

На правах рукописи

РАТУШНЫЙ АНДРЕЙ ЮРЬЕВИЧ

**РЕПЛИКАТИВНОЕ СТАРЕНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ
СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ С
РАЗЛИЧНЫМ СОДЕРЖАНИЕМ КИСЛОРОДА**

03.03.01 - физиология

03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре Российской Федерации – Институте медико-биологических проблем Российской академии наук.

Научный руководитель: **Буравкова Людмила Борисовна**, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующая лабораторией клеточной физиологии, ФГБУН ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем Российской академии наук.

Официальные оппоненты: **Дризе Нина Иосифовна**, доктор биологических наук, заведующая лабораторией физиологии кроветворения, ФГБУ Национальный Медицинский Исследовательский Центр «Гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Плотников Егор Юрьевич, доктор биологических наук, заведующий лабораторией структуры и функции митохондрий, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова.

Ведущая организация: НИИ экспериментальной кардиологии ФГБУ "Российский кардиологический научно-производственный комплекс" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «__» _____ 2019 г. в __ часов на заседании диссертационного совета Д 002.111.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре Российской Федерации – Институте медико-биологических проблем Российской академии наук по адресу: 123007 г. Москва, Хорошевское шоссе, д.76а.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации – Института медико-биологических проблем Российской академии наук и на сайте <http://www.imbp.ru/WebPages/win1251/Science/DisserSov/Ratushnyy2019/Ratushnyy-dis.pdf>.

Автореферат разослан « » _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

С.В. Поддубко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Поиск причин старения на тканевом и клеточном уровнях приводит к проблемам истощения пула стволовых клеток взрослого организма и нарушения межклеточной коммуникации (Turinetti et al., 2016; Li et al., 2017). Истощение их пула и возникающие в них изменения способствуют развитию прогрессирующих возрастных изменений, в том числе, патологических.

Мезенхимальные стромальные/стволовые клетки (МСК) представляют особый интерес, как с точки зрения фундаментальной науки, так и прикладного применения в регенеративной медицине, включая случаи возрастных патологий. Данная популяция клеток присутствует почти во всех тканях и играет одну из первостепенных ролей в процессах их обновления и регенерации, участвуя в регуляции ангиогенеза, иммуномодуляции, поддержании гомеостаза и др. Многие исследователи связывают положительные эффекты, оказываемые МСК, с их способностью секретировать целый ряд биологически активных факторов, в том числе цитокины и компоненты внеклеточного матрикса (Murphy et al., 2013; Forostyak et al., 2013; Richardson et al., 2015). Клиническое применение этих клеток расширяется год от года. Согласно данным представленным на сайте Национального Института Здоровья США (US National Institutes of Health) (<http://www.clinicaltrial.gov/>) в июне 2015 года было зарегистрировано 493 завершенных или продолжающихся клинических испытаний с применением МСК (Squillaro et al., 2016). На сентябрь 2017 года зарегистрировано уже 761 такое исследование, в 11 из которых принимает участие Российская Федерация (данные сайта <http://www.clinicaltrial.gov/>, термин для поиска - Mesenchymal Stem Cells).

Отличительной особенностью данной клеточной популяции является значительная гетерогенность. Несмотря на соответствие общепринятым критериям, МСК из разных тканей могут значительно различаться по своим свойствам, что требует детального изучения каждой отдельной популяции (Ullah et al., 2015). Также стоит учитывать, что извлечение клеток из ткани приводит к нарушению многих условий их тканевой ниши, в частности, характерный уровень кислорода для ниши МСК – 2-8%. В исследованиях *in vitro* было показано, что модификация микроокружения может значительно повлиять на физиологию этих клеток. Так, культивирование МСК при различных значениях кислорода приводило к изменениям ряда функциональных свойств, таких как пролиферация, миграция, дифференцировка, ангиогенный потенциал, которые сопровождались изменениями на уровне протеома и транскриптома. (D'Ippolito et al., 2006; Fehrer et al., 2007; Lopez et al., 2011; Buravkova et al., 2013, Zhang et al., 2015, Naaldijk et al., 2015; Udartseva et al., 2016; Andreeva et al., 2018). Уровень кислорода тесно связан с метаболизмом клетки, а значит, может оказывать значительное влияние на скорость старения культуры. Стоит отметить, что для медицинских целей требуется большое количество клеток. Большинство протоколов предполагают размножение культуры *in vitro*. Подбор оптимальных условий культивирования, поддерживающих терапевтические свойства клеток, в этом случае, является одной из приоритетных задач. Таким образом, исследования направленные на изучение

функционального состояние тканеспецифичных МСК при репликативном старении, а также влияние, оказываемое факторами микроокружения, представляются весьма актуальными.

Цель исследования:

изучение репликативного старения МСК, выделенных из жировой ткани человека, культивируемых при атмосферном (20%) и физиологическом (5%) уровнях кислорода.

Задачи:

1. Анализ основных маркеров клеточного старения;
2. Характеристика иммунофенотипа и дифференцировочного потенциала сенесцентных МСК;
3. Оценка состояния клеточных органелл и уровня окислительного стресса;
4. Характеристика элементов секреторного фенотипа;
5. Выявление транскриптомных изменений, ассоциированных со старением и реакцией на гипоксию.

Научная новизна

Данная работа является одним из первых исследований, касающихся репликативного старения МСК, выделенных из жировой ткани (жтМСК). Впервые проведено длительное культивирование данной клеточной популяции до достижения лимита Хейфлика при физиологическом (5%) уровне кислорода. Комплексный анализ феноменологических признаков старения позволил определить максимально возможное время поддержания исследуемой культуры *in vitro*, а также изучить основные морфофункциональные свойства клеток при достижении сенесцентного состояния. Впервые продемонстрировано, что при длительном культивировании МСК при 5% O₂ оказывают позитивное влияние на пролиферативные свойства на ранних пассажах, сохраняя, при этом, влияние на жизнеспособность и количество клеток с активной β-галактозидазой вплоть до потери пролиферативных свойств.

Впервые проведены исследования, касающиеся активности митохондриального и лизосомального компартментов МСК при репликативном старении. Продemonстрировано, что сенесцентные МСК, длительно культивируемые при тканевых значениях O₂, отличаются по уровню окислительного стресса и характеристике органелл от аналогичных клеток, культивируемых в стандартных условиях (20% O₂). При 5% кислорода на поздних пассажах в клетках показано снижение количества АФК и уровня перекисного окисления липидов, а также мембранного потенциала митохондрий и активности лизосомального компартмента.

Получены новые данные о паракринной активности и экспрессии генов сенесцентных жтМСК. Впервые показано снижение продукции TGFβ при перманентном поддержании физиологического уровня O₂ (5%). Культивирование МСК при 5% O₂ позволяет смягчить изменения экспрессии генов, ассоциированных со старением. Показано снижение экспрессии *HIF1A*, основного регулятора реакции на гипоксию, в модели репликативного старения МСК.

Теоретическая и практическая значимость

Экспериментальные данные, полученные в ходе выполнения научной работы, вносят значительный вклад в имеющиеся представления о биологии старения тканеспецифичных МСК. Выявлены модификации свойств клеток при достижении ими сенесцентного состояния. Показаны эффекты, оказываемые изменением уровня кислорода, важного параметра тканевой ниши, на функциональные особенности МСК при длительном культивировании.

Особую важность проведенные исследования представляют для практического применения. На сегодняшний день МСК, благодаря ряду уникальных свойств, представляют собой один из наиболее перспективных инструментов для регенеративной медицины. Полученные данные указывают на то, что использование тканевого уровня кислорода может выступать в качестве «мягкого» позитивного фактора, стимулирующего поддержание терапевтических свойств МСК и препятствующего клеточному старению.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Постоянное культивирование жтМСК при 5% O₂ приводит к повышению жизнеспособности и снижению доли клеток с активной β-галактозидазой, ассоциированной со старением, на поздних пассажах. На ранних пассажах эффекты гипоксии (5% O₂) более выражены и включают также усиление пролиферативных свойств и влияние на морфологию.
2. Постоянное культивирование жтМСК при тканевом уровне кислорода (5%) сопровождается снижением активности митохондриального и лизосомального компартментов, а также уровня окислительного стресса как на ранних пассажах, так и после длительного поддержания культуры.
3. Изменение экспрессии генов, ассоциированных со старением, в сенесцентных жтМСК более выражены при культивировании в условиях 20% O₂, чем при 5% O₂. При этом независимо от уровня оксигенации репликативное старение приводит к снижению экспрессии *HIF1A*. На ранних пассажах при 5% O₂ снижена экспрессия генов *ATM*, участвующего в реакции клетки на повреждение ДНК, и *PTEN*, негативного регулятора пролиферации.

