

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Государственный научный центр Российской Федерации – Институт  
медицинско-биологических проблем Российской академии наук»

---

*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

ДИССЕРТАЦИЯ  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук, профессор,  
член-корреспондент РАН  
Буравкова Л.Б.

Москва – 2019

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ .....	5
ВВЕДЕНИЕ .....	6
Актуальность проблемы.....	6
Научная новизна .....	7
Теоретическая и практическая значимость .....	8
Основные положения, выносимые на защиту.....	9
Степень достоверности результатов проведённых исследований.....	9
Апробация работы .....	9
Связь работы с научными программами .....	10
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	11
Мезенхимальные стромальные/стволовые клетки. Общие положения. ....	11
Тканевые источники и гетерогенность МСК .....	13
Тканевая ниша МСК. Уровень кислорода.....	15
Старение организма и старение клетки .....	18
Инициаторы клеточного старения .....	23
Механистические теории старения .....	25
Теломерная теория .....	26
Свободно-радикальная теория .....	29
Митохондриальная теория старения .....	31
Свободно-радикальная митохондриальная теория.....	33
Положительные эффекты клеточного старения .....	35
Старение МСК.....	36
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	41
Химические реагенты .....	41
Материалы .....	42
Оборудование .....	42
Выделение МСК.....	43

Криоконсервация МСК .....	43
Длительное культивирование МСК при различном содержании кислорода .....	44
Иммунофенотипирование МСК .....	45
Число удвоений популяции .....	46
Распределение популяций МСК по фазам клеточного цикла .....	46
Колониеобразующие единицы .....	47
Экспрессия $\beta$ -галактозидазы, ассоциированной со старением .....	47
Распределение популяций МСК по размеру и гранулярности.....	47
Жизнеспособность .....	48
Дифференцировка в остеогенном и адипогенном направлениях .....	48
Состояние внутриклеточных органелл.....	49
Конфокальная микроскопия .....	50
Окислительный стресс в клетке .....	50
Иммуноферментный анализ .....	51
Количественный ПЦР анализ .....	51
Статистическая обработка .....	52
<b>РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....</b>	<b>53</b>
Феноменологические признаки сенесцентного состояния.....	53
Количество удвоений клеточной популяции .....	53
Жизнеспособность .....	56
Пролиферативная активность .....	59
Активность ассоциированной со старением $\beta$ -галактозидазы .....	63
Морфология .....	67
Характеристика МСК при длительном культивировании .....	70
Иммунофенотип .....	70
Потенциал к дифференцировке .....	70
Характеристика состояния клеточных органелл и уровня окислительных процессов ....	76
Митохондрии .....	76

АФК .....	78
Лизосомы .....	80
Паракринные медиаторы.....	83
Транскрипционная активность генов, ассоциированных со старением и реакцией на гипоксию.....	88
Экспрессия генов, ассоциированных со старением.....	88
Экспрессия генов, ассоциированных с реакцией на гипоксию .....	95
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	100
ВЫВОДЫ .....	104
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	105

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода

ГСК – гемопоэтические стволовые клетки

жтМСК – МСК, выделенные из жировой ткани

ИФА – иммуноферментный анализ

КОЕ – колониеобразующие единицы

МСК – мезенхимальные стромальные/стволовые клетки

ПЦР – полимеразная цепная реакция

СИФ – средняя интенсивность флуоресценции

СОА – супероксид анион

ЭТЦ – электрон-транспортная цепь

CD – кластер дифференцировки

DDR – реакция на повреждение ДНК

HIF - гипоксия-индуциальный фактор

IL - интерлейкин

PBS – фосфатно-солевой буфер

PD – количество удвоений популяции

SASP – секреторный фенотип, ассоциированный со старением

SA- $\beta$ -gal –  $\beta$ -галактозидаза, ассоциированная со старением

TGF $\beta$  – трансформирующий ростовой фактор  $\beta$

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность проблемы

Поиск причин старения на тканевом и клеточном уровнях приводит к осознанию проблем исчерпания пула стволовых клеток взрослого организма и нарушения межклеточной коммуникации (Turinotto et al., 2016; Li et al., 2017). Популяции стволовых клеток имеют важное значение для поддержания тканевого гомеостаза. Исчерпание 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 гемопоэза 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 (Андреева и Буравкова, 2013; Murphy et al., 2013; Forostyak et al., 2013; Richardson et al., 2016). Клиническое применение этих клеток расширяется год от года. Согласно данным представленным на сайте Национального Института Здоровья США (US National Institutes of Health) (<https://clinicaltrials.gov>), в июне 2015 года было зарегистрировано 493 завершенных или продолжающихся клинических испытаний с применением МСК (Squillaro et al., 2016). На октябрь 2018 года зарегистрировано уже 893 таких исследований, в 13 из которых принимает участие Российская Федерация (данные сайта <https://clinicaltrials.gov>, термин для поиска - Mesenchymal Stem Cells).

