

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

БОРОДКИНА
Александра Васильевна

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ОТВЕТОВ ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА НА ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС**

03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
к.х.н. Е.Б. Бурова

Санкт-Петербург
2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ.....	7
Актуальность исследования	7
Цель и задачи исследования	8
Основные положения, выносимые на защиту	8
Научная новизна	9
Теоретическая и практическая значимость.....	10
Публикации	10
Апробация работы	10
Список работ, опубликованных по теме диссертации.....	11
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 Основные понятия биологии стволовых клеток.....	13
1.1.1 Основные этапы в истории открытия и изучения стволовых клеток	13
1.1.2 Определение, свойства и классификация стволовых клеток	14
1.1.3 Идентификация стволовых клеток	19
1.1.4 Мезенхимные стволовые клетки из десквамированного эндометрия	20
1.2 Стволовые клетки и стресс	22
1.2.1 Окислительный стресс и стволовые клетки человека	22
1.2.2 Различные реакции эмбриональных и мезенхимных стволовых клеток человека на стресс	23
1.3 Апоптоз.....	24
1.3.1 Основные маркеры апоптоза.....	24
1.3.2 Внутриклеточная машинерия апоптоза	25
1.4 Феномен старения клеток	27
1.4.1 Репликативная и стресс-индуцированная формы клеточного старения.....	27
1.4.2 Укорочение теломер, как одна из причин развития старения	28
1.5 Механизмы, лежащие в основе клеточного старения.....	29
1.5.1 Инициация клеточного старения в ответ на повреждение ДНК	29
1.5.2 Активация DDR приводит к индукции блока клеточного цикла	31
1.5.3 Для установления и развития старения необходима постоянная активация DDR.....	33
1.5.4 Роль АФК в развитии клеточного старения	34
1.5.5 Митохондрии – основной источник эндогенных АФК.....	36
1.5.6 Вклад митохондрий в развитие клеточного старения	37

1.5.7 Участие ферментов антиоксидантной защиты в клеточном старении	38
1.5.8 p38 MAPK играет важную роль как в репликативном, так и в стресс-индуцированном старении клеток	39
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	42
2.1 Клеточные линии и особенности их культивирования.....	42
2.2 Моделирование окислительного стресса и условия обработки клеток	42
2.3 Оценка жизнеспособности методом МТТ.....	43
2.4 Метод проточной цитофлуориметрии.....	43
2.4.1. Анализ апоптотических клеток, окрашенных с помощью йодида пропидия и конъюгата Annexin V/FITC	43
2.4.2. Анализ распределения по фазам клеточного цикла, выживаемости и размера клеток с помощью метода проточной цитометрии	44
2.4.3. Измерение уровня внутриклеточных АФК и митохондриальных пероксидов, совокупной митохондриальной массы и мембранного потенциала митохондрий (ММП)..	44
2.5 Использование конфокальной микроскопии для оценки внутриклеточных АФК, клеточных пероксидов, ММП и митохондриальной массы	45
2.6 Электрофорез и иммуноблотинг	45
2.6.1. Приготовление проб для электрофоретического разделения	45
2.6.2. Электрофорез белков в полиакриламидном геле.....	45
2.6.3. Иммуноблотинг со специфическими антителами.....	46
2.7 Анализ экспрессии генов	47
2.8 Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток	48
2.9 Выявление активности SA- β -Gal	49
2.10 Используемые реактивы, ингибиторы и антиоксиданты.....	49
2.11 Статистическая обработка данных	49
3. РЕЗУЛЬТАТЫ	51
3.1. Оценка устойчивости различных типов клеток к окислительному стрессу.....	51
3.2. Исследование характера гибели ЭСК, фибробластов и эМСК при окислительном стрессе	52
3.2.1. H ₂ O ₂ -индуцированный апоптоз ЭСК	53
3.2.2. Гибель фибробластов при окислительном стрессе	55
3.2.3. Характер ответа эМСК на разные дозы H ₂ O ₂	56
3.3. Исследование ответа фибробластов на действие H ₂ O ₂ в сублетальной концентрации	59
3.3.1. Индукция преждевременного старения фибробластов после обработки 200 мкМ H ₂ O ₂	59
3.4. Преждевременное старение эМСК в ответ на действие H ₂ O ₂ в сублетальной концентрации	61
3.4.1. Развитие фенотипа преждевременного старения в H ₂ O ₂ -обработанных эМСК	61

3.4.2. Остановка пролиферации и арест клеточного цикла в H_2O_2 -обработанных эМСК	63
3.4.3. Реализация блока клеточного цикла в H_2O_2 -обработанных эМСК.....	66
3.5. Исследование механизма, лежащего в основе стресс-индуцированного старения эМСК.	68
3.5.1. Быстрое накопление экзогенной H_2O_2 в эМСК.....	68
3.5.2. Ранняя активация ответа на повреждение ДНК вследствие проникновения H_2O_2 в эМСК	69
3.5.3. Активация MAP-киназных путей в эМСК в условиях окислительного стресса	73
3.5.4. Развитие H_2O_2 -индуцированного старения эМСК опосредовано повышением уровня эндогенных АФК вследствие роста митохондриальной активности	74
3.5.5. Повышение уровня эндогенных АФК приводит к продолжительной активации DDR в процессе развития H_2O_2 -индуцированного старения эМСК.....	79
3.6. Пути предотвращения преждевременного старения эМСК в условиях окислительного стресса.....	82
3.6.1. Использование различных антиоксидантов для предотвращения индуцированного преждевременного старения эМСК.....	82
3.6.2. Ингибирование MAP-киназы p38 частично предотвращает развитие H_2O_2 -индуцированного старения эМСК.....	90
4. ОБСУЖДЕНИЕ	99
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	113
ВЫВОДЫ	114
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	115

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- АФК – активные формы кислорода
- ГСК – гемопоэтические стволовые клетки
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- кДНК – комплементарная ДНК
- ММП – мембранный потенциал митохондрий
- МПК – мобилизованная периферическая кровь
- МСК – мезенхимные стволовые клетки
- мтДНК – митохондриальная ДНК
- ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- СК – стволовые клетки
- ССК – соматические стволовые клетки
- ЭГДА – этиленгликоль бис (бета-аминоэтил эфир)-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты
- ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
- эМСК – мезенхимные стволовые клетки эндометрия
- ЭСК – эмбриональные стволовые клетки
- AnV – аннексин V
- ASK1 – апоптоз-стимулирующая киназа 1
- BIRB 796 – 1-(3-(tert-butyl)-1-(p-tolyl)-1H-pyrazol-5-yl)-3-(4-(2-morpholinoethoxy) naphthalen-1-yl) urea
- BSA – бычий сывороточный альбумин
- CD – кластер дифференцировки
- DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндола дигидрохлорид
- DDR – ответ на повреждение ДНК
- DHR123 – дигидрородамин123
- DMEM – питательная среда Игла в модификации Дюльбекко
- DMSO – диметилсульфоксид
- DPI – дифенилениодоний
- DSB – двойные разрывы ДНК
- FBS – бычья эмбриональная сыворотка
- FITC – флюоресцеин изотиоцианат
- GPX – глутатионпероксидаза
- H₂DCF-DA – 2,7-дихлорфлюоресцеин диацетат

H₂O₂ – перекись водорода

HLA – главный комплекс гистосовместимости

МАРК – митоген-активируемая протеинкиназа

МАРКАРК-2 – протеин киназа-2, активируемая МАР-киназой

МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид

NAC – N-ацетил-L-цистеин

NAO – нонил-акридиновый оранжевый

PBS – фосфатно-солевой буфер

PI – йодистый пропидий

PMSF – фенилметилсульфонилфторид

Rb – белок ретинобластомы

Rho123 – родамин123

SA-β-Gal – ассоциированная со старением β-галактозидаза

SB203580 – 4-(4-fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl) imidazole

SDS – додецилсульфат натрия

SOD – супероксиддисмутаза

TAE – трис-ацетатный буфер с этилендиаминтетрауксусной кислотой

TTBS – фосфатно-солевой буфер с Tween 20

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

В 2007 году в десквамированном эндометрии, содержащемся в менструальной крови, впервые были обнаружены стволовые клетки мезенхимной природы (эМСК) (Meng et al., 2007). Позднее было показано, что эМСК обладают существенными преимуществами по сравнению с мезенхимными стволовыми клетками (МСК), полученными из других источников: при длительном культивировании такие клетки сохраняют стабильный кариотип и высокую пролиферативную активность. Особо следует отметить способ изоляции эМСК, не инвазивный и не травматичный для пациента. Интересно, что с момента изоляции и идентификации эМСК до их клинического применения прошло всего два года (Zhong et al., 2009). Более того, продолжает расти число сообщений о положительных результатах трансплантации эМСК людям, страдающим такими заболеваниями, как рассеянный склероз, мышечная дистрофия Дюшена и сердечная недостаточность (Zhong et al., 2009; Ichim et al., 2010; Bockeria et al., 2013; Ulrich et al., 2013). Учитывая быстрый переход от открытия до клинического применения эМСК, не удивительно, что до сих пор остаётся множество «белых пятен» в области фундаментальных исследований этих клеток, в частности, молекулярных механизмов их ответа на различные типы стресса, моделирующие возможные стрессовые условия, которые являются причиной или сопутствующим фактором ряда заболеваний.

Сравнительно недавно было обнаружено, что МСК, аналогично другим типам пролиферирующих клеток, в условиях субцитотоксического стресса могут подвергаться преждевременному старению (Wang, Jang, 2009). Характерными особенностями этого феномена является то, что старые клетки, оставаясь метаболически активными, находятся в состоянии необратимого ареста клеточного цикла и, соответственно, перестают делиться (d'Adda di Fagagna, 2008). Важно понимать, что остановка пролиферации стволовых клеток равносильна утрате их способности к регенерации поврежденных тканей. Прогрессия многих заболеваний различной природы, для которых описано успешное применение эМСК, сопровождается локальным окислительным стрессом (Agarwal et al., 2005; Di Filippo et al., 2006; Tsutsui et al., 2011; Terrill et al., 2013). При этом возникают ситуации, когда после трансплантации эМСК оказываются в неблагоприятном микроокружении, которое может индуцировать их преждевременное старение (Wehrwein, 2012). Кроме того, стареющие клетки секретируют во внеклеточное пространство множество различных факторов, которые могут инициировать канцерогенез в соседних клетках, повышая тем самым риск развития рака при трансплантации (Moiseeva et al., 2013). С учетом этих обстоятельств, фундаментальные исследования преждевременного старения стволовых клеток имеют большую практическую значимость – в первую очередь, для тканевой инженерии.

Ввиду широкого применения эМСК в заместительной терапии и ограниченного на сегодняшний день объема известных сведений о реакции этих стволовых клеток на стресс (в частности, на окислительное воздействие), изучение возможности индукции преждевременного старения наряду с детализацией молекулярных механизмов, лежащих в основе его развития, является весьма актуальным. Не менее важной представляется проблема предотвращения развития преждевременного старения, индуцированного в условиях окислительного стресса, решение которой в перспективе должно способствовать повышению эффективности использования эМСК в регенеративной медицине.

Цель и задачи исследования

Цель работы состояла в исследовании молекулярных механизмов ответов эндометриальных стволовых клеток человека на окислительный стресс. Для достижения указанной цели были поставлены следующие конкретные задачи исследования:

1. Провести сравнительный анализ устойчивости эндометриальных стволовых клеток (эМСК) и эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека к окислительному стрессу, индуцированному действием H_2O_2 .
2. Исследовать реакцию эМСК и ЭСК на действие H_2O_2 в высоких дозах, превышающих LD_{50} .
3. Выявить возможность индукции преждевременного старения эМСК в ответ на сублетальный окислительный стресс.
4. Исследовать молекулярные механизмы, лежащие в основе стресс-индуцированного преждевременного старения эМСК.
5. Оценить возможность предотвращения преждевременного старения эМСК в условиях снижения уровня эндогенных активных форм кислорода (АФК), а также ингибирования активности p38 MAPK.

Основные положения, выносимые на защиту

1. эМСК характеризуются более высокой устойчивостью к окислительному стрессу, индуцированному действием H_2O_2 , по сравнению с ЭСК.
2. В культурах ЭСК и эМСК в ответ на высокие, превышающие LD_{50} , дозы H_2O_2 , индивидуальные для каждого типа клеток, развивается апоптоз, опосредованный активацией каспаз-8 и -3. Однако динамика и характер апоптоза существенно различаются в разных типах стволовых клеток. Если в ЭСК апоптоз индуцируется быстро и затрагивает большую часть популяции клеток, то лишь небольшая часть популяции эМСК подвергается апоптозу, при этом для него характерна значительно более медленная динамика.

3. Действие H_2O_2 в сублетальной концентрации (200 мкМ) приводит к необратимой потере пролиферативного потенциала и развитию фенотипа преждевременного старения эМСК.
4. а) Индукция преждевременного старения эМСК включает быструю активацию ответа на повреждение ДНК с участием pATM, γ H2AX, p53BP1 и последующую передачу сигнала через Chk2/p53/p21/Rb и p38/MAPKAPK-2/Rb пути, приводящие к необратимому блоку клеточного цикла.
 б) Стабилизация преждевременного старения эМСК сопровождается повышенной продукцией эндогенных АФК за счет увеличения массы функционально активных митохондрий, что обеспечивает непрерывную активацию ответа на повреждение ДНК и перманентное функционирование p53/p21/Rb и p38/MAPKAPK-2/Rb путей.
5. а) Обработка клеток антиоксидантом N-acetyl-L-cysteine (NAC) частично предотвращает развитие H_2O_2 -индуцированного преждевременного старения эМСК.
 б) Ингибирование активности p38МАРК приводит к существенному снижению уровня эндогенных АФК и частичному уменьшению основных митохондриальных показателей, тем самым способствуя частичному предотвращению развития преждевременного старения эМСК.

Научная новизна

Проведен сравнительный анализ устойчивости эМСК и ЭСК к окислительному стрессу, индуцированному действием H_2O_2 . Впервые показано, что эМСК характеризуются чрезвычайно высокой устойчивостью к окислительному стрессу, тогда как ЭСК демонстрируют высокую чувствительность к стрессу. При исследовании реакций стволовых клеток на высокие дозы H_2O_2 было установлено, что большая часть популяции ЭСК быстро подвергается апоптозу в ответ на действие H_2O_2 в широком диапазоне концентраций. Напротив, апоптоз инициируется лишь в небольшой части популяции эМСК при действии H_2O_2 в высоких дозах и характеризуется значительно более медленной динамикой. Впервые обнаружено, что в обоих типах стволовых клеток индукция апоптоза опосредована активацией каспаз-8 и -3.

Впервые продемонстрировано, что эМСК подвергаются преждевременному старению в условиях сублетального окислительного стресса. Мы также впервые исследовали молекулярный механизм, лежащий в основе инициации и стабилизации стресс-индуцированного старения эМСК. Показано, что процесс инициации старения в эМСК опосредован активацией ответа на повреждение ДНК, приводящего к блоку клеточного цикла через ATM/Chk2/p53/p21/Rb сигнальный путь. Процесс стабилизации связан с повышением продукции эндогенных АФК за счет увеличения функциональной активности митохондрий в

стареющих клетках и поддержания ответа на повреждение ДНК в постоянно активном состоянии. Кроме того, впервые показано участие ASK1/p38/MAPKAPK-2/Rb пути в инициации и развитии старения, а также в регуляции продукции внутриклеточных АФК. Предложены варианты обработки клеток, обеспечивающие частичное предотвращение развития H₂O₂-индуцированного старения эмСК с использованием антиоксиданта NAC и ингибитора p38.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическое значение работы состоит в расширении представлений о механизмах ответа эндометриальных стволовых клеток на стрессовые воздействия. В настоящее время показана ключевая роль окислительного стресса в прогрессии различных заболеваний, приводящих к женскому бесплодию (Gupta et al., 2014), в снижении эффективности процедуры экстракорпорального оплодотворения (Das et al., 2006) и в возрастном снижении фертильности женщин (Agarwal et al., 2005). Если учесть, что трансплантация эмСК в полость матки женщин для коррекции фертильности в настоящее время находится на стадии активных клинических испытаний (Ulrich et al., 2013), понимание механизмов ответа эмСК на окислительный стресс имеет несомненную практическую значимость. Результаты данного исследования в перспективе могут внести существенные коррективы в разработку стратегии повышения репродуктивной функции женщин, основанной на принципах тканевой инженерии. Результаты работы могут быть также использованы в курсах лекций для студентов биологических и медицинских факультетов университетов и медицинских институтов.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК для размещения материалов кандидатских диссертаций (из них 2 статьи в зарубежных журналах), и 7 тезисов докладов.

Апробация работы

Результаты исследования представлены на IV съезде биофизиков России (Нижний Новгород, 2012), на III съезде Общества клеточной биологии (Санкт-Петербург, 2012), на 38-ом и 39-ом конгрессах федерации европейских биохимических обществ (FEBS EMBO) (Россия, Санкт-Петербург, 2013 и Франция, Париж, 2014), на III международной конференции «Genetics of Aging and Longevity» (Сочи, 2014), на XVII всероссийском симпозиуме "Структура и функции клеточного ядра" (Санкт-Петербург, 2014).

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Бурова Е.Б., Люблинская О.Г., Шатрова А.Н., **Бородкина А.В.**, Никольский Н.Н. 2012. Сравнительный анализ устойчивости к окислительному стрессу стволовых клеток эндометрия и фибробластов человека. Цитология. 54(6) : 478–483.
2. Burova E.B., **Borodkina A.V.**, Shatrova A.N., Nikolsky N.N. 2013. Sublethal oxidative stress induces the premature senescence of human mesenchymal stem cells derived from endometrium. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2013 : Article ID 474931.
3. **Бородкина А.В.**, Шатрова А.Н., Пуговкина Н.А., Земелько В.И., Никольский Н.Н., Бурова Е.Б. 2013. Различные защитные механизмы эмбриональных и тканеспецифичных стволовых клеток человека в условиях окислительного стресса. Цитология. 55(8) : 517–526.
4. **Borodkina A.V.**, Shatrova A.N., Abushik P.A., Nikolsky N.N., Burova E.B. 2014. Interaction between ROS dependent DNA damage, mitochondria and p38 MAPK underlies senescence of human adult stem cells. *Aging*. 6(6) : 481–495.

Тезисы докладов:

1. **Бородкина А.В.**, Шатрова А.Н., Пуговкина Н.А., Никольский Н.Н., Бурова Е.Б. 2012. Реакции эмбриональных и мезенхимных стволовых клеток человека на окислительный стресс. Нижний Новгород. Тезисы IV съезда биофизиков России. Сборник материалов симпозиума III "Физика в медицине и экологии" IV Съезда биофизиков России. С. 36.
2. **Бородкина А.В.**, Шатрова А.Н., Пуговкина Н.А., Бурова Е.Б. 2012. Влияние окислительного стресса на жизнеспособность эмбриональных и тканеспецифичных стволовых клеток человека. Санкт-Петербург. Тезисы III съезда общества клеточной биологии. Цитология. 54(9) : 669.
3. **Borodkina A.V.**, Shatrova A.N., Nikolsky N.N., Burova E.B. 2013. Oxidative stress-induced premature senescence of human endometrium-derived mesenchymal stem cells. Abstracts of the 38th FEBS Congress. Saint-Petersburg, Russia. *FEBS Journal*. 280 : 245–246.
4. **Borodkina A.V.**, Shatrova A.N., Nikolsky N.N., Burova E.B. 2014. Oxidative DNA damage and premature senescence of endometrium-derived human mesenchymal stem cells. Sochi, Russia. Abstracts of the 3rd International Conference «Genetics of Aging and Longevity». Abstract book. P. 37.
5. Burova E.B., **Borodkina A.V.**, Shatrova A.N., Nikolsky N.N. 2014. Interplay between ROS, DNA damage, p38MAPK and mitochondria is required for premature senescence of endometrial stem cells. Paris, France. Abstracts of the 39th FEBS EMBO. *FEBS Journal*. 281 : 74–75.

6. **Бородкина А.В.**, Шатрова А.Н., Никольский Н.Н., Бурова Е.Б. 2014. Роль p38 MAPK в развитии преждевременного старения стволовых клеток эндометрия человека в условиях окислительного стресса. Санкт-Петербург. Тезисы XVII Всероссийского симпозиума «Структура и функции клеточного ядра». Цитология. 56(9) : 646.
7. **Бородкина А.В.**, Шатрова А.Н., Никольский Н.Н., Бурова Е.Б. 2014. Использование N-ацетил-L-цистеина для предотвращения H₂O₂-индуцированного преждевременного старения стволовых клеток эндометрия человека. Санкт-Петербург. Тезисы XVII Всероссийского симпозиума «Структура и функции клеточного ядра». Цитология. 56(9) : 646–647.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Основные понятия биологии стволовых клеток

1.1.1 Основные этапы в истории открытия и изучения стволовых клеток

Открытие понятия, а чуть позднее и термина, «стволовая клетка» в историческом аспекте связано с именем русского ученого-гистолога А.А. Максимова, который в своей статье 1909 года высказал предположение, что в нашем организме пожизненно сохраняются недифференцированные клетки, которые могут превращаться в специализированные клетки крови и соединительной ткани (Maximow, 1909) (**рис. 1**).

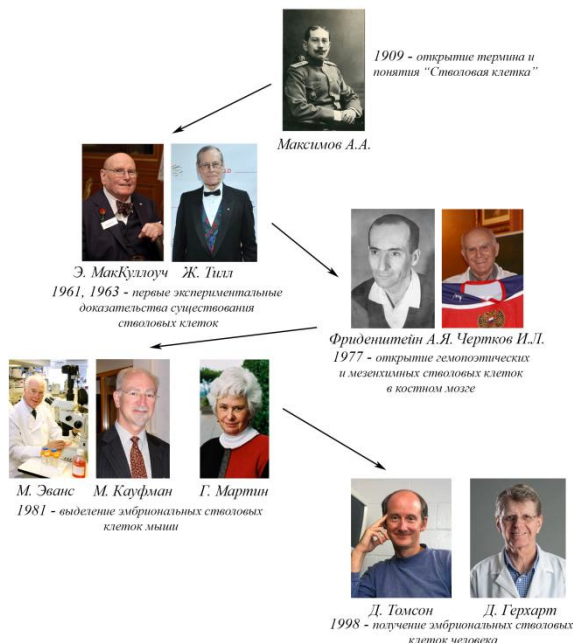


Рис. 1. Ученые и их вклад в историю развития биологии стволовых клеток.

В середине XX века на клетках костного мозга были получены первые экспериментальные доказательства существования стволовых клеток (СК). Так, в 1961 году двумя канадскими биологами была опубликована статья, в которой описывались результаты экспериментов по введению взвеси донорского костного мозга смертельно облученным мышам, у которых через 1–2 недели формировались макроскопические колонии пролиферирующих клеток (Till, McCulloch, 1961) (**рис. 1**). В 1963 году в журнале «Nature» была издана еще одна статья этих же ученых в соавторстве с А. Бекером, в которой с помощью метода хромосомных маркеров было продемонстрировано, что каждая такая колония представляет собой клон – потомство одной клетки (Becker et al., 1963). Чуть позднее российские ученые А.Я. Фриденштейн и И.Л. Чертков в своей статье 1977 года описали существование двух видов СК в костном мозге – гемопоэтических, являющихся предшественниками всех типов клеток крови, и стромальных (мезенхимных) стволовых клеток (Чертков, Фриденштейн, 1977) (**рис. 1**).

В 1981 году двумя независимыми группами ученых в Кембриджском Университете (Evans, Kaufman, 1981) и в Калифорнийском Университете (Martin, 1981) из внутренней клеточной массы бластоцисты были получены эмбриональные стволовые клетки мыши (**рис. 1**). С этого времени все усилия ученых в этой области были направлены на получение эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) из зародыша человека, пока в 1998 году Д. Томсон не опубликовал статью о выделении 5 бессмертных линий эмбриональных стволовых клеток из эмбриобласта бластоцисты человека в журнале «Science» (Thomson et al., 1998) (**рис. 1**).

Одновременно другой американский ученый Джон Герхарт предложил метод выделения бессмертных линий ЭСК из полового бугорка 4-5 недельных фетусов (Shamblott et al., 1998) (рис. 1). Начиная с этого момента и до настоящего времени, изучение стволовых клеток находится на переднем крае науки.

1.1.2 Определение, свойства и классификация стволовых клеток

Согласно одному из определений, стволовые клетки представляют собой группу клеток-предшественников, обладающих способностью к самообновлению и дифференцировке в специализированные ткани. В основе этого определения лежат фундаментальные свойства, присущие СК. Во-первых, самоподдержание – свойство, под которым понимается способность одной (при ассиметричном делении) или обеих (при симметричном делении) дочерних клеток полностью воспроизводить свойства материнской, что позволяет СК сохранять пролиферативный потенциал на протяжении всей жизни организма. Во-вторых, стволовые клетки способны к дифференцировке, т.е. к процессу специализации клеток под действием различных стимулов.

На сегодняшний день существует несколько классификаций стволовых клеток, наиболее распространенными из которых являются две: по способности к дифференцировке и по источнику происхождения. Согласно первой классификации принято выделять следующие типы СК (Wobus, Boheler, 2005) (рис. 2):

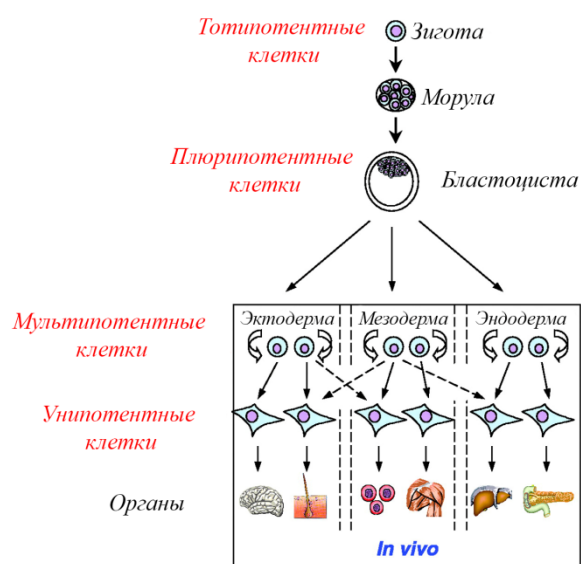


Рис. 2. Классификация стволовых клеток по способности к дифференцировке (Wobus, Boheler, 2005).

- 1) тотипотентные – способны формировать все эмбриональные и экстраэмбриональные типы клеток – к ним относятся эмбриональный ооцит и бластомеры 2-8 клеточных стадий;
- 2) плюрипотентные – способны формировать ткани производные всех трех зародышевых листков (энтодермы, мезодермы, эктодермы) – к ним относятся эмбриональные стволовые клетки, первичные половые клетки и клетки эмбриональных карцином;
- 3) мультипотентные – клетки, способные дифференцироваться во многие, но не все линии клеток, обычно в пределах одного зародышевого листка;
- 4) унипотентные – способны к дифференцировке только в клетки определенных тканей.

По источнику происхождения стволовые клетки, как правило, подразделяются на эмбриональные, первичные половые и соматические клетки. При этом по способности к дифференцировке эмбриональные стволовые клетки принято относить к плюрипотентным, а соматические СК могут быть либо мультипотентными, либо унипотентными (Fortier, 2005).

1.1.2 а) Эмбриональные стволовые клетки

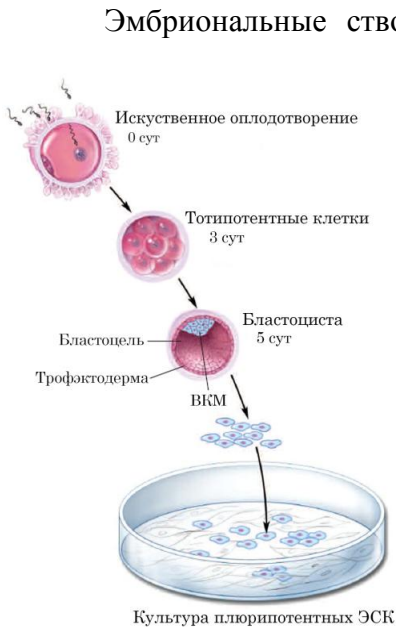


Рис. 3. Схема выделения ЭСК человека (Winslow, 2006).

Эмбриональные стволовые клетки получают из эмбрионов на стадии развития до имплантации. После оплодотворения, обычно происходящего в маточной трубе, и в течение следующих нескольких дней при движении из яйцевода в матку эмбрион проходит несколько делений дробления. Результатом этих делений является образование недифференцированных бластомеров, каждый из которых потенциально может дать начало целому организму. На пятый день после оплодотворения эмбрион претерпевает первый акт дифференцировки, предопределяющий появление двух клеточных типов, образующих трофобластическую и внутреннюю клеточную массу. Именно этот временной промежуток (4-6 суток) считается оптимальным для выделения ЭСК из внутренней клеточной массы бластоцист человека. Важно отметить, что выделение ЭСК человека стало возможным только после внедрения в медицинскую практику метода экстракорпорального оплодотворения. При использовании этого метода всегда остаются бластоцисты, которые не употребляются для подсадки в организм женщины и либо уничтожаются, либо сохраняются в замороженном виде в жидком азоте. ЭСК успешно изолируют из ВКМ бластоцист несколькими методами: с помощью избирательного комплемент-зависимого лизиса бластоцист с последующим удалением трофобластов или путем растворения гликопротеиновой мембраны бластоцист ферментом проназой (Heins et al., 2004). После процедуры выделения клетки помещают в культуральную среду на подложку из инактивированных мышинных эмбриональных фибробластов, которые служат источником ростовых факторов (Киселев, Лагарькова, 2006) (рис. 3).

Эмбриональные стволовые клетки обладают высокой пролиферативной активностью и теоретически способны дифференцироваться во все ткани взрослого организма, что является их главным достоинством при возможном использовании в клинике. На сегодняшний день, описана возможность дифференцировки ЭСК *in vitro* в экстраэмбриональные клеточные линии, включая клетки трофобласта и энтодермы (Hay et al., 2004); в клетки эктодермального

происхождения (клетки-предшественницы нервной ткани, дающие начало астроцитам, нейронам и олигодендроцитам) (Schulz et al., 2003); в клетки мезодермального происхождения – эндотелиальные клетки (Levenberg et al., 2002) и кардиомиоциты (Xu et al., 2002), а также в клетки энтодермального происхождения – клетки-предшественницы поджелудочной железы (Assady et al., 2001) и гепатоцитов (Rambhatla et al., 2003).

Несмотря на столь значительный потенциал ЭСК, использование этих клеток для терапевтических нужд в настоящее время по ряду причин ограничено. Во-первых, следует отметить этические проблемы, возникающие при работе с ЭСК, обусловленные необходимостью разрушения преимплантационных бластоцист для изоляции этих клеток. Во-вторых, при использовании аллогенного материала может возникать иммунный конфликт и отторжение дифференцированных ЭСК при трансплантации (Fairchild et al., 2004). Кроме того, используемые методики дифференцировки ЭСК не дают 100 %-ной гарантии, что все клетки в культуре дифференцировались, существенно повышая, таким образом, риск формирования тератом и тератокарцином в организме реципиента. В связи с этим для дальнейшего использования ЭСК в регенеративной медицине важным вопросом является разработка методов удаления из культур трансплантируемых клеток недифференцированных плюрипотентных клеток. Интересно отметить, что к настоящему моменту группе ученых из Стенфордского института биологии стволовых клеток и регенеративной медицины удалось разработать комбинацию антител, включающих anti-SSEA-5, которые с высокой специфичностью связываются только с плюрипотентными клетками (Tang et al., 2014). Применение такого подхода привело к достаточно продуктивному очищению культур дифференцированных клеток от нативных ЭСК, хотя в отдельных случаях культуры все же оставались тератогенными. Таким образом, несмотря на очевидную уникальность свойств ЭСК, возможность их использования в регенеративной медицине на сегодняшний день остается под вопросом.

1.1.2 б) Соматические стволовые клетки

Соматические стволовые клетки (ССК) являются постнатальными, т.е. их получают после рождения организма. На сегодняшний день ССК идентифицированы в большинстве тканей взрослого организма, включая кожу, желудочно-кишечный тракт, печень, головной мозг и костный мозг и др. (Пальцев и др., 2006). По способности к дифференцировке потенциал ССК существенно меньше по сравнению с ЭСК: ССК могут быть мультипотентными и унипотентными. Наиболее подробно изучены стволовые клетки костного мозга – гемопоэтические (ГСК) и мезенхимные (МСК).

ГСК дают начало всем клеткам крови миелоидного (моноциты, макрофаги, нейтрофилы, базофилы, эозинофилы, эритроциты, мегакариоциты, тромбоциты, дендритные клетки) и лимфоидного рядов (Т-, В-лимфоциты, естественные киллеры) (Bellantuono, 2004) (**рис. 4**). Морфологически ГСК представляют собой относительно однородную совокупность клеток с круглыми ядрами, мелкодисперсным хроматином и небольшим количеством слабобазофильной

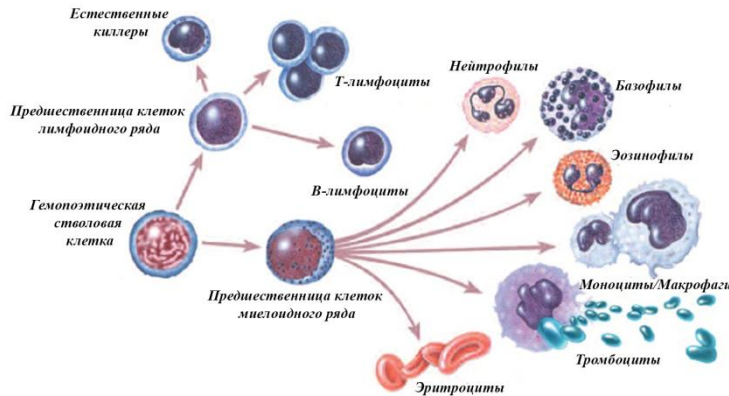


Рис. 4. Дифференцировка гемопоэтических стволовых клеток (Winslow, 2006).

цитоплазмы (Андреева и др., 1999; Woods et al., 2001). Традиционно основным источником этих клеток принято считать костный мозг, и действительно, во взрослом организме при нормальных условиях большинство ГСК локализовано именно там. Кроме

того, при стимуляции кроветворения различными цитокинами огромное число ГСК поступает в

периферическую кровь – такой источник принято называть мобилизованной периферической кровью (МПК) (Kurtzberg et al., 1996; De Bruyn et al., 2000; Wang et al., 2009). Интересно, что при непосредственном сравнении трансплантационного материала из костного мозга и МПК одних и тех же доноров оказалось, что периферическая кровь содержит в несколько раз больше ГСК, чем костный мозг (Singhal et al., 2000). Еще одним источником ГСК является пуповинная кровь (Laughlin, 2001; Barker, Wagner, 2003; Koh, Chao, 2004), причем считается, что она содержит клетки ранних предшественников кроветворения в большей концентрации, чем нормальный костный мозг взрослых людей (Timeus et al., 1998).

Второй основной тип соматических стволовых клеток – МСК. Проведенные в конце прошлого века исследования позволили установить основные отличия МСК от ГСК. Во-первых, при культивировании аспиратов костного мозга в низком разведении МСК прикрепляются к поверхности, то есть они адгезивны к пластику, что не свойственно ГСК. Во-вторых, МСК обладают клоногенностью, что приводит к формированию колониеобразующих фибробластоподобных единиц из одной СК. Кроме того, эти клетки могут успешно пролиферировать *in vitro* в присутствии таких митогенов, как тромбоцитарный фактор роста, эпидермальный фактор роста, основной фактор роста фибробластов-2 и инсулиноподобный фактор роста-1 (Пальцев и др., 2006). Долгое время главным источником этих клеток являлся костный мозг. Позднее МСК были выделены из скелетной мышцы (Williams et al., 1999), жировой ткани (Zuk et al., 2001), пупочного канатика (Erices et al., 2000), синовиальной

оболочки (De Bari et al., 2001), периферической крови (Kuznetsov et al., 2001), пульпы зуба (Gronthos et al., 2000) и амниотической жидкости (Prusa et al., 2003; Tsai et al., 2004). Основной характеристикой МСК является их способность дифференцироваться в трех основных направлениях – в остеобласты, хондроциты и адипоциты (Weissman, 2000). Более того, в ряде работ была описана способность МСК к дифференцировке в клетки не мезенхимальных тканей (Herzog et al., 2003; Wagers, Weissman, 2004; da Silva Meirelles et al., 2006). Подобная трансформация стволовых клеток получила название «пластичности» (Minguell et al., 2001). Изначально было показано, что костный мозг содержит миогенные клетки-предшественники, пригодные для трансплантации (Ferrari et al., 1998). Затем было выявлено, что клетки костного мозга могут образовывать клетки нервной ткани (Mezey et al., 2000), гепатоциты (Petersen et al., 1999) и кардиомиоциты (Orlic et al., 2001). Кроме того, было обнаружено, что мезенхимальным стволовым клеткам присущ нейрогенный потенциал, реализуемый под действием нейроиндукторов – ретиноевой кислоты (RA) и фактора роста нервов NGF (Sanchez-Ramos et al., 2001) и спонтанно под воздействием соответствующего микроокружения (Kopen et al., 1999). Установлено, что МСК обладают способностью проникать через гематоэнцефалический барьер и мигрировать от места введения к различным областям мозга (Kopen et al., 1999). Также было показано, что миогенез и кардиомиогенез можно вызвать при добавлении в культуру аскорбиновой кислоты, дексаметазона и 5-азациитидина (Shim et al., 2004). Именно благодаря таким свойствам, как высокая скорость пролиферации, позволяющая нарастить достаточное количество клеток для трансплантации, и способность к дифференцировке и трансдифференцировке в разные клеточные линии МСК представляют особый интерес для научных и клинических исследований.

В заключение, представляется важным подчеркнуть преимущества применения ССК в регенеративной медицине: (1) ССК можно получать из тканей пациентов, что снимает проблему иммунологического отторжения; (2) стволовые клетки из дифференцированных тканей не способствуют образованию тератом; (3) терапевтическое использование стволовых клеток пациента не вызывает серьезных этических вопросов (Fischbach, Fischbach, 2004). Так, согласно экспериментальным медицинским протоколам, опубликованным Food and Drug Administration USA (FDA), на сегодняшний день ССК успешно применяются при терапии болезни Паркинсона и Альцгеймера, заболеваний печени, инфаркта миокарда, повреждений костей и хрящей, аутоиммунных заболеваний, анемии, сахарного диабета первого типа и иммунодефицитов (с использованием генной терапии).

1.1.3 Идентификация стволовых клеток

Важным вопросом в биологии СК является их идентификация. Наиболее распространенный способ характеристики СК на сегодняшний день основан на различиях в экспрессии маркеров клеточной поверхности (CD, cluster of differentiation). За основу CD-номенклатуры клеток принята специфичность мышиных моноклональных антител к лейкоцитарным антигенам человека.

Недифференцированные ЭСК человека могут быть охарактеризованы по экспрессии таких поверхностных маркеров, как SSEA3 (Stage-Specific Embryonic Antigen-3), SSEA4 (Stage-Specific Embryonic Antigen-4), TRA-1-60 (Tumor Rejection Antigen-1-60), TRA-1-81 (Tumor Rejection Antigen-1-81), Gctm-2 (Germ cell tumor marker-2) (Stewart et al., 2006). Важно отметить, что наличие этих маркеров не является достаточным для идентификации ЭСК. Еще одним важным свидетельством эмбрионального происхождения стволовых клеток является экспрессия транскрипционных факторов Oct4 (POU5F1), Sox2 ((sex determining region Y)-box 2), Nanog, регулирующих плюрипотентность ЭСК. Однако самым убедительным доказательством является *in vivo* тест, подтверждающий плюрипотентность этих клеток. Суть теста заключается в том, что при введении ЭСК человека иммунодефицитным мышам у них наблюдается образование тератом, состоящих из тканей всех зародышевых листков (Odorico et al., 2001, Baharvand et al., 2004).

Для идентификации ГСК также существует соответствующий набор поверхностных маркеров. Так, для популяций ГСК характерно присутствие на мембране следующих маркеров: CD34 (маркер гемопоэтических клеток), CD133 (гемопоэтический/ангиобластный маркер), CD117 (c-kit, маркер гемопоэтических стволовых/прогениторных клеток). Кроме того, эти клетки не экспрессируют CD38 (маркер дифференцирующихся ГСК), CD235 (гликофорин А), CD2 (рецептор Т-клеток, натуральных киллеров, тимоцитов), CD3 (маркер Т-лимфоцитов), CD4 (маркер Т-хелперов), CD8 (маркер Т-клеток), CD15 (маркер эмбриональных стволовых клеток), CD16, CD19, CD20, CD56 (маркер нервных клеток) и CD66, а также большинство маркеров, характерных для зрелых клеток крови. Важно отметить, что для ГСК, как и для ЭСК, экспрессия характерных маркеров является необходимым, но не достаточным условием для их идентификации. В настоящее время одним из наиболее убедительных свидетельств гемопоэтической природы СК человека является трансплантация этих клеток ксеногенным донорам, в частности, иммунодефицитным мышам; результатом такого эксперимента является терминальная дифференцировка трансплантированных ГСК в клетки миелоидного и лимфоидного рядов (Bellantuono, 2004).

Говоря о МСК, в первую очередь стоит отметить, что большинство типов МСК не экспрессируют CD11b, CD45 (маркер лимфоцитов), гликофорин-А, CD34, CD14, CD19, CD79a,

а также антигены гистосовместимости HLA-DR. С другой стороны, у большинства МСК наблюдается экспрессия таких маркеров, как Stro-1 (маркер мезенхимных стволовых клеток), CD29, CD73, CD90, CD105, CD166 и CD44 (Abdallah et al., 2005; Foster et al., 2005; Dominici et al., 2006; Keating, 2006). Тем не менее, возможны некоторые вариации в экспрессии CD-маркеров при идентификации МСК, выделенных из разных источников. Важным свидетельством мезенхимной природы этих клеток является хорошая адгезивность к пластику и способность дифференцироваться в костную, хрящевую и жировую ткани.

1.1.4 Мезенхимные стволовые клетки из десквамированного эндометрия

Эндометрий человека представляет собой динамическую ткань, которая претерпевает около 400 циклов роста, обновления, дифференцировки и отслаивания в течение репродуктивной жизни женщины (Jabbour et al., 2006; Gargett, 2007). На гистологическом уровне в составе человеческого эндометрия принято выделять два слоя: базальный, который остается интактным во время менструального цикла, и функциональный, который почти полностью отслаивается в период менструации (Padykula, 1991; Patel et al., 2008; Umezawa, Makino, 2008). Предположения о существовании популяции резидентных стволовых клеток в эндометрии, ответственных за циклическую регенерацию функционального слоя, были высказаны более 30 лет назад Прянишниковым В.А. (Pranishnikov, 1978). Однако первые экспериментальные доказательства были получены значительно позже. Так, в 2004 году были опубликованы данные, свидетельствующие о наличии в базальном слое человеческого эндометрия клеток, экспрессирующих маркеры стволовых клеток CD117 и CD34 (Cho et al., 2004). В этом же году другие авторы, исследовавшие клоногенность клеток в составе эндометрия, выявили небольшую популяцию эпителиальных и стромальных клеток, обладающих высокой пролиферативной активностью и способностью к самообновлению (Chan et al., 2004). В течение последующих 7 лет было опубликовано еще 15 работ, подтверждающих существование резидентных стволовых клеток в человеческом эндометрии (Cervelló et al., 2013). Следует отметить, что в подавляющем большинстве исследований продемонстрирована

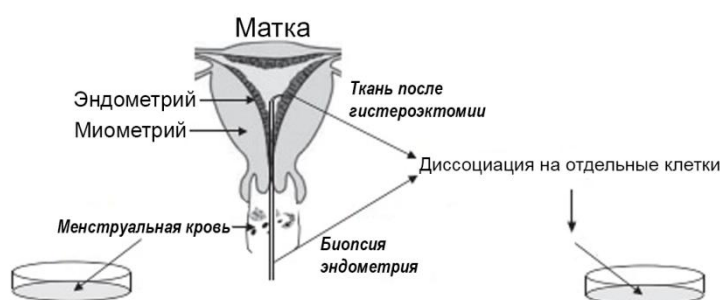


Рис. 5. Способы получения эндометриальных стволовых клеток человека (Gargett et al., 2012).

мезенхимальная природа этих клеток, как по экспрессии специфических поверхностных маркеров (CD90, CD105, CD73), так и по способности этих клеток дифференцироваться *in vitro* в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях. Одним из наиболее распространенных путей

получения эндометриальных стволовых клеток является забор биоптата через шейку матки (рис. 5). Несмотря на то, что такой способ не требует применения анестезии, в отличие от изоляции стволовых клеток спинного мозга или жировой ткани, все же он остается инвазивным и травматичным для пациента. Учитывая это обстоятельство и принимая во внимание, что стволовые клетки были обнаружены в отслаивающемся функциональном слое матки, возникло предположение, что эти клетки могут также содержаться и в отторгаемом вместе с менструальной кровью эндометрии. В 2007–2008 годах двум группам исследователей независимо друг от друга удалось выделить из десквамированного эндометрия в менструальной крови клетки, которые сохраняли стабильный кариотип при длительном культивировании (Meng et al., 2007; Patel et al., 2008). Согласно данным, опубликованным этими авторами, индекс пролиферации клеток, выделенных из менструальной крови, оказался значительно выше, чем у стволовых клеток пуповинной крови и костного мозга, являющихся на сегодняшний день наиболее распространенными источниками мезенхимных стволовых клеток. Еще одной характерной чертой этих клеток оказалась их способность дифференцироваться в 9 типов клеток всех трех зародышевых листков: мезодерму (остеоциты, хондроциты, миоциты), эктодерму (нейроны, астроциты, клетки эпидермиса) и энтодерму (гепатоциты, панкреатические клетки и клетки дыхательного эпителия) (Meng et al., 2007; Мусина и др., 2008; Patel et al., 2008). Таким образом, в течение последних 7 лет различными группами ученых были получены убедительные доказательства существования эндометриальных стволовых клеток в десквамированном эндометрии менструальной крови человека (ЭМСК).

Несмотря на относительно недавнюю историю обнаружения ЭМСК, уже опубликованы работы, касающиеся их практического применения. В частности, на моделях экспериментальных животных были получены многообещающие результаты при лечении таких заболеваний, как миопатия Дюшенна (Cui et al., 2007), инфаркт миокарда (Hida et al., 2008), ишемия нижних конечностей (Murphy et al., 2008), кроме того трансплантированные ЭМСК тормозили рост глиом у крыс (Han et al., 2009). Помимо данных, полученных на экспериментальных животных, на сегодняшний день есть несколько сообщений о положительных результатах трансплантации ЭМСК людям с различными заболеваниями, в том числе с рассеянным склерозом (Zhong et al., 2009), мышечной дистрофией Дюшенна (Ichim et al., 2010), сердечной недостаточностью (Bokeria et al., 2013), синдромом Ашермана (Nagori et al., 2011).

Исходя из всего выше сказанного, можно выделить ряд существенных преимуществ ЭМСК, являющихся основанием для разностороннего изучения этого нового типа клеток: (1) неинвазивный и легкодоступный способ получения, (2) высокий индекс пролиферации, (3) сохранение стабильного кариотипа при длительном культивировании, (4) успешное

применение для терапии экспериментальных животных и (5) перспективные результаты клинического применения на людях.

1.2 Стволовые клетки и стресс

1.2.1 Окислительный стресс и стволовые клетки человека

Термин «окислительный стресс» относится к состоянию клеток, которое характеризуется избыточной продукцией эндогенных активных форм кислорода (АФК) (супероксид-радикал $O_2^\bullet$, гидроксил-радикал $OH^\bullet$, перекись водорода H_2O_2) или возникает в результате действия больших концентраций экзогенных АФК. Несомненный интерес к окислительному стрессу обусловлен широкой вовлеченностью его во многие физиологические и патологические процессы, включая повреждение ДНК, пролиферацию, клеточную адгезию и выживание. Кроме того, показана важная роль окислительного стресса в прогрессии таких заболеваний, как рассеянный склероз (Gilgun-Sherki et al., 2004), миодистрофия (Terrill et al., 2013), болезнь Паркинсона (Hwang, 2013), женское бесплодие (Agarwal et al., 2005), сердечная недостаточность (Tsutsui et al., 2011), лечение которых в перспективе предполагает использование заместительной клеточной терапии. С другой стороны, всё больше сторонников в научных кругах находит точка зрения на окислительный стресс, как один из наиболее важных регуляторных механизмов для опухолевых, стволовых и раковых стволовых клеток. Последние годы пристальное внимание уделяется исследованию особенностей дифференцировки стволовых клеток, а также роли эндогенных АФК в этом процессе (Saretzki et al., 2008). При этом АФК рассматриваются как наиболее существенные мутагены, при повышенном уровне блокирующие самообновление и в то же время служащие сигналом для стимуляции дифференцировки стволовых клеток (Dayem et al., 2010). Для реализации способности к самообновлению стволовые клетки должны поддерживать низкий уровень АФК, что достигается благодаря высокой антиоксидантной ферментативской активности (Valle-Prieto, Conger, 2010), небольшому числу митохондрий в клетках и низкому уровню потребления кислорода (Piccoli et al., 2005; St. John et al., 2006). Предполагают, что митохондриальная активность в стволовых клетках может играть важную роль в балансе между самообновлением и дифференцировкой (Lyu et al., 2007). В процессе дифференцировки происходит повышение уровня внутриклеточных АФК, при этом значительно уменьшается уровень антиоксидантной защиты и усиливается биогенез митохондрий, что приводит, в конечном счете, к ослаблению регуляции многих защитных механизмов от стресса (Saretzki et al., 2008).

