

АНТИПРОЛИФЕРАТИВНЫЕ И ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ ЦИТОСТАТИКОВ НА ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ И КЛЕТКИ ТЕРАТОКАРЦИНОМЫ МЫШИ

© 2012 г. О. Ф. Гордеева

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

E-mail: olgagordeeva@yandex.ru

Поступила в редакцию 21.01.12 г.

Окончательный вариант получен 20.02.2012 г.

Плюрипотентные стволовые клетки млекопитающих способны неограниченно пролиферировать и дифференцироваться в различные типы клеток в культуре *in vitro*. Однако дифференцировка плюрипотентных клеток *in vitro* в большинстве случаев является асинхронной и неполной, а остаточные недифференцированные клетки при трансплантации реципиентам инициируют развитие тератом. Эти особенности плюрипотентных стволовых клеток ограничивают развитие безопасных технологий клеточной терапии на основе плюрипотентных стволовых клеток. Учитывая значительное сходство скорости роста плюрипотентных стволовых и раковых клеток, мы исследовали антипролиферативные и цитотоксические эффекты различных типов цитостатиков (митомидин С, этопозид, винбластин, циклогексимида) на недифференцированные и дифференцирующиеся эмбриональные стволовые, эмбриональные герминативные клетки, клетки бластоцист мыши, а также на тератокарциномные клетки и эмбриональные фибробласты мыши. Все использованные цитостатики наряду с антипролиферативными эффектами вызывали острые токсические процессы в недифференцированных плюрипотентных стволовых клетках мыши и клетках тератокарциномы, тогда как в дифференцирующихся эмбриональных стволовых клетках и эмбриональных фибробластах их эффекты были значительно слабее. Кроме того, клетки трофобласта бластоцист мыши были менее чувствительны к повреждающим эффектам цитостатиков по сравнению с клетками внутренней клеточной массы. При изучении отсроченных эффектов цитостатиков на недифференцированные эмбриональные стволовые клетки и эмбриональные фибробласты было обнаружено, что воздействие митомидина, этопозид и винбластин, но не циклогексимида, является необратимым, и выжившие клетки не способны к дальнейшей пролиферации. Тем не менее, число эмбриональных фибробластов, обработанных этопозидом и винбластином, не изменялось, в то время как недифференцированные плюрипотентные клетки, практически полностью подвергались апоптозу. Таким образом, различные цитотоксические эффекты этопозид и винбластин на недифференцированные плюрипотентные клетки и дифференцированные эмбриональные клетки позволяют рассматривать эти цитостатики и их аналоги в качестве препаратов-кандидатов для разработки методов избирательной элиминации остаточных недифференцированных плюрипотентных клеток в популяции дифференцирующихся клеток. Полученные нами данные впервые демонстрируют возможность селективной элиминации недифференцированных плюрипотентных клеток с использованием низкомолекулярных цитостатиков, применяемых в клинической практике. Однако для увеличения эффективности и безопасности этого подхода и предотвращения мутагенных, канцерогенных и тератогенных эффектов цитостатиков на плюрипотентные стволовые клетки и их дифференцированные клетки-производные необходимы широкомасштабные исследования цитостатических эффектов при различных дозах и схемах воздействия.

Ключевые слова: эмбриональные стволовые клетки, бластоциста, эмбриональные герминативные клетки, тератокарцинома, цитостатики, митомидин, этопозид, винбластин, циклогексимид, ретиноевая кислота, дифференцировка, цитотоксичность, эмбриотоксичность.

Плюрипотентные стволовые клетки млекопитающих способны активно и неограниченно пролиферировать и дифференцироваться в различные типы клеток в культуре *in vitro*. Скорость роста плюрипотентных стволовых клеток сопоставима с таковой для раковых клеток. Структура клеточного цикла плюрипотентных стволовых клеток имеет

уникальные характеристики и значительно отличается от клеточного цикла нормальных соматических клеток (Savatier et al., 1994; 1996; Jirmanova et al., 2002). Большую часть всего времени клеточного цикла плюрипотентные стволовые клетки находятся в S-фазе, а G1- и G2-периоды у них значительно сокращены по сравнению с соответствующими

щими фазами клеточного цикла соматических клеток. Фактически, разделившиеся клетки вступают в новый раунд репликации ДНК практически сразу после завершения предыдущего митоза (Savatier et al., 1994, 1996; Burdon et al., 2002; Stead et al., 2002; White et al., 2005; Fluckiger et al., 2006; Becker et al., 2006; Гордеева и др., 2011). В отличие от раковых клеток плюрипотентные стволовые клетки способны к спонтанной и индуцированной дифференцировке. Однако даже при индуцированной различными факторами дифференцировке некоторые клетки остаются недифференцированными, т.е. дифференцировка плюрипотентных клеток *in vitro* в большинстве случаев является асинхронной и неполной (Brederlau et al., 2006; Boyd et al., 2008; Sundberg et al., 2011). Причины этого явления неясны, но оно в значительной мере ограничивает развитие технологий клеточной терапии на основе плюрипотентных стволовых клеток, т.к. остаточные недифференцированные клетки при трансплантации инициируют развитие тератом.

Для развития безопасных клеточных технологий на основе плюрипотентных стволовых клеток используют несколько стратегий, направленных на устранение остаточных недифференцированных клеток из популяции дифференцирующихся клеток. Селекция определенных клеточных типов с помощью клеточных сортеров и генетическая модификация клеточных линий с помощью различных “суицидальных” конструкций являются перспективными методами, однако имеют ряд недостатков, которые ограничивают их эффективность (Kiuru et al., 2009; Tang et al., 2011).

