

На правах рукописи

БОРОДКИНА
Александра Васильевна

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

03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург - 2014

Работа выполнена в Отделе внутриклеточной сигнализации и транспорта
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института
цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург

Научный руководитель:

Кандидат химических наук

Бурова Елена Борисовна

Институт цитологии РАН

Официальные оппоненты:

Член-корреспондент Российской академии наук,
доктор медицинских наук, профессор

Буравкова Людмила Борисовна

заведующий лабораторией клеточной
физиологии Федерального государственного
бюджетного учреждения Государственного
научного центра Российской Федерации
Институт медико-биологических проблем
Российской академии наук, Москва

Кандидат биологических наук

Кантидзе Омар Леванович

старший научный сотрудник лаборатории
структурно-функциональной организации
хромосом Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Института
биологии гена Российской академии наук,
Москва

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт эволюционной
физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова
Российской академии наук (ИЭФБ РАН)

Защита диссертации состоится «...» ... 201... г. в ... часов
на заседании диссертационного совета Д.002.230.01 на базе Института
цитологии РАН по адресу: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4.

Адрес электронной почты Института: cellbio@mail.cytspb.rssi.ru

Сайт Института: <http://www.cytspb.rssi.ru>

Факс Института: 8(812)297-35-41

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН и
на сайте <http://www.cytspb.rssi.ru>

Автореферат разослан «...» ... 201... г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Е.В. Каминская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 (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 исследования. Исследование 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, $\gamma H2AX$, p53BP1 и последующую передачу сигнала через Chk2/p53/p21/Rb и p38/MAPK-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/МАРКАРК-2/Rb путей.

5. а) Обработка клеток антиоксидантом N-acetyl-L-cysteine (NAC) частично предотвращает развитие H₂O₂-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 H₂O₂. 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 H₂O₂ было установлено, что большая часть популяции ЭСК быстро подвергается апоптозу в ответ на действие H₂O₂ в широком диапазоне концентраций. Напротив, апоптоз инициируется лишь в небольшой части популяции эМСК при действии H₂O₂ 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 АТМ/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).

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 143 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы по исследуемой теме, материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждения результатов экспериментов, заключения и списка цитируемой литературы, включающего 380 источников (из них 370 иностранных). Работа иллюстрирована 72 рисунками.

Личный вклад автора. Большинство экспериментальных процедур, описанных в работе, осуществлялись автором лично. Анализ проб на проточном цитофлуориметре выполняла А.Н. Шатрова. Анализ экспрессии генов методом ОТ-ПЦР проведен Л.Л. Алексеенко совместно с Я.Г. Борисовым. Анализ флуоресценции на конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 MP проводили совместно с П.А. Абушик. Материалы, вошедшие в представленную работу, обсуждались и публиковались совместно с соавторами и научным руководителем.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Культивирование клеток. Культуры эМСК (линия 2304) и ЭСК (линия C910) были получены сотрудниками Института цитологии РАН. 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.

Обработка клеток. Окислительный стресс вызывали добавлением на 1 ч в бессывороточную ростовую среду раствора H₂O₂, который готовили из 30 %-ного раствора H₂O₂ (Sigma, США) непосредственно перед экспериментами. 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. Обработка клеток N-acetyl-L-cysteine (NAC) (Sigma, США): совместное действие 10 mM NAC и 200 мкМ H₂O₂ в течение 1 ч в среде без сыворотки, после чего клетки промывали, как описано выше, и культивировали в свежей ростовой среде. Обработка клеток SB203580 (SB): действие 200 мкМ H₂O₂ в течение 1 ч, промывка клеток с последующим добавлением в инкубационную среду 5 мкМ SB и поддержанием этой концентрации в течение всего периода наблюдения за счет ежедневного добавления 5 мкМ SB.

Жизнеспособность клеток оценивали через 24 ч после начала эксперимента методом МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид), как было описано ранее (Бородкина и др., 2013). Абсорбцию раствора измеряли при 570 нм на приборе Fluorofot “Charity”.

Проточная цитофлуориметрия. Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла проводили, как описано ранее (Бородкина и др., 2013). Изменение размера клеток оценивали с помощью метода прямого светорассеяния на окрашенных иодидом пропидия (PI) образцах, использованных для анализа распределения клеток по фазам клеточного цикла.

Анализ апоптоза. Для выявления апоптотических клеток использовали комбинированную окраску с помощью PI и AnnexinV/FITC (An V/FITC) с последующим анализом окрашенных клеток на цитометре Coulter EPICS XL Flow Cytometer (Backman Coulter).

Оценку уровней внутриклеточных АФК, митохондриальных пероксидов, митохондриальной массы и мембранного потенциала митохондрий (ММП) клеток проводили с помощью флуоресцентных красителей: 10 мкМ 2,7-дихлорфлуоресцеин-диацетата (H₂DCF-DA), 30 мкМ дигидрородамина123 (DHR123), 10 мкМ нонил-акридинового оранжевого (NAO), 10 мкМ родамина123 (Rho123), соответственно. Анализ флуоресценции проводили на проточном цитометре (Backman Coulter) и на инвертированном сканирующем конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 MP (Leica Microsystems Inc, Германия) с частотой сканирования 0,03 кадр/с. Флуоресценцию красителей возбуждали аргоновым лазером (488 нм), а регистрировали в зеленой области спектра (510-560 нм). Полученные конфокальные изображения оцифровывали при помощи программного обеспечения Leica LAS AF.

Электрофорез и иммуноблотинг. Лизис клеток, разделение белков в полиакриламидном геле и иммуноблотинг проводили по стандартным методикам. Детекцию иммунокомплексов осуществляли методом усиленной хемилюминесценции (ECL, Amersham, Швеция).