1.2.2 Различные реакции эмбриональных и мезенхимных стволовых клеток человека на стресс

В последнее десятилетие интенсивно исследуются реакции стволовых клеток человека, как эмбриональных, так и тканеспецифичных мезенхимной природы на различные стрессовые воздействия, включая УФ- и γ -излучение, тепловой шок и окислительный стресс, с целью разработки протоколов успешного применения этих клеток в регенеративной медицине (Otto, Wright, 2011; Tower, 2012). Интересно, что в зависимости от типа стволовых клеток, а также от типа и уровня стрессового воздействия ответная реакция клеток может заключаться в индукции пролиферации, дифференцировки, остановке клеточного цикла и репарации повреждений, старении, апоптозе или опухолевой трансформации. Например, мягкие стрессовые воздействия, такие как механическое воздействие (Stolberg, McCloskey 2009), электростимуляция (Hronik-Turaj et al., 2011) и мягкий тепловой шок (Chen et al., 2013), могут улучшать дифференцировку стволовых клеток, тогда как культивирование в условиях мягкой гипоксии приводит к усилению пролиферации стволовых клеток (Santilli et al., 2010). Именно на применении вышеупомянутых мягких стрессовых факторов основано много протоколов направленной дифференцировки СК in vitro.

Как известно, более высокие дозы стресса обычно приводят к развитию апоптоза. На основании данных литературы принято считать, что ЭСК чувствительны к различным стрессовым воздействиям, при этом поврежденные клетки удаляются из популяции путем апоптоза (Dumitru et al., 2012). Так, хорошо известны факты о значительной склонности ЭСК к апоптозу при увеличении температуры (Alekseenko et al., 2012), а также при действии повреждающих ДНК агентов, таких как ионизирующая радиация (Filion et al., 2009; Luo et al., 2012), этопозид (Grandela et al., 2007) или ингибитор топоизомеразы II (Velichko et al., 2011). Предполагается, что программируемая клеточная гибель ЭСК в ответ на действие различных стрессов, приводящая к быстрой элиминации поврежденных клеток из популяции, необходима для сохранения генетической стабильности (Dumitru et al., 2012).

Общепринято, что МСК являются более устойчивыми к индукции клеточной гибели, чем ЭСК (Liu et al., 2014). Однако данные, касающиеся апоптоза мезенхимных стволовых клеток, полученных из разных источников, свидетельствуют о различной устойчивости этих клеток (Ertaş et al., 2012). Так, при сравнении устойчивости МСК из костного мозга, жировой ткани и хряща к индуцированному окислительным стрессом апоптозу оказалось, что МСК из жировой ткани являются наиболее чувствительными, а из хрящевой ткани наиболее толерантными. При этом МСК из жировой ткани при сывороточном голодании были первыми в ряду устойчивости этих клеток (Peng et al., 2008).

Помимо перечисленных выше реакций клеток на стресс в многочисленных работах было показано, что пролиферирующие клетки в условиях субцитотоксического стресса могут

входить в состояние преждевременного старения после повреждения ДНК (УФ- и γ -излучение) (Medrano et al., 1995; Toussaint et al., 2000; Oh et al., 2001), окислительного стресса (Chen et al., 1998; Dumont et al., 2000; Toussaint et al., 2000; Duan et al., 2005; Brandl et al., 2011a), теплового шока (Alekseenko et al., 2012) или после обработки ингибиторами гистон-деацетилазы (Ogryzko et al., 1996; Demidenko et al., 2009). Недавние исследования выявили, что МСК, аналогично другим пролиферирующим типам клеток, включая диплоидные фибробласты кожи и легкого, меланоциты, эндотелиальные и эпителиальные клетки при субцитотоксическом стрессе *in vitro* могут подвергаться индуцированному преждевременному старению (Wang, Jang, 2009; Brandl et al., 2011b; Kim et al., 2011; Cmielova et al., 2012; Ko et al., 2012; Larsen et al., 2012; Burova et al., 2013). Таким образом, преждевременное клеточное старение представляет собой еще один возможный ответ клеток на стрессовое воздействие, при котором клетки остаются метаболически активными и продолжают существовать, однако, находятся в состоянии необратимого ареста клеточного цикла, что предотвращает пролиферацию поврежденных клеток (d'Adda di Fagagna, 2008). Считается, что выбор между индукцией апоптоза и клеточным старением в ответ на стрессовые воздействия определяется типом клеток, природой стресса, силой и длительностью воздействия.

1.3 Апоптоз

Наравне с возможностью регенерации и пролиферации, многоклеточные организмы имеют также механизмы элиминации поврежденных клеток, одним из которых является апоптоз. Согласно определению, апоптоз – это явление программируемой клеточной смерти, сопровождающейся характерными цитологическими признаками (маркеры апоптоза) и активацией специфических сигнальных каскадов.

1.3.1 Основные маркеры апоптоза

Термин апоптоз был введен в 1972 году Керром и соавторами для обозначения формы гибели клеток, прототипом которой является гибель тромбоцитов под действием глюкокортикоидов (Kerr et al., 1972). Несколько позднее три независимых группы исследователей с помощью электрофореза ДНК обнаружили, что хроматин в клетках после облучения распадается на отдельные фрагменты и образует специфический рисунок «лестницы» на геле (Skalka et al., 1976; Yamada et al., 1981; Zhivotovsky et al., 1981). А в 1984 году Вайли с соавторами, связав феномен образования такой «лесенки» с процессом апоптоза, добавил еще один специфический маркер к уже описанным морфологическим изменениям, характерным для апоптотических клеток (Wyllie et al., 1984). Эти результаты послужили толчком к появлению огромного числа работ, посвященных изучению механизмов развития апоптоза и возможности применения этих механизмистических представлений в противораковой

терапии (Thompson et al., 1992; Schwartz, Osborne, 1993; Kerr et al., 1994; Raff, 1994; Wyllie, 1994). В результате было убедительно доказано, что апоптоз играет важную роль в онтогенетическом развитии (дифференцировка органов и тканей), противовирусном иммунном ответе, элиминации поврежденных клеток и подавлении опухолевого роста (Wojda, Witt, 2003; Longo et al., 2005).

Следует отметить, что помимо программируемой клеточной гибели (апоптоза, аутофагии, аноикиса) существует и другой тип клеточной смерти – некроз. Причиной некроза, как правило, является токсическое или механическое повреждение клеток, при этом его развитие сопровождается воспалением, приводящим к повреждению окружающих клеток. В отличие от некроза, апоптоз представляет собой сравнительно безопасный для организма способ клеточной гибели, не вызывающий повреждения соседних клеток. Для процесса апоптоза характерны следующие основные признаки (Bowen, Bowen, 1990; Kerr, Harmon, 1991; Tomei, Cope, 1994; Razvi, Welsh, 1995):

- 1) уменьшение размера клеток,
- 2) потеря контактов с соседними клетками и внеклеточным матриксом, приводящая к округлению клеток,
- 3) образование вздутий (blebs) на плазматической мембране,
- 4) конденсация хроматина,
- 5) разрушение ядерной оболочки и цитоскелета,
- 6) фрагментация ядерной ДНК,
- 7) экспонирование различных молекул, в том числе и фосфотидилсерина, на клеточной поверхности, для последующей элиминации апоптотических клеток путем фагоцитоза.

1.3.2 Внутриклеточная машинерия апоптоза

Внутриклеточная машина апоптоза представлена главным образом семейством цистеиновых протеаз, содержащих остаток цистеина в активном сайте и расщепляющих белки-мишени по последовательности, которая обязательно содержит аспарагиновую кислоту. Поэтому такие протеазы получили название каспазы (caspases – cysteine-dependent aspartate specific proteases). Впервые важная роль каспаз в апоптозе была продемонстрирована в работе 1993 года, в которой было доказано участие цистеиновой протеазы CED-3 в инициации программируемой клеточной гибели в *C. elegans*, а также выдвинуто предположение об участии аналогичных протеаз в клеточной гибели у млекопитающих (Yuan et al., 1993). Позже, когда были описаны основные принципы работы этих ферментов, это предположение получило убедительное подтверждение (Thornberry, Lazebnik, 1998). В настоящее время принято

выделять три группы этих ферментов: (1) иницирующие каспазы 2, 8, 9, 10, 12, 15, которые запускают апоптоз, (2) эффекторные каспазы 3, 6, 7, 14, ответственные за протеолитические события, (3) участвующие в воспалении каспазы 1, 4, 5, 11 (Riedl, Shi, 2004; Best, 2008). В зависимости от иницирующих каспаз, апоптоз можно классифицировать следующим образом:

- апоптоз, активируемый сигналами от рецепторов, при котором иницирующими являются каспаза-8 и каспаза-10;
- митохондриальный тип апоптоза с участием каспазы-2 и каспазы-9;
- апоптоз, обусловленный стрессовыми сигналами из эндоплазматического ретикулума, при котором иницирующей является каспаза-12.

В нормальной клетке каспазы существуют в неактивной форме в виде прокаспаз. Индукция апоптоза в общем случае начинается с активации адапторных белков, которые соединяют многие копии инициаторных прокаспаз в один комплекс, следствием такой агрегации может быть взаимный протеолиз или конформационные изменения прокаспаз, приводящие к расщеплению молекул прокаспаз и высвобождению малой и большой субъединиц. Далее две большие и две малые субъединицы формируют активный тетрамерный фермент (Zhang et al., 2003; Fan et al., 2005). Активированные инициаторные каспазы, в свою очередь, вызывают расщепление нижележащих прокаспаз и образованием активных эффекторных каспаз. Результатом активации этого сигнального каскада является протеолитическая деградация множества белков-мишеней, приводящая к возникновению характерных для апоптоза морфологических изменений (Zhang et al., 2003). Так, каспаза-6 расщепляет ламин А, входящий в состав ядерной оболочки, что необходимо для конденсации хроматина и разрушения ядра. Каспазы-3 и -7 могут расщеплять фермент поли-АДФ-рибозополимеразу (PARP), участвующий в репарации ДНК. А каспаза-3 опосредует протеолиз ингибитора каспаза-активируемой ДНКазы (Icad), приводя к специфической фрагментации ДНК за счет эндонуклеазной активности высвободившейся ДНКазы и т.д.

Существует два механизма активации апоптоза – активация внеклеточными стимулами и активация внутриклеточными стимулами (Zhang et al., 2003; Adams, 2003). Реализация первого пути предусматривает активацию на клеточной поверхности рецепторов, содержащих «домены смерти» (DD, death domains). К таким рецепторам относятся Fas/Cd95, TNF1, Apo3/DR3, DR4 и DR5 (Kischkel et al., 1995; Peter, Krammer, 2003; Best, 2008). Связывание этих рецепторов со своими лигандами приводит к тримеризации рецептора и присоединению к нему соответствующей адапторной молекулы, результатом чего является формирование сигнального комплекса индукции смерти (DISC, death-inducing signaling complex), необходимого для активации инициаторных каспаз, в частности, каспаз-8 и -10 (Best, 2008). Внутриклеточный механизм активации апоптоза опосредован изменением проницаемости внешней

митохондриальной мембраны и последующим выходом митохондриальных белков из межмембранного пространства в цитоплазму. Ключевую роль в этом процессе играет цитохром с, который, попадая в цитоплазму, изменяет конформацию адаптерного белка APAF-1, образуя, таким образом, апоптосому. В такой апоптосоме АТФ-зависимым образом расщепляется прокаспаса-9, которая затем активирует нижележащие каспазы (Adams, Cory, 2007; Aslan, Thomas, 2009). Выход цитохрома с осуществляется за счет образования белками семейства Bcl-2 поры в наружной мембране митохондрий. В состав семейства Bcl-2 входят три подсемейства: Bcl-2 (B-cell leukaemia/Lymphoma 2), Bax (Bcl-2-associated X protein) и BH3. Интересно, что часть белков в семействе Bcl-2 обладает проапоптотической активностью, тогда как другая часть антиапоптотической (Zhang et al., 2003). Активную пору образуют проапоптотические члены семейства Bcl-2 – Bax, Bak и Bok, часто при участии расщепленного Bid. Антиапоптотические белки Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1 ингибируют Bax в цитоплазме и в составе поры.

1.4 Феномен старения клеток

Еще в XIX веке А. Вейсман предположил, что в основе механизма запрограммированного старения лежит ограничение числа делений соматических клеток. Однако экспериментальные доказательства этого предположения были получены только в середине следующего века, когда Л. Хейфлик обнаружил феномен старения клеток в культуре после определенного числа удвоений клеточной популяции, получивший название лимита Хейфлика (Hayflick, Moorhead, 1961). В настоящее время под клеточным старением принято понимать необратимую потерю пролиферативного потенциала метаболически активных клеток, сопровождающуюся характерными изменениями (Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007). К таким изменениям в первую очередь относятся морфологические – стареющие клетки увеличены в размерах, избыточно вакуолизированы и уплощены (Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007). Другими типичными признаками, присущими стареющим клеткам, являются остановка клеточного цикла (преимущественно в фазе G1), отсутствие репликации ДНК, экспрессия ассоциированной со старением β -галактозидазы (SA- β -Gal), которая отражает усиление биогенеза лизосом (Dimri et al., 1995; Kurz, 2004; Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007).

1.4.1 Репликативная и стресс-индуцированная формы клеточного старения

По современным представлениям принято различать репликативную и стресс-индуцированную формы клеточного старения. Репликативное старение отражает необратимую потерю пролиферативной активности соматических клеток после прохождения ими определенного количества клеточных делений в соответствии с лимитом Хейфлика. Стресс-индуцированное старение – это состояние клеток, которое также характеризуется потерей

пролиферативной активности, но возникает в клетках даже на ранних пассажах в ответ на различные сублетальные стрессовые воздействия. Основные признаки репликативного и индуцированного стрессом старения подобны и включают, как упоминалось выше, характерные фенотипические изменения, накопление в популяции SA- β -Gal-позитивных клеток и потерю пролиферативного потенциала (Blagosklonny, 2012).

Сравнительно недавно было обнаружено, что МСК человека, подобно другим типам пролиферирующих клеток (фибробласты кожи и легкого, меланоциты, эндотелиальные и эпителиальные клетки), подвергаются стресс-индуцированному преждевременному старению в ответ на сублетальный стресс (Wang, Jang, 2009; Brandl et al., 2011b; Kim et al., 2011; Cmielova et al., 2012; Larsen et al., 2012).

1.4.2 Укорочение теломер, как одна из причин развития старения

Длительное время в биологии старения господствовала точка зрения, что первопричиной клеточного старения является укорочение теломер. История открытия теломер берет свое начало в 1930-х годах, когда в процессе исследования влияния рентгеновского излучения на ДНК пришли к выводу, что концевые участки хромосом представляют собой особую структуру, защищающую их от слипания и повреждения (McClintock, 1931; McClintock, 1941). Позднее Оловников выдвинул гипотезу о концевой недорепликации хромосом, согласно которой при каждом клеточном делении происходит укорочение 5'-концевой дочерней цепи ДНК (Olovnikov, 1973). Однако официально открытие нуклеотидной последовательности и структуры теломер датируется 1978 годом и связано с именем Блэкберн (Blackburn, Gall, 1978). На сегодняшний день теломеры – это высокоспециализированные гетерохроматиновые ДНК-белковые структуры, защищающие концы хромосом эукариотических клеток от деградации, рекомбинации или слипания (Москалев, 2008). Так, согласно теломерной теории, с каждым клеточным делением происходит укорочение теломер, приводящее, в конечном итоге, к репликативному старению клеток (Martens et al., 2000; Wright, Shay, 2001; Karlseder et al., 2002).

Важно отметить, что в некоторых типах клеток содержится фермент теломеразы, который способен синтезировать повторы и удлинять теломеры, компенсируя, таким образом, концевую недорепликацию и позволяя клетке делиться неограниченно долго. К клеткам, обладающим теломеразной активностью, относятся половые, раковые и эмбриональные стволовые клетки (Wright et al., 1996; Miura et al., 2004). В ряде работ показано, что ЭСК человека сохраняют высокий уровень теломеразной активности, даже после 300 удвоений клеточной популяции, а также при культивировании продолжительностью более года (Thomson et al., 1998; Thomson, Marshall, 1998; Rosler et al., 2004). Таким образом, наличие активной теломеразы в ЭСК

представляет собой один из механизмов, лежащих в основе иммортальности этих клеток, и позволяющий им избегать клеточного старения (Miura et al., 2004).

Следует отметить, что, несмотря на стволовую природу МСК, в них не выявлена экспрессия теломеразы, в отличие от ЭСК (Zimmermann et al., 2003). Следствием этого является то, что МСК, подобно другим нормально пролиферирующим клеткам, подвергаются репликативному старению и характеризуются лимитом Хейфлика (Banfi et al., 2002; Stenderup et al., 2003). Так, при длительном культивировании этих клеток наблюдается укорочение теломер (Banfi et al., 2002; Baxter et al., 2004), повышение β -галактозидазной активности (Stenderup et al., 2003), прекращение дифференцировки (Digirolamo et al., 1999).

Первые убедительные свидетельства в пользу того, что укорочение теломер – это не единственная причина развития клеточного старения, были получены в работе по гиперэкспрессии онкогенного Ras в культурах человеческих клеток (Serrano et al., 1997). Позднее было показано, что разнообразные стрессовые воздействия также способны индуцировать преждевременное клеточное старение. В итоге, клеточное старение стали рассматривать, как реакцию клеток на широкий спектр повреждений клеток (Toussaint et al., 2002; Ben-Porath, Weinberg, 2004; Shay, Roninson, 2004; Kahlem et al., 2004).

1.5 Механизмы, лежащие в основе клеточного старения

1.5.1 Инициация клеточного старения в ответ на повреждение ДНК

Согласно существующим представлениям, запуск программы старения при действии разнообразных стрессовых факторов инициируется повреждением ДНК (Ksiazek et al., 2007; Zhan et al., 2010). К наиболее распространенным типам повреждений принято относить образование ковалентных сшивок между азотистыми основаниями ДНК и между ДНК и белками, повреждение азотистых оснований, а также одно- и двуцепочечные разрывы ДНК (Саенко, Шутов, 2011). Среди прочих, именно образование двойных разрывов ДНК (Double Strand Breaks, DSB) является наиболее опасным, так как неправильная репарация DSB может приводить к хромосомным абберациям, апоптозу и онкотрансформации (Grudzenski et al., 2010; Firsanov et al., 2011). Прямые доказательства того, что появление DSB может инициировать также и развитие преждевременного клеточного старения, были получены при исследовании старения, индуцированного различными химиотерапевтическими агентами (такими как блеомицин, адриамицин, митомицин) с хорошо изученным механизмом повреждения ДНК (Robles, Adami, 1998; Bavik et al., 2006). Возникновение DSB приводит к активации ответа на повреждение ДНК (DNA damage response, DDR), причем начальные этапы этого ответа, включающие сборку больших белковых комплексов в местах разрыва, аналогичны при индукции, как репарации, так и старения (Petrini, Stracker, 2003; Pilch et al., 2003).

В большинстве соматических клеток DDR начинается с активации трех сенсорных киназ, принадлежащих к семейству фосфатидилинозитол-3-киназ (PI-3-K): ATM (Ataxia telangiectasia mutated), ATR (ATM and Rad-related) и DNA-PK (DNA-dependent protein kinase), которые распознают повреждения ДНК и фосфорилируют нижележащих по каскаду участников этого

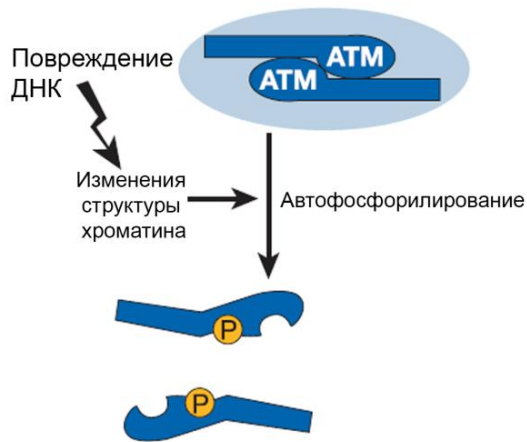


Рис. 6. Механизм активации ATM киназы (Bakkenist, Kastan, 2003).

сигнального ответа. Центральное место при развитии клеточного старения, индуцированного окислительным стрессом, занимает ATM киназа (Zhan et al., 2010; Ditch, Paull, 2012). ATM представляет собой белок с молекулярной массой 350 кДа, который существует в клетке в виде неактивного димера (Ditch, Paull, 2012). Как показано на **рис. 6**, при активации происходит автофосфорилирование ATM по *Ser1981* и последующая диссоциация димера на активные мономеры (Bakkenist, Kastan, 2003; So et al., 2009). Интересно, что локализация ATM в местах разрыва ДНК не требуется для автофосфорилирования, так как считается, что этот процесс может быть опосредован изменением структуры хроматина вследствие появления DSB (Bakkenist, Kastan, 2004). Тем не менее, перемещение активированной ATM к местам повреждения ДНК необходимо для дальнейшего фосфорилирования ее субстратов (So et al., 2009), важнейшими из которых являются гистон H2AX, транскрипционный фактор p53, чекпоинт киназа (checkpoint kinase) Chk2.

Стоит отметить, что в работах последних лет высказывается предположение о существовании дополнительного механизма активации ATM в условиях окислительного стресса (Ditch, Paull, 2012). По мнению авторов, в цитоплазме различных типов клеток содержится небольшая фракция димерного белка ATM, при активации которой происходит прямое окисление димера и последующее образование ковалентных дисульфидных связей между мономерами, однако, разделить активность ATM, возникшую в результате повреждения ДНК или прямого окисления, на сегодняшний день представляется затруднительным.

Фосфорилирование H2AX по *Ser139*, осуществляемое ATM киназой в местах двунитевых разрывов, приводит к формированию фокусов γ -H2AX, необходимых для последующего рекрутирования и закоривания остальных участников DDR в сайтах повреждения ДНК (Burma et al., 2001; Firsanov et al., 2011). Результаты исследований различных авторов демонстрируют, что кинетика образования γ -H2AX фокусов в значительной степени коррелирует с появлением DSB, благодаря чему γ -H2AX принято считать достаточно чувствительным и надежным маркером двойных разрывов ДНК (Kuo, Yang, 2008; Firsanov et

al., 2011). Интересно, что для незначительных и быстро репарируемых повреждений характерно образование временных, сравнительно небольших γ -H2AX фокусов. Такие фокусы исчезают сразу после исправления повреждений ДНК, в частности, благодаря работе систем ремоделирования хроматина и за счет дефосфорилирования γ -H2AX соответствующими фосфатазами (Downey, Durocher, 2006). После репарации таких повреждений клетки быстро возобновляют пролиферацию. В случае трудно репарируемых повреждений, приводящих к индукции старения, наблюдается формирование визуально более крупных фокусов, что, по всей вероятности, связано с поддержанием DDR в активном состоянии в течение длительного времени и, как следствие, с фосфорилированием большего числа молекул гистона (d'Adda di Fagagna, 2008).

К местам повреждения, содержащим фосфорилированный H2AX, привлекается множество различных белков, таких как MRE11/RAD50/NBS1 (MRN комплекс), MDC1, BRCA1, RAD51 и 53BP1 (Fernandez-Capetillo et al., 2003; Xie et al., 2007). Среди перечисленных белков последний играет особую роль в ответе на повреждение ДНК при запуске клеточного старения. Так, рекрутирование 53BP1 к сайтам разрыва необходимо для фосфорилирования некоторых мишеней ATM, в частности, BRCA1 и SMC1. Предполагается, что адапторный белок 53BP1 опосредует перемещение субстратов к активному центру фермента ATM (Bakkenist, Kastan, 2004). Кроме того, показано, что кинетика активации 53BP1 и формирования γ -H2AX фокусов идентична. Таким образом, и белок p53BP1, и γ -H2AX служат надежными маркерами DSB (Purrucker et al., 2010; Firsanov et al., 2011). Интересно, что одновременное выявление γ -H2AX и p53BP1 в совокупности с другими показателями принято считать достоверным свидетельством клеточного старения (Bartkova et al., 2005; Gorgoulis et al., 2005; Herbig et al., 2006).

1.5.2 Активация DDR приводит к индукции блока клеточного цикла

ATM киназа, активированная в результате повреждения ДНК, запускает последовательность сигнальных событий, приводящих к блоку клеточного цикла (Bakkenist, Kastan, 2004; Zhan et al., 2010). Так, при индукции преждевременного старения pATM может фосфорилировать серин-треониновую киназу Chk2 по T68 (Buscemi et al., 2004), результатом чего является олигомеризация и автофосфорилирование последней и, как следствие, ее полная активация (Ahn et al., 2004). Фосфорилированная Chk2 транслоцируется в ядерное пространство, где и активирует свои нижележащие мишени (Lukas et al., 2003). Chk2 является компонентом сигнального пути, приводящего к остановке клеточного цикла преимущественно в фазе G1 в ответ на повреждение ДНК. Интересно, что при выключении

продемонстрировано вовлечение p16 в реакцию клеток на различные стрессовые воздействия, включая гиперэкспрессию онкогенов и неблагоприятные условия культивирования (Hara et al., 1996; Stein et al., 1999), механизм ответа на повреждение ДНК, связанный с повышением уровня p16, исследован в меньшей степени, чем путь p53/p21. Тем не менее, достоверно известно, что оба ингибитора p21 и p16, подавляя киназную активность соответствующих циклин-зависимых киназ, приводят к гипофосфорилированию белка ретинобластомы (Rb) (McConnell et al., 1999; Sherr, Roberts, 1999) (**рис. 7**). В таком состоянии Rb активна и способна связывать транскрипционные факторы семейства E2F, регулирующие прогрессию клеточного цикла (Sherr, McCormick, 2002). Путем обратимого связывания и, как следствие, функциональной инактивации белков E2F, Rb контролирует экспрессию генов, продукты которых являются важными участниками регуляции клеточного цикла, и блокирует переход клеток из G1 в S фазу. Несмотря на то, что оба рассматриваемых ингибитора p21 и p16 участвуют в гипофосфорилировании Rb, их вклад в клеточное старение не является равнозначным (Sherr, Roberts, 1999). Так, например, клетки, в процессе старения которых задействован только p53/p21 путь, при его инактивации полностью возобновляют пролиферацию (d'Adda di Fagagna et al., 2003). В свою очередь, если развитие старения связано с повышением экспрессии p16 (например, при гиперэкспрессии Ras), возобновление будет не полным (Di Micco et al., 2006). Наконец, если арест клеточного цикла при старении опосредуется длительной активацией пути p16/Rb, то потеря пролиферативного потенциала будет необратимой даже при инактивации p53, Rb или p16 (Beausejour et al., 2003).

Путь p53/p21 представляет собой первый защитный барьер, предотвращая пролиферацию клеток с серьезными повреждениями ДНК, тогда как p16/Rb путь вовлекается несколько позднее (Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007). Однако в зависимости от клеточного контекста предпочтение может быть отдано тому или другому пути. Например, для культур эпителиальных клеток арест пролиферации является следствием повышенной экспрессии p16 (Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007).

На основании представленных литературных данных можно резюмировать, что ответ на повреждение ДНК условно подразделяется на два этапа: (1) образование белковых комплексов в местах разрывов ДНК, включающих γ H2AX, p53BP1, pATM и (2) развитие событий, направленных на торможение клеточного цикла через p53/p21 и/или p16/Rb путь.

1.5.3 Для установления и развития старения необходима постоянная активация DDR

Очевидно, что стресс-индуцированное старение это не одномоментное явление, а развивающийся во времени процесс. В связи с этим, его принято разделять на несколько последовательных стадий: (1) инициация, включающая активацию DDR и последующую

индукцию ареста клеточного цикла, (2) развитие и установление старения, в ходе которого остановка пролиферации становится необратимой, а клетка претерпевает соответствующие фенотипические изменения, присущие старым клеткам (Passos et al., 2010). Показано, что для реализации второй стадии необходимо поддержание DDR в постоянно активном состоянии (d'Adda di Fagagna et al., 2003; Passos et al., 2010), результатом чего является формирование крупных фокусов, ассоциированных со старением (senescence-associated DNA-damage foci, SDFs) (d'Adda di Fagagna, 2008), в состав которых входят активированные ATM, 53BP1 и H2AX. Образование таких SDFs было обнаружено в большинстве стареющих клеток разных типов, причем их количество, как правило, накапливается в течение длительного времени (Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007; Meier et al., 2007). Таким образом, на сегодняшний день постулируется, что постоянная активация DDR, ответственная за формирование SDFs, обуславливает установление необратимого ареста клеточного цикла в процессе развития старения, в частности, через p53/p21 путь (Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007; Passos et al., 2010). Интересно, что ингибирование сигнального ответа на повреждение ДНК в клетках, которые уже приобрели фенотип старения, не способно более восстановить пролиферацию (d'Adda di Fagagna et al., 2003; Sang et al., 2008).

1.5.4 Роль АФК в развитии клеточного старения

Важную роль в прогрессии клеточного старения, по современным представлениям, играют эндогенные АФК. Предположение о вовлеченности АФК в процесс старения легло в основу свободно-радикальной теории старения (Harman, 1956). Согласно этой теории, старение и ассоциированные с ним дегенеративные заболевания возникают как следствие повреждающего действия свободных радикалов на различные компоненты клетки. Несмотря на то, что в свое время, в силу недостатка экспериментальных доказательств, вокруг этой теории было множество споров, на сегодняшний день вклад АФК в клеточное старение не вызывает сомнений (Passos et al., 2007b; Ли, Finkel, 2008; Passos et al., 2010).

Наличие взаимосвязи между прогрессией клеточного старения и уровнем АФК подтверждается в первую очередь тем, что стареющие клетки характеризуются повышенным уровнем АФК (Allen et al., 1999; Hutter et al., 2004; Passos et al., 2007a). Изначально считалось, что накопление АФК могло быть связано с условиями культивирования клеток, а именно с более высоким содержанием кислорода в условиях *in vitro* по сравнению с таковым *in vivo*. А неспособность клеток в процессе длительного культивирования справляться с высокой концентрацией атмосферного кислорода являлась причиной возникновения различных повреждений, включая повреждения ДНК, в процессе старения (von Zglinicki et al., 1995; Sitte et al., 2001). Однако недавние исследования убедительно продемонстрировали, что повышенная

продукция АФК связана не с длительным культивированием *in vitro*, а скорее всего, является следствием индукции ареста клеточного цикла при старении клеток (Lawless et al., 2012). Более того, она необходима для поддержания DDR в постоянно активном состоянии и для последующей стабилизации ареста клеточного цикла в процессе развития старения (Passos et al., 2010).

Еще одним важным свидетельством в пользу существования взаимосвязи между АФК и старением явилось то, что обработка клеток сублетальной дозой перекиси водорода (H_2O_2) приводила к развитию преждевременного старения клеток (Chen et al., 1998; Frippiat et al., 2000; Colavitti, Finkel, 2005; Burova et al., 2013; Yagi et al., 2013).

Другие доказательства участия АФК в процессе старения были получены в экспериментах, направленных на снижение уровня внутриклеточных свободных радикалов. Так, например, в клетках, культивировавшихся в условиях низкого содержания кислорода, старение развивалось медленнее, чем в контрольных (Packer, Fuehr, 1977; Forsyth et al., 2003; Richter, von Zglinicki, 2007). Использование различных антиоксидантов, таких как N-ацетил-L-цистеин (N-acetyl-L-cysteine, NAC), пирролидин дитиокарбамат (Pyrrolidine dithiocarbamate, PDTC), фенил-2-нафтиламин (phenyl-alpha-tert-butyl nitron, PBN) (Lee et al., 1999; von Zglinicki et al., 2000; Jung et al., 2004), а также полифенолов, обладающих антиоксидантной активностью (Katiyar et al., 2001; Kao et al., 2010; Yagi et al., 2013) также приводило к частичному предотвращению развития клеточного старения. Помимо этого, оверэкспрессия ферментов антиоксидантной защиты (Serra et al., 2003) также способствовала увеличению продолжительности жизни клеток в культуре. В ряде работ описано применение препаратов, обладающих антиоксидантными свойствами, в качестве геропротекторов, то есть веществ, способных увеличивать продолжительность жизни живых организмов (Анисимов, 2000). Например, 2-меркаптоэтиламин (Harman, 1994), бутилированный гидрокситолуол (2,6-диберт-бутил-4-метилфенол) (Clapp et al., 1979) и фенилбутилнитрон (Saito et al., 1998) способствовали увеличению средней продолжительности жизни мышей, что служит еще одним свидетельством в пользу вовлеченности АФК в процесс старения.

Важно отметить, что недавние исследования выявили корреляцию между активацией основных белков, участвующих в развитии старения, и продукцией АФК. Установлено, что активация транскрипционного фактора p53 может приводить к усилению генерации внутриклеточных АФК (Macip et al., 2003; Liu et al., 2008; Vigneron, Vousden, 2010). С другой стороны, оверэкспрессия p53 трансктивирует ряд p53-индуцируемых генов, которые кодируют АФК-генерирующие ферменты (quinine oxidoreductase, proline oxidase) (Polyak et al., 1997). В свою очередь, АФК могут опосредованно влиять на фосфорилирование p53, например, через p38 MAPK (mitogen activated protein kinase) (Bragado et al., 2007), ATM (Kurz, Lees-Miller, 2004)

или ERK1/2 (extracellular signal regulated kinases) (Persons et al., 2000). Кроме того, получены результаты, свидетельствующие о том, что усиление экспрессии белка p21 также приводит к увеличению образования эндогенных АФК (Macip et al., 2002; Passos et al., 2010).

Обобщая имеющиеся на сегодняшний день данные, можно постулировать, что АФК вовлечены как в установление, так и в развитие клеточного старения, причем повышенный уровень АФК связан с репликативным, онкоген- и стресс-индуцированным старением (Saretzki et al., 2003; Ramsey, Sharpless, 2006; Passos et al., 2007a; Lu, Finkel, 2008). Известно, что АФК способствуют укорочению теломер (von Zglinicki, 2002) и могут напрямую повреждать ДНК, инициируя, таким образом, активацию ответа на повреждение ДНК и старение (Chen et al., 1995; Lu, Finkel, 2008; Rai et al., 2008). С другой стороны, основные эффекторы DDR опосредуют генерацию АФК (Polyak et al., 1997; Macip et al., 2002; Macip et al., 2003), что в конечном итоге приводит к формированию так называемой «петли положительной обратной связи» (Passos et al., 2010).

1.5.5 Митохондрии – основной источник эндогенных АФК

Хорошо известно, что при физиологических условиях около 0,2 % потребляемого клеткой кислорода расходуется на генерирование свободных радикалов. Важный вклад в этот процесс вносят белки плазматической мембраны, принадлежащие к семейству NADPH-оксидаз, липидный метаболизм в пероксисомах, активность различных цитозольных ферментов (например, циклооксигеназы) (Москалев, 2008). Однако наиболее существенным является вклад митохондрий. Митохондрии – это внутриклеточные органеллы, специализирующиеся на синтезе АТФ за счет сопряжения процессов окислительного фосфорилирования и транспорта электронов по дыхательной цепи (Lee et al., 2000).

На **рис. 8** представлено схематичное изображение перемещения электронов по дыхательной цепи митохондрий. Принято считать, что основными местами образования АФК в

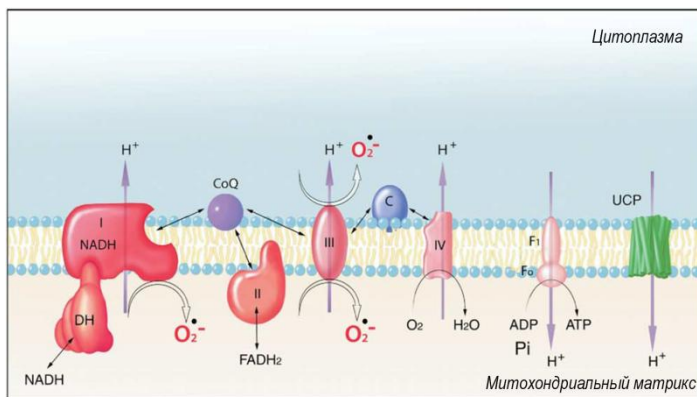


Рис. 8. Дыхательная цепь митохондрий (Balaban et al., 2005).

митохондриях являются комплексы I и III, где в результате восстановления кислорода происходят большие изменения потенциальной энергии электронов (**рис. 8**). Интересно, что увеличение восстановительного потенциала этих комплексов в общем случае приводит к увеличению скорости образования АФК, подтверждая тем самым их участие в продукции свободных радикалов

(Kushnareva et al., 2002; Chen et al., 2003). Кроме того, увеличение числа митохондрий, копий дыхательной цепи в клетке или усиление экспрессии митохондриального генома могут способствовать росту уровня АФК (Balaban et al., 2005). Генерация митохондриальных АФК также может опосредоваться изменением парциального давления кислорода в тканях (Turrens et al., 1982), однако, механизм этого влияния требует дополнительных исследований.

Важно отметить, что в норме генерация АФК в митохондриях является хорошо регулируемым процессом. Так, семейство митохондриальных белков-разобщителей (uncoupling proteins, UCP), способных принимать протоны и переносить их через внутреннюю мембрану митохондрий, минуя V комплекс (**рис. 8**), играет важную роль в поддержании необходимого уровня АФК в клетке (Casteilla et al., 2001; Echtaу et al., 2002). Например, при снижении мембранного потенциала митохондрий (ММП) в результате работы UCP наблюдается уменьшение генерации АФК (Casteilla et al., 2001; Brand et al., 2004). Кроме того, уровень образующихся в митохондриях АФК контролируется благодаря строгой регуляции передвижения электронов по дыхательной цепи, в частности, на уровне комплекса I (**рис. 8**). В результате такого контроля окислительное фосфорилирование осуществляется только для восполнения энергетических нужд клетки, то есть при недостатке АТФ (Bose et al., 2003; Joubert et al., 2004).

1.5.6 Вклад митохондрий в развитие клеточного старения

По современным представлениям, наблюдаемое увеличение образования АФК в стареющих клетках, по крайней мере, частично опосредуется изменениями физиологии митохондрий. Во-первых, показано, что стареющие клетки больше по размеру и содержат большее число митохондрий (Lee et al., 2000; Passos et al., 2007c). Кроме того, в процессе развития старения выявлены следующие изменения в митохондриях: (1) окислительные модификации некоторых митохондриальных ферментов, таких как аконитаза, аденин-нуклеотид транслоказа и цитохром с-оксидаза (Agarwal, Sohal, 1995; Yan et al., 1997; Yan, Sohal, 1998; Davies et al., 2001); (2) перекисное окисление фосфолипидов, входящих в состав митохондриальной мембраны (Schlame et al., 2000); (3) накопление повреждений митохондриальной ДНК (мтДНК) (Balaban et al., 2005; Ma et al., 2009; Passos et al., 2010). Предполагается, что изменения в системе репарации мтДНК могут способствовать накоплению окислительных повреждений и мутаций мтДНК при развитии старения (Druzhyna et al., 2008).

В литературе существуют различные точки зрения, касающиеся изменений в функционировании митохондрий, приводящих в конечном итоге к увеличению продукции АФК в процессе старения. Так, ряд исследователей считает, что клеточное старение сопровождается падением митохондриального потенциала. Следствием падения ММП являются дефекты

электронно-транспортной цепи митохондрий, приводящие к увеличению продукции АФК (Ma et al., 2009; Passos et al., 2010). Однако другие исследователи придерживаются точки зрения, что в процессе старения не возникает никаких дефектов ни в электронно-транспортной цепи, ни в процессах окислительного фосфорилирования (Lee et al., 2000; Maklashina, Ackrell, 2004). По их мнению, усиление генерации АФК при развитии старения может быть связано с растущим числом функционально активных митохондрий или с изменениями в работе митохондриальных белков-разобщителей, что коррелирует с увеличением ММП. Однако, несмотря на существующие различия, обе точки зрения предполагают вовлечение митохондрий в процесс развития старения благодаря их участию в продукции эндогенных АФК (Lanza, Nair, 2010).

1.5.7 Участие ферментов антиоксидантной защиты в клеточном старении

Накопление окислительных повреждений ДНК в процессе развития старения, с одной стороны, может быть связано с увеличением образования АФК, а с другой стороны – с ослаблением механизма антиоксидантной защиты клеток (Martin, Grotewiel, 2006). Важнейшими участниками системы защиты клеток от неблагоприятного действия АФК являются ферменты супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза и каталаза. Интересно, что открытие супероксиддисмутазы (SOD) (McCord, Fridovich, 1969), основная функция которой заключается в нейтрализации супероксиданиона, сыграло определяющую роль в подтверждении свободно-радикальной теории старения. По сути, это было хоть и непрямым, но достаточно убедительным доказательством того, что в клетках постоянно генерируются активные формы кислорода. В клетке функционируют несколько типов SOD: Mn-зависимая SOD2, локализованная в матриксе митохондрий, и Cu/Zn-зависимая SOD1, содержащаяся преимущественно в цитоплазме клеток. Оба фермента катализируют реакцию дисмутации супероксиданиона в H_2O_2 . Образовавшаяся в результате H_2O_2 утилизируется благодаря работе двух ферментов антиоксидантной защиты – каталазы и глутатионпероксидазы. Под действием каталазы происходит расщепление H_2O_2 до воды и молекулярного кислорода (Radi et al., 1991), а под действием глутатионпероксидаз – до воды и восстановленного глутатиона.

Принимая во внимание тот факт, что стареющие клетки характеризуются повышенным содержанием АФК, логично предположить, что модуляция активности ферментов антиоксидантной защиты может влиять на процесс старения. И действительно, есть данные о том, что увеличение уровня экспрессии SOD приводило к снижению скорости укорочения теломер и продлению жизни культуры первичных фибробластов (Serra et al., 2003). Наоборот, подавление активности SOD методом РНК интерференции индуцировало развитие клеточного старения, вероятно, за счет активации экспрессии белка p53 (Blander et al., 2003).

Важно отметить, что в настоящее время общепринятой все же остается точка зрения, что старение сопровождается скорее увеличением продукции АФК, нежели снижением эффективности работы ферментов антиоксидантной защиты (Lanza, Nair, 2010). Так, при старении в клетках скелетных мышц выявлено увеличение активности каталазы и SOD1 (Pansarasa et al., 1999; Pansarasa et al., 2000; Gianni et al., 2004). Предполагается, что наблюдаемое увеличение активности этих ферментов отражает реакцию клеток на повышение уровня АФК в процессе старения.

1.5.8 p38 MAPK играет важную роль как в репликативном, так и в стресс-индуцированном старении клеток

Впервые p38 MAPK (p38) была обнаружена в LPS-стимулированных макрофагах (Chen et al., 2001; Raman et al., 2007). В настоящее время в клетках млекопитающих идентифицировано четыре изоформы этой киназы: p38 α , p38 β , p38 γ и p38 δ , причем p38 α является доминирующей формой, экспрессирующейся в клетках в наибольшем количестве. Будучи стресс-киназой, p38 активируется в ответ на действие различных стрессовых факторов, таких как тепловой и осмотический шок, УФ- и γ -облучение, гипоксия, окислительный стресс (Iwasa et al., 2003; Mezhir et al., 2005; Zdanov et al., 2006). Стоит отметить, что роль p38 в ответе на различные типы стресса уже давно установлена, и механизмы ответа достаточно хорошо изучены. Тем не менее, в последнее десятилетие растущее число работ посвящается исследованию роли этой киназы в развитии репликативного и стресс-индуцированного клеточного старения (Haq et al., 2002; Iwasa et al., 2003; Bulavin et al., 2004; Roux, Blenis 2004; Davis et al., 2005; Zarubin, Han 2005; Han, Sun, 2007; Maruyama et al., 2009; Passos et al., 2010; Guo et al., 2013; Borodkina et al., 2014).

В ходе исследований было установлено, что p38 играет важную роль в развитии преждевременного старения, индуцированного онкогенами, неблагоприятными условиям культивирования и окислительным стрессом (Chen, Ames, 1994; Ishikawa, 2006; Han, Sun, 2007). Так, подавление киназной активности p38 специфическим ингибитором SB203580 или экспрессия доминантно-негативных мутантов вышестоящих MAPK (МКК3 и МКК6), неспособных активировать p38, приводили к частичной отмене онкоген-индуцированного старения (Wang et al., 2002; Iwasa et al., 2003). Наоборот, постоянная активация p38, опосредованная экспрессией активных мутантов МКК3 и МКК6, инициировала развитие преждевременного старения в культуре первичных фибробластов (Wang et al., 2002; Iwasa et al., 2003).

Аналогичные данные были получены при удалении или инактивации фосфатазы Wip1. Wip1, продукт гена, регулируемого p53, как известно, ингибирует активность p38 (Takekawa et

al., 2000). Подавление активности этой фосфатазы приводило к активации p38 сигнального пути и к индукции преждевременного старения (Wang et al., 2002; Iwasa et al., 2003; Bulavin et al., 2004).

Еще одно доказательство участия p38 в процессе клеточного старения, было получено при исследовании клеток, полученных от пациентов с синдромом Вернера. Это редкое генетическое заболевание, приводящее к преждевременному старению организма (Davis et al., 2005). Клетки, полученные от таких больных, прекращают пролиферировать без соответствующего укорочения теломер, что свидетельствует об индукции преждевременного старения (Schulz et al., 1996). Оказалось, что культивирование этих клеток в присутствии ингибитора p38 предотвращало развитие старения (Davis et al., 2005; Bagley et al., 2010).

Важно отметить, что p38 вовлечена также и в репликативное старение клеток. При старении в культуре человеческих фибробластов была выявлена активация p38, причем оказалось, что индукция экспрессии hTERT (каталитической субъединицы теломеразы из семейства обратных транскриптаз) отменяла активацию p38, демонстрируя, что наблюдаемая активация p38 являлась следствием укорочения теломер при репликативном старении (Iwasa et al., 2003).

При исследовании механизмов, опосредующих участие p38 в клеточном старении, было выяснено, что эта стресс-киназа может модулировать функциональную активность таких белков, как p16 и p53 (Han, Sun, 2007). В ряде работ было показано, что в результате активации p38 усиливается экспрессия p16, что приводит к гипофосфорилированию белка Rb и индукции блока клеточного цикла (Wang et al., 2002; Bulavin et al., 2004). Кроме того, p38 может инициировать активацию p53, который индуцирует экспрессию p21 и, как следствие, блок клеточного цикла (Wu, 2004; Han, Sun, 2007). Так, при действии УФ-излучения или химиотерапевтических агентов p38 может фосфорилировать p53 по *Ser15*, *Ser33* и *Ser46* (Huang et al., 1999; Sanchez-Prieto et al., 2000; Perfettini et al., 2005; Bragado et al., 2007), а в условиях осмотического шока (Kishi et al., 2001) или в результате гиперэкспрессии онкогенов (Bulavin et al., 2004) p38 фосфорилирует p53 по *Ser33*.

Более того в ряде работ было выявлена важная роль не только самой p38, но и ее прямой нижележащей мишени MAPKAPK-2 (MK-2) (Reinhardt et al., 2007; Reinhardt et al., 2011). Показано, что активированная MK-2, аналогично киназам Chk1 и Chk2, может опосредовать остановку клеточного цикла в ответ на повреждение ДНК (Lopez-Aviles et al., 2005; Reinhardt et al., 2007; Reinhardt et al., 2011).

Помимо рассмотренных выше примеров участия p38 в регуляции клеточного старения, важно отметить, что p38 вовлечена также в «петлю положительной обратной связи» между повышенным уровнем АФК и постоянной активацией DDR в процессе развития и установления

клеточного старения (Passos et al., 2010). Было показано, что ингибирование активности p38 приводит к уменьшению продукции АФК при развитии как теломер-зависимого, так и стресс-индуцированного старения (Passos et al., 2010; Borodkina et al., 2014), с одной стороны, и к уменьшению числа сайтов повреждения ДНК, содержащих активированные АТМ и 53BP1, с другой (Passos et al., 2010).

Таким образом, представленные в этой главе данные свидетельствуют о ключевой роли p38 в инициации и развитии как репликативного, так и стресс-индуцированного клеточного старения.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Клеточные линии и особенности их культивирования

В работе использовали следующие линии клеток: эМСК (линия 2304) (Земелько и др., 2011), ЭСК (линия C910) (Alekseenko et al., 2012), полученные сотрудниками Отдела внутриклеточной сигнализации и транспорта (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург), а также эмбриональные фибробласты легкого человека (линия FRL-9505), полученные из ФГБУ НИИ гриппа МЗ и СР РФ. Фибробласты и эМСК культивировали в среде DMEM/F12 (Gibco, США), содержащей 10 % эмбриональной сыворотки (HyClone, США), 1 % гентамицина и 1 % глутамакса (Gibco, США) при 37 °C в атмосфере 5 % CO₂. ЭСК культивировали в среде mTeSR1 (Stem Cell Technologies, США) на чашках Петри с фидерным слоем из эМСК, обработанных митомицином C. Для всех экспериментальных исследований ЭСК выращивали в бесфидерных условиях на чашках или платах, обработанных матригелем (BD Biosciences, США).

Для всех экспериментов клетки рассеивали на культуральные чашки диаметром 35 мм (Corning, США) или платы (NUNC, Дания) в плотности 15×10^3 клеток/см². Для опытов использовали субконфлюентные культуры через сутки после посева. Для экспериментов по иммунофлуоресценции в пластиковые чашки диаметром 35 мм (Corning, США) помещали покровные стекла 8×8 мм (Menzel-Glaser, Германия).

2.2 Моделирование окислительного стресса и условия обработки клеток

Окислительный стресс вызывали добавлением на 1 ч в бессывороточную ростовую среду свежеприготовленного раствора H₂O₂, который готовили из 30 %-ного раствора H₂O₂ (Sigma, США). Конечную концентрацию H₂O₂ варьировали в диапазоне от 200 до 2000 мкМ. Обработку клеток проводили при 37 °C в атмосфере 5 % CO₂, после чего клетки дважды промывали бессывороточной средой и далее инкубировали в свежей ростовой среде.

В экспериментах, направленных на предотвращение развития H₂O₂-индуцированного старения, использовали следующие соединения: (1) N-acetyl-L-cysteine (NAC) (Sigma, США), (2) diphenylene iodonium (DPI) (Calbiochem, США), (3) SB203580 (Calbiochem, США), (4) BIRB796 (Axon Medchem, Нидерланды). Было протестировано два различных способа добавления NAC. Согласно первому варианту, клетки одновременно обрабатывали 10 мМ NAC и 200 мкМ H₂O₂ в течение 1 ч в среде без сыворотки, с последующей промывкой, как описано выше, и далее культивировали в свежей ростовой среде. В отличие от первого варианта, второй способ предусматривал постоянное присутствие антиоксиданта в культуральной среде в течение всего эксперимента. Схема обработки клеток DPI заключалась в следующем: клетки предобрабатывали 0,25 мкМ DPI в течение 40 мин в среде без сыворотки, затем в эту же среду

добавляли 200 мкМ H_2O_2 на 1 ч, после чего клетки дважды промывали бессывороточной средой и далее инкубировали в свежей ростовой среде, содержащей 0,25 мкМ DPI.