С другой стороны, для ингибирования пролиферации раковых клеток разработаны и продолжают разрабатываться препараты с различными механизмами действия (Vander Heiden, 2011). Учитывая значительное сходство скорости роста плюрипотентных стволовых и раковых клеток, представляет интерес изучение эффектов различных групп цитостатических препаратов на недифференцированные и дифференцирующиеся плюрипотентные стволовые клетки. В представленной работе исследованы эффекты различных типов цитостатиков, применяемых в клинической практике для химиотерапии различных опухолей: алкилирующих агентов, образующих сшивки в структуре ДНК (митомин С), ингибиторов топоизомеразы II (этопозид), ингибиторов сборки микротрубочек (винбластин) и ингибиторов синтеза белков (циклогексимид). Задачей нашего исследования являлось изучение прямых и отсроченных антипролиферативных и токсических эффектов разных типов цитостатиков на

плюрипотентные эмбриональные стволовые (ЭСК), эмбриональные герминативные клетки (ЭГК) и клетки внутренней массы бластоцисты мыши, а также на опухолевые клетки линии тератокарциномы (ЭТК) мыши и на нетрансформированные эмбриональные фибробласты мыши (МЭФ).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Культивирование клеток *in vitro*. В работе были использованы ЭСК мыши линии R1, ЭГК мыши линии EGC-10, любезно предоставленные доктором А. Макларен (A. McLaren, WTCR Institute of Cancer and Developmental Biology, Cambridge, UK). ЭТК мыши линии F9 получены из Российской коллекции клеточных культур (Банк клеточных культур Института цитологии РАН, Санкт-Петербург). Плюрипотентные клеточные линии мыши культивировали в среде DMEM, содержащей 1 mM L-глутамина, 0.1 mM заменимых аминокислот, 0.1 mM β -меркаптоэтанола и 15% телячьей фетальной сыворотки (“HyClone”, США). Недифференцированные плюрипотентные стволовые клетки мыши поддерживали на фидере из первичных эмбриональных фибробластов мыши, инактивированных митомицином С (10 мкг/мл, “Sigma”). В течение экспериментов ЭСК и ЭГК мыши культивировали в бесфидерной системе, в среде с фактором ингибирования лейкемии (leukemia inhibitory factor, LIF, 10 нг/мл, “Sigma”). МЭФ и ЭТК F9 культивировали в среде для плюрипотентных клеток без LIF. Для изучения влияния цитостатиков на дифференцированные клетки ЭСК R1 предварительно индуцировали к дифференцировке ретиноевой кислотой (10^{-6} M, “Sigma”) в течение 3 суток. На 4 сутки культивирования среду, содержащую ретиноевую кислоту, заменяли на стандартную среду для культивирования плюрипотентных клеток и добавляли цитостатики.

Получение и культивирование доимплантационных эмбрионов мышей. В работе использовали мышей линии C57Bl/6 из питомника лабораторных животных НПП “Пушино” ФИБХ РАН. Все эксперименты проводили в соответствии с требованиями биоэтического комитета Института. Для получения эмбрионов с датированным сроком беременности животных спаривали, день обнаружения копулятивной пробки считали стадией E 0.5. Эмбрионы мышей на стадии бластоцисты (стадия E 4.0) извлекали из матки самки и культивировали в течение суток до их вылупления из блестящей оболочки в среде для культивирования плюрипотентных клеток в 4-луночных планшетах (“Nunc”, Дания). В каждой группе использовали по 15 эмбрионов.

Изучение эффектов цитостатиков. Для изучения цитостатических эффектов использовали митомицин С, этопозид, винбластин, циклогексимид (все “Sigma”). На основании данных литературы из базы данных TOXNET, U.S. National Library of Medicine, National Institutes of Health (<http://toxnet.nlm.nih.gov/>) для используемых нами цитостатиков были выбраны активные дозы соответствующих препаратов: митомицин С — 10 мкг/мл, этопозид — 10 мкМ, винбластин — 10 мкг/мл, циклогексимид — 10 мкг/мл. Все эксперименты были повторены дважды.

ЭСК, ЭГК и ЭТК высевали на планшеты плотностью 20 тыс. клеток/см² (“Greinerbio”, Германия). После достижения культурами 30–40% конфлюэнтности (через 30–33 ч) их культивировали в течение 24 ч в среде с цитостатиками, затем отмывали клетки средой и культивировали следующие 24 ч в среде без цитостатиков. По завершении эксперимента подсчитывали число живых клеток с помощью красителя трипанового синего. В выживших плюрипотентных и тератокарциномных клетках выявляли активность щелочной фосфатазы. При изучении отсроченных эффектов цитостатиков МЭФ и ЭСК подвергали действию цитостатиков в тех же концентрациях в течение 24 ч, а затем культивировали в стандартной среде без цитостатиков в течение последующих 5 суток.

Статистический анализ скорости роста клеточных культур проводили с использованием ANOVA и парного критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при вероятности нулевой гипотезы $p < 0.01$.

Гистохимический анализ активности щелочной фосфатазы. Клетки фиксировали 3%-ным раствором параформальдегида в фосфатно-солевом буфере (“Sigma”) в течение 20 мин. После промывки в фосфатно-солевом буфере образцы инкубировали в растворе, содержащем 10 мл 0.02 М буфера *tris*-HCl (pH 8.6), 1 мг нафтола AS-BI-фосфата и 5 мг красителя Fast Red-TR (“Sigma”), в течение 30–40 мин при температуре 37°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Токсические и антипролиферативные эффекты цитостатиков на недифференцированные ЭСК, ЭГК, ЭТК и бластоцисты мыши. Влияние цитостатиков на плюрипотентные клетки исследовали на бластоцистах мыши (E 4.0) и линиях плюрипотентных клеток, происходящих из различных источников: ЭСК — из внутренней клеточной массы бластоцист, а ЭГК — из ранних первичных половых клеток. Кроме того, в работе были использованы нуллипотентные ЭТК, являющиеся трансфор-

мированными аналогами плюрипотентных стволовых клеток, утратившими способность к дифференцировке. Для изучения антипролиферативных эффектов были использованы цитостатики с различными механизмами действия. В наших предыдущих исследованиях было установлено, что клетки всех используемых линий (R1, EGC-10 и F9) имеют практически идентичную структуру клеточного цикла с преимущественным нахождением клеток в S фазе и сходные профили экспрессии специфических генов (Гордеева и др., 2011). В экспериментах была использована следующая схема: посев клеток в одинаковой плотности → культивирование недифференцированных ЭСК, ЭГК и ЭТК до достижения 30–40% конфлюэнтности культуры → воздействие цитостатиков в течение 24 ч → отмена цитостатиков и культивирование в стандартной среде в течение последующих 24 ч. После завершения экспериментов подсчитывали число жизнеспособных клеток и выявляли в них активность щелочной фосфатазы.