Анализ экспрессии генов. Тотальную РНК экстрагировали с использованием коммерческого набора RNeasy Micro Kit (Qiagen, США), следуя инструкции изготовителя. кДНК получали при отжиге 1 мкг общей РНК с использованием фирменного набора RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Литва) в соответствии с протоколом производителя. Амплификацию исследуемых генов проводили при помощи

Тaq-полимеразы (Fermentas, Литва) в амплификаторе Cyclo Temp. Параметры ПЦР и число циклов соответствовали описанным ранее (Burova et al., 2013). Анализ продуктов ПЦР проводили в 2 %-ном агарозном геле, приготовленном на буфере TAE с добавлением бромистого этидия. Визуализацию проводили на трансиллюминаторе при 302 нм. Интенсивность полос амплификатов ПЦР определяли компьютерной денситометрией с помощью программы Scion Image, версия 4.0.3.2.

Иммунофлуоресцентный анализ. Окрашку клеток проводили, как описано ранее (Borodkina et al., 2014). 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).

Выявление активности SA- β -Gal осуществляли с использованием фирменного набора «Senescence-galactosidase staining kit» (Cell Signaling, США) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Статистическая обработка данных была проведена 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.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ устойчивости и характера гибели ЭМСК и ЭСК в условиях окислительного стресса. Устойчивость исследуемых клеток к окислительному стрессу, индуцированному действием H₂O₂ в широком диапазоне концентраций в течение 1 ч, оценивали методом МТТ. В качестве показателя жизнеспособности была выбрана величина LD₅₀, соответствующая концентрации H₂O₂, при действии которой через 24 ч выживает 50 % клеток. Диапазоны значений LD₅₀ составили 600–700 и 370–400 мкМ для ЭМСК и ЭСК, соответственно (данные не представлены). Полученные результаты свидетельствуют о большей устойчивости ЭМСК к окислительному стрессу по сравнению с ЭСК. Эти наблюдения хорошо согласуются с данными литературы о большей устойчивости к стрессовым воздействиям взрослых стволовых клеток по сравнению с эмбриональными (Liu et al., 2014). Исходя из оценки

устойчивости клеток к окислительному воздействию, в дальнейших экспериментах при изучении характера гибели клеток использовали концентрации H_2O_2 , превышающие LD_{50} : 500 и 900 мкМ для ЭСК и эМСК, соответственно. Для изучения индуцированного старения эМСК использовали 200 мкМ H_2O_2 в качестве сублетальной концентрации.

Для изучения характера клеточной гибели применяли двойное флуоресцентное окрашивание клеток PI и An V/FITC с последующим анализом методом проточной цитофлуориметрии, а также окрашивание специфическими антителами против расщепленных каспаз-8 и -3 в иммуноблоте. В большей части популяции ЭСК действие H_2O_2 в концентрации 500 мкМ индуцировало быстрый апоптоз, опосредованный каспазой-8 с последующей активацией эффекторной каспазы-3 (рис. 1, а, в).

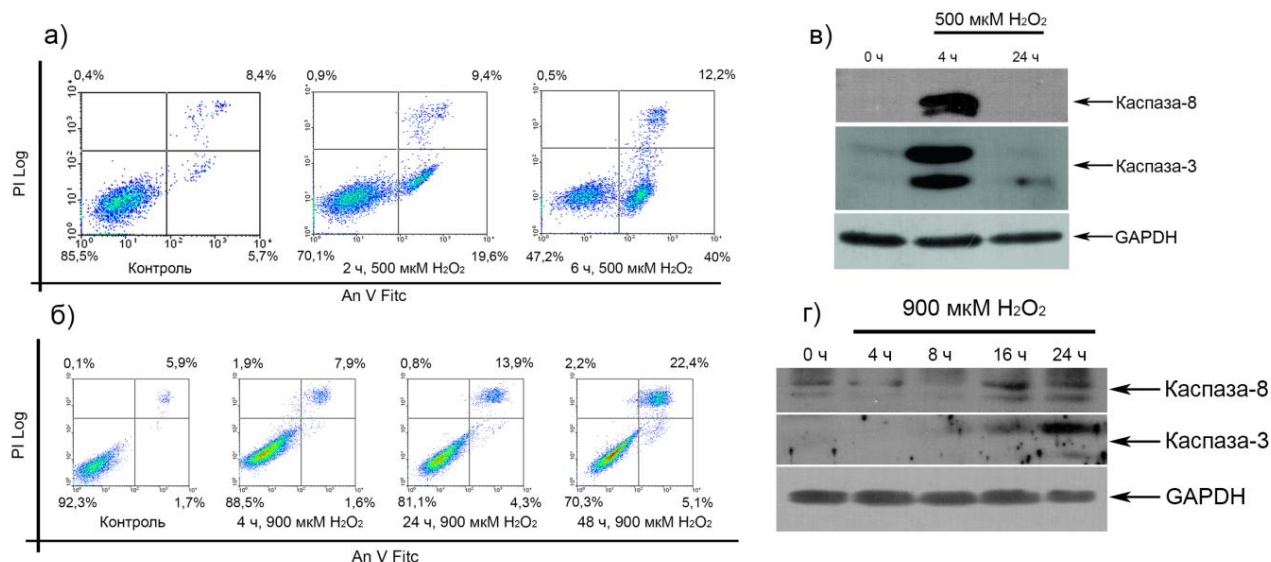


Рис. 1. Детекция апоптоза в ЭСК и эМСК в ответ на действие токсичных доз H_2O_2 . Распределение ЭСК (а) и эМСК (б), меченных An V/FITC и PI. Выявление каспаз-3 и -8 в лизатах ЭСК (в) и эМСК (г) методом иммуноблотинга.