Условия обработки клеток SB и BIRB были сходными: сначала клетки обрабатывали 200 мкМ H_2O_2 в стандартных условиях, а затем в инкубационную среду добавляли 5 мкМ SB или BIRB, причем в процессе дальнейшего культивирования клеток по 5 мкМ каждого ингибитора добавляли ежедневно для поддержания постоянной концентрации.

2.3 Оценка жизнеспособности методом МТТ

Жизнеспособность клеток после обработки H_2O_2 оценивали методом МТТ, основанном на энзиматическом превращении МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид) в формазан в живых клетках. Для этих экспериментов клетки выращивали на 24-луночных платах, оценку жизнеспособности производили через 24 ч после начала эксперимента. После удаления культуральной среды к клеткам добавляли раствор МТТ (0,715 мг/мл) (AppliChem, Германия) в ростовой среде. Через 2 ч раствор заменяли на DMSO (Sigma, США) для растворения образовавшихся кристаллов формазана, и инкубировали клетки в течение 15 мин при комнатной температуре, после чего измеряли абсорбцию раствора при 570 нм на приборе Fluorofot "Charity".

2.4 Метод проточной цитофлуориметрии

2.4.1. Анализ апоптотических клеток, окрашенных с помощью йодида пропидия и конъюгата Annexin V/FITC

Для анализа H_2O_2 -индуцированного апоптоза клетки окрашивали йодидом пропидия (PI) и Annexin V/FITC следующим образом. Клетки дважды промывали холодным PBS, ресуспендировали в 1-кратном связывающем буфере, приготовленном из 10-кратного исходного раствора, содержащего 0,1 М HEPES/NaOH (pH 7,4); 1,4 М NaCl; 25 мМ $CaCl_2$, и инкубировали с 5 мкл Annexin V (An V), меченого FITC (BD Biosciences, США), и 5 мкл PI в течение 15 мин при комнатной температуре в темноте. Непосредственно перед анализом добавляли к каждому образцу по 400 мкл 1-кратного связывающего буфера. В процессе апоптоза клетки экспонируют фосфатидилсерин на клеточной поверхности. An V, являющийся фосфолипид-связывающим протеином, в присутствии ионов кальция селективно и с высокой аффинностью связывает фосфатидилсерин, при этом он проявляет очень низкую аффинность к таким фосфолипидам, как фосфатидилэтаноламин, сфингомиелин и фосфатидилхолин. Такой профиль связывания позволяет использовать An V в качестве высокоспецифичного агента для определения апоптотических клеток (Koorman et al., 1994; Vermes et al., 1995; van Engeland et al., 1996). PI, в свою очередь, красит только мертвые клетки. Благодаря этим свойствам, совместное окрашивание An V и PI позволяет разделять ранне ($An V^+/PI^-$), поздние ($An V^+/PI^+$) -

апоптотические и некротические (An V/PI⁺) клетки. Анализ окрашенных клеток проводили на цитометре Coulter EPICS XL Flow Cytometer (Backman Coulter).

2.4.2. Анализ распределения по фазам клеточного цикла, выживаемости и размера клеток с помощью метода проточной цитометрии

Клетки снимали с чашек смесью растворов трипсина и Версена (0,05%), осаждали центрифугированием и промывали раствором PBS. Одну часть каждого образца использовали для окрашивания PI (50 мкг/мл) с последующим анализом по протоколу «живые/мертвые клетки», другую часть – для анализа распределения по фазам клеточного цикла. Клетки инкубировали в течение 30 мин в 300 мкл PBS, содержащего 200 мкг/мл сапонины, 250 мкг/мл РНКазы и 50 мкг/мл PI при комнатной температуре и анализировали на цитометре Coulter EPICS XL Flow Cytometer (Backman Coulter). Распределение клеток по фазам клеточного цикла анализировали с помощью программы WinMDI, версия 2.8. Изменение размера клеток оценивали с помощью метода прямого светорассеяния на окрашенных PI образцах, использованных для анализа распределения клеток по фазам клеточного цикла.

2.4.3. Измерение уровня внутриклеточных АФК и митохондриальных пероксидов, совокупной митохондриальной массы и мембранного потенциала митохондрий (ММП)

Прикрепленные к поверхности чашки клетки дважды промывали PBS и инкубировали в среде без сыворотки с добавлением соответствующих флуоресцентных красителей при 37 °C в темноте. Все использованные флуоресцентные зонды производства фирмы Molecular Probes (США).

Для оценки внутриклеточного уровня АФК использовали 2,7-дихлорфлуоресцеин диацетат (H₂DCF-DA) (Oyama et al., 1994). Клетки инкубировали в присутствии красителя в конечной концентрации 10 мкМ в течение 20 мин. Для оценки уровня клеточных пероксидов клетки инкубировали в течение 30 мин в присутствии 30 мкМ раствора дигидрородамина123 (DHR123). Для определения мембранного потенциала митохондрий перед измерением клетки инкубировали в течение 30 мин в среде DMEM/F12 с добавлением 10 мкМ флуоресцентного зонда родамина123 (Rho123). Совокупную митохондриальную массу в клетках оценивали с помощью окраски флуоресцентным красителем нонил-акридиновым оранжевым (NAO) в конечной концентрации 10 мкМ в течение 10 мин.

После окончания времени инкубации с красителем клетки дважды промывали PBS, переводили в суспензионное состояние при помощи смеси растворов трипсина и Версена (0,05 %) и анализировали на проточном цитометре Coulter EPICS XL Flow Cytometer (Backman Coulter). В каждом образце анализировали не менее 10000 клеток.

2.5 Использование конфокальной микроскопии для оценки внутриклеточных АФК, клеточных пероксидов, ММП и митохондриальной массы

Для этих экспериментов перед рассевом клеток в чашки помещали покровные стекла, предварительно покрытые полилизинном. Условия окраски клеток соответствующими красителями полностью совпадали с условиями, описанными в пункте 2.4.3. По завершении инкубации с красителем покровные стекла с клетками переносили в регистрационную/перфузионную камеру. Флуоресценцию измеряли на инвертированном сканирующем конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 MP (Leica Microsystems Inc, Германия) с частотой сканирования 0,03 кадр/с. Для всех красителей флуоресценцию возбуждали аргоновым лазером (длина волны 488 нм), а регистрировали в зеленой области спектра (510-560 нм). Полученные конфокальные изображения оцифровывали при помощи программного обеспечения Leica LAS AF.

2.6 Электрофорез и иммуноблотинг

2.6.1. Приготовление проб для электрофоретического разделения

Прикрепленные клетки дважды промывали холодным PBS и лизировали в буфере, содержащем 50 mM Трис-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 1 mM ЭГТА, 10 % глицерина, 1 % тритона X-100, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM NaF, 0,5 mM PMSF, коктейль ингибиторов протеаз (1:500, Sigma, США), в течение 10 мин на льду. После лизиса клетки соскребали с чашек и центрифугировали в течение 15 мин при 15000 g. Для определения экспрессии активной каспазы-3 и каспазы-8 открепившиеся клетки предварительно собирали центрифугированием и лизировали затем вместе с клетками, собранными с чашек. К супернатанту добавляли 1/4 часть буфера для электрофоретических проб (40 mM Трис (pH 6,8), 10 % SDS, 20 % 2-меркаптоэтанола и 40 % глицерина) и инкубировали в течение 5 мин при 99 °C. Готовые пробы сразу использовали для электрофореза или хранили при температуре -70 °C. Концентрацию белка в пробах определяли по методу Бредфорд (Bradford, 1976), используя овалбумин для построения калибровочной кривой.

2.6.2. Электрофорез белков в полиакриламидном геле

Электрофоретическое разделение белков проводили методом SDS-электрофореза в полиакриламидном геле. Процентное содержание акриламида в разделяющем геле варьировали (от 4 до 12 %) в зависимости от молекулярного веса интересующих белков. Разделение белков проводили в блоках геля 90×60×1 мм при силе тока 30 мА на пластину в течение 2-3 ч, используя метод Лэммли (Laemmli, 1970). В форезных камерах использовали Tris-глициновый электродный буфер (pH 8,3), содержащий 25 mM Tris-HCl, 250 mM глицина и 0,1 % SDS.

2.6.3. Иммуноблотинг со специфическими антителами

Белки из геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C extra (Amersham Pharmacia Biotech, Швеция) методом «мокрого» переноса на трансблоте фирмы Bio-Rad (США) с использованием буфера, содержащего 48 мМ Tris-HCl, 39 мМ глицина, 0,1 % SDS и 5-20 % метанола в зависимости от молекулярного веса интересующих белков. Для визуализации белковых полос на мембране использовали Ponceau S (Sigma, США). Иммуноблотинг проводили в соответствии с методикой ECL Western Blotting protocols (Amersham Pharmacia Biotech, Швеция). Мембрану промывали в буфере TBS-Tween-20 (TTBS, 20 мМ Трис-HCl (pH 7,6), 150 мМ NaCl, 0,1 % Tween-20), после чего инкубировали в 5 %-ном растворе сухого обезжиренного молока, приготовленном на TTBS, в течение 1 ч при комнатной температуре. По окончании инкубации мембрану переносили в раствор первичных антител, приготовленный либо на 5 %-ном молоке в TTBS, либо на 5%-ном растворе BSA в TTBS и инкубировали в течение ночи при +4 °С. Для специфического выявления белков использовали следующие первичные антитела: (1) моноклональные кроличьи антитела против активной каспазы-8 (расщепленной по Asp391) (clone 18C8) (#9496, Cell Signaling, США); (2) поликлональные кроличьи антитела против активной каспазы-3 (расщепленной по Asp175) (#9661, Cell Signaling, США); (3) моноклональные кроличьи антитела против глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH, clone 14C10) (#2118, Cell Signaling, США); (4) моноклональные мышинные антитела против ядерного антигена PCNA (clone PC10) (# 307901, Biolegend, США); (5) моноклональные кроличьи антитела против p21^{Waf1/Cip1} (clone 12D1) (#2947, Cell Signaling, США); моноклональные мышинные антитела против p16 (clone D25) (#sc-81613, Santa Cruz, США); (6) поликлональные кроличьи антитела против фосфорилированной по Ser807/811 ретинобластомы (#9308, Cell Signaling, США); (7) моноклональные кроличьи антитела против фосфорилированной по Ser1981 АТМ киназы (clone D6H9) (#5883, Cell Signaling, США); (8) поликлональные кроличьи антитела против фосфорилированной по Thr68 Chk2 (#2661, Cell Signaling, США); (9) моноклональные мышинные антитела против фосфорилированного по Ser15 p53 (clone 16G8) (#9286, Cell Signaling, США); (10) поликлональные кроличьи антитела против фосфорилированной по Thr202/Tyr204 MAP киназы p44/p42 (#9101, Cell Signaling, США); (11) поликлональные кроличьи антитела против фосфорилированной по Thr183/Tyr185 SAPK/JNK (#9251, Cell Signaling, США); (12) поликлональные кроличьи антитела против фосфорилированной по Thr845 ASK1 (#3765, Cell Signaling, США); (13) поликлональные кроличьи антитела против фосфорилированной по Thr180/Tyr182 p38 MAP киназы (#9211, Cell Signaling, США); (14) моноклональные кроличьи антитела против p38α MAP киназы (clone 7D6) (#2371, Cell Signaling, США); (15) моноклональные кроличьи антитела против фосфорилированной по Thr334 MAPKAPK-2 (clone 27B7) (#3007, Cell Signaling, США).

По окончании инкубации с первичными антителами мембрану промывали TTBS (3 раза по 5 мин), затем помещали на 1 ч в раствор вторичных антител в 5 %-ном растворе молока в TTBS, после чего промывали мембрану, как описано выше. В качестве вторичных антител применяли конъюгированные с пероксидазой хрена козы анти тела, выработанные против иммуноглобулинов (1) кролика (GAR-HRP) (#7074, Cell Signaling, США) или (2) мыши (GAM-HRP) (#7076, Cell Signaling, США). Белки, связавшиеся с антителами, выявляли с помощью метода усиленной хемилюминесценции (ECL, Amersham, Швеция). Для этого мембрану промывали 5 раз по 5 мин в растворе TTBS, инкубировали в растворе ECL и, далее, регистрировали хемилюминесцентное излучение экспонированием на рентгеновскую пленку CEA RP NEW (CEA AB, Швеция).

2.7 Анализ экспрессии генов

Для анализа уровня экспрессии генов общую РНК экстрагировали с использованием коммерческого набора RNeasy Micro Kit (Qiagen, США), следуя инструкции изготовителя. 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. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически при 260 нм. Полученную РНК хранили в водном растворе при температуре -80 °С.

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

Для проведения ОТ-ПЦР использовали следующие специфические праймеры: для *p21^{Waf1/Cip1}*: прямой 5' CCACATGGTCTTCCTCTGCTG 3' и обратный 5' GATGTCCGTCAGAACCCATG 3', температура отжига 55 °С (316 п.н.); для *SOD1* прямой 5' GGTCCCTCACTTTAATCCTCTAT 3' и обратный 5' CATCTTTGTCAGCAGTCACATT 3', температура отжига 62 °С (96 п.н.); для *SOD2* прямой 5' TGACAAGTTTAAGGAGAAGC 3' и обратный 5' GAATAAGGCCTGTTGTTCC 3', температура отжига 56 °С (148 п.н.); для *GPX1* прямой 5' CGCCACCGCGCTTATGACCG 3' и обратный 5'

GCAGCACTGCAACTGCCAAGCAG 3', температура отжига 68 °C (238 п.н.); в качестве количественного и качественного контроля кДНК использовали олигонуклеотидные праймеры для β -актина: прямой 5' GCCGAGCGGGAAATCGTGCGT 3' и обратный 5' CGGTGGACGATGGAGGGGCGG 3', температура отжига 70 °C (507 п.н.). Все праймеры получены из фирмы SYNTOL (Россия).

Анализ продуктов ПЦР проводили в горизонтальной установке для электрофореза, используя для разделения 2 %-ный агарозный гель, приготовленный на трис-ацетатном буфере (pH 7,6) (40 mM Трис, 1 mM ЭДТА, 5,7 % уксусной кислоты), содержащем бромистый этидий в концентрации 0,5 мкг/мл. Для идентификации полученных ПЦР-продуктов использовали маркер молекулярной массы ДНК 100 н.п. (Fermentas, Литва). После электрофореза ДНК в геле визуализировали на трансиллюминаторе при 302 нм. Интенсивность полос амплификатов ПЦР определяли компьютерной денситометрией с помощью программы Scion Image версия 4.0.3.2.

2.8 Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток

Для экспериментов по иммунофлуоресценции в пластиковые чашки диаметром 35 мм (Corning, США) дополнительно помещали покровные стекла 8×8 мм (Menzel-Glaser, Германия). Прикрепленные клетки дважды промывали теплым PBS, а затем фиксировали 4 %-ным раствором формалина (Sigma, США) в течение 15 мин при комнатной температуре. После фиксации клетки промывали 4 раза по 5 мин PBS и пермеабелизовали 10 мин при комнатной температуре раствором PBS, содержащим 0,1 % тритона. Далее стекла инкубировали в 1 %-ном растворе BSA в PBS для блокирования неспецифического связывания. Аналогичный по составу раствор использовали для разведения первичных антител. Для специфического выявления белков использовали следующие первичные антитела: (1) поликлональные кроличьи антитела против Ki67 (#15580, Abcam, Англия); (2) моноклональные кроличьи антитела против p21^{Waf1/Cip1} (clone 12D1) (#2947, Cell Signaling, США); (3) моноклональные мышинные антитела против p53, фосфорилированного по Ser15 (clone 16G8) (#9286, Cell Signaling, США); (4) моноклональные кроличьи антитела против ATM киназы, фосфорилированной по Ser1981 (#ab81292; Abcam, Англия); (5) моноклональные мышинные антитела против ATM киназы фосфорилированной, по Ser1981 (#NH176677, Thermo scientific, США); (6) поликлональные кроличьи антитела против 53BP1, фосфорилированного по Ser1778 (#2675, Cell Signaling, США); (7) поликлональные кроличьи антитела против γ H2AX (Ser139) (#ab11174; Abcam, Англия). С первичными антителами клетки инкубировали в течение ночи при 4 °C. После окончания инкубации клетки промывали 3 раза по 5 мин раствором PBS, содержащим 0,01 % Tween-20. Далее клетки инкубировали с вторичными антителами,

разведенными в 1 %-ном растворе BSA в PBS в течение 30 мин при 37 °C в темноте. В качестве вторичных антител применяли козы антитела, выработанные против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с Alexa Fluor 568 (#A11011, Life Technologies, США) или козы антитела, выработанные против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с Alexa Fluor 488 (#A11001, Life Technologies, США). По истечении времени обработки вторичными антителами клетки промывали 3 раза по 5 мин раствором PBS, содержащим 0,01 % Tween-20. Ядра клеток окрашивали с помощью DAPI (Sigma, США) в концентрации 1 мкг/мл. Далее покровные стекла заключали в глицериновый буфер с 2 % пропилгаллата. Распределение флуоресцентно-меченных белков в клетках изучали с помощью флуоресцентного микроскопа Zeiss Axiovert 200M (Carl Zeiss, Германия) (объективы 40x, 100x) дополнительно оборудованного цифровой камерой DCF 420C (Leica, Германия).

2.9 Выявление активности SA- β -Gal

Для определения активности фермента SA- β -Gal использовали фирменный набор «Senescence-galactosidase staining kit» (Cell Signaling, США). Все процедуры производились в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Клетки на чашках промывали PBS, фиксировали в течение 10 мин при комнатной температуре 1-кратным фиксирующим раствором, после чего дважды промывали PBS и окрашивали в β -галактозидазном растворе при 37 °C в течение ночи. Об активности SA- β -Gal судили по появлению синих гранул в цитоплазме клеток.

Количественный анализ изображений произведен с использованием пакета прикладных программ MatLab, согласно алгоритму, описанному в методологической статье 2011 года (Shlush et al., 2011). Для каждой экспериментальной точки было вручную отмечено и проанализировано минимум 250 случайно выбранных клеток.

2.10 Используемые реактивы, ингибиторы и антиоксиданты

В работе использовали неорганические соли и перекись водорода производства фирмы Sigma (США). Кроме того, использовали антиоксидант – N-acetyl-L-cysteine (NAC) (Sigma, США) и ингибиторы: (1) diphenylene iodonium (DPI) (Calbiochem, США) – ингибитор NADPH оксидазы; (2) SB203580 (Calbiochem, США) – ингибитор p38 MAP киназы; (3) BIRB796 (Ахон Medchem, Нидерланды) – ингибитор p38 MAP киназы.

2.11 Статистическая обработка данных

Полученные данные подвергались статистической обработке с использованием компьютерных программ Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США) и STATISTICA 10 (StatSoft, США). Для проверки нормальности распределения данных применяли тесты Шапиро-

Уилка или Колмогорова-Смирнова. При установлении достоверности различий данных, подчиняющихся нормальному распределению, использовали *t*-критерий Стьюдента и *U*-критерий Манна-Уитни. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ SD (N=3), * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ по сравнению с контролем, § – $p < 0,05$; §§ – $p < 0,01$; §§§ – $p < 0,001$ по сравнению с H₂O₂-обработанными клетками.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

В последнее десятилетие интенсивно исследуются реакции эмбриональных и соматических стволовых клеток человека на стресс, включая УФ- и γ -излучение, тепловой шок и действие окислителей, с целью разработки успешной стратегии их использования в регенеративной медицине (Otto, Wright, 2011). Специфические ответы этих клеток на окислительный стресс могут играть критическую роль в регуляции тканевого гомеостаза, а также в регенерации органов после окислительного повреждения. Широко распространенным и простым способом моделирования окислительного стресса является обработка культур клеток с помощью H_2O_2 , при этом степень стресса напрямую зависит от используемой концентрации. В настоящей работе окислительный стресс вызывали кратковременным (в течение 1 ч) действием на клетки H_2O_2 , при этом концентрацию варьировали в широком диапазоне (от 200 мкМ до 3 мМ) в зависимости от конкретной цели.

3.1. Оценка устойчивости различных типов клеток к окислительному стрессу

На первом этапе исследований была проведена оценка устойчивости эМСК к окислительному стрессу по сравнению с эмбриональными стволовыми клетками человека (ЭСК) и эмбриональными фибробластами лёгкого человека. Влияние окислительного стресса на жизнеспособность клеток оценивали через 24 ч после действия H_2O_2 методом МТТ (см. Материалы и методы исследований), который основан на способности митохондриальных дегидрогеназ восстанавливать желтый МТТ в темно-фиолетовый формазан. Так как реакция восстановления происходит только в живых клетках с активными митохондриальными ферментами, количество образовавшегося формазана коррелирует с числом живых клеток в популяции. В качестве показателя жизнеспособности была выбрана величина LD_{50} , соответствующая концентрации H_2O_2 , при действии которой через 24 ч выживает 50 % клеток. Диапазоны значений LD_{50} составили 600–700, 450–500 и 370–400 мкМ для эМСК, фибробластов и ЭСК, соответственно (рис. 9).

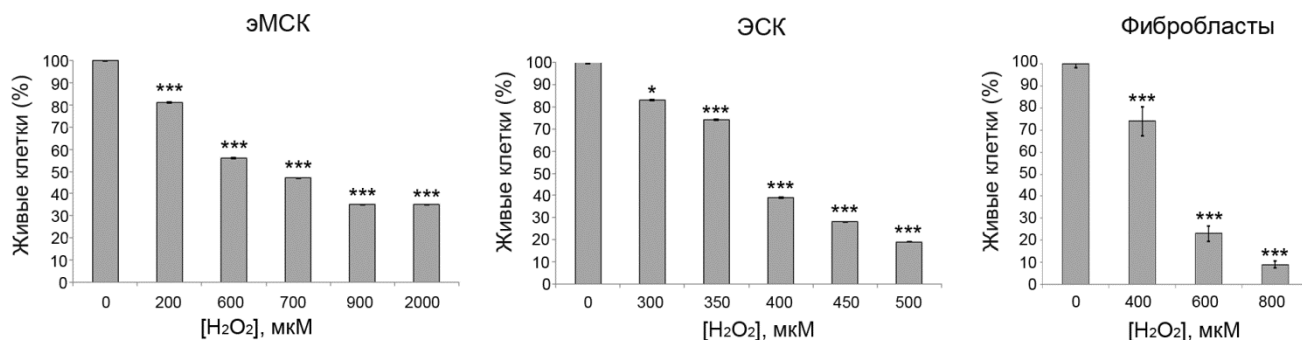


Рис. 9. Жизнеспособность клеток различных типов в зависимости от концентрации H₂O₂.

Долю живых клеток после обработки H₂O₂ в течение 1 ч оценивали через 24 ч методом МТТ. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ SD (N=4), * – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ по сравнению с контролем.

Полученные результаты свидетельствуют о большей устойчивости к окислительному стрессу эМСК по сравнению с фибробластами и ЭСК. В свою очередь, из трех исследованных клеточных линий самыми чувствительными к действию H₂O₂ оказались ЭСК. Исходя из оценки устойчивости клеток к окислительному воздействию, в дальнейших экспериментах при изучении характера гибели клеток использовали токсичные концентрации H₂O₂, превышающие LD₅₀: 500, 800 и 900 мкМ для ЭСК, фибробластов и эМСК, соответственно. С другой стороны, для исследования преждевременного старения в качестве субцитотоксической концентрации для всех линий клеток использовали 200 мкМ H₂O₂.

3.2. Исследование характера гибели ЭСК, фибробластов и эМСК при окислительном стрессе

После оценки устойчивости к окислительному стрессу исследуемых клеточных линий представлялось интересным сравнить особенности гибели этих клеток при действии H₂O₂ в высоких концентрациях. Известно, что окислительный стресс при определенных условиях индуцирует в различных типах клеток запрограммированную клеточную гибель – апоптоз. Одним из методов детекции апоптоза является двойное флуоресцентное окрашивание клеток йодидом пропидия (PI) и аннексином V (An V), конъюгированным с FITC. В основе этого метода лежит способность An V специфично и с высокой аффинностью связывать фосфатидилсерин, который появляется на внешней стороне плазматической мембраны апоптотических клеток. Одновременное окрашивание An V/FITC и PI с последующим анализом методом проточной цитометрии позволяет разделить следующие фенотипы клеток: живые (An V⁻/PI⁻), ранне-апоптотические (An V⁺/PI⁻), поздне-апоптотические (An V⁺/PI⁺) и некротические клетки (AnV⁻/PI⁺).

Другим важным признаком апоптоза является активация каспазного каскада, который в общем случае включает инициаторные каспазы-8,-9,-10 и эффекторные каспазы-3,-7. Активация

эффекторных каспаз является конечной стадией перед запуском протеолитического каскада реакций, ведущего к гибели клетки.

3.2.1. H_2O_2 -индуцированный апоптоз ЭСК

Реакцию ЭСК на действие высоких доз H_2O_2 анализировали методом проточной цитофлуориметрии и иммуноблотинга. Через 2 ч после экспонирования ЭСК с 500 мкМ H_2O_2 мы наблюдали открепление большого числа округлившихся клеток от подложки, что позволило предположить гибель ЭСК путем апоптоза. Для подтверждения этого феномена применили двойное окрашивание как контрольных, так и H_2O_2 -обработанных клеток при помощи An V/FITC и PI. Было выявлено, что в популяции ЭСК, стимулированных H_2O_2 , уже через 2 ч после обработки происходит значительное увеличение числа An V⁺ клеток, которое через 6 ч достигает 40 % (рис. 10).

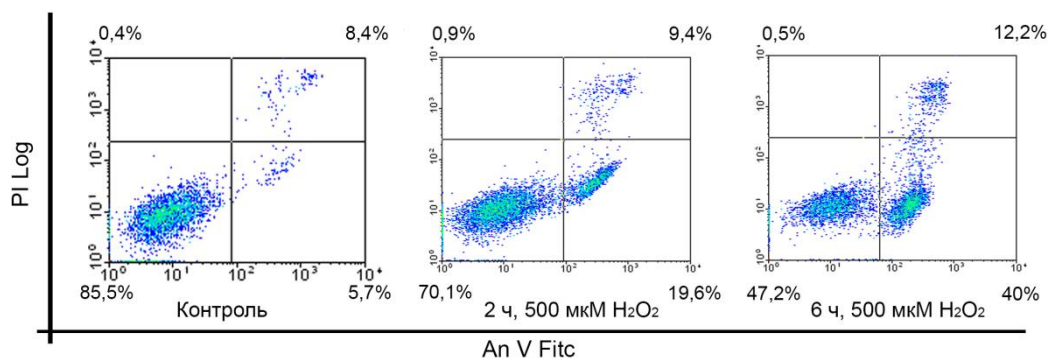


Рис. 10. Распределение ЭСК, меченных An V/FITC и PI, после 1 ч обработки H_2O_2 в концентрации 500 мкМ.

Аналогичную динамику появления An V⁺ клеток мы наблюдали при действии 200 мкМ H_2O_2 : через 2 ч после обработки доля An V⁺ клеток постепенно нарастала и через 6 ч составила 21,7 % (рис. 11), что свидетельствует о дозо-зависимости процесса апоптоза. Следует отметить, что во всех экспериментах для контрольных культур ЭСК был характерен относительно высокий уровень спонтанного апоптоза (5-7 % An V⁺ клеток).

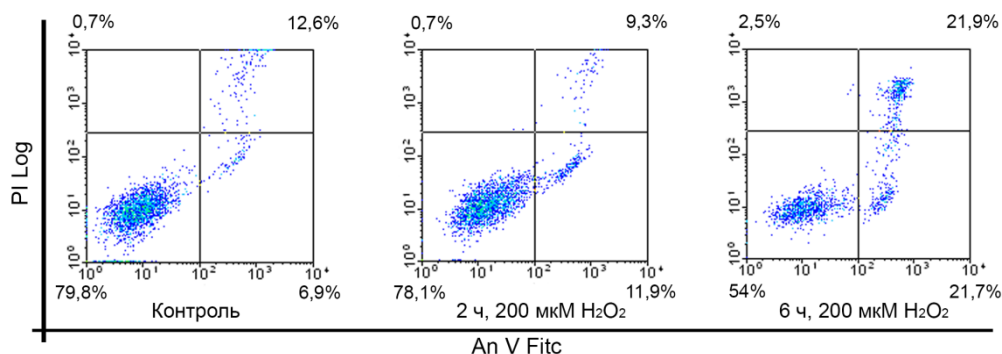


Рис. 11. Распределение ЭСК, меченных An V/FITC и PI, после действия H_2O_2 в концентрации 200 мкМ.

Интересно, что массовая гибель клеток в ответ на разные дозы H_2O_2 наблюдалась только в течение первых суток, затем выжившие после стресса клетки восстанавливали пролиферативный потенциал (рис. 12).

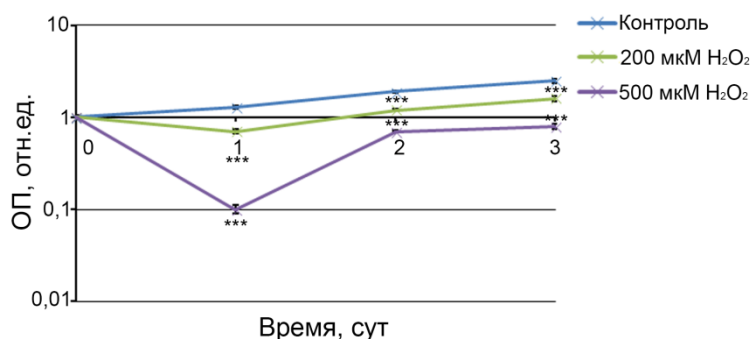


Рис. 12. Динамика жизнеспособности ЭСК в зависимости от концентрации H_2O_2 . Жизнеспособность оценивали методом МТТ. В течение первых суток наблюдали выраженную гибель клеток после действия токсичной концентрации H_2O_2 (500 мкМ), далее выжившие после стресса клетки продолжали нормально пролиферировать. H_2O_2 в концентрации 200 мкМ не оказывала столь же мощного повреждающего воздействия на популяцию ЭСК. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ SD (N=6), *** – $p < 0,001$ по сравнению с контролем.

С целью подтверждения H_2O_2 -индуцированного апоптоза в ЭСК провели исследование уровня активности каспаз методом иммуноблотинга с использованием специфических антител против каспазы-8 и каспазы-3, расщепленной по Asp 175. Через 4 ч после действия 500 мкМ H_2O_2 был выявлен очень высокий уровень экспрессии активной каспазы-3, который снижался до контрольного уровня через 24 ч (рис. 13). Одновременно определяли в иммуноблоте каспазу-8, специфический активатор каспазы-3 (рис. 13). Таким образом, H_2O_2 в концентрации 500 мкМ вызывала быструю и массовую гибель ЭСК путем апоптоза, который был опосредован каспазой-8 с последующей активацией эффекторной каспазы-3.

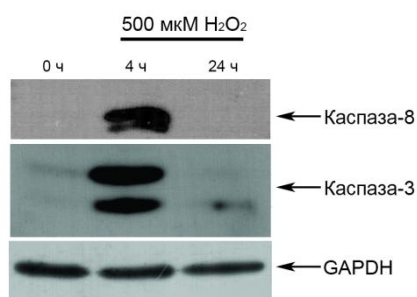


Рис. 13. Выявление каспаз-3 и -8 в лизатах ЭСК после действия 500 мкМ H_2O_2 . Иммуноблотинг проводили с использованием антител против активной (расщепленной по аспарагину 175) каспазы-3 и каспазы-8. В качестве контроля равномерности нанесения белка использовали GAPDH.

На основании полученных данных можно предполагать, что H_2O_2 -индуцированный апоптоз ЭСК является преимущественной реакцией на окислительный стресс и служит

защитным механизмом, благодаря которому поврежденные клетки эффективно элиминируются из популяции с целью сохранения геномной стабильности ЭСК (Stambrook, Tichy, 2010).

3.2.2. Гибель фибробластов при окислительном стрессе

В отличие от ЭСК, первые открепившиеся клетки в популяции фибробластов наблюдали только через 5 ч после действия 800 мкМ H_2O_2 . Методом проточной цитофлуориметрии с использованием An V/PI было показано, что фракция An V^+ клеток к этому времени составляла 7 %, тогда как фракция An V^+/PI^+ клеток – 20% (рис. 14). Через 48 ч после обработки H_2O_2 доля как An V^+ , так и An V^+/PI^+ клеток увеличивалась примерно в 3 раза и достигала 18,8 % и 61,9 %, соответственно (рис. 14).

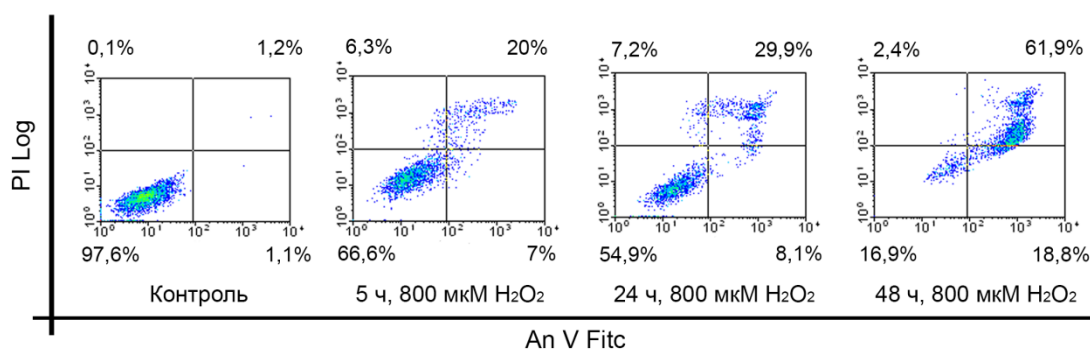


Рис. 14. Распределение фибробластов, меченных An V/FITC и PI, после действия H_2O_2 в концентрации 800 мкМ.

На основании полученных данных можно заключить, что при действии летальной дозы H_2O_2 фибробласты подвергались апоптозу, который, по сравнению с ЭСК, характеризовался следующими особенностями: (1) более медленной динамикой; (2) небольшой долей An V^+ клеток в популяции (18,8 %) и одновременно существенным увеличением доли An V^+/PI^+ клеток (61,9 %) через 2 сут после воздействия (рис. 14). Особо отметим, что H_2O_2 в сублетальной концентрации 200 мкМ не индуцировала апоптоз в фибробластах (рис. 15).

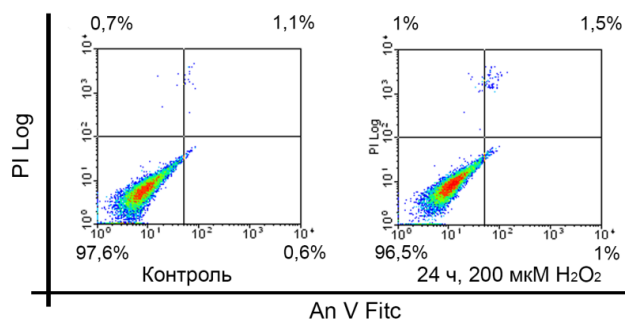


Рис. 15. Распределение фибробластов, меченных An V/FITC и PI, после действия H_2O_2 в концентрации 200 мкМ.

Методом иммуноблоттинга мы выявили заметное повышение уровня экспрессии каспазы-8 и каспазы-3 только через 24 ч после действия H_2O_2 на фибробласты (**рис. 16**), в отличие от быстрой активации этих белков в ЭСК (через 4 ч) (**рис. 13**).

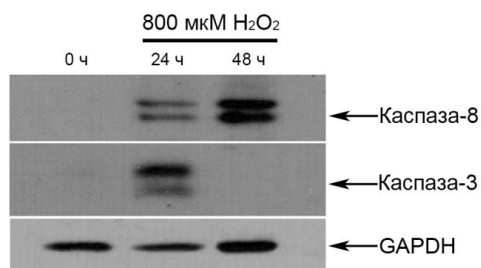


Рис. 16. Выявление каспаз-3 и -8 в лизатах фибробластов после действия 800 мкМ H_2O_2 .

Иммуноблоттинг проводили с использованием антител против активной (расщепленной по аспарагину 175) каспазы-3 и каспазы-8. В качестве контроля равномерности нанесения белка использовали GAPDH.

Таким образом, несмотря на существенные различия характера и динамики гибели ЭСК и фибробластов в ответ на действие цитотоксических доз H_2O_2 , можно предположить, что эти клетки используют одинаковый механизм апоптоза, включающий активацию каспазы-8 и эффекторной каспазы-3.

3.2.3. Характер ответа эМСК на разные дозы H_2O_2

На следующем этапе исследований мы проверили, может ли H_2O_2 в высокой концентрации вызывать апоптоз в эМСК. Открепление от подложки небольшого числа округлившихся клеток в популяции эМСК, обработанной 900 мкМ H_2O_2 , мы наблюдали лишь через 1 сут, в отличие от более быстрого аналогичного процесса в ЭСК и фибробластах. При этом доля $An V^+$ клеток через сутки после действия H_2O_2 возрастала незначительно (до 4,3 %) по сравнению с контролем (1,7 %), тогда как доля $An V^+/PI^+$ клеток составляла 13,9 % (в контроле - 5,9 %) (**рис. 17**). Через 2 сут доля $An V^+/PI^+$ клеток постепенно увеличивалась до 22,4 % при несущественном изменении доли $An V^+$ клеток (**рис. 17**). Более того, даже через 4 сут после действия 900 мкМ H_2O_2 суммарная доля погибших клеток не превышала 32 % (данные не показаны).

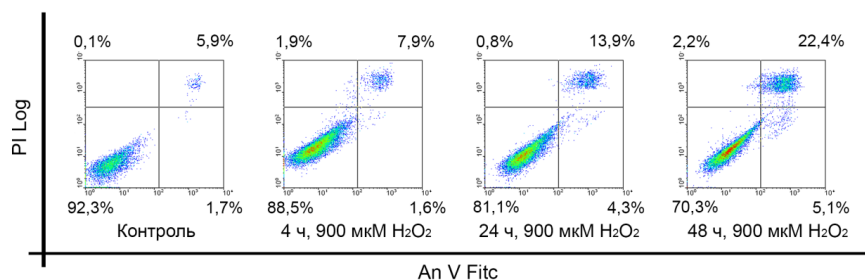


Рис. 17. Распределение эМСК, меченных An V/FITC и PI, после действия H_2O_2 в концентрации 900 мкМ.

Эти результаты демонстрируют, что в эМСК в ответ на действие 900 мкМ H_2O_2 развивается апоптоз, характеризующийся медленной динамикой. Стоит подчеркнуть, что уровень апоптоза при обработке клеток как 900 мкМ, так и 2 мМ H_2O_2 был сопоставим. Полученные данные свидетельствуют о высоком уровне устойчивости эМСК к апоптозу в ответ на окислительный стресс, индуцированный H_2O_2 в широком диапазоне концентраций от 900 мкМ до 2 мМ. Повышенная устойчивость этих клеток подтверждается тем фактом, что стауроспорин в концентрации 1 мкМ, обычно используемой для индукции апоптоза в клетках различных типов, не вызывал гибели эМСК (данные не показаны). Более сильная индукция апоптоза в эМСК обеспечивалась только в случае использования высокотоксичной дозы H_2O_2 (3 мМ) (рис. 18).

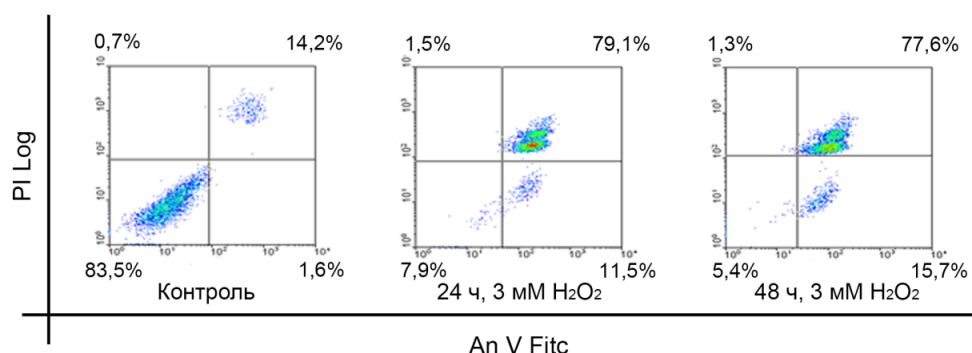


Рис. 18. Распределение эМСК, меченных An V/FITC и PI, после действия H_2O_2 в концентрации 3 мМ.

Интересно, что при действии любой цитотоксической концентрации H_2O_2 (900 мкМ, 2 мМ или 3 мМ), не зависимо от времени, доля An V^+ клеток всегда оставалась существенно меньшей, чем $\text{An V}^+/\text{PI}^+$ клеток. Аналогичное соотношение было типично и для фибробластов. Другое важное сходство эМСК с фибробластами заключается в отсутствии каких-либо признаков апоптоза в течение длительного времени после действия H_2O_2 в сублетальной концентрации (200 мкМ), что подтверждается окраской клеток при помощи An V/PI (рис. 19).

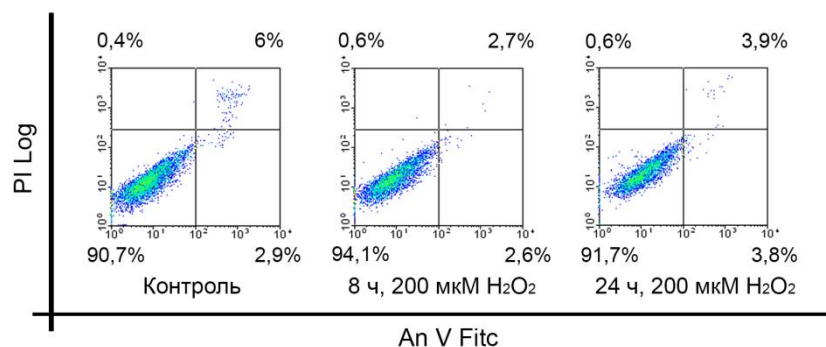


Рис. 19. Распределение эМСК, меченных An V/FITC и PI, после действия H_2O_2 в концентрации 200 мкМ.

Для выяснения механизма H_2O_2 -индуцированного апоптоза эМСК мы детектировали каспазы 3 и -8 в лизатах клеток методом иммуноблотинга. Каспаза-8 была выявлена через 16 ч после действия H_2O_2 , тогда как активная (расщепленная по Asp175) каспаза-3 появлялась на заметном уровне лишь через 24 ч (**рис. 20**).

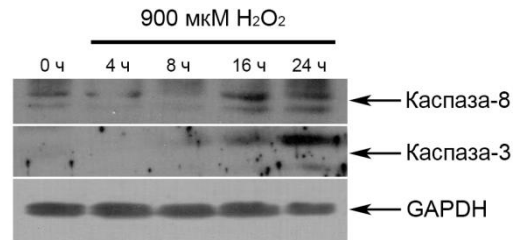


Рис. 20. Выявление каспаз-3 и -8 в лизатах эМСК после действия 900 мкМ H_2O_2 . Иммуноблотинг проводили с использованием антител против активной (расщепленной по Asp175) каспазы-3 и каспазы-8. В качестве контроля равномерности нанесения белка использовали GAPDH.

Следует отметить, что уровень экспрессии каспазы-3 в эМСК был значительно ниже по сравнению с ЭСК, причем определение было возможно только при использовании специального набора SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo scientific), предназначенного для выявления малых количеств белков. Таким образом, для всех исследованных линий клеток (ЭСК, фибробласты и эМСК) можно констатировать вовлеченность каспазы-3 и каспазы-8 в H_2O_2 -индуцированный апоптоз.

Суммируя полученные в главе 3.2 результаты, мы заключаем, что динамика H_2O_2 -индуцированного апоптоза в ЭСК, фибробластах и эМСК существенно различается. Наиболее чувствительные к окислительному стрессу ЭСК демонстрировали быструю и массовую гибель в ответ на действие цитотоксической концентрации H_2O_2 . Однако через 48 ч после окислительного воздействия нормальная пролиферация клеток восстанавливалась. Совершенно другая ситуация была характерна для эМСК: благодаря высокой устойчивости этих клеток к токсическому действию H_2O_2 апоптоз медленно развивался лишь при действии очень высоких концентраций H_2O_2 . Динамика апоптоза в фибробластах, занимающих промежуточное положение между эМСК и ЭСК по устойчивости к окислительному стрессу, имела наибольшее сходство с эМСК. Несмотря на различную динамику активации апоптоза, продемонстрированная зависимость гибели поврежденных при окислительном стрессе клеток от активности каспаз-3 и -8 позволяет предположить, что все исследованные линии клеток используют, в основном, одинаковый механизм H_2O_2 -индуцированного апоптоза.

На основании наших результатов можно заключить, что преимущественной реакцией ЭСК на окислительный стресс, независимо от используемой концентрации H_2O_2 , является апоптоз. Напротив, в эМСК и фибробластах только высокие концентрации H_2O_2 способны были

инициировать апоптоз, тогда как действие H_2O_2 в сублетальной концентрации не приводило к гибели клеток. Этот экспериментальный факт наводит на мысль о существовании принципиально другого, отличного от апоптоза, ответа ЭМСК и фибробластов на сублетальный окислительный стресс. В связи с этим, на следующем этапе работы нам представлялось интересным исследовать реакции этих клеток на субцитотоксическое воздействие H_2O_2 .

3.3. Исследование ответа фибробластов на действие H_2O_2 в сублетальной концентрации

Кроме апоптоза, на сегодняшний день известен и другой механизм регулирования жизнеспособности поврежденных клеток — клеточное старение. Известно, что пролиферирующие клетки, такие как нормальные диплоидные фибробласты кожи и легкого, меланоциты, эндотелиальные и эпителиальные клетки, могут входить в состояние преждевременного старения в условиях субцитотоксического стресса, вызванного УФ- и γ -излучением (Medrano et al., 1995; Toussaint et al., 2000; Oh et al., 2001), окислительным стрессом (Chen et al., 1998; Dumont et al., 2000; Toussaint et al., 2000; Duan et al., 2005; Brandl et al., 2011a) или обработкой ингибиторами гистон-деацетилазы (Ogryzko et al., 1996; Demidenko et al., 2009). Такую форму клеточного старения принято называть стресс-индуцированной. Основные признаки стресс-индуцированного старения включают в себя характерные фенотипические изменения клеток (увеличение их размера и уплощение), накопление в популяции SA- β -Gal-позитивных клеток и необратимую потерю пролиферативного потенциала.

3.3.1. Индукция преждевременного старения фибробластов после обработки 200 мкМ H_2O_2

Для проверки возможности индукции преждевременного старения фибробластов в наших экспериментальных условиях, клетки обрабатывали H_2O_2 в сублетальной концентрации (200 мкМ) в течение 1 ч, а затем анализировали основные показатели, характерные для индуцированного стрессом преждевременного старения. Необходимо отметить, что мы использовали фибробласты только на ранних пассажах (между 14 и 23), чтобы избежать нежелательного репликативного старения клеток, поскольку основные черты как индуцированного стрессом, так и репликативного старения совпадают (Toussaint et al., 2000; Fripiat et al., 2001).

Наблюдения за H_2O_2 -обработанными клетками в течение длительного времени (вплоть до 9 сут) выявили типичную для стареющих клеток морфологию: клетки постепенно становились более плоскими и укрупнялись. Размер клеток оценивали с помощью метода проточной цитометрии по изменению прямого светорассеяния (FS) на образцах, окрашенных PI. Принцип метода основан на регистрации светорассеяния от каждой отдельно взятой клетки в клеточной суспензии, при этом интенсивность рассеянного под малым углом света пропорциональна размеру клетки. Важно отметить, что более крупные клетки способны

рассеивать свет сильнее, чем мелкие. В результате оказалось, что через 6 сут после действия H_2O_2 размер фибробластов увеличился почти в 3 раза по сравнению с контрольными клетками (рис. 21).

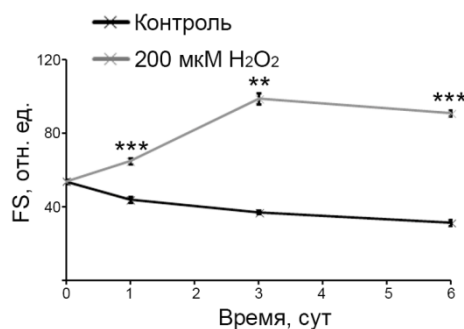


Рис. 21. Изменение прямого светорассеяния PI-окрашенных фибробластов.

Увеличение прямого светорассеяния (FS), коррелирующее с увеличением размера клеток, наблюдается в H_2O_2 -обработанных фибробластах по сравнению с контрольными (необработанными). Данные представлены в виде средних значений $\pm$ SD (N=3), ** – $p < 0,005$, *** – $p < 0,001$ по сравнению с контролем.

Еще одним общепринятым маркером старения является повышение в лизосомах активности β -галактозидазы, ассоциированной со старением (SA- β -Gal), которая выявляется по появлению характерных голубых гранул в цитоплазме клеток. При pH 4,0 этот фермент можно детектировать как в нормально пролиферирующих, так и в стареющих клетках; окрашивание клеток при pH 6,0 является оптимальным для выявления активности β -галактозидазы исключительно в стареющих (старых) клетках (Dimri et al., 1995). В культуре фибробластов после обработки H_2O_2 мы наблюдали постепенное увеличение интенсивности окраски и числа SA- β -Gal-позитивных клеток в течение 7 сут (рис. 22), тогда как в экспоненциально растущей контрольной культуре обнаружили лишь едва заметное увеличение интенсивности окраски отдельных клеток.

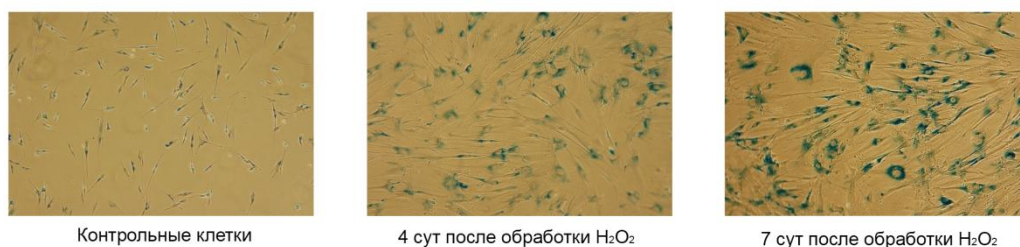


Рис. 22. Появление ассоциированной со старением β -галактозидазной активности (SA- β -Gal) в культуре фибробластов после обработки H_2O_2 в концентрации 200 мкМ. Представлены данные типичного эксперимента.