Апробация работы

Основные результаты и положения диссертации были представлены и обсуждены на научных конференциях: XIII Конференция молодых специалистов, аспирантов и студентов (Москва, 2015), World conference on regenerative medicine (Leipzig, 2015), 17th international conference on oxidative stress reduction (Paris, 2016), V молодежная конференция по молекулярной и клеточной биологии (Санкт-Петербург, 2016), V съезд физиологов СНГ (Дагомыс, 2016), XXIII съезда Физиологического общества им. И. П. Павлова (Воронеж, 2017), Tissue engineering and regenerative medicine international society (TERMIS) conference (Davos, 2017), Клеточная биология: проблемы и перспективы (Санкт-Петербург, 2017), XVI Конференция молодых учёных, специалистов и студентов (Москва, 2017), III национальный конгресс по регенеративной медицине (Москва, 2017), Cell technologies at the edge: research and practice (CTERP) Conference (Moscow,

2018), XVII Конференция молодых учёных, специалистов и студентов (Москва, 2018).

По теме диссертации опубликовано 16 печатных работ, в том числе 4 статьи в журналах из перечня ВАК РФ и баз данных Scopus/Web of Science, 12 тезисов докладов.

Результаты диссертационной работы были обсуждены и рекомендованы к защите на секции «Космическая физиология и биология» Учёного совета ГНЦ РФ – ИМБП РАН (протокол № 3 от 6 марта 2019 г.).

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из глав: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы». Текст диссертации изложен на 140 страницах, содержит 36 рисунков и 5 таблиц. Список литературы состоит из 399 цитируемых источников, из которых 23 - на русском и 376 - на иностранном языке.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Выделение МСК

МСК выделяли из стромально-васкулярной фракции жировой ткани человека (жтМСК) с использованием стандартной методики (Zuk et. al., 2001) с модификациями (Buravkova et. al., 2009) и культивировали в среде α -МЕМ, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки (ФТС), 50 ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина (ПанЭко) в условиях 5% CO₂, 37°C, 100% влажности при 20% и 5% кислорода. Пересев осуществляли при 80-90% конфлюентности клеточного слоя. Донорами были женщины 35–45 лет. Длительное культивирование продолжали до репликативного старения.

Иммунофенотипирование МСК

Для подтверждения иммунофенотипа МСК (Dominici et al., 2006) проводили иммунофенотипирование по основным маркерам (CD29⁺, CD90⁺, CD73⁺, CD44⁺, CD105⁺, HLA-ABC⁺, CD45⁻, CD31⁻, CD34⁻) с помощью соответствующих антител (BD, США).

Количество удвоений клеточной популяции

Количество удвоений клеточной популяции (PD) МСК оценивали, рассчитывая среднее PD за один пассаж, а также сумму PD за все время поддержания культуры.

Жизнеспособность

Жизнеспособность определяли методом проточной цитофлуориметрии на приборе Accuri C6 (BD, США) с использованием набора Annexin V-FITC/PI (Immunotech, Франция) согласно инструкции производителя.

Распределение популяций МСК по фазам клеточного цикла

Распределение популяций МСК по фазам клеточного цикла оценивали методом проточной цитофлуориметрии на приборе Accuri C6 (BD, США). Для анализа клетки фиксировали этанолом и обрабатывали раствором, содержащим 50 мкг/мл иодида пропидия (PI) и 25 мкг/мл РНКазы А в течение 15 минут.

Клоногенная активность

МСК высевали с низкой плотностью на чашки Петри, диаметром 35 мм (порядка 100 клеток на чашку). После двух недель культивирования клетки фиксировали и окрашивали 0,5% раствором кристалл виолета в метаноле в течение 5 минут.

Экспрессия старение-ассоциированной β -галактозидазы

Экспрессию β -галактозидазы (SA- β -gal) в клетках выявляли с помощью Senescence Cells Histochemical Staining Kit (Sigma, США) согласно инструкции производителя. Анализировали 5 полей зрения, полученных с использованием светового фазово-контрастного микроскопа Nikon Eclipse TiU (Nikon, Япония). Число клеток считали с помощью программы Sigma ScanPro 5.0 Image Analysis Software (SPSS Inc., США).

Распределение популяций МСК по размеру и гранулярности

Для оценки относительного размера и гранулярности МСК использовали метод проточной цитофлуориметрии. Датчики регистрируют поглощение и рассеивание света клеткой (прямое (Forward Scatter - FSC-A) и угловое (Side Scatter - SSC-A)). FSC-A позволяет судить о размерах клетки, а SSC-A о гранулярности цитоплазмы.

Дифференцировка в остеогенном и адипогенном направлениях

Остеогенную дифференцировку индуцировали путем культивирования клеток в полной ростовой среде α MEM, содержащей 10^{-8} М дексаметазона, 10мМ β -глицерол-2-фосфата и 0,2 мМ 2-фосфо-L-аскорбиновой кислоты (10 и 21 день). Степень дифференцировки оценивали при помощи коммерческого набора «Alkaline phosphatase kit» (Sigma-Aldrich, США) согласно инструкции производителя и по минерализации матрикса путем выявления солей кальция ализариновым красным S.

Адипогенную дифференцировку осуществляли 18 дней в полной ростовой среде α MEM, содержащей 10^{-6} М дексаметазона, 200 μ М индометацина, 0,5 мМ изобутил-метил-ксантина (IBMX) и 10 μ М инсулина. Дифференцировки оценивали путем визуализации жировых капель 0,36% раствором масляного красного (Oil Red O).

Для количественной оценки связавшиеся красители растворяли в ДМСО (ализариновый красный) и в 100% изопропанол (масляный красный), после чего измеряли оптическую плотность полученных растворов при длинах волн 405 нм и 490 нм, соответственно.

Активность органелл и уровень окислительного стресса

Для определения функциональной активности митохондрий и лизосом использовали катионный потенциал-зависимый краситель Mitotracker Red FM (500 nM, 30 мин, 37°C) и pH-зависимый маркер LysoTracker Green DND-26 (200 nM, 30 мин, 37°C), соответственно (все - Life Technologies, США). Флуоресценцию анализировали на проточном цитофлуориметре Accuri C6 (BD, США). Также, совместно с д.м.н. С.В. Буравковым (ФФМ МГУ им. М.В. Ломоносова), проводили конфокальное микроскопическое исследование окрашенных зондами МСК (конфокальный лазерный сканирующий микроскоп LSM 780 (Zeiss, Германия).

Детекцию активных форм кислорода, супероксид-аниона (COA) и уровня окисления липидов проводили с помощью 2,7-дихлорфлуоресцеин диацетата (H2DCFDA) (Sigma, США) (20

μM, 30 мин), MitoSOX Red (Life Technologies, США) (5 μM, 10 мин), Image-iT Lipid Peroxidation Sensor (Life Technologies, США) (согласно инструкции), соответственно. Флуоресценцию оценивали на проточном цитофлуориметре Accuri C6.

Иммуноферментный анализ

Уровень продуцируемых паракринных факторов в кондиционированной среде определяли при помощи иммуноферментного анализа (ИФА) согласно инструкциям производителей: IL-6, IL-8 – BD (США); VEGF, TGFβ – R&D (США).

Количественная ПЦР

Для определения уровня экспрессии генов выделяли тотальную РНК с помощью лизирующего реагента QIAzol (Qiagen, США), после чего осуществляли реакцию обратной транскрипции с использованием QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, США) согласно инструкциям производителя. Полученную кДНК использовали для проведения количественной ПЦР с применением коммерческого реагента RT2 - Real Time SYBR Green/ROX PCR master mix (Qiagen, США) и планшетов RT² Profiler™ PCR Array Human Cellular Senescence (Qiagen, США) и RT² Profiler™ PCR Array Human Hypoxia Signaling Pathway с иммобилизованными лиофилизированными праймерами. Также использовали 2,5х реакционную смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя SYBR GREEN I (Синтол, Россия). Уровень экспрессии оценивали с использованием метода $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak et al., 2001).

Статистическая обработка данных

Статистическую достоверность различий между двумя группами данных оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни.

Результаты и обсуждения

Феноменологические признаки сенесцентного состояния

Одним из первых этапов работы являлось получение сенесцентных жтМСК, подтверждение их сенесцентного состояния, а также определение эффектов, оказываемых физиологическим уровнем кислорода на основные феноменологические признаки клеточного старения.

