

РОЛЬ МАР-КИНАЗЫ p38 В РАЗВИТИИ СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННОГО СТАРЕНИЯ ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

© А. В. Бородкина,¹ А. Н. Шатрова,¹ Н. Н. Никольский,^{1,2} Е. Б. Бузова¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064,
и ²Факультет медицинской физики С.-Петербургского государственного
политехнического университета, Санкт-Петербург, 195251;
¹электронный адрес: borodkina618@gmail.com

Ранее мы обнаружили, что эндометриальные стволовые клетки человека (эМСК) в условиях сублетального окислительного стресса, индуцированного действием H₂O₂, подвергаются преждевременному старению через сигнальный путь ATM/Chk2/p53/p21/Rb. Мы продемонстрировали вовлеченность МАР-киназы p38 в развитие стресс-индуцированного старения эМСК, используя ингибитор SB203580 (SB). В настоящей работе с целью подтверждения роли p38 в развитии H₂O₂-индуцированного старения эМСК использовали другой ингибитор киназной активности p38, характеризующийся большей селективностью, — BIRB796 (BIRB). Оказалось, что обработка H₂O₂-стимулированных эМСК ингибитором BIRB предотвращала увеличение размера клеток и уровня эндогенно генерируемых активных форм кислорода и приводила к частичному восстановлению пролиферации и появлению фосфорилирования белка Rb. Полученные результаты убедительно доказывают роль киназы p38 в H₂O₂-индуцированном старении эМСК, а также позволяют рассматривать ингибирование p38 как перспективный подход для предотвращения его развития.

Ключевые слова: эндометриальные стволовые клетки, окислительный стресс, преждевременное старение, МАР-киназа p38.

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода, эМСК — эндометриальные мезенхимные стволовые клетки человека, МАРКАРК-2 (или МК-2) — протеинкиназа 2, активируемая МАР-киназой (MAP kinase-activated protein kinase 2), Rb — белок ретинобластомы, SASP — ассоциированный со старением секреторный фенотип (senescence associated secretory phenotype).

Первые экспериментальные доказательства репликативного старения клеток в культуре были получены Л. Хейфликом более полувека назад (Hayflick, Moorhead, 1961). С тех пор понятие клеточного старения значительно расширилось: наряду с репликативной стали выделять онкоген- и стресс-индуцированные формы. Под клеточным старением вне зависимости от формы 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. 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). Не менее важным признаком клеточного старения является секреция стареющими клетками множества различных факторов, что принято называть ассоциированным со старением секреторным фенотипом (senescence associated secretory phenotype, SASP) (Coppe

et al., 2008; Kuilman, Peeper, 2009). Феномен клеточного старения приобретает особое значение в контексте мезенхимных стволовых клеток (МСК), поскольку, с одной стороны, остановка пролиферации этих клеток равносильна утрате их способности регенерировать поврежденные ткани, а с другой — секретлируемые стареющими клетками факторы могут инициировать канцерогенез в соседних клетках (Moiseeva et al., 2013), что повышает риск развития рака при трансплантации МСК. С учетом этих обстоятельств фундаментальные исследования преждевременного старения стволовых клеток являются весьма актуальным направлением.

Проблема регуляции клеточного старения тесно связана с исследованием роли МАР-киназ, активность которых модулируется в процессе старения клеток (Maruyama et al., 2009; Debacq-Chainiaux et al., 2010). При изучении стресс-индуцированного старения клеток внимание исследователей сконцентрировано на регуляторной роли стресс-киназ МАР-киназного каскада, в частности киназы p38 (Han, Sun, 2007; Maruyama et al., 2009; Passos et al., 2010; Guo et al., 2013). В настоящее время в клетках млекопитающих идентифицированы четыре изоформы этой киназы — p38α, p38β, p38γ и p38δ, причем p38α является доминирующей. Киназа p38 активируется в ответ на дей-

ствии различных стрессовых факторов, таких как тепловой и осмотический шок, УФ- и γ -облучение, гипоксия, окислительный стресс (Iwasa et al., 2003; Mezhrig et al., 2005; Zdanov et al., 2006). Имеющиеся данные о роли p38 в клеточном старении достаточно противоречивы. Например, во многих типах опухолевых клеток активация p38 не является необходимым и достаточным условием стресс-индуцированного преждевременного старения (Naq et al., 2002; Lee et al., 2010). Напротив, p38 играет определяющую роль в преждевременном старении фибробластов, которое инициируется гиперэкспрессией онкогенов, укорочением теломер, активацией Ras—Raf-сигналинга и окислительным стрессом (Chen, Ames, 1994; Iwasa et al., 2003; Han, Sun, 2007). Таким образом, вклад киназы p38 в развитие старения во многом зависит от клеточного контекста и от природы стресса.

