

Этопозид и гипоксия не активируют апоптоз ММСК *in vitro*

Рылова Ю.В.^{1,2}, Андреева Е.Р.¹, Гогвадзе В.Г.^{2,3}, Животовский Б.Д.^{2,3}

Буравкова Л.Б.^{1,2}

¹Институт медико-биологических проблем, РАН, Москва; ²Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва; ³Каролинский Институт, Стокгольм, Швеция

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) – это прогениторные клетки, которые можно легко выделить из различных тканей и длительное время культивировать *in vitro*. Перспективы клинического применения ММСК связывают как с возможностью использования их для заместительной терапии, основанной на способности дифференцироваться в клетки мезенхимальных тканей различного типа [4, 11, 14], так и участием их в формировании регенеративного микроокружения и использования этих клеток для адресной доставки терапевтических белков в опухоли [13]. Реализация функций ММСК в местах повреждения часто сопряжена с условиями недостатка питательных веществ, ростовых факторов и кислорода. В настоящее время активно изучается влияние пониженного содержания кислорода на функциональные характеристики ММСК *in vitro* [1, 4, 5]. Показано, что даже в условиях жесткой гипоксии (1% O₂) ММСК сохраняют высокий уровень жизнеспособности [12], что, в свою очередь, вызывает особый интерес к механизмам, лежащим в основе устойчивости этих клеток к повреждающим воздействиям. Недавние исследования влияния агентов, вызывающих апоптоз в ММСК костного мозга показали, что эти клетки более устойчивы к таким распространенным индукторам этого процесса как цисплатин, этопозид, винкристин и др., чем опухолевые клетки [8, 10]. Однако устойчивость ММСК из других источников, в частности из жировой ткани, изучена недостаточно. Целью данного исследования являлось изучение влияния этопозид на ММСК из жировой ткани человека в условиях гипоксии и дефицита ростовых факторов.

Методика исследования

Выделение ММСК из жировой ткани и получение первичной культуры.

Выделение ММСК проводили, используя методику Zuk P. с незначительными модификациями [15, 1]. В работе использовали среду α -MEM (MP Biomedicals, США) с добавлением 50 мкг/мл амфотерицина В (Sigma-Aldrich, США), 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 мМ L-глутамин (ПанЭко, Россия), 10% фетальной телячьей сыворотки (ФТС) (HyClone, США). После выделения клетки переносили в культуральные флаконы, плотность посадки составляла 2–3 x 10³ ядросодержащих клеток на см². Часть

клеток помещали в стандартные условия культивирования (20% O₂), часть - в условия близкие к физиологическому содержанию кислорода (5% O₂).

Анализ иммунофенотипа ММСК. Иммунофенотип ММСК определяли с помощью моноклональных антител, меченых флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) или фикоэритрином (PE) к антигенам CD90, CD73, CD54, CD105, CD11b, CD34 по стандартной методике на проточном цитофлуориметре Epics XL (Beckman Coulter, США) согласно инструкции производителя. В качестве изотипического контроля к антителам использовали FITC- и PE-меченые IgG соответствующего класса.

Схема эксперимента. ММСК 2-3 пассажа пересевали в чашки Петри Ø 60 мм с плотностью 2–3 × 10³ кл/см² и культивировали в CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония) до достижения 70-80% конфлуентного монослоя, затем вносили этопозид в концентрации 10 мкМ и помещали в условия 20% O₂ и 1% O₂ на 24, 48 и 72 часа. Для изучения влияния этопозид на ММСК, постоянно культивируемые при пониженном до «физиологического» содержании кислорода (5% O₂), клетки пассировали с той же плотностью и культивировали при 5% O₂ в мультигазовом инкубаторе (Sanyo, Япония) до достижения 70-80% конфлуентного монослоя, затем вносили этопозид на 24, 48 и 72 часа. Оценку воздействия этопозид на ММСК в условиях дефицита ростовых факторов в течение 24 и 48 часов проводили по той же схеме при 20%, 5% и 1% O₂ в среде культивирования без ФТС. Условия гипоксии 1% O₂ создавали в гипоксических камерах (Stem Cell Technology, США).