Количество удвоений клеточной популяции

Одним из главных признаков клеточного старения является неспособность клетки к делению, т.е. необратимая потеря ее пролиферативных свойств. Анализ среднего количества удвоений популяций за пассаж (PD) 5 клеточных образцов выявил, что среднее время поддержания пролиферирующей культуры варьирует от 21 до 23 пассажа (рис. 1), составляя, в среднем, 25-35 удвоений клеточной популяции.

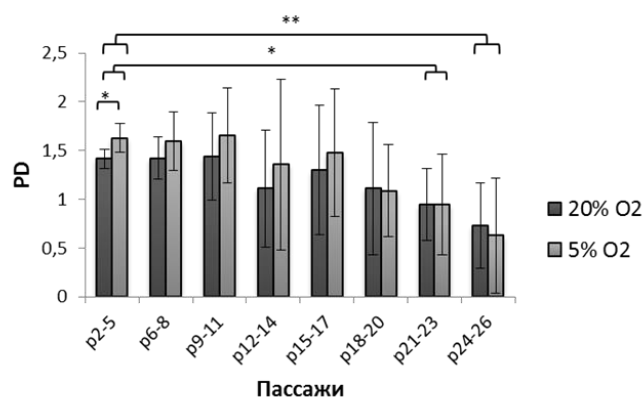


Рисунок 1. Среднее количество удвоений клеточных популяций по пассажам. Данные представлены как $M \pm SD$, $n \geq 5$, $*-p \leq 0,05$, $** - p \leq 0,01$.

Постоянное культивирование клеток в условиях с физиологическим уровнем кислорода (5%) приводило к увеличению среднего PD на ранних этапах культивирования (рис. 1). При более длительном пассировании эффект влияния уровня кислорода не был статистически подтвержден, но тенденция сохранялась.

Такой параметр как количество удвоений популяции может зависеть от двух основных факторов – пролиферативной активности клеток и клеточной гибели. Таким образом, нашим следующим шагом являлся анализ этих двух характеристик.

Жизнеспособность

С возрастом происходит накопление внутриклеточных повреждений, в том числе мутаций, что может приводить к трем основным последствиям – активации сенесцентного состояния, клеточной гибели или опухолевой трансформации клетки. Каскады клеточной гибели активируются в результате значительных повреждений, в то время как более мягкие отклонения приводят лишь к аресту клеточного цикла (Cerella et al., 2016; Gonzalez et al., 2016).

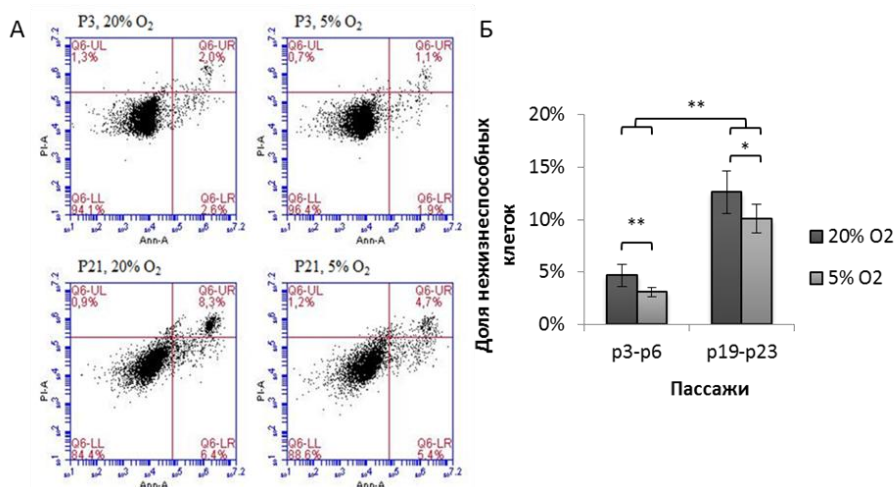


Рисунок 2. Оценка жизнеспособности МСК при помощи AnnA/PI. Данные представлены как $M \pm SD$, $n \geq 5$, $*-p \leq 0,05$, $** - p \leq 0,01$.

При помощи метода проточной цитофлуориметрии с применением окрашивания флуоресцентными красителями Ann/PI (аннексин/йодид пропидия) было показано, что на поздних пассажах (p19-23) обнаруживается повышение доли нежизнеспособных клеток в 2,5 – 3 раза (рис. 2). При культивировании МСК в условиях с физиологическим уровнем кислорода (5%) доля нежизнеспособных клеток была снижена как на ранних пассажах, так и в сенесцентных культурах (рис. 2). Это может указывать на меньший уровень внутриклеточных повреждений в этих условиях.

Пролиферативная активность

Пролиферативный потенциал культуры МСК оценивали по распределению МСК по фазам клеточного цикла и клоногенной активности.

Популяция МСК представляет собой гетерогенную культуру, включающую клетки разной степени коммитированности с различным пролиферативным потенциалом. Для оценки доли делящихся клеток в конкретный момент времени использовали метод выявления количества ДНК. Так, в фазе G1/G0 в клетках содержится в 2 раза меньше ДНК, чем в G2 фазе и во время митоза (М). Анализ распределения популяции МСК ранних и поздних пассажей по фазам клеточного цикла выявил существенное снижение доли активно делящихся клеток (G2/M) в сенесцентных культурах (рис. 3).

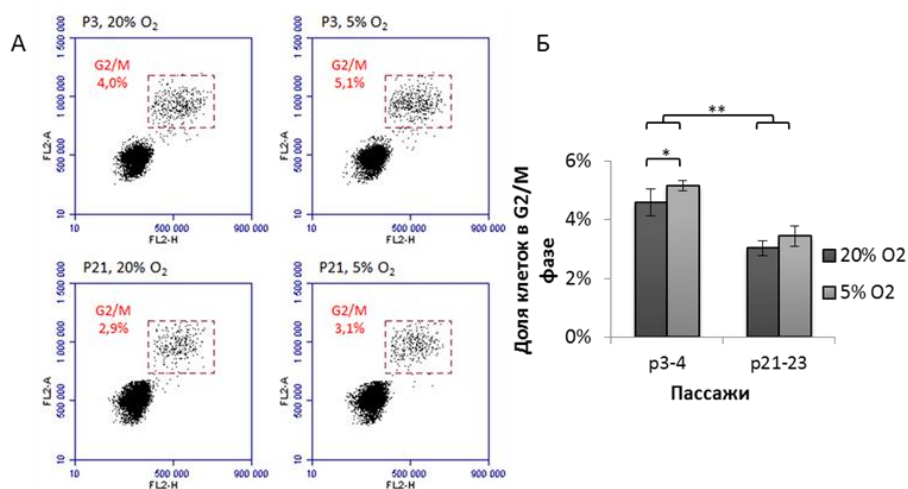


Рисунок 3. Распределение по фазам клеточного цикла на стадии 80-90% конфлюентности. Данные представлены как $M \pm SD$, $n \geq 3$, $*-p \leq 0,05$, $** - p \leq 0,01$.

Культивирование МСК при физиологическом уровне кислорода приводило к увеличению доли делящихся клеток на ранних пассажах. Однако в сенесцентных культурах значимых различий по данному параметру не выявлено, хотя тенденция сохранялась (рис. 3).

Анализ клоногенной активности показал аналогичную закономерность. На ранних пассажах в условиях с атмосферным уровнем кислорода среднее количество колоний составляло 17,9. На поздних пассажах выявлено значимое снижение КОЕ до 7,8, т.е. более чем двукратное уменьшение пула активно делящихся клеток на популяцию по сравнению с ранними пассажами

(рис. 4). Анализируемые колонии отличались не только количественно, но и качественно. Так, колонии сенесцентных МСК были гораздо менее плотными и занимали меньшую площадь.

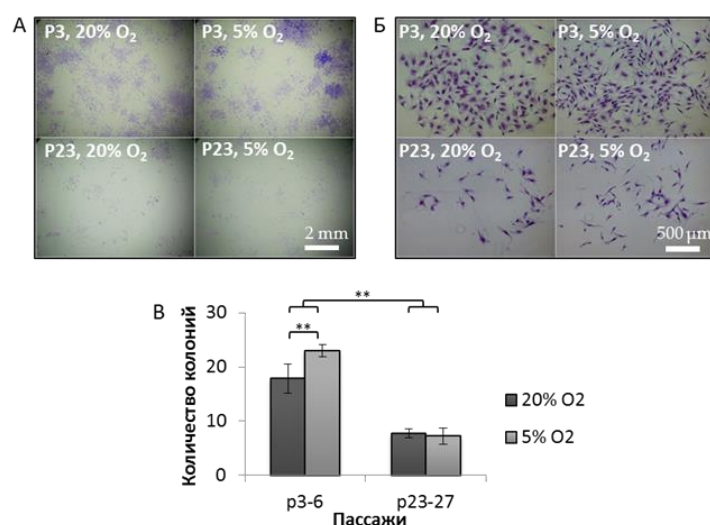


Рисунок 4. Клоногенная активность. Данные представлены как $M \pm SD$, $n \geq 3$, * $-p \leq 0,05$, ** $-p \leq 0,01$.