Одной из отличительных особенностей 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; Buravkova et al., 2014, 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 состояния 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% O<sub>2</sub> оказывают позитивное влияние на пролиферативные свойства на ранних пассажах,

сохраняя, при этом, влияние на жизнеспособность и количество клеток с активной  $\beta$ -галактозидазой вплоть до потери пролиферативных свойств.

Впервые проведены исследования, касающиеся активности митохондриального и лизосомального компартментов МСК при репликативном старении. Продемонстрировано, что сенесцентные МСК, длительно культивируемые при тканевых значениях  $O_2$ , отличаются по уровню окислительного стресса и характеристике органелл от аналогичных клеток, культивируемых в стандартных условиях (20%  $O_2$ ). При 5% кислорода на поздних пассажах в клетках показано снижение количества АФК и уровня перекисного окисления липидов, а также мембранныго потенциала митохондрий и активности лизосомального компартмента.

Получены новые данные о паракринной активности и экспрессии генов сенесцентных жтМСК. Впервые показано снижение продукции TGF $\beta$  при перманентном поддержании физиологического уровня  $O_2$  (5%). Культивирование МСК при 5%  $O_2$  позволяет смягчить изменения экспрессии генов, ассоциированных со старением. Показано снижение экспрессии *HIF1A*, основного регулятора реакции клетки 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% O<sub>2</sub> приводит к повышению жизнеспособности и снижению доли клеток с активной β-галактозидазой, ассоциированной со старением, на поздних пассажах. На ранних пассажах эффекты гипоксии (5% O<sub>2</sub>) 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% O<sub>2</sub>, чем при 5% O<sub>2</sub>. При этом независимо от уровня оксигенации репликативное старение приводит к снижению экспрессии *HIF1A*. На ранних пассажах при 5% O<sub>2</sub> снижена экспрессия генов *ATM*, участвующего в реакции клетки на повреждение ДНК, и *PTEN*, негативного регулятора пролиферации.

### **Степень достоверности результатов проведённых исследований**

Все научные положения и выводы по результатам диссертационной работы основаны на достоверных результатах, подкреплённых фактическими данными. Достоверность результатов обусловлена достаточным количеством наблюдений и использованием современных методов исследования. Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием современных методов анализа данных. Интерпретация результатов производилась на основе анализа данных мировой научной литературы по соответствующей тематике.

### **Апробация работы**

Основные результаты и положения диссертации были представлены и обсуждены на научных мероприятиях: 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 съезд 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.

### **Связь работы с научными программами**

Работа выполнена при поддержке программы Президиума РАН «Интегративная физиология» и гранта РФФИ № 16-04-01244.

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### **Мезенхимальные стромальные/стволовые клетки. Общие положения.**

К стволовым клеткам (СК) принято относить клетки, обладающие специфическими возможностями к самообновлению и мультилинейной дифференцировке (Wei et al., 2013). Благодаря потенциальной возможности их использования в медицине, а также большой биологической значимости, они привлекли немалый общественный интерес. В зависимости от источника выделения СК можно разделить на эмбриональные (ЭСК) и постнатальные (или соматические - ССК), полученные из сформировавшегося организма. Отдельно стоит рассмотреть индуцированные плюрипотентные СК (иПСК).

ЭСК выделяют из внутренней клеточной массы на ранней стадии развития бластоциты. Они характеризуются свойством плюрипотентности, т.е. могут дифференцироваться в любом направлении, обладают особой способностью к самоподдержанию и сохранению геномной стабильности (Evans and Kaufman, 1981, Bai et al., 2013). Тем не менее, исследование или применение ЭСК человека в значительной степени ограничено по этическим и методологическим причинам.

Популяцию иПСК получают искусственно из дифференцированных клеток путем индукции избыточной экспрессии четырех факторов транскрипции (коктейль Яманаки) - Oct4, Sox2, Klf4, и c-Myc (Takahashi and Yamanaka, 2006). Полученные таким способом клетки обладают почти теми же свойствами, что и ЭСК. Несмотря на свой потенциал для клеточной терапии вопросы безопасного использования иПСК по-прежнему не решены.

