

DOI:10.15690/vramn614

Ю.В. Рылова¹, Л.Б. Буравкова^{1,2}, Б.Д. Животовский^{2,3}

¹ Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Российская Федерация

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация

³ Каролинский институт, Стокгольм, Швеция

Воздействие цисплатина на мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани человека при различном уровне кислорода

Цель исследования: оценить повреждающее воздействие цисплатина на мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) жировой ткани, находящиеся в фазе активной пролиферации и в состоянии монослоя, при стандартном (20%) и сниженном до 1 и 5% уровне кислорода в среде культивирования. **Методы.** Оценку влияния цисплатина на ММСК проводили после двух пассажей на культурах в состоянии монослоя и в активной фазе роста. Профиль поверхностных маркеров ММСК определяли с помощью проточной цитофлуориметрии. Жизнеспособность ММСК после инкубации с цисплатином оценивали по количеству апоптотических и некротических клеток с помощью набора ANNEXIN V-FITC — PI (Immunotech, Франция). Стандартные условия культивирования (~20% O₂) создавали в CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония), 5% O₂ — при помощи мультигазового инкубатора (Sanyo, Япония), 1% O₂ — с использованием герметичной камеры (Stemcell Technologies, США). **Результаты.** Инкубация ММСК в состоянии монослоя с цисплатином в концентрации 10 мкг/мл в течение 72 ч вызывала гибель практически половины клеток. Во всех условиях культивирования увеличивалась доля PI⁺- и PI⁺/Ann⁺-клеток. Более кратковременные экспозиции с цисплатином (24 и 48 ч) не оказывали выраженного повреждающего эффекта. Воздействие цисплатина на ММСК в активной фазе роста в течение 48 ч сопровождалось накоплением количества Ann⁺- и PI⁺/Ann⁺-клеток. При этом наименьшее повреждающее воздействие цисплатина оказывал на клетки, культивируемые в условиях гипоксии (1% O₂). **Заключение.** Полученные данные свидетельствуют, что ММСК в состоянии монослоя погибают преимущественно путем некроза, тогда как для культур ММСК в фазе роста в ответ на воздействие было характерно накопление клеток, погибающих путем апоптоза вне зависимости от уровня содержания кислорода в среде.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, гипоксия, цисплатин.

(Для цитирования: Рылова Ю.В., Буравкова Л.Б., Животовский Б.Д. Воздействие цисплатина на мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани человека при различном уровне кислорода. Вестник РАМН. 2016;71(2):114–120. doi: 10.15690/vramn614)

114

Yu.V. Rylova¹, L.B. Buravkova^{1,2}, B.D. Zhivotovky^{2,3}

¹ Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

³ Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

The Effects of Cisplatin on Human Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stromal Cells Under Different Oxygen Levels

Objective: To evaluate the damaging effects of cisplatin on MMSCs from adipose tissue in a phase of active proliferation and the state of the monolayer, this was exposed at standard (20%) and reduced to 1% and 5% level of oxygen. **Methods:** The effect of cisplatin was detected on monolayer cultures in the active growth phase after 2 passages. Profile surface markers of MMSC was determined by flow cytometry. MMSCs viability after incubation with cisplatin was detected by the number of apoptotic and necrotic cells using ANNEXIN V-FITC — PI Kit (Immunotech, France). Standard culture conditions (~20% O₂) were created in a CO₂ incubator (Sanyo, Japan), 5% O₂ — using multigas incubator (Sanyo, Japan), 1% O₂ — using an airtight chamber (Stemcell Technologies, USA). **Results:** Incubation of MMSC monolayer with cisplatin at a concentration of 10 µg/ml for 72 hours leads to death of half of the cells in the culture. Cisplatin increased the fracture of PI⁺-cell, and PI⁺/Ann⁺-cells under all culture conditions. The short-term exposure with cisplatin (24 and 48 hours) did not cause the damaging effect. Effects of cisplatin on the MMSC in the growth phase for 48 hours led to accumulation of Ann⁺-cells and PI⁺/Ann⁺-cells under all culture conditions. However, minimal noci-influence of cisplatin was observed in a culture under hypoxic conditions (1% O₂). **Conclusion:** These data suggest that MMSC monolayer dies primarily through necrosis, whereas MMSCs in the growth phase in response to cisplatin treatment dies by apoptosis, regardless the oxygen tension.

Key words: multipotent mesenchymal stromal cells, hypoxia, cisplatin.