Ранее мы показали, что эндометриальные стволовые клетки человека (эмСК) в условиях сублетального окислительного стресса подвергаются преждевременному старению через сигнальный путь ATM/Chk2/p53/p21/Rb (Borodkina et al., 2014). Кроме того, мы выявили H_2O_2 -индуцированную активацию p38 и продемонстрировали участие этой киназы в процессе развития старения эмСК с использованием ингибитора SB203580 (SB) (Borodkina et al., 2014). Необходимо отметить, что SB, традиционно применяемый для подавления активности p38, обладает рядом существенных недостатков. Так, вследствие токсичности это соединение невозможно использовать для исследований *in vivo* (Force et al., 2004; Bagley et al., 2010). Кроме того, SB характеризуется достаточно низкой селективностью по отношению к киназе c-Raf1 и стресс-киназе c-Jun (JNK) (Godl et al., 2003; Bain et al., 2007), что может в значительной степени затруднять интерпретацию полученных результатов.

В связи с этим в настоящей работе использовали высокоселективный ингибитор активности p38 — BIRB796 (BIRB) — с целью подтверждения роли киназы p38 в развитии H_2O_2 -индуцированного старения эмСК.

Материал и методика

Стволовые клетки эндометрия человека (эмСК), полученные в Институте цитологии РАН (Санкт-Петербург; Земелько и др., 2011), культивировали в среде DMEM/F12 (Gibco, США), содержащей 10 % эмбриональной сыворотки (HyClone, США), 1 % гентамицина и 1 % глутамакса, в атмосфере 5 % CO_2 при 37 °C во флаконах 25 или 75 см². Для экспериментов клетки рассевали в плотности 15 тыс. кл./см² на чашки диаметром 35 мм; использовали клетки 6—9-го пассажей.

Окислительный стресс моделировали в клетках добавлением в бессывороточную ростовую среду H_2O_2 (до конечной концентрации 200 мкМ), раствор которой готовили из 30%-ной H_2O_2 непосредственно перед использованием. Обработку клеток проводили в течение 1 ч при 37 °C в атмосфере 5 % CO_2 , после чего клетки дважды промывали бессывороточной средой и далее культивировали в свежей ростовой среде.

Обработка клеток ингибитором. В экспериментах использовали ингибитор киназы p38 — BIRB796 (Axon Medchem, Нидерланды). Эксперименты проводили по следующей схеме: клетки подвергали окислительному стрессу в стандартных условиях, затем переводили в свежую ростовую среду, содержащую ингибитор BIRB796 в

концентрации 5 мкМ. В процессе дальнейшего культивирования клеток ингибитор добавляли ежедневно при смене среды для поддержания постоянной концентрации.

Жизнеспособность клеток после обработки ингибитором в различных концентрациях оценивали методом МТТ, основанным на ферментатическом превращении МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид) в формазан в живых клетках. После удаления культуральной среды к клеткам добавляли раствор МТТ (0.715 мг/мл) в ростовой среде. Через 2 ч раствор заменяли на DMSO 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» (Россия).

Иммуноблоттинг. Клетки дважды промывали холодным PBS и лизировали в буфере, содержащем 50 мМ Трис-HCl, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 10 % глицерина, 1 % Тритона X-100, 1 мМ Na_3VO_4 , 1 мМ NaF, 0.5 мМ PMSF и 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 15 000 g. К супернатанту добавляли 1/4 часть буфера для электрофоретических проб (40 мМ Трис, pH 6.8, 10 % SDS, 20 % 2-меркаптоэтанола и 40 % глицерина) и инкубировали в течение 5 мин при 100 °C. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда, используя овальбумин для построения калибровочной кривой. Электрофоретическое разделение белков проводили методом SDS-электрофореза в полиакриламидном геле с последующим переносом белков на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C extra (Amersham Pharmacia Biotech, Швеция). Для визуализации белковых полос использовали Ponceau S (Sigma, США). Для специфического выявления белков использовали моноклональные кроличьи антитела против ингибитора циклин-зависимых киназ p21^{Waf1/Cip1} (p21), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH, clone 14C10), фосфо-МАРКАРК-2 (Thr334), а также поликлональные кроличьи антитела против фосфо-Rb (Ser807/811) и фосфо-p53 (Ser15). В качестве вторичных антител применяли козы антитела, разработанные против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (GAR-HRP). Все антитела были получены от фирмы Cell Signaling (США). Для детекции пероксидазной активности конъюгатов GAR-HRP использовали реакцию усиленной хемилюминесценции (ECL, Amersham, Швеция). Хемилюминесцентное излучение регистрировали экспонированием на рентгеновскую пленку CEA RP NEW (CEA AB, Швеция).