Помимо описанных выше фенотипических изменений, характерных для процесса преждевременного старения, мы оценили изменение пролиферативного статуса обработанных H_2O_2 фибробластов. Оказалось, что действие 200 мкМ H_2O_2 приводило к остановке пролиферации клеток, о чем свидетельствует отсутствие увеличения числа H_2O_2 -

стимулированных фибробластов в течение как минимум 9 сут по сравнению с контрольными пролиферирующими клетками (рис. 23).

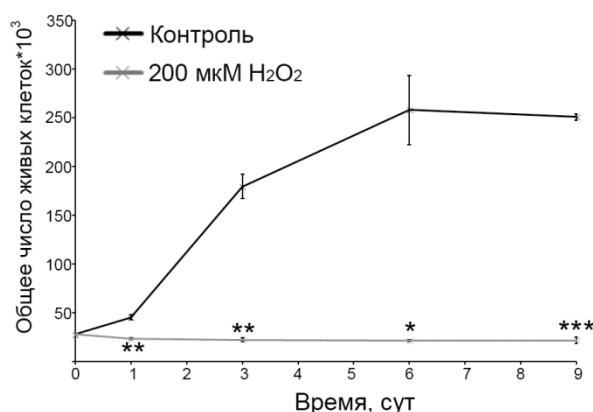


Рис. 23. Кривые роста контрольных и обработанных 200 мкМ H₂O₂ фибробластов.

Данные представлены в виде средних значений $\pm$ SD (N=3), * – $p < 0,01$, ** – $p < 0,005$, *** – $p < 0,001$ по сравнению с контролем.

Представленные результаты подтверждают, что сублетальная доза H₂O₂ действительно инициирует преждевременное старение в эмбриональных фибробластах лёгкого человека.

3.4. Преждевременное старение эМСК в ответ на действие H₂O₂ в сублетальной концентрации

В отличие от фибробластов, являющихся классической моделью для изучения стресс-индуцированного старения, в эМСК феномен преждевременного старения до настоящего времени не был исследован. В связи с этим было интересно выяснить, могут ли эМСК подвергаться преждевременному старению в ответ на действие H₂O₂ в сублетальной концентрации (200 мкМ).

3.4.1. Развитие фенотипа преждевременного старения в H₂O₂-обработанных эМСК

Согласно нашим многодневным наблюдениям за клеточной культурой, обработанной 200 мкМ H₂O₂ в течение 1 ч, часть клеток уже через 2 сут после обработки претерпевала характерные для старения фенотипические изменения – клетки становились плоскими и зернистыми, размер их увеличивался. По аналогии с фибробластами, мы исследовали H₂O₂-индуцированное изменение размера эМСК методом прямого светорассеяния. Размер H₂O₂-стимулированных клеток по мере культивирования постепенно увеличивался, при этом контрольные клетки практически не изменялись по размеру. H₂O₂ индуцировала увеличение размера эМСК приблизительно в 1,5 раза через 5 сут (рис. 24, а), однако, при более длительном культивировании (в течение 11 сут) дальнейшего увеличения размера не происходило.

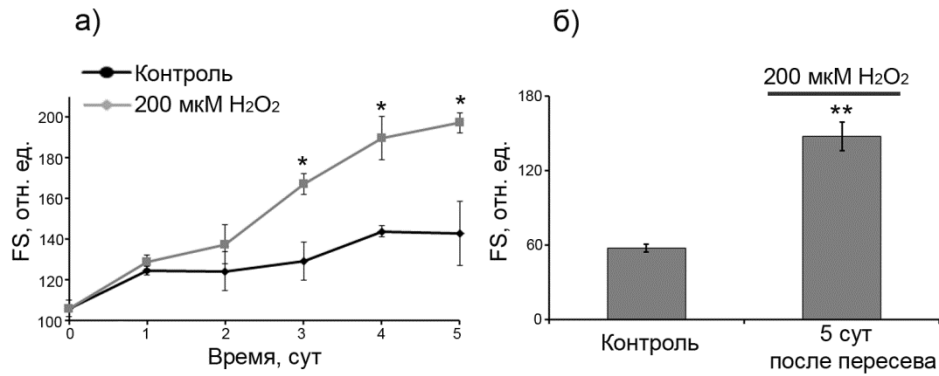


Рис. 24. Изменение прямого светорассеяния (FS) PI-окрашенных эМСК.

а) динамика изменения размера клеток в контроле и после действия 200 мкМ H₂O₂; б) увеличение размера H₂O₂-обработанных эМСК после пересева. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ SD (N=3), * – $p < 0,01$, ** – $p < 0,005$ по сравнению с контролем.

Можно предположить, что это было связано с максимальным уплотнением клеток на чашке. Для проверки такого предположения как контрольные, так и H₂O₂-обработанные эМСК пересеивали через 7 сут и культивировали дополнительно в течение 5 сут. В этом случае пересеянные клетки демонстрировали значительно большее увеличение размера (в 2,6 раза) по сравнению с контрольными клетками (рис. 24, б). Эти данные подтверждают наше предположение: при наличии свободного места на поверхности чашки H₂O₂-стимулированные эМСК продолжают увеличиваться в размере в процессе культивирования. Важно отметить хорошую корреляцию между гипертрофией обработанных клеток и накоплением белка, количество которого определяли в лизатах клеток по методу Бредфорд.

Кроме того, мы наблюдали постепенное увеличение активности SA- β -Gal в обработанных клетках, которая достигала максимального значения через 7 сут после действия H₂O₂, когда более 95 % клеток были SA- β -Gal-положительными (рис. 25).

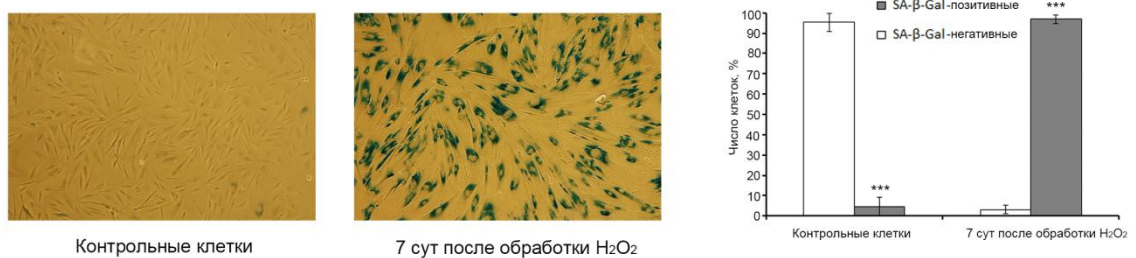


Рис. 25. Развитие окраски на SA- β -Gal в эМСК после действия 200 мкМ H₂O₂.

Представлены данные типичного эксперимента. Справа приведена количественная оценка результатов окраски на SA- β -Gal. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ SD (N=6), *** – $p < 0,001$.

Об активности SA- β -Gal судили по появлению в цитоплазме клеток синих гранул. При этом в культуре контрольных клеток можно было обнаружить лишь слабое увеличение интенсивности окраски отдельных клеток. Стоит отметить, что такой высокий процент SA- β -Gal-положительных клеток (95 %) сохранялся вплоть до 21-го дня после действия окислителя.

Таким образом, полученные результаты демонстрируют, что фенотипические изменения, наблюдаемые в эМСК после действия H_2O_2 в сублетальной концентрации, сходны с таковыми в фибробластах и характерны для культуры старых клеток.

3.4.2. Остановка пролиферации и арест клеточного цикла в H_2O_2 -обработанных эМСК

Важнейшим показателем индукции клеточного старения, наряду с морфологическими изменениями, является необратимая остановка пролиферации клеток. В связи с этим, на следующем этапе мы исследовали изменение пролиферации и распределение по фазам клеточного цикла эМСК после действия окислительного стресса. Характер кривой роста, построенной на основании данных, полученных методом проточной цитометрии, свидетельствует об отсутствии увеличения числа клеток в популяции, обработанной H_2O_2 , по сравнению с контрольными пролиферирующими клетками (рис. 26).

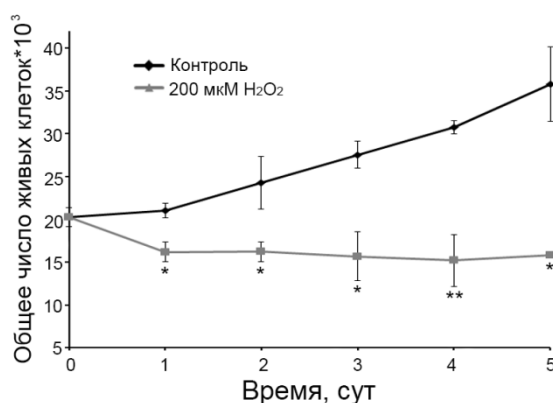


Рис. 26. Кривые роста контрольных и обработанных 200 мкМ H_2O_2 эМСК. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ SD (N=3), * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$.

Это могло быть связано либо с гибелью обработанных клеток, либо с блоком клеточного цикла. Поскольку при обработке H_2O_2 в концентрации 200 мкМ мы наблюдали гибель лишь незначительного числа клеток, как описано выше в разделе 3.1, было проанализировано распределение эМСК по фазам клеточного цикла. Как видно на рис. 27, а, действие H_2O_2 вызывало остановку клеточного цикла во всех фазах в течение всего периода наблюдения. Интересно отметить, что распределение обработанных клеток по фазам цикла в каждой выбранной временной точке повторяло распределение контрольных клеток и характеризовалось лишь небольшим увеличением доли клеток в фазе G1. Несмотря на видимое отсутствие выраженного G1-блока, который, согласно литературным данным, типичен для стресс-индуцированного старения других типов клеток, с помощью двумерной цитограммы нам удалось продемонстрировать торможение перехода H_2O_2 -обработанных клеток из G1 в S фазу (рис. 27, б).

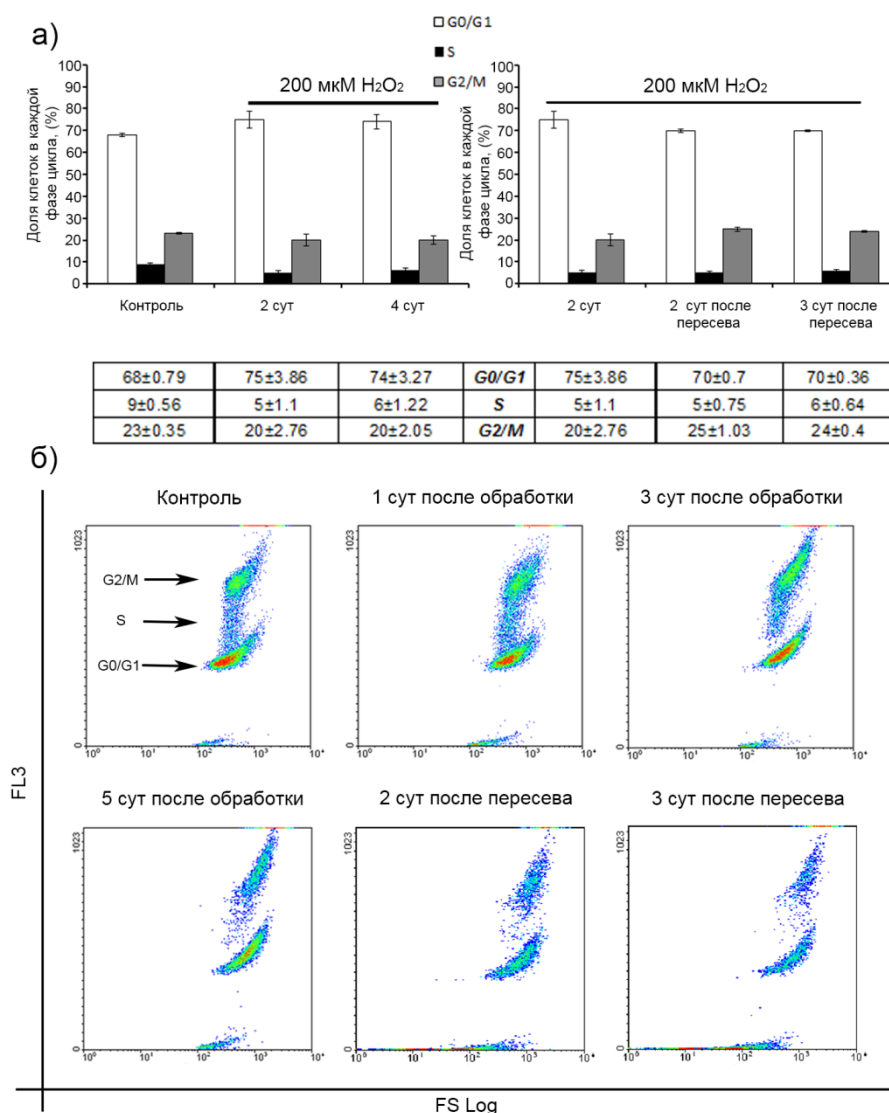


Рис. 27. Распределение клеток по фазам клеточного цикла.

На данном рисунке приведены разные варианты представления результатов анализа распределения клеток по фазам цикла, полученные с помощью метода проточной цитометрии: а) данные представлены в виде гистограммы, по вертикали – доля клеток (%) в разных фазах клеточного цикла; б) данные представлены в виде двухпараметрической цитогаммы.

Для подтверждения необратимости блока клеточного цикла, ЭМСК пересевали через 2 сут после стимуляции H₂O₂ и дополнительно культивировали в течение 2-х и 3-х сут. Оказалось, что независимо от схемы пересева клетки по-прежнему находятся в состоянии ареста и имеют такое же распределение по фазам клеточного цикла, как и до пересева (**рис. 27, а, правая часть, рис. 27, б, нижняя панель**).

Данные, демонстрирующие H₂O₂-индуцированный блок цикла, подтверждаются результатами, полученными с использованием антител против ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA), который синтезируется только на ранних G1 и S-фазах клеточного цикла. Как показано методом иммуноблотинга, уровень экспрессии белка PCNA в

H_2O_2 -стимулированных клетках в течение всего времени наблюдения (9 сут) был значительно снижен по сравнению с необработанными клетками (рис. 28).

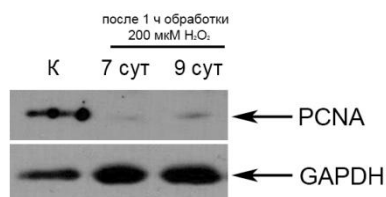


Рис. 28. Содержание белка PCNA падает в лизатах H_2O_2 -обработанных эМСК при длительном культивировании.

К – контрольные (необработанные) клетки. В качестве контроля равномерности нанесения белка использовали GAPDH.

Чтобы получить дополнительное доказательство необратимой остановки пролиферации в H_2O_2 -обработанных клетках, мы проанализировали изменение уровня экспрессии ядерного белка Ki67 методом иммунофлуоресценции. Белок Ki67 является широко распространенным маркером пролиферирующих клеток благодаря его способности экспрессироваться во всех фазах клеточного цикла. Важно, что этот маркер отсутствует в не пролиферирующих клетках. Как видно на рис. 29, через 5 сут после обработки эМСК в культуре отсутствовали Ki67-позитивные клетки, в то время как в контрольных клетках была выявлена сильная экспрессия этого маркера.

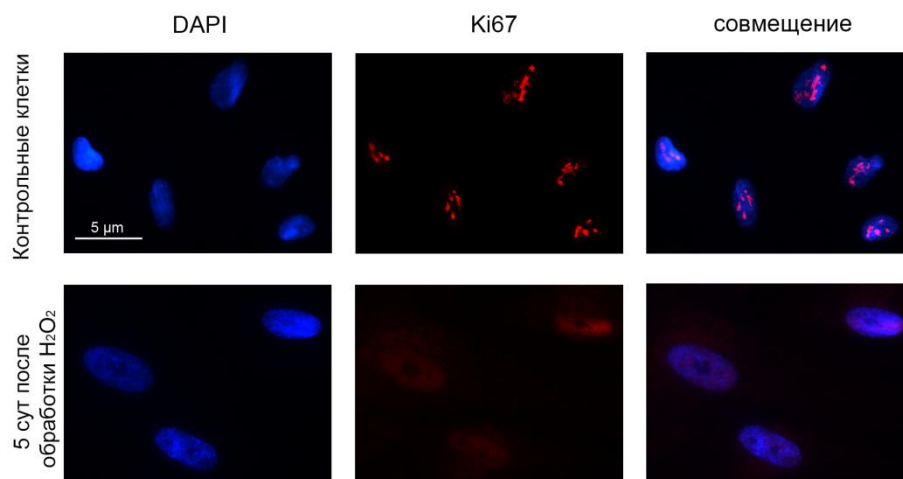


Рис. 29. Окраска контрольных и H_2O_2 -обработанных эМСК специфическими антителами на Ki67.

Иммунофлуоресцентная микроскопия, об. 100×.

Совокупность полученных результатов свидетельствует о необратимой остановке пролиферации эМСК в ответ на действие H_2O_2 в сублетальной концентрации.

На основании представленных в главе 3.4 данных можно заключить, что эМСК, подобно фибробластам, отвечают на сублетальный окислительный стресс индукцией преждевременного старения, которое развивается вследствие необратимой остановки пролиферации клеток.

3.4.3. Реализация блока клеточного цикла в H_2O_2 -обработанных ЭМСК

Механизм возникновения блока клеточного цикла включает подавление активности циклин-зависимых киназ, регулирующих прохождение клеток по фазам цикла, в результате связывания ингибиторов циклин-зависимых киназ с ферментом. Ранее было показано, что наиболее важную роль в индукции блока клеточного цикла при развитии преждевременного старения клеток человека играют такие ингибиторы циклин-зависимых киназ, как белки p21 и p16. В связи с этим представляло интерес исследовать возможное участие этих ингибиторов в процессе H_2O_2 -индуцированного старения ЭМСК. Как известно, количество p21 в клетке регулируется на уровне транскрипционной активации и пост-транскрипционной стабилизации мРНК и белка, поэтому для выяснения возможного участия p21 в регуляции преждевременного старения ЭМСК мы определили в лизатах клеток содержание белка p21 методом иммуноблотинга и уровень экспрессии его гена методом ПЦР. Оказалось, что H_2O_2 в концентрации 200 мкМ приводила к значительному увеличению как уровня мРНК (рис. 30, а), так и белка p21 (рис. 30, б) уже через 7 ч после обработки.

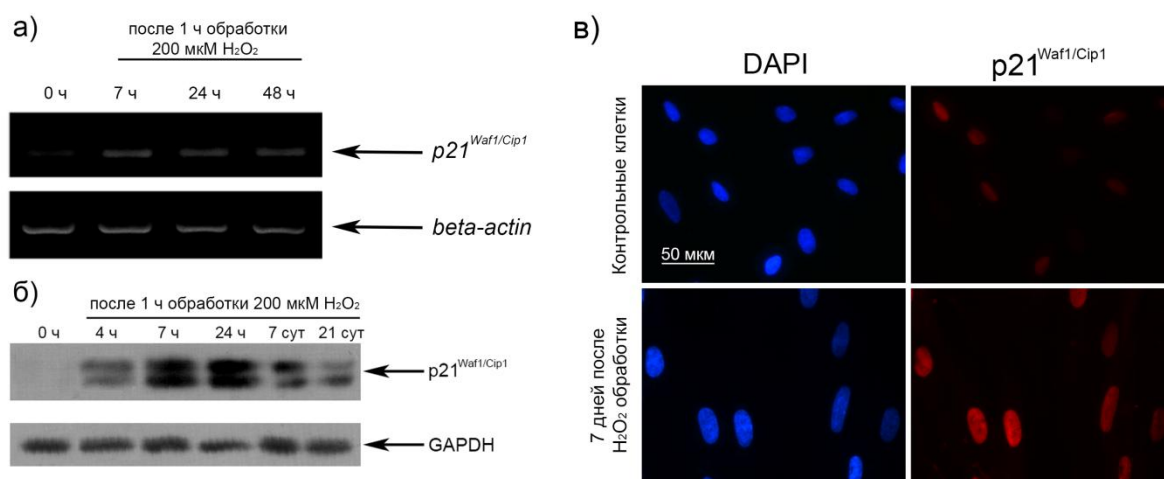


Рис. 30. Изменение содержания мРНК (а) и белка (б) $p21^{Waf1/Cip1}$ в контрольных и H_2O_2 -обработанных ЭМСК. (в) Иммунофлуоресцентный анализ внутриклеточной локализации p21 в контроле и после действия H_2O_2 (об. 40×).

В качестве контроля равномерности нанесения проб использовали GAPDH и *beta-actin*.

Максимальное накопление белка p21 наблюдали через 7 ч, причем повышенный уровень его сохранялся в течение 1 сут, а затем снижался до уровня, немного выше контрольного. Несмотря на очевидное снижение уровня белка p21, остановленные в прогрессе по циклу клетки не возобновляли пролиферацию (рис. 26) и имели морфологию, характерную для старых клеток (рис. 24). Для подтверждения данных ПЦР и иммуноблотинга был проведен иммунофлуоресцентный анализ внутриклеточной локализации p21. Как можно видеть на рис. 30, в, через 7 сут после действия H_2O_2 уровень локализованного в ядре белка p21 превышает

таковой в контроле. Следовательно, повышение уровня экспрессии p21 было необходимо для запуска преждевременного старения в эМСК в ответ на окислительный стресс.

Согласно литературным данным, в процессе старения клеток p16 экспрессируется значительно позже, чем p21, предотвращая тем самым возможность для остановленных клеток снова войти в цикл. Однако мы обнаружили значительное увеличение уровня экспрессии белка p16 только на ранней стадии в течение 1 ч, т. е. в период действия H_2O_2 (рис. 31), тогда как на более поздних сроках p16 не был выявлен в эМСК, обработанных H_2O_2 . На основании этих данных мы предполагаем, что вовлечение p16 в процесс преждевременного старения эМСК происходит исключительно на стадии индукции блока клеточного цикла.

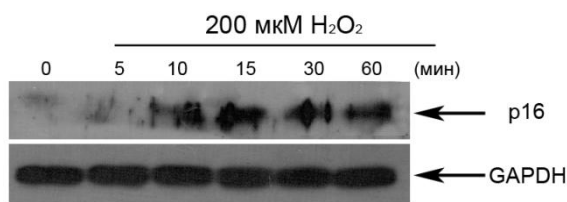


Рис. 31. Индукция экспрессии белка p16 в ответ на обработку эМСК при помощи H_2O_2 .

Иммуноблотинг проведен с использованием специфических антител против p16. В качестве контроля равномерности нанесения белка использовали GAPDH.

Известно, что нижележащей мишенью обоих ингибиторов циклин-зависимых киназ является белок ретинобластомы (Rb). Индукция экспрессии p16 и p21 препятствует фосфорилированию Rb и, следовательно, запуску E2F-зависимой транскрипции генов пролиферации, останавливая репликацию ДНК и деление клетки. Для оценки функционального состояния Rb в процессе установления блока клеточного цикла в эМСК, мы исследовали кинетику активации этого белка в H_2O_2 -стимулированных клетках. Как и ожидалось, фосфорилированная форма Rb в обработанных клетках отсутствовала, начиная с 7 ч после действия H_2O_2 и далее в течение всего периода наблюдения, тогда как для контрольных клеток был характерен высокий уровень фосфорилирования Rb (рис. 32).

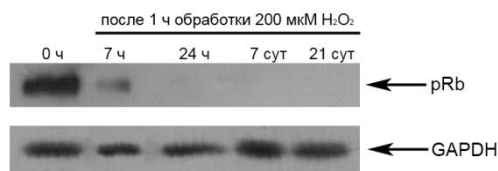


Рис. 32. Кинетика активации белка Rb в H_2O_2 -стимулированных эМСК.

В качестве контроля равномерности нанесения белка использовали GAPDH.

Суммируя полученные результаты, можно заключить, что активация p16/Rb и p21/Rb путей, приводящих к аресту клеточного цикла, необходима для индукции преждевременного старения эМСК в условиях окислительного стресса.

3.5. Исследование механизма, лежащего в основе стресс-индуцированного старения эМСК

3.5.1. Быстрое накопление экзогенной H_2O_2 в эМСК

Молекула H_2O_2 , в силу своей природы, посредством диффузии может беспрепятственно проникать через мембрану клеток во внутриклеточное пространство, оказывая повреждающее действие на липиды, белки и ДНК. Согласно нашим наблюдениям, проникновение H_2O_2 в эМСК сопровождалось существенными морфологическими изменениями клеток, происходящими в течение 1 ч. Как видно на **рис. 33**, клетки заметно уменьшались в размере и округлялись, однако, уже через 24 ч восстанавливали нормальную морфологию (данные не показаны).

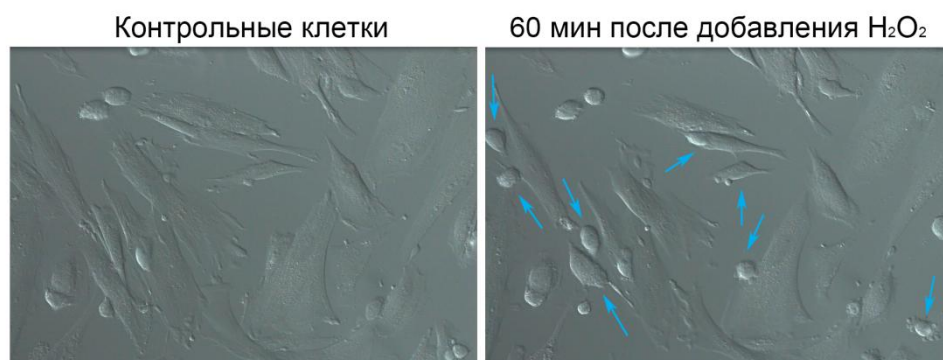


Рис. 33. Проникновение H_2O_2 в клетки приводит к временным морфологическим изменениям эМСК (об. 40×).

Как видно, многие клетки реагируют на добавление H_2O_2 кратковременным сжатием и округлением; справа указано время, прошедшее с момента начала обработки клеток.

Для изучения динамики проникновения H_2O_2 в клетки в наших экспериментальных условиях мы использовали краситель 2,7-дихлорфлуоресцеин диацетат (H_2DCF -DA), способный свободно проникать через мембраны клеток. В клетке краситель в результате взаимодействия с неспецифическими внутриклеточными эстеразами превращается в H_2DCF , который обладает меньшей проникающей способностью и преимущественно накапливается внутри клеток, где он реагирует с H_2O_2 , образуя сильно флуоресцирующий продукт – DCF. Таким образом, увеличение интенсивности флуоресценции DCF отражает накопление H_2O_2 внутри клеток. Изменение концентрации H_2O_2 в эМСК, окрашенных при помощи H_2DCF -DA, непрерывно регистрировали в течение 60 мин с использованием двух методов: (1) конфокальной микроскопии, которая позволяет наблюдать изменения флуоресценции, происходящие внутри отдельных клеток, выбранных для исследования; (2) проточной цитометрии, с помощью которой оценивали среднее значение флуоресценции на клетку. Оказалось, что при обработке клеток 200 мкМ H_2O_2 происходит быстрое повышение уровня внутриклеточных АФК, который уже через 15 мин достигал максимального значения и далее

снижался таким образом, что к окончанию времени инкубации с H_2O_2 (через 60 мин) был ниже контрольного (рис. 34, а, б, в). Результаты этих экспериментов убедительно доказывают, что H_2O_2 в концентрации 200 мкМ полностью утилизируется клетками в течение 1 ч.

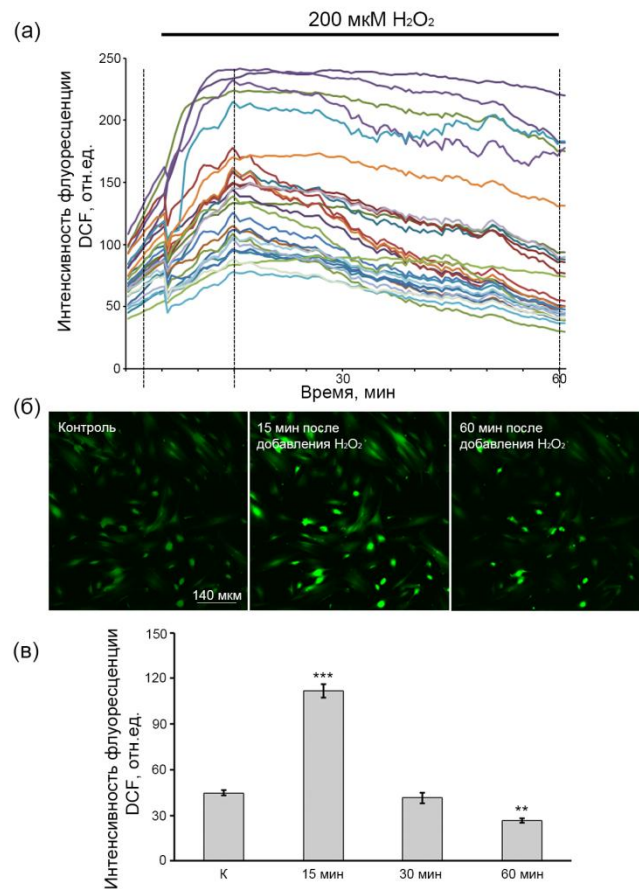


Рис. 34. Динамика проникновения H_2O_2 в эМСК.

(а) Изменение уровня внутриклеточных АФК после добавления 200 мкМ H_2O_2 . Каждая кривая представляет изменение флуоресценции DCF в одной клетке. (б) Флуоресцентные изображения эМСК, зарегистрированные в моменты, отмеченные пунктирными линиями над соответствующими регистрациями. (в) Изменение уровня АФК, полученное с использованием метода проточной цитометрии. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ SD (N=3), ** – $p < 0,005$, *** – $p < 0,001$.

Учитывая эти наблюдения и приведенное выше доказательство полной утилизации экзогенной H_2O_2 во время обработки клеток, можно предположить, что повреждающие эффекты H_2O_2 , приводящие в дальнейшем к преждевременному старению, могут реализоваться в пределах 1 ч.

3.5.2. Ранняя активация ответа на повреждение ДНК вследствие проникновения H_2O_2 в эМСК

Различные внутриклеточные АФК, в частности H_2O_2 , способны вызывать множество неблагоприятных эффектов, важнейшую роль среди которых играют повреждения ДНК, включающие одно- и двунитевые разрывы ДНК. Возникновение разрывов ДНК, в свою очередь, запускает каскад последовательных реакций, называемых ответом на повреждение

ДНК (DNA damage response, DDR). DDR характеризуется формированием сайтов повреждения ДНК, содержащих активированную АТМ киназу (рАТМ), фосфорилированные гистон H2AX (γ H2AX) и адапторный белок 53BP1 (р53BP1). С целью проверки возможности активации DDR в H_2O_2 -обработанных эМСК, мы оценивали функциональный статус ключевых белков, участвующих в этом ответе. Иммунофлуоресцентный анализ с использованием специфических антител против рАТМ, γ H2AX и р53BP1 выявил быструю активацию АТМ (через 5 мин после начала обработки) (**рис. 35, а**) и последующее одновременное фосфорилирование 53BP1 и H2AX (через 15 мин) (**рис. 35 б, в**).

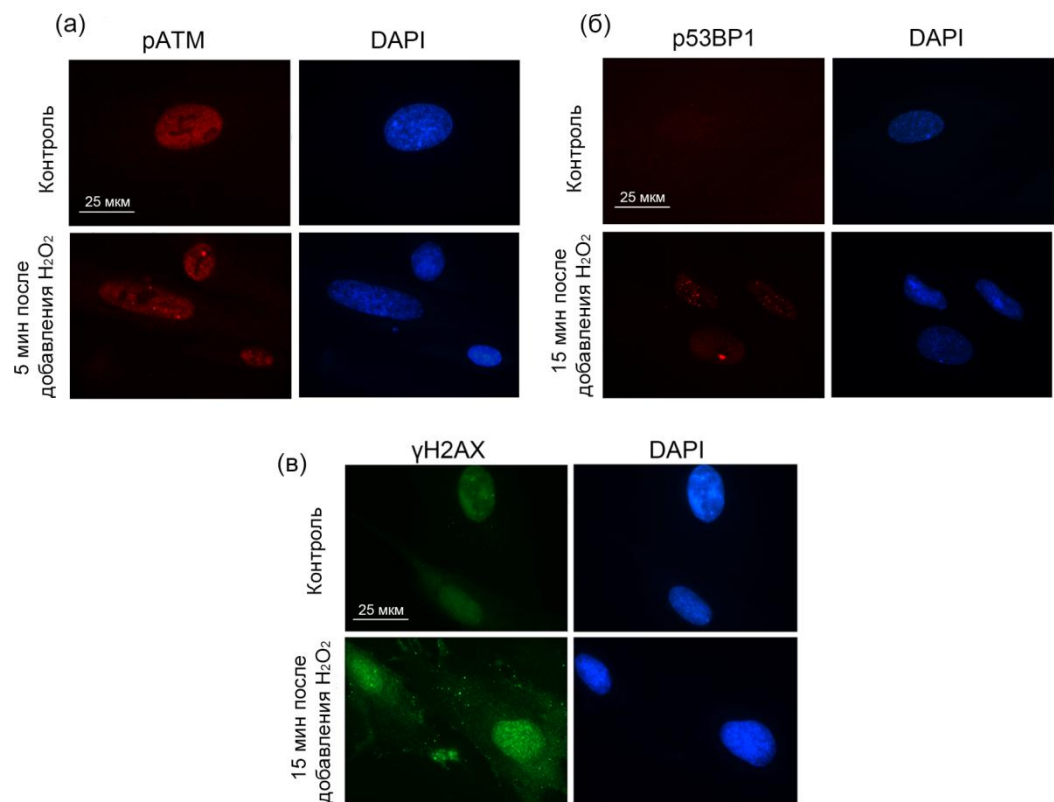


Рис. 35. Иммунофлуоресцентный анализ с использованием специфических антител против (а) рАТМ, (б) р53BP1 и (в) γ H2A.X (об. 40 $\times$).

Интересно, что к окончанию часовой H_2O_2 -обработки мы наблюдали ко-локализацию рАТМ как с γ H2AX, так и с р53BP1 (**рис. 36 а, б**).

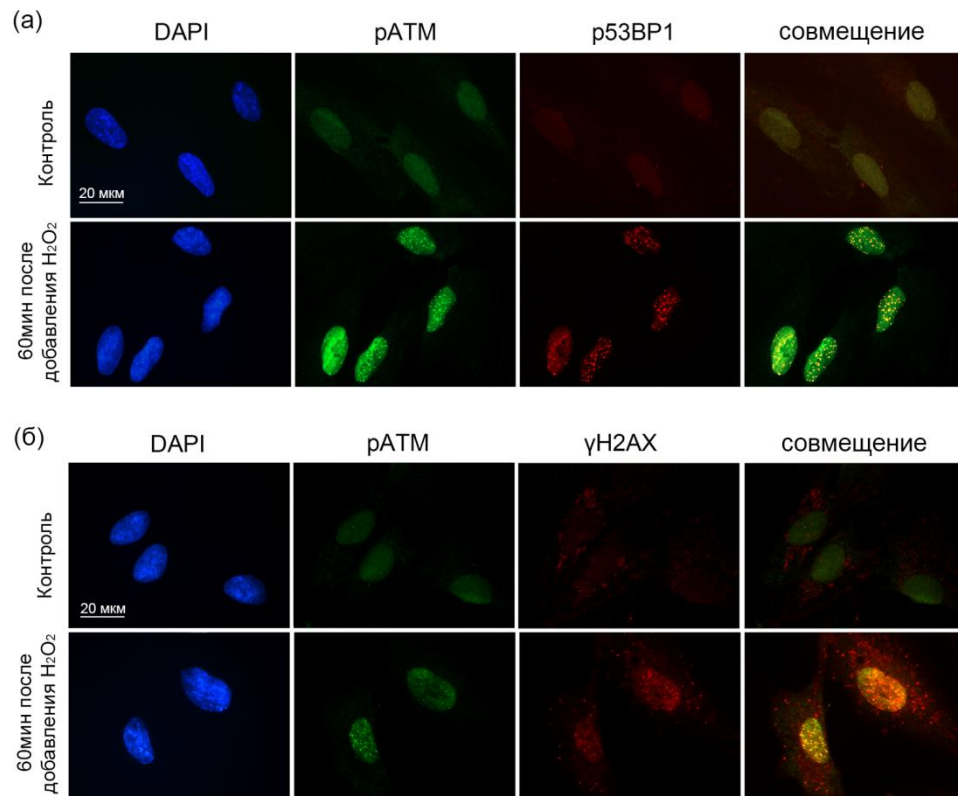


Рис. 36. Ко-локализация (а) pATM с p53BP1, (б) pATM с γH2AX через 60 мин после добавления H₂O₂, выявленная с помощью иммунофлуоресцентного анализа (об. 40×).

Быстрая H₂O₂-индуцированная активация ATM была подтверждена результатами иммуноблотинга, согласно которым фосфорилирование ATM по *Ser1981* начинается через 5 мин и достигает максимума через 30 мин после добавления окислителя (рис. 37, а).

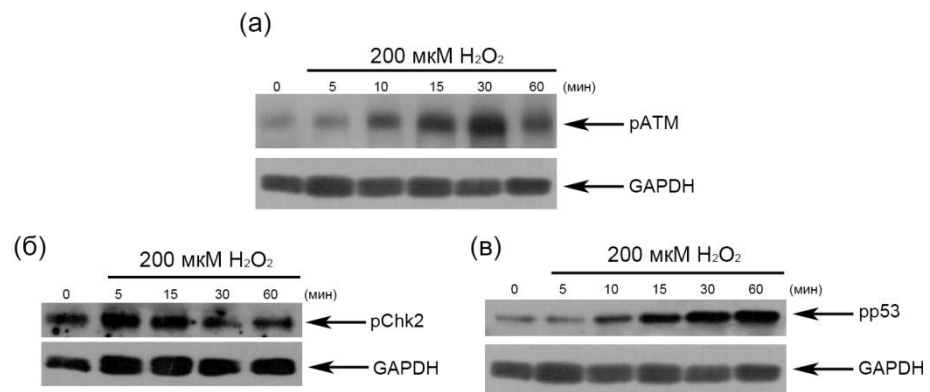


Рис. 37. Кинетика активации (а) ATM, (б) Chk2, (в) p53 во время H₂O₂-обработки эМСК.

В качестве контроля равномерности нанесения белка использовали GAPDH.

Основными нижележащими мишенями киназы ATM, как известно, являются киназа контрольной точки клеточного цикла Chk2 (checkpoint kinase 2) и опухолевый супрессор белок p53, активация которых приводит к блоку клеточного цикла, в частности, за счет инициации

транскрипции p21. В свою очередь, Chk2 может непосредственно активировать p53. В связи с этим, далее мы исследовали функциональный статус белков Chk2 и p53. Методом иммуноблотинга было показано, что H_2O_2 -зависимое фосфорилирование Chk2 по *Thr68* наблюдается в интервале 5 – 15 мин с понижением до контрольного уровня к концу обработки клеток (**рис. 37, б**). Было установлено, что фосфорилирование p53 по *Ser15* происходит через 10 мин после начала обработки клеток H_2O_2 , причем уровень фосфорилирования постепенно увеличивается во времени и достигает максимума через 60 мин (**рис. 37, в**). Далее представлялось интересным проследить ядерно-цитоплазматическое перераспределение pp53 в H_2O_2 -обработанных ЭМСК методом иммунофлуоресценции. При использовании специфических антител против pp53 и pATM была показана транслокация pp53 из цитоплазмы в ядро в течение 45 мин действия H_2O_2 (**рис. 38, а**) и последующая ко-локализация pp53 с pATM (**рис. 38, б**).

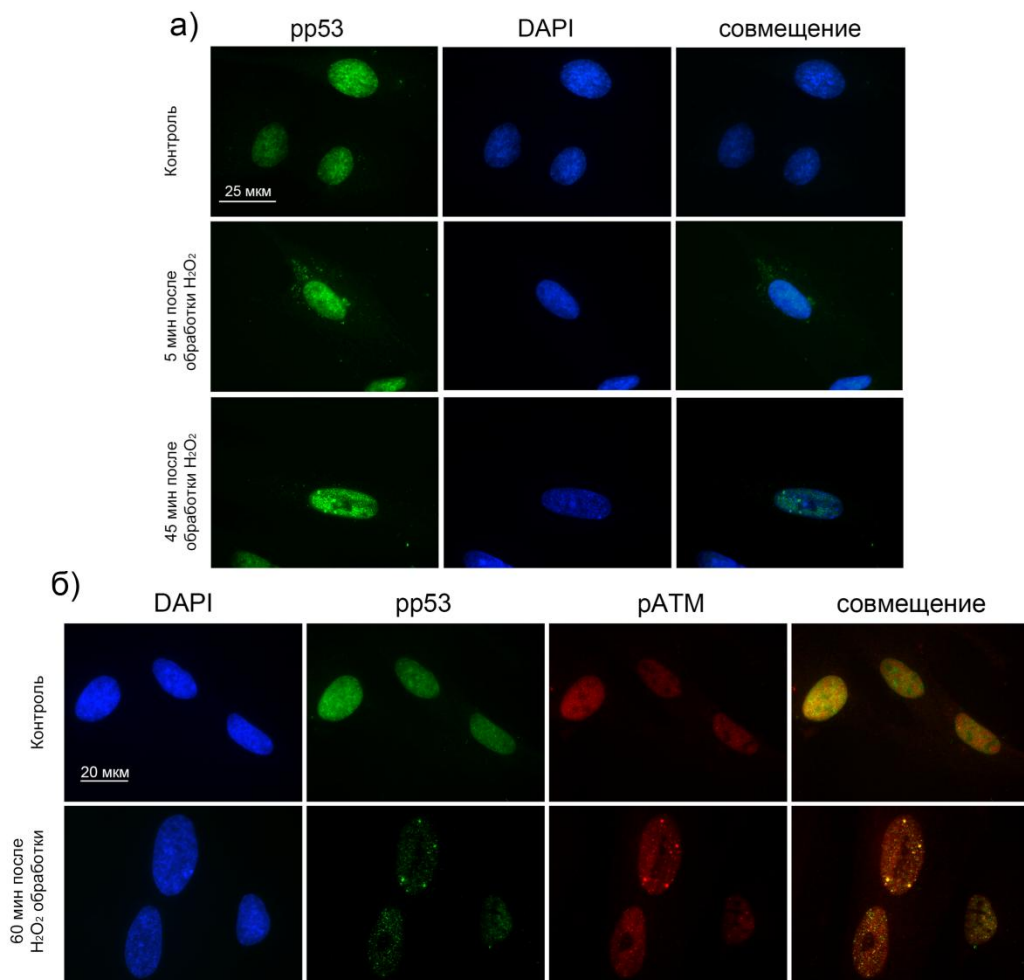


Рис. 38. (а) Ядерная транслокация фосфорилированного белка p53 выявленная методом иммунофлуоресценции. (б) Ко-локализация pATM с pp53 через 60 мин после добавления H_2O_2 , выявленная с помощью иммунофлуоресцентного анализа (об. 40 $\times$). Указано время инкубации с H_2O_2 (5, 45 или 60 мин).

Полученные результаты демонстрируют, что быстрое проникновение экзогенной H_2O_2 в эМСК приводит к столь же быстрому повреждению ДНК и активации DDR с последующей инициацией Chk2/p53/p21/Rb пути, который индуцирует арест клеточного цикла.

3.5.3. Активация MAP-киназных путей в эМСК в условиях окислительного стресса

Активация членов семейства MAP-киназ, включая ERK, JNK и p38, играет важную роль в ответе различных клеток на окислительный стресс (Guyton et al., 1996). Для проверки возможности активации этих киназ, эМСК были обработаны в стандартных условиях (200 мкМ H_2O_2 , 1 ч), и затем уровень фосфорилирования MAP-киназ был проанализирован методом иммуноблоттинга с использованием специфических антител против pERK1/2 (Thr202/Tyr204), pJNK (Thr183/Tyr185) и pp38 (Thr180/Tyr182). В ответ на окислительный стресс мы наблюдали постепенное увеличение уровня фосфорилирования ERK1/2 в интервале 5 – 30 мин с отчетливым максимумом через 15 мин после начала обработки; причем через 60 мин уровень pERK1/2 резко снижался (рис. 39, а). Стоит отметить, что помимо быстрой активации ERK в течение часовой обработки H_2O_2 , мы обнаружили еще одну волну активации ERK на более поздних сроках (через 4 – 7 ч после окончания действия H_2O_2), постепенно затухающую в течение последующих трех недель (рис. 39, б). В отличие от ERK, активация JNK характеризовалась другой динамикой: максимальный уровень фосфорилирования достигался через 30 мин и оставался на заметном уровне к концу обработки (через 60 мин) (рис. 39, в).

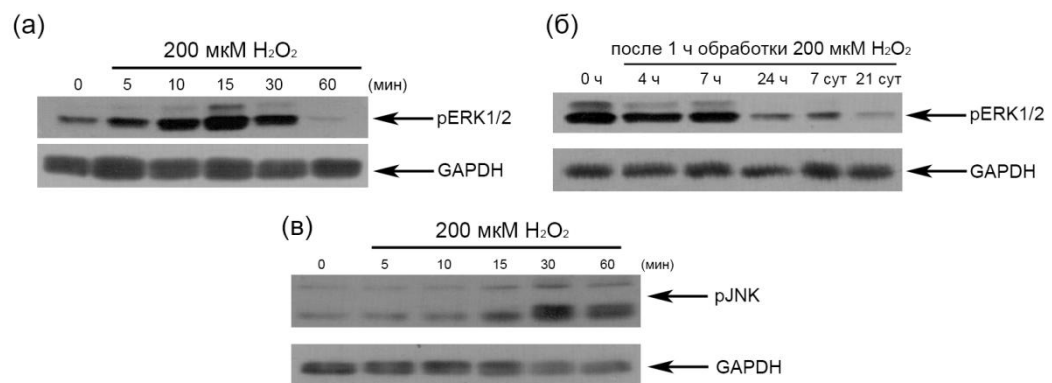


Рис. 39. Динамика H_2O_2 -индуцированной активации MAP-киназ ERK1/2 и JNK в эМСК. Краткосрочная активация ERK1/2 (а) и JNK (в) в 1 ч период H_2O_2 -обработки клеток; долгосрочная активация ERK1/2 (б), выявленная после действия H_2O_2 . В качестве контроля равномерности нанесения белка использовали GAPDH.

При изучении динамики H_2O_2 -индуцированной активации p38 оказалось, что значительное увеличение фосфорилирования p38 происходит уже через 5 мин после добавления H_2O_2 , и далее повышенный уровень сохраняется в течение 1 ч, тогда как в контрольных клетках фосфорилированная форма p38 не выявлялась (рис. 40, б). Основным активатором стрессовых киназ p38 и JNK в клетках является апоптоз-стимулирующая киназа 1 (ASK1), связанная N-концевой частью с восстановленной формой тиоредоксина. При действии H_2O_2 тиоредоксин

окисляется и диссоциирует из комплекса, что приводит к активации (фосфорилированию) ASK1. Методом иммуноблоттинга с применением специфических антител против pASK1 (Thr845) была выявлена быстрая активация ASK1 (через 5 мин) с последующим снижением уровня фосфорилирования через 30 мин после начала обработки (рис. 40, а). Полученные результаты указывают на то, что практически одновременная H₂O₂-индуцированная активация p38 и JNK совпадает по времени с активацией вышестоящей ASK1 на начальных этапах ответа эМСК на окислительное воздействие.

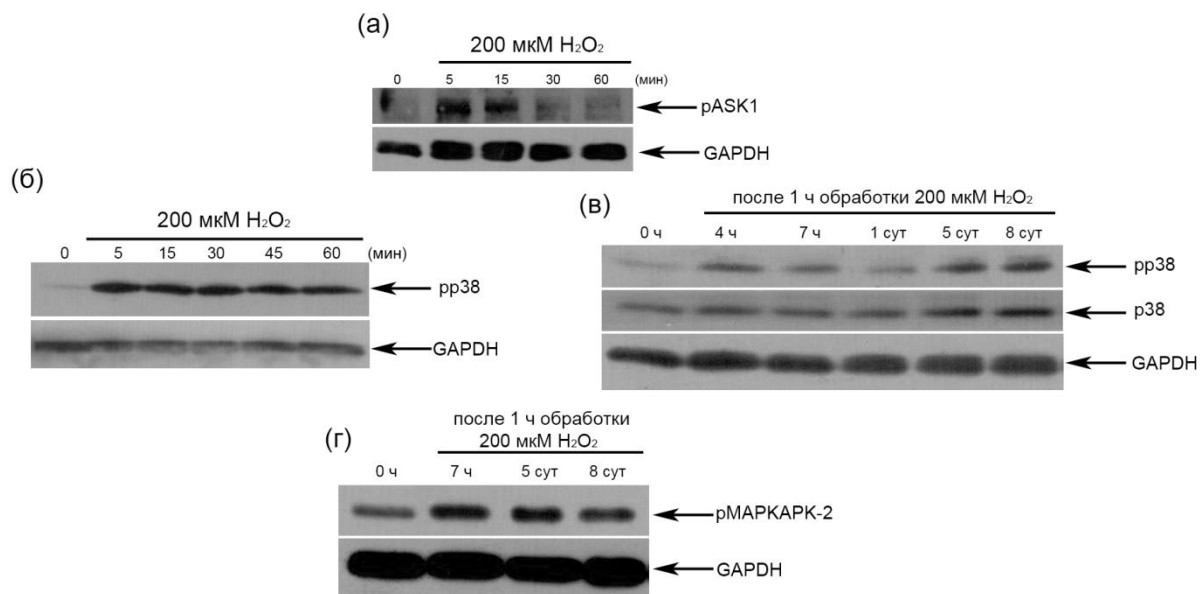


Рис. 40. Активация MAP-киназного каскада с участием p38 в H₂O₂-стимулированных эМСК.

Динамика H₂O₂-индуцированной активации ASK1 (а), p38 (б и в), MAPKAPK-2 (г). В качестве контроля равномерности нанесения белка использовали GAPDH.