В настоящее время наибольшее внимание для применения в клеточной терапии привлекают ССК. Среди их основных преимуществ можно выделить следующие: (1) возможность получения непосредственно из тканей пациента, что решает проблему реакции «трансплантат против хозяина»; (2) «сниженная стволовость» не способствует образованию тератом; (3) этические вопросы не так остры (Fischbach and Fischbach, 2004). Среди ССК наиболее изученными являются популяции гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и мезенхимальных стромальных/стволовых клеток (МСК). ГСК являются предшественниками всех клеток крови, включая миелоидный (моноциты, макрофаги, нейтрофилы, базофилы, эозинофилы, эритроциты, мегакариоциты, тромбоциты, дендритные клетки) и лимфоидный ряды (T-, В-лимфоциты, естественные киллеры). МСК, как следует из названия, принадлежат к негемопоэтическому ряду и могут дифференцироваться, в основном, в клетки мезодермального происхождения.

Впервые МСК были выделены из костного мозга мыши. Было показано, что фибробластоподобные клетки проявляли способность к адгезии на пластик и при

культивировании образовывали колонии, т.е. представляли собой колониеобразующие единицы (КОЕ) (Friedenstein et al., 1976). Позже МСК были получены почти из всех типов тканей (Crisan et al., 2008), тем не менее конкретных маркеров данной популяции определено не было. Для внесения большей ясности Международное Общество по Клеточной Терапии (International Society for Cellular Therapy) установило ряд минимальных критериев для определения мезенхимальных стволовых/стромальных клеток. Эти клетки (1) должны адгезировать на культуральный пластик, (2) обладать определенным набором поверхностных маркеров, включая CD73+, CD90+, CD105+, CD14-, CD34-, CD45-, HLA-DR-, и (3) дифференцироваться *in vitro* в adipогенном, хондрогенном, остеогенном направлениях при соответствующей индукции (Dominici et al., 2006). Подобные требования применимы ко всем МСК, хотя могут быть некоторые различия в зависимости от тканевого источника или пассажа (Ullah et al., 2015). Так, согласно ряду научных работ, свежевыделенные МСК жировой ткани или костного мозга могут содержать клеточную субпопуляцию CD34+, принадлежащую к гемопоэтическому ряду. Уже на втором пассаже данные клетки элиминируются из культуры (Lin, et al. 2012).

Благодаря ряду свойств МСК, таких как мультипотентность, способность к самоподдержанию, доступность и геномная стабильность, данная клеточная популяция привлекла особое внимание с целью ее применения в регенеративной медицине. МСК задействованы в физиологическом обновлении тканей (Chan et al. 2004) и репарации раневых повреждений, выполняя важную функцию по поддержанию тканевого гомеостаза. Многочисленные исследования *in vivo* доказывают эффективность введения данной популяции клеток в репаративных целях при инфарктах, инсультах, язвах, ожогах, повреждениях внутренних органов и др. (Рубина и др., 2010; Калинина и др. 2011; Nombela-Arrieta, et al. 2011; Zuk 2010; Natesan, et al. 2011). Предполагали, что в основе наблюдаемых эффектов лежит способность МСК к дифференцировке в функционально активные элементы ткани или слияние с ними, обеспечивая доставку здоровых митохондрий и иных клеточных компартментов. Однако накопленные данные позволяют уверенно говорить, что основную роль играет секреция различных паракринных медиаторов, осуществляемая МСК в области повреждения. Они продуцируют широкий спектр цитокинов, проявляя антиапоптотический, иммуномодуляторный, хемоаттрактивный, антифибротический, ангиогенный эффекты (Парфенова и др., 2006; Трактуев и др., 2006; Rubina et al., 2009; Caplan, 2009; Locke et al., 2011; Gnechi et al., 2016; Hodgkinson et al., 2016; Gornostaeva et al., 2016; Lunyak et al., 2017).