Проточная цитофлуориметрия. Прикрепленные клетки снимали с чашек смесью трипсина/Версена (0.05 %; Gibco, США), осаждали центрифугированием и промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS). Для оценки выживаемости клеток образец окрашивали иодистым пропидием (PI; 50 мкг/мл) и анализировали на цитометре Coulter EPICS XL Flow Cytometer (Becton Coulter, США). Изменение размера клеток оценивали по изменению прямого светорассеяния живых клеток.

Для оценки уровня внутриклеточных активных форм кислорода (АФК) использовали 2,7-дихлорфлуоресцеин диацетат (H_2DCF -DA) (Molecular Probes, США). Прикрепленные к поверхности чашки клетки инкубировали в течение 20 мин при 37 °C в темноте в среде без сыворотки, содержащей 10 мкМ флуо-

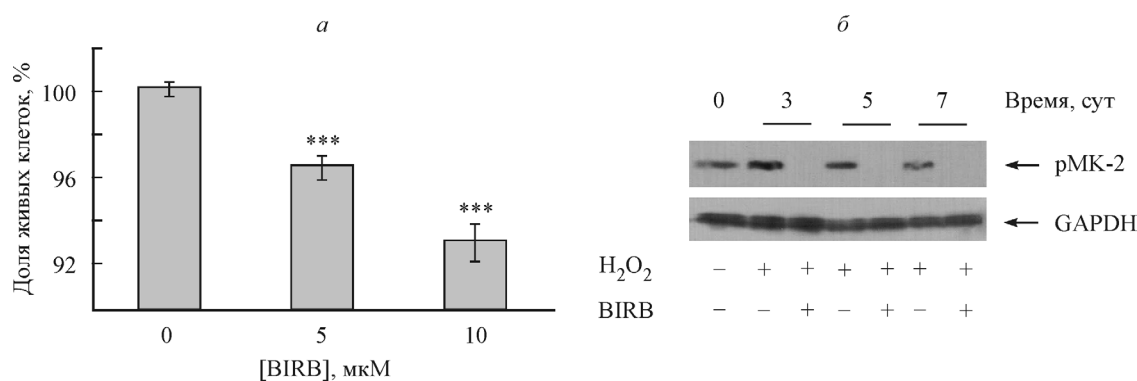


Рис. 1. Жизнеспособность ЭМСК в зависимости от концентрации ингибитора киназы p38 BIRB (а) и уровень H₂O₂-индуцированного фосфорилирования прямой мишени p38 — МК-2 — при действии BIRB (б).

а — клетки инкубировали в присутствии BIRB в указанных концентрациях в течение 24 ч, затем количество живых клеток определяли с помощью МТТ; данные представлены в виде средних значений и их стандартных отклонений ($n = 3$), *** $P < 0.001$ по сравнению с контролем. б — ЭМСК, обработанные 200 мкМ H₂O₂ в течение 1 ч, культивировали в течение 7 сут либо в свежей ростовой среде, либо в присутствии BIRB; статус фосфорилирования МК-2 оценивали в указанных временных точках с помощью иммуноблоттинга, GAPDH использовали в качестве контроля равномерности нанесения белка.

ресцентного красителя. Далее клетки промывали PBS, переводили в суспензионное состояние при помощи смеси трипсина/Версена (0.05 %) и анализировали на том же проточном цитометре. В каждом образце анализировали не менее 10 000 клеток.

Статистическая обработка данных. Использовали компьютерную программу Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США). Достоверность различий данных, подчиняющихся нормальному распределению, проверяли с помощью *t*-критерия Стьюдента. Данные представлены в виде средних значений и стандартного отклонения, вычисленных из трех повторов в одном эксперименте, каждый эксперимент повторяли минимум дважды. Результаты считались достоверными при уровне значимости $P < 0.05$.

В работе использовали неорганические соли и перекись водорода производства фирмы Sigma (США).

Результаты

Ранее нами было показано, что киназа p38 подвергается фосфорилированию в течение 5 мин в ответ на действие H₂O₂ в концентрации 200 мкМ и далее поддерживается в постоянно активном состоянии в течение длительного времени, что предполагает вовлеченность этой киназы в развитие H₂O₂-индуцированного преждевременного старения ЭМСК (Borodkina et al., 2014). В настоящей работе мы использовали высокоспецифичный ингибитор активности p38 — BIRB796 (BIRB) — для доказательства вовлеченности p38 в H₂O₂-индуцированное старение ЭМСК, а также с целью подтверждения результатов, полученных нами ранее с применением ингибитора SB. В отличие от SB, механизм действия которого предполагает конкурентное вытеснение АТФ из АТФ-связывающего кармана, BIRB связывается с аллостерическим сайтом p38α и изменяет конформацию молекулы, приводя к потере ферментативной активности p38 и препятствуя, таким образом, фосфорилированию ее мишеней (Bagley et al., 2010). На основании оценки выживаемости клеток при действии BIRB методом МТТ была выбрана концентрация 5 мкМ, которая практически не влияла на жизнеспособность ЭМСК (рис. 1, а).

