

На правах рукописи

МОРГУНОВА
Галина Васильевна

**КИНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ МОДЕЛИРОВАНИЯ СТАРЕНИЯ
В ЭКСПЕРИМЕНТАХ НА НЕПЕРЕСЕВАЕМОЙ КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК**

14.01.30 – геронтология и гериатрия

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург–2019

Работа выполнена в секторе эволюционной цитогеронтологии лаборатории клеточной биологии старения и развития биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова"

Научный руководитель:

доктор биологических наук
Хохлов Александр Николаевич

Официальные оппоненты:

Колосова Наталия Гориславовна, доктор биологических наук, профессор, лаборатория молекулярных механизмов старения ФГБУН "Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук", заведующая лабораторией

Корневский Андрей Валентинович, доктор биологических наук, лаборатория межклеточных взаимодействий отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ "Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта", ведущий научный сотрудник

Ведущая научная организация: ФГБУН "Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля Российской академии наук", г. Москва, Россия

Защита диссертации состоится « ____ » _____ 2019 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д.521.103.01 в АННО ВО НИЦ "Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии" по адресу: 197110, Санкт-Петербург, пр. Динамо, 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте АННО ВО НИЦ "Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии" <http://www.gerontology.ru>.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2019 г.

Ученый секретарь

диссертационного Совета Д 521.103.01
доктор биологических наук, профессор  Людмила Семеновна Козина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Продолжительность жизни людей в развитых странах растёт, но возрастает и число больных с серьёзными возрастными патологиями, в том числе сердечно-сосудистыми и нейродегенеративными (инфаркты, инсульты, болезнь Альцгеймера, атрофия мышечной ткани и т.д.). Данные патологии связаны с нарушением функционирования кардиомиоцитов и нейронов – постмитотических долгоживущих клеток, время существования которых сопоставимо со временем существования организма [Cuervo et al. 2005; Khokhlov 2010]. Изучение процессов, лежащих в основе механизмов старения данных клеток, является приоритетной задачей в цитогеронтологии. Нейроны и мышечные клетки не могут пролиферировать, так как выполняют определённые функции, несовместимые с делением. Модель хронологического/"стационарного старения" позволяет имитировать и изучать закономерности, определяющие продолжительность жизни постмитотических клеток [Хохлов 1988; MacLean et al. 2001; Longo, Fabrizio 2012; Sampaio-Marques et al. 2019]. В рамках данной модели культура клеток переходит в стационарную фазу роста вследствие ограничения пролиферации (например, из-за контактного торможения) и спустя определённое время начинает деградировать, так как она не может обновиться за счёт деления клеток.

Долгое время под старением клеток понимали старение "по Хейфлику", или репликативное старение, феномен которого заключается в изменении клеток по мере исчерпания ограниченного пролиферативного потенциала (максимального числа удвоений клеточной популяции) [Hayflick, Moorhead 1961]. Некоторое время после его открытия господствовала идея о том, что предел Хейфлика лежит в основе старения организма. Однако довольно скоро стало понятно, что даже клетки пожилых людей не исчерпывают полностью свой митотический потенциал [Cristofalo et al. 1998; Olovnikov 2007; Khokhlov 2010]. Кроме того, данная модель никак не объясняла старение постмитотических и специализированных клеток, а также стволовых клеток, имеющих активную теломеразу. "Стационарное старение" клеточных культур позволяет искать ответы на некоторые из описанных выше вопросов.

Наибольшее распространение модель хронологического/"стационарного старения" получила в экспериментах на дрожжах [Longo, Fabrizio 2012; Polymenis, Kennedy 2012]. Модельная система является универсальной и может быть применима к клеткам самого разного происхождения [Khokhlov et al. 2014]. Адекватность использования данной модели доказывают эксперименты, в которых обнаруживается значительное сходство между возрастными повреждениями и нарушениями в клетках организма и в клетках, претерпевших "стационарное старение" [Khokhlov et al. 1986; Alvers et al 2009; Wierman et al. 2017]. С применением модели хронологического старения на дрожжах исследователи уже многие годы изучают фундаментальные механизмы старения и тестируют геропротекторы, ещё больше ценных данных можно получить, используя для этой цели клетки млекопитающих.

С помощью клеточных моделей можно относительно быстро тестировать потенциальные геропротекторы. Однако необходимо установить критерии, по которым можно оценить, замедляет или ускоряет изучаемое биологически активное соединение или физический фактор старение культуры клеток. При изучении репликативного старения, как правило, исследователи пользуются так называемыми биомаркерами "возраста" *in vitro*. Наиболее надёжным (и, фактически, единственным) способом обнаружения у изучаемого соединения геропротекторных свойств в экспериментах с животными является построение кривых гибели [Comfort 1964; Khokhlov 2010]. По изменению формы этих кривых можно сделать выводы о

том, как влияет соединение на характер старения популяции. Подобный подход было бы интересно использовать и в экспериментах на клеточных культурах.

Цель и задачи исследования

Целью работы стала оценка возможности использования кинетических закономерностей вымирания непересеваемой культуры клеток для изучения механизмов старения и для тестирования потенциальных геропротекторов. В работе поставлены следующие **задачи**:

1 – Изучить кинетику вымирания непересеваемой культуры клеток и проанализировать её изменения при модификации условий культивирования.

2 – Определить оптимальные условия для корректного моделирования "стационарного старения" на трансформированных клетках китайского хомячка (ККХ); оценить влияние таких параметров, как pH, солевой и питательный состав сред, на продолжительность жизни непересеваемой культуры клеток.

3 – Изучить возможность использования известных биомаркёров "клеточного возраста" в модели "стационарного старения" культур клеток.

4 – Протестировать на разрабатываемой модельной системе некоторые интересные в геронтологическом плане соединения – 2,4-динитрофенол (ДНФ), 8-оксо-2'-дезоксигуанозин (8-охо-dG; 8-охо-2'-deoxyguanosine), изотонический препарат "Квинтон" (QMP; Quinton Marine Plasma).

Научная новизна

В работе впервые показано, что клетки в непересеваемой культуре вымирают в соответствии с законом Гомпертца, как и когорты животных или людей. Доказана применимость для изучаемой модели биомаркёра клеточного "возраста" – ассоциированной со старением β -галактозидазы, что говорит о сходстве двух типов клеточного старения – репликативного и "стационарного". Подробно изучена динамика изменения pH в культуральной среде в ходе роста, пребывания в стационарной фазе и вымирания непересеваемой культуры клеток, а также исследовано влияние разных способов поддержания этого показателя на рост такой культуры. В экспериментах с использованием методики полимеразной цепной реакции не обнаружено аномального увеличения числа копий генов *MAP1LC3A*, *Atg5*, *PRKAA1*, *GAPDH*, *ACTB*, *B2M*, *Mki67*, *Cdkn2a*, *Tp53* в ККХ линии B11-dii FAF28 по сравнению с их числом у китайского хомячка (*Cricetulus griseus*). Показано, что уровень транскрипции генов *Atg5* и *PRKAA1* (белок – α_1 -субъединица АМПК) не изменяется в ходе "стационарного старения" клеток этой линии. Установлено, что ДНФ в "мягко разобщающих" концентрациях не влияет на рост и гибель непересеваемой культуры клеток. 8-охо-dG не влияет на рост такой культуры клеток, но вызывает уменьшение её средней продолжительности жизни. Замена 44,4% МДСИ на QMP увеличивает среднюю и максимальную продолжительность жизни культуры клеток в стационарной фазе.

Теоретическая и практическая значимость работы

Соответствие кинетики гибели клеток закону Гомпертца доказывает, что их вымирание в культуре происходит по тем же принципам, что и вымирание когорты организмов, – следовательно, для клеточной культуры можно строить кривые выживания и использовать их при тестировании геропротекторов. Применимость широко известного биомаркёра возраста, ассоциированной со старением β -галактозидазы, не только доказывает наличие общих черт между двумя основными цитогеронтологическими моделями (репликативное и хронологическое старение), но и позволяет дополнить набор методов для работы со второй из них. Как известно, линии клеток, полученные от китайского хомячка, являются самыми

популярными и широко используемыми в биотехнологических целях для производства моноклональных антител и рекомбинантных белков человека. В связи с этим результаты диссертационной работы имеют прикладное значение, так как в ней подробно проанализировано влияние состава сред, добавления дополнительных компонентов и условий культивирования на рост и долговременное поддержание непересеваемой культуры ККХ в жизнеспособном состоянии. Обнаружено, что при длительном культивировании ККХ необходимо подбирать среды с высоким содержанием незаменимых аминокислот и глюкозы. Не так принципиально наличие дополнительных компонентов – заменимых аминокислот, вспомогательных добавок, витаминов, наличие которых способствует бурному росту культуры, но приводит к её преждевременной гибели.

Положения, выносимые на защиту

1. Для корректной оценки плотности вымирающей культуры в экспериментах с использованием модели "стационарного старения" целесообразно снимать клетки с поверхности роста и оценивать их количество в гемоцитометре. Принципиально важным при длительном культивировании ККХ является высокое содержание аминокислот (в первую очередь, незаменимых и глутамин), витаминов и глюкозы в среде, добавление дополнительного буфера не требуется, так как в ходе эксперимента рН не опускается ниже 6,4.

2. Относительный уровень транскрипции генов-регуляторов клеточного цикла и генов, связанных с аутофагией, не различается в клетках разного "стационарного возраста". Исключением является ген *MAP1LC3A* (кодирует белок LC3), уровень экспрессии которого понижен в "зрелых" и "умеренно старых" (от 8 до 34 сут культивирования) клетках. В качестве биомаркера "клеточного возраста" в модели "стационарного старения" можно использовать активность ассоциированной со старением β -галактозидазы (SA- β -gal; senescence-associated β -galactosidase).

3. В нашей модели популяция клеток вымирает в соответствии с уравнением Гомпертца, т.е. вероятность их гибели увеличивается со временем, как и в когортах людей или животных. Вымирание культивируемых клеток в поздней стационарной фазе, по-видимому, не может быть обусловлено простой нехваткой питательных веществ или значительным снижением рН, а связано с "реальным" старением культуры.

4. Ингибитор "аутофагического потока" (autophagic flux) хлорид аммония ухудшает пролиферативную активность ККХ и способствует снижению плотности культуры, но не влияет на продолжительность жизни клеток.

5. ДНФ в концентрациях, предположительно обеспечивающих "мягкое разобшение" дыхания и окислительного фосфорилирования, не оказывает влияния на рост и гибель культуры клеток вследствие её "стационарного старения". 8-охо-dG не влияет на пролиферативную активность "молодых" клеток, но ухудшает жизнеспособность "стационарно старых" клеток. Замена части МДСИ на QMP способствует лучшему росту культуры, а также увеличивает её среднюю, модальную и максимальную продолжительность жизни.

Структура и объем диссертации

Работа изложена на 193 страницах, состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов, результатов и обсуждения, выводов и списка использованной литературы, 3 приложений, содержит 34 рисунка и 2 таблицы. Список использованной литературы включает 390 источников, в том числе 359 на иностранных языках.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 36 научных работ, в том числе 16 статей в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для опубликования материалов диссертационных исследований (из них 12 статей, индексируемых Scopus и Web of Science), 3 главы в коллективных монографиях, индексируемых Scopus и Web of Science, 3 статьи в сборниках и 14 тезисов докладов.

Апробация и реализация диссертации

Материалы диссертации доложены на II Российском симпозиуме с международным участием "Световой режим, старение и рак" (Петрозаводск, 2013); Международной научно-практической конференции "Пожилой больной. Качество жизни" (Москва, 2013–2018 гг.); Международной конференции "Фундаментальные проблемы геронтологии и гериатрии" (Санкт-Петербург, 2014); Международной научной конференции "Радиобиология: антропогенные излучения" (Гомель, Беларусь, 2014); Международной научной конференции "Радиобиология: "Маяк", Чернобыль, Фукусима" (Гомель, Беларусь, 2015); Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов" (Москва, 2016–2019 гг.); Международной научной конференции "Biomedical Innovations for Healthy Longevity/Биомедицинские инновации для здорового долголетия" (Санкт-Петербург, 2016); Международной научной конференции "Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/BGRS-2016" (Новосибирск, 2016); Научно-практической конференции "Инновационные российские технологии в геронтологии и гериатрии – 2017", посвящённой 25-летию Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии (Санкт-Петербург, 2017); Международном конгрессе "Социальная адаптация, поддержка и здоровье пожилых людей в современном обществе" (Санкт-Петербург, 2018). Результаты работы неоднократно обсуждались на заседаниях сектора эволюционной цитогеронтологии лаборатории клеточной биологии старения и развития биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. За проведённые исследования соискатель был удостоен нескольких стипендий и премий, в том числе Стипендии Президента Российской Федерации молодым учёным и аспирантам, осуществляющим перспективные научные исследования и разработки по приоритетным направлениям модернизации российской экономики.