Анализ клеточного роста показал, что эффекты всех изучаемых цитостатиков были сходными для ЭСК, ЭГК и ЭТК. Наибольшие токсические и антипролиферативные эффекты оказывали митомицин С и этопозид, т.к. после их воздействия выживали не более 1–2% клеток (рис. 1 и 2). Воздействие винбластина также подавляло рост и усиливало гибель клеток: лишь 1–4% клеток оставались жизнеспособными (рис. 1 и 2). Следует отметить, что эффекты винбластина на ЭСК, ЭГК и ЭТК различались: наибольшую чувствительность проявляли ЭСК и ЭГК (2.4–2.9% жизнеспособных клеток), наименьшую — ЭТК (7.7%). После воздействия циклогексимида на ЭСК, ЭГК и ЭТК мы наблюдали наибольшее число жизнеспособных клеток по сравнению с другими цитостатиками (рис. 1 и 2).

При воздействии изучаемых веществ на бластоцисты мыши никаких морфологических изменений в эмбрионах мы не наблюдали в течение 24 ч культивирования, и в связи с этим время экспозиции эмбрионов было увеличено до 48 ч. В течение этого времени бластоцисты прикреплялись к подложке планшета, и в ходе этого процесса нарушалась целостность трофобласта бластоцисты. По истечении 48 ч воздействия и последующих 24 ч культивирования бластоцист в среде без цитостатиков плюрипотентные клетки внутренней клеточной массы полностью погибали, тогда как клетки трофобласта оставались жизнеспособными (рис. 2).

Таким образом, наши эксперименты показали, что все использованные в работе цитостатики наряду с антипролиферативными эффектами вызы-

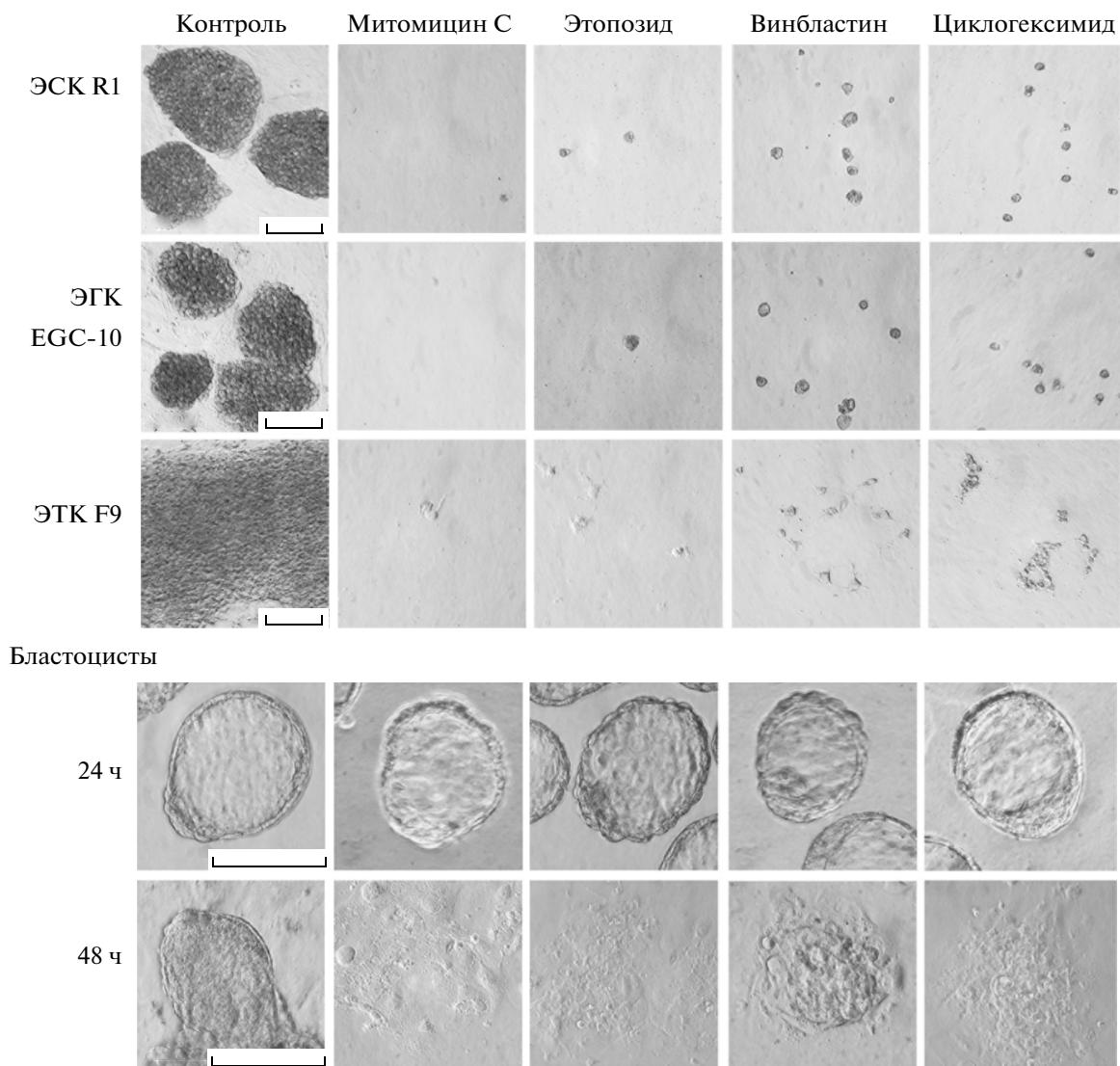


Рис. 1. Активность щелочной фосфатазы в недифференцированных плюрипотентных клетках мыши ЭСК R1, ЭГК EGC-10 и опухолевых клетках мыши ЭТК F9, подвергшихся воздействию цитостатиков в течение 24 ч. Морфология бластоцист мыши, подвергшихся воздействию цитостатиков в течение 24 и 48 ч. Масштаб: 100 мкм.