Интересно, что активация p38 сохранялась как минимум в течение 8 сут после действия H₂O₂ на эМСК (рис. 40, в). Одновременно с этим мы наблюдали увеличение уровня фосфорилирования непосредственной мишени p38 – MAPKAPK-2 (МК-2) (рис. 40, г). Эти результаты свидетельствуют о возможной роли активации p38/МК-2 пути в процессе преждевременного старения эМСК, индуцированного окислительным стрессом.

3.5.4. Развитие H₂O₂-индуцированного старения эМСК опосредовано повышением уровня эндогенных АФК вследствие роста митохондриальной активности

Известно, что развитие преждевременного старения, независимо от типа стрессового воздействия, непосредственно связано с повышенной генерацией эндогенных активных форм кислорода (АФК). На следующем этапе работы мы исследовали динамику накопления внутриклеточных АФК в H₂O₂-стимулированных клетках в процессе развития старения, используя краситель H₂DCF-DA. В разделе 3.5.1 показано, что экзогенно-добавленная H₂O₂ полностью утилизировалась за время обработки клеток, причем через 60 мин уровень АФК был

ниже контрольного. Далее генерация внутриклеточных АФК постепенно усиливалась, но через 5-6 ч после обработки H_2O_2 мы снова наблюдали кратковременное падение уровня АФК с последующим неуклонным повышением уровня вплоть до 24 ч (рис. 41).

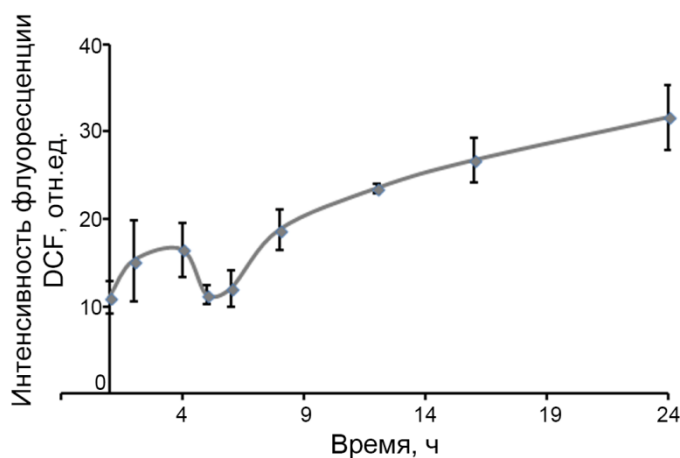


Рис. 41. Динамика уровня внутриклеточных АФК в H_2O_2 -обработанных эМСК.

Оценка изменения уровня АФК в клетках была проведена в течение 24 ч после действия H_2O_2 с помощью метода проточной цитометрии с использованием зонда $H_2DCF-DA$. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ SD (N=3).

Наблюдаемое падение уровня АФК было обусловлено, по всей вероятности, активацией экспрессии генов ферментов антиоксидантной защиты, в частности, супероксиддисмутазы-1,2 (*SOD1,2*) и глутатионпероксидазы-1 (*GPX1*). Согласно результатам ПЦР анализа, уровень экспрессии мРНК генов *SOD1* и *SOD2* через 60 мин после начала H_2O_2 -обработки клеток значительно превышал контрольный уровень (рис. 42), что согласуется с данными, представленными на рис. 34.

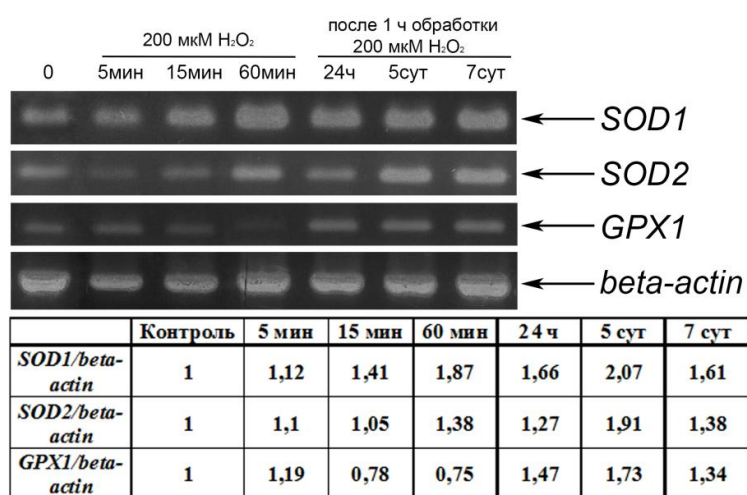


Рис. 42. Экспрессия мРНК генов *SOD1,2* и *GPX1* в контрольных и H_2O_2 -обработанных эМСК.

H_2O_2 присутствовала в инкубационной среде 5, 15 или 60 мин, после чего была удалена; далее клетки культивировались в течение 24 ч, 5 или 7 сут в свежей ростовой среде. В качестве контроля равномерности нанесения проб при проведении ПЦР анализа использовали *beta-actin*.

Несмотря на то, что повышенная экспрессия мРНК генов *SOD1,2* и *GPX1* была выявлена на более поздних сроках (1, 5 и 7 сут) (рис. 42), уровень внутриклеточных АФК в этих временных точках продолжал постепенно увеличиваться, превышая контрольный уровень более, чем в 2 раза, уже через 5 сут (рис. 43 а, б). Таким образом, полученные результаты показывают, что однократное добавление 200 мкМ H_2O_2 инициировало продукцию внутриклеточных АФК, которая постоянно возрастала в процессе старения эМСК, несмотря на активацию экспрессии генов ферментов антиоксидантной защиты клеток.

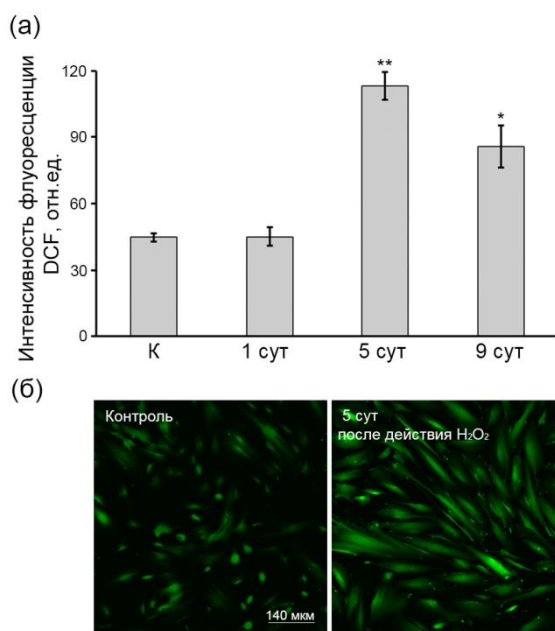


Рис. 43. Динамика уровня внутриклеточных АФК в контрольных и H_2O_2 -обработанных эМСК.

Оценка изменения уровня АФК в клетках была проведена в течение 1, 5 или 9 сут после действия H_2O_2 с помощью метода проточной цитометрии (а) и конфокальной микроскопии (б) с использованием зонда H_2DCF -DA. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ SD (N=3), ** – $p < 0,005$, * – $p < 0,05$.

Принимая во внимание то, что основным источником АФК внутри клетки являются митохондрии, представлялось важным исследовать возможную модуляцию митохондриальной активности в эМСК после действия H_2O_2 . В первую очередь, мы оценили продукцию митохондриальных пероксидов с помощью методов проточной цитофлуориметрии и конфокальной микроскопии с использованием красителя дигидрорадамина 123 (DHR123), который способен проникать через клеточные мембраны благодаря своим липофильным свойствам с последующим накоплением в митохондриях в виде нефлуоресцирующего соединения. При окислении в митохондриях DHR123 превращается в флуоресцирующий родамин 123 (Rho123), который служит индикатором уровня АФК в этих органеллах. В H_2O_2 -обработанных эМСК мы выявили заметное увеличение уровня митохондриальных пероксидов,

причем уже через 24 ч он почти в 2 раза превышал уровень в контрольных клетках и далее продолжал непрерывно расти в течение всего периода наблюдения (рис. 44, а, б).

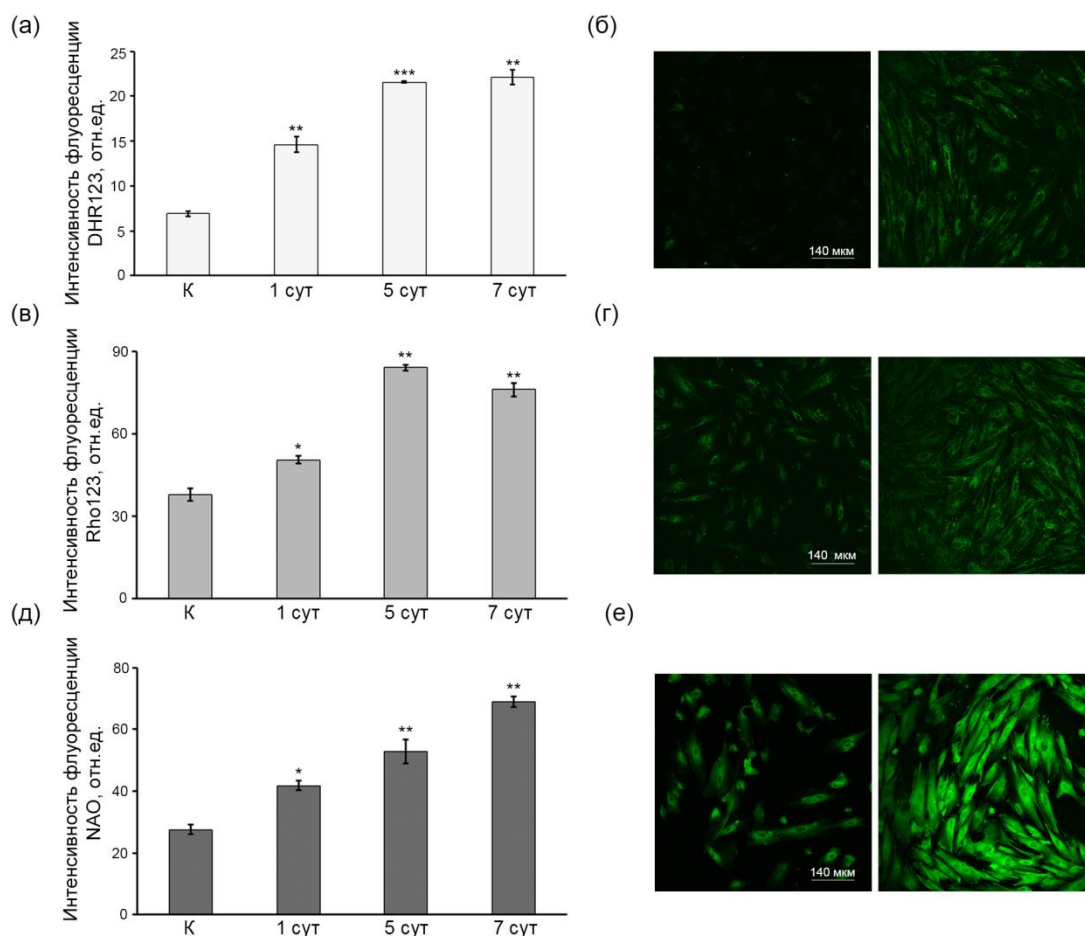


Рис. 44. Митохондриальные характеристики эМСК после действия 200 мкМ H_2O_2 .

Оценка уровня митохондриальных пероксидов (а, б), митохондриального мембранного потенциала (в, г), массы митохондрий (д, е) с помощью красителей DHR123, Rho123, NAO, соответственно. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ SD (N=3), *** – $p < 0,001$, ** – $p < 0,005$, * – $p < 0,05$.

Отметим, что рост продукции митохондриальных пероксидов происходил практически одновременно с генерацией внутриклеточных АФК, причём несколько интенсивнее последних, о чем свидетельствуют результаты измерения обоих показателей через 1 сут после действия H_2O_2 (рис. 43, а и рис. 44, а).

Другим важным показателем митохондриальной активности является митохондриальный мембранный потенциал (ММП), который отражает уровень метаболической активности клеток. Регистрацию ММП мы проводили с помощью проточной цитофлуориметрии и конфокальной микроскопии с использованием Rho123 – липофильного катионного флуоресцентного красителя, проникновение которого через мембрану митохондрий коррелирует с величиной мембранного потенциала. Оказалось, что обработка H_2O_2 индуцировала рост ММП уже через 24 ч после окислительного воздействия с дальнейшим

увеличением вплоть до 7 сут, при этом через 5 сут значение этого показателя превышало контрольное более, чем в 2 раза (**рис. 44, в, г**). Одной из основных причин возрастания ММП, как известно, является увеличение массы митохондрий, которую мы определяли при помощи флуоресцентного красителя нонил-акридинового оранжевого (NAO). Связываясь с кардиолипином на мембране митохондрий, NAO позволяет оценить митохондриальную массу независимо от ММП. Интересно, что митохондриальная масса в эМСК, обработанных H_2O_2 , увеличивалась уже через 1 сут после действия окислителя и далее продолжала расти в течение 7 сут (**рис. 44, д, е**). Как показано выше, динамика увеличения ММП в H_2O_2 -стимулированных эМСК была аналогична. Для подтверждения взаимосвязи между ММП и митохондриальной массой мы применили корреляционный анализ.

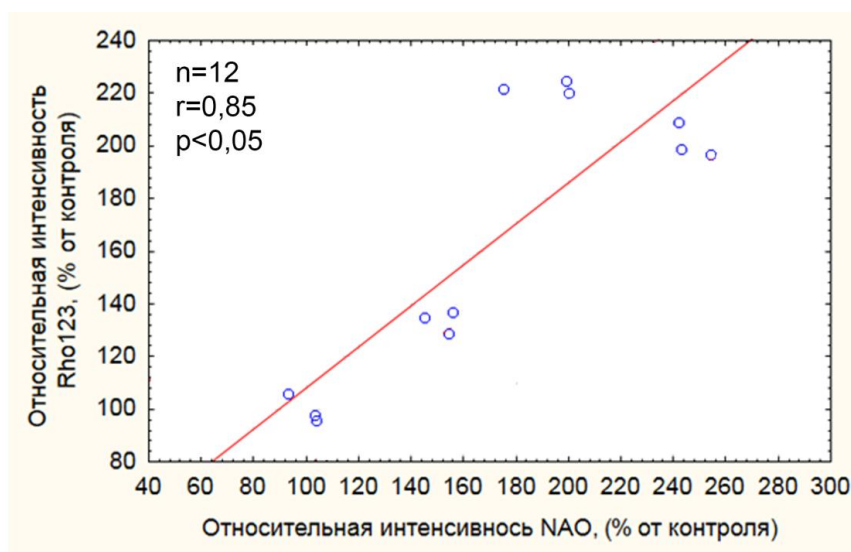


Рис. 45. Корреляция между увеличением мембранного потенциала и массы митохондрий в H_2O_2 -обработанных эМСК.

После обработки клеток с 200 мкМ H_2O_2 в течение 1 ч, масса митохондрий и мембранный потенциал были измерены при помощи цитофлуориметрии после окрашивания клеток с NAO и Rho123, соответственно. Относительная интенсивность выражена графически как процент от интенсивности флуоресценции необработанных (контрольных) клеток. Корреляционный анализ произведен с помощью программы STATISTICA. Увеличение мембранного митохондриального потенциала и массы митохондрий достоверно коррелировали в течение 7 сут эксперимента ($r = 0,85$; $p < 0,05$); n – число измерений.

Использование данного подхода позволило показать, что увеличение ММП действительно коррелирует с изменением митохондриальной массы в течение всего периода наблюдения после обработки клеток 200 мкМ H_2O_2 ($r=0,85$; $p<0,05$) (**рис. 45**). Считается, если значение коэффициента корреляции (r) находится в диапазоне 0,7 – 0,9, это свидетельствует о хорошей степени корреляции двух величин. Более того, величина ММП на единицу митохондриальной массы, выраженная как отношение интенсивности флуоресценции Rho123 к NAO, сохранялась приблизительно одинаковой в течение как минимум 7 сут (данные не представлены). Таким

образом, полученные данные демонстрируют, что H_2O_2 -индуцированный рост ММП в старых эМСК обусловлен увеличением митохондриальной массы.

Для оценки функционального состояния митохондрий в H_2O_2 -обработанных клетках мы проанализировали способность этих клеток восстанавливать МТТ, что отражает работу митохондриальных ферментов. Ранее нами было показано, что в течение длительного времени после действия 200 мкМ H_2O_2 число клеток в культуре практически не изменялось вследствие блока клеточного цикла и остановки пролиферации (рис. 26). В то же время, методом МТТ мы выявили рост оптической плотности клеток в течение 3-х сут после обработки H_2O_2 . Рассчитав коэффициент восстановления МТТ, как отношение между значением оптической плотности при 570 нм и соответствующим числом живых клеток, мы выявили существенное увеличение этого коэффициента в H_2O_2 -обработанных клетках по сравнению с контролем (рис. 46). Следовательно, митохондрии в H_2O_2 -обработанных клетках сохраняли функциональную активность.

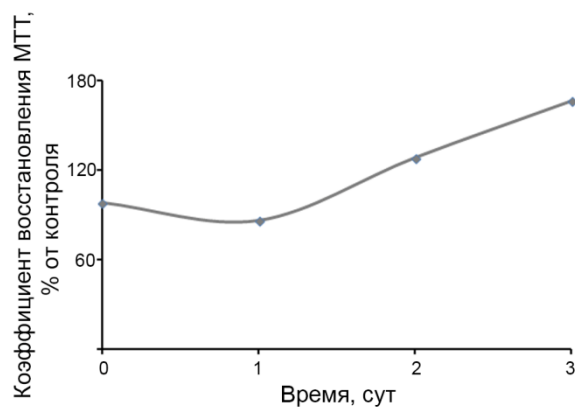


Рис. 46. Сохранение функциональной активности митохондрий в H_2O_2 -обработанных эМСК.

После стандартной обработки клеток с 200 мкМ H_2O_2 , их способность восстанавливать МТТ была проанализирована в указанных временных точках. Коэффициент восстановления МТТ был вычислен как отношение между значением оптической плотности при 570 нм и числом живых клеток, определённым методом проточной цитометрии.

Обобщая представленные в этом разделе данные, можно заключить, что процесс развития H_2O_2 -индуцированного старения эМСК тесно связан с повышением уровня эндогенных АФК, который может быть обусловлен увеличением массы функционально активных митохондрий. Вероятнее всего, это явление связано с сохранением биогенеза митохондрий в стареющих клетках и, следовательно, увеличением их числа.

3.5.5. Повышение уровня эндогенных АФК приводит к продолжительной активации DDR в процессе развития H_2O_2 -индуцированного старения эМСК

Логично было предположить, что повышенный уровень внутриклеточных АФК, сопровождающий развитие старения в H_2O_2 -обработанных эМСК, может приводить к

постоянному повреждению ДНК. Для проверки этого предположения мы исследовали функциональный статус основных участников DDR – ATM, H2AX и 53BP1. При помощи иммунофлуоресцентного анализа мы обнаружили, что даже через 5 сут после действия H_2O_2 все исследуемые белки находились в активированном (фосфорилированном) состоянии. Более того, рАТМ киназа была ко-локализована как с р53BP1 (рис. 47, а), так и с γ H2AX (рис. 47, б) в так называемых «ассоциированных со старением сайтах повреждения ДНК».

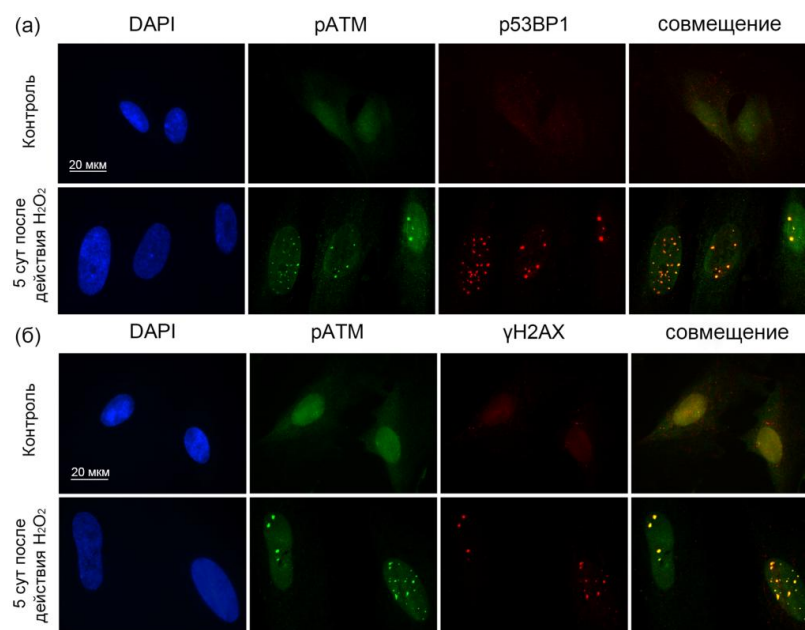


Рис. 47. Иммунофлуоресцентный анализ внутриклеточной локализации рАТМ, р53BP1 (а) и γ H2AX (б) в эМСК через 5 сут после действия H_2O_2 (об. 40 $\times$).

Результаты иммуноблотинга с использованием специфических антител против рАТМ (Ser1981) демонстрируют, что киназа АТМ оставалась в фосфорилированном состоянии не только через 5 сут после индукции старения, но и далее, в течение всего периода наблюдения за старыми клетками (вплоть до 9 сут) (рис. 48).

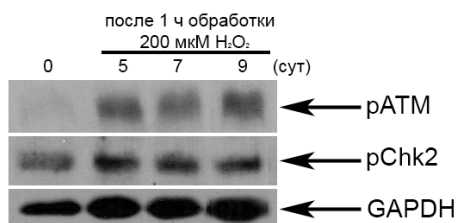


Рис. 48. Характеристика уровней фосфорилирования АТМ и Chk2 в стареющих эМСК. После индукции старения (обработка клеток с 200 мкМ H_2O_2 в течение 1 ч) оценка статуса фосфорилирования АТМ и Chk2 в указанных временных точках была проведена методом иммуноблотинга. В качестве контроля равномерности нанесения белка использовали GAPDH.

Как упоминалось в разделе 3.5.2., результатом активации киназы АТМ может быть инициация фосфорилирования ее мишеней, в частности, р53 и Chk2. Эти эффекторные белки, в свою очередь, индуцируют транскрипцию ингибитора циклин-зависимых киназ р21,

необходимого для поддержания блока клеточного цикла в процессе развития старения. В связи с этим, далее мы проанализировали функциональное состояние этих белков в H_2O_2 -стимулированных эМСК в отставленные сроки после запуска старения. Методом иммунофлуоресценции было показано, что p53 через 5 сут после индукции старения по-прежнему оставался в фосфорилированном состоянии, как и во время обработки клеток с H_2O_2 (рис. 38, б), и был ко-локализован с pATM в ядре (рис. 49).

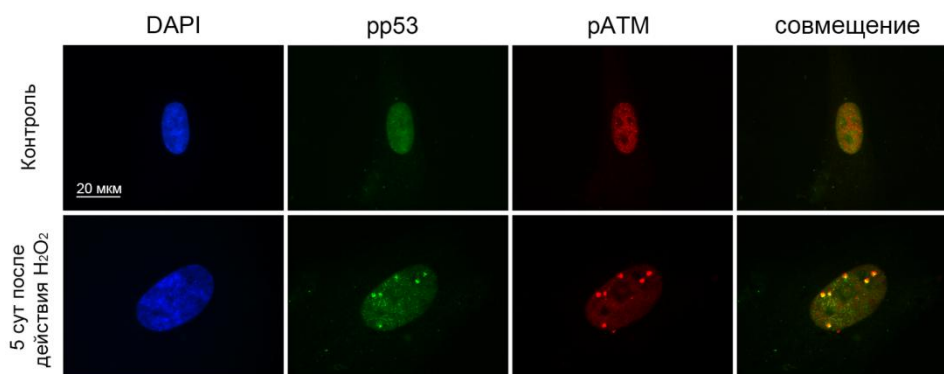


Рис. 49. Иммунофлуоресцентный анализ локализации фосфорилированных белков p53 и ATM в старых эМСК, (об. 40×).

Методом иммуноблоттинга мы оценили динамику активации p53 в процессе развития старения. Так, максимум фосфорилирования p53 в H_2O_2 -стимулированных клетках наблюдался через 7 ч после окончания обработки; далее при наблюдении в течение 8 сут он значительно снижался, но не до контрольного уровня (рис. 50).

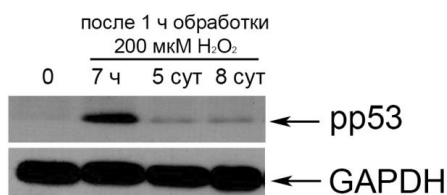


Рис. 50. Динамика активации p53 в процессе развития H_2O_2 -индуцированного старения эМСК.

Характеристика фосфорилирования p53 через 7 ч, 5 и 8 сут после индукции старения с помощью иммуноблоттинга. GAPDH использовали в качестве контроля равномерности нанесения белка.

Интересно, что обнаруженное снижение уровня фосфорилирования белка p53 не оказывало выраженного эффекта на уровень экспрессии белка p21, который оставался повышенным по сравнению с контролем в течение всего периода наблюдения (рис. 30, б, в). Эти данные позволяют предположить существование дополнительного активатора экспрессии p21 при старении эМСК. Хорошо известно, что Chk2 участвует в инициации транскрипции p21 путем активации p53. Однако недавно было показано, что Chk2 может активировать экспрессию p21 и

при отсутствии функционально активного белка p53 (Aliouat-Denis et al., 2005). Методом иммуноблотинга с применением специфических антител против pChk2 мы обнаружили небольшое, но стабильное увеличение уровня фосфорилирования Chk2 в течение 9 сут после индукции старения (**рис. 48**), что свидетельствует о вовлеченности Chk2 в развитие старения эМСК в условиях окислительного стресса. Обобщая полученные результаты, можно констатировать, что все участники DDR (ATM, H2AX, 53BP1, p53, Chk2) в процессе H₂O₂-индуцированного старения эМСК находятся в постоянно активном состоянии, причиной чего может быть перманентная генерация внутриклеточных АФК на высоком уровне. Следует заметить, что независимо от пути активации, экспрессия белка p21 приводила к гипофосфорилированию Rb (**рис. 32**) и, как следствие, к блоку цикла.

Таким образом, в основе инициации и установления H₂O₂-индуцированного старения эМСК лежит повышение уровня внутриклеточных АФК, что приводит к повреждению ДНК с последующей активацией DDR, а также сигнальных путей pATM/pp53/p21/pRb и pATM/pChk2/p21/pRb, которые в итоге ведут к блокированию клеточного цикла. При этом постоянно повышенный уровень АФК за счёт функциональных митохондрий и других АФК-генерирующих систем клетки обуславливает поддержание DDR в перманентно активном состоянии в процессе развития старения.

3.6. Пути предотвращения преждевременного старения эМСК в условиях окислительного стресса

Изучение механизма, лежащего в основе индуцированного клеточного старения, представляет особый интерес в рамках поиска успешной стратегии предотвращения его развития. Ряд достаточно успешных зарубежных исследований по обратимости клеточного старения даёт основание предполагать существование в стареющих клетках некой «точки возврата», из которой арестованные клетки ещё способны восстановить пролиферативный потенциал (в отсутствии индуктора старения) и вернуться, если не в исходное, то в обратимое состояние покоя (Probin et al., 2007; Demidenko et al., 2009; Yagi et al., 2013). В связи с этим, наши дальнейшие исследования были посвящены попытке найти возможные эффективные подходы для предотвращения H₂O₂-индуцированного старения эМСК.

3.6.1. Использование различных антиоксидантов для предотвращения индуцированного преждевременного старения эМСК

В предыдущих разделах мы продемонстрировали, что экзогенные и эндогенно-генерируемые АФК, повреждая ДНК, запускают механизм клеточного старения, поэтому логично было предположить, что антиоксиданты, нейтрализующие АФК и уменьшающие уровень окислительного стресса, должны выполнять защитную функцию. Были использованы

фармакологические ингибиторы продукции АФК с разной химической структурой и механизмом действия – diphenylene iodonium (DPI) и N-acetyl-cysteine (NAC). Выбор именно этих агентов был обусловлен их доступностью, широким использованием для супрессии АФК и изученностью эффектов.

3.6.1. а) Эффекты DPI на эМСК

Изначально DPI считался специфическим ингибитором NADPH оксидазы, основного источника АФК в клетках, однако, при детальном изучении оказалось, что он способен также ингибировать NO-синтазу, ксантиноксидазу, митохондриальный комплекс I и цитохром P-450 редуктазу. Для решения нашей задачи мы пренебрегли невысокой специфичностью DPI, так как для предотвращения старения желательнее максимально нейтрализовать внутриклеточные АФК из любых источников. Используя метод МТТ, определили концентрацию DPI равную 0,25 мкМ, которая не оказывала негативного действия на выживаемость клеток (**рис. 51**).

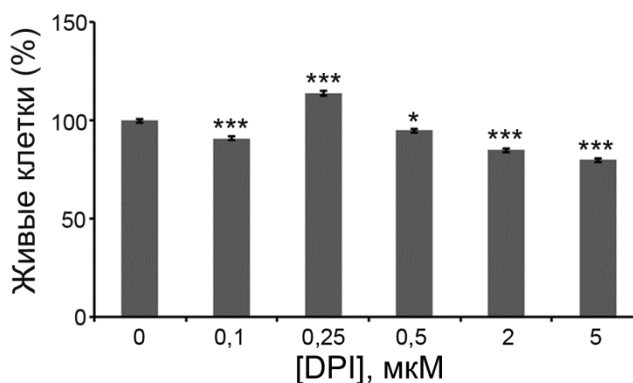


Рис. 51. Определение жизнеспособности эМСК в зависимости от концентрации DPI.

Долю живых клеток после обработки клеток DPI в различных концентрациях в течение 1 ч оценивали через 24 ч методом МТТ. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ SD (N=4), * – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ по сравнению с контролем.

Учитывая, что данное соединение является антиоксидантом, было интересно, в первую очередь, оценить его действие на продукцию АФК в старых клетках, которые культивировались в течение 6 сут после H_2O_2 -обработки. Оказалось, что при постоянном присутствии DPI в инкубационной среде уровень внутриклеточных АФК снижался приблизительно в 1,3 раза через 6 сут после индукции старения (**рис. 52**).

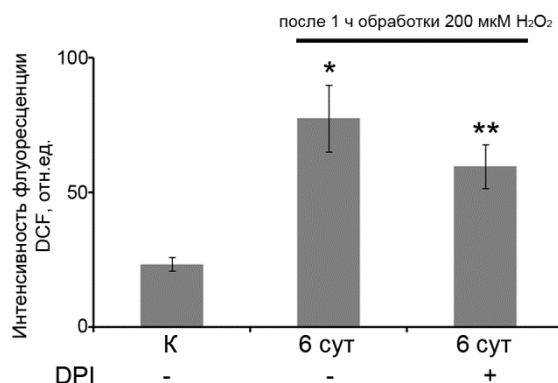


Рис. 52. Влияние DPI на уровень внутриклеточных АФК в H_2O_2 -обработанных эМСК.

Клетки подвергали действию либо 200 мкМ H_2O_2 , либо совместному действию 200 мкМ H_2O_2 и 0,25 мкМ DPI в течение 1 ч с последующим удалением H_2O_2 переводом клеток в свежую ростовую среду. Во втором случае (при совместной обработке H_2O_2 и DPI) ингибитор присутствовал в среде на протяжении всего эксперимента. Клетки инкубировали в течение 6 сут и затем определяли интенсивность флуоресценции DCF методом проточной цитофлуориметрии. К – контрольные (необработанные) клетки. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ SD (N=3), * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$.

Для выяснения возможного влияния этого ингибитора на предотвращение H_2O_2 -индуцированного старения эМСК, мы проанализировали изменение основных маркеров старения – уровня активности SA- β -Gal, размера клеток и пролиферативного потенциала. В присутствии DPI наблюдалось снижение активности SA- β -Gal (**рис. 53, а**) и небольшое (приблизительно в 1,2 раза) уменьшение размера эМСК (**рис. 53, б**). Следует отметить также, что после культивирования в течение 6 сут морфологические изменения клеток в присутствии DPI были не столь сильными по сравнению с H_2O_2 -обработанными клетками. Однако, несмотря на имеющее место частичное DPI-зависимое предотвращение фенотипа старения H_2O_2 -обработанных клеток, ингибитор не оказывал абсолютно никакого влияния на остановку пролиферации, вызванную действием H_2O_2 (**рис. 53, в**).

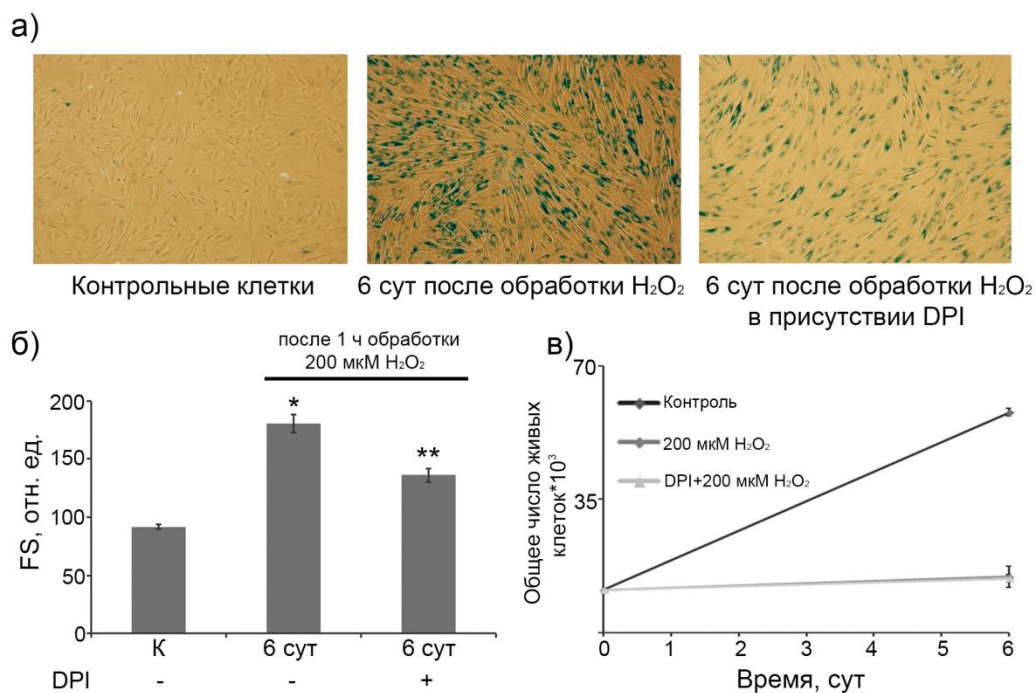


Рис. 53. Эффекты DPI на активность SA- β -Gal (а), размер (б) и пролиферацию (в) H_2O_2 -стимулированных ЭМСК.

Клетки обрабатывали, как указано в подписи к **рис. 52**. Все параметры определяли через 6 сут после индукции старения. С помощью метода проточной цитометрии была проведена оценка размера клеток и построена кривая роста; на графике (в) линии, соответствующие «200 мкМ H_2O_2 » и «DPI+200 мкМ H_2O_2 », полностью совпадают. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ SD (N=3), * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ по сравнению с контролем.

С целью выяснить причину отсутствия эффекта DPI на пролиферацию H_2O_2 -обработанных клеток, мы проверили действие этого антиоксиданта на рост контрольных (не обработанных H_2O_2) ЭМСК. Оказалось, что при постоянном присутствии в инкубационной среде в течение 6 сут DPI вызывал блок контрольных клеток в фазе G1 и, соответственно, приводил к заметному торможению пролиферации (**рис. 54**).

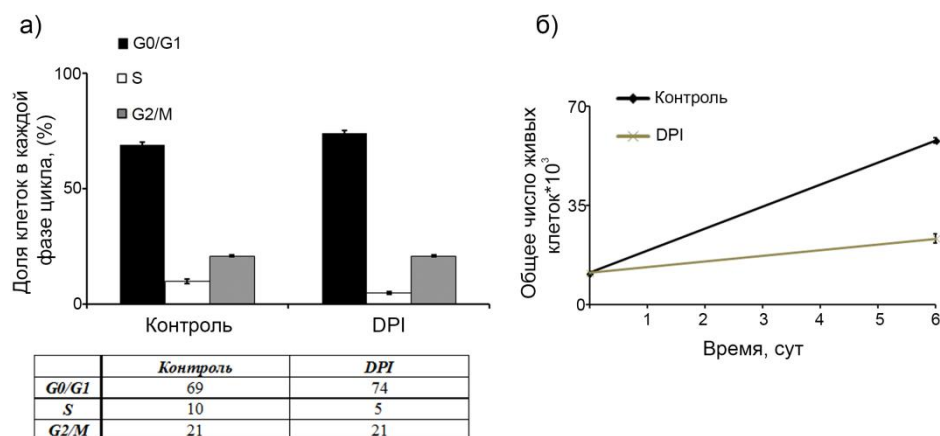


Рис. 54. DPI-зависимый блок клеточного цикла (а) и торможение пролиферации (б) контрольных эМСК.

Контрольные клетки инкубировали в присутствии 0,25 мкМ DPI в течение 6 сут, затем с помощью метода проточной цитометрии анализировали распределение по фазам клеточного цикла и изменения общего числа клеток.

В связи с обнаруженным отрицательным влиянием DPI на пролиферацию клеток дальнейшее его использование для предотвращения H₂O₂-индуцированного старения эМСК не представляло интереса.

3.6.1. б) Эффекты NAC на эМСК

Антиоксидант NAC, предшественник синтеза восстановленного глутатиона в клетках, широко применяется с целью модуляции окислительно-восстановительного потенциала и понижения внутриклеточного уровня АФК. В наших экспериментах NAC был использован в концентрации 10 мМ. В первую очередь, необходимо было разработать стратегию обработки клеток с помощью NAC таким образом, чтобы выполнялось основное условие: индукция старения предшествовала обработке антиоксидантом. В связи с этим мы протестировали два различных способа добавления антиоксиданта: (1) совместное действие H₂O₂ и NAC в течение 1 ч; (2) совместная обработка клеток с помощью H₂O₂ и NAC в течение 1 ч с последующим постоянным присутствием антиоксиданта в ростовой среде. При оценке влияния NAC на уровень АФК в клетках через 3 сут после индукции старения было обнаружено, что независимо от способа обработки происходит существенное подавление уровня эндогенных АФК по сравнению с H₂O₂-стимулированными эМСК. Наблюдаемый эффект при постоянном присутствии NAC, как и предполагалось, был несколько сильнее (в 1,7 раза), чем в случае удаления NAC из ростовой среды (в 1,4 раза) (рис. 55).

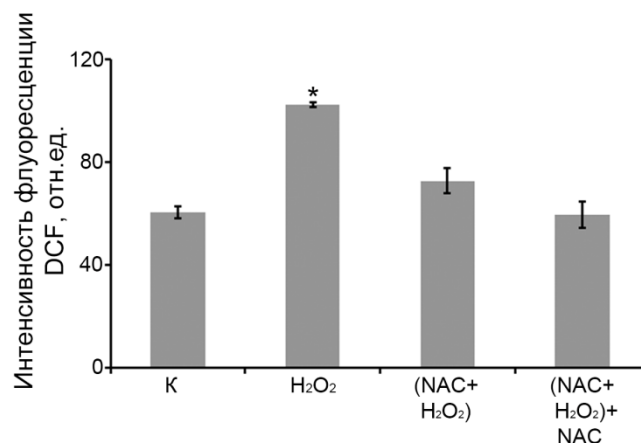


Рис. 55. NAC способен модулировать уровень внутриклеточных АФК в H₂O₂-стимулированных эМСК.

Клетки были обработаны в течение 1 ч либо 200 мкМ H₂O₂, либо совместно (200 мкМ H₂O₂+10 мМ NAC) с последующей заменой ростовой среды на свежую. В варианте «(NAC+H₂O₂)+NAC» антиоксидант постоянно присутствовал в среде в течение 3-х сут. Уровень АФК анализировали через 3 сут методом проточной цитометрии с использованием зонда H₂DCF-DA. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ SD (N=3), * – $p < 0,01$ по сравнению с контролем.

Несмотря на преимущество второго варианта обработки клеток в отношении более эффективной супрессии АФК, он имел существенные недостатки. Во-первых, антиоксидант NAC при постоянном присутствии в инкубационной среде вызывал значительные изменения в клеточной морфологии: клетки становились более вытянутыми и приобретали игольчатую форму, тогда как при его отмывке подобных изменений не наблюдалось (**рис. 56**).

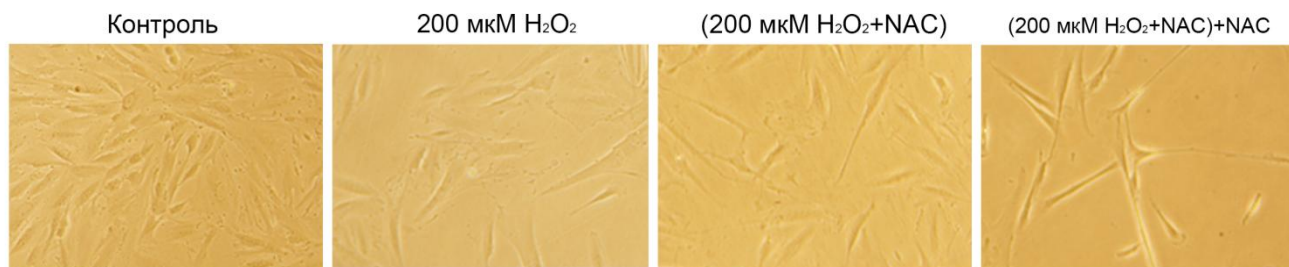


Рис. 56. Продолжительность обработки при помощи NAC влияет на морфологию H₂O₂-стимулированных эМСК.

Обработка клеток проведена, как указано в подписи к **рис. 55**. Фазовый контраст, об. 100 $\times$.

Во-вторых, использование первого способа приводило к заметному улучшению жизнеспособности клеток через сутки после действия H₂O₂, что было существенно для решения поставленной задачи, тогда как второй способ обработки не влиял на выживаемость клеток (**рис. 57, а**). В-третьих, применение первого способа обработки приводило в результате к более выраженному эффекту на восстановление пролиферации H₂O₂-стимулированных эМСК по сравнению со вторым вариантом, что было продемонстрировано методом проточной цитометрии (**рис. 57, б**).

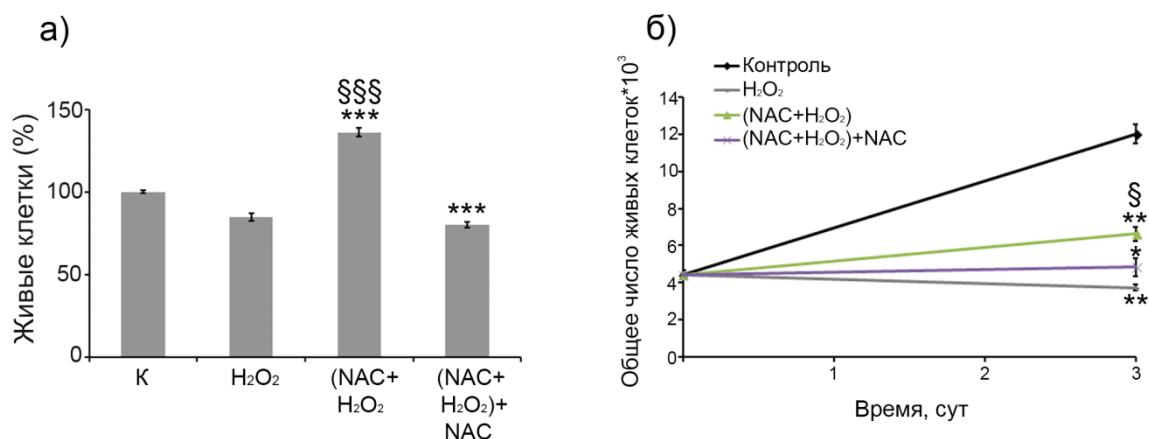


Рис. 57. Изменение жизнеспособности эМСК и характера кривых роста в зависимости от продолжительности действия антиоксиданта NAC.

Обработка клеток проведена, как указано в подписи к **рис. 55**. (а) – долю живых клеток после разных вариантов обработки оценивали через 24 ч методом МТТ; (б) – кривые роста построены на основании данных, полученных методом проточной цитометрии. Все характеристики оценивали через 3 сут после индукции старения. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ SD (N=3), ** – $p < 0,005$, *** – $p < 0,001$ по сравнению с контролем, § – $p < 0,01$, §§§ – $p < 0,001$ по сравнению с H₂O₂-обработанными эМСК.

Основываясь на этих находках, для изучения возможности предотвращения H₂O₂-индуцированного старения эМСК было решено использовать первый способ обработки клеток, схематичное изображение которого представлено на **рис. 58**.

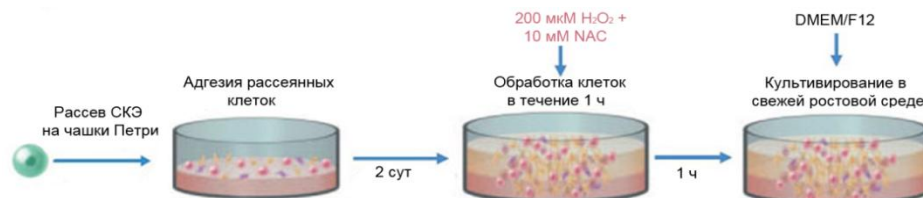


Рис. 58. Схема типичного эксперимента обработки эМСК при совместном действии H₂O₂ и NAC.

Любопытно, что одновременное действие H₂O₂ и NAC способствовало существенному понижению уровня внутриклеточных АФК не только через 3 сут, как показано выше (**рис. 55**), но через 8 сут после воздействия по сравнению с уровнем АФК в H₂O₂-обработанных эМСК (**рис. 59, а**). Кроме того, в течение 11 сут после индукции старения клетки, обработанные антиоксидантом, сохраняли способность пролиферировать, хотя и медленнее, чем контрольные (**рис. 59, б**), а размер их был приблизительно в 1,6 раза меньше по сравнению с H₂O₂-стимулированными клетками (**рис. 59, в**).

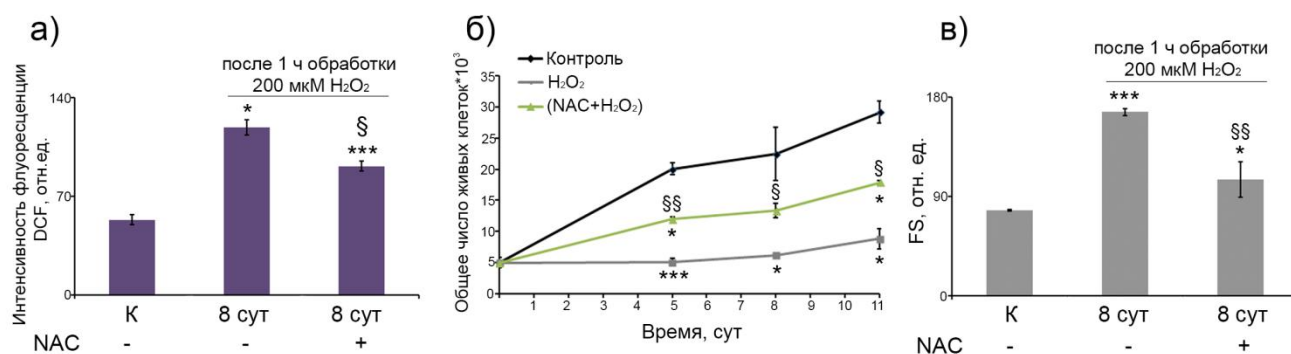


Рис. 59. Влияние NAC на генерацию АФК (а), пролиферацию (б) и размер (в) старых эМСК.

Клетки обрабатывали в соответствии со схемой на **рис. 58**; уровень АФК, общее число живых клеток и их размер оценивали через 8 или 11 сут после индукции старения при помощи метода проточной цитометрии; К – контрольные (необработанные) клетки. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ SD (N=3), * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,005$, *** – $p < 0,001$ по сравнению с контролем, § – $p < 0,05$, §§ – $p < 0,005$ по сравнению с H₂O₂-обработанными эМСК.

Известно, что пролиферирующие клетки, достигшие состояния плотного монослоя при культивировании, окрашиваются на SA- β -Gal (Debacq-Chainiaux et al., 2009). В связи с тем, что эМСК после совместной обработки NAC и H₂O₂ сохраняли способность пролиферировать в отличие от H₂O₂-стимулированных клеток, для корректной оценки влияния антиоксиданта на развитие SA- β -Gal-окраски мы пересекали контрольные, H₂O₂- и (NAC+H₂O₂)-обработанные клетки через 5 сут после начала эксперимента и еще через 2 сут культивирования анализировали изменение активности β -галактозидазы, ассоциированной со старением. Как видно на **рис. 60 а, б**, действие антиоксиданта приводило к существенному уменьшению окраски на SA- β -Gal по сравнению с клетками, обработанными H₂O₂.