Схема обработки клеток ингибитором была выбрана таким образом, что ингибитор BIRB добавляли в инкубационную среду после индукции старения, т. е. через 1 ч после действия H₂O₂ и последующего ее удаления сменой среды. Далее в течение всего эксперимента поддерживали постоянную концентрацию ингибитора в среде. Аналогичная схема обработки ЭМСК ингибитором была выбрана ранее при работе с SB (Borodkina et al., 2014). Эффективность BIRB в выбранной концентрации оценивали по изменению киназной активности прямой мишени p38 — MAPKAPK-2 (МК-2). В присутствии 5 мкМ BIRB мы не наблюдали фосфорилированной формы МК-2 в H₂O₂-обработанных ЭМСК в любой выбранной временной точке наблюдения (рис. 1, б).

Важнейшими характеристиками стресс-индуцированного старения, как известно, являются увеличение размера клеток и необратимая потеря пролиферативного потенциала. В связи с этим для выяснения возможного влияния BIRB на H₂O₂-индуцированное старение ЭМСК мы проанализировали изменение вышеупомянутых показателей в присутствии ингибитора. Эффект BIRB на изменение размера ЭМСК оценивали через 3, 5 и 7 сут после индукции старения. Как видно на рис. 2 а, ингибирование активности p38 приводило к предотвращению увеличения размера ЭМСК по сравнению с H₂O₂-обработанными клетками: через 7 сут размер клеток в присутствии BIRB был примерно в 1.3 раза меньше. Следует отметить, что влияние BIRB на размер стареющих клеток было сопоставимо с SB: размер ЭМСК в присутствии SB через 5 сут был примерно в 1.4 раза меньше (Borodkina et al., 2014).

При исследовании влияния ингибирования активности p38 на модуляцию пролиферации H₂O₂-стимулированных ЭМСК оказалось, что в присутствии BIRB происходило небольшое увеличение числа пролиферирующих клеток по отношению к H₂O₂-обработанным ЭМСК (рис. 2, б). Для сравнения действия BIRB и SB на пролиферацию ЭМСК мы рассчитали коэффициент, теоретически отражающий долю пролиферирующих клеток в популяции при действии ингибитора от нормально пролиферирующих контрольных клеток, согласно следующей формуле:

$$k = \text{tg}\alpha/\text{tg}\beta,$$

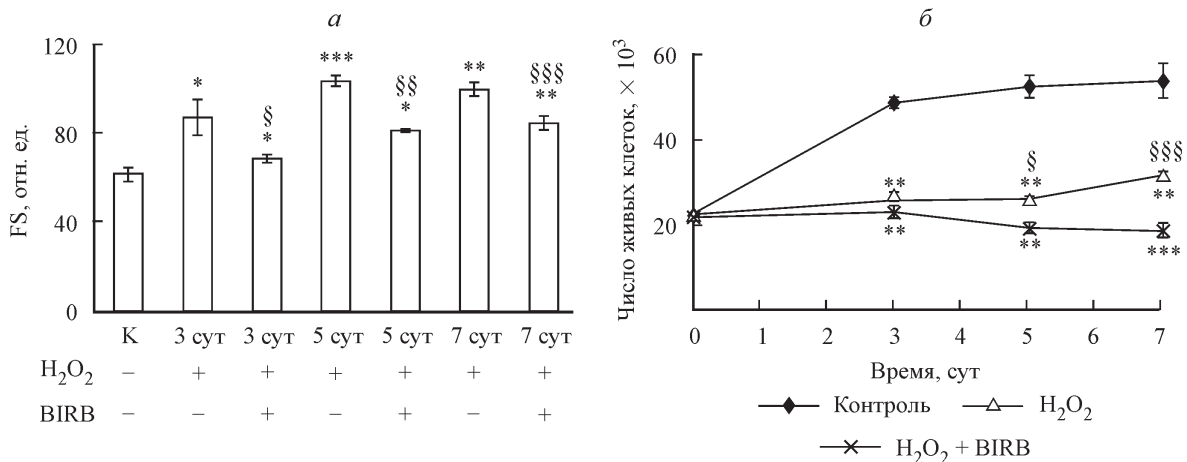


Рис. 2. Влияние ингибитора BIRB на размер (а) и пролиферацию (б) ЭМСК, обработанных H₂O₂ в течение 1 ч и культивируемых далее в течение 7 сут.