Личный вклад автора

Автор принимал участие (вклад не менее 80%) во всех этапах подготовки и реализации работы – планировании и проведении экспериментов, обработке и анализе данных, написании научных статей и отчётов, подготовке докладов.

Связь с научными и научно-прикладными программами

Работа выполнялась в период прохождения курса аспирантуры (2013–2017 гг.) в рамках государственного задания МГУ, ч. 2 (фундаментальные научные исследования, № АААА-А16-116021660098-8) и частично – при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 18-34-00813 мол_а, диссертант – руководитель проекта).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Культура клеток. Эксперименты проводили на ККХ перевиваемой линии B11-dii FAF28 (клон 237), полученной из ФГБНУ "Медико-генетический научный центр" (Москва). Клетки культивировали при 37°C в стеклянных флаконах Карреля, используя модифицированную Дульбекко среду Игла (МДСИ; NuClone, GE Healthcare Life Sciences, США) с добавлением 5–10% сыворотки крови крупного рогатого скота (СКРС; "РАА", Австрия или "Биолот",

Россия), пенициллина (100 ед./мл) и стрептомицина (100 мкг/мл). Исключение составляли эксперименты по культивированию клеток на средах разного состава, список и состав сред приведён в *Приложении 2* диссертации. Поддерживая культуру, клетки пересевали в соотношении 1:10–1:3 через каждые 3–4 сут. Клетки снимали с поверхности роста с помощью смеси (1:1) 0,02%-го версена и 0,25%-го трипсина (ФГБУ "НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского" Минздрава России, Москва).

Определение митогенных и цитотоксических свойств тестируемых соединений. В предварительных исследованиях, направленных на определение цитотоксических и митогенных свойств различных соединений, клетки в "возрасте" 3–4 сут (т.е. выращиваемые без посева в течение 3–4 сут) засеивали в герметично закрывающиеся пенициллиновые флаконы с плотностью около 20–40 тыс. клеток/см². Через сутки добавляли во флаконы среду, содержащую исследуемое соединение в разных конечных концентрациях, в контрольные флаконы добавляли среду с соответствующим количеством дистиллированной воды качества Milli-Q. Флаконы помещали на 4–7 сут в термостат (37°C), после чего клетки снимали с поверхности роста смесью растворов версена и трипсина, затем оценивали их количество с помощью камер Горяева (4–6 флаконов на каждую точку, 4 камеры на каждый флакон).

Построение кривых выживания культуры клеток. Для оценки влияния тех или иных соединений на кинетику роста клеток и их последующую гибель в стационарной фазе 3-суточные клетки засеивали в пенициллиновые флаконы с плотностью 20–40 тыс. клеток/см². На следующие сутки подсчитывали количество прикрепившихся клеток и добавляли во флаконы среду, содержащую исследуемое соединение (действующая концентрация определялась из оценки на цитотоксичность), во флаконы контрольной группы – среду с соответствующим объёмом растворителя. Через определённые промежутки времени снимали клетки с поверхности роста смесью растворов версена и трипсина, затем оценивали их количество с помощью камер Горяева (3–4 флакона на каждую точку, 4 камеры на каждый флакон).

На основании полученных данных строили кривые роста, пребывания в стационарной фазе и гибели клеток в контрольной и экспериментальной группах. Используя данные о кинетике вымирания культуры клеток, строили кривые выживания и рассчитывали среднюю, 90%-ную, и медианную продолжительность жизни (СПЖ, ПЖ90 и ПЖ50 соответственно), а также определяли параметры уравнения Гомпертца – силу смертности в нулевой момент времени (R_0), темп старения (α), модальную продолжительность жизни (МПЖ). Для вычисления СПЖ использовали формулу:

$$\text{СПЖ} = \frac{1}{N_0} \sum_{i=1}^n \left[\left(t_{i-1} + \frac{t_i - t_{i-1}}{2} \right) \cdot (N_{i-1} - N_i) \right],$$

где N_0 – максимальная плотность культуры, t_i – время, к которому культура достигла плотности N_i . Аппроксимацию данных о вымирании осуществляли с помощью функции Гомпертца.

Оценка способности к образованию колоний. В экспериментах с ДНФ определяли его цитотоксическое влияние с использованием метода оценки эффективности образования колоний (ЭОК) и определением разработанного в нашей лаборатории показателя средневзвешенного номера класса (СВНК) [Alinkina et al. 2012]. Засеивали в чашки Петри ("Nunclon", Дания) от 100 до 200 клеток, использовали МДСИ с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (NuClone; GE Healthcare Life Sciences, США). Помещали чашки на 7 сут в CO₂-инкубатор EG 115 IR (37°C, 5% CO₂; Jouan, Германия). Фиксацию и окраску производили, как

было описано ранее [Alinkina et al. 2012]. Для оценки СВНК разбивали все колонии на 17 классов в зависимости от их величины.

Окраска клеток метиленовым синим и трипановым синим. Для дифференциальной окраски живых и мёртвых клеток использовали 0,1%-ный раствор метиленового синего (ПанЭко, Россия) или 0,4%-ный раствор трипанового синего (Sigma, США). Клетки окрашивали (по стандартному протоколу) и подсчитывали на ростовой поверхности или в суспензии с использованием гемоцитометра.

ПЦР в реальном времени. Определение экспрессии генов. Клетки разного "стационарного возраста" снимали с поверхности роста с помощью смеси версена и трипсина. Итоговую суспензию каждой группы, приготовленную на PBS, центрифугировали при 3000g в течение 2 мин, чтобы осадить клетки. К осадку клеток добавляли 500 мкл охлаждённого реагента extractRNA (Евроген, Россия), дальнейшее выделение РНК проводили по протоколу производителя, использовали центрифугу с охлаждением (Eppendorf, Германия). Измерение концентрации нуклеиновых кислот осуществляли с помощью прибора NanoDrop Spectrophotometr (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Германия).

Удаление ДНК проводили с помощью ДНКазы (Thermo Fisher Scientific, США) по протоколу производителя. Синтез кДНК осуществляли с помощью набора "MMLV RT kit" (Евроген, Россия) по протоколу производителя. В качестве затравок для обратной транскрипции РНК использовали случайные праймеры. Полученную смесь ставили на 2 мин в термостат на 70°C, затем быстро переносили её в ледяную баню и добавляли 5-кратный буфер для ревертазы, ревертазу, смесь 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов (dNTP), раствор дитиотреитола (DTT) и воду. Ставили пробы на 1 ч в термостат на 40°C, затем на 10 мин переставляли на 70°C. ПЦР в реальном времени проводили на приборе MiniOpticon Real-Time PCR System (Bio-Rad Laboratories, США). Используемые при ПЦР праймеры приведены в *Приложении 3* диссертации. Протокол для ПЦР состоял из следующих этапов: 1 – 95°C 5 мин, 2 – 95°C 10 с, 3 – 55°C 30 с, 4 – 72°C 1 мин (1–4 этапы – 39 циклов); 5 – 65°C 5 сек и 95°C 5 с. Весь процесс – 2 ч 22 мин.

Для определения продуктов реакции готовили агарозный гель на трис-ацетатном буфере с добавлением бромистого этидия. В качестве маркера молекулярных длин ДНК использовали GeneRuler 100 bp Plus – DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США), источнику питания Эльф-4 (ДНК-технологии, Россия), параметры электрофореза – 110 В, 8 Ватт, 200 мА, 25 мин.

Оценка вариации числа копий генов. Клетки выращивали, снимали с поверхности роста и осаждали так же, как описано выше. ДНК из клеток выделяли стандартным фенол-хлороформным методом. ПЦР в реальном времени проводили, как описано выше.

Высокоэффективная жидкостная хроматография. Для определения динамики поглощения 8-охо-dG клетки выращивали в течение 4 сут до состояния сомкнутого монослоя, затем добавляли окисленный нуклеозид до конечной концентрации 10^{-3} М и через определённые интервалы времени производили отбор 20–30 мкл среды, последний был сделан на 20-е сут. Кроме того, определили стабильность 8-охо-dG в среде с 10% сыворотки без клеток при инкубации (37°C) в течение 21 сут. Оценку содержания 8-охо-dG в среде любезно провели сотрудники кафедры биорганической химии биологического факультета МГУ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе LC-20AD (Shimadzu Scientific Instruments, Япония) со спектрофотометрическим детектором SPD-M20A (Shimadzu Corporation, Япония) и автосэмплером SII-20A (Shimadzu Corporation, Япония); использовали

колонку Equivalent to Phenomenex® Luna® C18(2) (Phenomenex Inc., США). Хроматограммы регистрировали с помощью программы Shimadzu LCSolution (Shimadzu Corporation, Япония).

Оценка экспрессии SA-β-gal. 3-суточные клетки засеивали с плотностью 80 тыс. клеток/см² в герметично закрывающиеся пенициллиновые флаконы с покровными стеклами на дне, использовали среду МДСИ с 10% СКРС. Через 2 сут флаконы группы СИПС (стресс-индуцированное преждевременное старение) подвергали воздействию 5%-ного этанола (на 1 ч через каждые 24 ч в течение 5 сут). Через 7 сут после посева производили фиксацию и окраску по протоколу Dimri et al. (1995) с использованием X-gal (Sigma, США). В параллельной серии экспериментов сравнивали окраску в клетках разного "стационарного возраста" – 7-суточные и 14-суточные.

Потенциальные геропротекторные и геропромоторные соединения, а также добавки к средам. QMP (Laboratoires Quinton International, S.L., Испания) использовали для замены сыворотки и МДСИ, также им разбавляли культуральную среду в разных пропорциях. 8-охо-dG был синтезирован на кафедре биоорганической химии биологического факультета МГУ из 2'-дезоксигуанозина (Sigma, США), чистота синтезированного соединения подтверждена методами ядерного магнитного резонанса, а также жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии. ДНФ (Merck-Schuchardt GmbH, Германия) перекристаллизовали и спектрофотометрически подтвердили его чистоту. Химически чистый хлорид аммония (Реахимприбор, Россия) растворяли в дистиллированной воде качества Milli-Q. 1М раствор буфера HEPES-натриевая соль (ПанЭко, Россия) добавляли в среду до конечной концентрации 20 мМ.

Определение pH культуральной среды. В экспериментах при необходимости измеряли pH культуральной среды, в которой содержались клетки, с помощью комбинированного полумикроэлектрода (ЭСК 10612; Измерительная техника, Россия), подключённого к цифровому pH-метру (Измерительная техника, Россия).

Статистическая обработка данных. При сравнении данных использовали t-критерий Стьюдента или непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Все данные приведены в виде среднего и стандартной ошибки среднего. Сравнение выживаемости в контрольной и в опытной группах осуществляли с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Математические расчёты и статистическую обработку данных производили с помощью программы SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Подбор оптимальных для изучения "стационарного старения" условий работы с непересеваемой культурой клеток. На рис. 1 представлены снимки непересеваемой культуры трансформированных ККХ линии B11-dii FAF28 в разных фазах роста и "стационарного старения". Культура ККХ достигает состояния сомкнутого монослоя приблизительно через 4–5 сут культивирования. В дальнейшем клетки несколько меняют форму (становятся менее распластанными) и уменьшаются, а к поздней стационарной фазе значительное их количество погибает.

Ранее в работах нашей лаборатории "стационарное старение" клеточных культур мы определяли как накопление в культивируемых клетках, пролиферация которых заторможена каким-либо способом (лучше всего с помощью контактного торможения), "возрастных" повреждений, сходных с изменениями в клетках стареющих многоклеточных организмов. В рамках другой модели, используемой в нашей лаборатории (клеточно-кинетическая модель для тестирования потенциальных геропротекторов и геропромоторов [Khokhlov 1992; 2018]),

изучалась кинетика роста непересяваемой культуры клеток. Аппроксимацию полученных данных проводили с использованием уравнения Ферхюльста-Пирла. В диссертационном исследовании мы попробовали изучить кинетику гибели культуры клеток, находящихся в стационарной фазе роста, для чего, как и в случае с оценкой кинетики роста, определяли количество клеток через определённые промежутки времени и строили кривые гибели.