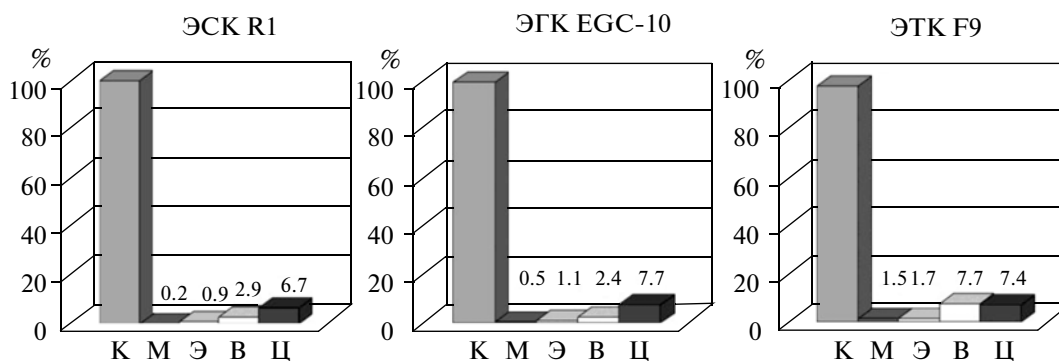


Рис. 2. Число жизнеспособных клеток ЭСК R1, ЭГК EGC-10 и ЭТК F9 в культурах, подвергшихся воздействию цитостатиков в течение 24 ч, а затем культивируемых в течение 24 ч в стандартной среде. По оси ординат – доля жизнеспособных клеток в процентах от контроля. Обозначения: К – контроль (100%); М – митомин; Э – этопозид; В – винбластин; Ц – циклогексимид. На гистограммах указаны точные значения процентных долей.

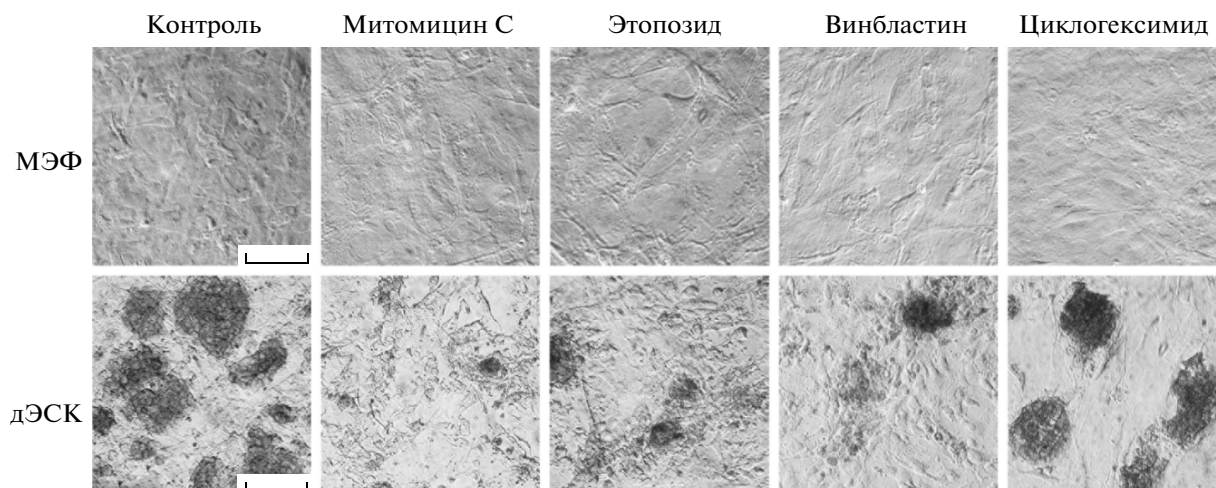


Рис. 3. Активность щелочной фосфатазы в ЭСК R1, индуцированных к дифференцировке ретиноевой кислотой, а затем подвергшихся воздействию цитостатиков в течение 24 ч. Морфология МЭФ, подвергшихся воздействию цитостатиков в течение 24 ч. Масштаб: 100 мкм.

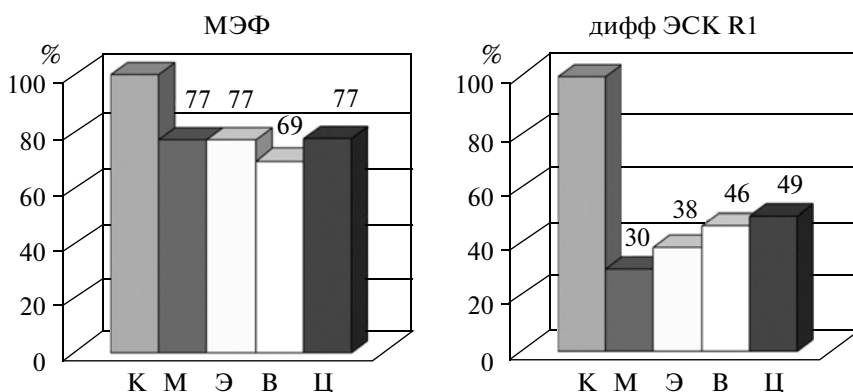


Рис. 4. Анализ роста дифференцированных ЭСК R1 и МЭФ, после воздействия цитостатиков в течение 24 ч. По оси ординат – доля жизнеспособных клеток в процентах от контроля. Обозначения: К – контроль (100%); М – митомин С; Э – этопозид; В – винбластин; Ц – циклогексимид. На гистограммах указаны точные значения процентных долей.

вают острые токсические процессы в плюрипотентных стволовых клетках мыши, а также в их опухолевых аналогах – ЭТК. Клетки трофобласта бластоцисты способны эффективно защищать внутреннюю клеточную массу от токсического действия цитостатиков при условии сохранения целостности трофоэктодермы. Клетки трофобласта менее чувствительны к повреждающим эффектам цитостатиков и лучше выживали по сравнению с клетками внутренней клеточной массы.

Чувствительность дифференцирующихся ЭСК и МЭФ к действию различных типов цитостатиков. Далее мы исследовали эффекты цитостатиков на дифференцированные клетки – эмбриональные фибробласты (эмбриональная мезенхима, стадия E 13.5) и на ЭСК, стимулированные к дифференцировке ретиноевой кислотой. Культуры ЭСК, подвергшиеся воздействию ретиноевой кислоты в

течение 3 сут, представляли собой смешанные популяции, состоящие из дифференцированных, дифференцирующихся и недифференцированных клеток. Доля недифференцированных клеток с высокой активностью щелочной фосфатазы была довольно высока на этой стадии дифференцировки (рис. 3). Изучение воздействия цитостатиков на МЭФ показало, что все вещества ингибируют пролиферативную активность клеток, но, в отличие от плюрипотентных и тератокарциномных клеток, не вызывают массовую клеточную гибель. Следует отметить, что все использованные цитостатики, независимо от механизма их токсического действия, ингибировали рост МЭФ на 30% по сравнению с контролем (рис. 4).