(For citation: Rylova YuV, Buravkova LB, Zhivotovky BD. The Effects of Cisplatin on Human Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stromal Cells Under Different Oxygen Levels. Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2016;71(2):114–120. doi: 10.15690/vramn614)

Обоснование

В последнее время все больше внимания уделяют мультипотентным мезенхимальным стромальным клеткам (ММСК) в связи с их важной ролью в терапии [1–3]. Исследования, посвященные оценке устойчивости ММСК к различным ДНК-повреждающим агентам, являются крайне актуальными, так как химиотерапия остается основным методом лечения для большинства типов рака. Цисплатин (СРt) (цис-диамин-дихлорплатина) — один из самых мощных химиотерапевтических агентов, используемых против широкого спектра злокачественных опухолей, в том числе головы и шеи, семенников, яичников, мочевого пузыря и легких [4]. Тем не менее его положительные эффекты ограничены из-за токсического действия на нетрансформированные здоровые ткани организма [5]. Исследования показали, что в ответ на химиотерапию ММСК костного мозга мигрируют из своей ниши, по-видимому, с целью поддержки регенерации тканей [6]. В более ранних работах исследователи сконцентрировали свое внимание на воздействии химиотерапевтических агентов на этот тип ММСК, показав их устойчивость к низким дозам повреждающих агентов [7–9]. Хотя основным депо ММСК является костный мозг, в настоящее время хорошо известно, что резидентные ММСК присутствуют во всех тканях организма; кроме того, небольшая популяция таких клеток может циркулировать в периферической крови [10]. Уже сейчас накоплено значительное количество исследований, указывающих на положительные эффекты введения ММСК не только из костного мозга, но и других источников, при остром повреждении почек, вызванном химиотерапией [11–14]. Механизмы, посредством которых ММСК способны снижать повреждения, активно изучаются. Большая часть исследований свидетельствует о паракринном механизме протективной функции ММСК [12, 13]. При этом стоит отметить, что в зоне повреждения существенно меняется микроокружение, в том числе содержание кислорода. Экспериментальные исследования свидетельствуют об изменении функциональных свойств ММСК в условиях гипоксии [15, 16].

Цель исследования: оценить *in vitro* повреждающее действие цисплатина на ММСК жировой ткани, находящиеся в фазе активной пролиферации и в состоянии монослоя, при стандартном (20%) и сниженном (до 1 и 5%) уровне кислорода в среде культивирования.

Методы

Дизайн исследования

В исследовании использовали ММСК из жировой ткани человека. Выделение проводили, используя методику, описанную в работе Л.Б. Буравковой и соавт. [17]. Ткань измельчали и обрабатывали 0,075% раствором коллагеназы IA в среде α -MEM в течение 35 мин при 37 °С. Затем суспензию центрифугировали 2 раза в течение 5 мин при 1000 оборотов/мин, осадок ресуспендировали в полной питательной среде, состоящей из среды α -MEM (MP Biomedicals, США) с добавлением 50 мкг/мл амфотерицина В (Sigma-Aldrich, США), 50 ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина, 2 мМ L-глутамина (ПанЭко, Россия), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США). Клетки высевали в чашки Петри с плотностью 2–3 × 10³ ядросодержащих клеток на см². Смену среды проводили каждые 72 ч.

Оценку влияния СРt на ММСК проводили после двух пассажей на культурах, находящихся в состоянии монослоя, а также в активной стадии пролиферации. Для изучения воздействия в состоянии монослоя клетки пересеивали в чашки Петри диаметром 60 мм, плотностью 2–3 × 10³ кл/см² и культивировали в СО₂-инкубаторе (Sanyo, Япония) до достижения 80–90% конфлюэнтного монослоя, затем вносили СРt в концентрации 10 мкг/мл и помещали в условия 20% О₂, 5% О₂ и 1% О₂ на 24, 48 и 72 ч. Для изучения влияния СРt на ММСК в активной фазе роста культуры клетки пассировали с той же плотностью и культивировали при 20% О₂, 5% О₂ и 1% О₂ в течение 48 ч, затем вносили СРt в концентрации 10 мкг/мл на 48 ч.

Условия исследования

Стандартные условия культивирования (~20% О₂) создавали в СО₂-инкубаторе (5% СО₂, 95% воздуха) (Sanyo, Япония), 5% О₂ — в мультигазовом инкубаторе (5% СО₂, 5% О₂, 90% N₂) (Sanyo, Япония), 1% О₂ — в герметичной камере (Stemcell Technologies, США), модифицированной датчиками давления, продувая газовой смесью (95% N₂, 5% СО₂) до установления концентрации кислорода 1%.

Критерии соответствия

Профиль поверхностных маркеров, характерный для ММСК, определяли с помощью моноклональных антител, меченных флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) или фикоэритрином (PE) к антигенам CD31, CD54, CD73, CD90, CD105, HLA-ABC, по стандартной методике на проточном цитофлуориметре Epics XL (Beckman Coulter, США) согласно инструкции производителя. В качестве изотипического контроля к антителам использовали FITC- и PE-меченные IgG соответствующего класса.