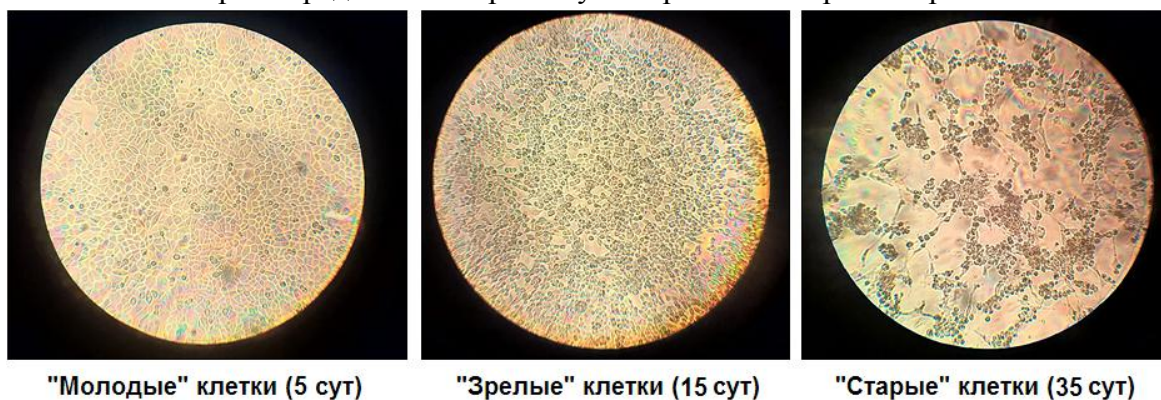


Рисунок 1. Внешний вид непересяваемой культуры ККХ разного "стационарного возраста"; световой микроскоп, увеличение 120×.

Изменение со временем соотношения живых и мёртвых клеток. Для построения кривой гибели необходимо корректно оценивать динамику изменения со временем соотношения в культуре живых и мёртвых клеток. В наших экспериментах мы неоднократно измеряли долю живых и мёртвых клеток с помощью различных подходов. Применяли как обычную визуальную оценку состояния клеток под микроскопом, так и фотографирование культуры с помощью цифровой камеры с последующим подсчётом доли живых и мёртвых клеток на экране компьютера. Клетки анализировали либо без использования красителей/зондов, либо после добавления красителей, которые обеспечивают дифференциальную окраску живых и мёртвых клеток. В частности, использовали трипановый синий (ТС), метиленовый синий (МС), нейтральный красный и МТТ. Данные о проценте мёртвых клеток в конкретной культуре, получаемые этими методами, в некоторых случаях достоверно различаются (например, результаты с окраской ТС достоверно отличаются от результатов с окраской нейтральным красным). Для своих экспериментов мы выбрали ТС и МС, так как они окрашивают отдельные клетки (в отличие от МТТ, который можно применять только для суспензии клеток) и результаты их окраски не различаются. Подсчёт клеток можно производить либо на ростовой поверхности, либо в суспензии – в счётных камерах или проточных цитометрах, предварительно сняв клетки с поверхности смесью версена и трипсина. При подсчёте клеток на ростовой поверхности доля мёртвых всегда оказывается больше, чем при подсчёте в камерах. Корректно подсчитывать количество живых клеток на поверхности можно только с использованием дифференциально окрашивающих живые и мёртвые клетки красителей. В поздней стационарной фазе роста даже с окраской подсчёт клеток затруднён.

Подсчёт в камерах Горяева показал, что количество мёртвых клеток в культуре возрастает до 20-х сут, а далее даже несколько уменьшается, при этом нет разницы между группами, окрашенными МС или ТС, поэтому можно использовать любой из двух красителей. На основании полученных данных было принято решение строить кривые роста, пребывания в стационарной фазе и гибели культуры путём подсчёта количества живых клеток в суспензии (это позволяет использовать как счётные камеры, так и более современное оборудование – проточные цитометры и автоматические счётчики клеток).

Выбор оптимальных условий для культивирования клеток, претерпевающих "стационарное старение". Одним из недостатков модели "стационарного"/хронологического старения является проблема закисления ростовой среды со временем. Клетки метаболизируют питательные вещества и выделяют в среду продукты распада, которые способствуют снижению pH. В связи с этим при постановке экспериментов необходимо тщательно подбирать условия для выращивания и содержания непересяваемой культуры, причём для разных клеток они могут значительно различаться [Ceccarini, Eagle 1971]. Клетки можно культивировать в герметично закрытых флаконах, но объём воздуха обязательно должен быть больше объёма среды, оптимальное соотношение – 10:1, либо в CO₂-инкубаторе. Для разных способов культивирования разработаны разные среды. Мы попытались сравнить, как будут расти клетки в герметично закрытых флаконах (с соотношением воздушной и жидкой фазы – 10:1) и в открытых флаконах, выращиваемых в CO₂-инкубаторе. Использовали МДСИ, содержащую 5% СКРС, флаконы первой группы плотно закрыли пробками и поместили в обычный термостат, второй – закрыли негерметично и поместили в атмосферу с 10% CO₂. Через 7 сут после посева произвели подсчёт плотности выросших клеток. Обнаружили, что обе культуры достигли приблизительно одинаковой плотности (герметично закрытые – 114678,33±1421,95 клеток, CO₂-инкубатор – 110865,61±2422,01 клеток, P = 0,667), следовательно, культивирование ККХ можно осуществлять любым из двух вариантов.

В следующей серии подготовительных экспериментов изучили влияние солевого состава среды на рост культуры ККХ. С этой целью клетки посеяли на среде 199 (содержание СКРС – 10%, плотность посева – 25 тыс. клеток/см²), в одном случае среда содержала соли Эрла, а в другом – соли Хэнкса. Не обнаружили различий по количеству прикрепившихся за 24 ч клеток (соли Эрла – 13312,54±807,38 клеток, соли Хэнкса – 14904±1532,73 клеток, P = 0,400) – следовательно, солевой состав не влияет на их способность к адгезии. Не различалась плотность культуры через 5 сут после посева (соли Эрла – 163253,31±5245,53 клеток, соли Хэнкса – 166225,41±6166,9 клеток, P = 0,690) – это говорит о том, что её рост также не зависит от солевого состава. Кроме того, ни в одном из случаев не обнаружено достоверного увеличения или снижения pH среды (pH через 5 сут: соли Эрла – 7,685±0,025, соли Хэнкса – 7,39±0,01, P = 0,333). Можно заключить, что для моделирования "стационарного старения" культуры ККХ в герметично закрытых флаконах можно использовать как среды на солях Эрла, так и среды на солях Хэнкса.

Также мы оценили, как влияет добавление буфера HEPES на рост и гибель непересяваемой культуры ККХ. Клетки растили на среде МДСИ с добавлением 10% СКРС, через 24 ч после прикрепления во флаконы экспериментальной группы добавляли HEPES (до конечной концентрации 20 мМ), в контрольные флаконы – соответствующее количество дистиллированной воды, результат эксперимента представлен на рис. 2А. Культура, растущая на среде с добавлением буфера, росла значительно лучше, чем контрольная, и достигала большей насыщающей плотности. Однако средняя продолжительность жизни (СПЖ) в группе HEPES на 6% меньше, чем в контрольной (СПЖ_{контроль} = 35 сут, СПЖ_{HEPES} = 33 сут; t₀ – 11-е сут). Распределение величин продолжительности жизни в опытной группе достоверно отличается от распределения этих величин в контрольной группе (критерий Колмогорова-Смирнова, p<0,05). Что особенно важно, pH среды различался только в первые несколько суток после посева, а после 10 сут был одинаковым в обеих группах.

В следующей серии попытались повторить тот же эксперимент, но HEPES/воду добавляли уже при посеве. Это позволило оценить, как влияет присутствие буфера на прикрепление

клеток, которое вносит определённый вклад в последующий рост, результат представлен на рис. 2Б.

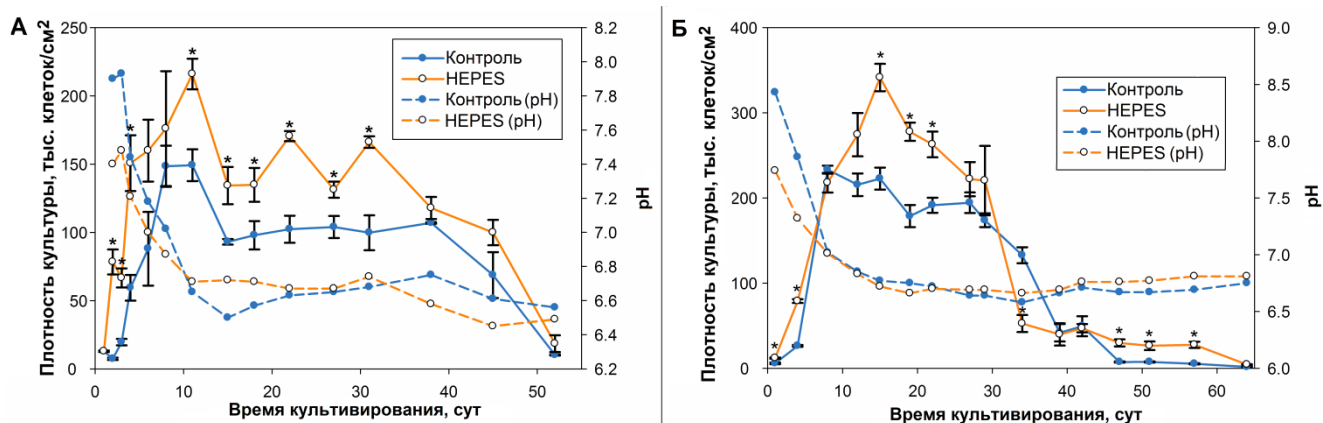


Рисунок 2. Кривые роста, пребывания в стационарной фазе и гибели культуры клеток на среде с добавлением буфера HEPES (20 мМ) и без буфера (левая ось ординат – плотность культуры клеток), а также кривые динамики изменения рН культуральной среды (правая ось ординат – показания рН). **А** – добавление буфера через сутки после посева, **Б** – добавление буфера при посеве. * – достоверное отличие от контрольной группы, $p < 0,05$.

В этом эксперименте клетки, растущие на среде с буфером, также достигли большей насыщающей плотности, при этом достоверно больше количество прикрепившихся клеток, но и вымирать они стали быстрее. СПЖ контрольной группы была на 12% больше, чем в группе HEPES (СПЖ_{контроль} = 26 сут, СПЖ_{HEPES} = 23 сут, t_0 – 8-е сут), также в контрольной группе больше была ПЖ90 (на 24%, ПЖ90_{контроль} = 36 сут, ПЖ90_{HEPES} = 27,4 сут), распределение величин продолжительности жизни различается достоверно ($p < 0,01$). Кривые, отражающие динамику изменения рН, похожи на кривые из предыдущего эксперимента – после 10 сут они не различаются.

Таким образом, HEPES не удерживает рН в области нейтральных значений и не увеличивает продолжительность жизни непересяваемой культуры ККХ. Положительное воздействие на рост обусловлено, вероятно, не столько буферными свойствами соединения, сколько его химической природой – HEPES является слабой кислотой. Добавление слабой кислоты выравнивает рН, который оказывается несколько завышен при посеве. В дальнейших экспериментах не использовали буфер HEPES.

Наконец, для моделирования "стационарного"/хронологического старения крайне важно правильно подобрать питательные среды с оптимальным органическим составом. С этой целью мы провели сравнительное исследование с построением кривых роста, пребывания в стационарной фазе и гибели культуры ККХ на разных средах (СКРС во всех случаях – 10%). Оптимальной для длительного культивирования ККХ оказалась МДСИ с повышенным содержанием глюкозы (4,5 г/л). Данные одного из сравнительных экспериментов приведены на рис. 3А.

На среде 199 культура клеток растёт значительно быстрее, чем на МДСИ, и достигает большей насыщающей плотности. Однако быстрый рост сразу же переходит в быстрое вымирание (СПЖ_{МДСИ} = 26 сут, СПЖ₁₉₉ = 10 сут; t_0 разное для групп "МДСИ" и "199" – 14-е и 9-е сут соответственно), максимальная продолжительность жизни в этой культуре оказалась меньше, чем в культуре, выращенной на среде МДСИ (ПЖ90₁₉₉ = 24 сут, ПЖ90_{МДСИ} – не рассчитывалась, так как эксперимент был окончен на 71-е сут, когда в контрольной группе вымерло 79% популяции). Среда 199 содержит вспомогательные вещества (холестерин,

натриевую соль АТФ, компоненты для построения нуклеотидов и др.), незаменимые и заменимые аминокислоты, а также 17 витаминов. В состав МДСИ входят преимущественно незаменимые аминокислоты и только 8 витаминов, вспомогательных соединений в ней нет (составы можно посмотреть в *Приложении 2* диссертации). Хотя МДСИ уступает по разнообразию компонентов среде 199, их концентрация в ней выше и во многих случаях превышает концентрацию тех же компонентов в среде 199 в несколько раз. В первую очередь это аминокислоты – глутамин (в 5,85 раз больше), изолейцин (в 5,25 раз больше), валин (в 3,76 раз больше) и т.д., а также витамины – мио-инозитол, пиридоксин и прочие. Также в использованной нами в этом эксперименте МДСИ содержится в 4,5 раза больше глюкозы, чем в среде 199. Кроме того, МДСИ обладает несколько большими буферной ёмкостью и осмоляльностью.