После воздействия цитостатиков на культуры ЭСК, предварительно индуцированных к дифференцировке ретиноевой кислотой, было обнару-

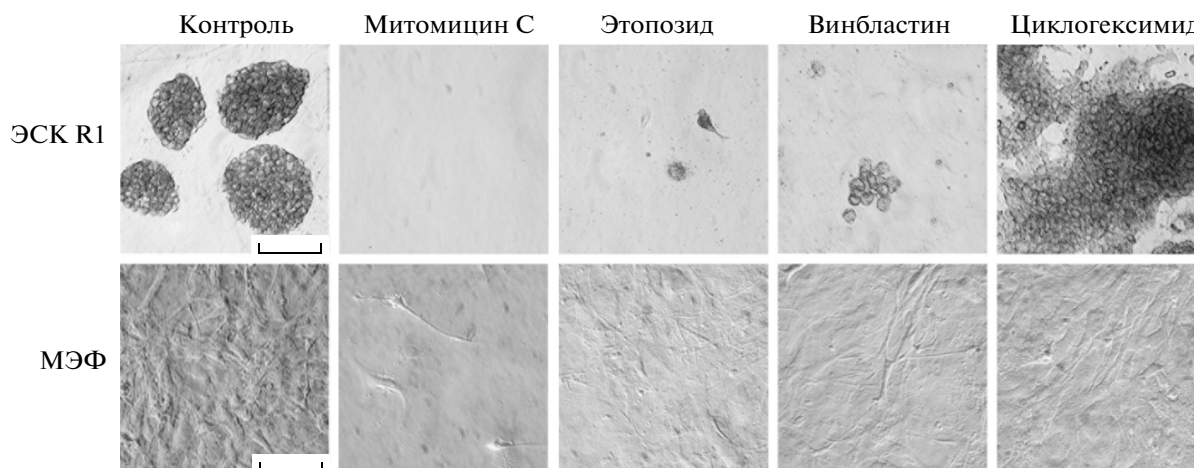


Рис. 5. Отдаленные эффекты цитостатиков в ЭСК R1 и МЭФ. Активность щелочной фосфатазы в ЭСК R1 и морфология МЭФ на 5 сут после отмены воздействия цитостаитиков. Масштаб: 100 мкм.

жено, что основной мишенью токсического действия являлись недифференцированные клетки, т.к. в опытных клеточных культурах сохранялись лишь единичные клетки, в которых была выявлена активность щелочной фосфатазы (рис. 3). Причем наибольшее число жизнеспособных недифференцированных клеток сохранялось в клеточных культурах, обработанных циклогексимидом, как и при описанных выше воздействиях на недифференцированные ЭСК. В целом, после воздействия цитостатиков на популяции дифференцирующихся ЭСК число жизнеспособных клеток было значительно больше, чем после действия на недифференцированные плюрипотентные стволовые клетки, т.к. дифференцирующиеся и дифференцированные ЭСК, как и МЭФ, были более устойчивы к действию цитостатиков (рис. 4).

Суммируя полученные результаты, можно сделать вывод, что все использованные цитостатики в выбранных дозах вызывают острые токсические эффекты в недифференцированных плюрипотентных стволовых клетках, тогда как в дифференцирующихся и дифференцированных эмбриональных клетках, способных к пролиферации, их эффекты были значительно слабее.

Отсроченные эффекты цитостатиков на ЭСК и МЭФ. Для выявления отсроченных эффектов цитостатиков мы исследовали выживаемость и рост недифференцированных ЭСК и МЭФ через 5 суток после воздействия. Результаты показали, что воздействие митомицина С на ЭСК приводило к полной гибели клеток, тогда как число жизнеспособных клеток, подвергшихся действию винбластина, не изменялось (рис. 5 и 6а). Однако число клеток в популяциях, подвергшихся воздействию этопозиды и циклогексимида, возрастало

соответственно в 2 и 53 раза по сравнению с их числом, обнаруженным через 24 ч культивирования после отмены цитостатиков (рис. 6а, 6б). Стоит отметить, что, несмотря на значительный рост ЭСК, подвергшихся действию циклогексимида, он был существенно ниже, чем в контроле (Рис. 6б).

Изучение отсроченных эффектов цитостатиков на МЭФ показало, что, несмотря на незначительное снижение роста клеток (30%) в течение первых 24 ч после воздействия всех цитостатиков, на 5 сутки после отмены цитостатиков их эффекты существенно различались. Наибольший цитотоксический эффект проявлял митомицин С, т.к. на 5 сут после воздействия выживали только 6% клеток по сравнению с контролем и их число снижалось в 6 раз по сравнению с числом клеток через 24 ч после воздействия (рис. 5 и 6в). Число МЭФ на 5 сут после воздействия этопозиды и винбластина не изменялось по сравнению с числом клеток через 24 ч после отмены цитостатиков, однако было в 2.5–3 раза ниже, чем в контроле (Рис. 5 и 6в). Наименьший отсроченный цитотоксический эффект на МЭФ проявлял циклогексимида. Число клеток на 5 сут после воздействия циклогексимида было практически одинаковым с контролем (91%), что свидетельствует об обратимости антипролиферативного и цитотоксического эффектов циклогексимида на МЭФ (рис. 5 и 6в).

ОБСУЖДЕНИЕ

В основе токсического действия цитостатиков лежит их способность повреждать генетический материал клеток или нарушать аппарат, обеспечивающий их пролиферацию, а также метаболизм