Эти результаты подтверждают данные литературы о значительной склонности ЭСК к апоптозу при действии различных стрессовых факторов (Alekseenko et al., 2012; Luo et al., 2012). Предполагается, что быстрая элиминация поврежденных клеток из популяции ЭСК путем апоптоза необходима для сохранения генетической стабильности (Dumitru et al., 2012). В культуре эМСК H_2O_2 в концентрации 900 мкМ также индуцировала апоптоз,

зависящий от активности каспаз-3 и -8, но характеризующийся более медленной динамикой (**рис. 1, б, г**). Более сильная индукция апоптоза в эМСК имела место только при действии высокотоксичной дозы H_2O_2 (3 мМ) (данные не показаны). Важно отметить, что обработка клеток H_2O_2 в концентрации 200 мкМ приводила к развитию апоптоза в культуре ЭСК, тогда как в культуре эМСК в аналогичных условиях мы не наблюдали признаков апоптоза.

Феномен индукции преждевременного старения эМСК в условиях сублетального окислительного стресса. Недавно было продемонстрировано, что МСК, подобно другим типам пролиферирующих клеток, могут подвергаться преждевременному старению в условиях сублетального окислительного стресса (Brandl et al., 2011; Kim et al., 2011; Harbo et al., 2012; Ko et al., 2012). Основными признаками, характеризующими клеточное старение, являются гипертрофия, экспрессия SA- β -Gal и необратимая потеря пролиферативного потенциала (Campisi, di Fagagna, 2007). Учитывая, что при действии сублетальной дозы H_2O_2 не наблюдалось развитие апоптоза эМСК, на следующем этапе работы мы проверили возможность индукции преждевременного старения эМСК в таких экспериментальных условиях. Оказалось, что обработка эМСК с помощью 200 мкМ H_2O_2 приводит к появлению активности SA- β -Gal (**рис. 2, а**) и заметному увеличению размера клеток, оцененному методом прямого светорассеяния (**рис. 2, б**). Характер кривой роста свидетельствует об отсутствии увеличения числа клеток в популяции, обработанной H_2O_2 , по сравнению с контрольными пролиферирующими клетками (**рис. 2, в**). Неспособность H_2O_2 -обработанных эМСК возобновить пролиферацию после пересева доказывает необратимость потери пролиферативного потенциала. Дополнительным подтверждением остановки пролиферации в H_2O_2 -стимулированных клетках служит отсутствие экспрессии Ki67, широко используемого маркера пролиферирующих клеток (**рис. 2, г**). На основании представленных данных можно заключить, что эМСК отвечают на сублетальный окислительный стресс индукцией преждевременного старения.

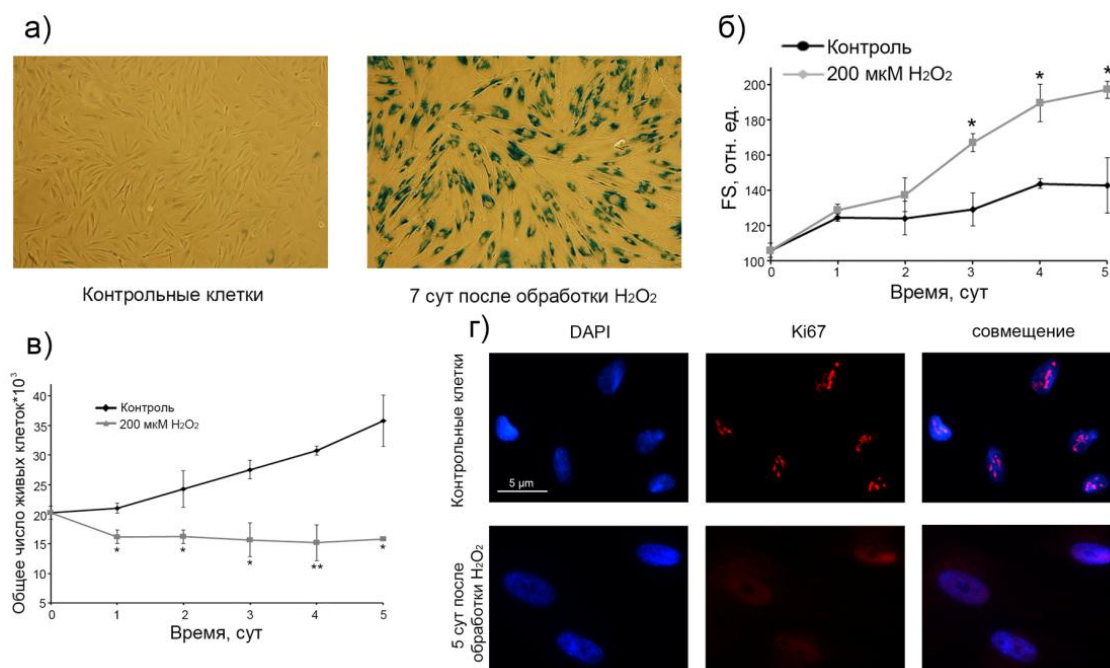


Рис. 2. H₂O₂ в концентрации 200 мкМ индуцирует преждевременное старение эМСК. (а) – развитие окраски на SA-β-Gal и (б) – увеличение размера H₂O₂-обработанных клеток; (в) – кривые роста; (г) – окраска эМСК специфическими антителами на Ki67.