Методы регистрации

Жизнеспособность ММСК после инкубации с СРt оценивали по количеству апоптотических и некротических клеток методом проточной цитофлуориметрии с помощью набора ANNEXIN V-FITC — PI (Immunotech, Франция) согласно инструкции производителя. Апоптотические клетки определялись за счет высокоаффинного связывания аннексина V, меченного FITC, с фосфолипидом фосфатидилсеринном, который на ранней стадии апоптоза перемещается на внешний слой мембраны клетки. Некротические клетки определяли за счет связывания йодида пропидия с ДНК при повреждении целостности мембран. Детектируемое смешанное окрашивание (AnnV⁺/PI⁺) анализируемых клеток свидетельствует о том, что клетка находится на поздней стадии апоптоза, так как йодид пропидия проникает через поврежденную мембрану клетки [18].

Клетки, осторожно ресуспендируя, помещали в охлажденный при 4 °С связывающий буфер из расчета не менее 100 тыс. клеток на 100 μ л буфера в каждой пробе и вносили по 5 μ л йодида пропидия и 1 μ л аннексина V-FITC, инкубировали в течение 15 мин при 4 °С, затем добавляли в каждую пробу по 400 μ л связывающего буфера, ресуспендировали и оценивали количество поврежденных клеток на проточном цитофлуориметре Epics XL (Beckman Coulter, США). Анализировали не менее 10 000 событий.

Статистический анализ

Статистический анализ и обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica v. 6.0 (StatSoft Inc., США). Для определения досто-

верности различий в случае негауссовых распределений использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Критический уровень значимости был принят за 5% (0,05). Данные представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка среднего арифметического.

Результаты

Для идентификации выделенных и культивируемых в различных условиях клеток были использованы наиболее часто применяемые поверхностные маркеры ММСК. Цитофлуориметрическое исследование показало, что во всех исследуемых культурах доля клеток, стабильно экспрессирующих на поверхности такие антигены, как CD73, CD90, CD105, HLA-ABC, составляла более 90%. Небольшое количество CD54⁺-клеток (~36%) связано с тем, что данная молекула (молекула межклеточной адгезии 1-го типа, ICAM-1) является индуцибельной, а для выраженной экспрессии ICAM-1 на поверхности необходима активация клеток цитокинами (IL 1β и IFN γ) [19]. Следовательно, в используемых клетках отсутствует провоспалительная активация. Кроме того, в культурах не детектировались клетки с поверхностным маркером CD31, характерным для эндотелиальных клеток, что свидетельствует о чистоте полученных адгезивных культур ММСК (рис.).

Инкубация ММСК в состоянии монослоя с СРt в концентрации 10 мкг/мл за первые 24 ч не вызывала увеличения доли как апоптотических, так и некротических клеток. В культурах, помещенных в условия 20% O₂, общая доля поврежденных клеток составила 5,1%, в условиях 5% O₂ — 4,8%, а при 1% O₂ — 6,1%, что существенным образом не отличалось от контроля (табл. 1). Более длительная инкубация в течение 48 ч увеличивала долю некротических PI⁺-клеток и клеток, имеющих двойное

окрашивание йодидом пропидия и аннексином V (Ann⁺/PI⁺-клетки). При этом доля апоптотических (Ann⁺-клеток также несколько увеличивалась, но не превышала 3% как при стандартных условиях культивирования (20% O₂), так и при снижении концентрации кислорода в среде до 5 и 1% (см. табл. 1). Общее количество поврежденных клеток было одинаковым и не зависело от содержания кислорода в среде культивирования, составляя 15% от общего числа клеток. В контрольных культурах условия гипоксии не оказывали повреждающего воздействия, количество живых клеток превышало 95%.

Инкубация с СРt в течение 72 ч вызывала гибель практически половины клеток в культуре как при 20% O₂, так и при 5 и 1% O₂ в среде. Доля PI⁺-клеток возрастала до 10,2±3,8, 13,6±5,5 и 24,8±1,6% при 1; 5 и 20% O₂, соответственно. Количество Ann⁺/PI⁺-клеток также значительно увеличивалось и составляло 24,6±1,6% при стандартных условиях, 34,6±2,3 и 9,7±0,7% — соответственно, при 1 и 5% O₂. При этом доля апоптотических Ann⁺-клеток в культурах ММСК в состоянии монослоя при воздействии СРt в течение 72 ч существенно не возрастала и варьировала от 3 до 5% как при стандартных условиях, так и в условиях гипоксии (см. табл. 1). Контрольные культуры без добавления СРt сохраняли высокий уровень жизнеспособности (более 95%).