Общее число живых клеток и их размер оценивали при помощи метода проточной цитометрии. Различия по сравнению с контролем (К) считали достоверными при * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$. Различия по сравнению с H₂O₂-обработанными ЭМСК считали достоверными при § $P < 0.05$, §§ $P < 0.005$, §§§ $P < 0.001$.

где k — «коэффициент пролиферации», $\text{tg}\alpha$ — тангенс угла наклона аппроксимированной кривой роста H₂O₂-обработанных ЭМСК в присутствии ингибитора, $\text{tg}\beta$ — тангенс угла наклона аппроксимированной кривой роста контрольных клеток.

Оказалось, что «коэффициент пролиферации», рассчитанный на основании данных, представленных на рис. 2, б, для BIRB составил 0.28, тогда как в присутствии SB его значение достигало 0.47 (Borodkina et al., 2014). Наблюдаемое различие в эффектах может быть связано с более высокой селективностью ингибитора BIRB, который в основном подавляет ферментативную активность p38 α , тогда как SB помимо четырех изоформ p38 может ингибировать активность стрессовой киназы JNK. Согласно нашим предыдущим результатам, киназа JNK также вовлечена в процесс преждевременного старения ЭМСК (Дерябин и др., 2015), следовательно, подавление ее активности может вносить вклад в восстановление пролиферации H₂O₂-обработанных клеток. В результате

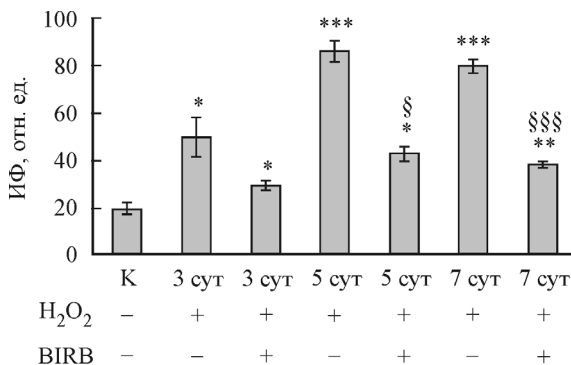


Рис. 3. Влияние BIRB на интенсивность флуоресценции (ИФ) АФК-зависимого зонда в старых ЭМСК.

Уровень АФК оценивали в указанных временных точках после индукции старения (200 мкМ H₂O₂ в течение 1 ч) методом проточной цитометрии с использованием красителя H₂DCF-DA; К — контрольные (необработанные) клетки. Различия по сравнению с контролем (К) считали достоверными при * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$. Различия по сравнению с H₂O₂-обработанными ЭМСК считали достоверными при § $P < 0.05$, §§ $P < 0.005$, §§§ $P < 0.001$.

проведенных экспериментов мы выявили частичное восстановление пролиферации и уменьшение размера H₂O₂-обработанных ЭМСК в присутствии BIRB, что свидетельствует о предотвращении старения в части популяции ЭМСК в условиях окислительного стресса при ингибировании p38.

Ранее мы установили, что стареющие ЭМСК характеризуются постоянно повышенным уровнем внутриклеточных АФК (Borodkina et al., 2014). Принимая во внимание, что в присутствии BIRB мы наблюдали частичное предотвращение H₂O₂-индуцированного старения ЭМСК, логично было предположить, что ингибирование p38 может приводить к снижению уровня АФК. Для проверки этой гипотезы было исследовано влияние BIRB на генерацию эндогенных АФК в процессе развития старения. Как показано на рис 3, влияние BIRB действительно привело к значительному снижению уровня АФК по сравнению с H₂O₂-стимулированными клетками в течение всего периода наблюдения (вплоть до 7 сут). Эти результаты свидетельствуют об участии p38 в регуляции продукции эндогенных АФК в старых ЭМСК.

В наших предыдущих исследованиях мы убедительно продемонстрировали участие сигнального пути p53/p21/Rb в реализации H₂O₂-индуцированного блока клеточного цикла в ЭМСК, приводящего к остановке пролиферации. В связи с этим далее мы оценили возможную вовлеченность p38 в регуляцию этого каскада, применив ингибиторный анализ. Оказалось, что обработка клеток с помощью BIRB способствовала увеличению как фосфорилирования p53, так и экспрессии p21 (рис. 4). Стоит отметить, что обнаруженный эффект BIRB на функционирование пути p53/p21 хорошо согласуется с характером кривой роста H₂O₂-обработанных ЭМСК в присутствии этого ингибитора: на 3-и сут при максимальной активности пути p53/p21 мы наблюдали лишь незначительное увеличение числа пролиферирующих клеток (рис. 2, б), избежавших блока клеточного цикла. С течением времени число пролиферирующих клеток увеличивалось, что коррелировало со снижением фосфорилирования p53 и экспрессии p21. В отличие от результатов, полученных с использованием BIRB и представленных в данной работе, ранее мы показали, что обработка H₂O₂-стимулиро-