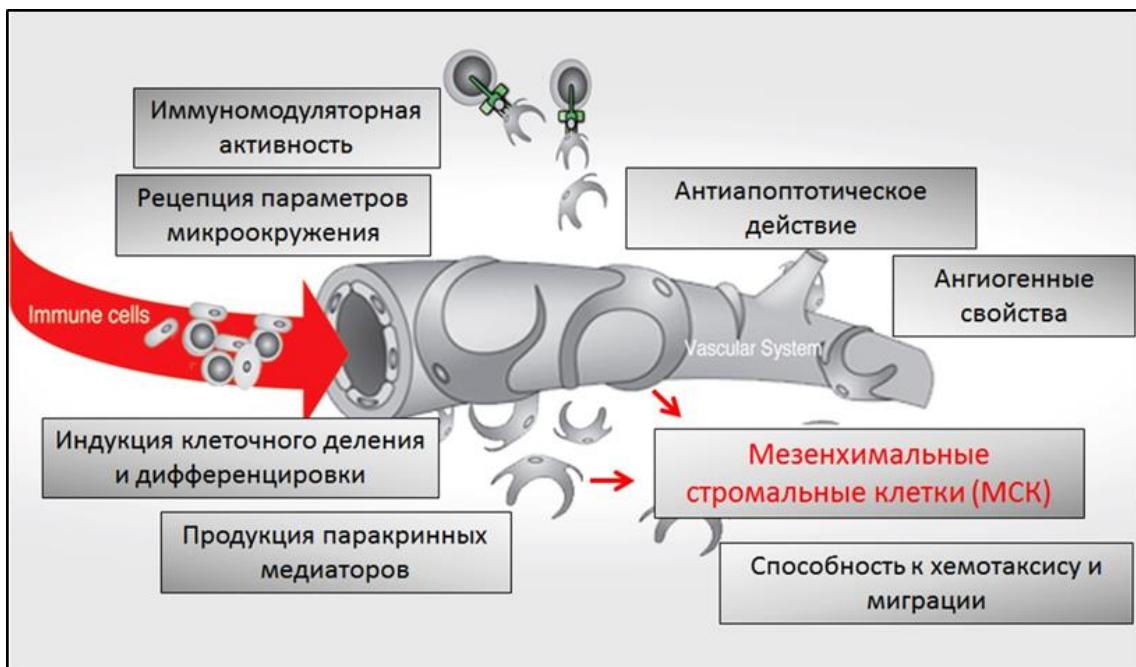


Рисунок 1. Свойства МСК (адаптировано из Lunyak et al., 2017).

### Тканевые источники и гетерогенность МСК

На сегодняшний день многие исследователи приходят к выводу о том, что функциональное состояние органов и тканей в значительной степени зависит от МСК. Они занимают периваскулярную нишу, располагаясь вблизи кровеносных сосудов (Паюшина, 2015; Lunyak et al., 2017). Данные клетки были обнаружены уже почти во всех тканях взрослого организма, а также в тканях новорожденных, включая плаценту и пуповину (Uccelli et al., 2008; Hass et al., 2011; Singer and Caplan, 2011). Так, МСК были получены из костного мозга, жировой ткани, амниотической жидкости, амниотической мембранны, пульпы зуба, эндометрия, зародышей конечностей, менструальной крови, периферической крови, слюнных желез, кожи, крайней плоти, синовиальной жидкости, Вартонова студня и др. (Ullah et al., 2015) Тем не менее, несмотря на соответствие выделяемых клеток минимальным критериям (Dominici et al., 2006), что позволяет относить их к МСК, получаемые культуры в значительной степени различаются.

Тканеспецифичные варианты дифференцировочной активности, различия в составе поверхностных маркеров, протеома и транскриптома продолжают изучаться (Анохина и Буравкова, 2007; Kern et al., 2006; Mattar and Bieback, 2015; Strioga et al., 2012). Стоит учитывать тонкие модификации, которые возникают вследствие различий в локальных функциях, параметрах микроокружения и индивидуальных характеристиках донора. Среди МСК, выделенных из различных тканевых источников, наиболее хорошо исследованы МСК костного мозга (кмМСК) и жировой ткани (жтМСК). В последнее

время много внимания уделяют изучению свойств МСК, выделенных из пуповинной крови, (пкМСК.). Известно, что кмМСК поддерживают процессы гемопоэза, в то время как жтМСК выполняют задачи по специальному локальному поддержанию иммунного гомеостаза, отличным от таковых в костном мозге (Kern et al., 2006; Hass et al., 2011, Hoogduijn et al., 2014). В других исследованиях показано, что на поверхности жтМСК значительно снижен уровень представленности CD106 по сравнению с МСК других тканевых ниш (Kern et al., 2006, Xishan et al., 2013, Yang et al., 2013). Анализ дифференцировочной активности пкМСК выявил снижение адипогенного потенциала (Karagianni et al., 2013). Сравнение иммуномодуляторных функций МСК, полученных из трех рассматриваемых тканевых источников, также выявило ряд различий. Так, жтМСК, по-видимому, оказывают более выраженное влияние на дифференцировку дендритных клеток, чем кмМСК (Ivanova-Todorova et al., 2009). Другие исследователи оценили противовоспалительную активность. Показано, что пкМСК наиболее активно подавляют продукцию цитокинов ЛПС-индуцированными альвеолярными макрофагами, чем жтМСК и кмМСК (Jin et al., 2013). Сравнение жтМСК и кмМСК по способности ингибировать активацию лимфоцитов (CD4+/CD8+) выявило повышенную иммуносупрессивную активность у жтМСК (Ribeiro et al., 2013). Эти и многие другие исследования доказывают необходимость отдельного изучения каждой тканеспецифичной субпопуляции МСК.