Оценку воздействия на культуры ММСК в активной фазе роста проводили в течение 48 ч. Результаты показали, что в отличие от клеток в состоянии монослоя в пролиферирующих культурах при воздействии СРt доля апоптотических Ann⁺-клеток существенно возрастала и достигала 10,0±1,3% при 1% O₂, 10,8±1,7% при 5% O₂ и 12,7±0,6% при 20% O₂. Количество клеток с двойным окрашиванием (Ann⁺/PI⁺-клеток) составляло 18,3±6,6% при 1% O₂, 23,1±6,6% при 5% O₂ и 19,2±1,4% при 20% O₂, тогда как некротические PI⁺-клетки практически отсутствовали в культурах и при стандартных условиях,

116

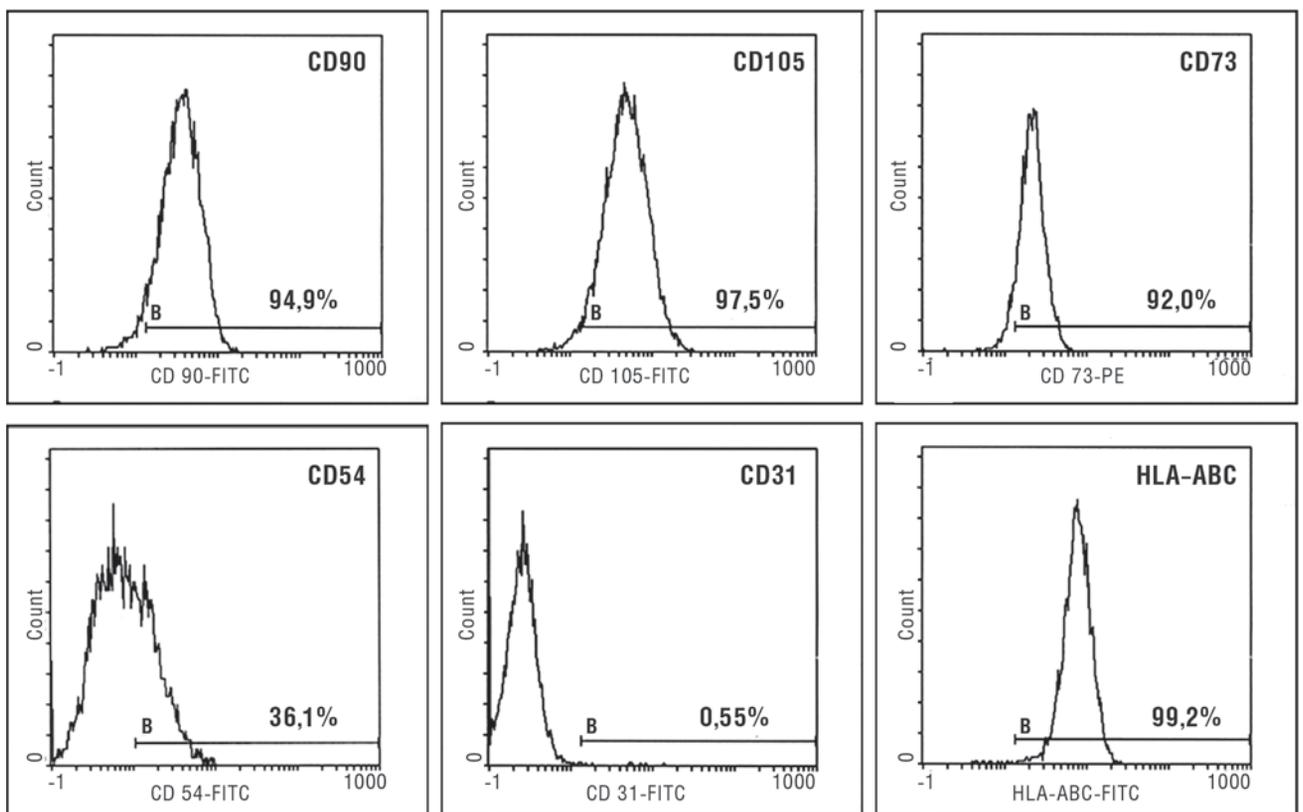


Рис. 1 Иммунофенотип мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из жировой ткани человека
Примечание. Представлены репрезентативные данные для клеток 2-го пассажа.