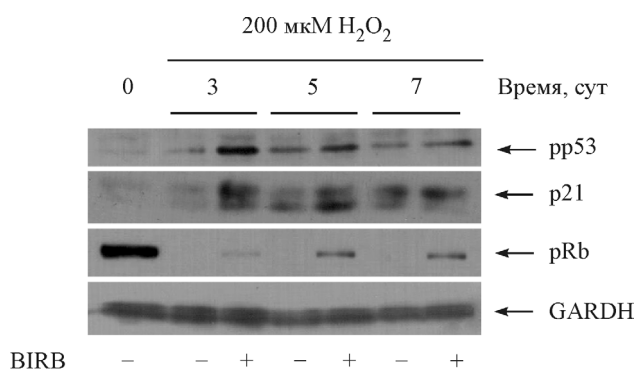


Рис. 4. Регуляция белков-участников сигнального каскада p53/p21/Rb в стареющих ЭМСК в присутствии BIRB.

После индукции старения (200 мкМ H₂O₂ в течение 1 ч) клетки культивировали в течение указанного времени в свежей ростовой среде в отсутствие или в присутствии ингибитора, затем оценивали уровень фосфорилирования белков p53 и Rb, а также уровень экспрессии p21 методом иммуноблоттинга с использованием специфических антител.

ванных клеток SB в течение всего периода наблюдения не оказывала заметного влияния ни на уровень фосфорилирования p53, ни на экспрессию белка p21 по сравнению со стареющими клетками (Borodkina et al., 2014). Обнаруженные различия в эффектах BIRB и SB, вероятно, связаны с более низкой селективностью SB.

Интересно, что подавление киназной активности p38 при помощи BIRB приводило к небольшому, но заметному усилению фосфорилирования белка Rb по сравнению с H₂O₂-обработанными ЭМСК (рис. 4). Существенно, что эти данные совпадают с результатами, полученными с использованием SB, и хорошо согласуются с наблюдаемым частичным восстановлением пролиферации в присутствии каждого из ингибиторов. Суммируя полученные результаты, можно заключить, что киназа p38 действительно вовлечена в развитие преждевременного старения ЭМСК, индуцированного окислительным стрессом.

Обсуждение

Проблема старения мезенхимных стволовых клеток человека при действии стрессовых факторов вызывает интерес исследователей в течение последних нескольких лет (Wang, Jang, 2009; Brandl et al., 2011; Kim et al., 2011; Smielova et al., 2012; Larsen et al., 2012). Наряду с детализацией молекулярных механизмов, опосредующих инициацию и стабилизацию стресс-индуцированного старения, особое внимание уделяется поиску путей предотвращения его развития, что в перспективе должно способствовать повышению эффективности использования стволовых клеток в регенеративной медицине.

Ранее мы показали, что старение ЭМСК в условиях окислительного стресса развивается за счет активации ответа на повреждение ДНК и последующей передачи сигнала по пути ATM/Chk2/p53/p21/Rb, который необходим для установления необратимого блока клеточного цикла. В настоящей работе для более детального изучения роли p38 в преждевременном старении ЭМСК и подтверждения наших данных, полученных при использовании SB, мы применяли специфическое ингибирование киназной активности p38 с помощью агента BIRB. Оказалось, что обработка H₂O₂-стимулированных клеток ингибитором,

приводящая к перманентному подавлению функциональной активности p38, способствовала предотвращению увеличения размера и частичному восстановлению пролиферативного потенциала стареющих клеток. Эти данные свидетельствуют о важной роли активированной p38 в процессе развития преждевременного старения ЭМСК в условиях окислительного стресса. Совершенно противоположные данные были получены при исследовании H₂O₂-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 — агента, моделирующего окислительный стресс, приводило к предотвращению развития фенотипа старения и частичному восстановлению пролиферативного потенциала клеток (Probin et al., 2006). Результаты тем более интересны, что в обоих случаях авторы использовали одну и ту же клеточную линию — диплоидные фибробласты легкого человека (WI38). Основной пул работ, посвященных исследованию роли p38 в старении МСК, выделен на клетках, изолированных из костного мозга. Показана активация киназы p38 как при репликативном (Lee et al., 2009), так и при H₂O₂-индуцированном старении МСК из костного мозга (Choi et al., 2014). Результаты наших исследований в значительной степени согласуются с данными авторов этих работ и свидетельствуют об участии киназы p38 в H₂O₂-индуцированном старении ЭМСК.