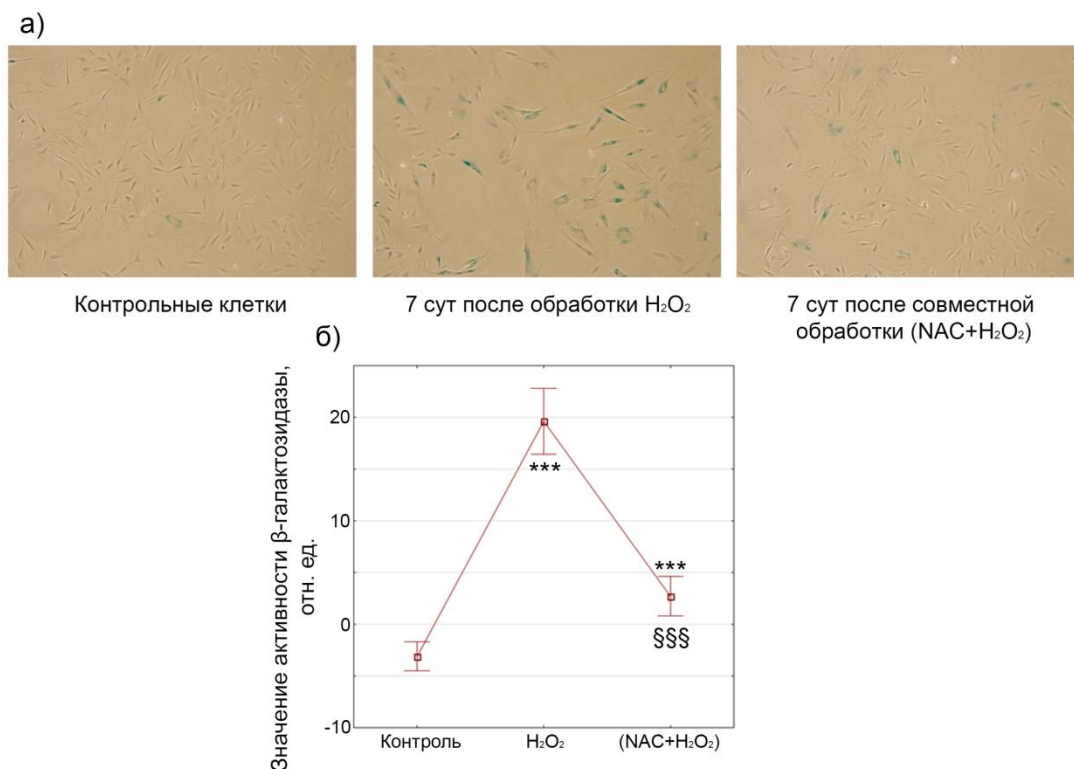


Рис. 60. Эффект NAC на уровень активности SA- β -Gal в H_2O_2 -обработанных эМСК.

(а) – Представлены данные типичного эксперимента. (б) – Снизу приведена количественная оценка результатов окраски на SA- β -Gal и статистический анализ данных с помощью программного комплекса STATISTICA. Данные представлены в виде среднего значения активности β -галактозидазы $\pm$ SD (N=3), для каждой точки пранализировано 250 случайно выбранных клеток, *** – $p < 0,001$ по сравнению с контролем, §§§ – $p < 0,001$ по сравнению с H_2O_2 -обработанными эМСК. Отметим, что 7 сут после обработки либо H_2O_2 , либо (NAC+ H_2O_2) – это суммарное время культивирования клеток (5 сут до пересева + 2 сут после пересева).

Обобщая полученные данные, можно заключить, что снижение уровня АФК при использовании NAC приводит к частичному предотвращению преждевременного старения эМСК, индуцированного окислительным стрессом.

3.6.2. Ингибирование MAP-киназы p38 частично предотвращает развитие H_2O_2 -индуцированного старения эМСК

Поскольку в разделе 3.5.3 было продемонстрировано, что киназа p38 быстро фосфорилируется на начальных стадиях индукции старения и далее поддерживается в активном состоянии в течение длительного времени, логично было предположить ее возможную роль в развитии H_2O_2 -индуцированного старения эМСК. С целью проверки этого предположения мы использовали специфический ингибитор активности p38 – SB203580 (SB). На основании оценки выживаемости клеток при действии SB методом МТТ была выбрана концентрация 5 мкМ, которая практически не влияла на жизнеспособность эМСК (рис. 61).

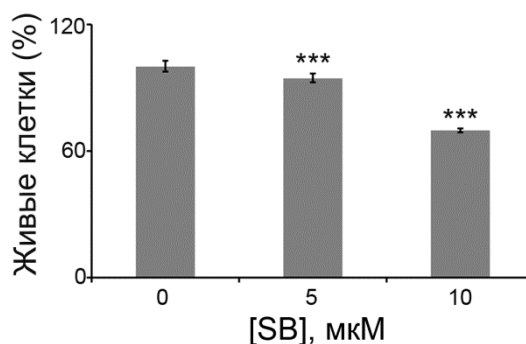


Рис. 61. Жизнеспособность эМСК зависит от концентрации ингибитора SB.

Клетки инкубировали в присутствии SB в указанных концентрациях в течение 24 ч и затем анализировали с помощью MTT; К – контрольные (необработанные) клетки. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ SD (N=3), *** – $p < 0,001$ по сравнению с контролем.

Схема обработки клеток ингибитором была выбрана таким образом, что SB добавляли в инкубационную среду сразу после индукции старения, то есть через 1 ч после действия H_2O_2 (рис. 62). Далее, в течение всего эксперимента поддерживали постоянную концентрацию ингибитора в среде ежедневным добавлением 5 мкМ SB.

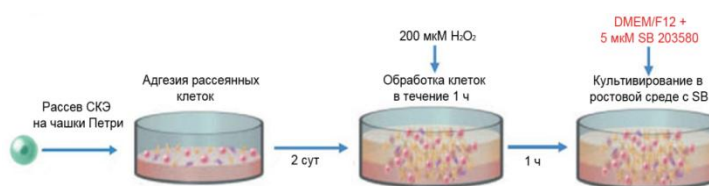


Рис. 62. Схема типичной обработки H_2O_2 -стимулированных эМСК с помощью ингибитора SB.

После действия H_2O_2 с последующим удалением из среды, клетки инкубировали при постоянном присутствии SB.

Механизм действия SB предполагает вытеснение АТФ из АТФ-связывающего кармана p38, что предотвращает фосфорилирование мишеней p38, в частности МК-2, не препятствуя фосфорилированию p38 (Young et al., 1997). В соответствии с этим, в наших экспериментальных условиях действие ингибитора не приводило к уменьшению уровня фосфорилирования p38 в H_2O_2 -обработанных клетках (рис. 63, а), но полностью подавляло H_2O_2 -индуцированное фосфорилирование МК-2 в течение 8 сут после индукции старения (рис. 63, б).

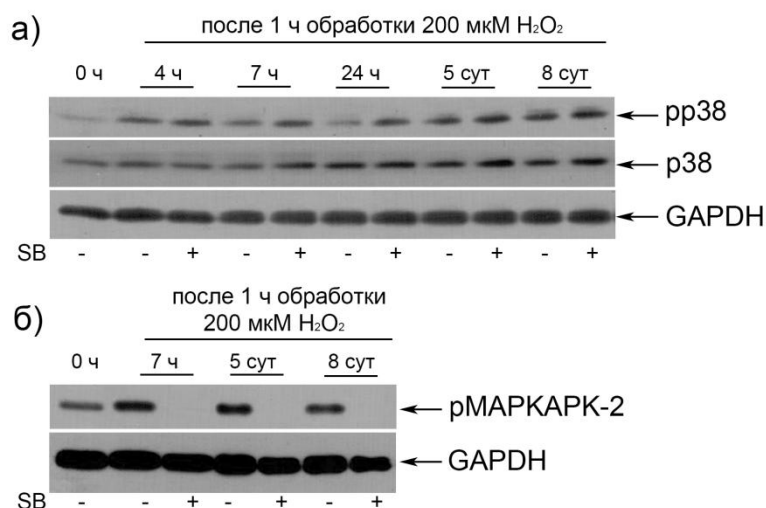


Рис. 63. Модуляция уровня фосфорилирования MAP-киназы p38 (а) и МК-2 (б) в присутствии SB в процессе H₂O₂-индуцированного старения ЭМСК.

Клетки, обработанные 200 мкМ H₂O₂ в течение 1 ч (индукция старения), инкубировали в течение 8 сут либо в свежей ростовой среде, либо в присутствии SB (согласно схеме на рис. 62). Статус фосфорилирования p38 и МК-2 оценивали с помощью иммуноблотинга. GAPDH и p38 использовали в качестве контроля равномерности нанесения белка.

При исследовании влияния ингибирования активности p38 на модуляцию пролиферации H₂O₂-обработанных ЭМСК оказалось, что в присутствии SB происходило заметное увеличение числа пролиферирующих клеток по сравнению с H₂O₂-стимулированными клетками (рис. 64, а). Следовательно, ингибирование p38 способствовало частичному предотвращению потери пролиферативного потенциала в H₂O₂-обработанных ЭМСК. Интересно, в другом варианте обработки клеток ингибитором (при добавлении SB в инкубационную среду через 24 или 48 ч после H₂O₂-стимуляции в течение 1 ч) мы не наблюдали какого-либо восстановления пролиферации (данные не приведены).

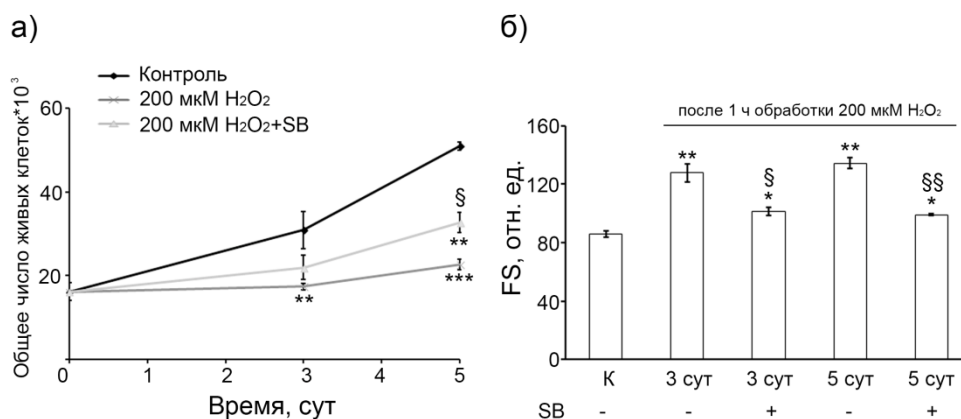


Рис. 64. Влияние SB на пролиферацию (а) и размер (б) стареющих ЭМСК.

Клетки обрабатывали в соответствии со схемой на рис. 62; общее число живых клеток и их размер оценивали через 3 или 5 сут после индукции старения при помощи метода проточной цитометрии; К – контрольные (необработанные) клетки. Данные представлены в виде средних значений ± SD (N=3), * – $p < 0,01$, ** – $p < 0,005$, *** – $p < 0,001$ по сравнению с контролем, § – $p < 0,05$, §§ – $p < 0,005$ по сравнению с H₂O₂-обработанными ЭМСК.

Эффект SB на изменение размера эМСК оценивали через 3 и 5 сут после индукции старения. Как видно **рис. 64, б**, ингибирование активности p38 приводило к предотвращению увеличения размера эМСК по сравнению с H_2O_2 -обработанными клетками: через 5 сут размер клеток в присутствии SB был примерно в 1,4 раза меньше. Для оценки влияния SB на активность SA- β -Gal, мы пересевали контрольные, обработанные H_2O_2 или (H_2O_2 +SB) клетки по аналогичной схеме, описанной в разделе **3.6.1.(б)**. Тестирование активности SA- β -Gal в клетках через 7 сут после индукции старения показало, что в присутствии ингибитора активность в значительной степени снижена по сравнению с обработанными H_2O_2 клетками (**рис. 65, а, б**). Результаты описанных выше экспериментов демонстрируют, что супрессия активности p38 с помощью SB частично предотвращала развитие H_2O_2 -индуцированного старения эМСК.

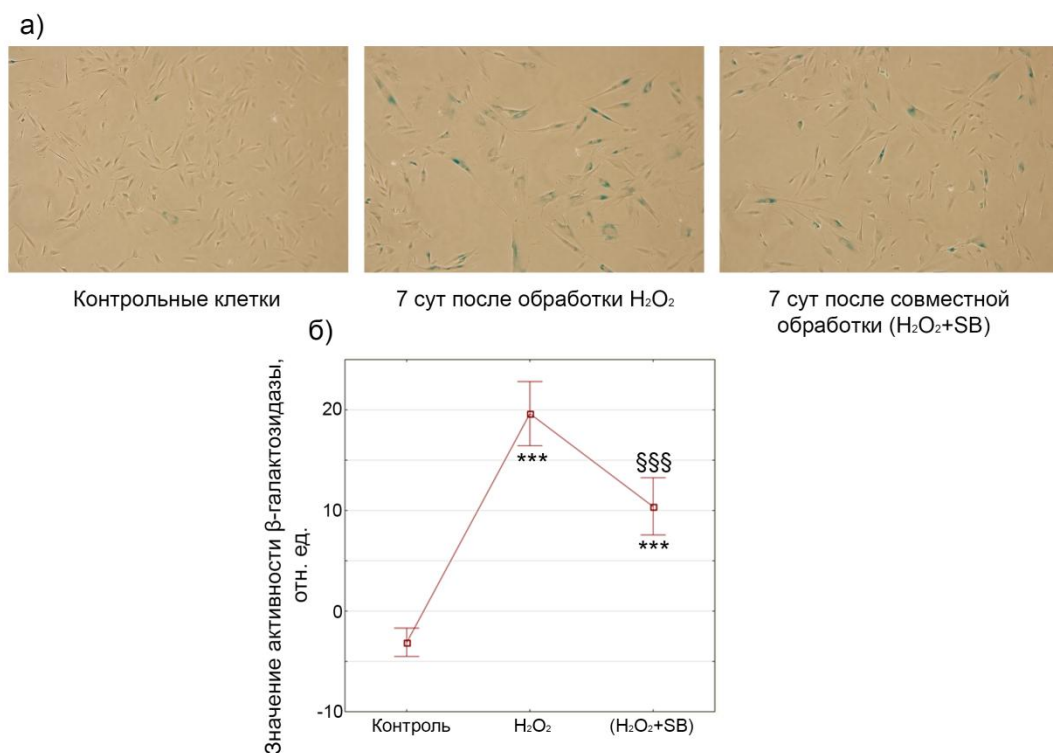


Рис. 65. Ингибирование p38 влияет на уровень активности SA- β -Gal в H_2O_2 -стимулированных эМСК.

(а) – Данные типичного эксперимента. (б) – Справа приведена количественная оценка результатов окраски на SA- β -Gal и статистический анализ данных с помощью программного комплекса STATISTICA. Данные представлены в виде среднего значения активности β -галактозидазы $\pm$ SD (N=3), для каждой точки пранализировано 250 случайно выбранных клеток, *** – $p < 0,001$ по сравнению с контролем, §§§ – $p < 0,001$ по сравнению с H_2O_2 -обработанными эМСК. 7 сут после обработки либо H_2O_2 , либо (H_2O_2 +SB) – это суммарное время культивирования клеток (5 сут до пересева + 2 сут после пересева).

С целью подтверждения результатов, полученных с использованием SB, было проверено действие другого, более специфичного ингибитора p38 MAPK – BIRB796 (BIRB) для возможного предотвращения стресс-индуцированного старения. Как известно, BIRB

связывается рядом с АТФ-связывающим карманом p38 α , что изменяет конформацию и приводит к потере ферментативной активности p38 и, следовательно, препятствует фосфорилированию ее мишеней. По данным МТТ теста в качестве рабочей была выбрана концентрация 5 мкМ BIRB (рис. 66).

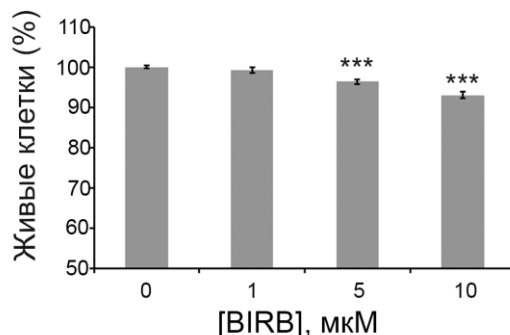


Рис. 66. Жизнеспособность эМСК зависит от концентрации ингибитора BIRB.

Клетки инкубировали в присутствии BIRB в указанных концентрациях в течение 24 ч, затем количество живых клеток определяли с помощью МТТ; К – контрольные (необработанные) клетки. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ SD (N=3), *** – $p < 0,001$ по сравнению с контролем.

Схемы типичной обработки H₂O₂-стимулированных эМСК с помощью ингибиторов BIRB и SB были аналогичны. Интересно отметить, что BIRB вызывал увеличение уровня фосфорилирования p38 по сравнению с H₂O₂-обработанными клетками, и при этом полностью подавлял активацию нижележащей мишени p38 – МК-2 (рис. 67).

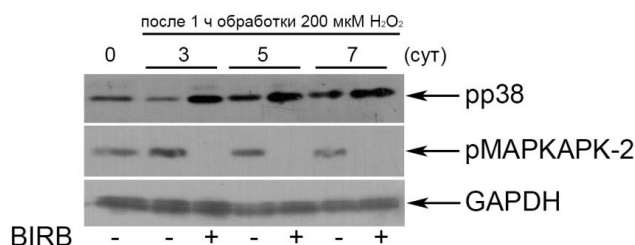


Рис. 67. Уровень H₂O₂-индуцированного фосфорилирования p38 MAPK и её прямой мишени МК-2 при действии BIRB.

эМСК, обработанные 200 мкМ H₂O₂ в течение 1 ч (индукция старения), инкубировали в течение 7 сут либо в свежей ростовой среде, либо в присутствии BIRB. Статус фосфорилирования p38 и МК-2 оценивали в указанных временных точках с помощью иммуноблотинга. GAPDH использовали в качестве контроля равномерности нанесения белка.

При изучении влияния BIRB на пролиферацию H₂O₂-стимулированных клеток и на изменение их размера в процессе старения мы получили результаты, в целом подобные таковым при использовании SB. Так, в присутствии BIRB наблюдали небольшое, но стабильное увеличение числа пролиферирующих клеток (рис. 68, а), а также уменьшение их размера по сравнению с H₂O₂-обработанными клетками в течение как минимум 7 сут после индукции

старения (**рис. 68, б**). Таким образом, наши результаты, полученные с использованием двух разных по природе и степени специфичности ингибиторов p38, SB и BIRB, убедительно демонстрируют, что подавление активности p38 в течение длительного времени может способствовать предотвращению развития H₂O₂-индуцированного старения эМСК.

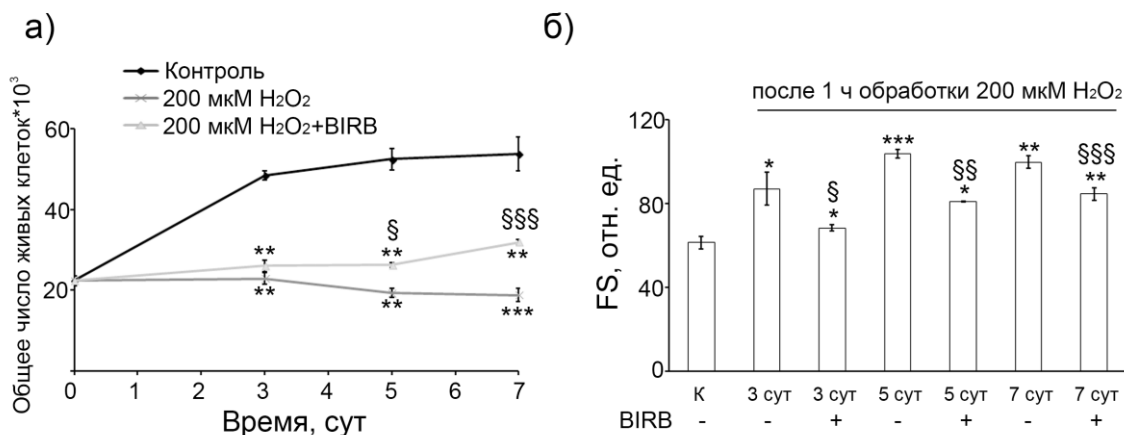


Рис. 68. Влияние BIRB на пролиферацию (а) и размер (б) H₂O₂-стимулированных эМСК. Клетки обрабатывали либо с помощью 200 мкМ H₂O₂ в течение 1 ч, либо в соответствии со схемой на **рис. 62**; общее число живых клеток и их размер оценивали через 3, 5 или 7 сут после индукции старения при помощи метода проточной цитометрии; К – контрольные (необработанные) клетки. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ SD (N=3). Данные представлены в виде средних значений $\pm$ SD (N=3), * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,005$, *** – $p < 0,001$ по сравнению с контролем, § – $p < 0,05$, §§ – $p < 0,005$, §§§ – $p < 0,001$ по сравнению с H₂O₂-обработанными эМСК.

Принимая во внимание представленные выше результаты об участии p53/p21/Rb сигнального пути в реализации H₂O₂-индуцированного блока клеточного цикла в эМСК, приводящего к остановке пролиферации, на следующем этапе работы мы оценили возможную роль p38 в активации данного каскада, применив ингибиторный анализ. Как видно на **рис. 69, а, б**, присутствие SB в течение всего периода наблюдения не оказывало заметного влияния ни на уровень фосфорилирования p53, ни на экспрессию белка p21 по сравнению со стареющими клетками. Напротив, при действии BIRB мы наблюдали усиление активации p53 и уровня экспрессии p21 (**рис. 69, г, д**). Обнаруженное различие в эффектах BIRB и SB, вероятно, связано с более низкой специфичностью SB. Известно, что SB, помимо p38, может эффективно ингибировать активность стрессовой MAP-киназы JNK, тогда как BIRB в основном подавляет ферментативную активность только p38 α . В таком случае другие изоформы p38 (β , γ , δ) и JNK могут компенсировать функции BIRB-ингибированной p38 α . Важно отметить, что подавление киназной активности p38 в течение длительного времени после индукции старения, не зависимо от типа использованного ингибитора, приводило к небольшому, но заметному усилению фосфорилирования белка Rb по сравнению с H₂O₂-обработанными эМСК (**рис. 69, в, е**). Эти

данные согласуются с частичным восстановлением пролиферации клеток в присутствии обоих ингибиторов.

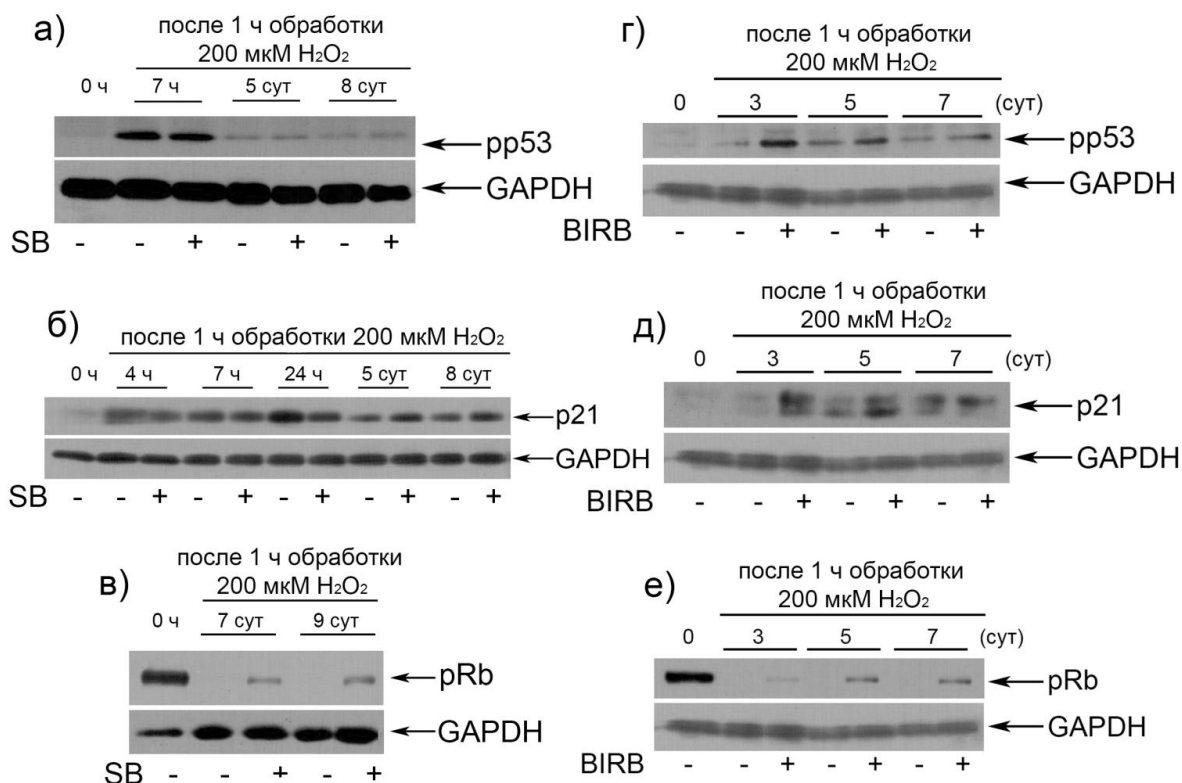


Рис. 69. Влияние ингибиторов SB и BIRB на уровень H_2O_2 -индуцированной активации белков-участников p53/p21/Rb сигнального каскада в стареющих эМСК. После индукции старения (обработка 200 μ M H_2O_2 в течение 1 ч) клетки инкубировали в течение указанного времени либо в свежей ростовой среде, либо в присутствии одного из ингибиторов, и затем оценивали уровень фосфорилирования белков p53 и Rb, а также уровень экспрессии p21 методом иммуноблоттинга с использованием специфических антител.

Обобщая полученные в этой главе результаты, можно заключить, что p38 участвует как в инициации, так и в развитии преждевременного старения эМСК в условиях окислительного стресса, тогда как ингибирование ее активности частично предотвращает старение.

Стареющие (старые) эМСК характеризуются постоянно повышенным уровнем эндогенных АФК, что было описано в разделе 3.5.4. Чтобы выяснить причину этого явления, мы предположили, что длительная H_2O_2 -индуцированная активация p38 в старых клетках может быть ответственна за регуляцию продукции АФК. Для проверки этого предположения было исследовано влияние ингибиторов активности p38 на генерацию внутриклеточных АФК в процессе развития старения. Оказалось, что действие SB и BIRB приводило к значительному снижению уровня АФК по сравнению с H_2O_2 -стимулированными клетками (рис. 70, а, б) в течение всего периода наблюдения (вплоть до 7 сут), что свидетельствует об участии p38 в повышенной продукции эндогенных АФК в старых эМСК.

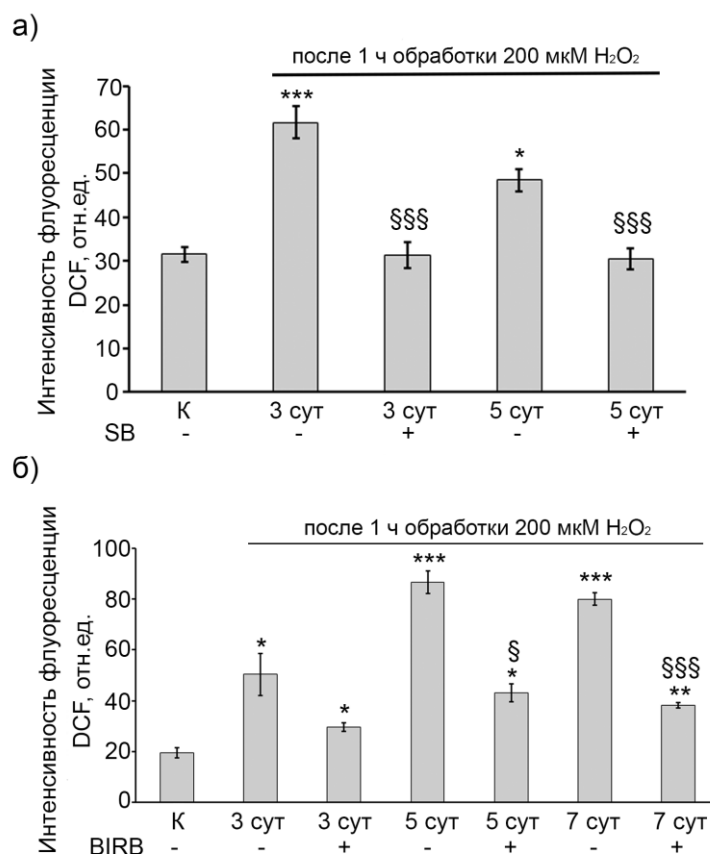


Рис. 70. Влияние SB (а) и BIRB (б) на генерацию внутриклеточных АФК в старых ЭМСК.

Уровень АФК оценивали в указанных временных точках после индукции старения (200 мкМ H_2O_2 в течение 1 ч) методом проточной цитофлуориметрии с использованием красителя $H_2DCF-DA$; К – контрольные (необработанные) клетки. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ SD (N=3), * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,005$, *** – $p < 0,001$ по сравнению с контролем, § – $p < 0,05$, §§§ – $p < 0,001$ по сравнению с H_2O_2 -обработанными ЭМСК.

С другой стороны, повышенный уровень АФК в старых клетках был частично опосредован модуляцией функционирования митохондрий, как показано в разделе 3.5.4. Поэтому далее логично было оценить изменение основных митохондриальных показателей в условиях ингибирования р38, чтобы попытаться установить функциональную взаимосвязь р38 и митохондриальной активности с повышенным уровнем эндогенных АФК в процессе клеточного старения. Добавление SB в ростовую среду после индукции старения приводило к небольшому (в 1,2 раза), но достоверному снижению интенсивности флуоресценции красителей DHR123 (рис. 71, а) и Rho123 (рис. 71, б) по сравнению с H_2O_2 -стимулированными клетками. Кроме того, в присутствии SB интенсивность флуоресценции красителя NAO уменьшалась в 1,4 раза по сравнению с H_2O_2 -обработанными клетками, что указывало на уменьшение митохондриальной массы клеток (рис. 71, в).

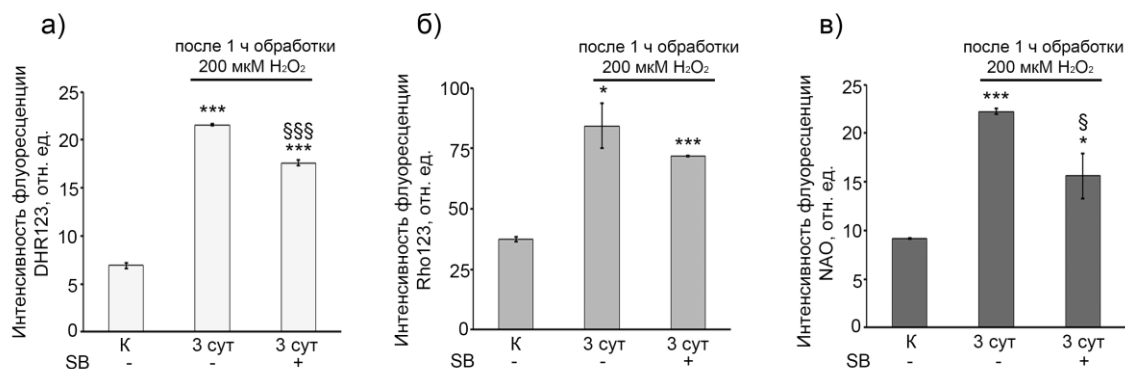


Рис. 71. Модуляция продукции митохондриальных пероксидов (а), потенциала (б) и массы митохондрий (в) в H_2O_2 -стимулированных клетках при действии SB.

После индукции старения (обработка 200 мкМ H_2O_2 в течение 1 ч) эМСК инкубировали в течение 3 сут либо в свежей ростовой среде, либо в присутствии SB, и затем оценивали показатели активности митохондрий с помощью метода проточной цитофлуориметрии. К – контрольные (необработанные) клетки. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ SD (N=3), * – $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$ по сравнению с контролем, § – $p < 0,05$, §§§ – $p < 0,001$ по сравнению с H_2O_2 -обработанными эМСК.

Представленные на **рис. 71** результаты свидетельствуют о том, что все исследованные показатели активности митохондрий – продукция митохондриальных пероксидов, потенциал и масса митохондрий были снижены при постоянном ингибировании киназной активности p38 в процессе старения эМСК. Следовательно, функциональная активность p38 была необходима для нормального функционирования митохондрий в старых клетках. На основании полученных результатов можно сделать вывод о вовлеченности MAP-киназы p38 в процесс генерации эндогенных АФК, который опосредован увеличением массы функционирующих митохондрий, в процессе развития H_2O_2 -индуцированного старения эМСК.

4. ОБСУЖДЕНИЕ

В последнее десятилетие бурно развиваются фундаментальные исследования как эмбриональных, так и тканеспецифичных стволовых клеток человека в связи с их возможным применением в регенеративной медицине. Стволовые клетки обладают высоким пролиферативным потенциалом, способностью к самообновлению и при определенных условиях дифференцируются в различные специализированные клетки. Однако перспективы терапевтического использования стволовых клеток во многом зависят от их устойчивости к стрессовым воздействиям различного рода, так как именно реакции стволовых клеток на повреждающие воздействия определяют возможность нормального развития организма и его способность восстанавливать нормальные функции тканей после повреждения.

Одним из наиболее распространенных типов стресса у живых организмов является окислительный стресс, который вызывает различные окислительные повреждения белков и ДНК, в итоге приводящие к старению, апоптозу и/или опухолевой трансформации клеток. В данной работе исследовали специфические ответы на окислительный стресс эмбриональных и тканеспецифичных, полученных из десквамированного эндометрия, стволовых клеток человека. В качестве модели сравнения были выбраны эмбриональные фибробласты легкого человека, реакции которых на окислительный стресс достаточно подробно изучены и описаны в многочисленных публикациях.

В настоящей работе мы провели сравнительный анализ устойчивости ЭСК, эМСК и фибробластов к окислительному стрессу. Проблема устойчивости эмбриональных стволовых клеток на стресс в последние годы широко дискутируется в литературе, тогда как в отношении стволовых клеток эндометрия аналогичные данные отсутствуют. В связи с этим такое исследование представлялось весьма актуальным. Значение изучения сравнительной устойчивости различных типов клеток к стрессу обусловлено тем, что одинаковое воздействие может восприниматься одним типом клеток как повреждающий фактор, а другими – как стимулирующий, т.е. выступать в роли либо летального, либо физиологического стресса. Исследование влияния окислительного стресса на клетки по ряду причин оказывается довольно сложным. В том случае, когда окислительный стресс моделируется действием экзогенной H_2O_2 , на устойчивость клеток влияет большое число факторов, которые следует учитывать: концентрация и объем раствора H_2O_2 , длительность обработки, уровень метаболизма H_2O_2 , специфичный для каждого типа клеток, а также плотность посева клеточных культур. В связи с этим в наших экспериментах мы варьировали плотность посева клеток и объем раствора H_2O_2 в среде соответственно площади поверхности культуральной посуды, чтобы унифицировать условия обработки.

Ранее мы проводили исследование устойчивости эМСК и фибробластов в условиях пролонгированной (в течение 24 ч) обработки H_2O_2 . В результате было установлено, что эМСК почти в 3 раза превосходят по устойчивости эмбриональные фибробласты человека, причем была обнаружена корреляция между скоростью утилизации H_2O_2 клетками и уровнем устойчивости к стрессу (Бурова и др., 2012). В настоящей работе для всех экспериментов была выбрана пульсовая обработка клеток с помощью H_2O_2 в течение 1 часа. При сравнении реакций исследуемых линий клеток – ЭСК, эМСК и фибробластов на окислительный стресс, эМСК оказались наиболее устойчивыми к действию H_2O_2 , что следует из диапазонов значений LD_{50} , составляющих 600–700, 450–500 и 370–400 мкМ для эМСК, фибробластов и ЭСК, соответственно. Согласно нашим данным, в H_2O_2 -обработанных эМСК повышен уровень экспрессии ферментов антиоксидантной защиты, таких как супероксиддисмутаза-1 и -2 и глутатионпероксидаза, что может быть одной из основных причин толерантности эМСК к стрессу. Эти наблюдения хорошо согласуются с сообщениями о высокой устойчивости к окислительному стрессу мезенхимных стволовых клеток спинного мозга человека, которая была связана с высоким базальным уровнем антиоксидантной защиты клеток (Valle-Prieto, Conget, 2010; Brandl et al., 2011b). В то же время, относительно высокая чувствительность к действию H_2O_2 мезенхимных стволовых клеток из пуповинной крови была связана, по мнению авторов, с низкой активностью ферментов антиоксидантной защиты (Ko et al., 2012).

Как показывает анализ данных литературы, исследование запрограммированной клеточной гибели (апоптоза) стволовых клеток различного происхождения находится в состоянии активного изучения. Мы продемонстрировали, что в ответ на высокие концентрации H_2O_2 клетки всех исследованных линий гибнут путем апоптоза, однако, характер и динамика этого процесса в ЭСК, эМСК и фибробластах существенно различаются. Так, H_2O_2 в концентрации 500 мкМ индуцировала быстрое развитие апоптоза в большей части популяции ЭСК, которые, как было установлено, характеризуются наибольшей чувствительностью к окислительному стрессу; при этом уже через 6 ч после стресса доля $AnnV^+$ клеток возрастала почти в 7 раз. Процесс апоптоза в ЭСК был дозо-зависимым, поскольку обработка клеток H_2O_2 в субцитотоксической концентрации (200 мкМ) также приводила к развитию апоптоза, динамика которого была аналогична таковой при действии летальных доз H_2O_2 , но доля ранне-апоптотических клеток была значительно меньше. Эти наблюдения согласуются с хорошо известными фактами о значительной склонности ЭСК к апоптозу при увеличении температуры (Alekseenko et al., 2012), а также при действии повреждающих ДНК агентов, таких как ионизирующая радиация (Filion et al., 2009; Luo et al., 2012) или этопозид (Grandela et al., 2007). Интересно, что в популяции ЭСК после элиминации поврежденных клеток через 48 ч возобновлялась нормальная пролиферация. Полагают, что в ЭСК для поддержания геномной

стабильности должны быть хорошо развиты механизмы, обеспечивающие репарацию ДНК и (или) элиминацию поврежденных клеток из популяции (Stambrook, Tichy, 2010). Действительно, было обнаружено, что высокая чувствительность ЭСК к различным стрессовым воздействиям коррелирует с более эффективной, чем в соматических клетках, работой систем репарации ДНК (Maynard et al., 2008; Luo et al., 2012). Наши результаты, демонстрирующие быструю и массовую гибель ЭСК в ответ на действие различных доз H_2O_2 , свидетельствуют в пользу того, что H_2O_2 -индуцированный апоптоз может служить эффективным защитным механизмом от стресса. Применительно к ЭСК справедливо парадоксальное утверждение: высокая устойчивость всей клеточной популяции к окислительному воздействию обеспечивается повышенной чувствительностью части клеток, благодаря которой поврежденные клетки элиминируются из клеточной популяции, обеспечивая тем самым стабильность ее дальнейшей пролиферации.

Совершенно другая ситуация характерна для эМСК: в соответствии с высокой устойчивостью этих клеток к токсическому действию H_2O_2 апоптоз медленно развивался лишь при высоких концентрациях H_2O_2 . Так, при действии 900 мкМ H_2O_2 первые слабые признаки апоптоза (появление $Ap V^+$ клеток) наблюдали только через 24 ч после пульсовой обработки клеток. Далее в течение нескольких дней происходило постепенное увеличение доли погибших клеток. И только при действии H_2O_2 в значительно более высоких концентрациях (3 мМ) апоптоз становился преимущественным ответом эМСК на окислительный стресс. Характер гибели фибробластов, занимающих промежуточное положение в ряду устойчивости к действию H_2O_2 , был в большей степени сходен с гибелью эМСК. Полученные данные наглядно демонстрируют наличие корреляции между степенью чувствительности разных клеток к действию летальных доз H_2O_2 и характером апоптоза (его динамикой, степенью выраженности). Особо отметим, что H_2O_2 в сублетальной концентрации (200 мкМ) не индуцировала развитие апоптоза ни в фибробластах, ни в эМСК.

В настоящее время на примере ЭСК хорошо исследован механизм действия таких стрессовых факторов, индуцирующих апоптоз, как гамма-излучение, гипоксия, клеточное голодание и влияние цитотоксических соединений. Быстрая индукция апоптоза в ЭСК в ответ на ионизирующее излучение обусловлена конститутивно активным *Bax*, локализованным в аппарате Гольджи, который р53-зависимым путем транслоцируется в митохондрии и инициирует высвобождение проапоптотических факторов (Sokolov, Neumann, 2012). При сравнении апоптоза в эмбриональных и эндотелиальных стволовых клетках в условиях гипоксии было выявлено повышение экспрессии р53/*Bax* и усиление активности каспазы-9 с последующей активацией каспаз-3, -6 и -7 (Lee et al., 2005). При действии таких

цитотоксических соединений, как нонифенол и октифенол, индуцирующих апоптоз в ЭСК, было обнаружено увеличение активности каспаз-8 и -3 (Kim et al., 2006).

Большинство работ, касающихся изучения механизмов гибели мезенхимных стволовых клеток, выполнено на МСК из костного мозга, причем интерес к таким исследованиям продиктован, в первую очередь, низкой выживаемостью этих клеток при трансплантации больным с ишемией. Так, в условиях сывороточного голодания и гипоксии (моделирование ишемии) в пределах первых суток МСК из костного мозга крыс подвергались апоптозу с участием каспаз-8 и -3. Причем ингибитор каспазной активности zVAD-fmk полностью предотвращал гибель клеток в этих стрессовых условиях (Zhu et al., 2006). Аналогичные результаты были получены и в более поздней работе на МСК из костного мозга человека, где авторы убедительно продемонстрировали, что подавление экспрессии гена каспазы-8 методом РНК-интерференции защищает клетки от апоптоза в условиях голодания и гипоксии (Liang et al., 2014). Кроме того, было показано, что нокдаун каспазы-3 ингибировал развитие апоптоза МСК из костного мозга в условиях окислительного стресса (Hua et al., 2013). С другой стороны, известны случаи, когда апоптоз МСК из жировой ткани регулировался каспаза-независимым механизмом наряду с каспаза-зависимым (Park et al., 2011).

Наши данные демонстрируют зависимость гибели поврежденных при окислительном стрессе клеток (ЭСК, эМСК и фибробластов) от активности каспаз-3 и -8, что может указывать на сходство механизма апоптоза во всех исследованных клеточных линиях. Интересно, что динамика активации каспаз в этих клетках была различна, что может быть связано, по всей вероятности, с их различной устойчивостью к окислительному воздействию. Так, в наиболее стресс-чувствительных ЭСК мы наблюдали быструю, уже через 4 часа, активацию каспаз-3 и -8, тогда как в эМСК, характеризующихся чрезвычайно высокой устойчивостью к окислительному стрессу, увеличение активности каспаз происходило значительно медленнее – только через 16 часов. Для более детального выяснения механизма H_2O_2 -индуцированного апоптоза необходимы дополнительные исследования, проведение которых, однако, не входило в задачи настоящей работы. На основании полученных результатов и с учётом данных литературы можно заключить, что для ЭСК апоптоз является преимущественной реакцией на стресс, вне зависимости от силы воздействия, тогда как в эМСК апоптоз индуцируется только в ответ на действие высоких доз H_2O_2 .

Наиболее интересная, с нашей точки зрения, находка данной работы заключается в том, что эМСК, подобно фибробластам, могут подвергаться преждевременному старению в условиях сублетального окислительного стресса. Проблема старения мезенхимных стволовых клеток человека при действии стрессовых факторов вызывает особый интерес исследователей в течение последних нескольких лет. Однако с 2009 года, когда впервые был описан феномен

стресс-индуцированного преждевременного старения МСК (Wang, Jang, 2009), появилось лишь несколько сообщений об индуцированном старении в условиях окислительного стресса стволовых клеток, полученных из костного мозга (Brandl et al., 2011b; Kim et al., 2011; Harbo et al., 2012) и пуповинной крови (Ko et al., 2012). В отличие от этих клеток, инвазивное получение которых связано с определенным риском для пациента, эМСК дают уникальную возможность изучения механизма H_2O_2 -индуцированного старения в стволовых клетках, полученных простым не инвазивным методом (Земелько и др., 2011).

В ответ на действие H_2O_2 в сублетальной концентрации в популяции эМСК, как и в популяции фибробластов, мы наблюдали блок клеточного цикла, подавление пролиферации, развитие гипертрофии клеток и увеличение доли SA- β -Gal положительно окрашенных клеток. Важно отметить, что приведенный выше набор признаков можно считать необходимым, но не достаточным для установления факта индукции преждевременного старения. Необходимо учитывать, что клетки, находящиеся в так называемом «состоянии покоя», которое может быть вызвано сывороточным голоданием, недостатком ростовых факторов или контактным торможением, также характеризуются блоком клеточного цикла, отсутствием пролиферации и, кроме того, могут окрашиваться на SA- β -Gal (Severino et al., 2000). Существенным отличием покоящихся клеток от стареющих является обратимость блока клеточного цикла (Coller et al., 2006), причём возобновление пролиферации покоящихся клеток возможно после пересева или стимуляции митогенами (Coller et al., 2006). С целью подтверждения факта индукции преждевременного старения эМСК в условиях окислительного стресса был проведен ряд экспериментов, в ходе которых мы пересевали клетки через несколько дней после H_2O_2 -обработки и затем, спустя 3-5 сут культивирования, характеризовали распределение пересейанных клеток по фазам клеточного цикла. Оказалось, что клетки после пересева по-прежнему находились в состоянии ареста клеточного цикла и, соответственно, были не способны восстановить пролиферацию. Кроме того, они продолжали увеличиваться в размере и сохраняли повышенную активность β -галактозидазы. Эти данные служат убедительным доказательством того, что эМСК в условиях сублетального окислительного стресса действительно подвергаются преждевременному старению, а не входят в состояние покоя.

После установления факта индукции преждевременного старения эМСК в условиях окислительного стресса, представлялось интересным исследовать молекулярный механизм, лежащий в его основе. Хорошо известно, что H_2O_2 дозо-зависимым образом вызывает повреждения ядерной ДНК в виде двунитевых разрывов (Giorgio et al., 2007; Panieri et al., 2013), которые инициируют в клетках специфический ответ (DDR), включающий активацию киназы АТМ, фосфорилирование гистона H2AX и адапторного белка 53BP1 (Zhan et al., 2010; Firsanov et al., 2011). При этом фосфорилированные формы H2AX (γ H2AX) и 53BP1 рассматриваются

как надежные маркеры двойных разрывов ДНК (Bartkova et al., 2005). Наши результаты по изучению динамики активации основных участников DDR указывают на быстрое (через 5-15 мин после добавления H_2O_2) и почти одновременное фосфорилирование ATM, H2AX и 53BP1 с последующей колокализацией этих белков и образованием ядерных дискретных фокусов, что свидетельствует о ранней активации и формировании DDR при действии окислительного стресса на эМСК. Эти данные в принципе согласуются и дополняют описанные в литературе факты об активации DDR в ответ на действие ионизирующего излучения, химиотерапевтических агентов и окислительного стресса в стволовых клетках, включая МСК из костного мозга (Prendergast et al., 2011), гемопоэтические стволовые клетки (Shao et al., 2011) и ЭСК (Sokolov, Neumann, 2013).

Считается, что киназа ATM регулирует G1/S контрольную точку клеточного цикла через фосфорилирование нижележащей мишени - киназы Chk2 (Buscemi et al., 2004), что вызывает активацию транскрипционного фактора p53 с последующей индукцией экспрессии p21 (Brown et al., 1997). Кроме того, ATM может прямо фосфорилировать p53 без участия Chk2 (Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007). В свою очередь, Chk2 может индуцировать транскрипцию p21 в p53-нокаутных клетках (Aliouat-Denis et al., 2005). Согласно результатам наших экспериментов, во время стимуляции эМСК с помощью H_2O_2 происходит быстрое фосфорилирование как p53, так и киназы Chk2, причем p53 транслоцируется в ядро практически одновременно с активацией DDR. Через 4-7 ч после фосфорилирования Chk2 и p53 мы выявили повышение уровня белка p21 и экспрессии мРНК этого гена, сохранявшееся в течение всего периода наблюдения (вплоть до 3-х недель). Повышенная экспрессия p21 повлекла за собой устойчивое гипофосфорилирование белка Rb и, как следствие, арест клеточного цикла. Хорошо известно, что сигнальный путь p53/p21/Rb играет ключевую роль как в запуске репликативного старения клеток (Beausejour et al., 2003; Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007), так и преждевременного старения мезенхимных (Prendergast et al., 2011) и гемопоэтических стволовых клеток (Shao et al., 2011). Совокупность полученных нами данных свидетельствует о том, что эМСК не являются исключением, и индукция старения в условиях окислительного стресса осуществляется в этих клетках также через p53/p21/Rb путь.

Наряду с p21, в процессе клеточного старения показано участие и другого ингибитора циклин-зависимых киназ – p16, также контролирующего активность Rb (Robles, Adami, 1998). Однако сообщалось, что путь p16/Rb необходим не для индукции, а для поддержания состояния старения различных типов клеток в течение длительного времени (Robles, Adami, 1998; Beausejour et al., 2003; Campisi, 2005; Shao et al., 2011). Интересно, что в этих случаях экспрессия p16 наблюдалась значительно позже, чем p21. При этом повышение уровня p16 на поздних сроках трактовалось как необходимое условие для предотвращения повторного

вхождения старых клеток в клеточный цикл (Campisi, 2005). Напротив, наши результаты демонстрируют повышение уровня белка p16 только на начальной стадии (в пределах часовой обработки клеток H_2O_2), что позволяет предположить вовлеченность p16/Rb пути, наряду с p53/p21/Rb, непосредственно в индукцию блока клеточного цикла в H_2O_2 -стимулированных эМСК.

В настоящее время в литературе процесс стресс-индуцированного старения принято рассматривать как совокупность двух основных стадий – индукции и стабилизации, которые могут регулироваться различными механизмами в зависимости от типа стресса, клеточного контекста и других факторов (Passos et al., 2010). Применительно к преждевременному старению эМСК процесс индукции можно кратко описать следующим образом: экзогенная H_2O_2 сразу после добавления проникает внутрь клеток и почти моментально приводит к возникновению повреждений ДНК и активации основных участников DDR, среди которых АТМ киназа ответственна за последующую остановку клеточного цикла через Chk2/p53/p21/Rb. Интересно, что активация DDR, приводящая к временному блоку клеточного цикла, необходима, в первую очередь, для инициации репарации с целью предотвращения пролиферации поврежденных клеток и сохранения геномной стабильности (Schwartz et al., 2007; Mariotti et al., 2013). Однако в случае, когда повреждения достаточно сильные и их сложно репарировать, блок цикла становится необратимым, что приводит к запуску преждевременного старения (d'Adda di Fagagna, 2008). Считается, что необратимость блока клеточного цикла обеспечивается поддержанием DDR в стареющих клетках в постоянно активном состоянии, что отражает стабилизацию старения (d'Adda di Fagagna, 2008; Passos et al., 2010). Чтобы охарактеризовать эту стадию процесса старения, далее мы проверили функциональный статус основных участников ответа на повреждение ДНК в старых эМСК. Оказалось, что АТМ, H2AX и 53BP1 находились в активном состоянии даже через 5 сут после индукции старения; более того, эти белки были ко-локализованы в отдельных фокусах. Стоит отметить, что визуально количество фокусов, возникших в процессе развития старения, было существенно меньше, чем сразу после индукции, однако, они были значительно крупнее. Эти наблюдения хорошо согласуются с данными других исследователей, наблюдавших аналогичное увеличение размера фокусов в процессе развития старения (Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007; Suzuki et al., 2012). Предполагается, что такая модификация сайтов повреждения ДНК может быть опосредована фосфорилированием все большего числа молекул гистона H2AX в результате постоянно активного DDR в старых клетках (d'Adda di Fagagna, 2008).