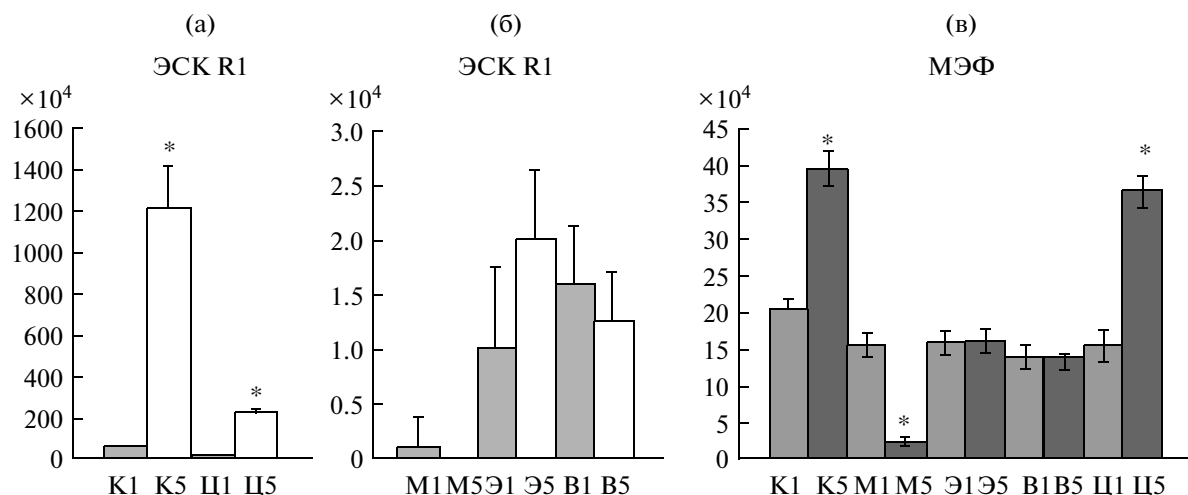


Рис. 6. Анализ отдаленных антипролиферативных и цитотоксических эффектов цитостатиков на рост ЭСК R1 (а, б) и МЭФ (в) на 5 сут после воздействия. По оси ординат – число жизнеспособных клеток, умноженное на 10^4 . Обозначения: K1, K5 – контроль на 1 и 5 сут после отмены цитостатиков; M1, M5 – митомин; Э1, Э5 – этопозид; B1, B5 – винбластин; Ц1, Ц5 – циклогексимид. * – различия статистически достоверны при $p < 0.01$.

клетки. Наиболее чувствительными к цитотоксическому и генотоксическому действию цитостатиков являются активно делящиеся клетки в эмбрионах и в обновляющихся тканях взрослого организма. Последствия повреждений в клетках зависят от дозы цитостатиков и времени их воздействия. Высокие дозы вызывают антипролиферативный эффект и гибель клеток, более низкие – мутагенное, канцерогенное или тератогенное действие. Проведенные эксперименты по изучению эффектов цитостатиков с различными механизмами действия на недифференцированные плюрипотентные клетки мыши, а также клетки тератоканциномы показали, что их чувствительность к использованным цитостатикам была сходной, несмотря на различное происхождение изучаемых клеточных линий. Это можно объяснить тем, что все используемые линии имеют значительное сходство структуры их клеточного цикла (Гордеева и др., 2011). Время воздействия цитостатиков в эксперименте составляло 24 ч, что значительно больше времени удвоения популяции для ЭСК, ЭГК и ЭТК (14–16 ч) и длительности их клеточного цикла (11–14 ч). Таким образом, вероятность повреждения активно делящихся недифференцированных клеток была очень высока. В выбранных дозах все цитостатики проявляли острый цитотоксический эффект в недифференцированных ЭСК, ЭГК и ЭТК. Однако при тех же условиях (дозы и время экспозиции) воздействия цитостатиков на МЭФ и ЭСК, индуцированные к дифференцировке ретиноевой кислотой, их цитотоксические и антипролиферативные эффекты были значительно менее выражены. В основном, клеточной мише-

ню цитотоксического действия цитостатиков были остаточные недифференцированные клетки в популяциях дифференцирующихся ЭСК, тогда как дифференцированные клетки – производные ЭСК, как и МЭФ, были менее чувствительны к повреждающему действию. Эти эффекты можно объяснить несколькими причинами. Во-первых, изменениями пролиферативной активности, т.к. в ходе дифференцировки ЭСК скорость их роста замедляется, продолжительность их клеточного цикла удлиняется и увеличивается доля клеток в G_1/G_0 периоде клеточного цикла (Savatier et al., 1994, 1996; Jirmanova et al., 2002). Так в МЭФ, имеющих значительно более длинный клеточный цикл (время удвоения популяции 24–26 ч), воздействие всех цитостатиков в течение 24 ч не приводило к значительному снижению роста клеток. Кроме того, дифференцированные клетки могут переходить в G_0 фазу клеточного цикла и становиться нечувствительными к повреждающему действию цитостатиков. Все эти изменения могут приводить к уменьшению вероятности повреждения клеток в период митоза. Во-вторых, снижение чувствительности клеток к цитостатикам может быть обусловлено изменениями в регуляции клеточной гибели. Известно, что в недифференцированных ЭСК повреждения ДНК не репарируются, и клетки подвергаются апоптозу, тогда как в дифференцирующихся ЭСК нарушения ДНК репарируются, и клетки продолжают двигаться по клеточному циклу (Burdon et al., 2002; Fluckiger et al., 2006; Becker et al., 2006; Chuykin et al., 2008; Momcilovic et al., 2009).

При изучении отсроченных эффектов цитостатиков на МЭФ и недифференцированные ЭСК было обнаружено, что воздействие митомицина, этопозид и винбластин является необратимым, и выжившие клетки не способны к дальнейшей пролиферации. Напротив, эффекты циклогексимида были обратимы: и МЭФ, и ЭСК быстро восстанавливали свой рост после его отмены. Тем не менее, число МЭФ, обработанных этопозидом и винбластином, оставалось на 5 сут таким же, как и через 24 ч после отмены цитостатиков, что свидетельствует о том, что эти цитостатики в выбранных дозах оказывают скорее антипролиферативный, но не цитотоксический эффект на дифференцированные эмбриональные клетки. В то же время, недифференцированные плюрипотентные клетки, подвергшиеся действию этих цитостатиков, практически полностью подвергаются апоптозу, а выжившие не способны к дальнейшей пролиферации. Эти результаты находятся в соответствии с полученными ранее данными о различных эффектах этопозид на недифференцированные ЭСК человека и дифференцированные из ЭСК гемопоэтические клетки (Vueno et al., 2009). Таким образом, различные цитотоксические эффекты этопозид и винбластин на недифференцированные плюрипотентные клетки и дифференцированные эмбриональные клетки позволяют рассматривать эти цитостатики и их аналоги в качестве препаратов-кандидатов для разработки методов избирательной элиминации остаточных недифференцированных плюрипотентных клеток из популяции дифференцирующихся клеток.