В настоящее время известно, что вне зависимости от индуктора клеточное старение сопровождается повышением уровня внутриклеточных АФК, тогда как предотвращение его развития характеризуется снижением этого уровня (Passos et al., 2007; Lawless et al., 2012; Kodama et al., 2013; Borodkina et al., 2014; Loseva et al., 2014). В случае подавления активности p38 в H₂O₂-стимулированных ЭМСК мы наблюдали значительное уменьшение уровня эндогенных АФК в процессе развития старения. На основании этих данных можно говорить о несомненном участии киназы p38 в регуляции 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).

Интересные данные были получены при исследовании влияния ингибирования p38 на сигнальный путь p53/p21/Rb, необходимый для индукции и поддержания блока клеточного цикла в H₂O₂-обработанных ЭМСК. Согласно нашим предыдущим результатам, обработка H₂O₂-стимулированных ЭМСК с помощью SB не приводила к существенным изменениям функциональной активности p53 и экспрессии p21, однако заметно увеличивала фосфорилирование Rb. На основании этого можно предположить, что киназа p38 независимо от пути p53/p21 вовлечена в регуляцию фосфорилирования Rb и как следствие — в установление блока клеточного цикла в H₂O₂-обработанных ЭМСК. К нашему удивлению, в настоящей работе при использовании другого специфического ингибитора p38 — BIRB — нам удалось выявить увеличение фосфорилирования p53 и экспрессии p21. Наблюдаемые различия в эффектах этих ингибиторов могут

быть опосредованы более низкой селективностью SB. Известно, что SB может эффективно ингибировать помимо p38 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 . Это предположение хорошо согласуется с незначительным по сравнению с SB влиянием BIRB на восстановление пролиферации H₂O₂-обработанных клеток, отражая вклад только p38 α и косвенно свидетельствуя о вовлеченности других киназ в развитие старения ЭМСК.

Важно, что независимо от природы ингибитора в обоих случаях наблюдалось увеличение уровня фосфорилирования Rb. Эти данные позволяют предположить участие в развитии H₂O₂-индуцированного старения ЭМСК другого сигнального каскада, независимого от p53/p21, компонентом которого является белок Rb. Согласно современным представлениям, таким сигнальным путем может служить каскад p38/MK-2/Rb (Manke et al., 2005). Прямая мишень p38 — киназа MK-2 — является негативным регулятором прогрессии клеточного цикла, поскольку непосредственно инактивирует члены семейства фосфатаз Cdc25, которые ответственны за функционирование комплексов циклин/CDK, и приводит в конечном итоге к гипофосфорилированию Rb. Таким образом, MK-2 функционирует параллельно с Chk1 и Chk2 в интеграции ответов на повреждение ДНК и аресте клеточного цикла (Manke et al., 2005). Согласно нашим экспериментальным данным, использование любого из протестированных ингибиторов активности p38 приводило к перманентному подавлению активности MK-2 в H₂O₂-обработанных ЭМСК и одновременно способствовало заметному увеличению фосфорилирования Rb и частично восстановлению пролиферации клеток. Эти находки в совокупности с данными литературы дают основание предполагать участие сигнального пути p38/MK-2/Rb независимо от p53/p21/Rb в реализации программы преждевременного старения ЭМСК.

Обобщая все полученные в данной работе результаты, можно с уверенностью говорить о несомненной роли стресс-киназы p38 в H₂O₂-индуцированном старении ЭМСК. Важность успешной трансплантации МСК для лечения ряда серьезных заболеваний диктует необходимость изучения молекулярных механизмов предотвращения преждевременного старения этих клеток. Исходя из результатов нашей работы с этой целью можно рекомендовать обработку ЭМСК ингибитором MAP-киназы p38 (BIRB).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 16-34-00081-мол_а и 14-04-01720-а, которые позволили провести электрофорез, иммуноблоттинг и проточную цитофлуориметрию), а также Российского научного фонда (проект 14-50-00068, который обеспечил проведение работ по культивированию мезенхимных стволовых клеток эндометрия человека).

Список литературы

Земелько В. И., Гринчук Т. М., Домнина А. П., Арцыбашева И. В., Зенин В. В., Кирсанов А. А., Бичева Н. К., Корсаков 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. (Zemelko V. I., Grinchuk T. M., Domnina A. P., Artzibasheva I. V., Zenin V. V., Kirsanov A. A., Bichevaia N. K., Korsak V. S., Nikolsky N.N. 2011. Multipotent mesenchymal stem cells of desquamated endometrium: isolation, characterization, and use as a feeder layer for maintenance of human embryonic stem cells. Tsitologiya. 53 (12) : 919—929.)

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.