Далее представлялось важным выяснить, что обеспечивало постоянную активацию DDR в стареющих/старых эМСК. Еще в 1999 году при исследовании репликативного старения ученые обнаружили, что стареющие клетки характеризуются повышенным уровнем

эндогенных АФК (Allen et al., 1999). Эти данные получили подтверждение и в более поздних работах (Passos et al., 2007a; Lawless et al., 2012). Более того, аналогичные результаты были получены при изучении преждевременного старения, индуцированного гиперэкспрессией онкогенов (Kodama et al., 2013), стрессом (Borodkina et al., 2014; Loseva et al., 2014) и обработкой химиотерапевтическими агентами (Probin et al., 2007). Результаты наших исследований также демонстрируют наличие взаимосвязи между развитием старения и повышенной продукцией внутриклеточных АФК в ЭМСК. Важно подчеркнуть, что во время стимуляции клеток экзогенная H_2O_2 полностью утилизировалась к моменту окончания обработки, в частности, за счет усиления экспрессии генов ферментов антиоксидантной защиты SOD1/2. Однако через 5-6 ч после обработки уровень эндогенных АФК начинал плавно увеличиваться, через 5 сут превысив контрольный приблизительно в 3 раза и оставаясь постоянно повышенным в течение всего периода наблюдения. Эти данные коррелируют с результатами, полученными при индукции старения с помощью агента busulfan, который вызывает окислительный стресс за счет истощения пула свободного глутатиона (Probin et al., 2007). Согласно данным этих авторов, первоначальное увеличение АФК, связанное именно с механизмом действия busulfan, было выявлено через 30 мин после окончания обработки. Однако далее генерация АФК линейно возрастала в течение всего периода наблюдения, несмотря на то, что уровень восстановленного глутатиона в обработанных и контрольных клетках был сопоставим. На сегодняшний день принято считать, что именно такое отставленное во времени возрастание уровня эндогенных АФК ответственно за инициацию повреждения ДНК и стабилизацию DDR в процессе развития старения (Passos et al., 2010; Jurk et al., 2012). Таким образом, основываясь на полученных нами данных, можно предполагать, что процесс развития H_2O_2 -индуцированного старения ЭМСК является следствием повышенной продукции АФК, приводящей к поддержанию DDR в постоянно активном состоянии и аресту клеточного цикла через сигнальные пути pATM/pp53/p21/pRb и pATM/pChk2/p21/pRb.

Принимая во внимание то, что митохондрии являются основным источником эндогенных АФК в клетке, логично было предположить их возможный вклад в увеличение продукции АФК в процессе развития стресс-индуцированного старения. Известно, что даже в отсутствие каких-либо стрессовых воздействий в нормальных человеческих клетках в ходе клеточного цикла возникает около 50 двойных разрывов ДНК за счет побочных продуктов, образующихся в ходе окислительно-восстановительных реакций в дыхательной цепи митохондрий (Zhao et al., 2007). Как и ожидалось, в процессе развития H_2O_2 -индуцированного старения в ЭМСК существенно возрастала продукция митохондриальных пероксидов. Причиной такого повышения, согласно данным различных исследователей, может быть нарушение функционирования митохондрий, детектируемое по падению мембранного

потенциала митохондрий (Ma et al., 2009; Passos et al., 2010). Однако в нашем случае не удалось выявить ожидаемого уменьшения ММП. Более того, мы обнаружили достоверное увеличение митохондриального потенциала, которое в значительной степени коррелировало с ростом митохондриальной массы, что свидетельствует, скорее, о сохранении нормального функционирования митохондрий в стареющих эМСК. В пользу этого вывода также свидетельствует плавное возрастание коэффициента восстановления МТТ, отражающее увеличение активности митохондриальных ферментов пропорционально изменению их массы. Интересно, что аналогичные результаты были получены группой китайских ученых при исследовании H_2O_2 -индуцированного старения фибробластов (Lee et al., 2000). Обобщая полученные результаты, можно предположить, что в процессе развития H_2O_2 -индуцированного старения в эМСК не нарушается биогенез митохондрий, и, следовательно, повышение продукции АФК в стареющих клетках, по крайней мере, частично может быть опосредовано увеличением числа функционально активных митохондрий в расчете на одну клетку.

Другая интересная, но довольно сложная проблема заключается в поиске успешной стратегии предотвращения (отмены или уменьшения) индуцированного клеточного старения. Ряд достаточно успешных зарубежных исследований по обратимости клеточного старения даёт основание предположить существование в стареющих клетках некой «точки возврата», из которой арестованные клетки ещё способны восстановить пролиферативный потенциал (в отсутствии индуктора старения) и вернуться если не в исходное, то в обратимое состояние покоя. Дальнейшая работа была нацелена на поиск возможных эффективных подходов для предотвращения H_2O_2 -индуцированного старения эМСК.

В современной литературе целый пласт работ посвящен исследованию влияния антиоксидантов с различными механизмами действия на процесс стресс-индуцированного старения различных типов клеток. Считается, что антиоксиданты способны уменьшать окислительное повреждение ДНК, ключевой фактор старения, за счет утилизации эндогенных АФК и таким образом замедлять процесс старения. Наиболее эффективными в защите клеток от старения, индуцированного окислительным стрессом, оказались вещества растительного происхождения. Так, предобработка клеток эндотелия человека с помощью биоактивного компонента ревеня, rhein lysinate, способствовала предотвращению развития H_2O_2 -индуцированного старения клеток (Lin et al., 2011). Основным компонентом женьшеня ginsenoside Rb1 также защищал клетки эндотелия человека от преждевременного старения, вызванного окислительным стрессом (Liu et al., 2011). Обработка фибробластов WI38 метанольным экстрактом из черного риса приводила к ослаблению повреждающего эффекта H_2O_2 (Choi et al., 2012). Один из компонентов родиолы розовой, salidroside, защищал фибробласты человека от H_2O_2 -индуцированного старения (Mao et al., 2010). Изо-тиоцианаты, содержащиеся в

крестоцветных растениях, оказывали протекторный эффект от повреждений, вызванных действием H_2O_2 , в мезенхимных стволовых клетках (Zanichelli et al., 2012). Кроме того, показано, что использование таких полифенолов, как epigallocatechin gallate, в большом количестве содержащегося в зеленом чае, и curcumin, входящего в состав корня куркумы, способствовало предотвращению H_2O_2 -индуцированного старения МСК из костного мозга (Yagi et al., 2013).

В настоящей работе мы исследовали эффект двух антиоксидантов, DPI и NAC, на регулирование процесса старения ЭМСК при окислительном стрессе. Выбор этих соединений был обусловлен их доступностью и широкой изученностью эффектов. Diphenyleneiodonium (DPI) является хорошо известным ингибитором флавоэнзимов. Сообщалось, что он ингибирует активность NADPH оксидазы, NO синтазы, ксантин оксидазы, NADPH цитохром P450 оксидоредуктазы (Park et al., 2007). Кроме того, мишенями его действия являются холинэстераза и кальциевая помпа (Wind et al., 2010). Несмотря на невысокую специфичность действия, DPI широко применяется для ингибирования генерации АФК, опосредованной флаavin-содержащими энзимами, в разных типах нормальных и трансформированных клеток. Мы использовали DPI в концентрации 0,25 мкМ, в которой он не влиял на жизнеспособность ЭМСК, с одной стороны, и значительно снижал эндогенный уровень АФК, с другой. Наряду с этими позитивными эффектами, присутствие DPI вызывало также заметное уменьшение активности SA- β -Gal и размера H_2O_2 -стимулированных клеток. Однако мы не выявили ожидаемого восстановления (хотя бы частичного) пролиферации в DPI-обработанных клетках по сравнению с арестованными H_2O_2 -обработанными клетками. Чтобы попытаться понять причину отсутствия эффекта, мы исследовали действие данного антиоксиданта на пролиферацию H_2O_2 -необработанных ЭМСК. Оказалось, что DPI вызывает торможение пролиферации клеток с преимущественным блокированием их в G1 фазе клеточного цикла. Продемонстрированный анти-пролиферативный эффект DPI подтверждается данными литературы о способности DPI в высоких дозах (10 мкМ) необратимо ингибировать прогрессию клеточного цикла (Scaife, 2005). В связи с этим, дальнейшее использование DPI для предотвращения H_2O_2 -индуцированного старения ЭМСК не представлялось целесообразным.

Антиоксидант NAC, понижающий эндогенный уровень АФК за счет стимуляции синтеза восстановленного глутатиона, традиционно используют для уменьшения токсического эффекта H_2O_2 на клетки. Однако важно отметить, что в определенных условиях NAC может вызывать торможение пролиферации и блокирование клеток в G1 фазе цикла (Sekharam et al., 1998), аналогично действию DPI. Учитывая, что часовая обработка H_2O_2 приводила к необратимой остановке пролиферации и блоку клеточного цикла ЭМСК, нам необходимо было подобрать такие условия модуляции индуцированного старения ЭМСК, при которых NAC сам по себе не

оказывал бы влияния на пролиферативный статус контрольных клеток, но был способен восстанавливать пролиферацию H_2O_2 -обработанных клеток. Кроме того, поскольку преждевременное старение эМСК сопровождается постоянно повышенным внутриклеточным уровнем АФК, необходимо было, чтобы НАС эффективно подавлял АФК. Антиоксидант в концентрации 10 мМ при постоянном присутствии в культуральной среде вызывал падение АФК до контрольного уровня, но в то же время лишь в незначительной степени ослаблял анти-пролиферативный эффект H_2O_2 . Такой неудовлетворительный результат побудил нас тестировать другие варианты обработки клеток с помощью НАС. Представлялось целесообразным моделировать условия в двух направлениях: либо снижать концентрацию антиоксиданта при постоянном присутствии в среде, либо уменьшать время инкубации с 10 мМ НАС. Как оказалось, первый вариант имел существенный недостаток - НАС в концентрации 5 мМ не оказывал значительного эффекта на уровень АФК в H_2O_2 -обработанных эМСК.

Далее, при выборе условий обработки эМСК антиоксидантом мы приняли во внимание результаты исследования эффекта НАС на уменьшение токсического действия H_2O_2 в клетках карциномы эндометрия. Наилучший результат по выживаемости был получен при совместном действии НАС и H_2O_2 через 24 ч после обработки клеток (Estany et al., 2007). Согласно нашим данным, одновременная обработка эМСК в течение часа при помощи НАС и H_2O_2 (с последующей отмывкой) оказалась наиболее перспективной стратегией для предотвращения преждевременного старения эМСК. При исследовании развития H_2O_2 -индуцированного старения было установлено, что в присутствии НАС наблюдается как частичное восстановление пролиферации, так и предотвращение развития фенотипа старения.

Насколько известно из доступной нам литературы, протекторное действие этого антиоксиданта в отношении преждевременного старения мезенхимных стволовых клеток человека до настоящего времени практически не исследовалось. В одной из немногих работ (Yagi et al., 2013) предобработка МСК из костного мозга при помощи НАС в различных концентрациях приводила к значительному улучшению выживаемости и колониеобразующей способности клеток в условиях окислительного стресса, однако, авторы не затрагивали проблему отмены стресс-индуцированного старения этих клеток.

Проблема регуляции клеточного старения тесно связана с исследованием роли MAP-киназ, поскольку, как известно, их активность модулируется в процессе старения клеток (Maruyama et al., 2009; Debacq-Chainiaux et al., 2010). При изучении стресс-индуцированного преждевременного старения клеток внимание исследователей сконцентрировано на регуляторной роли стресс-киназ MAP-киназного каскада - p38 и JNK1/2, которые преимущественно активируются при многих стрессовых воздействиях и включаются в различные клеточные ответы на стресс. Как показывает анализ литературы, вклад каждой из

этих MAP-киназ в развитие старения зависит, прежде всего, от клеточного контекста и типа индуктора стресса. Во многих типах опухолевых клеток активация p38 MAPK не является необходимым и достаточным условием стресс-индуцированного преждевременного старения (Haq et al., 2002; Lee et al., 2010). С другой стороны, p38 MAPK играет определяющую роль в преждевременном старении фибробластов, которое инициируется гиперэкспрессией онкогенов, окислительным стрессом, неподходящими условиями культивирования клеток, укорочением теломер и активацией Ras-Raf сигналинга (Chen, Ames, 1994; Iwasa et al., 2003; Han, Sun, 2007). Относительно роли p38 в старении мезенхимных стволовых клеток нам удалось найти лишь несколько опубликованных работ. В одной из них авторы показали участие киназы p38 в репликативном старении МСК (Lee et al., 2009), а в другой – ее вовлеченность в процесс H_2O_2 -индуцированного преждевременного старения (Choi et al., 2014), при этом источником МСК в обеих работах был костный мозг. Результаты наших исследований в значительной степени согласуются с данными этих исследователей и свидетельствуют об участии киназы p38 как в инициации, так и в процессе стабилизации H_2O_2 -индуцированного старения эМСК.

Для более детального изучения роли p38 в преждевременном старении эМСК, а также в качестве возможной стратегии предотвращения его развития, мы использовали специфическое ингибирование киназной активности p38 с помощью фармакологических агентов SB и BIRB. Оказалось, что пост-обработка H_2O_2 -стимулированных клеток ингибиторами, приводящая к перманентному подавлению функциональной активности p38, вызывала достоверное уменьшение размера, снижение активности β -галактозидазы и частичное восстановление пролиферативного потенциала в стареющих клетках. Важно отметить, что такие интересные и существенные для решения поставленной задачи результаты были получены исключительно в том случае, когда пост-обработка ингибиторами осуществлялась тотчас после H_2O_2 -стимуляции эМСК, но не через 24 или 48 часов. Эти находки свидетельствуют о важной роли активированной p38 как в процессе инициации, так и стабилизации преждевременного старения эМСК в условиях окислительного стресса. Напротив, при исследовании H_2O_2 -индуцированного старения фибробластов человека селективное ингибирование киназной активности p38 не оказывало значительного эффекта ни на развитие фенотипа старения, ни на пролиферацию остановленных клеток (Wang et al., 2004). В то же время в работе других авторов подавление активности p38 в условиях преждевременного старения фибробластов, индуцированного с помощью busulfan, моделирующего окислительный стресс, приводило к предотвращению развития фенотипа старения и частичному восстановлению пролиферативного потенциала клеток (Probin et al., 2006).

Согласно литературным данным, p16 и p53 принято рассматривать в качестве основных белков, которые регулируются через p38 MAPK путь в процессе клеточного старения.

Показано, что активированная p38 MAP-киназа способна как повышать экспрессию p16 (Wang et al., 2002; Bulavin et al., 2004), так и фосфорилировать p53, что приводит к увеличению экспрессии другого ингибитора CDK – p21 (Wu, 2004; Han, Sun, 2007). В стволовых клетках роль киназы p38 в реализации блока клеточного цикла связывают в большей степени с регуляцией экспрессии p16 (Lee et al., 2009). Так, например, позитивное регулирующее действие активированной p38 киназы на уровень экспрессии p16 рассматривалось в качестве предполагаемого механизма H₂O₂-индуцированного старения гемопоэтических стволовых клеток (Ito et al., 2006). Возвращаясь к вопросу H₂O₂-индуцированного старения эМСК, следует сказать, что в наших условиях исследование подобного механизма по ряду причин не казалось рациональным. С одной стороны, увеличение экспрессии p16 мы наблюдали только в пределах 1 ч во время действия H₂O₂, но не в более поздние сроки, когда происходила стабилизация старения клеток. С другой стороны, в экспериментах, направленных на поиск условий предотвращения H₂O₂-индуцированного старения эМСК, мы намеренно не использовали предобработку клеток ингибиторами p38, а добавляли их после индукции старения, т. е. непосредственно сразу после окончания действия H₂O₂. Такая схема эксперимента не позволяла оценить возможный вклад p38/p16 пути в прогрессию преждевременного старения эМСК.

Для исследования возможного влияния p38 на p53/p21/Rb путь, необходимый для индукции и поддержания блока клеточного цикла в H₂O₂-обработанных эМСК, функциональный статус этих белков оценивали в условиях ингибирования p38. Пост-обработка H₂O₂-стимулированных эМСК с помощью SB не приводила к существенным изменениям функциональной активности p53 и экспрессии p21, однако, заметно увеличивала фосфорилирование Rb. Отметим, что белок Rb является компонентом p38/МК-2 сигнального каскада и одним из важнейших участников, опосредующих стресс-индуцированный арест клеточного цикла. Для подтверждения результатов, полученных с использованием SB, были проведены дополнительные эксперименты с применением другого специфического ингибитора p38 - BIRB. Вопреки нашим ожиданиям, обработка клеток с помощью BIRB способствовала небольшому увеличению фосфорилирования p53 и экспрессии p21. Наблюдаемые различия в эффектах этих ингибиторов могли быть связаны с более низкой специфичностью SB. Известно, что SB, помимо p38, может эффективно ингибировать активность стрессовой MAP-киназы JNK, тогда как BIRB в основном подавляет ферментативную активность p38 α . В таком случае другие изоформы p38 (β , γ , δ) и JNK могут компенсировать функции BIRB-ингибированной p38 α . Тем не менее, независимо от природы ингибитора в обоих случаях наблюдалось увеличение уровня фосфорилирования Rb. Принимая во внимание результаты ингибиторного анализа, можно было предположить, что p38/МК-2/Rb путь, независимо от p53/p21/Rb, вовлечен в регуляцию блока клеточного цикла эМСК.

С целью более детального исследования механизма активации каскада p38/Rb в процессе стресс-индуцированного старения эМСК необходимо было выявить возможные активаторы и эффекторы p38. Известно, что основным активатором p38 в клетках разных типов является апоптоз-стимулирующая киназа 1 (ASK1), непосредственно активируемая экзогенной H_2O_2 (Tobiume et al., 2002). Наши данные демонстрируют очень быстрое фосфорилирование этой киназы (в пределах первых 5 мин) в ответ на действие H_2O_2 , что позволяет говорить об участии ASK1 в запуске преждевременного старения эМСК в условиях окислительного стресса.

В качестве основного эффектора p38 киназы мы рассматривали ее прямую мишень – МК-2. Как известно, МК-2 является негативным регулятором прогрессии клеточного цикла, поскольку непосредственно инактивирует члены семейства Cdc25 фосфатаз, которые ответственны за функционирование циклин/CDK комплексов. Согласно современным представлениям, МК-2 функционирует параллельно с Chk1 и Chk2 в интеграции ответов на повреждение ДНК и аресте клеточного цикла (Manke et al., 2005). В наших экспериментальных условиях активация МК-2 на высоком уровне сохранялась в течение длительного времени, что свидетельствовало о вовлеченности этой киназы в H_2O_2 -индуцированное старение эМСК. Как и ожидалось, использование специфических ингибиторов p38 полностью подавляло фосфорилирование МК-2. Таким образом, эти находки дают основание сделать вывод об участии ASK1/p38/МК-2/Rb сигнального пути в реализации программы преждевременного старения в эМСК.

Хотелось бы отметить отдельно тот факт, что ингибирование p38, помимо всех упомянутых выше эффектов, приводило к существенному снижению уровня эндогенных АФК в стареющих эМСК. Такое наблюдение хорошо согласуется с результатами сравнительно недавних исследований, демонстрирующих включение p38 в АФК-зависимый сигналинг, играющий определяющую роль в поддержании состояния клеточного старения (Passos et al., 2010). Правда, авторы объясняли повышенную генерацию эндогенных АФК, необходимых для развития старения, дисфункцией митохондрий, тогда как, с нашей точки зрения, она могла быть опосредована увеличением числа функционально активных митохондрий. Тем не менее, в том и другом случае снижение уровня внутриклеточных АФК в результате ингибирования активности p38 сопровождалось модуляцией основных митохондриальных показателей. В наших экспериментальных условиях использование SB приводило к уменьшению митохондриальной массы, ММП и, соответственно, к снижению уровня митохондриальных пероксидов. Важно подчеркнуть, что в H_2O_2 -обработанных эМСК подавление активности p38 вызывало лишь частичное уменьшение всех перечисленных показателей, в то время как уровень эндогенных АФК падал практически до контрольного значения. На основании этих данных можно говорить о несомненном участии киназы p38 в регуляции уровня эндогенных

АФК в стареющих ЭМСК, которое опосредовалось, по крайней мере частично, изменением функционирования митохондрий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в настоящей работе результаты позволяют представить молекулярный

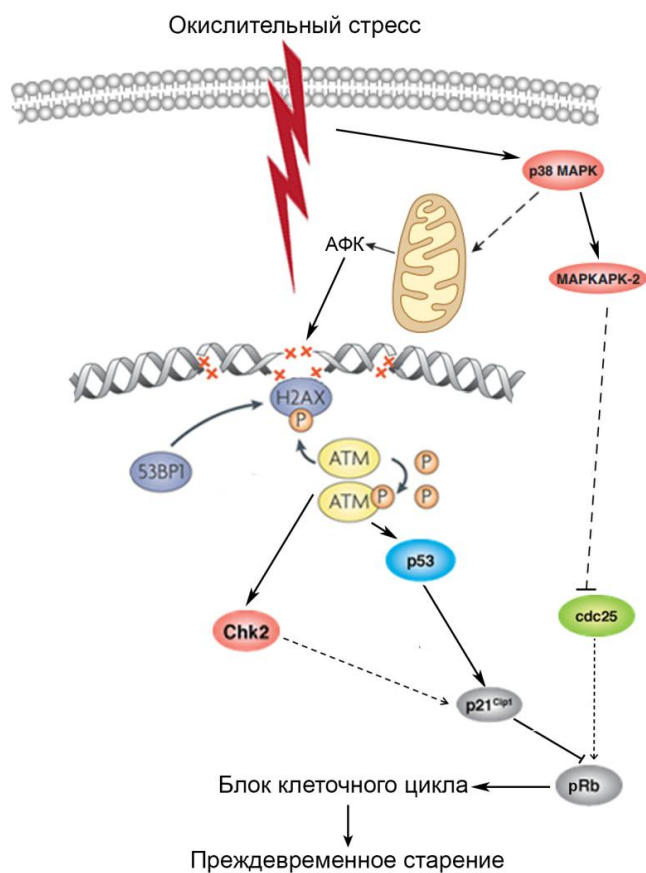


Рис. 72. Молекулярный механизм преждевременного старения ЭМСК в условиях окислительного стресса.

механизм преждевременного старения ЭМСК, как изображено на схеме (рис. 72). Индукция старения в условиях окислительного стресса включает быструю активацию ответа на повреждение ДНК и последующую передачу сигнала через p53/p21/Rb и p38/MK-2/Rb пути, которые требуются для установления необратимого блока клеточного цикла. Дальнейшую стабилизацию старения ЭМСК можно представить в виде петли положительной обратной связи между повышенной продукцией внутриклеточных АФК, частично опосредованной митохондриями, и постоянной активацией DDR. Можно предположить, что пролонгированная индукция p21, как и повышенная активация p38/MARКАРК-2, необходимы для поддержания постоянного пролиферативного блока в стареющих клетках. Кроме того, киназа p38 вовлекается в стабилизацию старения за счет

регуляции как внутриклеточной, так и митохондриальной продукции АФК.

ВЫВОДЫ

1. Сравнение реакций тканеспецифичных и эмбриональных стволовых клеток человека на окислительный стресс, индуцированный действием H_2O_2 , позволило выявить высокую устойчивость эМСК к стрессу по сравнению с ЭСК.
2. H_2O_2 -индуцированный апоптоз, как в эМСК, так и в ЭСК, имеет дозо-зависимый характер и опосредуется активацией каспазы-3 и каспазы-8, однако, динамика апоптоза существенно различается. В ЭСК апоптоз быстро развивался в большей части клеточной популяции, в результате чего эффективно элиминировались поврежденные клетки, тогда как в эМСК апоптоз был слабо выражен и характеризовался очень медленной динамикой.
3. В условиях сублетального окислительного стресса эМСК входят в состояние преждевременного старения, которое характеризуется соответствующими фенотипическими изменениями и необратимой потерей пролиферативного потенциала клеток.
4. Механизм индукции преждевременного старения эМСК включает быструю активацию DDR с участием pATM, $\gamma H2AX$, p53BP1 и передачу сигнала через Chk2/p53/p21/Rb и p38/MAPKAPK-2/Rb пути, приводящие к необратимому блоку клеточного цикла. Стабилизация старения эМСК сопровождается повышенной продукцией эндогенных АФК, которая регулируется активностью p38 и частично опосредуется ростом массы функционально активных митохондрий, что обеспечивает непрерывную активацию ответа на повреждение ДНК, а также перманентное функционирование p53/p21/Rb и p38/MAPKAPK-2/Rb путей.
5. Снижение уровня эндогенных АФК в результате обработки клеток антиоксидантом NAC, а также ингибирования активности p38 MAPK приводит к частичному предотвращению H_2O_2 -индуцированного преждевременного старения эМСК.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева Л.Ю., Тупицин Н.Н., Овумян Г.Ш., Чимишкян К.Л., Птушкин В.В. 1999. Стволовые гемопоэтические клетки крови в онкологических больных: экспрессия CD34 и колониеобразование. Гематология и трансфузия. 44 (4) : 3–6.
2. Анисимов В.Н. 2000. Средства профилактики преждевременного старения (геропротекторы). Успехи геронтологии. 4 : 55–74.
3. Бурова Е.Б., Люблинская О.Г., Шатрова А.Н., Бородкина А.В., Никольский Н.Н. 2012. Сравнительный анализ устойчивости к окислительному стрессу стволовых клеток эндометрия и фибробластов человека. Цитология. 54 (6) : 478–483.
4. Земелько В.И., Гринчук Т.М., Домнина А.П., Арцыбашева И.В., Зенин В.В., Кирсанов А.А., Бичева Н.К., Корсак В.С., Никольский Н.Н. 2011. Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки десквамированного эндометрия. Выделение, характеристика и использование в качестве фидерного слоя для культивирования эмбриональных стволовых линий человека. Цитология. 53 (12) : 919–929.
5. Киселев С.Л., Лагарькова М.А. 2006. Эмбриональные стволовые клетки человека. Природа. 10 : 49–64.
6. Москалев А.А. 2008. Старение и гены. Санкт-Петербург: Наука. 358 с.
7. Мусина Р.А., Белявский А.В., Тарусова О.В., Соловьева Е.В., Сухих Г.Т. 2008. Мезенхимальные стволовые клетки эндометрия, полученные из менструальной крови. Кл. техн. Биол. Мед. 2 : 110–114.
8. Пальцев М.А., Смирнов В.Н., Романов Ю.А., Иванов А.А. 2006. Перспективы использования стволовых клеток в медицине. Вестник Российской академии наук. 76 (2) : 99–111.
9. Саенко Ю.В., Шутов А.М. 2011. Исследование динамики радиационно-индуцированного оксидативного стресса в культуре клеток лейкемии. Медицинские науки. 3 : 30–40.
10. Чертков П.Л., Фриденштейн А.Я. 1977. Клеточные основы кроветворения. Кроветворные клетки-предшественники. Медицина. 274.
11. Abdallah B.M., Haack-Sørensen M., Burns J.S., Elsnab B., Jakob F., Hokland P., Kassem M. 2005. Maintenance of differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene despite [corrected] extensive proliferation. Biochem Biophys Res Commun. 326 : 527–538.
12. Adams J.M. 2003. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. Genes Dev. 17 : 2481–2495.
13. Adams J.M., Cory S. 2007. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. Curr Opin Immunol. 19 : 488–496.

14. Agarwal A., Gupta S., Sharma R.K. 2005. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol.* 3 : 28.
15. Agarwal S., Sohal R.S. 1995. Differential oxidative damage to mitochondrial proteins during aging. *Mech Ageing Dev.* 85 : 55–63.
16. Ahn J., Urist M., Prives C. 2004. The Chk2 protein kinase. *DNA Repair.* 3 : 1039–1047.
17. Alekseenko L.L., Zemelko V.I., Zenin V.V., Pugovkina N.A., Kozhukharova I.V., Kovaleva Z.V., Grinchuk T.M., Fridlyanskaya I.I., Nikolsky N.N. 2012. Heat shock induces apoptosis in human embryonic stem cells but a premature senescence phenotype in their differentiated progeny. *Cell Cycle.* 11 : 3260—3269.
18. Aliouat-Denis C.M., Dendouga N., van den Wyngaert I., Goehlmann H., Steller U., van de Weyer I., van Slycken N., Andries L., Kass S., Luyten W., Janicot M., Vialard J.E. 2005. p53-Independent Regulation of p21Waf1/Cip1 Expression and Senescence by Chk2. *Mol Cancer Res.* 3 : 627–634.
19. Allen R.G., Tresini M., Keogh B.P., Doggett D.L., Cristofalo V.J. 1999. Differences in electron transport potential, antioxidant defenses, and oxidant generation in young and senescent fetal lung fibroblasts (WI-38). *J Cell Physiol.* 180 : 114–122.
20. Aslan J.E., Thomas G. 2009. Death by committee: organellar trafficking and communication in apoptosis. *Traffic.* 10 : 1390—1404.
21. Assady S., Maor G., Amit M., Itskovitz-Eldor J., Skorecki K.L., Tzukerman M. 2001. Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes.* 50 : 1691—1697.
22. Bagley M.C., Davis T., Murziani P.G., Widdowson C.S., Kipling D. 2010. Use of p38 MAPK inhibitors for the treatment of Werner syndrome. *Pharmaceuticals.* 3: 1842–1872.
23. Baharvand H., Ashtiani S.K., Valojerdi M.R., Shahverdi A., Taei A., Sabour D. 2004. Establishment and in vitro differentiation of a new embryonic stem cell line from human blastocyst. *Differentiation.* 72 : 224–229.
24. Bakkenist C.J., Kastan M.B. 2003. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature.* 421 : 499–506.
25. Bakkenist C.J., Kastan M.B. 2004. Initiating Cellular Stress Responses. *Cell.* 118 : 9–17.
26. Balaban R.S., Nemoto S., Finkel T. 2005. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell.* 120 : 483–495.
27. Banfi A., Bianchi G., Notaro R., Luzzatto L., Cancedda R., Quarto R. 2002. Replicative aging and gene expression in long-term cultures of human bone marrow stromal cells. *Tissue Eng.* 8 : 901—910.
28. Barker J.N., Wagner J.E. 2003. Umbilical cord blood transplantation: current practice and future innovations. *Crit Rev Oncol Hematol.* 48 : 35–43.

29. Bartkova J., Horejsi Z., Koed K., Kramer A., Tort F., Zieger K., Guldberg P., Sehested M., Nesland J.M., Lukas C., Orntoft T., Lukas J., Bartek J. 2005. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*. 434 : 864–870.
30. Bavik C., Coleman I., Dean J.P., Knudsen B., Plymate S., Nelson P.S. 2006. The gene expression program of prostate fibroblast senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through paracrine mechanisms. *Cancer Res*. 66 : 794–802.
31. Baxter M.A., Wynn R.F., Jowitt S.N., Wraith J.E., Fairbairn L.J., Bellantuono I. 2004. Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells*. 22 : 675–682.
32. Beauséjour C.M., Krtolica A., Galimi F., Narita M., Lowe S.W., Yaswen P., Campisi J. 2003. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J*. 22 : 4212–4222.
33. Becker A.J., McCulloch E.A., Till J.E. 1963. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*. 197 : 452–454.
34. Bellantuono I. 2004. Haemopoietic stem cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 36 : 607–620.
35. Ben-Porath I., Weinberg R.A. 2004. When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence. *J Clin Invest*. 113 : 8–13.
36. Best S.M. 2008. Viral subversion of apoptotic enzymes: escape from death row. *Annu Rev Microbiol*. 62 : 171–192.
37. Blackburn E.H., Gall J.G. 1978. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J Mol Biol*. 120 : 33–53.
38. Blagosklonny M.V. 2012. Cell cycle arrest is not yet senescence, which is not just cell cycle arrest: terminology for TOR-driven aging. *Aging*. 4 : 159—165.
39. Blander G., de Oliveira R.M., Conboy C.M., Haigis M., Guarente L. 2003. Superoxide dismutase 1 knock-down induces senescence in human fibroblasts. *J Biol Chem*. 278 : 38966–38969.
40. Bokeria L., Bogin V., Bokeria O., Le T., Alekryan B., Woods E.J., Brown A.A., Ichim T.E., Patel A.N. 2013. Endometrial regenerative cells for treatment of heart failure: a new stem cells in clinic. *J Transl Med*. 11: 56.
41. Bond J.A., Wyllie F.S., Wynford-Thomas D. 1994. Escape from senescence in human diploid fibroblasts induced directly by mutant p53. *Oncogene*. 9 : 1885–1889.
42. Borodkina A., Shatrova A., Abushik P., Nikolsky N., Burova E. 2014. Interaction between ROS dependent DNA damage, mitochondria and p38 MAPK underlies senescence of human adult stem cells. *Aging*. 6 : 481–495.

43. *Bose S., French S., Evans F.J., Joubert F., Balaban R.S. 2003.* Metabolic network control of oxidative phosphorylation: multiple roles of inorganic phosphate. *J Biol. Chem* 278 : 39155–39165.
44. *Bowen I.D., Bowen S.M. 1990.* Mechanisms of programmed cell death. *Programmed Cell Death in Tumors and Tissues*. Chapman and Hall, London, UK. p. 57–61.
45. *Bradford M.M. 1976.* A rapid and sensitive method for the quantification microgram quantites of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem.* 72 : 248–254.
46. *Bragado P., Armesilla A., Silva A., Porras A. 2007.* Apoptosis by cisplatin requires p53 mediated p38 α MAPK activation through ROS generation. *Apoptosis.* 12 : 1733–1742.
47. *Brand M.D., Affourtit C., Esteves T.C., Green K., Lambert A.J., Miwa S., Pakay J.L., Parker N. 2004.* Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med.* 37 : 755–767.
48. *Brandl A., Hartmann A., Bechmann V., Graf B., Nerlich M., Angele P. 2011a.* Oxidative stress induces senescence in chondrocytes. *J Orthop Res.* 29 : 1114–1120.
49. *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.
50. *Brown J.P., Wei W., Sedivy J.M. 1997.* Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science.* 277 : 831–834.
51. *Bulavin D.V., Phillips C., Nannenga B., Timofeev O., Donehower L.A., Anderson C.W., Appella E., Fornace A.J. Jr. 2004.* Inactivation of the Wip1 phosphatase inhibits mammary tumorigenesis through p38 MAPK-mediated activation of the p16(Ink4a)-p19(Arf) pathway. *Nat Genet.* 36 : 343–350.
52. *Burma S., Chen B.P., Murphy M., Kurimasa A., Chen D.J. 2001.* ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem.* 276 : 42462–42467.
53. *Burova E., Borodkina A., Shatrova A., Nikolsky N. 2013.* Sublethal oxidative stress induces the premature senescence of human mesenchymal stem cells derived from endometrium. *Oxid Med Cell Longev.* 2013 : 474931.
54. *Buscemi G., Perego P., Carenini N., Nakanishi M., Chessa L., Chen J., Khanna K., Delia D. 2004.* Activation of ATM and Chk2 kinases in relation to the amount of DNA strand breaks. *Oncogene.* 23 : 7691–7700.
55. *Campisi J. 2005.* Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbours. *Cell.* 120 : 513–522.
56. *Campisi J., d'Adda di Fagagna F. 2007.* Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8 : 729–740.

57. Casteilla L., Rigoulet M., Penicaud L. 2001. Mitochondrial ROS metabolism: modulation by uncoupling proteins. *IUBMB*. 52 : 181–188.
58. Cervelló I., Mas A., Gil-Sanchis C., Simón C. 2013. Somatic stem cells in the human endometrium. *Semin Reprod Med*. 31 : 69–76.
59. Chan R.W., Schwab K.E., Gargett C.E. 2004. Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells. *Biol Reprod*. 70 : 1738–1750.
60. Chen J., Shi Z., Ji X., Morales J., Zhang J., Kaur N., Wang S. 2013. Enhanced osteogenesis of human mesenchymal stem cells by periodic heat shock in self-assembling peptide hydrogel. *Tissue Eng Part A*. 19 : 716–728.
61. Chen Q., Ames B.N. 1994. Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc Natl Acad Sci*. 91 : 4130–4134.
62. Chen Q., Vazquez E.J., Moghaddas S., Hoppel C.L., Lesnfsky E.J. 2003. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem*. 278 : 36027–36031.
63. Chen Q.M., Bartholomew J.C., Campisi J., Acosta M., Reagan J.D., Ames B.N. 1998. Molecular analysis of H₂O₂-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication. *Biochem J*. 332 : 43–50.
64. Chen Q.M., Fischer A., Reagan J.D., Yan L.J., Ames B.N. 1995. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci*. 92 : 4337–4341.
65. Chen Z., Gibson T.B., Robinson F., Silvestro L., Pearson G., Xu B., Wright A., Vanderbilt C., Cobb M.H. 2001. MAP kinases. *Chem Rev*. 101 : 2449–2476.
66. Cho N.H., Park Y.K., Kim Y.T., Yang H., Kim S.K. 2004. Lifetime expression of stem cell markers in the uterine endometrium. *Fertil Steril*. 81 : 403–407.
67. Choi M.J., Kim H.Y., Cho E.J. 2012. Anti-aging effect of black rice against H₂O₂-induced premature senescence. *J of Med Plant Res*. 6 : 3672–3680.
68. Choi M.R., Han D.M.R., Kim S.H., Ohn T., Jung K.H., Chai Y.G. 2014. Resveratrol relieves hydrogen peroxide-induced premature senescence associated with SIRT1 in human mesenchymal stem cells. *Mol Cel Toxicol*. 10 : 29–39.
69. Clapp N.K., Satterfield L.C., Bowles N.D. 1979. Effects of the antioxidant butylated hydroxytoluene (BHT) on mortality in BALB/c mice. *J Gerontol*. 34 : 497–501.
70. Cmielova J., Havelek R., Soukup T., Jiroutova A., Visek B., Suchanek J., Vavrova J., Mokry J., Muthna D., Bruckova L., Filip S., English D., Rezacova M. 2012. Gamma radiation induces senescence in human adult mesenchymal stem cells from bone marrow and periodontal ligaments. *Int J Radiat. Biol*. 88 : 393–404.

71. Colavitti R., Finkel T. 2005. Reactive oxygen species as mediators of cellular senescence. *IUBMB Life*. 57 : 277—281.
72. Coller H.A., Sang L., Roberts J.M. 2006. A new description of cellular quiescence. *PLoS Biol*. 4 : e83.
73. Cui C.H., Uyama T., Miyado K., Terai M., Kyo S., Kiyono T., Umezawa A. 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.
74. d'Adda di Fagagna F. 2008. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat Rev Cancer*. 8 : 512–522.
75. d'Adda di Fagagna F., Reaper P.M., Clay-Farrace L., Fiegler H., Carr P., von Zglinicki T., Saretzki G., Carter N.P., Jackson S.P. 2003. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*. 426 : 194–198.
76. Das S., Chattopadhyay R., Ghosh S., Ghosh S., Goswami S.K., Chakravarty B.N., Chaudhury K. 2006. Reactive oxygen species level in follicular fluid - embryo quality marker in IVF? *Hum Reprod*. 21 : 2403–2407.
77. da Silva Meirelles L., Chagastelles P.C., Nardi N.B. 2006. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*. 119 : 2204–2213.
78. Davies S.M., Poljak A., Duncan M.W., Smythe G.A., Murphy M.P. 2001. Measurements of protein carbonyls, ortho- and meta-tyrosine and oxidative phosphorylation complex activity in mitochondria from young and old rats. *Free Radic Biol Med*. 31 : 181–190.
79. Davis T., Baird D.M., Haughton M.F., Jones C.J., Kipling D. 2005. Prevention of accelerated cell aging in Werner syndrome using a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor. *J Gerontol*. 60 : 1386–1393.
80. Dayem A.A., Choi H.Y., Kim J.H., Cho S.G. 2010. Role of oxidative stress in stem, cancer, and cancer stem cells. *Cancers (Basel)*. 2 : 859–884.
81. Debacq-Chainiaux F., Boilan E., Dedessus Le Moutier J., Weemaels G., Toussaint O. 2010. p38 (MAPK) in the senescence of human and murine fibroblasts. *Adv Exp Med Biol*. 694:126–137.
82. Debacq-Chainiaux F., Erusalimsky J.D., Campisi J., Toussaint O. 2009. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc*. 4 : 1798–1806.
83. De Bari C., Dell'Accio F., Tylzanowski P., Luyten F.P. 2001. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum*. 44 : 1928–1942.

84. *De Bruyn C., Delforge A., Langneaux L., Bron D. 2000.* Characterization of CD34+ subsets derived from bone marrow, umbilical cord blood and mobilized peripheral blood after stem cell factor and interleukin 3 stimulation. *Bone Marrow Transplant.* 25 : 377–383.
85. *Demidenko Z.N., Zubova S.G., Bukreeva E.I., Pospelov V.A., Pospelova T.V., Blagosklonny M.V. 2009.* Rapamycin decelerates cellular senescence. *Cell Cycle.* 8 : 1888—1895.
86. *Di Filippo C., Cuzzocrea S., Rossi F., Marfella R., D'Amico M. 2006.* Oxidative stress as the leading cause of acute myocardial infarction in diabetics. *Cardiovasc Drug Rev.* 24 : 77—87.
87. *Digirolamo C.M., Stokes D., Colter D., Phinney D.G., Class R., Prockop D.J. 1999.* Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol.* 107 : 275—281.
88. *Di Micco R., Fumagalli M., Cicalese A., Piccinin S., Gasparini P., Luise C., Schurra C., Garre' M., Nuciforo P.G., Bensimon A., Maestro R., Pelicci P.G., d'Adda di Fagagna F. 2006.* Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyperreplication. *Nature.* 444 : 638–642.
89. *Dimri G., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E., Linskens M., Rubelj I., Pereira-Smith O., Peacocke M., Campisi J. 1995.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Nat Acad Sci.* 92 : 9363—9367.
90. *Ditch S., Paull T.T. 2012.* The ATM protein kinase and cellular redox signaling: beyond the DNA damage response. *Trends Biochem Sci.* 37 : 15—22.
91. *Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop Dj., Horwitz E. 2006.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells: the International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 8 : 315–317.
92. *Downey M., Durocher D. 2006.* γ H2AX as a checkpoint maintenance signal. *Cell Cycle.* 5 : 1376–1381.
93. *Druzhyna N.M., Wilson G.L., LeDoux S.P. 2008.* Mitochondrial DNA repair in aging and disease. *Mech Ageing Dev.* 129 : 383–390.
94. *Duan J., Zhang Z., Tong T. 2005.* Irreversible cellular senescence induced by prolonged exposure to H₂O₂ involves DNA-damage- and-repair genes and telomere shortening. *Int J Biochem Cell Biol.* 37 : 1407—1420.
95. *Dumitru R., Gama V., Fagan B.M., Bower J.J., Swahari V., Pevny L.H., Deshmukh M. 2012.* Human embryonic stem cells have constitutively active Bax at the Golgi and are primed to undergo rapid apoptosis. *Mol Cell.* 46 : 573–583.

96. Dumont P., Burton M., Chen Q.M., Gonos E.S., Frippiat C., Mazarati J.B., Eliaers F., Remacle J., Toussaint O. 2000. Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free Rad Biol Med.* 28 : 361—373.
97. Ehtay K.S., Roussel D., St-Pierre J., Jekabsons M.B., Cadenas S., Stuart J.A., Harper J.A., Roebuck S.J., Morrison A., Pickering S., Clapham J.C., Brand M.D. 2002. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature.* 415 : 96–99.
98. Erices A., Conget P., Minguell J.J. 2000. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol.* 109 : 235–242.
99. Ertas G., Ural E., Ural D., Aksoy A., Kozdag G., Gacar G., Karaöz E. 2012. Comparative analysis of apoptotic resistance of mesenchymal stem cells isolated from human bone marrow and adipose tissue. *Scientific World Journal.* 2012 : 105698.
100. Estany S., Palacio J.R., Barnadas R., Sabes M., Iborra A., Martínez P. 2007. Antioxidant activity of N-acetylcysteine, flavonoids and alpha-tocopherol on endometrial cells in culture. *J Reprod Immunol.* 75 : 1–10.
101. Evans M.J., Kaufman M.H. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 292 : 154–156.
102. Fairchild P.J., Cartland S., Nolan K.F., Waldmann H. 2004. Embryonic stem cells and the challenge of transplantation tolerance. *Trends Immunol.* 25 : 465–470.
103. Fan T.J., Han L.H., Cong R.S., Liang J. 2005. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin.* 37 : 719—727.
104. Fernandez-Capetillo O., Celeste A., Nussenzweig A. 2003. Focusing on foci: H2AX and the recruitment of DNA-damage response factors. *Cell Cycle.* 2 : 426–427.
105. Ferrari G., Cusella-De Angelis G., Coletta M., Paolucci E., Stornaiuolo A., Cossu G., Mavilio F. 1998. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science.* 279 : 1528-1530.
106. Fillion T.M., Qiao M., Ghule P.N., Mandeville M., van Wijnen A.J., Stein J.L., Lian J.B., Altieri D.C., Stein G.S. 2009. Survival responses of human embryonic stem cells to DNA damage. *J Cell Physiol.* 220 : 586—592.
107. Firsanov D.V., Solovjeva L.V., Svetlova M.P. 2011. H2AX phosphorylation at the sites of DNA double-strand breaks in cultivated mammalian cells and tissues. *Clin Epigenetics.* 2 : 283–297.
108. Fischbach G.D., Fischbach R.L. 2004. Stem cells: science, policy, and ethics. *J Clin Invest.* 14 : 1364–1370.
109. Forsyth N.R., Evans A.P., Shay J.W., Wright W.E. 2003. Developmental differences in the immortalization of lung fibroblasts by telomerase. *Aging Cell.* 2 : 235–243.

110. Fortier L.A. 2005. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Vet Surg.* 34 : 415–423.
111. Foster L.J., Zeemann P.A., Li C., Mann M., Jensen O.N., Kassem M. 2005. Differential expression profiling of membrane proteins by quantitative proteomics in a human mesenchymal stem cell line undergoing osteoblast differentiation. *Stem Cells.* 23 : 1367–1377.
112. Frippiat C., Chen Q.M., Remacle J., Toussaint, O. 2000. Cell cycle regulation in H₂O₂-induced premature senescence of human diploid fibroblasts and regulatory control exerted by the papilloma virus E6 and E7 proteins. *Exp Gerontol.* 35 : 733 – 745.
113. Frippiat C., Chen Q.M., Zdanov S., Magalhaes J.P., Remacle J., Toussaint O. 2001. Subcytotoxic H₂O₂ stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts. *J Biol Chem.* 276 : 2531—2537.
114. Gargett C.E. 2007. Uterine stem cells: what is the evidence? *Hum Reprod Update.* 13 : 87–101.
115. Gargett C.E., Nguyen H.P., Ye L. 2012. Endometrial regeneration and endometrial stem/progenitor cells. *Rev Endocr Metab Disord.* 13 : 235–251.
116. Gianni P., Jan K.J., Douglas M.J., Stuart P.M., Tarnopolsky M.A. 2004. Oxidative stress and the mitochondrial theory of aging in human skeletal muscle. *Exp Gerontol.* 39 : 1391—1400.
117. Gilgun-Sherki Y., Melamed E., Offen D. 2004. The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: the need for effective antioxidant therapy. *J Neurol.* 251 : 261–268.
118. Giorgio M., Trinei M., Migliaccio E., Pelicci P.G. 2007. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8 : 722–728.
119. Gire V., Roux P., Wynford-Thomas D., Brondello J. M., Dulic V. 2004. DNA damage checkpoint kinase Chk2 triggers replicative senescence. *EMBO J.* 23 : 2554–2563.
120. Gorgoulis V.G., Vassiliou L.V., Karakaidos P., Zacharatos P., Kotsinas A., Liloglou T., Venere M., Ditullio R.A. Jr, Kastrinakis N.G., Levy B., Kletsas D., Yoneta A., Herlyn M., Kittas C., Halazonetis T.D. 2005. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature.* 434:907–913.
121. Grandela C., Pera M.F., Grimmond S.M., Kolle G., Wolvetang E.J. 2007. p53 is required for etoposide-induced apoptosis of human embryonic stem cells. *Stem Cell Res.* 1 : 116—128.

122. *Gronthos S., Mankani M., Brahimi J., Robey P.G., Shi S. 2000.* Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci.* 97 : 13625–13630.
123. *Grudzenski S., Rath S., Conrad S., Rübe C., Löbrich M. 2010.* Inducible response required for repair of low-dose radiation damage in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci.* 107 : 14205–14210.
124. *Guo H., Liu Z., Xu B., Hu H., Wei Z., Liu Q., Zhang X., Ding X., Wang Y., Zhao M., Gong Y. Shao C. 2013.* Chemokine receptor CXCR2 is transactivated by p53 and induces p38-mediated cellular senescence in response to DNA damage. *Aging Cell.* 12 : 1110–11121.
125. *Gupta S., Ghulmiyyah J., Sharma R., Halabi J., Agarwal A. 2014.* Power of proteomics in linking oxidative stress and female infertility. *Biomed Res Int.* 2014 : 916212.
126. *Guyton K.Z., Liu Y., Gorospe M., Xu Q., Holbrook N.J. 1996.* Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem.* 271 : 4138–4142.
127. *Han J., Sun P. 2007.* The pathways to tumor suppression via route p38. *Trends Biochem Sci.* 32 : 364–371.
128. *Han X., Meng X., Yin Z., Rogers A., Zhong J., Rillema P., Jackson J.A., Ichim T.E., Minev B., Carrier E., Patel A.N., Murphy M.P., Min W.P., Riordan N.H. 2009.* Inhibition of intracranial glioma growth by endometrial regenerative cells. *Cell Cycle.* 8 : 606–610.
129. *Haq R., Brenton J.D., Takahashi M., Finan D., Finkelsztejn A., Damaraju S., Rottapel R., Zanke B. 2002.* Constitutive p38HOG mitogen-activated protein kinase activation induces permanent cell cycle arrest and senescence. *Cancer Res.* 62 : 5076–5082.
130. *Hara E., Smith R., Parry D., Tahara H., Stone S., Peters G. 1996.* Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol Cell Biol.* 16 : 859—867.
131. *Harbo M., Koelvraa S., Serakinci N., Bendix L. 2012.* Telomere dynamics in human mesenchymal stem cells after exposure to acute oxidative stress. *DNA Repair (Amst).* 11 : 774—779.
132. *Harman D. 1994.* Free-radical theory of aging. Increasing the functional life span. *Ann NY Acad Sci.* 717 : 1—15.
133. *Harman D. 1956.* Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 11 : 298–300.
134. *Hay D.C., 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.