Ранее было показано, что этопозид, синтетический аналог растительного токсина подофиллотоксина, ингибирует топоизомеразу II, блокирует клетки в *S* и *G2* стадии клеточного цикла, а также индуцирует апоптоз, ингибируя синтез белков Mdm2 (Arriola et al., 1999; Ahn et al., 2011). Этопозид одобрен к применению для лечения мелкоклеточного и немелкоклеточного рака легких, рака желудка, молочной железы и репродуктивных органов, лимфогранулематоза, неходжкинских лимфом, нелимфобластных лейкозов, сарком, нейробластом, хориокарцином (Perry, 2008). Однако он обладает высокой эмбриотоксичностью и тератогенностью (Nagao et al., 1999; Palo et al., 2005; Moneypenny et al., 2006; Vueno et al., 2009). Тем не менее, несмотря на сильный цитотоксический эффект этопозид, его генотоксические эффекты не столь выражены. Показано, что в ЭСК мыши с нокаутной инактивацией гена *p53*, воздействие этопозид не приводило к увеличению уровня мутаций в гене *Hprt* (Corbet et al., 1995). С другой стороны, в ЭСК человека и их клетках-производных

этопозид индуцировал различные перестройки в гене *MLL*, которые не имели селективного преимущества при последующем культивировании, но при хроническом воздействии этопозид число клеток с различными хромосомными аномалиями все же возрастало (Vueno et al., 2009).

Подобно этопозиду, растительный токсин винбластин — ингибитор сборки микротрубочек — широко применяется для лечения различных опухолей. Однако цитотоксические и тератогенные эффекты винбластин в половых клетках и ранних эмбрионах млекопитающих хорошо известны (Drasga et al., 1983; Russo et al., 1988; Weng et al., 1991; Jagetia et al., 1996; Palo et al., 2011). Кроме того, при воздействии винбластин на беременных мышей была обнаружена его высокая нейротоксичность, приводящая к морфофункциональным изменениям в мозгу потомков, а также нарушениям в их поведении (Van Calsteren et al., 2009; Nam et al., 2010). В этом контексте, при использовании винбластин для селективной элиминации недифференцированных клеток из популяции клеток, дифференцированных из плюрипотентных стволовых клеток *in vitro*, необходимо учитывать эти побочные эффекты для предотвращения риска структурно-функциональных нарушений в нейральных или других типах дифференцированных клеток.

Полученные нами данные впервые демонстрируют возможность селективной элиминации недифференцированных плюрипотентных клеток с использованием низкомолекулярных цитостатиков, применяемых в клинической практике. Однако для увеличения эффективности и безопасности этого подхода и предотвращения мутагенных, канцерогенных и тератогенных эффектов цитостатиков необходимы детальные исследования их эффектов при различных дозах и схемах воздействия на плюрипотентные стволовые клетки и дифференцированные клетки-производные.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 11-04-00379-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гордеева О.Ф., Лифанцева Н.В., Хайдуков С.В. Паттерны экспрессии генов, специфических для линии половых клеток, в плюрипотентных стволовых клетках мыши и человека связаны с регуляцией базового и первичного статусов плюрипотентности // Онтогенез. 2011. Т. 42. С. 403–424.
- Ahn J., Ko M., Lee C. et al. Srg3, a mouse homolog of BAF155, is a novel p53 target and acts as a tumor suppressor by modulating p21(WAF1/CIP1) expression // Oncogene. 2011. V. 30. P. 445–456.