Bain J., Plater L., Elliott M., Shpiro N., Hastie C. J., McLaulchlan, H., Klevernic I., Arthur J. S., Alessi D. R., Cohen P. 2007. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. Biochem. J. 408 : 297—315.

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.

Brandl A., Meyer M., Bechmann V., Nerlich M., Angele P. 2011. Oxidative stress induces senescence in human mesenchymal stem cells. Exp. Cell Res. 317 : 1541—1547.

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.

Chen Q., Ames B. N. 1994. Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 91 : 4130—4134.

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. Cell. Toxicol. 10 : 29—39.

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.

Coppé J. P., Patil C. K., Rodier F., Sun Y., Muñoz D. P., Goldstein J., Nelson P. S., Desprez P. Y., Campisi J. 2008. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. PLoS Biol. 6 : 2853—2868.

Debaq-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.

Deryabin P. I., Borodkina A. V., Nikolsky N. N., Burova E. B. 2015. Relationship between p53/p21/Rb and MAPK signaling pathways in human endometrium-derived stem cells under oxidative stress. Tsitologiya. 57 (11) : 788—795.

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. USA. 92 : 9363—9367.

Force T., Kuida K., Namchuk M., Parang K., Kyriakis J. M. 2004. Inhibitors of protein kinase signaling pathways: emerging therapies for cardiovascular disease. Circulation. 109 : 1196—1205.

Godl K., Wissing J., Kurtenbach A., Habenberger P., Blencke S., Gutbrod H., Salassidis K., Stein-Gerlach M., Missio A., Cotten M., Daub H. 2003. An efficient proteomics method to identify the cellular targets of protein kinase inhibitors. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 100 : 15 434—15 439.

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—1121.

Han J., Sun P. 2007. The pathways to tumor suppression via route p38. Trends Biochem. Sci. 32 : 364—371.

Haq R., Brenton J. D., Takahashi M., Finan D., Finkielstein 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.

Hayflick L., Moorhead P. S. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 25 : 585—621.

Iwasa H., Han J., Ishikawa F. 2003. Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway. *Genes Cells.* 8 : 131—144.

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.

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.

Kuilman T., Peeper D. S. 2009. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nat. Rev. Cancer.* 9 : 81—94.

Kurz E. U., Lees-Miller S. P. 2004. DNA damage-induced activation of Atm and Atm-dependent signaling pathways. *DNA Repair.* 3 : 889—900.

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.

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.

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.

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.

Loseva O., Shubbar E., Haghdoost 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.

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.

Maruyama J., Naguro I., Takeda K., Ichijo H. 2009. Stress-activated MAP kinase cascades in cellular senescence. *Curr. Med. Chem.* 16 : 1229—1235.

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.

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.* 12 : 489—498.

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.

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. 2007. Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence. *PLoS Biol.* 5 : e110.

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.

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.

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.

Zdanov S., Debacq-Chainiaux F., Remacle J., Toussaint O. 2006. Identification of p38MAPK-dependent genes with changed transcript abundance in H₂O₂-induced premature senescence of IMR-90 hTERT human fibroblasts. *FEBS Lett.* 580 : 6455—6463.

Поступила 3 II 2016

ROLE OF P38 MAP-KINASE IN THE STRESS-INDUCED SENESCENCE PROGRESSION OF HUMAN ENDOMETRIUM-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS

A. V. Borodkina,¹ A. N. Shatrova,¹ N. N. Nikolsky,^{1,2} E. B. Burova¹

¹Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064, and ²Department of Medical Physics, St. Petersburg State Polytechnical University St. Petersburg, 195251;

¹e-mail: borodkina618@gmail.com

Our recent findings clearly demonstrate that human endometrium-derived mesenchymal stem cells (hMESC) respond to the sublethal oxidative stress by the premature senescence induction via ATM/Chk2/p53/p21/Rb pathway. Furthermore, based on the application of the SB203580 (SB) we suggested p38 MAP-kinase involvement in senescence progression. However, there are several disadvantages concerning this inhibitor: 1) using SB would not be suitable for *in vivo* experiments due to toxicity issue; 2) the poor kinase selectivity profile of SB complicates interpretation of the obtained data. Here, in order to confirm the implication of p38 in the H₂O₂-induced senescence of hMESC, we applied another highly specific inhibitor of p38 — BIRB796 (BIRB). In presence of BIRB we revealed cell size decrease, reduction in the levels of reactive oxygen species, partial restoration of proliferation and increase in Rb phosphorylation levels in comparison to H₂O₂-treated hMESC. Summarizing the obtained results we can postulate p38 implication in H₂O₂-induced senescence of hMESC, and suggest p38 inhibition as a promising approach in prevention of premature senescence.

Key words: human endometrial stem cells, oxidative stress, premature senescence, p38 MAP-kinase.