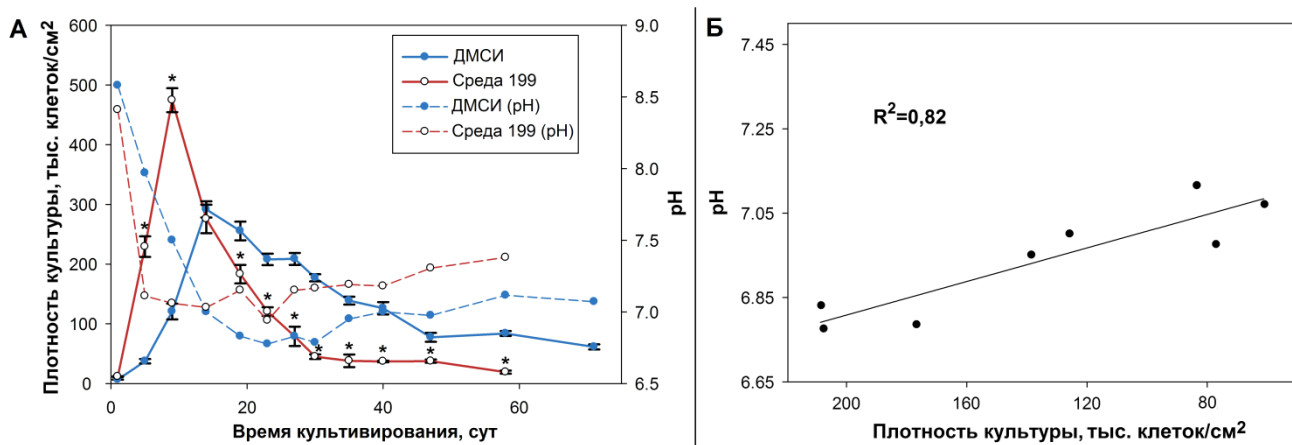


Рисунок 3. А – кривые роста, пребывания в стационарной фазе и гибели культуры клеток (левая ось ординат – плотность культуры клеток), а также кривые динамики изменения pH культуральной среды (правая ось ординат – показания pH) на разных средах. * – достоверное отличие, $p < 0,05$. Б – взаимосвязь pH культуральной среды и плотности вымирающей культуры ККХ в контрольной группе.

Бурный рост культуры, содержащейся на среде 199, вероятно, обеспечивается за счёт дополнительных компонентов – витаминов, заменимых аминокислот и вспомогательных веществ. Однако клетки быстро потребляют питательные вещества и в дальнейшем стремительно погибают вследствие их исчерпания. Наиболее критичной, вероятно, оказывается нехватка глутамина, однако нельзя исключить и недостаток других аминокислот – например, валина или лейцина, что подтверждается данными исследователей, работающих на других линиях клеток китайского хомячка [Fomina-Yadlin et al. 2014]. Возможно, важную роль играет и содержание глюкозы. Из всех протестированных нами сред наиболее подходящей для постановки экспериментов оказалась среда МДСИ с повышенным содержанием глюкозы. Мы также проверили, пригодна ли "стационарно старая" (т.е. кондиционированная непересеваемой культурой в течение долгого времени) МДСИ для роста "молодой" культуры ККХ. Для этого мы сливали среду, на которой в течение 30 и даже 45 сут росла непересеваемая культура, и готовили на её основе суспензию "молодых" клеток. На кондиционированной МДСИ "молодые" культуры клеток росли нормально (хотя и достигали меньшей насыщающей плотности) и поддерживались в течение следующих 25 сут (и могли поддерживаться на ней дольше, но эксперимент был завершён раньше, чем наступило полное вымирание). Следовательно, деградация не может быть вызвана исчерпанием питательных веществ и ростовых факторов, что согласуется с полученными ранее в нашей лаборатории на клетках той же линии данными [Хохлов и др. 2005]. А содержащихся в МДСИ питательных веществ не

только хватает для проведения длительных экспериментов в течение 45–60 сут, но и остаётся достаточно для роста и поддержания свежей культуры клеток.

Таким образом, результаты наших экспериментов позволяют заключить, что деградация клеток в стационарной фазе роста не является простым следствием нехватки питательных веществ в среде и не происходит по причине снижения рН, так как значение этого показателя в наших экспериментах не опускается ниже 6,4. Более того, рН может немного вырасти к концу эксперимента, когда клеток становится мало (обнаружена линейная взаимосвязь между рН и плотностью вымирающей культуры клеток – рис. 3Б).

Важно, что при росте культуры также обнаруживается линейная зависимость – по мере увеличения плотности культуры клетки активно закисляют среду вокруг себя, вследствие чего рН снижается. Такое снижение, вероятно, обусловлено производством кислых продуктов распада – в первую очередь, лактата [Leontieva, Blagosklonny 2011; Zhou et al. 2011], – которые и сдвигают рН в кислую сторону. рН перестаёт снижаться приблизительно через 10 сут после посева, когда культура достигает фазы плато.

Безусловно, выделяемые продукты распада негативно влияют на жизнеспособность клеток. Такие продукты распада могут способствовать ускорению старения, но не будут являться причиной гибели клеток, так как они не мешают молодой культуре ККХ расти на кондиционированной среде. Среди основных продуктов распада, которые могут влиять на выживаемость клеток, выделяют лактат (продукт метаболизма глюкозы) и аммиак (продукт распада глутамина). Манипуляции с составом сред – например, замена глюкозы на галактозу, а глутамин на глутамат – продлевают существование в непересеваемой культуре популярной линии клеток китайского хомячка СНО (Chinese hamster ovary cells) [Altamirano et al. 2000]. В экспериментах на СНО было установлено, что основным отравляющим продуктом всё же лактат, а не аммиак [Lao, Toth 1997]. Аммоний в высоких концентрациях не препятствует росту и продуктивности клеток, а также потреблению глюкозы и глутамин, а лактат в высоких концентрациях затормаживает рост на 25%.

В заключение можно сказать, что для работы с непересеваемой культурой ККХ можно использовать герметично закрытые флаконы и среду МДСИ, при этом добавление дополнительного буфера не требуется.

Установление закономерности вымирания клеток в ходе "стационарного старения".
В ходе диссертационного исследования мы получили набор кривых гибели непересеваемой культуры. Произведя аппроксимацию данных экспериментов, мы установили, что в наших опытах клетки вымирают в соответствии с уравнением Гомпертца, т.е. действительно стареют (рис. 4). Это свидетельствует о том, что вероятность их гибели со временем увеличивается экспоненциально, как и у стареющих животных или людей.

Таким образом, мы можем дать новое определение "стационарному старению" клеток, сходное с определением старения для организма [Comfort 1964]. "Стационарное"/хронологическое старение – это увеличение вероятности гибели клеток непролиферирующей культуры со временем, сопровождающееся накоплением "возрастных" повреждений, сходных с изменениями в клетках стареющих многоклеточных организмов. Лучшим способом оценки влияния того или иного геропротектора на старение является построение кривых выживания (survival curves) изучаемых модельных объектов. Построение и анализ кривых выживания непересеваемых культур клеток позволяют нам тестировать геропротекторы. Кроме того, мы получаем целый набор дополнительных параметров –

среднюю, медианную, модальную и максимальную продолжительность жизни, скорость вымирания и т.д.

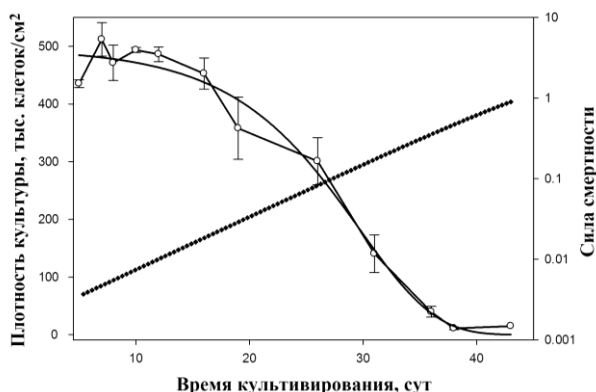


Рисунок 4. Кривая гибели стационарной культуры ККХ. Ломаная линия – экспериментальные данные; сплошная линия – кривая, аппроксимированная в соответствии с уравнением Гомпертца ($R^2 = 0,983$); прерывистая линия – увеличение силы смертности со временем (логарифмическая шкала).

Поиск биомаркёров, подходящих для определения "возраста" в модели "стационарного старения". При изучении "стационарного"/хронологического старения в качестве дополнения к методам построения кривых выживания было бы удобно использовать набор биомаркёров возраста. Поиск таких биомаркёров мы решили провести среди популярных в модели СИПС индикаторов, а также среди генов, активность которых может изменяться в стационарной фазе роста – регуляторов, вовлечённых в аутофагию.

Экспрессия и число копий генов, связанных с аутофагией и регуляцией клеточной пролиферации. Оценили уровень транскрипции трёх генов, связанных с макроаутофагией, в ККХ разного "стационарного возраста" – *Atg5* (autophagy related 5), *MAP1LC3A* (microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3A; кодирует белок LC3), *PRKAA1* (кодирует каталитическую α_1 -субъединицу АМПК). Уровень транскрипции изученных генов достоверно не изменялся в ходе "стационарного старения" (рис. 5), исключение составлял ген, кодирующий LC3 – уровень его экспрессии снижался после 4 сут культивирования и снова повышался только к 38-м сут. Экспрессия мРНК, кодирующих АМПК и *Atg5*, в ходе "стационарного старения" поддерживается на низком уровне в культурах ККХ, что соответствует литературным данным [Klionsky et al. 2016]. Из-за присущей стационарным культурам гетерогенности [Werner-Washburne et al. 2012] оценка среднего уровня экспрессии белка или мРНК может быть искажённой, так как в разных клетках она может значительно различаться, но мы не увидим этих различий на общем среднем фоне [Klionsky et al. 2016]. Возможно, именно по этой причине уровень транскрипции LC3 в "старых" клетках через 38 сут после посева не снижен. В стационарной культуре клеток можно выделить как минимум две субпопуляции – покоящиеся (quiescence; долгоживущая фракция) и непокоящиеся (non-quiescence; быстро деградирующие) клетки. В покоящихся клетках происходит накопление мРНК, кодирующих ключевые белки-участники сигнальных путей, – в первую очередь белки, участвующие в регуляции роста и метаболизма [Werner-Washburne et al. 2012]. Вероятно, через 38 сут после посева непокоящиеся клетки почти полностью вымирают и не искажают средний уровень экспрессии (или искажают его в меньшей степени), вследствие чего мы видим показатель, характерный для покоящихся клеток. Однако точное установление подобных фактов требует более детального изучения. Что же касается уровня экспрессии мРНК LC3 в "молодых" клетках, то эти результаты могут быть следствием влияния клеточного цикла на стимуляцию развития аутофагических вакуолей [Tasdemir et al. 2007].

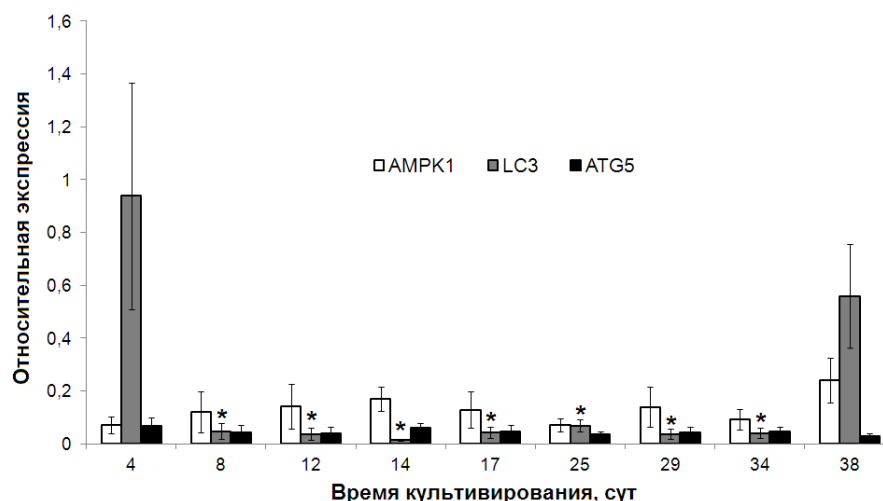


Рисунок 5. Оценка уровня транскрипции генов, связанных с аутофагией, в клетках разного "стационарного возраста". Приведены средние \pm стандартные ошибки среднего, * – достоверное отличие от уровня транскрипции LC3 в "молодых" (4-суточных) клетках, $p < 0,05$.