- Arriola E.L., Lopez A.R., Chresta C.M. Differential regulation of p21waf-1/cip-1 and Mdm2 by etoposide: etoposide inhibits the p53-Mdm2 autoregulatory feedback loop // *Oncogene*. 1999. V. 18. P. 1081–1091.
- Becker K.A., Stein J.L., Lian J.B. et al. Establishment of histone gene regulation and cell cycle checkpoint control in human embryonic stem cells // *J. Cell Physiol*. 2006. V. 210. P. 517–526.
- Bueno C., Montes R., Catalina P., Rodríguez R., Menendez P. Insights into the cellular origin and etiology of the infant pro-B acute lymphoblastic leukemia with MLL-AF4 rearrangement // *Leukemia*. 2011. V. 25. P. 400–410.
- Boyd A.S., Wu D.C., Higashi Y., Wood K.J. A comparison of protocols used to generate insulin-producing cell clusters from mouse embryonic stem cells // *Stem Cells*. 2008. V. 26. P. 1128–1137.
- Brederlau A., Correia A.S., Anisimov S.V. et al. Transplantation of human embryonic stem cell-derived cells to a rat model of Parkinson's disease: effect of in vitro differentiation on graft survival and teratoma formation // *Stem Cells*. 2006. V. 24. P. 1433–1440.
- Burdon T., Smith A., Savatier P. Signaling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells // *Trends Cell Biol*. 2002. V. 12. P. 432–438.
- Corbet S.W., Clarke A.R., Gledhill S., Bird C.C., Wyllie A.H. Embryonic stem cell-specific features of the cellular response to DNA-damaging agents // *J. Pathol*. 1995. V. 176 (Suppl). P. 17A.
- Chuykin I.A., Lianguzova M.S., Pospelova T.V., Pospelov V.A. Activation of DNA damage response signaling in mouse embryonic stem cells // *Cell Cycle*. 2008. V. 7. P. 2922–2928.
- Drasga R.E., Einhorn L.H., Williams S.D., Patel D.N., Stevens E.E. Fertility after chemotherapy for testicular cancer // *J. Clin. Oncol*. 1983. V. 1. P. 179–183.
- Fluckiger A.C., Marcy G., Marchand M. et al. Cell cycle features of primate embryonic stem cells // *Stem Cells*. 2006. V. 24. P. 547–556.
- Jagetia G.C., Krishnamurthy H., Jyothi P. Evaluation of cytotoxic effects of different doses of vinblastine on mouse spermatogenesis by flow cytometry // *Toxicology*. 1996. V. 112. P. 227–236.
- Jirmanova L., Afanassieff M., Gobert-Gosse S. et al. Differential contributions of ERK and PI3-kinase to the regulation of cyclin D1 expression and to the control of the G1/S transition in mouse embryonic stem cells // *Oncogene*. 2002. V. 2. P. 515–528.
- Kiuru M., Boyer J.L., O'Connor T.P., Crystal R.G. Genetic control of wayward pluripotent stem cells and their progeny after transplantation // *Cell Stem Cell*. 2009. V. 4. P. 289–300.
- Momčilović O., Choi S., Varum S. et al. Ionizing radiation induces ataxia telangiectasia mutated-dependent checkpoint signaling and G(2) but not G(1) cell cycle arrest in pluripotent human embryonic stem cells // *Stem Cells*. 2009. V. 27. P. 1822–1835.
- Moneypenny C.G., Shao J., Song Y., Gallagher E.P. MLL rearrangements are induced by low doses of etoposide in human fetal hematopoietic stem cells // *Carcinogenesis*. 2006. V. 27. P. 874–881.
- Nagao T., Yoshimura S., Saito Y., Imai K. Developmental toxicity of the topoisomerase inhibitor, etoposide, in rabbits after intravenous administration // *Teratog. Carcinog. Mutagen*. 1999. V. 19. P. 233–241.
- Nam C., Doi K., Nakayama H. Etoposide induces G2/M arrest and apoptosis in neural progenitor cells via DNA damage and an ATM/p53-related pathway // *Histol. Histopathol*. 2010. V. 25. P. 485–493.
- Palo A.K., Sahu P., Choudhury R.C. Etoposide-induced cytogenotoxicity in mouse spermatogonia and its potential transmission // *J. Appl. Toxicol*. 2005. V. 25. P. 94–100.
- Palo A.K., Pandit R.S., Choudhury R.C. Vinblastine-induced cytogenotoxicity in spermatogonia and its transmission in the germline cells of Swiss mice // *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol*. 2011. V. 30. P. 113–121.
- Perry M.C. (ed.). The chemotherapy source book. Fourth Edition // Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2008; P. 1–739.
- Russo A., Pacchierotti F. Meiotic arrest and aneuploidy induced by vinblastine in mouse oocytes // *Mutat. Res*. 1988. V. 202. P. 215–221.
- Savatier P., Huang S., Szekely L. et al. Contrasting patterns of retinoblastoma protein expression in mouse embryonic stem cells and embryonic fibroblasts // *Oncogene*. 1994. V. 9. P. 809–818.
- Savatier P., Lapillonne H., van Grunsven L.A. et al. Withdrawal of differentiation inhibitory activity/leukemia inhibitory factor up-regulates D type cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in mouse embryonic stem cells // *Oncogene*. 1996. V. 12. P. 309–322.
- Stead E., White J., Faast R. et al. Pluripotent cell division cycles are driven by ectopic Cdk2, cyclin A/E and E2F activities // *Oncogene*. 2002. V. 21. P. 8320–8333.
- Sundberg M., Andersson P., Akesson E. et al. Markers of pluripotency and differentiation in human neural precursor cells derived from embryonic stem cells and CNS tissue // *Cell Transplant*. 2011. V. 20. P. 177–191.
- Tang C., Lee A.S., Volkmer J.-P., Sahoo D. et al. An antibody against SSEA-5 glycan on human pluripotent stem cells enables removal of teratoma-forming cells // *Nat. Biotechnol*. 2011. V. 29. P. 829–834.
- Van Calsteren K., Hartmann D., Van Aerschot L. et al. Vinblastine and doxorubicin administration to pregnant mice affects brain development and behaviour in the offspring // *Neurotoxicology*. 2009. V. 30. P. 647–657.
- Vander Heiden M.G. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens // *Nat. Rev. Drug Disc*. 2011. V. 10. P. 671–684.
- Weng J.L., Kempainen B.W., Stringfellow D., Paxton R., Price S. Effects of a teratogen, vinblastine, on cellular proteins in an embryonic cell line // *Teratology*. 1991. V. 43. P. 462.
- White J., Stead E., Faast R. et al. Developmental activation of the Rb-E2F pathway and establishment of cell cycle regulated Cdk activity during embryonic stem cell differentiation // *Mol. Biol. Cell*. 2005. V. 16. P. 2018–2027.

Antiproliferative and Cytotoxic Effects of Different Type Cytostatics on Mouse Pluripotent Stem and Teratocarcinoma Cells

O. F. Gordeeva

*Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia
e-mail: olgagordeeva@yandex.ru*

Abstract—Pluripotent stem cells are able to proliferate indefinitely and differentiate in vitro into various cell types. However, in most cases in vitro differentiation of the pluripotent stem cells is asynchronous and incomplete, and the residual undifferentiated cells can initiate teratoma development after transplantation into recipients. These features of the pluripotent stem cells are the major issue for development of safe cell therapy technologies based on pluripotent stem cells. Considering significant resemblance of growth rates of pluripotent stem and cancer cells we investigated antiproliferative and cytotoxic effects of different type cytostatics (mitomycin C, etoposide, vinblastine and cycloheximide) on the undifferentiated and differentiating mouse embryonic stem cells, embryonic germ cells, blastocyst and on mouse embryonal teratocarcinoma cells and mouse embryonic fibroblasts. The findings showed that all cytostatics used induced both antiproliferative effects and acute toxic processes in undifferentiated pluripotent stem cells and embryonal teratocarcinoma cells whereas these effects were less in differentiating embryonic stem cells and embryonic fibroblast. Moreover, the trophoblast cells of mouse blastocysts were less sensitive to damaging effects of cytostatics than inner cell mass cells. The examination of deferred effects of cytostatics revealed that the effects of mitomycin C, etoposide and vinblastine, but not cycloheximide, were irreversible because survived cells were not able to proliferate. Nevertheless, the numbers of embryonic fibroblasts exposed to etoposide or vinblastine remained unchanged while vast majority of undifferentiated pluripotent cells treated underwent apoptosis. Thus, diverse effects of etoposide and vinblastine on the undifferentiated pluripotent stem cells and differentiated embryonic cells allow us to consider these cytostatics and their analogs as drug-candidates for selective elimination of the residual undifferentiated pluripotent stem cells from population of differentiating cells. These findings demonstrate for the first time the possibility of selective elimination of undifferentiated pluripotent stem cells using cytostatic drugs approved for clinic practice. However, to improve effectiveness and safety of this approach and to prevent mutagenic, carcinogenic and teratogenic effects on undifferentiated pluripotent stem cells and their differentiated cell derivatives large-scale studies of cytostatic effects using different experimental design and active doses must be performed.

Keywords: embryonic stem cells, blastocyst, embryonic germ cells, teratocarcinoma, cytostatics, mitomycin C, etoposide, vinblastine, cycloheximide, retinoid acid, differentiation, cytotoxicity, embryotoxicity.