Молекулярные механизмы, лежащие в основе индукции преждевременного старения эМСК. Известно, что H₂O₂ способна вызывать повреждения ДНК в виде двунитевых разрывов (Giorgio et al., 2007; Panieri et al., 2013), которые инициируют в клетках специфический ответ (DNA damage response, DDR), включающий активацию киназы ATM, фосфорилирование гистона H2AX и адапторного белка 53BP1 (Zhan et al., 2010; Firsanov et al., 2011). Динамику проникновения H₂O₂ в клетки оценивали методом конфокальной микроскопии с использованием красителя H₂DCF-DA. Оказалось, что обработка клеток 200 мкМ H₂O₂ приводит к заметному повышению уровня внутриклеточных АФК в пределах часовой обработки (**рис. 3, а, б**). Для проверки возможности активации DDR в H₂O₂-обработанных эМСК оценивали функциональный статус ключевых белков, участвующих в этом ответе. Иммунофлуоресцентный анализ выявил активацию и ко-локализацию pATM как с γH2AX, так и p53BP1 к окончанию часовой H₂O₂-обработки (**рис. 3, в, г**).

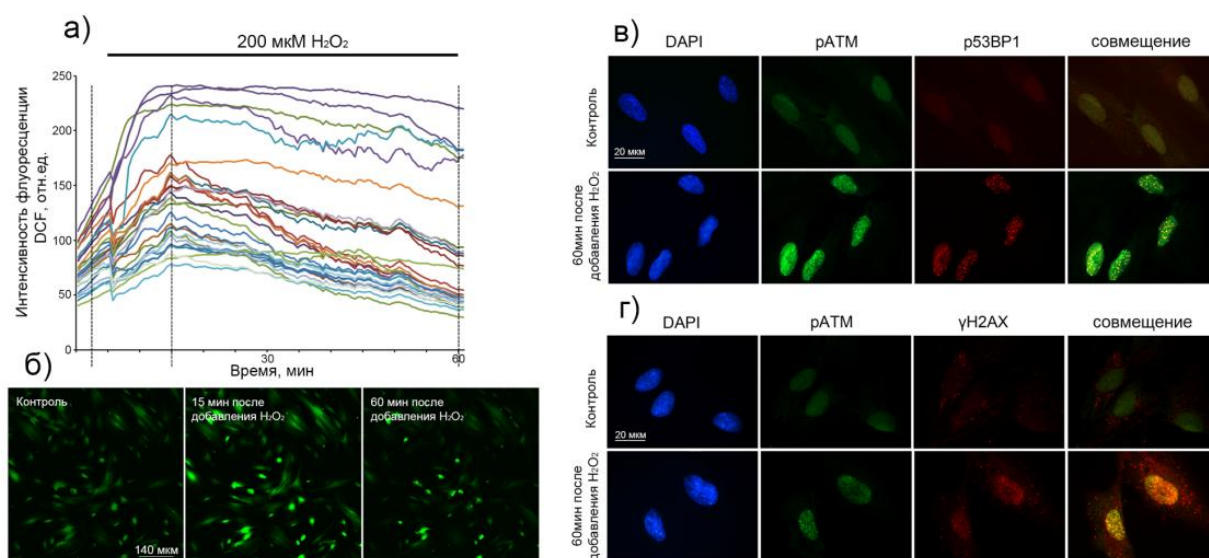


Рис. 3. Проникновение H_2O_2 в эМСК приводит к активации DDR.

(а) – изменение уровня эндогенных АФК; каждая кривая представляет изменение флуоресценции DCF в одной клетке; (б) – флуоресцентные изображения эМСК, зарегистрированные через 15 и 60 мин после добавления H_2O_2 ; (в) – ко-локализация pATM с p53BP1 и (г) – pATM с γ H2AX, выявленная через 60 мин после добавления H_2O_2 .

H_2O_2 -индуцированная активация ATM была подтверждена результатами иммуноблотинга (рис. 4, а).

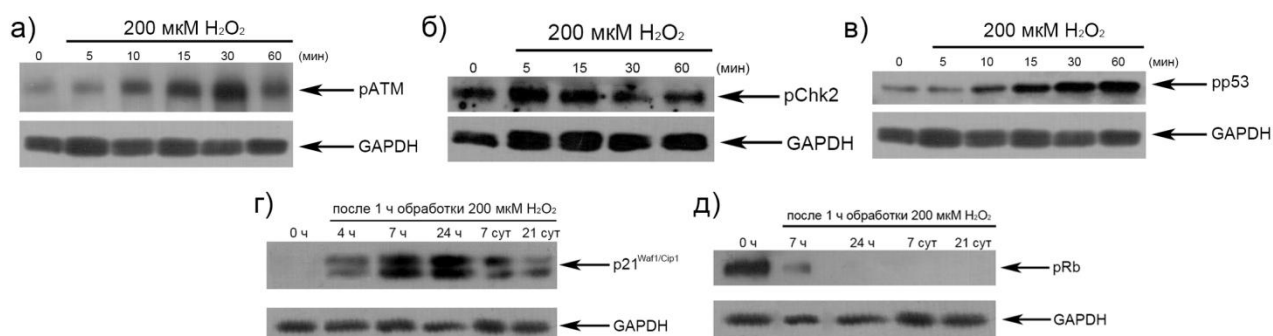


Рис. 4. Активация pATM/pChk2/pp53/p21/pRb пути в H_2O_2 -обработанных эМСК.

Динамика активации (а) ATM, (б) Chk2, (в) p53, экспрессии p21 (г) и гипофосфорилирования pRb (д) в H_2O_2 -обработанных эМСК.

Считается, что 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, di Fagagna, 2007). В свою очередь, Chk2 может p53-независимым образом индуцировать транскрипцию p21 (Aliouat-Denis et al., 2005). Наши данные, полученные методом иммуноблотинга, демонстрируют быстрое фосфорилирование Chk2

(рис. 4, б) и p53 (рис. 4, в), последующее повышение уровня белка p21 (рис. 4, г), повлекшее за собой продолжительное гипофосфорилирование белка Rb (рис. 4, д) и, как следствие, арест клеточного цикла. Следовательно, индукция старения эМСК в условиях окислительного стресса осуществляется в этих клетках через p53/p21/Rb путь.