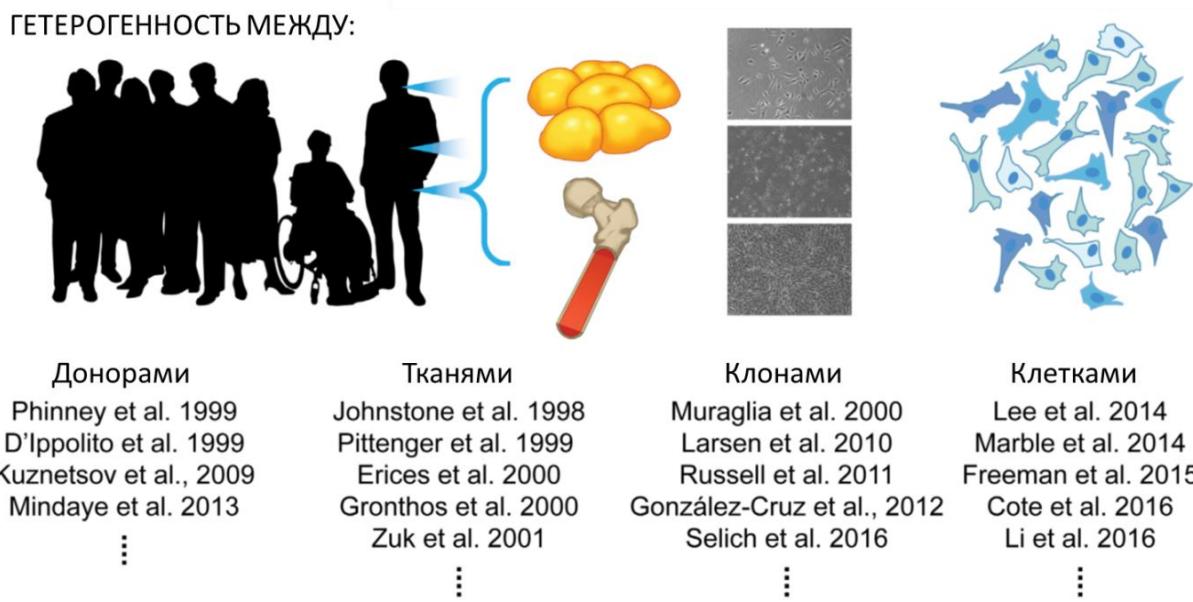


Рисунок 2. Гетерогенность МСК (адаптировано из McLeod and Mauck., 2017)

Помимо тканевой гетерогенности различия проявляются между донорами (Kuznetsov et al., 2009; Wang et al., 2013), и даже внутри одной клеточной популяции

(Bigildeev et al., 2012). Недавние исследования выявили значительную изменчивость по дифференцировочному потенциальному, молекулярным параметрам (эпигенетическим, транскриптомным, протеомным) и биофизическим свойствам между отдельными колониями МСК и внутри них (McLeod and Mauck., 2017). При культивировании *in vitro* степень гетерогенности в единой колонии увеличивается со временем, что можно отследить по изменению дифференцировочного потенциала, пролиферативной активности и многим другим параметрам. При высевании на чашку Петри свежевыделенной гетерогенной клеточной популяции, напротив, со временем происходит выщепление наиболее успешных клонов и снижение общего разнообразия (McLeod and Mauck., 2017).