Оценка жизнеспособности ММСК. Долю AnV⁺-клеток (ранний апоптоз), AnV⁺/PI⁺-клеток (постапоптотический некроз) и PI⁺-клеток (некроз) определяли с помощью набора Annexin V-FITC – PI (Beckman Coulter, США) по стандартной методике на проточном цитофлуориметре Epics XL (Beckman Coulter, США) согласно инструкции производителя. Анализировали не менее 10000 событий.

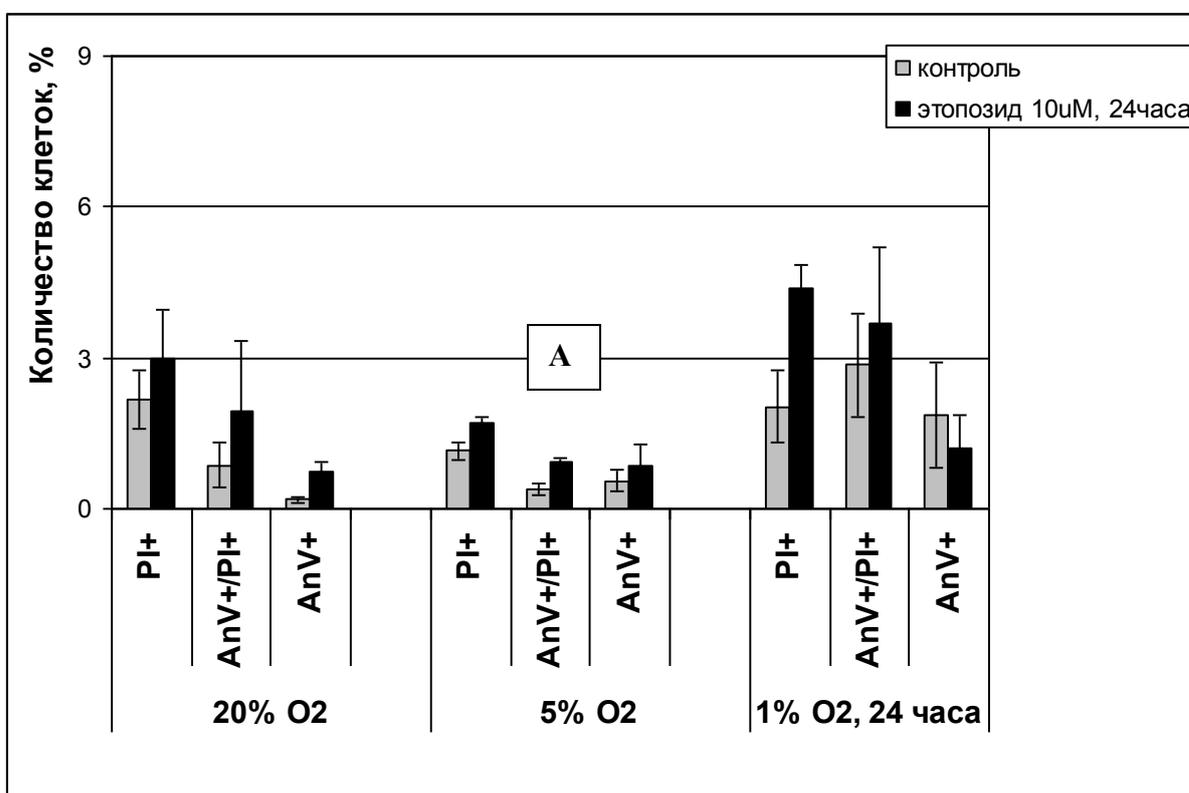
Статистический анализ проводили, используя пакет программ «Microsoft® Excel 2000». Для оценки достоверности различий использовали t-тест Стьюдента.