Исследование молекулярных механизмов, опосредующих развитие H_2O_2 -индуцированного старения эМСК. Для проверки гипотезы о необходимости поддержания DDR в постоянно активном состоянии для стабилизации H_2O_2 -индуцированного старения эМСК, была проведена оценка функционального статуса основных участников DDR в стареющих эМСК. Мы обнаружили, что ATM, H2AX и 53BP1 находятся в активированном состоянии и ко-локализованы в отдельные фокусы через 5 сут после индукции старения (рис. 5, а, б).

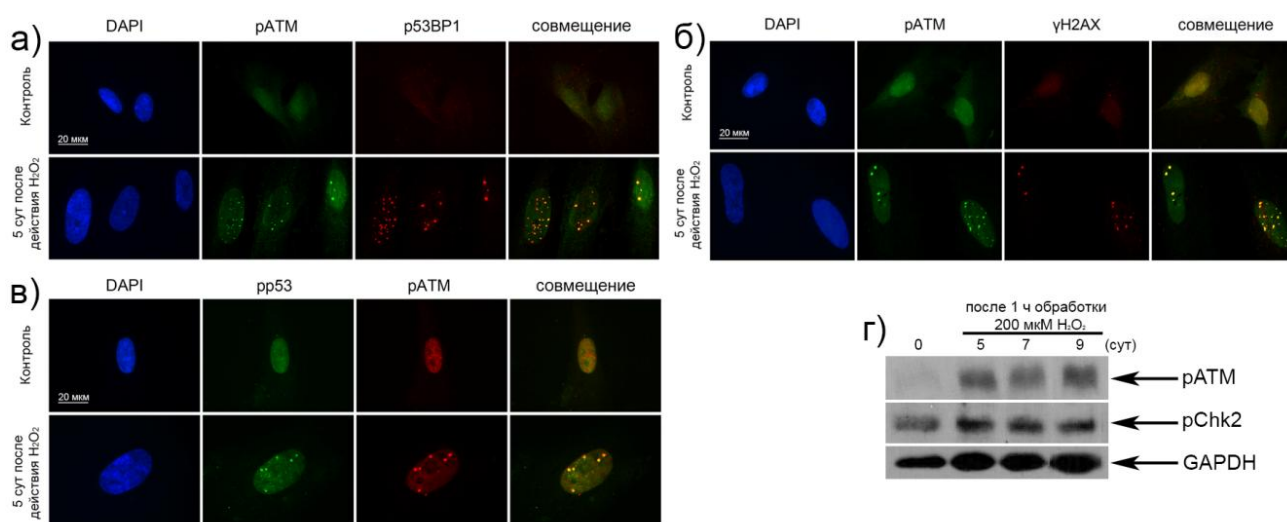


Рис. 5. Поддержание DDR в активном состоянии в стареющих эМСК.

Иммунофлуоресцентный анализ внутриклеточной ко-локализации (а) pATM с p53BP1, (б) pATM с γ H2AX, (в) pATM с pp53 в эМСК через 5 сут после действия H_2O_2 . (г) Оценка статуса фосфорилирования ATM и Chk2 в указанных временных точках.

Сохранение активности ATM при развитии старения подтверждалось результатами иммуноблотинга (рис. 5, г). Кроме того, p53 также оставался в фосфорилированном состоянии в течение длительного времени после индукции старения и был ко-локализован с pATM в ядре (рис. 5, в). Методом иммуноблотинга с применением специфических антител против pChk2 был

выявлен перманентно увеличенный уровень фосфорилирования этой киназы в H_2O_2 -обработанных эМСК (**рис. 5, г**). Таким образом, можно констатировать, что все участники DDR, равно как и основные эффекторы этого ответа – p53 и Chk2, находятся в постоянно активном состоянии в стареющих эМСК. Следствием перманентной активации DDR является поддержание повышенного уровня экспрессии p21 (**рис. 4, г**) и гипофосфорилирования Rb (**рис. 4, д**), опосредующих блок клеточного цикла в процессе развития H_2O_2 -индуцированного старения этих клеток.

В качестве возможной причины постоянной активации DDR логично было рассмотреть роль эндогенных АФК, повышенная продукция которых, как показано ранее, характерна для стареющих клеток (Hutter et al., 2004; Passos et al., 2007). Результаты исследования динамики накопления внутриклеточных АФК при развитии старения H_2O_2 -стимулированных эМСК демонстрируют существенное увеличение уровня эндогенных АФК в стареющих эМСК, сохраняющееся как минимум в течение 9 сут, по сравнению с контрольными клетками (**рис. 6, а**). Принято считать, что именно такое отставленное во времени возрастание уровня эндогенных АФК ответственно за инициацию непрерывных повреждений ДНК и стабилизацию DDR в процессе старения (Passos et al., 2010; Jurk et al., 2012).

Поскольку одним из основных источников эндогенных АФК в клетке являются митохондрии, далее мы исследовали модуляцию их функционирования в процессе развития преждевременного старения эМСК. Как и ожидалось, в H_2O_2 -обработанных эМСК при старении существенно возрастала продукция митохондриальных пероксидов (**рис. 6, б**), увеличивались ММП и митохондриальная масса (**рис. 6, в, г**). Хотя многие исследователи отмечают несомненный вклад митохондрий в генерацию АФК при развитии старения, на сегодняшний день нет единого мнения о механизмах этого процесса. Так, в ряде работ отмечалась взаимосвязь клеточного старения с дисфункцией митохондрий (Ma et al., 2009; Passos et al., 2010). Напротив, другие исследователи не выявили нарушения функционирования этих

органелл, при этом рост АФК объясняли либо изменениями в работе белков-разобщителей на мембране митохондрий (Maklashina, Ackrell, 2004), либо растущим числом функционально активных митохондрий в процессе клеточного старения (Lee et al., 2000).