### **Тканевая ниша МСК. Уровень кислорода.**

Возникающие *in vitro* субпопуляционные изменения являются прямым следствием изменения условий, характерных для тканевой ниши МСК, которая обеспечивает наличие специфических биологических, химических и механических сигналов. Согласно определению, ниша стволовой клетки является анатомическим компартментом, включающим клеточные и неклеточные составляющие, которые обеспечивают наличие системных и локальных стимулов, контролируя пролиферацию и дифференцировку стволовых клеток, а также препятствуя истощению их пуша и гибели (Yin and Li, 2006). К составляющим ниши можно отнести регуляторные молекулы (питательные вещества, цитокины), клетки ниши (3D-структура, межклеточные контакты, аутокринные и паракринные сигналы), внеклеточный матрикс и физические факторы (ток жидкости, сжатие, растяжение, электрические сигналы) (Vunjak-Novakovic and Scadden, 2006).

Особое внимание в контексте изучения МСК отводится кислороду, который, в этом случае, интересует не как физический фактор, а как метаболический субстрат и регуляторная молекула, влияющая на физиологию клеток (Буравкова и Анохина., 2008; Бурнаевский и др., 2010; Ефименко и др., 2010; Буравкова и др., 2012; Горностаева и др., 2013; Mohyeldin et al., 2010; Das et al., 2010; Sart et al., 2015). Молекулы кислорода необходимы для окислительных реакций, которые поддерживают рост и функционирование клеток. С другой стороны, их избыток в форме свободных радикалов может оказывать повреждающее воздействие, поэтому организм поддерживает концентрацию кислорода в узких физиологических границах. Известно, что в различных тканях МСК находятся в разных условиях оксигенации. Так, в паренхиме легких, сердце, печени и почках уровень кислорода достигает – 4-14%, в жировой ткани – 2-8%, в костном мозге – 1-6%, в головном мозге - 0,5-8% (Lennon et al., 2001; Ivanovic Z, 2009; Ma et al., 2009; Mohyeldin et al., 2010). Учитывая, что содержание кислорода в атмосфере ≈20%,

клетки в организме пребывают в условиях относительной гипоксии с точки зрения более привычных понятий и стандартов культивирования *in vitro* (95% атмосферного воздуха, 5% CO<sub>2</sub>). Таким образом, уровень O<sub>2</sub> может быть одним из факторов, которые модифицируют свойства МСК при их извлечении из тканевой ниши.

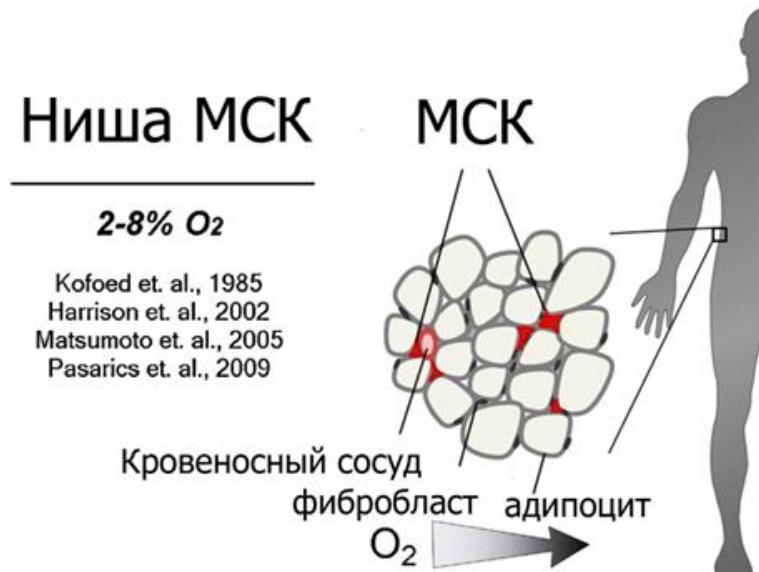


Рисунок 3. Тканевая ниша МСК, характерный уровень кислорода  
(адаптировано из Mohyeldin et al., 2010)

На сегодняшний день уже известно, что уровень кислорода может модифицировать некоторые морфофункциональные свойства МСК. Характерный иммунофенотип (CD105+, CD90+, CD73+, CD45-, CD34-, CD19-, CD14- и HLA-DR-), при этом, остается стабильным (Рылова и др. 2012; Choi et al., 2014). Культивирование в условиях различной оксигенации может влиять на морфологию клеток. Так, при атмосферном уровне кислорода доля крупных распластанных клеток больше, чем при 3-5% O<sub>2</sub>. Длительность культивирования составляла 4 пассажа (Рылова и Буравкова, 2013). Другие работы указывают на усиление пролиферативной активности МСК в условиях физиологического уровня кислорода. В частности, показано, что при длительном культивировании (100 суток) в условиях 3% O<sub>2</sub> увеличивается число удвоений кмМСК (Fehrer et al., 2007). Другие исследователи также указывают на усиление пролиферативных свойств МСК и стволовых клеток, в целом, при тканевых значениях уровня O<sub>2</sub> (Csete, 2005; Dos Santos et