135. Hayflick L., Moorhead P.S. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 25 : 585—621.
136. Heins N., Englund M.C., Sjöblom C., Dahl U., Tønning A., Bergh C., Lindahl A., Hanson C., Semb H. 2004. Derivation, characterization, and differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 22 : 367—376.
137. Herbig U., Ferreira M., Condel L., Carey D., Sedivy J.M. 2006. Cellular senescence in aging primates. *Science.* 311 : 1257.
138. Herbig U., Sedivy J. M. 2006. Regulation of growth arrest in senescence: telomere damage is not the end of the story. *Mech Ageing Develop.* 127 : 16—24.
139. Herzog E.L., Chai L., Krause D.S. 2003. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood.* 102 : 3483—3493.
140. Hida N., Nishiyama N., Miyoshi S., Kira S., Segawa K., Uyama T., Mori T., Miyado K., Ikegami Y., Cui C., Kiyono T., Kyo S., Shimizu T., Okano T., Sakamoto M., Ogawa S., Umezawa A. 2008. Novel cardiac precursor-like cells from human menstrual blood-derived mesenchymal cells. *Stem Cells.* 26 : 1695—1704.
141. Hronik-Tupaj M., Rice W.L., Cronin-Golomb M., Kaplan D.L., Georgakoudi I. 2011. Osteoblastic differentiation and stress response of human mesenchymal stem cells exposed to alternating current electric fields. *Biomed Eng Online.* 10 : 9.
142. Hua P., Liu L.B., Liu J.L., Wang M., Jiang H.Q., Zeng K., Yang Y.Q., Yang S.R. 2013. Inhibition of apoptosis by knockdown of caspase-3 with siRNA in rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood).* 238 : 991—998.
143. Huang C., Ma W.Y., Maxiner A., Sun Y., Dong Z. 1999. p38 kinase mediates UV-induced phosphorylation of p53 protein at serine 389. *J Biol Chem.* 274 : 12229—12235.
144. Hutter E., Renner K., Pfister G., Stöckl P., Jansen-Dürr P., Gnaiger E. 2004. Senescence-associated changes in respiration and oxidative phosphorylation in primary human fibroblasts. *Biochem J.* 380 : 919—928.
145. Hwang O. 2013. Role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Exp Neurobiol.* 22 : 11—17.
146. Ichim T.E., Alexandrescu D.T., Solano F., Lara F., Campion Rde N., Paris E., Woods E.J., Murphy M.P., Dasanu C.A., Patel A.N., Marleau A.M., Leal A., Riordan N.H. 2010. Mesenchymal stem cells as anti-inflammatories: implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Cell Immunol.* 260 : 75—82.
147. Ishikawa F. 2006. Cellular senescence as a stress response. *Cornea.* 25 : 3—6.

148. Ito K., Hirao A., Arai F., Takubo K., Matsuoka S., Miyamoto K., Ohmura M., Naka K., Hosokawa K., Ikeda Y., Suda T. 2006. Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat Med.* 12 : 446–451.
149. Iwasa H., Han J., Ishikawa F. 2003. Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway. *Genes Cells.* 8 :131–144.
150. Jabbour H.N., Kelly R.W., Fraser H.M., Critchley H.O. 2006. Endocrine regulation of menstruation. *Endocr Rev.* 27 : 17–46.
151. Joubert F., Fales H.M., Wen H., Combs C.A., Balaban R.S. 2004. NADH enzyme-dependent fluorescence recovery after photobleaching (ED-FRAP): applications to enzyme and mitochondrial reaction kinetics, in vitro. *Biophys J.* 86 : 629–645.
152. Jung M.S., Jin D.H., Chae H.D., Kang S., Kim S.C., Bang Y.J., Choi T.S., Choi K.S., Shin D.Y. 2004. Bcl-xL and E1B-19K proteins inhibit p53-induced irreversible growth arrest and senescence by preventing reactive oxygen species-dependent p38 activation. *J Biol Chem.* 279 : 17765–17771.
153. Jurk D., Wang C., Miwa S., Maddick M., Korolchuk V., Tsolou A., Gonos E.S., Thrassivoulou C., Saffrey M.J., Cameron K., von Zglinicki T. 2012. Postmitotic neurons develop a p21-dependent senescence-like phenotype driven by a DNA damage response. *Aging Cell.* 11 : 996–1004.
154. Kahlem P., Dorken B., Schmitt C.A. 2004. Cellular senescence in cancer treatment: friend or foe? *J Clin Invest.* 113 : 169–174.
155. Kao C.L., Chen L.K., Chang Y.L., Yung M.C., Hsu C.C., Chen Y.C., Lo W.L., Chen S.J., Ku H.H., Hwang S.J. 2010. Resveratrol protects human endothelium from H₂O₂-induced oxidative stress and senescence via SirT1 activation. *J Atheroscler Thromb.* 17 : 970–979.
156. Karlseder J., Smogorzewska A., de Lange T. 2002. Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. *Science.* 295 : 2446–2449.
157. Katiyar S.K., Afaq F., Perez A., Mukhtar H. 2001. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate treatment of human skin inhibits ultraviolet radiation-induced oxidative stress. *Carcinogenesis.* 22 : 287–294.
158. Keating A. 2006. Mesenchymal stromal cells. *Curr Opin Hematol.* 13 : 419–425.
159. Kerr J.F., Harmon B.V. 1991. Definition and incidence of apoptosis: an historical perspective. *Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death.* Edited by LD Tomei and FO Cope. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. p. 5–29.
160. Kerr J.F., Winterford C.M., Harmon B.V. 1994. Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer.* 73 : 2013–2026.

161. Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 26 : 239–257.
162. Kim J.S., Kim E.J., Kim H.J., Yang J.Y., Hwang G.S., Kim C.W. 2011. Proteomic and metabolomic analysis of H₂O₂-induced premature senescent human mesenchymal stem cells. *Exp Gerontol*. 46 : 500–510.
163. Kim S.K., Kim B.K., Shim J.H., Gil J.E., Yoon Y.D., Kim J.H. 2006. Nonylphenol and octylphenol-induced apoptosis in human embryonic stem cells is related to Fas-Fas ligand pathway. *Toxicol Sci*. 94 : 310–321.
164. Kischkel F.C., Hellbardt S., Behrmann I., Germer M., Pawlita M., Krammer P.H., Peter M.E. 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J*. 14 : 5579–5588.
165. Kishi H., Nakagawa K., Matsumoto M., Suga M., Ando M., Taya Y., Yamaizumi M. 2001. Osmotic shock induces G1 arrest through p53 phosphorylation at Ser33 by activated p38 MAPK without phosphorylation at Ser15 and Ser20. *J Biol Chem*. 276 : 39115–39122.
166. Ko E., Lee K.Y., Hwang D.S. 2012. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells undergo cellular senescence in response to oxidative stress. *Stem Cells Develop*. 21 : 1877–1886.
167. Kodama R., Kato M., Furuta S., Ueno S., Zhang Y., Matsuno K., Yabe-Nishimura C., Tanaka E., Kamata T. 2013. ROS-generating oxidases Nox1 and Nox4 contribute to oncogenic Ras-induced premature senescence. *Genes Cells*. 18 : 32–41.
168. Koh L.P., Chao N.J. 2004. Umbilical cord blood transplantation in adults using myeloablative and nonmyeloablative preparative regimens. *Biol Blood Marrow Transplant*. 10 : 1–22.
169. Koopman G., Reutelingsperger C.P., Kuijten G.A., Keehnen R.M., Pals S.T., van Oers M.H. 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 84 : 1415–1420.
170. Kopen G.C., Prockop D.J., Phinney D.G. 1999. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci*. 96 : 10711–10716.
171. Ksiazek K., Passos J.F., Olijslagers S., Saretzki G., Martin-Ruiz C., von Zglinicki T. 2007. Premature senescence of mesothelial cells is associated with non-telomeric DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun*. 362 : 707–711.
172. Kuo L.J., Yang L.X. 2008. γ -H2AX – A Novel Biomarker for DNA Double-strand Breaks. *In Vivo*. 22 : 305–309.

173. Kurz D.J. 2004. Telomere biology in cardiovascular disease. *Kardiovaskulare Medizin*. 7 : 433—442.
174. Kurz E.U., Lees-Miller S.P. 2004. DNA damage-induced activation of Atm and Atm-dependent signaling pathways. *DNA Repair*. 3 : 889–900.
175. Kurtzberg J., Laughlin M., Graham M.L., Smith C., Olson J.F., Halperin E.C., Ciocchi G., Carrier C., Stevens C.E., Rubinstein P. 1996. Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N Engl J Med*. 335 : 157–166.
176. Kushnareva Y., Murphy A.N., Andreyev A. 2002. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. *Biochem J*. 368 : 545–553.
177. Kuznetsov S.A., Mankani M.H., Gronthos S., Satomura K., Bianco P., Robey P.G. 2001. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol*. 153 : 1133–1140.
178. Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227 : 680–685.
179. Lanza I.R., Nair K.S. 2010. Mitochondrial function as a determinant of life span. *Pflugers Arch*. 459 : 277–289.
180. Larsen S.A., Kassem M., Rattan S.I. 2012. Glucose metabolite glyoxal induces senescence in telomerase-immortalized human mesenchymal stem cells. *Chem Cent J*. 6:18.
181. Laughlin M.J. 2001. Umbilical cord blood for allogeneic transplantation in children and adults. *Bone Marrow Transplant*. 27 : 1–6.
182. Lawless C., Jurk D., Gillespie C.S., Shanley D., Saretzki G., von Zglinicki T., Passos J.F. 2012. A stochastic step model of replicative senescence explains ROS production rate in ageing cell populations. *PLoS ONE* 7 : e32117.
183. Lee A.C., Fenster B.E., Ito H., Takeda K., Bae N.S., Hirai T., Yu Z.X., Ferrans V.J., Howard B.H., Finkel T. 1999. Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *J Biol Chem*. 274 : 7936–7940.
184. Lee C., Cheng W., Chang M., Su Y., Chen C., Hsieh F. 2005. Hypoxia-induced apoptosis in endothelial cells and embryonic stem cells. *Apoptosis*. 10 : 887–894.
185. Lee H.C., Yin P.H., Lu C.Y., Chi C.W., Wei Y.H. 2000. Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. *Biochem J*. 348 : 425–432.
186. Lee J.J., Lee J.H., Ko Y.G., Hong S.I., Lee J.S. 2010. Prevention of premature senescence requires JNK regulation of Bcl-2 and reactive oxygen species. *Oncogene*. 29 : 561–575.

187. Lee J.S., Lee M.O., Moon B.H., Shim S.H., Fornace A.J. Jr, Cha H.J. 2009. Senescent growth arrest in mesenchymal stem cells is bypassed by Wip1-mediated downregulation of intrinsic stress signaling pathways. *Stem Cells*. 27 : 1963–1975.
188. Levenberg S., Golub J.S., Amit M., Itskovitz-Eldor J., Langer R. 2002. Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci*. 99 : 4391–4396.
189. Liang Y., Lin Q., Zhu J., Li X., Fu Y., Zou X., Liu X., Tan H., Deng C., Yu X., Shan Z., Yuan W. 2014. The caspase-8 shRNA-modified mesenchymal stem cells improve the function of infarcted heart. *Mol Cell Biochem*. [Epub ahead of print].
190. Lin Y.J., Zhen Y.Z., Wei J., Liu B., Yu Z.Y., Hu G. 2011. Effects of Rhein lysinate on H₂O₂-induced cellular senescence of human umbilical vascular endothelial cells. *Acta Pharmacol Sin*. 32 : 1246–1252.
191. Liu B., Chen Y., St Clair D.K. 2008. ROS and p53: a versatile partnership. *Free Radic Biol Med*. 44 : 1529–1535.
192. Liu D.H., Chen Y.M., Liu Y., Hao B.S., Zhou B., Wu L., Wang M., Chen L., Wu W.K., Qian X.X. 2011. Rb1 protects endothelial cells from hydrogen peroxide-induced cell senescence by modulating redox status. *Biol Pharm Bull*. 34 : 1072–1077.
193. Liu J.C., Lerou P.H., Lahav G. 2014. Stem cells: balancing resistance and sensitivity to DNA damage. *Trends Cell Biol*. 24 : 268–274.
194. Longo V.D., Mitteldorf J., Skulachev V.P. 2005. Programmed and altruistic ageing. *Nature Rev*. 6 : 866—872.
195. Lopez-Aviles S., Grande M., Gonzalez M., Helgesen A.L., Alemany V., Sanchez-Piris M., Bachs O., Millar J.B., Aligue R. 2005. Inactivation of the Cdc25 phosphatase by the stress-activated Srk1 kinase in fission yeast. *Mol Cell*. 17 : 49–59.
196. Loseva O., Shubbar E., Haghdooost S., Evers B., Helleday T., Harms-Ringdahl M. 2014. Chronic low dose rate ionizing radiation exposure induces premature senescence in human fibroblasts that correlates with up regulation of proteins involved in protection against oxidative stress. *Proteomes*. 2 : 341–362.
197. Lu T., Finkel T. 2008. Free radicals and senescence. *Exp Cell Res*. 314 : 1918–1922.
198. Lukas C., Falck J., Bartkova J., Bartek J., Lukas, J. 2003. Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage. *Nature Cell Biol*. 5 : 255–260.
199. Luo L.Z., Gopalakrishna-Pillai S., Nay S.L., Park S.W., Bates S.E., Zeng X., Iverson L.E., O'Connor T.R. 2012. DNA repair in human pluripotent stem cells is distinct from that in non-pluripotent human cells. *PLoS ONE*. 7 : e30541.

200. *Lyu B.N., Lyu M.B., Ismailov B.I., Ismailov S.B. 2007. Four hypotheses on mitochondria's role in the development and regulation of oxidative stress in the normal state, cell pathology and reversion of tumor cells. Med Hypotheses. 69 : 186–194.*
201. *Ma Y.S., Wu S.B., Lee W.Y., Cheng J.S., Wei Y.H. 2009. Response to the increase of oxidative stress and mutation of mitochondrial DNA in aging. Biochim Biophys Acta. 1790 : 1021–1029.*
202. *Macip S., Igarashi M., Berggren P., Yu J., Lee S.W., Aaronson S.A. 2003. Influence of induced Reactive Oxygen Species in p53-Mediated Cell Fate Decisions. Mol Cell Biol. 23 : 8576–8585.*
203. *Macip S., Igarashi M., Fang L., Chen A., Pan Z.Q., Lee S.W., Aaronson S.A. 2002. Inhibition of p21-mediated ROS accumulation can rescue p21-induced senescence. EMBO J. 21 : 2180–2188.*
204. *Maklashina E., Ackrell B.A. 2004. Is defective electron transport at the hub of aging? Aging Cell. 3 : 21–27.*
205. *Manke I.A., Nguyen A., Lim D., Stewart M.Q., Elia A.E., Yaffe M.B. 2005. MAPKAP kinase-2 is a cell cycle checkpoint kinase that regulates the G2/M transition and S phase progression in response to UV irradiation. Mol Cell. 17 : 37–48.*
206. *Mao G.X., Wang Y., Qiu Q., Deng H.B., Yuan L.G., Li R.G., Song D.Q., Li Y.Y., Li D.D., Wang Z. 2010. Salidroside protects human fibroblast cells from premature senescence induced by H₂O₂ partly through modulating oxidative status. Mech Ageing Dev. 131 : 723–731.*
207. *Mariotti L.G., Pirovano G., Savage K.I., Ghita M., Ottolenghi A., Prise K.M., Schettino G. 2013. Use of the γ -H2AX assay to investigate DNA repair dynamics following multiple radiation exposures. PLoS One. 8 : e79541.*
208. *Martens U.M., Chavez E.A., Poon S.S., Schmoor C., Lansdorp P.M. 2000. Accumulation of short telomeres in human fibroblasts prior to replicative senescence. Exp Cell Res. 256 : 291–299.*
209. *Martin G.R. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci. 78 : 7634–7638.*
210. *Martin I., Grotewiel M.S. 2006. Oxidative damage and age-related functional declines. Mech Ageing Develop. 127 : 411–423.*
211. *Maruyama J., Naguro I., Takeda K., Ichijo H. 2009. Stress-Activated MAP Kinase Cascades in Cellular Senescence. Curr Med Chem. 16 : 1229–1235.*

212. Maximow A.A. 1909. Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere. *Folia Haematologica*. 8 : 125–134.
213. Maynard S., Swistowska A.M., Lee J.W., Liu Y., Liu S.T., Da Cruz A.B., Rao M., de Souza-Pinto N.C., Zeng X., Bohr V.A. 2008. Human embryonic stem cells have enhanced repair of multiple forms of DNA damage. *Stem Cells*. 26 : 2266—2274.
214. McClintock B. 1931. The order of the genes C, Sh and Wx in Zea Mays with reference to a cytologically known point in the chromosome. *Proc Natl Acad Sci*. 17 : 485–491.
215. McClintock B. 1941. The stability of broken ends of chromosomes in Zea Mays. *Genetics*. 26 : 234–282.
216. McConnell B.B., Gregory F.J., Stott F.J., Hara E., Peters G. 1999. Induced expression of p16(INK4a) inhibits both CDK4- and CDK2-associated kinase activity by reassortment of cyclin-CDK inhibitor complexes. *Mol Cell Biol*. 19 : 1981–1989.
217. McCord J.M., Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*. 244 : 6049–6055.
218. Medrano E.E., Im S., Yang F., Abdel-Malek Z.A. 1995. Ultraviolet B light induces G1 arrest in human melanocytes by prolonged inhibition of retinoblastoma protein phosphorylation associated with long-term expression of the p21Waf-1/SDI-1/Cip-1 protein. *Cancer Res*. 55 : 4047—4052.
219. Meier A., Fiegler H., Muñoz P., Ellis P., Rigler D., Langford C., Blasco M.A., Carter N., Jackson S.P. 2007. Spreading of mammalian DNA-damage response factors studied by ChIP-chip at damaged telomeres. *EMBO J*. 26 : 2707–2718.
220. Meng X., Ichim T.E., Zhong J., Rogers A., Yin Z., Jackson J., Wang H., Ge W., Bogin V., Chan K.W., Thébaud B., Riordan N.H. 2007. Endometrial regenerative cells: A novel stem cell population. *J Transl Med*. 5 : 57.
221. Mezey E., Chandross K.J., Harta G. Maki R.A., McKercher S.R. 2000. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science*. 290 : 1779–1782.
222. Mezhir J.J., Advani S.J., Smith K.D., Darga T.E., Poon A.P., Schmidt H., Posner M.C., Roizman B., Weichselbaum R.R. 2005. Ionizing radiation activates late herpes simplex virus 1 promoters via the p38 pathway in tumors treated with oncolytic viruses. *Cancer Res*. 65 : 9479–9484.
223. Minguell J.J., Erices A., Conget P. 2001. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med*. 226 : 507–520.

224. *Miura T., Mattson M.P., Rao M.S. 2004. Cellular lifespan and senescence signaling in embryonic stem cells. Aging Cell. 3 : 333—343.*
225. *Moiseeva O., Deschênes-Simard X., St-Germain E., Igelmann S., Huot G., Cadar A.E., Bourdeau V., Pollak M.N., Ferbeyre G. 2013. Metformin inhibits the senescence-associated secretory phenotype by interfering with IKK/NF- κ B activation. Aging Cell. 2013. 12 : 489—498.*
226. *Murphy M.P., Wang H., Patel A.N., Kambhampati S., Angle N., Chan K., Marleau A.M., Pysznik A., Carrier E., Ichim T.E., Riordan N.H. 2008. Allogeneic endometrial regenerative cells: An «Off the shelf solution» for critical limb ischemia? J Transl Med. 6 : 45.*
227. *Nagori C.B., Panchal S.Y., 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. J Hum Reprod Sci. 4 : 43—48.*
228. *Noda A., Ning Y., Venable S.F., Pereira-Smith O.M., Smith J.R. 1994. Cloning of senescent cell derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. Exp Cell Res. 211 : 90—98.*
229. *Odorico J.S., Kaufman D.S., Thomson J.A. 2001. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. Stem Cells. 19 : 193—204.*
230. *Ogryzko V.V., Hirai T.H., Russanova V.R., Barbie D.A., Howard B.H. 1996. Human fibroblast commitment to a senescence-like state in response to histone deacetylase inhibitors is cell cycle dependent. Mol Cell Biol 16 : 5210—5218.*
231. *Ogryzko V.V., Wong P., Howard B.H. 1997. WAF1 retards S-phase progression primarily by inhibition of cyclin-dependent kinases. Mol Cell Biol. 17 : 4877—4882.*
232. *Oh C.W., Bump E.A., Kim J.S., Janigro D., Mayberg M.R. 2001. Induction of a senescence-like phenotype in bovine aortic endothelial cells by ionizing radiation. Radiat Res. 156 : 232—240.*
233. *Olovnikov A.M. 1973. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. J Theor Biol. 41 : 181—190.*
234. *Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Jakoniuk I., Anderson S. M., Li B., Pickel J., McKay R., Nadal-Ginard B., Bodine D.M., Leri A., Anversa P. 2001. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. Nature 410 : 701—705.*
235. *Otto W.R., Wright N.A. 2011. Mesenchymal stem cells: from experiment to clinic. Fibrogenesis Tissue Repair. 4 : 20.*

236. Oyama Y., Hayashi A., Ueha T., Maekawa K. 1994. Characterization of 2',7'-dichlorofluorescein fluorescence in dissociated mammalian brain neurons: estimation on intracellular content of hydrogen peroxide. *Brain Res.* 635 : 113–117.
237. Packer L., Fuehr K. 1977. Low oxygen concentration extends the lifespan of cultured human diploid cells. *Nature.* 267 : 423–425.
238. Padykula H.A. 1991. Regeneration in the primate uterus: the role of stem cells. *Ann NY Acad Sci.* 622 : 47–56.
239. Panieri E., Gogvadze V., Norberg E., Venkatesh R., Orrenius S., Zhivotovsky B. 2013. Reactive oxygen species generated in different compartments induce cell death, survival, or senescence. *Free Radic Biol Med.* 57 : 176–187.
240. Pansarasa O., Bertorelli L., Vecchiet J., Felzani G., Marzatico F. 1999. Age-dependent changes of antioxidant activities and markers of free radical damage in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med.* 27 : 617–622.
241. Pansarasa O., Castagna L., Colombi B., Vecchiet J., Felzani G., Marzatico F. 2000. Age and sex differences in human skeletal muscle: role of reactive oxygen species. *Free Radic Res.* 33 : 287–293.
242. Park J.Y., Kim M.J., Kim Y.K., Woo J.S. 2011. Ceramide induces apoptosis via caspase-dependent and caspase-independent pathways in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. *Arch Toxicol.* 85 : 1057–1065.
243. Park S.E., Song J.D., Kim K.M., Park Y.M., Kim N.D., Yoo Y.H., Park Y.C. 2007. Diphenyleneiodonium induces ROS-independent p53 expression and apoptosis in human RPE cells. *FEBS Lett.* 581 : 180–186.
244. Passos J.F., Nelson G., Wang C., Richter T., Simillion C., Proctor C.J., Miwa S., Olijslagers S., Hallinan J., Wipat A., Saretzki G., Rudolph K.L., Kirkwood T.B., von Zglinicki T. 2010. Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence *Mol Syst Biol.* 6 : 347.
245. Passos J.F., Saretzki G., Ahmed S., Nelson G., Richter T., Peters H., Wappler I., Birket M.J., Harold G., Schaeuble K., Birch-Machin M.A., Kirkwood T.B., von Zglinicki T. 2007a. Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence. *PLoS Biol.* 5 : e110.
246. Passos J.F., Saretzki G., von Zglinicki T. 2007b. DNA damage in telomeres and mitochondria during cellular senescence: is there a connection? *Nucleic Acids Res.* 35: 7505–7513.
247. Passos J.F., von Zglinicki T., Kirkwood T.B. 2007c. Mitochondria and ageing: winning and losing in the numbers game. *BioEssays.* 29 : 908–917.

248. *Patel A.N., Park E., Kuzman M., Benetti F., Silva F.J., Allickson J.G. 2008.* Multipotent menstrual blood stromal stem cells: isolation, characterization, and differentiation. *Cell Transpl.* 17 : 303–311.
249. *Peng L., Jia Z., Yin X., Zhang X., Liu Y., Chen P., Ma K., Zhou C. 2008.* Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Cartilage, and Adipose Tissue. *Stem Cells Dev.* 17 : 761–773.
250. *Perfettini J.L., Castedo M., Nardacci R., Ciccocanti F., Boya P., Roumier T., Larochette N., Piacentini M., Kroemer G. 2005.* Essential role of p53 phosphorylation by p38 MAPK in apoptosis induction by the HIV-1 envelope. *J Exp Med.* 201 : 279–289.
251. *Persons D.L., Yazlovitskaya E.M., Pelling J.C. 2000.* Effect of extracellular signal-regulated kinase on p53 accumulation in response to cisplatin. *J Biol Chem.* 275 : 35778–35785.
252. *Peter M.E., Krammer P.H. 2003.* The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ.* 10 : 26–35.
253. *Petersen B.E., Bowen W.C., Patrene K.D., Mars W.M., Sullivan A.K., Murase N., Boggs S.S., Greenberger J.S., Goff J.P. 1999.* Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science.* 284 : 1168–1170.
254. *Petrini J.H., Stracker T.H. 2003.* The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators. *Trends Cell Biol.* 13 : 458–462.
255. *Piccoli C., Ria R., Scrima R., Cela O., D'Aprile A., Boffoli D., Falzetti F., Tabilio A., Capitanio N. 2005.* Characterization of mitochondrial and extra-mitochondrial oxygen consuming reactions in human hematopoietic stem cells. Novel evidence of the occurrence of NAD(P)H oxidase activity. *J Biol Chem.* 280 : 26467–26476.
256. *Pilch D.R., Sedelnikova O.A., Redon C., Celeste A., Nussenzweig A., Bonner W.M. 2003.* Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand breaks sites. *Biochem Cell Biol.* 81 : 123–129.
257. *Polyak K., Xia Y., Zweier J.L., Kinzler K.W., Vogelstein B. 1997.* A model for p53-induced apoptosis. *Nature.* 389 : 300 – 305.
258. *Prendergast A.M., Cruet-Hennequart S., Shaw G., Barry F.P., Carty M.P. 2011.* Activation of DNA damage response pathways in human mesenchymal stem cells exposed to cisplatin or γ -irradiation. *Cell Cycle.* 10 : 3768–3777.
259. *Prianishnikov V.A. 1978.* On the concept of stem cell and a model of functional-morphological structure of the endometrium. *Contraception.* 18 : 213–223.
260. *Probin V., Wang Y., Bai A., Zhou D. 2006.* Busulfan selectively induces cellular senescence but not apoptosis in WI38 fibroblasts via a p53-independent but extracellular

- signal-regulated kinase - p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. *J Pharmacol Exp Ther.* 319 : 551–560.
261. *Probin V., Wang Y., Zhou D. 2007.* Busulfan-induced senescence is dependent on ROS production upstream of the MAPK pathway. *Free Radic Biol Med.* 42 : 1858–1865.
 262. *Prusa A.R., Marton E., Rosner M., Bernaschek G., Hengstschläger M. 2003.* Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research? *Hum Reprod.* 18 : 1489–1493.
 263. *Purrucker J.C., Fricke A., Ong M.F., Rübe C., Rübe C.E., Mahlknecht U. 2010.* HDAC inhibition radiosensitizes human normal tissue cells and reduces DNA double-strand break repair capacity. *Oncol Rep.* 23 : 263–269.
 264. *Radi R., Turrens J.F., Chang L.Y., Bush K.M., Crapo J.D., Freeman B.A. 1991.* Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J Biol Chem.* 266 : 22028–22034.
 265. *Raff M.C. 1994.* Cell death genes: *Drosophila* enters the field. *Science.* 264 : 668–683.
 266. *Rai P., Onder T.T., Young J.J., McFaline J.L., Pang B., Dedon P.C., Weinberg R.A. 2008.* Continuous elimination of oxidized nucleotides is necessary to prevent rapid onset of cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci.* 106 : 169–174.
 267. *Raman M., Chen W., Cobb M.H. 2007.* Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene.* 26 : 3100–3012.
 268. *Rambhatla L., Chiu C.P., Kundu P., Peng Y., Carpenter M.K. 2003.* Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells. *Cell Transplant.* 12 : 1–11.
 269. *Ramsey M.R., Sharpless N.E. 2006.* ROS as tumour suppressor? *Nat Cell Biol.* 8 : 1213–1215.
 270. *Razvi E.S., Welsh R.M. 1995.* Apoptosis in viral infections. *Adv Virus Res.* 49 : 1–60.
 271. *Reinhardt H.C., Aslanian A.S., Lees J.A. Yaffe M.B. 2007.* p53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage. *Cancer Cell.* 11 : 175–189.
 272. *Reinhardt H.C., Cannell I.G., Morandell S., Yaffe M.B. 2011.* Is post-transcriptional stabilization, splicing and translation of selective mRNAs a key to the DNA damage response? *Cell Cycle.* 10 : 23–27.
 273. *Richter T., von Zglinicki T. 2007.* A continuous correlation between oxidative stress and telomere shortening in fibroblasts. *Exp Gerontol.* 42 : 1039–1042.
 274. *Riedl S.J., Shi Y. 2004.* Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5 : 897–907.

275. Robles S.J., Adami G.R. 1998. Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16(INK4A) enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene*. 16 : 1113–1123.
276. Rosler E.S., Fisk G.J., Ares X., Irving J., Miura T., Rao M.S., Carpenter M.K. 2004. Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Dev Dyn*. 229 : 259–274.
277. Roux P.P., Blenis J. 2004. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev*. 68 : 320–344.
278. Saito K., Yoshioka H., Cutler R.G. 1998. A spin trap, N-tert-butyl-alpha-phenylnitron extends the life span of mice. *Biosci Biotechnol Biochem*. 62 : 792–794.
279. Sanchez-Prieto R., Rojas J.M., Taya Y., Gutkind J.S. 2000. A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in the transcriptional activation of p53 on genotoxic stress by chemotherapeutic agents. *Cancer Res*. 60 : 2464–2472.
280. Sanchez-Ramos J.R., Song S., Kamath S.G., Zigova T., Willing A., Cardozo-Pelaez F., Stedeford T., Chopp M., Sanberg P.R. 2001. Expression of neural markers in human umbilical cord blood. *Exp Neurol*. 171 : 109–115.
281. Sang L., Collier H.A., Roberts J.M. 2008. Control of the reversibility of cellular quiescence by the transcriptional repressor HES1. *Science*. 321 : 1095–1100.
282. Santilli G., Lamorte G., Carlessi L., Ferrari D., Rota Nodari L., Binda E., Delia D., Vescovi A.L., De Filippis L. 2010. Mild hypoxia enhances proliferation and multipotency of human neural stem cells. *PLoS One*. 5 : e8575.
283. Saretzki G., Murphy M.P., von Zglinicki T. 2003. MitoQ counteracts telomere shortening and elongates lifespan of fibroblasts under mild oxidative stress. *Aging Cell*. 2 : 141–143.
284. Saretzki G., Walter T., Atkinson S., Passos J.F., Bareth B., Keith W.N., Stewart R., Hoare S., Stojkovic M., Armstrong L., von Zglinicki T., Lako M. 2008. Downregulation of multiple stress defense mechanisms during differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 26 : 455–464.
285. Scaife R.M. 2005. Selective and irreversible cell cycle inhibition by diphenyleneiodonium. *Mol Cancer Ther*. 4 : 876–884.
286. Schlame M., Rua D., Greenberg M.L. 2000. The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Prog Lipid Res*. 39 : 257–288.
287. Schulz T.C., Palmarini G.M., Noggle S.A., Weiler D.A., Mitalipova M.M., Condie B.G. 2003. Directed neuronal differentiation of human embryonic stem cells. *BMC Neurosci*. 4 : 27.

288. Schulz V.P., Zakian V.A., Ogburn C.E., McKay J., Jarzebowicz A.A., Edland S.D., Martin G.M. 1996. Accelerated loss of telomeric repeats may not explain accelerated replicative decline of Werner syndrome cells. *Hum Genet.* 97 : 750–754.
289. Schwartz E.I., Smilenov L.B., Price M.A., Osredkar T., Baker R.A., Ghosh S., Shi F.D., Vollmer T.L., Lencinas A., Stearns D.M., Gorospe M., Kruman I.I. 2007. Cell cycle activation in postmitotic neurons is essential for DNA repair. *Cell Cycle.* 6 : 318–329.
290. Schwartz L.M., Osborne B.A. 1993. Programmed cell death, apoptosis and killer genes. *Immunol Today.* 14 : 583–590.
291. Sekharam M., Trotti A., Cunnick J.M., Wu J. 1998. Suppression of fibroblast cell cycle progression in G1 phase by N-acetylcysteine. *Toxicol Appl Pharmacol.* 149 : 210–216.
292. Serra V., von Zglinicki T., Lorenz M., Saretzki G. 2003. Extracellular superoxide dismutase is a major antioxidant in human fibroblasts and slows telomere shortening. *J Biol Chem.* 278 : 6824–6830.
293. Serrano M., Lin A.W., Mccurrach M.E., Beach D., Lowe S.W. 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16 INK4A. *Cell.* 88 : 593–602.
294. Severino J., Allen R.G., Balin S., Balin A., Cristofalo V.J. 2000. Is beta-galactosidase staining a marker of senescence in vitro and in vivo? *Exp Cell Res.* 257 : 162–171.
295. Shablott M.J., Axelman J., Wang S., Bugg E.M., Littlefield J.W., Donovan P.J., Blumenthal P.D., Huggins G.R., Gearhart J.D. 1998. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci.* 95 : 13726–13731.
296. Shao L., Li H., Pazhanisamy S.K., Meng A., Wang Y., Zhou D. 2011. Reactive oxygen species and hematopoietic stem cell senescence. *Int J Hematol.* 94 : 24–32.
297. Shapiro G.I., Edwards C.D., Ewen M.E., Rollins B.J. 1998. p16INK4A participates in a G1 arrest checkpoint in response to DNA damage. *Mol Cell Biol.* 18 : 378–387.
298. Shay J.W., Roninson I.B. 2004. Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene.* 23 : 2919–2933.
299. Sherr C.J., McCormick F. 2002. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell.* 2 : 103–112.
300. Sherr C.J., Roberts J.M. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13 : 1501–1512.
301. Shim W.S., Jiang S., Wong P., Tan J., Chua Y.L., Tan Y.S., Sin Y.K., Lim C.H., Chua T., Teh M., Liu T.C., Sim E. 2004. Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 324 : 481–488.

302. Shlush L.I., Itzkovitz S., Cohen A., Rutenberg A., Berkovitz R., Yehezkel S., Shahar H., Selig S., Skorecki K. 2011. Quantitative digital in situ senescence-associated β -galactosidase assay. *BMC Cell Biol.* 12 : 16.
303. Singhal S., Powles R., Kulkarni S., Treleaven J., Sirohi B., Millar B., et al. 2000. Comparison of marrow and blood cell yields from the same donors in a double-blind, randomized study of allogeneic marrow vs blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 25 (5) : 501–505.
304. Sitte N., Merker K., Grune T., von Zglinicki T. 2001. Lipofuscin accumulation in proliferating fibroblasts in vitro: an indicator of oxidative stress. *Exp Gerontol.* 36 : 475–486.
305. Skalka M., Matyasova J., Cejkova M. 1976. DNA in chromatin of irradiated lymphoid tissues degrades in vivo into regular fragments. *FEBS Lett.* 72 : 271–274.
306. So S., Davis A.J., Chen D.J. 2009. Autophosphorylation at serine 1981 stabilizes ATM at DNA damage sites. *J Cell Biol.* 187 : 977–990.
307. Sokolov M.V., Neumann R.D. 2012. Human embryonic stem cell responses to ionizing radiation exposures: current state of knowledge and future challenges. *Stem Cells Int.* 2012 : 579104.
308. Sokolov M., Neumann R. 2013. Lessons learned about human stem cell responses to ionizing radiation exposures: a long road still ahead of us. *Int J Mol Sci.* 14 : 15695–15723.
309. Stambrook P.J., Tichy E.D. 2010. Preservation of genomic integrity in mouse embryonic stem cells. *Adv Exp Med Biol.* 695 : 59—75.
310. Stein G.H., Drullinger L.F., Soulard A., Dulic V. 1999. Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol Cell Biol.* 19 : 2109–2117.
311. Stenderup K., Justesen J., Clausen C., Kassem M. 2003. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone.* 33 : 919—926.
312. Stewart R., Stojkovic M., Lako M. 2006. Mechanisms of self-renewal in human embryonic stem cells. *Eur J Cancer.* 42 : 1257–1272.
313. St. John J.C., Amaral A., Bowles E., Oliveira J.F., Lloyd R., Freitas M., Gray H.L., Navara C.S., Oliveira G., Schatten G.P., Spikings E., Ramalho-Santos J. 2006. The analysis of mitochondria and mitochondrial DNA in human embryonic stem cells. *Methods Mol Biol.* 331 : 347–374.
314. Stolberg S., McCloskey K.E. 2009. Can shear stress direct stem cell fate? *Biotechnol Prog.* 25 : 10–19.

315. Suzuki M., Suzuki K., Kodama S., Yamashita S., Watanabe M. 2012. Persistent amplification of DNA damage signal involved in replicative senescence of normal human diploid fibroblasts. *Oxid Med Cell Longev.* 2012 : 310534.
316. Takekawa M., Adachi M., Nakahata A., Nakayama I., Itoh F., Tsukuda H., Taya Y., Imai K. 2000. p53-inducible wip1 phosphatase mediates a negative feedback regulation of p38 MAPK-p53 signaling in response to UV radiation. *EMBO J.* 19 : 6517–6526.
317. Tang C., Lee A.S., Volkmer J.P., Sahoo D., Nag D., Mosley A.R., Inlay M.A., Ardehali R., Chavez S.L., Pera R.R., Behr B., Wu J.C., Weissman I.L., Drukker M. 2011. An antibody against SSEA-5 glycan on human pluripotent stem cells enables removal of teratoma-forming cells. *Nat Biotechnol.* 29 : 829–834.
318. Terrill J.R., Radley-Crabb H.G., Iwasaki T., Lemckert F.A., Arthur P.G., Grounds M.D. 2013. Oxidative stress and pathology in muscular dystrophies: focus on protein thiol oxidation and dysferlinopathies. *FEBS J.* 280 : 4149–4164.
319. Thompson H.J., Strange R., Schedin P.J. 1992. Apoptosis in the genesis and prevention of cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1 : 597–602.
320. Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 282 (5391) : 1145–1147.
321. Thomson J.A., Marshall V.S. 1998. Primate embryonic stem cells. *Curr Top Dev Biol.* 38 : 133–165.
322. Thornberry N.A., Lazebnik Y. 1998. Caspases: Enemies within. *Science* 281: 1312–1316.
323. Till J.E., McCulloch E.A. 1961. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res.* 14 (2): 213–222.
324. Timeus F., Crescenzo N., Basso G., Ramenghi U., Saracco P., Gabutti V. 1998. Cell adhesion molecule expression in cord blood CD34+ cells. *Stem Cells.* 16 : 120—126.
325. Tobiume K., Saitoh M., Ichijo H. 2002. Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by the stress-induced activating phosphorylation of pre-formed oligomer. *J Cell Physiol.* 191 : 95–104.
326. Tomei L.D., Cope F.O. 1994. Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
327. Toussaint O., Medrano E.E., von Zglinicki T. 2000. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol.* 35 : 927—945.

328. *Toussaint O., Remacle J., Dierick J.F., Pascal T., Fripiat C., Zdanov S., Magalhaes J.P., Royer V., Chainiaux F. 2002. From the Hayflick mosaic to the mosaics of ageing. Role of stress-induced premature senescence in human ageing. Int J Biochem Cell Biol. 34 : 1415–1429.*
329. *Tower J. 2012. Stress and stem cells. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol. 1 : 789–802.*
330. *Tsai M.S., Lee J.L., Chang Y.J., Hwang S.M. 2004. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. Hum Reprod. 19 : 1450—1456.*
331. *Tsutsui H., Kinugawa S., Matsushima S. 2011. Oxidative stress and heart failure. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 301 : 2181—2190.*
332. *Turrens J.F., Freeman B.A., Crapo J.D. 1982. Hyperoxia increases H₂O₂ release by lung mitochondria and microsomes. Arch Biochem Biophys. 217 : 411–421.*
333. *Ulrich D., Muralitharan R., Gargett E. 2013. Toward the use of endometrial and menstrual blood mesenchymal stem cells for cell-based therapies. Expert Opin Biol Ther. 13: 1387–1400.*
334. *Umezawa A., Makino H. 2008. Cell source for regenerative medicine. Nihon Rinsho. 66 : 865–872.*
335. *Valle-Prieto A., Conget P.A. 2010. Human mesenchymal stem cells efficiently manage oxidative stress. Stem Cells Dev. 19 : 1885–1893.*
336. *van Engeland M., Ramaekers F.C., Schutte B., Reutelingsperger C.P. 1996. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. Cytometry. 24 : 131–139.*
337. *Velichko A.K., Lagarkova M.A., Philonenko E.S., Kiselev S.L., Katidze O.L., Rasin S.V. 2011. Sensitivity of human embryonic and induced pluripotent stem cells to a topoisomerase II poison etoposide. Cell Cycle. 10 : 2035—2037.*
338. *Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H., Reutelingsperger C.P. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled annexin V. J Immunol Methods. 184 : 39—51.*
339. *Vigneron A., Vousden K.H. 2010. p53, ROS and senescence in the control of aging. Aging. 2 : 471—474.*
340. *von Zglinicki T. 2002. Oxidative stress shortens telomeres. Trends Biochem Sci. 27 : 339–344.*
341. *von Zglinicki T., Pilger R., Sitte N. 2000. Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts. Free Rad Biol Med. 28 : 64–74.*

342. von Zglinicki T., Saretzki G., Docke W., Lotze C. 1995. Mild Hyperoxia Shortens Telomeres and Inhibits Proliferation of Fibroblasts: A Model for Senescence? *Exp Cell Res.* 220 : 186–193.
343. von Zglinicki T., Saretzki G., Ladhoff J., d'Adda di Fagagna F., Jackson S.P. 2005. Human cell senescence as a DNA damage response. *Mech Ageing Dev.* 126 : 111–117.
344. Wagers A.J., Weissman I.L. 2004. Plasticity of adult stem cells. *Cell.* 116 : 639–648.
345. Wang D., Jang D.J. 2009. Protein kinase CK2 regulates cytoskeletal reorganization during ionizing radiation-induced senescence of human mesenchymal stem cells. *Cancer Res.* 69 : 8200—8207.
346. Wang T.Y., Chang S.J., Chang M.D., Wang H.W. 2009. Unique biological properties and application potentials of cd34+ cd38- stem cells from various sources. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 48: 356–369.
347. Wang W., Chen J.X., Liao R., Deng Q., Zhou J.J., Huang S., Sun P. 2002. Sequential activation of the MEK-extracellular signal regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence. *Mol Cell Biol.* 22 : 3389–3403.
348. Wang Y., Meng A., Zhou D. 2004. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase uncouples H₂O₂-induced senescent phenotype and cell cycle arrest in normal human diploid fibroblasts. *Exp Cell Res.* 298 : 188–196.
349. Wehrwein P. 2012. Stem cells: Repeat to fade. *Nature.* 492 : 12–13.
350. Weissman I.L. 2000. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell.* 100 : 157–168.
351. Williams J.T., Southerland S.S., Souza J. et al. 1999. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *Am Surg.* 65 : 22–26.
352. Wind S., Beuerlein K., Eucker T., Müller H., Scheurer P., Armitage M.E., Ho H., Schmidt H.H., Winkler K. 2010. Comparative pharmacology of chemically distinct NADPH oxidase inhibitors. *Br J Pharmacol.* 161 : 885–898.
353. Winslow T. 2006. Regenerative Medicine. http://stemcells.nih.gov/staticresources/info/scireport/PDFs/Regenerative_Medicine_2006.pdf. 104 p.
354. Wobus A.M., Boheler K.R. 2005. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev.* 85 : 635–678.
355. Wojda A., Witt M. 2003. Manifestations of ageing at the cytogenetic level. *J Appl Genet.* 44 : 383—399.

356. Woods W.S., Neudorf S., Gold S., Sanders J. et al. 2001. A comparison of allogenic bone marrow transplantation, and aggressive chemotherapy in children with acute myeloid leukemia in remission: a report from the Children's Cancer Group. *Blood*. 97 : 56–62.
357. Wright W.E., Piatyszek M.A., Rainey W.E., Byrd W., Shay J.W. 1996. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet*. 18 : 173–179.
358. Wright W.E., Shay J.W. 2001. Cellular senescence as a tumor-protection mechanism: the essential role of counting. *Curr Opin Genet Dev*. 11 : 98–103.
359. Wu G.S. 2004. The functional interactions between the p53 and MAPK signaling pathways. *Cancer Biol Ther*. 3 : 156–161.
360. Wyllie A.H. 1994. Death gets a brake. *Nature*. 369 : 272–273.
361. Wyllie A.H., Morris R.G., Smith A.L., Dunlop D. 1984. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol*. 142 : 67–77.
362. Xie A., Hartlerode A., Stucki M., Odate S., Puget N., Kwok A., Nagaraju G., Yan C., Alt F.W., Chen J., Jackson S.P., Scully R. 2007. Distinct roles of chromatin-associated proteins MDC1 and 53BP1 in mammalian double-strand break repair. *Mol Cell*. 28 : 1045–1057.
363. Xu C., Police S., Rao N., Carpenter M.K. 2002. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circ Res*. 91 : 501–508.
364. Yagi H., Tan J., Tuan R.S. 2013. Polyphenols suppress hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human bone-marrow derived mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*. 114 : 1163–1173.
365. Yamada T., Ohyama H., Kinjo Y., Watanabe M. 1981. Evidence for the internucleosomal breakage of chromatin in rat thymocytes irradiated in vitro. *Radiat Res*. 85 : 544–553.
366. Yan L.J., Levine R.L., Sohal R.S. 1997. Oxidative damage during aging targets mitochondrial aconitase. *Proc Natl Acad Sci*. 94 : 11168–11172.
367. Yan L.J., Sohal R.S. 1998. Mitochondrial adenine nucleotide translocase is modified oxidatively during aging. *Proc Natl Acad Sci*. 95 : 12896–12901.
368. Young P.R., McLaughlin M.M., Kumar S., Kassis S., Doyle M.L., McNulty D., Gallagher T.F., Fisher S., McDonnell P.C., Carr S.A., Huddleston M.J., Seibel G., Porter T.G., Livi G.P., Adams J.L., Lee J.C. 1997. Pyridinyl imidazole inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase bind in the ATP site. *J Biol Chem*. 272 : 12116–12121.
369. Yuan J., Shaham S., Ledoux S., Ellis H.M., Horvitz H.R. 1993. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*. 75 : 641–652.

370. Zanicelli F., Capasso S., Di Bernardo G., Cipollaro M., Pagnotta E., Carteni M., Casale F., Iori R., Giordano A., Galderisi U. 2012. Low concentrations of isothiocyanates protect mesenchymal stem cells from oxidative injuries, while high concentrations exacerbate DNA damage. *Apoptosis*. 17 : 964–974.
371. Zarubin T., Han J. 2005. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res*. 15 : 11–18.
372. Zdanov S., Debacq-Chainiaux F., Remacle J., Toussaint O. 2006. Identification of p38MAPKdependent genes with changed transcript abundance in H₂O₂-induced premature senescence of IMR-90 hTERT human fibroblasts. *FEBS Lett*. 580 : 6455–6463.
373. Zhan H., Suzuki T., Aizawa K., Miyagawa K., Nagai R. 2010. Ataxia Telangiectasia Mutated-mediated DNA damage response in oxidative stress-induced vascular endothelial cell senescence. *J Biol Chem*. 285 : 29662—29670.
374. Zhang J.H., Zhang Y., Herman B. 2003. Caspases, apoptosis and aging. *Ageing Res. Rev*. 2 : 357—366.
375. Zhao H., Tanaka T., Halicka H.D., Traganos F., Zarebski M., Dobrucki J., Darzynkiewicz Z. 2007. Cytometric assessment of DNA damage by exogenous and endogenous oxidants reports aging-related processes. *Cytometry A*. 71 : 905—914.
376. Zhivotovsky B.D., Zvonareva N.B., Hanson K.P. 1981. Characteristics of rat thymus chromatin degradation products after whole-body X-irradiation. *Int J Radiat Biol*. 39 : 437–440.
377. Zhong Z., Patel A.N., Ichim T.E., Riordan N.H., Wang H., Min W-P., Woods E.J., Reid M., Mansilla E., Martin G.H., Drago H., Murphy M.P., Minev B. 2009. Feasibility investigation of allogeneic endometrial regenerative cells. *J Transl Med*. 7:15.
378. Zhu W., Chen J., Cong X., Hu S., Chen X. 2006. Hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 24 : 416–425.
379. Zimmermann S., Voss M., Kaiser S., Kapp U., Waller C.F., Martens U.M. 2003. Lack of telomerase activity in human mesenchymal stem cells. *Leukemia*. 17 : 1146–1149.
380. Zuk P.A., Zhu M., Misino H., Huang J., Futrell J.W., Katz A.J., Benheim P., Lorenz H.P., Hedrick M.H. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implication for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 7 : 211–228.