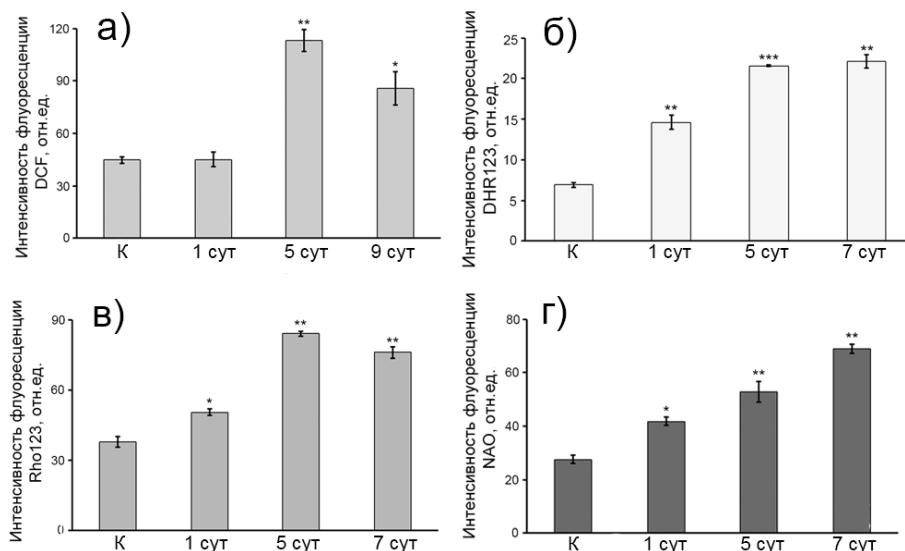


Рис. 6. Повышение уровня эндогенных АФК вследствие роста митохондриальной активности при развитии старения эМСК.

Анализ изменения уровня АФК в клетках был проведен в течение 1, 5 или 9 сут после действия H_2O_2 при помощи $H_2DCF-DA$ (а). Оценка уровня митохондриальных пероксидов (б), ММП (в), массы митохондрий (г) с помощью красителей DHR123, Rho123, NAO, соответственно.

Последнее наблюдение хорошо согласуется с нашими результатами, позволяющими предполагать, что повышение продукции АФК в стареющих эМСК, по крайней мере, частично опосредовано увеличением числа функционально активных митохондрий в расчете на одну клетку.

Использование антиоксиданта НАС для предотвращения преждевременного старения эМСК. Исходя из представлений о важной роли АФК в развитии преждевременного старения клеток, можно было предположить, что антиоксиданты, нейтрализующие АФК и уменьшающие уровень окислительного стресса, будут выполнять защитную функцию. Антиоксидант НАС, предшественник синтеза восстановленного глутатиона в клетках, широко применяется с целью модуляции окислительно-восстановительного потенциала и понижения внутриклеточного уровня АФК. При выборе условий обработки клеток антиоксидантом с целью

предотвращения их преждевременного старения, наиболее эффективной оказалась совместная обработка NAC и H_2O_2 в течение 1 ч с последующей отмывкой. Аналогичный вариант обработки, как наиболее эффективный, был выбран для уменьшения токсического действия H_2O_2 на клетки карциномы эндометрия (Estany et al., 2007). В наших экспериментах совместное действие H_2O_2 и NAC способствовало существенному понижению уровня внутриклеточных АФК. Примечательно, что пониженный уровень сохранялся даже через 8 сут после воздействия, по сравнению с уровнем АФК в H_2O_2 -обработанных ЭМСК (рис. 7, а). Более того, в течение 11 сут после индукции старения клетки, обработанные антиоксидантом, сохраняли способность пролиферировать, хотя и медленнее, чем контрольные, как показано на рис. 7, б, а размер их был приблизительно в 1,6 раза меньше по сравнению с H_2O_2 -стимулированными клетками (рис. 7, в).

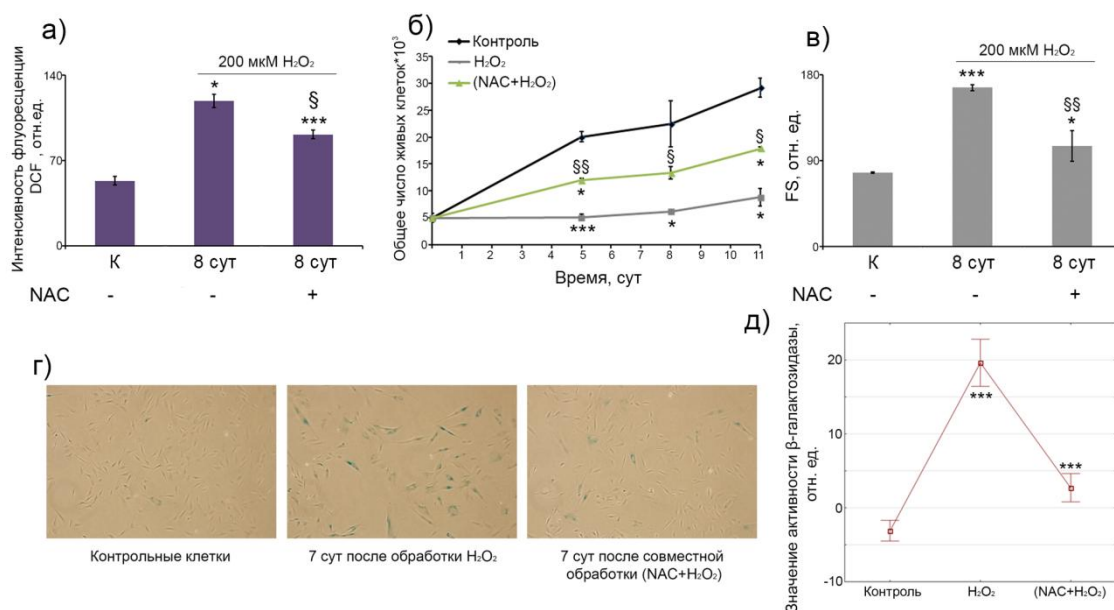


Рис. 7. Обработка клеток с помощью NAC предотвращает развитие преждевременного старения ЭМСК.