Результаты исследования

Оценка иммунофенотипа используемых в данной работе ММСК показала, что клетки экспрессировали CD54 (36 ÷ 56 %), CD73 (83 ÷ 100 %), CD90 (91 ÷ 100 %), CD105 (84 ÷ 99 %) и не имели маркеров, характерных для клеток гематогенного происхождения (CD34, CD11b). Адекватное участие ММСК в физиологических процессах определяется многими параметрами, в том числе содержанием кислорода в их микроокружении. Снижение концентрации кислорода в среде культивирования не вызывает изменения уровня экспрессии CD-маркеров (данные не приводятся). Ранее проведенные

исследования показали, что длительное культивирование ММСК из жировой ткани в условиях содержания кислорода близких к «физиологическому» (5% O₂) и ниже (1% O₂) способствует увеличению пролиферативной активности более, чем в 2 раза по сравнению со стандартными условиями культивирования (20% O₂). При этом оценка жизнеспособности ММСК продемонстрировала, что длительное воздействие пониженного содержания кислорода не оказывает проапоптотического действия [2].

Инкубация ММСК из жировой ткани человека с 10 мкМ этопозидом в течение 24 часов в стандартных условиях культивирования (20% O₂) не вызывала апоптоз, оцениваемый по появлению клеток окрашиваемых Аннексином V ($0,73 \pm 0,19$ % от общего числа проанализированных клеток). В то же время, этопозид приводил к появлению доли некротических клеткок (5.0%), определяемых попрокрашиванию PI а также комбинированным прокрашиванием AnV⁺/PI⁺ (стадия постапоптотического некроза). (.) .. В условиях «физиологического» содержания кислорода (постоянное культивирование при 5% O₂) количество некротических клеток было ниже (Рис 1).. При этом количество апоптотических клеток оставалось на уровне контроля и не превышало 1%. Сочетанное воздействия этопозида и гипоксии (1% O₂), наоборот, приводило к незначительному увеличению доли некротических клеток до $8,09 \pm 1,05$ % (PI+: $4,39 \pm 0,46$ %, AnV⁺/PI⁺: $3,70 \pm 1,49$ %) по сравнению с их количеством в условиях стандартного и «физиологического» содержания кислорода в среде культивирования (Рис. 1А).