Таблица 1. Количество мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), погибающих в результате некроза и апоптоза при воздействии цисплатина (СРt) в дозе 10 мкг/мл в состоянии монослоя при разном содержании кислорода в среде культивирования в течение 24, 48 и 72 ч

Показатель	PI ⁺ , %	AnnV-PI ^{+/+} , %	Ann ⁺ , %	AnnV-PI ^{-/-} , %
<i>1% O₂</i>				
Контроль, 24 ч	1,0±0,5	1,6 ±0,6	1,4±1,2	96,1±1,9
СРt, 24 ч	3,0±0,5	2,1±0,5	0,9±0,2	93,9±0,9
Контроль, 48 ч	1,5±0,4	0,8±0,2	0,4±0,2	97,3±0,1
СРt, 48 ч	3,9±0,7	9,6±1,3*	2,2±0,5	84,4±1,2*
Контроль, 72 ч	1,9±0,4	1,4±0,4	1,5±0,6	95,2±0,8
СРt, 72 ч	10,2±3,8**	24,6±1,6**	5,8±0,8*	59,4±4,0*
<i>5% O₂</i>				
Контроль, 24 ч	1,1±0,3	0,4±0,1	1,0±0,3	97,5±0,2
СРt, 24 ч	2,6±0,6	1,4±0,3	0,8±0,0	95,2±0,9
Контроль, 48 ч	0,9±0,0	0,7±0,3	0,5±0,3	98,0±0,6
СРt, 48 ч	6,9±1,4*	5,8±0,4*	2,9±0,0*	84,4±1,3*
Контроль, 72 ч	1,4±0,4	0,5±0,2	0,6±0,2	97,5±0,7
СРt, 72 ч	13,6±5,5**	34,6±2,3**	4,8±0,4*	47,2±7,0**
<i>20% O₂</i>				
Контроль, 24 ч	2,2±0,5	1,0±0,3	0,4±0,3	96,4±0,4
СРt, 24 ч	2,2±0,7	1,6±0,5	1,3±0,4	94,9±0,5
Контроль, 48 ч	0,8±0,3	1,1±0,2	1,7±0,4	96,5±0,7
СРt, 48 ч	2,3±0,6	9,9±2,8*	3,1±0,8	84,8±3,1*
Контроль, 72 ч	1,0±0,0	0,8±0,2	1,2±0,5	97,0±0,7
СРt, 72 ч	24,8±1,6*	9,7±0,7*	3,2±0,2*	62,4±0,7*

Примечание. Здесь и в табл. 2: PI⁺ — ММСК, погибающие некрозом, Ann⁺/PI⁺ — ММСК на поздней стадии апоптоза, Ann⁺ — ММСК на ранней стадии апоптоза, AnnV-PI^{-/-} — живые ММСК. Представлены средние значения по 3 независимым экспериментам: *p*<0,05 по сравнению с контролем (*) и 20% O₂ (+).

и при гипоксии. При этом наименьшее повреждающее воздействие СРt оказал на клетки, культивируемые в условиях гипоксии (1% O₂): количество живых клеток в этих условиях после воздействия цитостатика составляло 71,0 ± 6,2%, тогда как в условиях 5 и 20% O₂ их оставалось 64,7 ± 5,7 и 66,7 ± 2,2%, соответственно (табл. 2).

Обсуждение

В последнее десятилетие во всем мире возрос интерес к мультипотентным мезенхимальным стромальным клеткам взрослого организма. ММСК из жировой ткани и других источников уделяют много внимания из-за

Таблица 2. Количество мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, погибающих в результате некроза и апоптоза при воздействии СРt (10 мкг/мл) в фазе роста культуры при разном содержании кислорода в среде культивирования в течение 48 ч

Показатель	PI ⁺ , %	AnnV-PI ^{+/+} , %	Ann ⁺ , %	AnnV-PI ^{-/-} , %
<i>1% O₂</i>				
Контроль, 48 ч	1,1±0,4	1,9±0,2	0,8±0,2	96,2±0,2
СРt, 48 ч	0,7±0,1	18,3±6,6	10,0±1,3	71,0±6,2
<i>5% O₂</i>				
Контроль, 48 ч	1,2±0,2	1,2±0,3	0,7±0,4	96,9±0,8
СРt, 48 ч	1,3±0,5	23,1±6,6	10,8±1,7	64,7±5,7
<i>20% O₂</i>				
Контроль, 48 ч	1,2±0,5	2,3±0,8	1,0±0,6	95,5±0,9
СРt, 48 ч	1,4±0,2	19,2±1,4	12,7±0,6	66,7±2,2

возможного использования их не только в исследовательских, но и клинических целях. Многочисленные исследования в моделях на животных и перспективные клинические исследования показали, что ММСК взрослого организма успешно зарекомендовали себя в процессах репарации и регенерации костной, хрящевой ткани, тканей миокарда и могут применяться для лечения тканей и органов, поврежденных в результате химиотерапии [1–3, 13, 14].