Культивирование МСК при физиологическом уровне кислорода приводило к увеличению среднего количества колоний на ранних пассажах до 23 на чашку против 17,9 в условиях атмосферного O₂. Стоит отметить, что колонии состояли из большего числа более мелких клеток. Однако в сенесцентных культурах значимых различий по данному параметру не выявлено (рис. 4).

Активность β -галактозидазы, ассоциированной со старением

Длительное культивирование клеток приводило к увеличению активности ассоциированной со старением β -галактозидазы (SA- β -gal), которое происходит при аресте клеточного цикла. Данный фермент относится к лизосомальным гидролазам и в норме проявляет активность при pH 4. Было обнаружено, что в сенесцентных клетках SA- β -gal активируется и при pH 6 (Dimri et al., 1995). На настоящий момент специфическая реакция на выявление активности SA- β -gal является одним из наиболее широко используемых методов детекции клеточного старения.

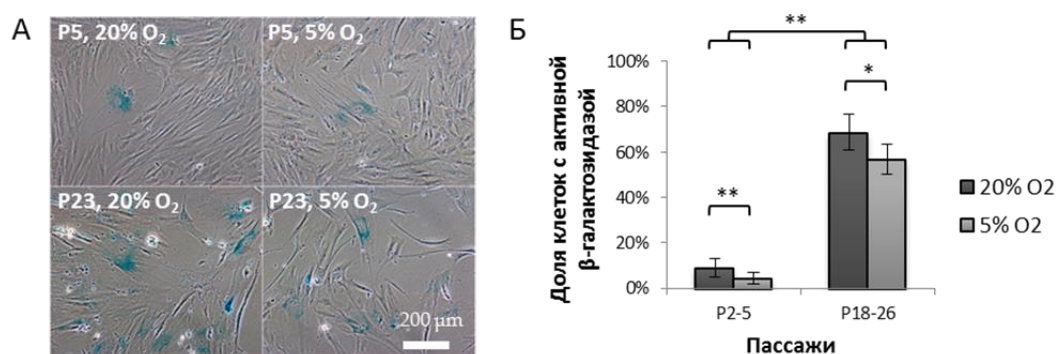


Рисунок 5. Выявление β -галактозидазы в МСК через 7 дней после посева в стандартной плотности (3000 кл/см²). Данные представлены как $M \pm SD$, $n \geq 5$, * $-p \leq 0,05$, ** $-p \leq 0,01$.

В ходе нашего исследования выявлено, что при длительном пассировании МСК в условиях атмосферной оксигенации (20% O₂) доля клеток с активной β-галактозидазой значительно увеличивается на поздних пассажах в среднем до 68,7% против 9% на ранних этапах культивирования (рис. 5). В условиях с физиологическим уровнем кислорода (5%) доля позитивно окрашенных клеток была снижена как на ранних, так и на поздних пассажах.

Морфология

По мере увеличения длительности культивирования увеличивался средний размер МСК и их гранулярность, количественная оценка которых осуществлялась по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеиванию, соответственно (рис. 6). Результаты могут указывать на снижение скорости делений. Снижение пролиферативной активности клетки не приводит к остановке роста, что и обуславливает увеличение среднего размера МСК на поздних пассажах. При этом, сенесцентные клетки, полностью остановившие клеточный цикл, способны сохранять жизнеспособность и функциональную активность довольно долго, не запуская апоптотические каскады и продолжая увеличиваться в размерах и накапливать широкий спектр различных цитоплазматических включений (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007; Rodier et al., 2011; Turinetti et al., 2016). Таким образом, увеличение среднего размера клеток и снижение пролиферативной активности являются тесно взаимосвязанными процессами.

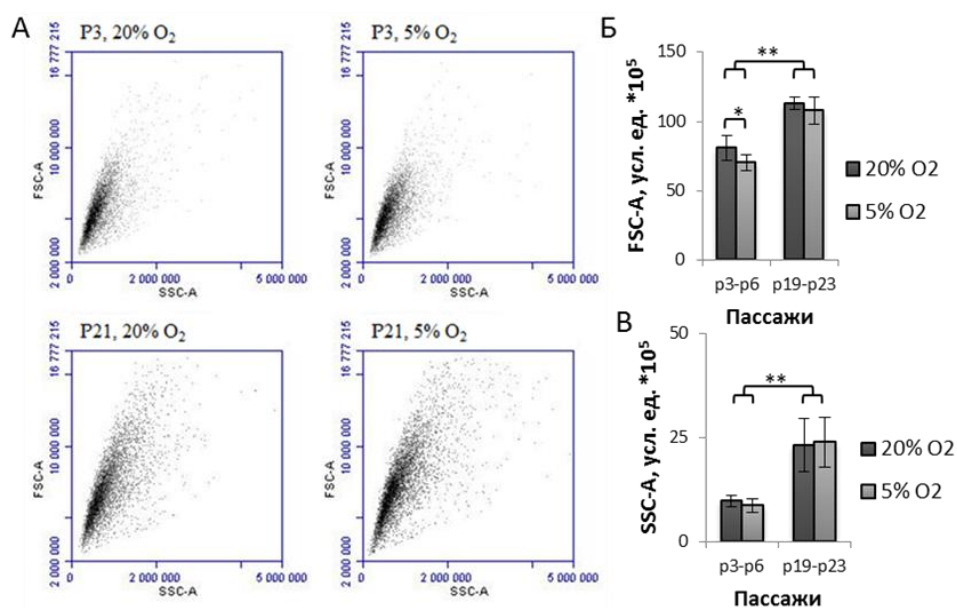


Рисунок 6. Оценка размера/гранулярности МСК по FSC/SSC (размеру/гранулярности), проточная цитометрия. Данные представлены как $M \pm SD$, $n \geq 5$, $*-p \leq 0,05$, $** - p \leq 0,01$.

Сравнительный анализ МСК, культивируемых в разных кислородных условиях, показал, что при 5% O₂ средний размер клеток оказался сниженным на ранних пассажах (рис. 6), что также, как и другие наши результаты, указывает на более активную пролиферацию. Значительных различий по признаку гранулярности внутриклеточной структуры МСК в зависимости от уровня оксигенации не выявлено.

Таким образом, постоянное культивирование жтМСК при 5% O₂ приводит к повышению жизнеспособности и снижению доли клеток с активной β-галактозидазой, ассоциированной со старением, на поздних пассажах. На ранних пассажах эффекты гипоксии (5% O₂) более выражены и включают также усиление пролиферативных свойств и влияние на морфологию.

Характеристика МСК при длительном культивировании

Полученные культуры сенесцентных клеток были подвергнуты анализу иммунофенотипа и оценке потенциала дифференцировки в канонических направлениях – остеогенном и адипогенном. При помощи метода проточной цитофлуориметрии и специфических антител, меченных флуорохромами, было показано, что доля позитивных клеток по маркерам CD29, CD90, CD73, CD44, CD105, HLA-ABC оставалась близкой к 100%.

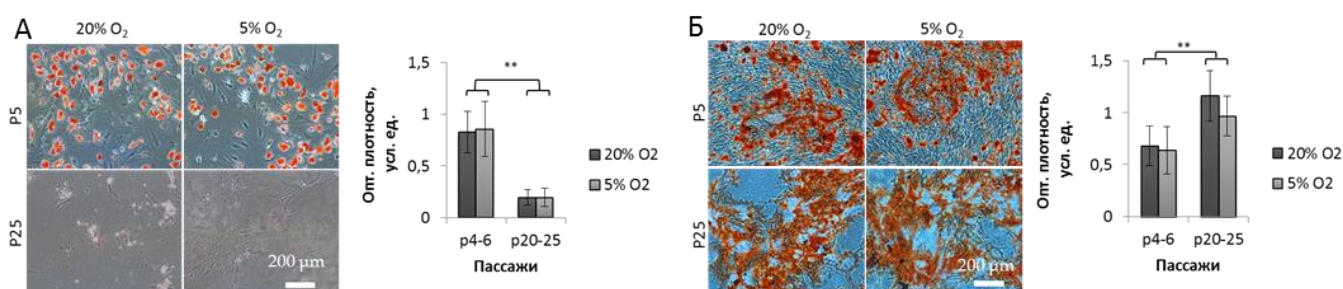


Рисунок 7. Потенциал к адипо- (А) и остеодифференцировке (Б). Данные представлены как $M \pm SD$, $n \geq 4$, *- $p \leq 0,05$, **- $p \leq 0,01$.