Влияние NAC на генерацию АФК (а), пролиферацию (б) и размер (в) стареющих ЭМСК оценивали через 8 или 11 сут после индукции старения; (г) – эффект NAC на уровень активности SA- β -Gal в H_2O_2 -обработанных ЭМСК, (д) – количественная оценка результатов окраски на SA- β -Gal.

Стоит отметить, что действие антиоксиданта приводило к существенному уменьшению окраски на SA- β -Gal по сравнению с H_2O_2 -обработанными клетками (рис. 7, г, д). Обобщая полученные данные, можно заключить, что

снижение эндогенного уровня АФК при использовании НАС приводит к частичному предотвращению преждевременного старения эМСК, индуцированного окислительным стрессом.

Ингибирование МАР-киназы p38 частично предотвращает развитие H_2O_2 -индуцированного старения эМСК. Регуляторная роль МАР-киназ, в частности p38, в реализации программы клеточного старения мезенхимных стволовых клеток на сегодняшний день исследована мало. Так, было показано участие p38 в репликативном старении (Lee et al., 2009) и в процессе H_2O_2 -индуцированного старения (Choi et al., 2014) МСК из костного мозга. Согласно нашим данным, p38 быстро активировалась в клетках во время инициации старения (**рис. 8, а**), а затем в процессе стабилизации H_2O_2 -индуцированного старения оставалась в активном состоянии в течение длительного времени (**рис. 8, б**).

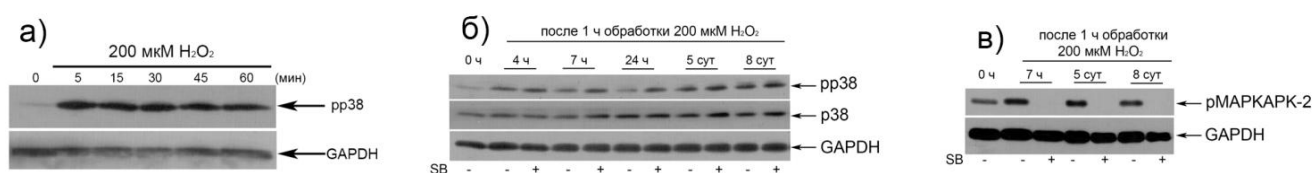


Рис. 8. Статус фосфорилирования p38 и МАРКАРК-2 в H_2O_2 -стимулированных эМСК. Динамика активации p38 во время индукции старения (а). Оценка статуса фосфорилирования p38 (б) и МАРКАРК-2 (в) в течение 8 сут в присутствии SB или без него.

Эти факты позволяют предположить функциональную роль активированной p38 в преждевременном старении эМСК при окислительном стрессе. Для 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 5 мкМ SB203580 (SB). Добавление SB не приводило к уменьшению уровня фосфорилирования p38 в H_2O_2 -обработанных клетках (**рис. 8, б**), но полностью подавляло H_2O_2 -индуцированное фосфорилирование МАРКАРК-2 (прямой мишени pp38) в течение 8 сут после индукции старения (**рис. 8, в**), что согласуется с механизмом действия SB (Young et al., 1997). При исследовании влияния ингибирования активности p38 на модуляцию пролиферации H_2O_2 -

обработанных эМСК оказалось, что в присутствии SB через 5 сут достоверно увеличивалось число пролиферирующих клеток в популяции по сравнению с H_2O_2 -стимулированными клетками (рис. 9, а). Следовательно, ингибирование p38 способствовало частичному предотвращению потери пролиферативного потенциала в H_2O_2 -обработанных эМСК. Кроме того, 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 (рис. 9, б).

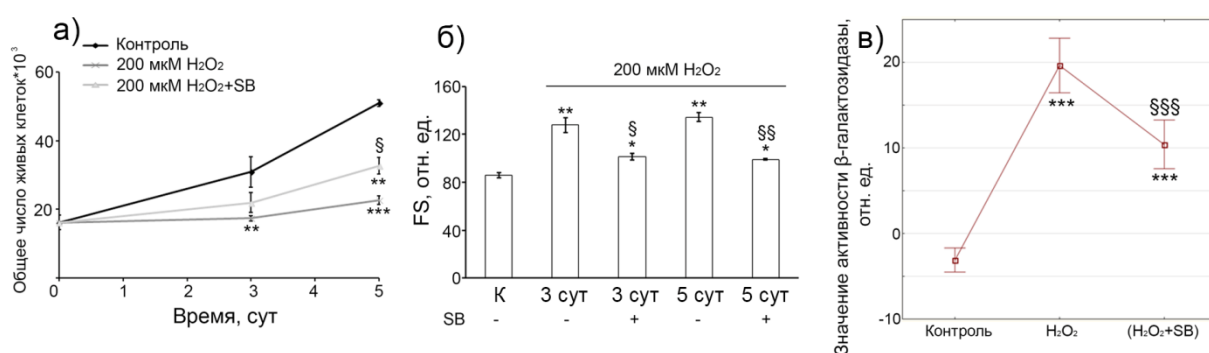


Рис. 9. Влияние SB на пролиферацию (а), размер (б) и активность SA-β-Gal (в) H_2O_2 -обработанных эМСК.