В качестве других потенциальных биомаркёров "клеточного старения" мы проанализировали уровень транскрипции генов, кодирующих белки, которые связаны с регуляцией клеточного цикла – p21 и p53. Однако нам не удалось обнаружить различий – мРНК обоих белков синтезировалась на низком уровне. Подобный результат, вероятно, связан с природой используемых нами клеток. p53 не всегда удаётся обнаруживать даже на уровне синтеза белка в ККХ другой линии – CHO [Shiao et al. 1998]. Даже при отравлении клеток никелем удаётся детектировать экспрессию близкого по массе к p53 белка, но не его самого. Это, как правило, связано с тем, что ген белка мутировал [Hu et al 1999]. В двух линиях ККХ из яичника (CHO-K1 и CHO-WBL) ген p53 представлен мутантной формой, а в случае с линией ККХ из лёгких (CHL) он, хотя и не является мутантным, всё равно неправильно функционирует [Hu et al. 1999]. В гене p53 есть мутации в большинстве опухолевых клеток человека [Nigro et al 1989]. То же, вероятно, относится и к белку p21.

Необходимо отметить, что при оценке вариации числа копий всех исследуемых генов с помощью ПЦР в реальном времени и с использованием программы MFEprimer-3.0 [Wang et al. 2019] мы не обнаружили аномального увеличения этого показателя по сравнению с их количеством у китайского хомячка (*Cricetulus griseus*). Гены, кодирующие AMPK α_1 , LC3, Atg5, p53, p21, представлены одной копией, референсные гены представлены несколькими копиями, но в количестве, не превышающем количество таких копий для хомячка.

SA- β -gal. SA- β -gal по-разному проявляет свою активность в "старых" и "молодых" клетках при pH 6,0, на чём и основан принцип её работы как биомаркёра "клеточного возраста". Мы проанализировали, может ли быть использована SA- β -gal в рамках нашей модели "стационарного старения" клеток. Дополнительно проверили методику на модели СИПС (этаноловый стресс), окрашивали клетки через 7 сут после посева. Клетки в экспериментальной группе окрасились в бирюзовый цвет, в контрольной окрашенных клеток почти нет.

В следующем эксперименте две группы клеток пребывали в стационарной фазе роста без пересевов в течение 7 и 14 сут (рис. 6). В молодых 7-дневных клетках SA- β -gal не проявилась или проявилась в единичных клетках. Бирюзовая окраска клеток 14-дневной культуры свидетельствует о наличии "старых" клеток. Эта культура действительно только перешла из "зрелого возраста" в "стационарно старый".

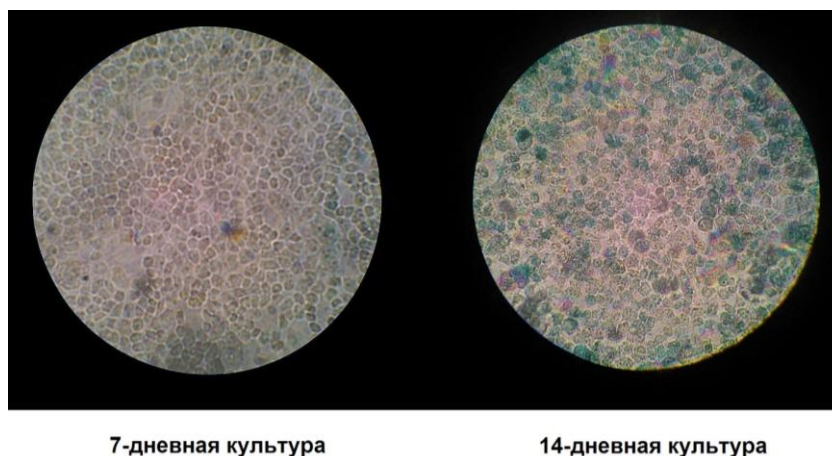


Рисунок 6. Непересеваемая культура трансформированных клеток китайского хомячка в разных фазах стационарного роста; фиксация формальдегидом и глутаральдегидом, световой микроскоп, увеличение 120×.

Как видно, в обоих случаях "старые" клетки окрашиваются, т.е. β-галактозидаза в таких клетках проявляет свою активность при pH 6.0. Мы оценили окраску количественно путём подсчёта клеток в полях зрения. В обеих группах "старых" клеток доля окрашенных оказалась приблизительно одинаковой – около 40%.

Таким образом, в рамках модели "стационарного"/хронологического старения можно использовать широко распространенный биомаркёр клеточного старения SA-β-gal.

Влияние нарушающего работу лизосом хлорида аммония (NH_4Cl) на кинетику гибели клеток. NH_4Cl блокирует так называемый "аутофагический поток" (autophagic flux), нарушая этап слияния аутофагосом с лизосомами [Klionsky et al. 2016]. Он накапливается в везикулах клетки с низким pH (лизосомы, эндосомы и др.) и нарушает их работу, нейтрализуя кислую среду внутри них.

В предварительном эксперименте оценили влияние NH_4Cl в концентрациях 10 мМ и 30 мМ (взяты из литературных данных) на рост и жизнеспособность клеток. Пролиферативная активность клеток значительно снизилась в обоих случаях – чем выше была концентрация соли, тем хуже пролиферировали клетки – рис. 7А.

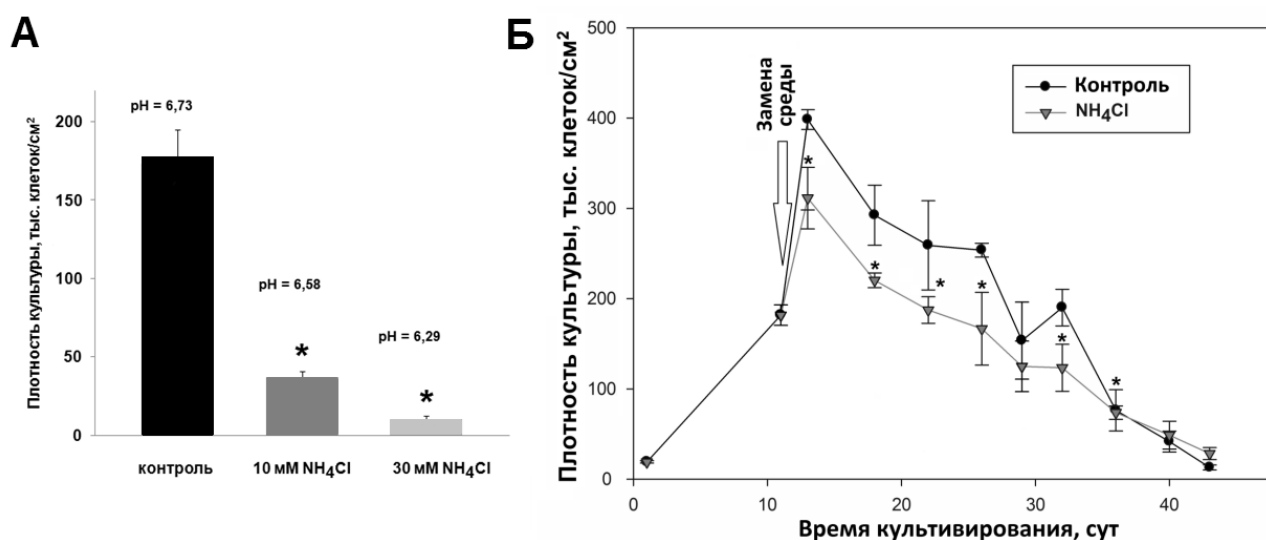


Рисунок 7. А – плотность культуры находящихся под влиянием NH_4Cl в разных концентрациях ККХ через 7 сут после посева. Б – влияние NH_4Cl в концентрации 10 мМ на кинетику гибели культуры ККХ. Приведены средние ± стандартные ошибки среднего, * – достоверное отличие от контрольной группы, $p < 0,05$.

Клетки, находящиеся под влиянием NH_4Cl , морфологически отличаются от контрольных. Они крупнее, а их цитоплазма содержит большое количество вакуолей – как мелких, так и достаточно крупных – рис. 8.

Чтобы оценить, как нарушение работы лизосом влияет на кинетику вымирания "стационарно стареющей" культуры ККХ, мы выбрали концентрацию 10 мМ. Так как NH_4Cl ожидаемо должен был подавить пролиферацию клеток, сначала вырастили культуру до стационарной фазы роста (10-е сут эксперимента), а затем добавили NH_4Cl или воду (в случае с контрольной группой). Добавка свежей среды стимулировала пролиферацию, но в случае с экспериментальной группой рост ожидаемо был не таким заметным – рис. 7Б.

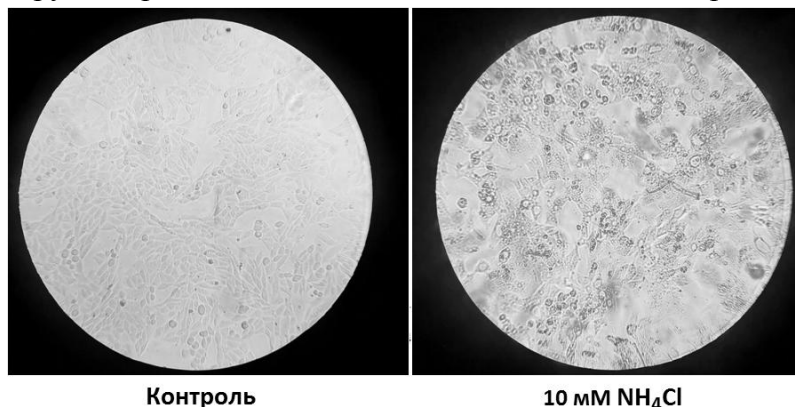


Рисунок 8. Внешний вид культуры находящихся под влиянием NH_4Cl ККХ через 7 сут после посева. Световой микроскоп, увеличение 120 \times .

При последующем вымирании плотность клеток в группе, находящейся под влиянием NH_4Cl , всё время была ниже, чем в контрольной группе, за исключением самых поздних точек. Однако распределение величин продолжительности жизни в двух группах не различаются, также похожи СПЖ и ПЖ50: $\text{СПЖ}_{\text{контроль}} = 15,4$ сут, $\text{СПЖ}_{\text{NH}_4\text{Cl}} = 16$ сут, $\text{ПЖ50}_{\text{контроль}} = 16,6$ сут, $\text{ПЖ90}_{\text{NH}_4\text{Cl}} = 16,2$ сут; t_0 – 13-е сут. В конце эксперимента клетки в экспериментальной группе выглядят так же, как и в контрольной, плотность клеток в обеих группах стала сопоставимой. Это согласуется с тем фактом, что NH_4Cl может быть ингибитором аутофагии только в коротких экспериментах, так как его накопление в лизосомах в дальнейшем, напротив, стимулирует аутофагию [Klionsky et al. 2016]. Таким образом, можно заключить, что клетки смогли устранить NH_4Cl , разрушив его, и вернулись к нормальному состоянию ($\text{ПЖ90}_{\text{контроль}} = 27,9$ сут, $\text{ПЖ90}_{\text{NH}_4\text{Cl}} = 29,1$ сут). Добавление NH_4Cl вызывает небольшое закисление pH среды ($\text{pH}_{\text{контроль}} = 7,16$, $\text{pH}_{\text{NH}_4\text{Cl}} = 6,8$).

Исследование влияния потенциальных геропротекторов на рост и гибель культуры клеток, претерпевающей "стационарное старение"

2,4-Динитрофенол (ДНФ). В первую очередь проверили чистоту используемого ДНФ. Для этого произвели перекристаллизацию вещества и оценили спектрофотометрически его качество. Форма спектра и коэффициент молярной экстинкции при 360 нм ($14656 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) совпали с литературными данными, что позволяет судить о достаточной чистоте препарата.

В предварительном эксперименте оценили влияние ДНФ в широком диапазоне концентраций – от $3,73 \cdot 10^{-10} \text{ M}$ до $3,73 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ – на рост и жизнеспособность клеток. Установили, что через 4 сут после посева достоверно пролиферативная активность клеток снижается только в группе под воздействием ДНФ в самой высокой из использованных концентраций – $3,73 \cdot 10^{-4} \text{ M}$.

Для определения концентрации ДНФ, в которой препарат будет вызывать эффект "мягкого" разобщения, провели детальный анализ с использованием метода определения ЭОК клетками и построили распределение колоний по размерам с последующей оценкой СВНК. Исследовали влияние ДНФ в концентрациях – от $5 \cdot 10^{-5}$ до $6,4 \cdot 10^{-4}$. ДНФ в концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ М почти полностью, а в концентрациях $6,4 \cdot 10^{-4}$ М – полностью подавляет пролиферацию клеток. Не влияет на способность к образованию клетками колоний концентрация $5 \cdot 10^{-5}$ М. В дополнительных экспериментах оценили ЭОК и СВНК при воздействии ДНФ в концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ и $5 \cdot 10^{-6}$ М. ЭОК в обеих группах ($20,68 \pm 1,8$ и $23,12 \pm 2,3$ соответственно) достоверно не отличается от контрольного показателя ($20,6 \pm 1,6$). СВНК выше в группе $5 \cdot 10^{-6}$ М ($4,01 \pm 0,17$), чем в группе $5 \cdot 10^{-5}$ М ($2,75 \pm 0,25$), но оба показателя не отличаются достоверно от значения в контроле ($3,42 \pm 0,33$). Можно предположить, что "мягко разобщающая" концентрация для ККХ должна быть близка к значению $5 \cdot 10^{-6}$ М. Однако известно, что ДНФ в концентрациях $1 \cdot 10^{-5}$, а другие разобщители и в более низких концентрациях ухудшают пролиферацию клеток млекопитающих и дрожжей [Desquiret et al. 2006]. Для рыбки данио (*Danio rerio*) в качестве разобщающей предлагается использовать концентрацию $5 \cdot 10^{-7}$ М [Bestman et al. 2015]. Увеличение продолжительности жизни дрожжей происходит под воздействием ДНФ в довольно низких концентрациях – 10^{-8} и даже 10^{-9} М [Barros et al. 2004]. В связи с этим для построения кривой роста и гибели культуры клеток под влиянием ДНФ мы выбрали две концентрации – $5,6 \cdot 10^{-4}$ М (как "сильно разобщающую") и $5,6 \cdot 10^{-7}$ М (как потенциально "мягко разобщающую", гарантированно не вызывающую цитотоксического эффекта).