Наиболее надежным методом оценки дифференцировочного потенциала является индукция дифференцировки в соответствующем направлении с последующим анализом специфических маркеров. Лучшими маркерами для остеогенного и адипогенного путей являются выявление кальцифицированного матрикса и липидных включений, соответственно. Анализ липидных включений в жтМСК поздних пассажей выявил почти полное отсутствие адипогенного потенциала (рис. 7). Выявление кальцифицированного матрикса при помощи ализаринового красного указывало на противоположные результаты. Так, на поздних пассажах интенсивность окраски была значительно выше, чем на ранних этапах культивирования (рис. 8). При этом, стоит также отметить значительные различия в морфологии минерализованного матрикса между МСК ранних и поздних пассажей (рис. 8)

Таким образом, длительное культивирование не приводит к изменениям иммунофенотипа жтМСК, но способствует модификации мультипотентных свойств. Уровень оксигенации при этом

не оказывает значительного влияния на данные параметры.

Состояния клеточных органелл и уровень окислительного стресса

Следующим этапом работы было изучение функционального состояния внутриклеточных органелл и окислительного стресса жтМСК при достижении сенесцентного состояния, а также влияния на них уровня кислорода.

Полученные данные показали снижение мембранного потенциала митохондрий жтМСК на поздних пассажах (рис. 8). При этом было обнаружено снижение митохондриального потенциала в клетках, постоянно культивируемых при 5% O₂. Влияние уровня оксигенации отмечено на обоих анализируемых этапах культивирования жтМСК (рис. 8).

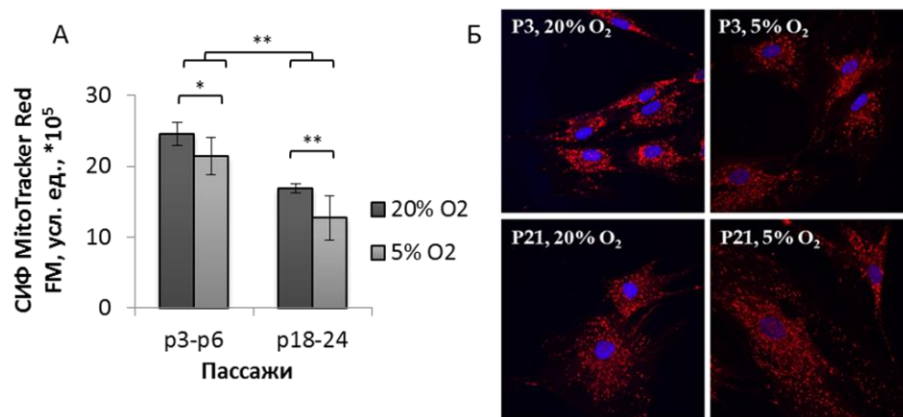


Рисунок 8. А - Средняя интенсивность флуоресценции MitoTracker Red FM; Б - Выявление митохондрий, конфокальная микроскопия. $M \pm SD$, $n \geq 5$, $*-p \leq 0,05$, $** - p \leq 0,01$

Анализ литературных данных показал, что исследователи по-разному оценивают роль митохондрий в развитии старения. Некоторые авторы не находят аномалий в функционировании электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) и процессах окислительного фосфорилирования в сенесцентных клетках (Maklashina and Ackrell., 2004). В более поздних работах отмечено снижение мембранного потенциала при старении, что связывают с повреждением ЭТЦ (Passos et al., 2010). Тем не менее, и те и другие указывают на повреждающую роль активных форм кислорода (АФК), продуцируемых митохондриями.

Детекцию АФК в МСК проводили при помощи методов проточной цитофлуориметрии с применением флуоресцентных зондов. При репликативном старении клеток уровень внутриклеточных АФК увеличивается (рис. 9А,Б). Также была оценена степень окисления клеточных липидов, которые являются одной из мишеней АФК. Было показано, что уровень перекисного окисления липидов достоверно повышается в сенесцентных клетках (рис. 9В).

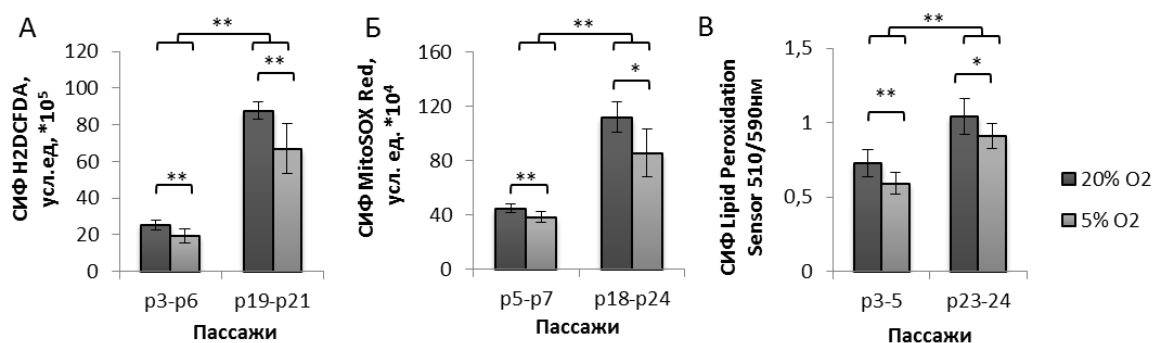


Рисунок 9. Средняя интенсивность флуоресценции зондов, детектирующих уровень активных форм кислорода (А), супероксид-аниона (Б) и перекисного окисления липидов (В)

Не вызывает сомнений, что повышение уровня АФК, в свою очередь, может вести к интенсификации процессов старения вследствие повреждения клеточных органелл и ДНК. Снижение содержания кислорода при культивировании до тканевого уровня (5% O₂) привело к уменьшению количества детектируемых АФК (рис. 9А). Схожие тенденции были обнаружены при анализе содержания супероксид-аниона (СОА), который является одной из наиболее опасных форм АФК (рис. 9Б), а также перекисного окисления липидов (рис. 9В). СОА в больших количествах генерируется в митохондриях, где может повреждать митохондриальную ДНК и способствовать нарушению синтеза белков, участвующих в переносе электронов в ЭТЦ. Нарушения в ЭТЦ, в свою очередь, еще больше способствуют продукции СОА и других АФК, которые могут попасть в ядро, вызвать повреждения в ядерной ДНК и, таким образом, способствовать формированию фенотипа стареющих клеток (Papa and Skulachev, 1997; Hu et al., 2018).

Немаловажными органеллами при изучении клеточного старения являются лизосомы, которые участвуют в аутофагических процессах, выполняя функцию утилизации широкого спектра органических частиц, в том числе дефектных белков и поврежденных органелл.

Для исследования активности лизосомального компартмента был использован зонд LysoTracker Green DND-26, который накапливается в везикулах с пониженным рН. В результате проведенных исследований было показано повышение флуоресценции данного зонда в МСК на поздних пассажах (рис. 12). Полученные данные указывают на увеличение количества кислых включений, что дополнительно подтверждается повышением гранулярности клеток (рис. 6). Культивирование клеток в условиях с физиологическим уровнем кислорода приводило к значимому снижению средней интенсивности флуоресценции (СИФ) зонда LysoTracker Green DND-26 как на ранних, так и на поздних пассажах (рис. 12).

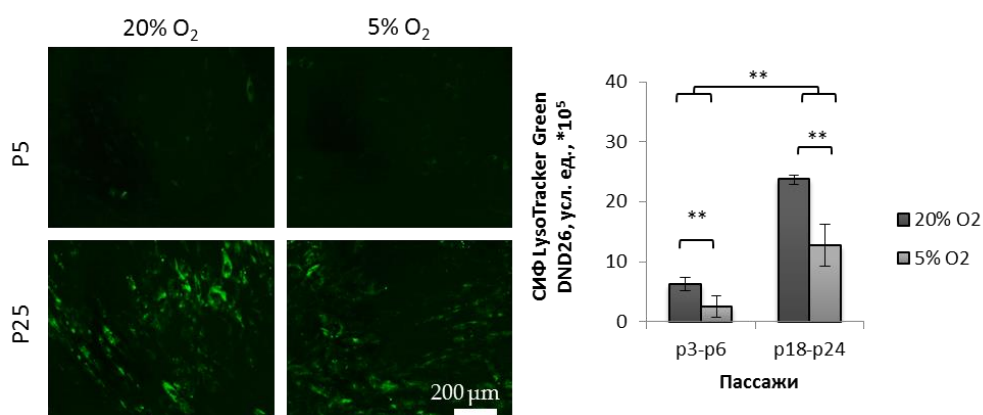


Рисунок 10. Средняя интенсивность флуоресценции LysoTracker Green DND26. Данные представлены как $M \pm SD$, $n \geq 5$, *- $p \leq 0,05$, **- $p \leq 0,01$.