В данном исследовании проведена оценка токсического воздействия алкилирующего агента СРt на ММСК жировой ткани в условиях различного содержания кислорода. Известно, что основными путями гибели клеток при воздействии СРt в зависимости от его концентрации являются апоптоз или некроз. Низкие концентрации этого агента (3 мкг/мл) в первую очередь вызывают апоптоз, а более высокие — преимущественно индуцируют некроз [13]. Однако результаты нашего исследования выявили различие в путях гибели клеток в зависимости от конfluэнтности культуры при использовании одинаковой дозы СРt. В культурах в состоянии монослоя после инкубации с цитостатиком детектировались преимущественно некротические клетки в отличие от культур в активной фазе роста, где окрашенные только йодидом пропидия клетки (PI⁺) не детектировались, а возрастало количество апоптотических Ann⁺-клеток.

Механизм цитотоксического действия препаратов на основе платины связан с формированием сшивок двухцепочечной молекулы ДНК, что приводит к ингибированию репликации и транскрипции. На повреждение ДНК клетки реагируют активацией внутриклеточных каскадов реакций, приводящих к репарации ДНК или к остановке клеточного цикла и апоптозу [4]. Белок p53, главный супрессор опухолевых клеток, являясь регулятором клеточного цикла и апоптоза, играет ключевую роль в чувствительности к СРt. Повреждение ДНК, вызванное цитостатиком, активирует экспрессию p53, который регулирует транскрипцию белка p21. Экспрессия p21, в свою очередь, ингибирует действие циклинзависимых киназ 1-го и 2-го типа (Cdk1 и Cdk2), вызывая тем самым остановку клеточного цикла. В том случае, если повреждения ДНК непоправимы, p53 запускает гибель клетки по пути апоптоза [4].

В ряде работ показано, что после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток большинство ММСК в костном мозге, тем не менее, имело происхождение реципиента [3, 8], и высказано предположение, что они не чувствительны к ДНК-повреждающим химиотерапевтическим агентам. Предположение подкрепляется тем фактом, что в исследованиях *in vitro* эти клетки также оказались устойчивыми к панели химиотерапевтических препаратов, особенно в клинической дозе, обычно используемой у больных при интенсивной химиотерапии [8, 9, 12, 20]. Так, в работе W. Liang и соавт. при использовании низких концентраций СРt (до 10 мкМ) в течение 72 ч отмечалась выраженная устойчивость ММСК костного мозга, тогда как увеличение дозы до 50 мкМ сопровождалось резким снижением их жизнеспособности: только около 10% клеток популяции оставались живыми. Использование 10 мкМ СРt сохраняло около 60% клеток культуры [20]. Чуть позже аналогичные данные были получены той же группой ученых и для ММСК жировой ткани человека [21]. При этом исследователи делают вывод, что ММСК человека имеют повышенный порог к индукции апоптоза ДНК-повреждающими агентами, такими как СРt, так как они

приводят к увеличению экспрессии белка p53, который, однако, не индуцирует апоптоз в клетках [9, 20]. Ученые предполагают, что спорный феномен, наблюдаемый в ММСК костного мозга и жировой ткани, может быть механизмом защиты, в частности, в стромальных клетках. Остановка клеточного цикла в результате экспрессии p53 может дать клеткам время, чтобы осуществить репарацию повреждений и поддержать свои характеристики [20].

В нашем исследовании подобный уровень жизнеспособности (~60% живых клеток) отмечен в монослойных культурах ММСК жировой ткани при использовании более высокой дозы СРt, которая соответствовала ~30 мкМ, и соотносится с данными группы W. Liang и соавт., так как в этих условиях так же не обнаружено увеличения доли апоптотических клеток.

Тем не менее в своей работе M. Seifrtova и соавт. оценивали воздействие высоких и низких доз СРt на растущей культуре ММСК пульпы зуба, 50% конfluэнтности, где показали, что 40 мкМ в течение 72 ч приводили к снижению жизнеспособности (~58% клеток оставались живыми). Меньшие концентрации (менее 20 мкМ) не оказывали сильного повреждающего воздействия. Воздействие 40 мкМ цисплатина в течение 72 ч вызывало увеличение доли апоптотических клеток до 18% в культуре ММСК пульпы зуба, что сопровождалось активацией экспрессии p53, p21 и накоплением доли клеток, находящихся в S- и G2/M-фазах клеточного цикла. Однако исследователи показали активацию митогенактивируемых протеинкиназ (Mitogen-Activated Protein Kinases, MAPK), предполагая их участие в активации апоптоза в ММСК пульпы зуба в ответ на воздействие СРt. MAPK играют решающую роль в балансе клеточных ответов на различные факторы — апоптоз, выживание, пролиферацию и др. Три основные MAPK принимают активное участие в этих процессах. Активация каскадов с участием c-Jun-N-концевой киназы (JNK) и p38 запускает проапоптотические реакции, тогда как каскад, опосредованный ERK1/2, связан с пролиферацией клеток и антиапоптотическим процессом. Активация тех или иных MAPK является специфичной для типа клеток и зависит от сложной сети сигнальных путей внутри них [4].