al., 2010; Рылова, Буравкова, 2013; Choi et al., 2014). Предполагается, что увеличение интенсивности деления МСК может быть связано с модификацией продукции факторов роста, в том числе VEGF и bFGF, или чувствительности к ним (Lee et al., 2009; Basciano et al. 2011). При усилении пролиферации не происходит снижения жизнеспособности МСК в условиях пониженного до тканевых значений уровня кислорода (Fehrer et al., 2007; Буравкова и др., 2009; Mathew et al., 2013). Стоит также отметить положительное влияние на данный параметр короткого гипоксического прекондиционирования (Leroux et al., 2010; Ivanovic, 2009).

Одной из наиболее важных отличительных особенностей МСК является их способность к мультилинейной дифференцировке. Ряд исследователей отмечает, что при тканевых значениях кислорода происходит некоторое ингибирование остеогенного потенциала (Гринаковская и др., 2009; Malladi et al., 2006; Fehrer et al., 2007; Iida et al., 2010). При этом обнаруживается повышение экспрессии отдельных маркеров стволовости (Oct-4, REX-1) (D’Ippolito et al., 2006). Наряду с подавлением остеогенеза при 3% O<sub>2</sub> наблюдается снижение адипогенного потенциала МСК (Fehrer et al., 2007). При этом понижается уровень экспрессии маркеров адипогенеза - FABP4 и LPL. В другом исследовании аналогичные эффекты наблюдались при 2% O<sub>2</sub>, а помимо FABP4 и LPL снижалась экспрессия ключевого регулятора адипогенеза - PPAR $\gamma$  (Choi et al., 2014). Интересно, что снижение уровня оксигенации, негативно влияющее на дифференцировку в остеогенном и адипогенном направлениях, положительно регулирует хондрогенез (Wang et al., 2005; Xu et al., 2007). Данные экспериментов указывают на усиление экспрессии характерных маркеров - COL2A, SOX9, ACAN и скорости протекания соответствующей дифференцировки при 2% O<sub>2</sub> (Choi et al., 2014).

По мнению исследователей в основе наблюдаемых морфофункциональных изменений может лежать модификация HIF-зависимых сигнальных путей. Основным регулятором в этом случае выступает транскрипционный фактор HIF-1 (Hypoxia-inducible factor-1), состоящий из  $\alpha$  и  $\beta$  субъединиц. Механизм его действия изучен довольно подробно (Semenza, 2007). Синтез фактора HIF-1 $\alpha$  происходит конститутивно, однако в присутствии кислорода он деградирует: пролилгидроксилазы, неактивные при низком уровне O<sub>2</sub> (1-4% O<sub>2</sub>), гидроксилируют консервативные пролиловые остатки на HIF-1 $\alpha$ . После этого следует связывание с белком фон Хиппель-Линдау, который направляет субъединицу на убиквитин-зависимую протеасомную деградацию. Другой механизм контроля – фактор FIH-1 (Factor Inhibiting HIF-1), который неактивен в гипоксических условиях, но в присутствии O<sub>2</sub> гидроксилирует аспарагиновый остаток на трансактивационном домене HIF-1 $\alpha$ . При гипоксии HIF-1 $\alpha$  стабилизируется и

транслоцируется в ядро, соединяясь с HIF-1 $\beta$ . Далее, димер присоединяется к гипоксия-чувствительному домену (hypoxia-response element, HRE), связанному с коактиватором, например, CBP/p300, и таким образом осуществляет прямую и непрямую регуляцию экспрессии более 1000 генов, которые участвуют в процессах, ассоциированных с метаболизмом, ангиогенезом, инвазией, пролиферацией, жизнеспособностью, дифференцировкой и др., определяя судьбу клетки (Hill et al., 2009; Haque et al., 2013; Chacko et al., 2010; Buravkova et al., 2014; Ejtehadifare et al., 2015).

Помимо влияния уровня кислорода на признаки, которые часто рассматриваются в контексте старения (такие как пролиферация), исследователи также прямо сообщают о замедлении старения и поддержании стволовых свойств МСК костного мозга, культивируемых при 1% кислорода (Tsai et al., 2011; Kim et al., 2016). В основе данного явления может лежать тот факт, что при культивировании МСК в условиях атмосферной оксигенации в клетках обнаруживается повышенный уровень окислительных повреждений ДНК (Bétous et al., 2017).