Согласно литературным данным основными источниками АФК, как и их ближайшими мишенями, являются активные митохондрии (Brunk and Terman, 2002). Повреждение данных органелл вызывает биогенез лизосом для их утилизации. Недостаточность утилизирующей способности клетки ведет к накоплению дефектных митохондрий, что усиливает продукцию внутриклеточных АФК, замыкая цикл. Культивирование МСК при 5% O₂ вызывало снижение детектируемой флуоресценции LysoTracker Green DND-26 в 1.5-2 раза (рис. 10). Стоит напомнить, что при 5% кислорода также снижался уровень АФК (рис. 9) и мембранный потенциал митохондрий (рис. 8). Таким образом, снижение содержания кислорода в среде культивирования, вероятно, позволяет снизить скорость появления дефектных структур, возникающих вследствие окислительных повреждений, и замедлить проявление негативных эффектов старения. Некоторые исследования также указывают на прямую зависимость между уровнем кислорода в атмосфере культивирования и скоростью накопления липофусцина (Sohal et al., 1989).

Секреторная активность

Ассоциированный со старением секреторный фенотип (SASP - senescence associated secretory phenotype) представляет собой одну из наиболее выраженных особенностей сенесцентных клеток и, вероятно, связан с развитием физиологического старения, а также с возрастными заболеваниями (Campisi et al., 2011; Coppé et al., 2010). Оценку основных провоспалительных элементов SASP МСК проводили при помощи иммуноферментного анализа (ИФА). При длительном культивировании в кондиционированной среде обнаруживалось постепенное повышение концентрации цитокина IL-6 (рис. 13). Данные по продукции культурами не показали достоверных различий содержания IL-8 между ранними (p2-6) и средними (p10-17) пассажами не выявлено. На поздних пассажах обнаруживалось значимое повышение продукции IL-8 (рис. 11).

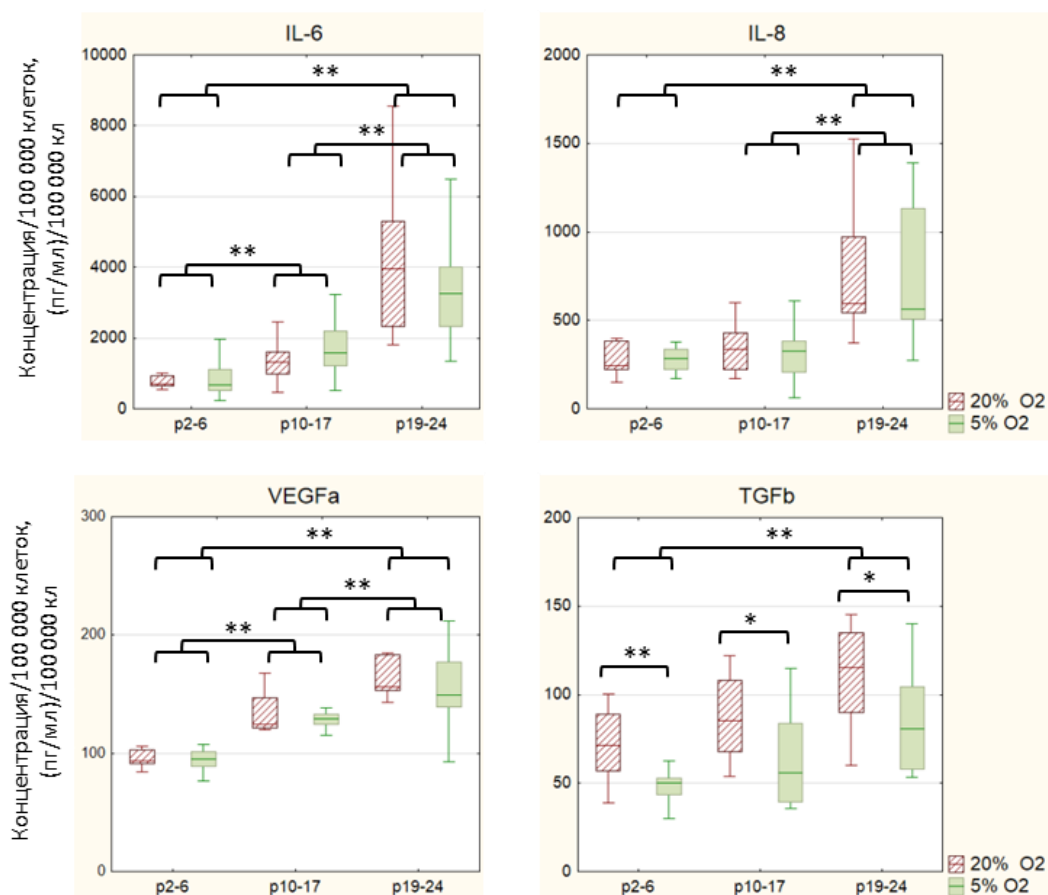


Рисунок 11. Продукция цитокинов, рассчитанная на 10^5 клеток. Данные представлены как Boxplots (медиана, интерквартильное расстояние, минимальное и максимальное значения), $n \geq 10$, * $-p \leq 0,05$, ** $-p \leq 0,01$.

Другими немаловажными паракринными агентами, в контексте изучения МСК, являются VEGF-а и TGF β . Данные белки относятся к антиапоптотическим факторам, при этом VEGF-а обладает ярко выраженным проангиогенным действием, а TGF β проявляет иммуномодуляторные свойства (Meirelles et al., 2009). Некоторые исследователи считают, что TGF β может выступать в качестве индуктора клеточного старения (Senturk et al. 2010). В нашей работе было показано увеличение продукции TGF β на поздних пассажах. Также обнаружено значимое снижение концентрации TGF β при культивировании МСК в условиях с пониженным содержанием O₂ (5%) на всех исследуемых пассажах (рис. 14). Исследование влияния репликативного старения на продукцию VEGFa показало, что максимальное содержание данного фактора в среде культивирования детектируется на средних пассажах (p10-17). При этом не выявлено значимых отличий между гипоксическими и нормоксическими условиями на ранних (p2-6) и средних (p10-17) пассажах (рис. 11).

Полученные данные указывают на то, что сенесцентные жтМСК могут быть одним из элементов тканевой ниши, активно участвующим в поддержании хронического воспаления, продуцируя провоспалительные цитокины. Изменение профиля секреции ростовых факторов

также может вносить вклад в модификацию свойств окружающих клеток, усиливая риск канцерогенеза, провоцируя клеточное старение или влияя на процесс ангиогенеза в тканях. Отдельно стоит отметить, что эксперименты *in vitro* показывают наличие связи между продукцией TGF β , который часто рассматривают как позитивный регулятор сенесценции (Katakura, 2006), и уровнем кислорода в атмосфере культивирования. Так, при физиологическом содержании O₂ (5%) продукция TGF β оказалась ниже, чем в стандартных условиях культивирования, что может быть одной из причин сниженного количества сенесцентных клеток, детектируемых, в том числе, с помощью SA- β -gal, при 5% O₂.

Транскриптомные модификации

Экспрессия генов, ассоциированных со старением

В дальнейших экспериментах усилия были сосредоточены на анализе транскрипционной активности генов, ассоциированных со старением и реакцией на гипоксические условия. Анализ МСК 21 и 3 пассажей проводили методом количественной ПЦР с помощью системы RT² Profiler™ PCR Array Human Cellular Senescence (“Qiagen”, США). Было обнаружено, что культивирование МСК до третьего пассажа в условиях 20% и 5% O₂ не привело к различиям в экспрессии значительного числа генов, продукты которых участвуют в процессах старения. При 20% O₂ по сравнению с клетками при 5% O₂ наблюдалось двукратное повышение экспрессии лишь двух генов из анализируемых 84 – *ATM* и *PTEN* (рис. 15). Известно, что продукт гена *ATM* участвует в ответе на повреждения ДНК, а повышенная экспрессия *PTEN* способствует снижению пролиферативной активности клеток (Xu et al., 2015). Полученные данные могут указывать на то, что стандартное культивирование при 20% O₂ оказывает некоторое повреждающее действие на ДНК клетки и способствует снижению скорости клеточного деления.