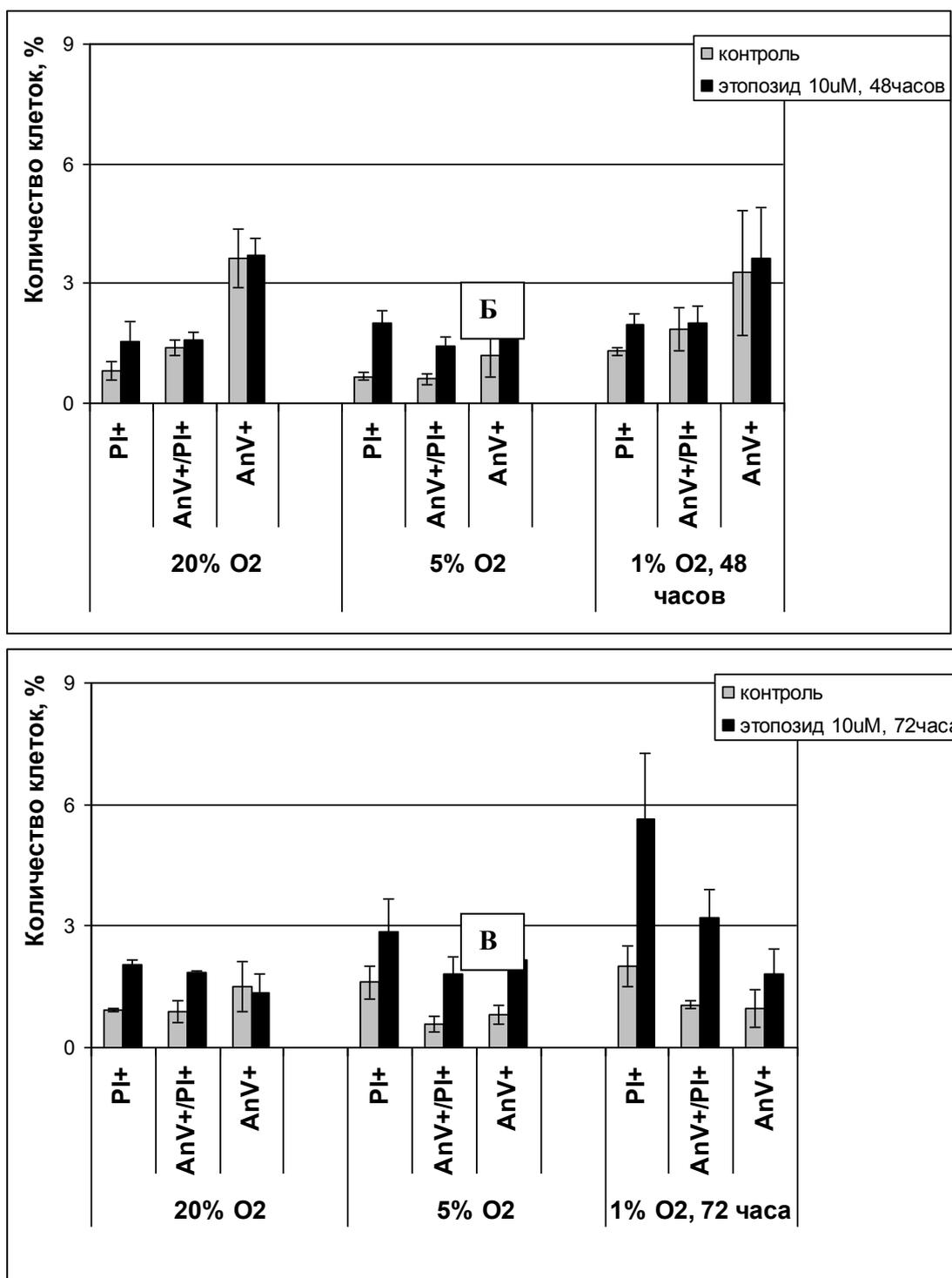


Рис 1. Доля ММСК, погибающих путем некроза и апоптоза при воздействии этопозида при различном содержании кислорода в среде культивирования в течение 24 часов (А), 48 часов (Б), 72 часов (В). Представлены средние значения по 3 независимым экспериментам.

Более длительная инкубация ММСК с этопозидом в течение 48 и 72 часов при различном содержании кислорода в среде культивирования (20%, 5% и 1% O₂) приводила к незначительным колебаниям количества апоптотических и некротических клеток. ов (Рис.1Б, В). ММСК сохраняли высокий уровень жизнеспособности, как в при 20%, так и при 5% O₂ в среде культивирования. Повышение концентрации этопозида до 100 мкМ не

оказывало дополнительного цитотоксического эффекта при тех же временных экспозициях. Не было выявлено и отсроченного действия этопозид (50 мкМ) через 24, 48 и 72 часа после 24-х часового воздействия (данные не представлены).