Как и ожидалось, клетки из группы, в среду которой добавляли ДНФ в концентрации $5,6 \cdot 10^{-4}$ М, погибали через 3 сут. Что же касается концентрации $5,6 \cdot 10^{-7}$ М, которая должна была вызывать "мягкое разобщение", то ДНФ в этом случае никак не повлиял на кинетику роста и последующее вымирание культуры (рис. 9).

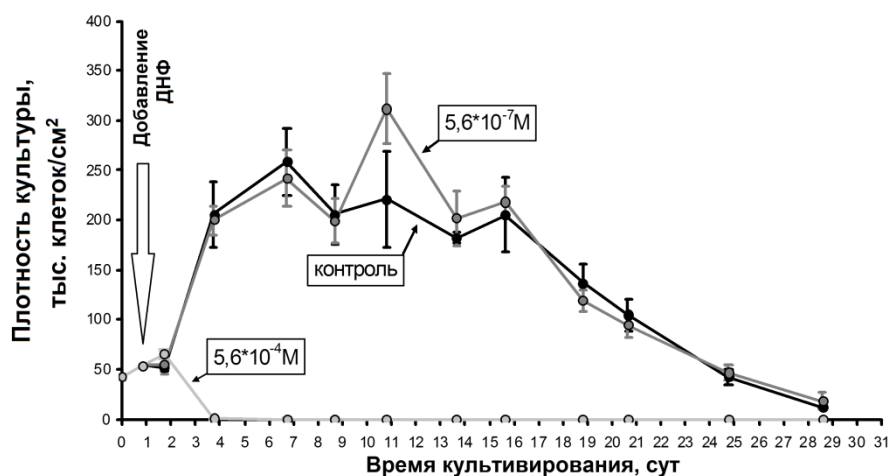


Рисунок 9. Влияние ДНФ в концентрациях $5,6 \cdot 10^{-4}$ М ("сильно разобщающая") и $5,6 \cdot 10^{-7}$ М (потенциально "мягко разобщающая") на кинетику роста и последующую гибель культуры ККХ. Приведены средние \pm стандартные ошибки среднего.

Ни по одному из параметров уравнения Гомпертца не обнаружили достоверных различий между группами. Отсутствие какого-либо эффекта может быть обусловлено тем, что "мягкое разобщение" не влияет либо на старение в целом, либо на "стационарное старение" культур клеток. Также нельзя исключить, что оно не даёт никаких преимуществ конкретной изучаемой культуре клеток. Например, известно, что "мягкое разобщение", вызванное добавлением ДНФ,

по-разному влияет на метаболизм различных линий клеток [Desquiret et al. 2006]. Кроме того, нельзя исключить, что выбранная доза разобщителя не является оптимальной.

8-оксо-2'-дезоксигуанозин. При определении цитотоксических и митогенных свойств 8-охо-dG в концентрациях от 10^{-6} М до 10^{-3} М не было обнаружено достоверного влияния соединения на жизнеспособность клеток через 5 сут после посева и кинетику роста культуры (8-охо-dG был добавлен через 24 ч после посева). При определении действия вещества на культуру клеток, пребывающую в стационарной фазе, обнаружили, что 8-охо-dG в концентрации 10^{-3} М достоверно уменьшает её плотность. Перед проведением длительного эксперимента определили, что 8-охо-dG остаётся стабильным при инкубации в среде с сывороткой без клеток, а в среде с клетками частично поглощается ими (концентрация ко вторым суткам падает в два раза по сравнению с исходной).

В ходе длительного эксперимента установили, что кривая, описывающая кинетику роста и гибели клеток экспериментальной группы, начиная с фазы плато, пролегает несколько ниже контрольной, достоверные отличия удалось обнаружить на 27-е, 31-е и 39-е сут (рис. 10). Распределение величин продолжительности жизни различается в двух группах ($p < 0,05$), при этом СПЖ в контрольной группе на 6% больше, чем группе "8-охо-dG" (СПЖ_{контроль} = 35 сут, СПЖ_{8-охо-dG} = 33 сут; t_0 – 11-е сут). Таким образом, под влиянием 8-охо-dG в концентрации 10^{-3} М кинетика роста не изменяется и несколько ухудшается жизнеспособность "стационарно старой" культуры клеток.

Отрицательный эффект 8-охо-dG обусловлен, вероятно, тем, что накопление окисленных нуклеозидов, свидетельствующее об окислительном стрессе, значительно нагружает клетку, заставляя тратить ресурсы на работу гликозилаз эксцизионной репарации оснований. Жизнедеятельность молодых активно делящихся клеток никак не нарушается, но при переходе культуры в стационарную фазу роста, когда репликативного синтеза ДНК не происходит, накопленные окисленные нуклеотиды становятся балластом.

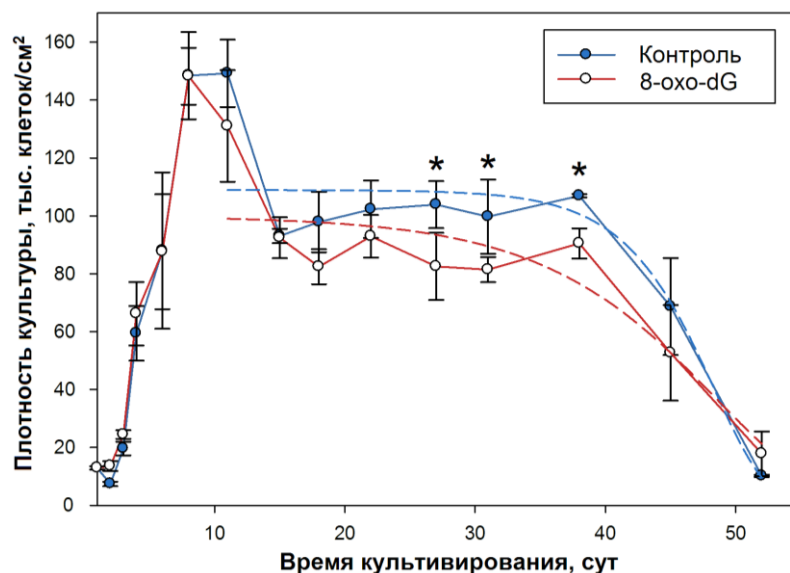


Рисунок 10. Влияние добавления 8-охо-dG в концентрации 10^{-3} М на кинетику роста и "стационарного старения" культуры ККХ. Приведены средние \pm стандартные ошибки среднего, * – достоверное отличие от контрольной группы, $p < 0,05$.

Изотонический препарат "Квинтон". Несмотря на то, что QMP считается обогащённым биологически активными веществами препаратом, замена МДСИ, равно как и замена СКРС на QMP, приводит к гибели клеток. Аналогичный результат получен и для случая замены МДСИ на физиологический раствор. В противоположность данным, полученным

другими авторами на мононуклеарных клетках периферической крови человека [Alberola et al. 2013], ККХ практически неспособны выживать и тем более размножаться в QMP как без СКРС, так и с ней. В QMP, вероятно, нет всего необходимого спектра как питательных веществ, так и ростовых факторов, необходимых для полноценного размножения культуры животных клеток.

В следующей серии экспериментов мы попытались разбавлять МДСИ с помощью QMP. Клетки выращивали на среде с добавлением СКРС, но при этом в разных пропорциях заменяли МДСИ физиологическим раствором или QMP. Интенсивность размножения культуры была максимальной при замене 44,4% МДСИ на различные комбинации QMP и ФР. В связи с этим для дальнейшего построения кривой роста и гибели клеток было решено заменить 44,4% МДСИ на QMP и в качестве дополнительного контроля ввести группу, в которой 44,4% МДСИ будет заменено на физиологический раствор.

В случае замены 44,4% среды как на QMP, так на физиологический раствор кинетика роста и гибели клеток практически не меняется (рис. 11А). Однако на 5-е сут плотность клеток в группе "физраствор" достоверно выше, чем в двух других, также выше она на 31-е и 36-е сут в этой же группе, но по сравнению только лишь с контрольными показателями. Такие результаты на первый взгляд свидетельствуют о том, что физраствор улучшает пролиферативную активность клеток и их выживаемость в поздней стационарной фазе, однако более детальный анализ данных о вымирании с использованием нашего подхода показал, что СПЖ культуры, выращенной на физиологическом растворе, была ниже на 17%, а культуры, выращенной на QMP, – выше на 7%, чем в контроле ($СПЖ_{\text{контроль}} = 20,2$ сут, $СПЖ_{\text{физраствор}} = 16,8$ сут, $СПЖ_{\text{QMP}} = 21,56$ сут; t_0 – 5-е сут). Вымирание в группе "физраствор" происходило не в соответствии с уравнением Гомпертца (рис. 11Б), а по прямой, что свидетельствует о худшем состоянии культуры, чем в двух других группах. Т.е. небольшая часть популяции клеток существует длительное время (даже больше, чем в двух других группах: $ПЖ90_{\text{физраствор}} = 32$ сут, $ПЖ90_{\text{контроль}} = 27$ сут, $ПЖ90_{\text{QMP}} = 30$ сут), но к середине эксперимента (приблизительно 20-е сут) доживает меньше клеток, чем в двух других группах ($ПЖ50_{\text{физраствор}} = 16$ сут; $ПЖ50_{\text{контроль}} = 22$ сут, $ПЖ50_{\text{QMP}} = 23$ сут). Наряду с СПЖ и ПЖ90 модальная продолжительность жизни в группе "QMP" оказывается выше, чем в контрольной группе ($МПЖ_{\text{контроль}} = 22,8$ сут, $МПЖ_{\text{QMP}} = 23,7$ сут, $МПЖ_{\text{физраствор}} = 11$ сут). Во всех трёх группах достоверно различаются распределения величин продолжительности жизни, при этом аппроксимированная кривая выживания в группе "QMP" лежит правее контрольной на протяжении всего периода гибели культуры (рис. 11Б).

При длительном поддержании непересеваемой культуры критичным оказывается, вероятно, содержание незаменимых аминокислот, глутамина, глюкозы и некоторых витаминов. При разбавлении среды на 44,4% мы уменьшаем состав этих критически важных компонентов, но их количество при этом оказывается бóльшим, чем в среде 199, на которой клетки в наших длительных экспериментах быстро вымирали (табл. 1). Культура хорошо растёт на разбавленной среде, что видно по данным, полученным для группы "физраствор", но для длительного поддержания разбавленной таким образом среды недостаточно. Замена части МДСИ на QMP не влияет на кинетику роста культуры, но увеличивает среднюю, медианную, максимальную и модальную продолжительность жизни. Можно предположить, что QMP содержит компоненты, которые не только дополняют частично разбавленную МДСИ, но и улучшают жизнеспособность клеток в стационарной фазе. Нельзя исключить, что геропротекторный эффект объясняется изменением осмоляльности среды. Полученные результаты, по-видимому, свидетельствуют о том, что QMP обладает геропротекторным действием.