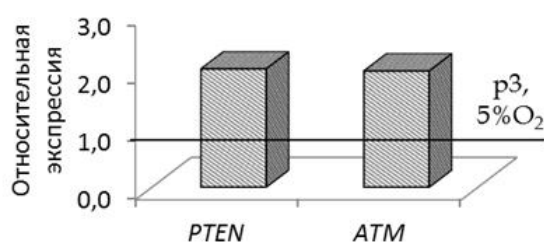
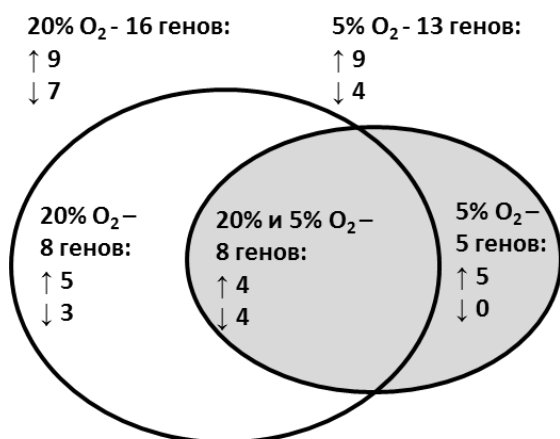


Рисунок 12. Экспрессия генов МСК третьего пассажа при культивировании в условиях атмосферного уровня кислорода (20%) относительно гипоксических условий (5%) (20% vs 5%O₂).



Ген	Продукт гена	относительная экспрессия	
		20% O2	5% O2
p53 / pRb сигналинг и клеточный цикл			
ALDH1A3	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3	-2,14	-
CCNA2	Cyclin A2	2,45	-
CCNB1	Cyclin B1	3,63	-
CCND1	Cyclin D1	10,48	8,66
CCNE1	Cyclin E1	-	2,69
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (p16)	-	3,23
CDKN1C	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	-14,77	-5,56
CREG1	Cellular repressor of E1A-stimulated genes 1	-3,64	-
ID1	Inhibitor of DNA binding 1	-12,21	-4,76
PLAU	Plasminogen activator, urokinase	3,77	-
SERPINE1	Serpin peptidase inhibitor	6,28	2,38
IGF-ассоциированные факторы			
IGF1	Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	-33,36	-30,80
IGFBP5	Insulin-like growth factor binding protein 5	-	2,06
IGFBP7	Insulin-like growth factor binding protein 7	-	2,34
Эффекторы p21 и p16			
CALR	Calreticulin	2,52	2,13
TBX2	T-box 2	-3,38	-
TBX3	T-box 3	2,65	-
Другие гены			
CD44	CD44 molecule (Indian blood group)	2,93	2,53
EGR1	Early growth response 1	4,44	-
NOX4	NADPH oxidase 4	-2,73	-2,89
MAP2K3	Mitogen-activated protein kinase kinase 3	-	2,31

Рисунок 13. Экспрессия генов МСК при длительном культивировании в условиях с различным содержанием кислорода (p21-23 vs p3-4).

Оценку экспрессии генов МСК 21 пассажа проводили относительно МСК 3 пассажа, культивируемых в аналогичных условия оксигенации (рис. 13). Полученные результаты указывали на изменение экспрессии 16 генов (*ALDH1A3*, *CCNA2*, *CCNB1*, *CCND1*, *CDKN1C*, *CREG1*, *ID1*, *PLAU*, *SERPINE1*, *IGF1*, *CALR*, *TBX2*, *TBX3*, *CD44*, *EGR1*, *NOX4*) при атмосферном уровне кислорода и 13 (*CCND1*, *CCNE1*, *CDKN2A*, *CDKN1C*, *ID1*, *SERPINE1*, *IGF1*, *IGFBP5*, *IGFBP7*, *CALR*, *CD44*, *NOX4*, *MAP2K3*) при 5% O₂. При этом экспрессия 8 генов одновременно изменялась в обоих условиях, транскрипционная активность *CCND1*, *SERPINE1*, *CALR*, *CD44* повышалась, в то время как *CDKN1C*, *ID1*, *IGF1*, *NOX4* снижалась. При разном уровне кислорода экспрессия генов, ассоциированных со старением, изменялась однонаправленно. Стоит отметить, что при 20% O₂ изменения транскрипционной активности, как правило, более выражены.

Экспрессия генов, ассоциированных с реакцией на гипоксию

Для выявления изменений транскриптомной активности 84 генов, ассоциированных с реакцией на гипоксию, при длительном культивировании в условиях с пониженным содержанием кислорода (5%) были изучены МСК 23-го и 3-го пассажей. Показано, что при длительном культивировании независимо от содержания O₂ изменялась экспрессия 7 генов (табл. 3). В сенесцентных клетках повышалась экспрессия генов *PKM2*, *SERPINE1*, *VEGFA* и снижалась экспрессия генов *ANKRD37*, *DDIT4*, *HIF1A*, *TXNIP* (табл. 1).

Таблица 1. Экспрессия генов, ассоциированных с реакцией на гипоксию, при длительном культивировании в условиях с различным содержанием кислорода (p21-23 vs p3-4).

Ген	Продукт гена	Относительная экспрессия	
		20% O ₂	5% O ₂
<i>PKM2</i>	Pyruvate kinase, muscle	2,05	2,18
<i>SERPINE1</i>	Serpin peptidase inhibitor, member 1	5,32	2,52
<i>VEGFA</i>	Vascular endothelial growth factor A	2,51	2,31
<i>HIF1A</i>	Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit	-2,75	-3,17
<i>ANKRD37</i>	Ankyrin repeat domain 37	-6,51	-5,40
<i>DDIT4</i>	DNA-damage-inducible transcript 4	-4,15	-2,25
<i>TXNIP</i>	Thioredoxin interacting protein	-3,67	-2,00

Примечание. Представлены гены, экспрессия которых достоверно ($p < 0,05$) изменилась более чем в 2 раза.

Культивирование жтМСК при 5% O₂ на ранних пассажах приводило к изменению транскрипционной активности 3 генов (табл. 2). Если репликативное старение усиливало экспрессию *PKM2*, *SERPINE1* и подавляло *ANKRD37*, то культивирование при 5% O₂ уже на ранних пассажах оказывало противоположный эффект. Так, при 5% O₂ экспрессия *PKM2* и *SERPINE* снижалась, а *ANKRD37* повышалась, что указывает на некоторую разнонаправленность эффектов, оказываемых репликативным старением и культивированием при пониженном содержании O₂.

Таблица 2. Изменение экспрессии генов, ассоциированных с реакцией на гипоксию, в жтМСК, культивируемых при 5% кислорода на ранних пассажах (p3-4).

Ген	Продукт гена	Относительная экспрессия, 5% O ₂ vs 20% O ₂
<i>PKM2</i>	Pyruvate kinase, muscle	-2,88*
<i>SERPINE1</i>	Serpin peptidase inhibitor, member 1	-2,92*
<i>VEGFA</i>	Vascular endothelial growth factor A	1,01
<i>HIF1A</i>	Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit	1,57
<i>ANKRD37</i>	Ankyrin repeat domain 37	2,33*
<i>DDIT4</i>	DNA-damage-inducible transcript 4	-1,92
<i>TXNIP</i>	Thioredoxin interacting protein	-1,64

Примечание. * - гены, экспрессия которых достоверно ($p < 0,05$) изменилась более чем в 2 раза.

Полученные результаты указывают на то, что направленность транскрипционных изменений активности генов, ассоциированных с гипоксией, в МСК при достижении завершающей фазы репликативного старения однотипна, несмотря на различные условия оксигенации. Тем не менее, на ранних пассажах можно обнаружить, что культивирование в гипоксических условиях (5%) может приводить к противоположной модификации экспрессии ряда генов, нежели репликативное старение. В то же время, как нами было показано ранее, при длительном культивировании МСК основные маркерные гены старения изменяют свою

экспрессию более выражено при использовании условий стандартного культивирования (20% O₂).

Таким образом, данные, полученные в ходе исследования могут внести значительный вклад в имеющиеся представления о биологии старения тканеспецифичных МСК (табл. 3). Выявлены модификации свойств клеток при достижении ими сенесцентного состояния. Показаны эффекты, оказываемые изменением уровня кислорода, важного параметра тканевой ниши, на функциональные особенности МСК при длительном культивировании (табл. 3).