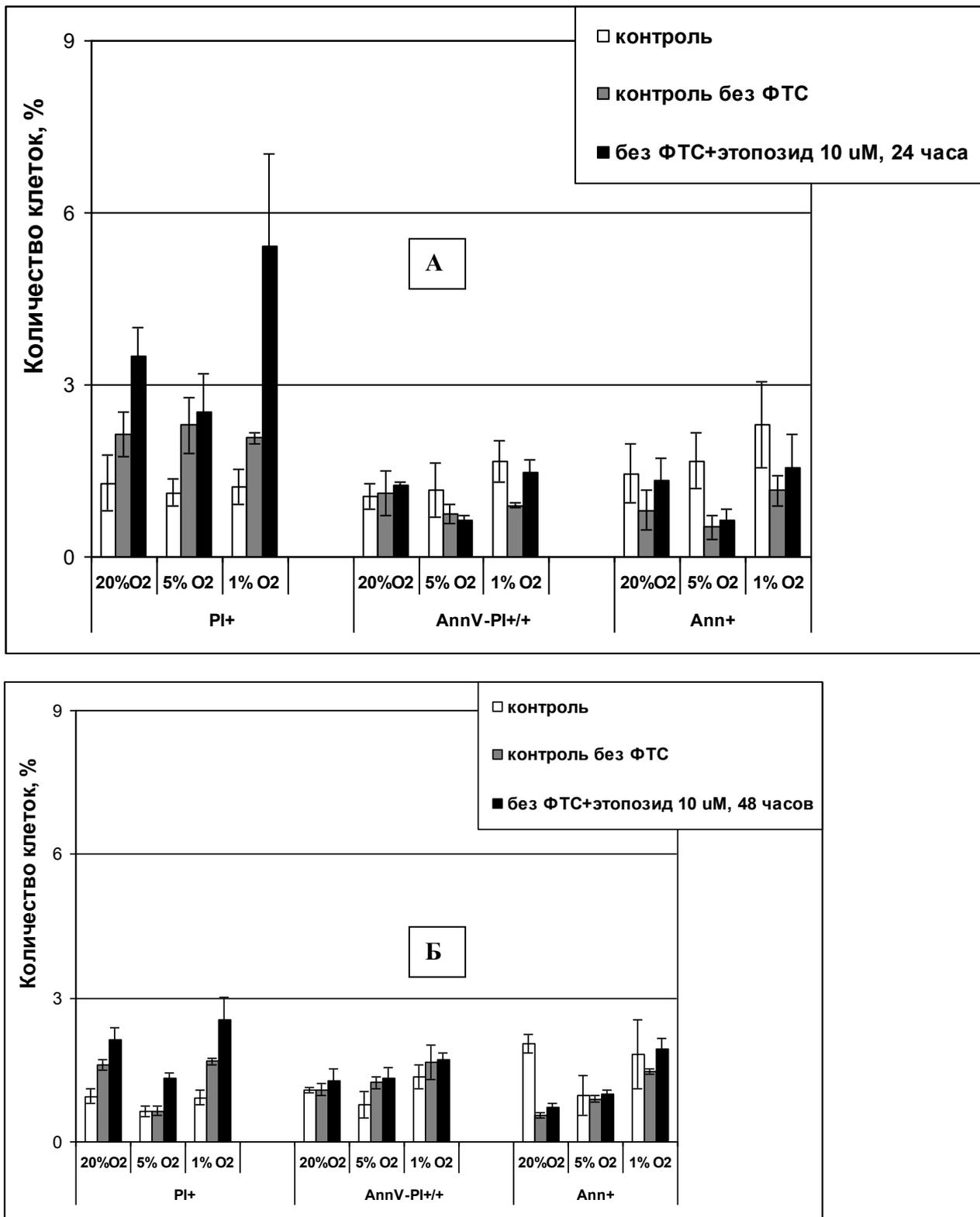


Рис. 2. Доля ММСК, погибающих путем некроза и апоптоза при воздействии этопозид при различном содержании кислорода в среде культивирования без ФТС в течение 24 часов (А), 48 часов (Б). Представлены средние значения 3 независимых экспериментов.

Воздействие этопозида на ММСК в условиях гипоксии и отсутствия в среде культивирования ростовых факторов, также не приводило к дополнительному снижению жизнеспособности клеток. Незначительная доля некротических клеток, наблюдалась через 24 часа в условиях 1% O₂ (PI+, AnV⁺/PI⁺: 6,91 ± 1,81%), что в 1,5 раза превышает значение при 20% O₂ и в 2 раза - при 5% O₂ (Рис. 2А). Увеличение времени экспозиции ММСК до 48 часов в этих условиях не оказывало выраженного повреждающего воздействия.