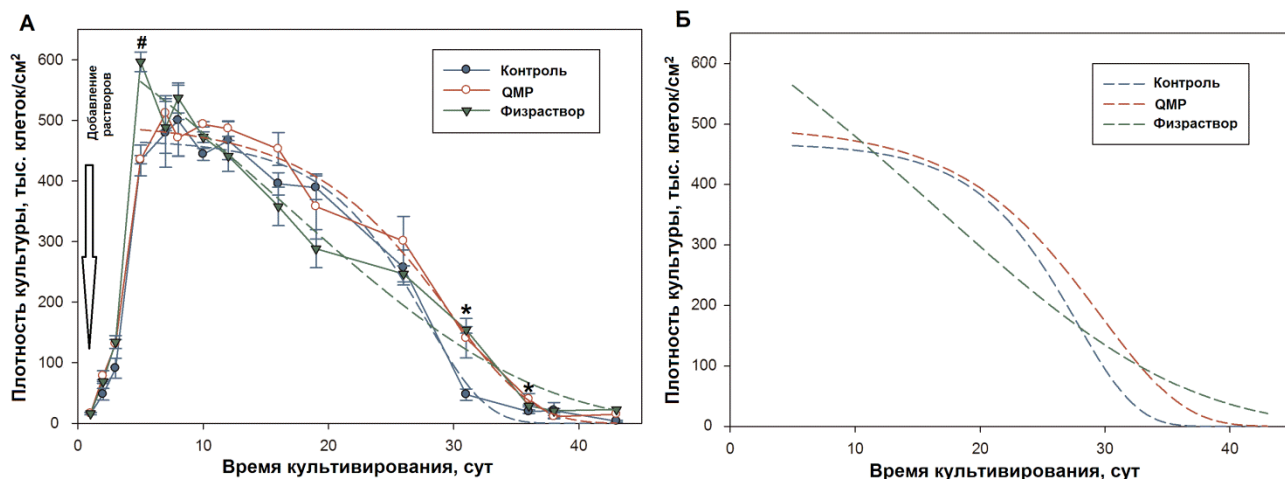


Рисунок 11. Влияние разбавление на 44,4% МДСИ физиологическим раствором или QMP на кинетику роста и "стационарное старение" ККХ. **А** – экспериментальные данные с наложенной аппроксимацией (пунктирные линии); **Б** – только аппроксимация; аппроксимировано в соответствии с уравнением Гомпертца. Приведены средние \pm стандартные ошибки среднего. * – достоверное отличие от контрольной группы, # – достоверное отличие от контрольной группы и группы "QMP"; $p < 0,05$.

ВЫВОДЫ

1. В модели "стационарного старения" клеточных культур популяция клеток вымирает в соответствии с законом Гомпертца, т.е. сила смертности экспоненциально растёт со временем.

2. Относительный уровень экспрессии генов-регуляторов клеточного цикла и генов, связанных с аутофагией, не различается в клетках разного "стационарного возраста". Исключение составляет ген *MAP1LC3A* (кодирует белок LC3), уровень экспрессии которого понижен в "зрелых" и "умеренно старых" (от 8 до 34 сут культивирования) клетках.

3. Активность SA- β -gal проявляется в "стационарно старых" клетках и почти не проявляется в "молодых", что позволяет использовать этот биомаркёр в экспериментах по "стационарному старению".

4. Хлорид аммония, нарушающий работу лизосом, вызывает вакуоляризацию цитоплазмы и способствует снижению плотности культуры ККХ, но не влияет на продолжительность их жизни.

5. 2,4-динитрофенол в концентрации $5,6 \cdot 10^{-7}$ М (предположительно обеспечивающей "мягкое разобщение" дыхания и окислительного фосфорилирования) не оказывает влияния на рост и гибель культуры клеток. В концентрации $5,6 \cdot 10^{-4}$ М он способствует угнетению роста культуры и вызывает преждевременную гибель клеток.

6. 8-оксо-2'-дезоксигуанозин в концентрации 10^{-3} М, добавленный через сутки после посева, не влияет на рост культуры клеток, при этом его действие проявляется в поздней стационарной фазе, что выражается в уменьшении средней продолжительности жизни и в достоверном снижении плотности экспериментальных клеток через 25–30 сут культивирования.

7. Разбавление на 44,4% МДСИ солевыми растворами (физиологическим или QMP) способствует увеличению максимальной продолжительности жизни, однако величины средней и модальной продолжительности жизни возрастают при разбавлении среды QMP и уменьшаются при разбавлении физиологическим раствором. Это позволяет полагать, что QMP можно считать геропротектором.

8. При длительном поддержании непересеваемой культуры ККХ необходимо подбирать ростовые среды с высоким содержанием некоторых аминокислот (в первую очередь, незаменимых и глутамина), витаминов и глюкозы. Для этой цели подходит среда МДСИ с повышенной концентрацией глюкозы или любая близкая по составу среда.

9. Добавление буфера НЕРЕС не влияет на кинетику гибели клеток и на динамику изменения рН после достижения культурой монослоя (при этом рН в ходе эксперимента не опускается ниже 6,4), поэтому не является необходимым.

10. Вымирание культуры клеток в поздней стационарной фазе не может быть обусловлено простой нехваткой питательных веществ или значительным снижением рН.

11. Исследование кинетики гибели клеток при "стационарном старении" клеточных культур можно использовать при изучении механизмов старения и при тестировании геропротекторов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Подобранные в работе условия культивирования ККХ, методы их исследования и дополнительные "возрастные" характеристики можно рекомендовать для корректной постановки экспериментов на клеточных культурах по поиску геропротекторов с использованием модели "стационарного старения".

2. Концентрация ДНФ $5,6 \cdot 10^{-7}$ М может быть рекомендована для постановки экспериментов с "мягким разобщением" на клеточных культурах.

3. Предложенный анализ кривых гибели клеток с аппроксимацией уравнением Гомпертца и вычислением средней, медианной, модальной и максимальной продолжительностью жизни можно использовать для работы по изучению выживаемости любых культур клеток.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Перспективным представляется проведение исследований с использованием модели "стационарного старения", дополненных анализом кривых выживания, на трансформированных клетках других линий, а также на нормальных и иммортализованных клетках млекопитающих, особенно нейрональных и мышечных. Изучение зависимости выживания клеток от состава питательных сред может оказаться полезным при поиске метаболических различий нормальных и раковых клеток; по-видимому, нужно интенсифицировать исследование возможной роли в процессе "стационарного старения" такого важного явления, как аутофагия.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, включенных в Перечень ВАК Минобрнауки РФ

1. *Khokhlov, A.N.* Testing of geroprotectors in experiments on cell cultures: choosing the correct model system / A.N. Khokhlov, A.A. Klebanov, A.F. Karmushakov, G.A. Shilovsky, M.M. Nasonov, **G.V. Morgunova** // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. – 2014. – Vol. 69. – №1. – P. 13–18. DOI: <http://dx.doi.org/10.3103/S0096392514020035>
2. *Khokhlov, A.N.* Pilot study of a potential geroprotector, "Quinton Marine Plasma," in experiments on cultured cells / A.N. Khokhlov, **G.V. Morgunova**, T.S. Ryndina, F. Coll // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. – 2015. – №1. – P. 9–13. DOI: <http://dx.doi.org/10.3103/S009639251501006X>
3. *Khokhlov, A.N.* On the constructing of survival curves for cultured cells in cytogerontological experiments: a brief note with three hierarchy diagrams / A.N. Khokhlov, **G.V. Morgunova** // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. – 2015. – Vol. 70. – №2. – P. 19–23. DOI: <http://dx.doi.org/10.3103/S0096392515020054>

4. **Morgunova, G.V.** Senescence-associated β -galactosidase – a biomarker of aging, DNA damage, or cell proliferation restriction? / **G.V. Morgunova**, A.V. Kolesnikov, A.A. Klebanov, A.N. Khokhlov // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. – 2015. – Vol. 70. – №4. – P. 15–18. DOI: <http://dx.doi.org/10.3103/S0096392515040082>
5. **Morgunova, G.V.** Interpretation of data about the impact of biologically active compounds on viability of cultured cells of various origin from a gerontological point of view / **G.V. Morgunova**, A.A. Klebanov, A.N. Khokhlov // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. – 2016. – Vol. 71. – №2. – P. 3–7. DOI: <http://dx.doi.org/10.3103/S0096392516020073>
6. **Моргунова, Г.В.** Аутофагия и "стационарное старение" клеточных культур / **Г.В. Моргунова**, А.А. Клебанов, А.Н. Хохлов // Клиническая геронтология. – 2016. – Т. 22. – №9–10. – С. 50–51.
7. **Мармий, Н.В.** 8-оксо-2'-дезоксигуанозин: биомаркер клеточного старения и окислительного стресса или потенциальное лекарство против возрастных болезней? / Н.В. Мармий, **Г.В. Моргунова**, Д.С. Есипов, А.Н. Хохлов // Клиническая геронтология. – 2016. – Т. 22. – №9–10. – С. 46–47.
8. **Morgunova, G.V.** Some remarks on the relationship between autophagy, cell aging, and cell proliferation restriction / **G.V. Morgunova**, A.A. Klebanov, A.N. Khokhlov // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. – 2016. – Vol. 71. – №4. – P. 28–33. DOI: <http://dx.doi.org/10.3103/S0096392516040088>
9. **Моргунова, Г.В.** Концепция ацидотической альтерации организма при старении и цитогеронтологические исследования / **Г.В. Моргунова**, А.А. Клебанов, А.Н. Хохлов // Клиническая геронтология. – 2017. – Т. 23. – №9–10. – С. 46–48.
10. **Morgunova, G.V.** Culture medium pH and stationary phase/chronological aging of different cells / **G.V. Morgunova**, A.A. Klebanov, F. Marotta, A.N. Khokhlov // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. – 2017. – Vol. 72. – №2. – P. 58–62. DOI: <http://dx.doi.org/10.3103/S0096392517020109>
11. **Shilovsky, G.A.** Protein poly(ADP-ribosylation) system: Changes in development and aging as well as due to restriction of cell proliferation / G.A. Shilovsky, S.I. Shram, **G.V. Morgunova**, A.N. Khokhlov // Biochemistry (Moscow). – 2018. – Vol. 83. – №1. – P. 47–60. DOI: <http://dx.doi.org/10.1134/S0006297917110177>
12. **Khokhlov, A.N.** On choosing control objects in experimental gerontological research / A.N. Khokhlov, A.A. Klebanov, **G.V. Morgunova** // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. – 2018. – Vol. 73. – №2. – P. 59–62. DOI: <http://dx.doi.org/10.3103/S0096392518020049>
13. **Моргунова, Г.В.** Связанное с возрастом закисление микроокружения и цитоплазмы клеток: влияние на организменном уровне и на уровне клеточной культуры / **Г.В. Моргунова**, А.А. Клебанов, А.Н. Хохлов // Клиническая геронтология. – 2018. – Т. 24. – №9–10. – С. 49–50.
14. **Morgunova, G.V.** Impairment of the viability of transformed Chinese hamster cells in a nonsubcultured culture under the influence of exogenous oxidized guanoside is manifested only in the stationary phase of growth / **G.V. Morgunova**, A.A. Klebanov // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. – 2018. – Vol. 73. – №3. – P. 124–129. DOI: <http://dx.doi.org/10.3103/S0096392518030136>
15. **Morgunova, G.V.** Age-related AMP-activated protein kinase alterations: From cellular energetics to longevity / **G.V. Morgunova**, A.A. Klebanov // Cell Biochemistry and Function. – 2019. – Vol. 37. – №3. – P. 169–176. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cbf.3384>
16. **Morgunova, G.V.** Studies into the effect of "mild" uncoupling with 2,4-dinitrophenol on the growth of Chinese hamster cell culture and its subsequent dying out in the stationary phase / **G.V. Morgunova**, A.F. Karmushakov, A.A. Klebanov, A.N. Khokhlov // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. – 2019. – Vol. 74. – № 3. – P. 163–169. DOI: <http://dx.doi.org/10.3103/S0096392519030088>

Главы в коллективных монографиях

1. *Khokhlov, A.N.* Testing of geroprotectors in experiments on cell cultures: pros and cons / A.N. Khokhlov, **G.V. Morgunova** // *Anti-aging Drugs: From Basic Research to Clinical Practice*. Royal Society of Chemistry. – 2017. – P. 53–74. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/9781782626602-00051>
2. **Morgunova, G.V.** Autophagy: The way to death or immortality? Activators and inhibitors of autophagy as possible modulators of the aging process / **G.V. Morgunova**, A.A. Klebanov, A.N. Khokhlov // *Aging: Exploring a Complex Phenomenon*. Taylor & Francis. – 2018. – P. 475–485. DOI: <http://dx.doi.org/10.1201/b21905>
3. *Khokhlov, A.N.* Anti-aging drug discovery in experimental gerontological studies: From organism to cell and back / A.N. Khokhlov, A.A. Klebanov, **G.V. Morgunova** // *Aging: Exploring a Complex Phenomenon*. Taylor & Francis. – 2018. – P. 575–592. DOI: <http://dx.doi.org/10.1201/b21905>

Статьи в сборниках

1. *Хохлов, А.Н.* К вопросу об оценке жизнеспособности культивируемых клеток в цитогеронтологических экспериментах / А.Н. Хохлов, А.А. Клебанов, Т.С. Рындина, О.И. Яблонская, **Г.В. Моргунова**, А.Ф. Кармушаков // *Световой режим, старение и рак. Сборник научных трудов II Российского симпозиума с международным участием*. Петрозаводск, 2013. – С. 346–354.
2. *Хохлов, А.Н.* Ассоциированная со старением бета-галактозидаза – биомаркер старения, повреждения ДНК или ограничения клеточной пролиферации? / А.Н. Хохлов, **Г.В. Моргунова**, А.Д. Гладнева, С.И. Шрам, Г.А. Шиловский, А.А. Клебанов // *Радиобиология: антропогенные излучения. Материалы международной научной конференции (Гомель, 25–26 сентября 2014 г.)*. Минск: Институт радиологии, 2014. – С. 201–203.
3. **Моргунова, Г.В.** Сравнение различных методов оценки жизнеспособности культивируемых клеток, применимых для изучения геропротекторов и геропромоторов / **Г.В. Моргунова**, А.А. Клебанов, А.В. Колесников, А.Н. Хохлов // *Радиобиология: «Маяк», Чернобыль, Фукусима = Radiobiology: «Mayak», Chernobyl, Fukushima: материалы междунар. науч. конф. (Гомель, 24–25 сент. 2015 г.)*. Минск: Институт радиологии, 2015. – С. 142–146.