Таблица 3. Влияние репликативного старения и тканевого уровня кислорода (5%) на морфофункциональные характеристики жтМСК.

Параметр	Эффекты репликативного старения	Эффекты гипоксии (5% O ₂)	
		На ранних пассажах	На поздних пассажах
PD за 1 пассаж	↓	↑	=
Пролиферация	↓	↑	=
Жизнеспособность	↓	↑	↑
Доля клеток с активной SA-β-gal	↑	↓	↓
Размер	↑	↓	=
Гранулярность	↑	=	=
Иммунофенотип	=	=	=
Адипогенный потенциал	↓	=	=
Мембранный потенциал митохондрий	↓	↓	↓
Уровень АФК	↑	↓	↓
Активность лизосомального компартмента	↑	↓	↓
Продукция паракринных медиаторов: IL-6 / IL-8 VEGFα / TGFβ	↑/↑ ↑/↑	=/=	=/=
Экспрессия генов: CCND1 / SERPINE1 ID1 / IGF1 ATM / PTEN PKM2 / VEGFA HIF1A	↑/↑ ↓/↓ =/ ↑/↑ ↓	=/=	↓/↓ ↑/↑ =/ ↓/= =

Суммируя полученные результаты, можно утверждать, что культивирование жтМСК при пониженном уровне O₂ может выступать в качестве мягкого воздействия, направленного на подавление старение-ассоциированных модификаций морфофункциональных характеристик клеток.

Выводы

1. Культивируемые мезенхимальные стромальные клетки, выделенные из жировой ткани человека (жтМСК), достигают репликативного старения после 25-35 удвоений клеточной популяции. При этом репликативное старение не приводит к изменениям иммунофенотипа, но сопровождается снижением мультипотентности: сенесцентные МСК не способны к дифференцировке в адипогенном направлении.
2. На ранних пассажах жтМСК, культивируемые при 5% O₂, характеризуются меньшими размерами, увеличенной пролиферативной активностью и жизнеспособностью, а также меньшей долей клеток с активной β-галактозидазой, ассоциированной со старением. На поздних пассажах сохраняется влияние уровня оксигенации только на жизнеспособность и долю клеток с активной β-галактозидазой.
3. В результате репликативного старения в жтМСК снижается мембранный потенциал митохондрий, повышается уровень окислительного стресса, увеличивается активность лизосомального компартмента. Постоянное культивирование клеток при 5% O₂ способствует снижению уровня окислительного стресса, активности митохондрий и лизосом как на ранних, так и на поздних пассажах.
4. Длительное культивирование жтМСК приводит к формированию секреторного фенотипа, ассоциированного со старением (SASP) как при 5% O₂, так и при 20% O₂. Увеличивается продукция провоспалительных цитокинов IL-6 и IL-8, а также ростовых факторов VEGFa и TGFβ. При 5% O₂ продукция TGFβ была снижена на всех этапах культивирования.
5. Изменение экспрессии генов, ассоциированных со старением, в сенесцентных жтМСК более выражено при культивировании в условиях 20% O₂. На ранних пассажах при 5% O₂ снижена экспрессия генов *ATM*, участвующего в реакции клетки на повреждение ДНК, и *PTEN*, негативного регулятора пролиферации.
6. Репликативное старение жтМСК приводит к снижению экспрессии *HIF1A*, субъединицы основного регулятора реакции клетки на гипоксию, а также к увеличению экспрессии *PKM2* (пируваткиназы M2, контролирующей последнюю стадию гликолиза) и *VEGFA* (фактора роста эндотелия, основного регулятора ангиогенеза). Постоянное культивирование клеток при 5% O₂ приводит к снижению экспрессии *PKM2* на ранних пассажах, но не влияет на *HIF1A* и *VEGFA*.

Список работ, опубликованных по материалам диссертации

Статьи:

1. Лобанова М.В., **Ратушный А.Ю.**, Буравкова Л.Б. Экспрессия генов, ассоциированных со старением, в мультипотентных мезенхимальных стромальных клетках при длительном культивировании в условиях разного содержания кислорода. // Доклады Академии Наук. - 2016. - Т. 470(2). - С. 227-229.
2. **Ratushnyy A**, Lobanova M, Buravkova LB. Expansion of adipose tissue-derived stromal cells at "physiologic" hypoxia attenuates replicative senescence. // Cell Biochem Funct. – 2017. – Vol. 35(4). – P. 232-243.
3. Лобанова М.В., **Ратушный А.Ю.**, Ездакова М.И., Буравкова Л.Б. Устойчивость мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток к действию глюкозной депривации в условиях сниженного содержания кислорода. // Биофизика. - 2018. - Т. 63(3). - С. 503-509.
4. **Ратушный А.Ю.**, Рудимова Ю.В., Буравкова Л.Б. Изменение транскрипции генов , ассоциированных с реакцией на гипоксию, в мезенхимальных стромальных клетках при репликативном старении в условиях физиологического содержания кислорода. // Биохимия. – 2019. – Т. 84. - С. 380 – 391.

Тезисы докладов научных конференций

1. **Ратушный А.Ю.**, Погодина М.В. Исследование функционального состояния ММСК при долговременном пассивировании в условиях с различным содержанием кислорода. // XIII Конференция молодых специалистов, аспирантов и студентов, г. Москва, 2015. С. 43-44.
2. **Ratushnyy A.**, Pogodina M., Buravkova L. MSC senescence during long-term cultivation under low oxygen tension. World conference on regenerative medicine. Leipzig, 2015. P. 184.
3. Udartseva OO, Ezdakova MI, **Ratushnyy AYU**, Andreeva ER, Buravkova LB. Ros-mediated regulation of mesenchymal stem cell angiogenic activity. JISANH, Paris, 2016. Materials of 17th International Conference on Oxidative Stress Reduction.
4. **Ратушный А.Ю.**, Буравкова Л.Б. Изменение способности ММСК к дифференцировке при репликативном и стресс-индуцированном старении. V молодежная конференция по молекулярной и клеточной биологии, Санкт-Петербург, 2016 г. Сборник тезисов, с. 58-59.
5. **Ратушный А.Ю.**, Буравкова Л.Б. Дифференцировочный потенциал мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток при репликативном старении. V съезд физиологов СНГ, Дагомыс, 4-8 октября 2016 г. ActaNaturae, спецвыпуск Т. 1, С. 126.
6. Лобанова М.В., **Ратушный А.Ю.**, Ездакова М.И., Буравкова Л.Б. Функциональное состояние митохондрий ММСК и экспрессия генов регуляторов энергетического обмена при действии глюкозной депривации в условиях различного содержания кислорода. XXIII съезд Физиологического общества им. И. П. Павлова, Воронеж, 2017 г. Материалы конференции С. 1506-1507.
7. Buravkova L, **Ratushnyy A**, Lobanova M, Buravkov S. Expansion at “physiologic” hypoxia attenuates replicative senescence of adipose tissue-derived stromal cells. TERMIS-EU 2017

Conference, Davos, 2017. European Cells and Materials Vol. 33 Suppl. 2; P.557.

8. **Ратушный А.Ю.**, Буравкова Л.Б. Секреторный фенотип мезенхимальных стромальных клеток при репликативном старении в условиях гипоксии. Конференция с международным участием «Клеточная биология: проблемы и перспективы», Санкт-Петербург, 2017 г. Материалы конференции С. 110-111.
9. **Ратушный А.Ю.** Репликативное старение мезенхимальных стромальных клеток в условиях физиологической гипоксии. XVI Конференция молодых учёных, специалистов и студентов, Москва, 2017 г. Материалы конференции С. 26-28.
10. **Ратушный А.Ю.**, Ездакова М.И., Буравкова Л.Б. Ангиогенный потенциал мезенхимальных стромальных клеток при длительном пассировании в условиях с различным содержанием кислорода. III Национальный Конгресс по регенеративной медицине, Москва, 2017 г. Гены и клетки, том 12, №3, с.204.
11. **Ratushnyy A.**, Konstantinova N. Proliferation of mesenchymal stromal cells during long-term cultivation under low oxygen tension. CTERP, 2018, Moscow. CTERP abstracts (Russian Journal of Developmental Biology /Онтогенез), P. 123-124.
12. **Ратушный А.Ю.** Ассоциированный со старением секреторный фенотип мезенхимальных стромальных клеток. XVII Конференция молодых учёных, специалистов и студентов, Москва, 2018 г. Материалы конференции, С. 102-104.