Общее число живых клеток (а) и их размер (б) оценивали через 3 и 5 сут после индукции старения. Количественная оценка результатов окраски на SA-β-Gal (в).

Тестирование активности SA-β-Gal в клетках через 7 сут после индукции старения показало, что в присутствии SB активность в значительной степени снижена по сравнению с H_2O_2 -обработанными клетками (рис. 9, в). Можно заключить, что подавление активности p38 с помощью SB приводит к частичному предотвращению развития H_2O_2 -индуцированного старения эМСК.

Принимая во внимание представленные выше результаты об участии p53/p21/Rb сигнального пути в реализации H_2O_2 -индуцированного блока клеточного цикла в эМСК, далее мы оценили возможную роль p38 в активации данного каскада, применив ингибиторный анализ. Интересно, что присутствие SB в течение всего периода наблюдения не оказывало заметного влияния ни на уровень фосфорилирования p53 (рис. 10, а), ни на экспрессию белка p21 (рис. 10, б). Однако при этом в SB-обработанных клетках мы наблюдали небольшое,

но заметное усиление фосфорилирования белка Rb (**рис. 10, в**) по сравнению с H_2O_2 -обработанными эМСК. Это наблюдение согласуется с частичным восстановлением пролиферации клеток в присутствии ингибитора (**рис. 9, а**) и может свидетельствовать о независимой роли p38 в индукции блока клеточного цикла, который устанавливается в ответ на окислительный стресс как через p53/p21/Rb, так и через p38/МАРКАРК-2/Rb пути.

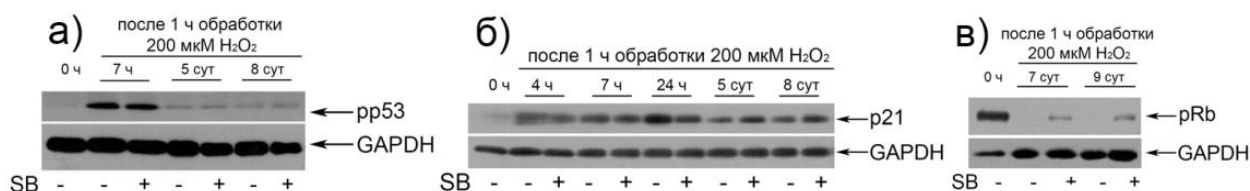


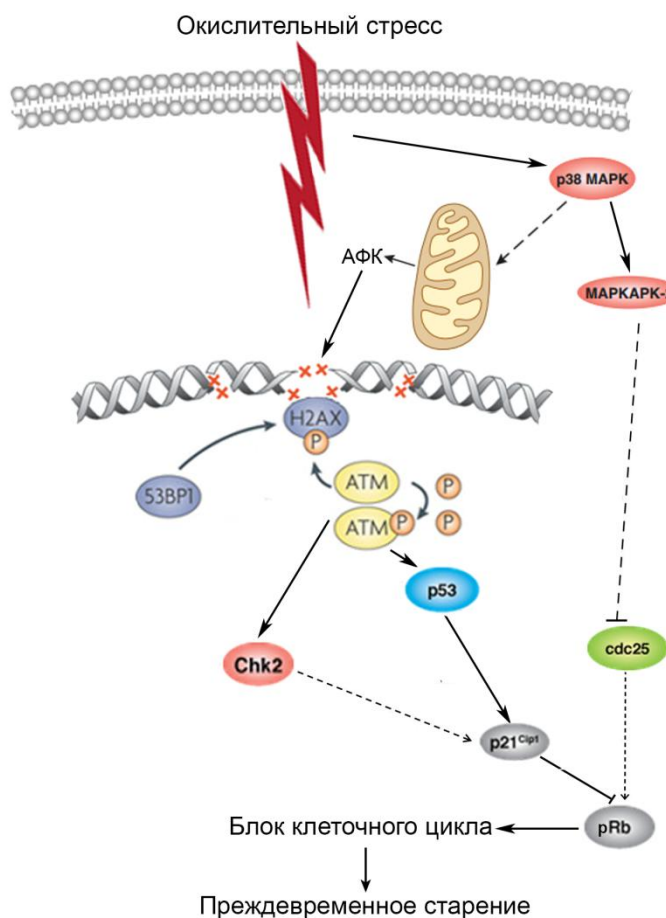
Рис. 10. Влияние SB на уровень фосфорилирования p53 (а) и Rb (в), а также экспрессии p21 (б) в стареющих эМСК.

Хотелось бы отдельно отметить тот факт, что ингибирование p38, помимо упомянутых выше эффектов, приводило к существенному снижению уровня эндогенных АФК в стареющих эМСК. Такое наблюдение хорошо согласуется с выводами о включении p38 в АФК-зависимый сигналинг, играющий определяющую роль в поддержании клеточного старения (Passos et al., 2010). В наших экспериментах использование SB приводило к уменьшению ММП, митохондриальной массы и 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 представленных данных можно сделать вывод о несомненном участии p38 в регуляции уровня эндогенных АФК в стареющих эМСК, которое частично опосредуется увеличением массы функционально активных митохондрий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в настоящей работе результаты позволяют представить молекулярный механизм преждевременного старения эМСК, как изображено на схеме. Индукция старения в условиях окислительного стресса включает быструю активацию ответа на повреждение ДНК и последующую передачу

сигнала через p53/p21/Rb и p38/MAPKAPK-2/Rb пути, которые требуются для установления необратимого блока клеточного цикла. Дальнейшую



стабилизацию процесса 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/MAPKAPK-2, необходимы для поддержания постоянного пролиферативного блока в стареющих клетках. Кроме того,

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 дозозависимый 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, γ 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 H₂O₂-индуцированного преждевременного старения эмСК.

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.