Механизм цитотоксического действия этопозида основан на угнетении митоза за счет ингибирования топоизомеразы II, при этом клетки блокируются в S-G2-интерфазе клеточного цикла. Также происходит подавление проникновения нуклеотидов через плазматическую мембрану (надо дать ссылку), что препятствует синтезу и восстановлению ДНК и может приводить к апоптозу. Механизм регуляции апоптоза, вызванного повреждением ДНК в прогениторных клетках, в настоящее время изучен недостаточно. Однако недавние исследования *in vitro* показали устойчивость ММСК костного мозга к этопозиду в низких дозах (10 мкМ) по сравнению с линиями опухолевых клеток, обладающих большей чувствительностью к данному препарату [8, 10]. Было высказано предположение, что устойчивость ММСК к повреждению ДНК ассоциирована с экспрессией белков семейства p53, играющих важную роль в клеточном выборе между апоптозом и арестом клеточного цикла [6, 9]. Вероятно, увеличение экспрессии этого белка позволяет ММСК осуществлять репарацию повреждений при блокировании клеточного цикла, избегая апоптоза [10]. Ранее был выявлен цитотоксический эффект на ММСК из жировой ткани крайне высоких доз этопозида (100-400 мкМ) [3]. В настоящем исследовании мы не обнаружили повреждающего действия как низких (10 мкМ), так и более высоких (50 мкМ и 100 мкМ) доз этопозида на ММСК из жировой ткани, ни сразу после воздействия, ни в отсроченный период времени. Наблюдаемое нами некоторое увеличение количества гибнущих ММСК в условиях гипоксии (1% O₂) и добавления этопозида может быть связано с более активной пролиферацией клеток и большей доступностью ДНК для повреждающего агента.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что этопозид в сочетании с гипоксией даже в условиях депривации факторов роста не оказывает выраженного проапоптотического действия на ММСК из жировой ткани человека. Такой повышенный порог чувствительности к цитотоксическим повреждениям расширяет наши представления об особенностях функционирования ММСК и делает их привлекательным объектом для дальнейшего клинического использования.

Литература:

1. Л. Б. Буравкова, О. С. Гринаковская, Е. Р. Андреева и др., *Цитология.*, 51, №1, 5-10 (2009).
2. Ю. В. Рылова, Е. Р. Андреева, Л. Б. Буравкова., *Авиакосм. и экол. мед.*, 44, №5, 38-41 (2010).
3. H. H. Cho, K.M. Kyoung, M. J. Seo, et. al., *Stem Cells Dev.*, 15, 853–864 (2006).
4. C. Fehrer, R. Brunauer, G. Laschober, et. al., *Aging Cell*, 6, No.6, 745-757 (2007).
5. W. L. Grayson, F. Zhao, R. Izadpanah, et al., *J Cell Physiol.*, 207, No. 2, 331–339 (2006).
6. S. Haupt, M. Berger, Z. Goldberg, et al., *J Cell Sci.*, 116, 4077– 4085 (2003).
7. C. Lamagna, G. Bergers, *J. Leukoc. Biol.*, 80, 677-681 (2006).
8. J. Li, H. K. W. Law, Y. L. Lau, et. al., *Br J Haematol.*, 127, No. 3, 326-334 (2004).
9. C. Lu, S. Lu, W. Liang, et. al., *Stem Cells Dev.*, 20, No. 8, 1319-1326 (2011).
10. L. P. Muller, J. Luetzkendorf, T. Muller, et. al., *Stem Cells.*, 24, 2753–2765 (2006).
11. M. F. Pittenger, A. M. Mackay, S.C. Beck, et. al., *Science*, 284, 143–147 (1999).
12. I. Rosova, M. Dao, B. Capoccia, et. al., *Stem Cells*, 26, 2173–2182 (2008).
13. L. S. Sasportas, R. Kasmieh, H. Wakimoto, et. al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 4822–4827 (2009).
14. T. Tallone, C. Realini, A. Böhmeler, et. al., *J. of Cardiovasc. Trans. Res.*, 4, 200–210 (2011).
15. P. A. Zuk, M. Zhu, H. Mizuno, et. al., *Tissue Eng.*, 7. No. 2, 211-228 (2001).