Несмотря на то, что в состоянии монослоя количество живых ММСК после воздействия СРt не зависело от содержания кислорода в среде культивирования, некоторое протективное действие гипоксии (1% O₂) было отмечено в культурах ММСК в активной фазе роста. Участие гипоксия-индуцируемого фактора-1 (HIF-1) в обеспечении жизнеспособности ММСК в условиях гипоксии в настоящее время подтверждено многими исследованиями [22, 23]. Гипоксия приводит к стабилизации HIF-1 и увеличению продукции VEGF и других ростовых факторов. При этом аутокринное воздействие VEGF активирует PI3K-путь, что вызывает фосфорилирование Akt и впоследствии способствует обеспечению более высокого уровня жизнеспособности [24]. Кроме того, растущий объем экспериментальных данных свидетельствует о том, что в некоторых типах злокачественных образований положительные эффекты СРt заметно уменьшались в связи с условиями гипоксии. Многие из HIF-1 индуцибельных молекул, таких как ростовые факторы, транспортеры (Glut-1, Mdr-1), антиапоптотический белок Bcl-2, прямо или опосредованно могут участвовать в развитии резистентности к химиотерапевтическим препаратам [25].

Заклучение

В результате проведенного исследования было выявлено отличие пути гибели ММСК жировой ткани в зависимости от конfluenceности культуры при воздействии высокой дозы ДНК-повреждающего агента СРt. Культуры в состоянии монослоя погибали преимущественно путем некроза, тогда как для культур в фазе роста в ответ на воздействие было характерно накопление клеток, погибающих путем апоптоза вне зависимости от уровня содержания кислорода в среде. При этом в обоих типах культур общее количество поврежденных клеток не превышало 50%, что свидетельствует о наличии механизмов защиты, обеспечивающих достаточный уровень жизнеспособности этих клеток. Более подробное исследование механизмов, лежащих в основе устойчивости

ММСК к ДНК-повреждающим агентам с учетом возможных условий микроокружения *in vivo* имеет важное значение для дальнейшего применения этих клеток в регенеративной медицине.

Источники финансирования

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №14-04-00933.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о которых необходимо сообщить.