Тезисы докладов

1. **Моргунова, Г.В.** Жизнеспособность клеток, "стареющих" в культуре: различные подходы к оценке / **Г.В. Моргунова**, А.Д. Гладнева, А.А. Клебанов, А.Н. Хохлов // *Успехи геронтологии*. – 2014. – Т. 27. – № 2 (Приложение). – С. 51.
2. **Моргунова, Г.В.** Проявление клеточных биомаркеров возраста в модели "стационарного старения" / **Г.В. Моргунова**, Н.В. Мармий // *XXIII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2016»*. 2016. – С. 47.
3. *Мармий, Н.В.* Влияние экзогенного 8-оксо-2'-дезоксигуанозина на рост и стационарное старение клеточной культуры / Н.В. Мармий, **Г.В. Моргунова** // *XXIII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2016»*. 2016. – С. 44.
4. **Morgunova, G.V.** Biomarkers of age in the "stationary phase aging" model / **G.V. Morgunova**, D.S. Esipov, N.V. Marmiy, A.N. Khokhlov // *The Tenth International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology*. Novosibirsk. 2016. – P. 189.
5. *Marmiy, N.V.* On the possible impact of exogenous 8-oxo-2'-deoxyguanosine on DNA synthesis, damage and repair in aging cell cultures and organism / N.V. Marmiy, **G.V. Morgunova**, D.S. Esipov, A.N. Khokhlov // *The Tenth International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology*. Novosibirsk. 2016. – P. 183–183.

6. **Morgunova, G.V.** Testing of geroprotectors in cytogerontological experiments and the problem of cell viability determination / **G.V. Morgunova**, A.A. Klebanov, A.N. Khokhlov // IVAO. «Biomedical Innovation for Healthy Longevity», Saint Petersburg. 2016. – P. 74.
7. **Marmiy, N.V.** 8-Охо-2'-deoxyguanosine - a biomarker of aging and/or a possible tool for biomedical prevention/treatment of age-related diseases? / N.V. Marmiy, **G.V. Morgunova**, D.S. Esipov, A.N. Khokhlov // IVAO. «Biomedical Innovation for Healthy Longevity», Saint Petersburg. 2016. – P. 75.
8. **Моргунова, Г.В.** pH ростовой среды и "стационарное" (хронологическое) старение клеточных культур / **Г.В. Моргунова** // XXIV Международный молодежный научный форум «Ломоносов-2017». 2017.
9. **Моргунова, Г.В.** О роли pH в хронологическом старении культивируемых клеток / **Г.В. Моргунова**, А.А. Клебанов, А.Н. Хохлов // Успехи геронтологии. – 2017. – Т. 30. – №6 (Приложение). – С. 52.
10. **Моргунова, Г.В.** Нужно ли имитировать эффект ограничения питания / **Г.В. Моргунова**, А.А. Клебанов, А.Н. Хохлов // Международный конгресс "Социальная адаптация, поддержка и здоровье пожилых людей в современном обществе". 2018. – С. 79–80.
11. **Моргунова, Г.В.** Аппроксимация кривой роста и выживания непересеваемой культуры клеток при моделировании процессов старения / **Г.В. Моргунова**, А.А. Клебанов // Международный молодежный научный форум "Ломоносов-2018". 2018.
12. **Klebanov, A.A.** Approximation of the growth and survival curve of a non-subcultured cell culture within the framework of the stationary phase aging model / A.A. Klebanov, **G.V. Morgunova**, A.N. Khokhlov // Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology (BGRS\SB-2018), Novosibirsk, 2018. – С. 240.
13. **Morgunova, G.V.** Maintaining pH of the culture medium in cytogerontological experiments: effect on the cell viability and the shape of the cells' survival curve / **G.V. Morgunova**, A.A. Klebanov, A.N. Khokhlov // Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology (BGRS\SB-2018), Novosibirsk, 2018. – С. 246.
14. **Моргунова, Г.В.** Разработка программного обеспечения для аппроксимации и анализа кривой роста, пребывания в стационарной фазе и гибели непересеваемой культуры клеток / **Г.В. Моргунова**, А.А. Клебанов // Международный молодежный научный форум "Ломоносов-2019". 2019.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- МДСИ** – модифицированная Дульбекко среда Игла
ДНФ – 2,4-динитрофенол
ККХ – клетки китайского хомячка
ПЖ90 – 90%-ная продолжительность жизни
ПЦР – полимеразная цепная реакция
СВНК – средневзвешенный номер класса
СИПС – стресс-индуцированное преждевременное старение
СКРС – сыворотка крупного рогатого скота
СПЖ – средняя продолжительность жизни
ЭОК – эффективность образования колоний
8-oxo-dG – 8-оксо-2'-дезоксигуанозин (8-oxo-2'-deoxyguanosine)
АСТВ – β -актин (actin β)
АМПК – АМФ-активируемая протеинкиназа (AMP activated protein kinase)
Atg5 – белок аутофагии 5 (autophagy-related protein 5)
В2М – бета-2-микроглобулин (beta-2-microglobulin)
GAPDH – глицеральдегид-3-фосфат (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)
LC3 – лёгкая 3А-цепь ассоциированного с микротрубочками белка 1А/1В (microtubule-associated proteins 1А/1В light chain 3А)
QMP – изотонический препарат "Квинтон" (Quinton Marine Plasma)
SA- β -gal – ассоциированная со старением β -галактозидаза (senescence-associated β -galactosidase)

МОРГУНОВА Галина Васильевна КИНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ МОДЕЛИРОВАНИЯ
СТАРЕНИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ НА НЕПЕРЕСЕВАЕМОЙ КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК //
Автореф. дис. канд. биол. наук: 14.01.30. – СПб., 2019. – 26 с.

Подписано в печать «25» 10 2019 г. Формат 60*84 1/16.

Бумага офсетная. Печать офсетная. Печ. л. 1,0.

Тираж 100 экз. Заказ _____.

Отпечатано с готового оригинал-макета
в типографии Издательства СПбГЭТУ «ЛЭТИ»
Издательство СПбГЭТУ «ЛЭТИ»
197376, С.-Петербург, ул. проф. Попова, 5.

УКАЗАТЕЛЬ ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Хохлов А.Н. и др.* "Стационарное старение" клеточных культур: попытка оценки влияния "возраста" среды. Цитология. 2005. 47:318–322. *Хохлов А.Н.* Пролиферация и старение. Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР, сер. "Общ. пробл. физ.-хим. биол.", т. 9. М.: ВИНТИ, 1988. 176 с. *Alberola J., Coll F.* Marine therapy and its healing properties. *Curr. Aging Sci.* 2013. 6(1):63–75. *Alinkina E.S. et al.* Cytogerontological studies of biological activity of oregano essential oil. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2012. 67(2):52–57. *Altamirano C. et al.* Improvement of CHO cell culture medium formulation: simultaneous substitution of glucose and glutamine. *Biotechnol. Progr.* 2000. 16(1):69–75. *Alvers A.L. et al.* Autophagy is required for extension of yeast chronological life span by rapamycin. *Autophagy.* 2009. 5(6):847–849. *Barros M.H. et al.* Higher respiratory activity decreases mitochondrial reactive oxygen release and increases life span in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 2004. 279(48):49883–49888. *Bestman J.E. et al.* The cellular and molecular progression of mitochondrial dysfunction induced by 2,4-dinitrophenol in developing zebrafish embryos. *Differentiation.* 2015. 89(3–4):51–69. *Ceccarini C., Eagle H.* pH as a determinant of cellular growth and contact inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1971. 68(1):229–233. *Comfort A.* Ageing: The biology of senescence, London: Routledge & Kegan Paul, 1964. 365 pp. *Cristofalo V.J. et al.* Relationship between donor age and the replicative lifespan of human cells in culture: A reevaluation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998. 95(18):10614–10619. *Cuervo A.M. et al.* Autophagy and aging: the importance of maintaining "clean" cells. *Autophagy.* 2005. 1(3):131–140. *Desquiret V. et al.* Dinitrophenol-induced mitochondrial uncoupling *in vivo* triggers respiratory adaptation in HepG2 cells. *BBA-Bioenergetics.* 2006. 1757(1):21–30. *Fomina-Yadlin D. et al.* Cellular responses to individual amino-acid depletion in antibody-expressing and parental CHO cell lines. *Biotechnol. Bioeng.* 2014. 111(5):965–979. *Hayflick L., Moorhead P.S.* The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 1961. 25(3):585–621. *Hu T. et al.* Characterization of p53 in Chinese hamster cell lines CHO-K1, CHO-WBL, and CHL: implications for genotoxicity testing. *Mutat. Res.-Fund. Mol. M.* 1999. 426(1):51–62. *Khokhlov A.N.* Cell kinetic approaches to the search for anti-aging drugs: Thirty years after. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2018. 73(4):185–190. *Khokhlov A.N.* From Carrel to Hayflick and back, or what we got from the 100-year cytogerontological studies. *Biophysics.* 2010. 55(5):859–864. *Khokhlov A.N. et al.* Strengthening of the DNA-protein complex during stationary phase aging of cell cultures. *Bull. Exp. Biol. Med.* 1986. 101(4):437–440. *Klionsky D.J. et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy.* 2016. 12(1):1–222. *Lao M.S., Toth D.* Effects of ammonium and lactate on growth and metabolism of a recombinant Chinese hamster ovary cell culture. *Biotechnol. Progr.* 1997. 13(5):688–691. *Leontieva O.V., Blagosklonny M.V.* Yeast-like chronological senescence in mammalian cells: phenomenon, mechanism and pharmacological suppression. *Aging (Albany NY).* 2011. 3(11):1078–1091. *Longo V.D., Fabrizio P.* Chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging research in yeast. Subcell. Bioch. V. 57* (eds. M. Breitenbach, S. Jazwinski, P. Laun). Dordrecht: Springer, 2011:101–121. *MacLean M. et al.* Chronological lifespan of stationary phase yeast cells; a model for investigating the factors that might influence the ageing of postmitotic tissues in higher organisms. *Yeast.* 2001. 18(6):499–509. *Nigro J.M. et al.* Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature.* 1989. 342(6250):705–708. *Olovnikov A.M.* Hypothesis: lifespan is regulated by chromomere DNA of the hypothalamus. *J. Alzheimer's Dis.* 2007. 11(2):241–252. *Polymenis M., Kennedy B.K.* Chronological and replicative lifespan in yeast: do they meet in the middle? *Cell Cycle.* 2012. 11(19):3531–3531. *Sampaio-Marques B. et al.* Yeast at the forefront of research on ageing and age-related diseases. *Yeasts in biotechnology and human health. Progr. Mol. Subcell. Biol. V. 58* (ed. I. Sá-Correia). Springer, Cham, 2019:217–242. *Shiao Y.H. et al.* Cell cycle arrest, apoptosis and p53 expression in nickel (II) acetate-treated Chinese hamster ovary cells. *Carcinogenesis.* 1998. 19(7):1203–1207. *Tasdemir E. et al.* Cell cycle-dependent induction of autophagy, mitophagy and reticulophagy. *Cell Cycle.* 2007. 6(18):2263–2267. *Wang K. et al.* MFEprimer-3.0: quality control for PCR primers. *Nucleic Acids Res.* 2019. 47(W1):W610–W613. *Werner-Washburne M. et al.* Aging and the survival of quiescent and non-quiescent cells in yeast stationary-phase cultures. *Aging research in yeast. Subcell. Bioch.* (ed. M. Breitenbach, S.M. Jazwinski, P. Laun). Dordrecht; Heidelberg; London; N.Y.: Springer, 2012:123–143. *Wierman M.B. et al.* Caloric restriction extends yeast chronological lifespan by optimizing the Snf1 (AMPK) signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 2017. 37(13):e00562-16. *Zhou M. et al.* Decreasing lactate level and increasing antibody production in Chinese Hamster Ovary cells (CHO) by reducing the expression of lactate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase kinases. *J. Biotechnol.* 2011. 53(1–2):27–34.