ЛИТЕРАТУРА

- Harvey RL, Chopp M. The therapeutic effects of cellular therapy for functional recovery after brain injury. *Phys Med Rehabil Clin N Am*. 2003;14(1):143–151. doi:10.1016/s1047-9651(02)00058-x.
- Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(13):8932–8937. doi:10.1073/pnas.132252399.
- Stamm C, Kleine HD, Westphal B, et al. CABG and bone marrow stem cell transplantation after myocardial infarction. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2004;52(3):152–158. doi:10.1055/s-2004-817981.
- Seifrtova M, Havelk R, Mielova J, et al. The response of human ectomesenchymal dental pulp stem cells to cisplatin treatment. *International Endodontic Journal*. 2011;45(5):401–412. doi:10.1111/j.1365-2591.2011.01990.x.
- Momekov G, Ferdinandov D, Bakalova A, et al. In vitro toxicological evaluation of a dinuclear platinum (II) complex with acetate ligands. *Arch Toxicol*. 2006;80(9):555–560. doi:10.1007/s00204-006-0078-0.
- Shaked Y, Henke E, Roodhart JM, et al. Rapid chemotherapy-induced acute endothelial progenitor cell mobilization: implications for antiangiogenic drugs as chemosensitizing agents. *Cancer Cell*. 2008;14(3):263–273. doi:10.1016/j.ccr.2008.08.001.
- Chen MF, Lin CT, Chen WC, et al. The sensitivity of human mesenchymal stem cells to ionizing radiation. *Int J Rad Oncol Biol Phys*. 2006;66(1):244–253. doi:10.1016/j.ijrobp.2006.03.062.
- Li J, Law HK, Lau YL, et al. Differential damage and recovery of human mesenchymal stem cells after exposure to chemotherapeutic agents. *Br J Haematol*. 2004;127(3):326–334. doi:10.1111/j.1365-2141.2004.05200.x.
- Mueller LP, Luetzkendorf J, Mueller T, et al. Presence of mesenchymal stem cells in human bone marrow after exposure to chemotherapy: evidence of resistance to apoptosis induction. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*. 2006;24(12):2753–2765. doi:10.1634/stemcells.2006-0108.
- Young HE, Steele TA, Bray RA, et al. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat Rec*. 2001;264(1):51–62. doi:10.1002/ar.1128.
- Ahn JM, You SJ, Lee YM, et al. Hypoxia inducible factor activation protects the kidney from gentamicin-induced acute injury. *PLoS One*. 2012;7(11):e48952. doi:10.1371/journal.pone.0048952.
- Zarjou A, Kim J, Traylor AM, et al. Paracrine effects of mesenchymal stem cells in cisplatin-induced renal injury require heme oxygenase-1. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011;300(1):254–262. doi:10.1152/AJPRENAL.00594.2010.
- Wang WW, Wang W, Jiang Y, et al. Human adipose derived stem cells modified by HIF-1 α accelerate the recovery of cisplatin induced acute renal injury in vitro. *Biotechnol Lett*. 2014;36(3):667–676. doi:10.1007/s10529-013-1389-x.
- Zhou Y, Xu H, Xu W, et al. Exosomes released by human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against cisplatin induced renal oxidative stress and apoptosis in vivo and in vitro. *Stem Cell Research & Therapy*. 2013;4(2):34. doi:10.1186/scrt194.
- Buravkova LB, Rylova YV, Andreeva ER, et al. Low ATP level is sufficient to maintain the uncommitted state of multipotent mesenchymal stem cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013;1830:4418–25. doi:10.1016/j.bbagen.2013.05.029.
- Fehrer C, Brunauer R, Laschober G, et al. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell*. 2007;6(6):745–757. doi:10.1111/j.1474-9726.2007.00336.x.
- Буравкова Л.Б., Гринаковская О.С., Андреева Е.Р., Жамбалова А.П., Козионова М.П. Характеристика мезенхимных стромальных клеток из липоасpirата человека, культивируемых при пониженном содержании кислорода // *Цитология*. – 2009. – Т. 51. – №1. – С. 5–11. [Buravkova LB, Grinakovskaya OS, Andreeva ER, et al. Characteristics of human lipoaspirate-isolated mesenchymal stromal cells cultivated under lower oxygen tension. *Cell tissue biol*. 2009;51(1):5–11. (In Russ.)] doi:10.1134/S1990519X09010039
- Хайтов Р.М., Пинегин Б.В., Ярилин А.А. Руководство по клинической иммунологии: диагностика заболеваний иммунной системы: руководство для врачей. – М.: ГЭОТАР-Медиа; 2009. 352 с. [Khaitov RM, Pinegin BV, Yarilin AA. *Rukovodstvo po klinicheskoi immunologii: diagnostika zabolevanii immunnnoi sistemy: rukovodstvo dlya vrachei*. Moscow: GEOTAR-Media; 2009. 352 p. (In Russ.)]
- Pober JS, Gimbrone MA Jr, Lapierre LA, et al. Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin-1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *J Immunol*. 1986;137(6):1893–1896.
- Liang W, Lu C, Li J, et al. p73 α regulates the sensitivity of bone marrow mesenchymal stem cells to DNA damage agents. *Toxicology*. 2010;270(1):49–56. doi:10.1016/j.tox.2010.01.011.
- Liang W, Xia H, Li J, et al. Human adipose tissue derived mesenchymal stem cells are resistant to several chemotherapeutic agents. *Cytotechnology*. 2011;63(5):523–530. doi:10.1007/s10616-011-9374-5.
- Greijer AE, van der Wall E. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol*. 2004;57(10):1009–1014.

23. Bhang SH, Cho SW, Lim JM. Locally delivered growth factor enhances the angiogenic efficacy of adipose-derived stromal cells transplanted to ischemic limbs. *Stem Cells*. 2009;27(8):1976–1986. doi: 10.1002/stem.115.
24. Stubbs SL, Hsiao ST, Peshavariya HM, et al. Hypoxic preconditioning enhances survival of human adipose derived stem cells and conditions endothelial cells in vitro. *Stem Cells Dev*. 2012;21(11):1887–1896. doi: 10.1089/scd.2011.0289.
25. Doktorova H, Hrabeta J, Khalil MA, et al. Hypoxia induced chemoresistance in cancer cells: The role of not only HIF-1. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2015;159(2):166–177. doi: 10.5507/bp.2015.025.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Рылова Юлия Владимировна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории клеточной физиологии ФГБУН «Государственный научный центр Российской Федерации — Институт медико-биологических проблем РАН»

Адрес: 123007, Москва, ул. Хорошевское шоссе, д. 76а, **тел.:** +7 (499) 195-65-44, **e-mail:** yuliaril@mail.ru

Буравкова Людмила Борисовна, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заместитель директора по науке, заведующая лабораторией клеточной физиологии ФГБУН «Государственный научный центр Российской Федерации — Институт медико-биологических проблем РАН»

Адрес: 123007, Москва, ул. Хорошевское шоссе, д. 76а, **тел.:** +7 (499) 195-22-43, **e-mail:** buravkova@imbp.ru

Животовский Борис Давидович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией исследования механизмов апоптоза, профессор кафедры фармацевтической химии, факультета фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский пр., д. 27 корп. 1, **тел.:** +7 (495) 932 9830, **e-mail:** Boris.Zhivotovsky@ki.se