### **Старение организма и старение клетки**

В современной интерпретации наиболее часто старение характеризуют как постепенную потерю физиологической целостности организма, ведущей к нарушениям его функций и увеличению риска смерти с течением времени. Признаки старения организма можно условно разделить на три категории: первичные, антагонистические и интегративные (López-Otín et al., 2013). Первичные признаки являются однозначно негативными и выполняют функцию триггеров, запуская патологические изменения. Антагонистические признаки представляют собой реакцию организма на первичные признаки. В зависимости от интенсивности и контекста проявления они могут оказывать как положительный, так и отрицательный эффект. Однако хроническая активация и несовершенство данных механизмов приводит к возникновению интегративных признаков. Так, повреждения ДНК (первичный признак) могут приводить к канцерогенезу. Активация сенесцентного состояния (антагонистический признак), в этом случае, оказывает положительный эффект, не позволяя клеткам с поврежденным геномом размножаться. С другой стороны наличие данного механизма приводит к постепенному истощению пула активно делящихся стволовых клеток (интегративный признак) (Muñoz-Espín et al., 2013; Muñoz-Espín and Serrano, 2014; López-Otín et al., 2013). Авторы данной классификации выделяют 9 ключевых признаков старения – нестабильность генома, укорочение теломер, эпигенетические альтерации, нарушение протеостаза, нарушение распознавания питательных веществ, митохондриальная дисфункция, клеточное старение,

истощение пула стволовых клеток, изменение межклеточного взаимодействия (рис. 4). Признаки выделяли на основании трех критериев: (1) он должен наблюдаться при нормальном старении; (2) его экспериментальное усиление должно приводить к ускоренному старению; (3) его экспериментальное ослабление должно замедлять развитие нормального старения и, тем самым, увеличивать здоровую продолжительность жизни. Стоит еще раз отметить, что подобные классификации весьма условны, так как при старении ключевые признаки проявляются совместно и тесно взаимосвязаны. Выявление причинно-следственных связей между ними представляет собой одну из основных проблем геронтологии.



Рисунок 4. Признаки старения организма на клеточном уровне  
(адаптировано из López-Otín et al., 2013)

На сегодняшний день некоторые авторы склонны считать, что одним из центральных звеньев в процессе старения является клеточное старение (сенесценция) (рис. 5) (McHugh and Gil, 2018). Данный феномен характеризуется необратимым арестом клеточного цикла и может сопровождаться выраженными фенотипическими изменениями, включая ремоделирование хроматина, модуляцию метаболизма, усиление аутофагических процессов, продукцию провоспалительных цитокинов (Campisi и d'Adda di Fagagna, 2007; Collado et al., 2007; Kuilman et al., 2010; Salama et al., 2014). Среди наиболее известных маркеров сенесцентного состояния клетки стоит выделить

морфологические изменения - уплощение и увеличение размера (Serrano et al., 1997, Imai et al., 2014), повышение активности старение-ассоциированной  $\beta$ -галактозидазы (SA- $\beta$ -gal) (Dimri et al., 1995), и увеличение частоты возникновения гетерохроматиновых фокусов -  $\gamma$ H2AX (Narita et al., 2003; Watanabe et al., 2017). Результаты исследований различных авторов демонстрируют, что кинетика образования  $\gamma$ H2AX фокусов в значительной степени коррелирует с появлением двунитевых разрывов, благодаря чему  $\gamma$ H2AX принято считать надежным маркером клеточного старения (Kuo and Yang, 2008; Firsanov et al., 2011). Стабильный арест цикла при сенесценции достигается путем активации сигнальных каскадов супрессоров опухолей p16INK4a/Rb и p53/p21CIP1, которые представляют собой реакцию клетки на повреждения ДНК.



Рисунок 5. Клеточное старение как ключевое звено старения организма

(адаптировано из McHugh and Gil, 2018)

Наряду с арестом клеточного цикла одним из наиболее характерных признаков сенесцентных клеток (и, возможно, наиболее важный с точки зрения старения всего организма) является секреторный фенотип, ассоциированный со старением (SASP - senescence-associated secretory phenotype). SASP характеризуется значительным сдвигом паракринной активности и включает сотни секрецируемых факторов, в том числе

провоспалительные цитокины, хемокины, факторы роста и протеазы (Kuilman and Peepre, 2009; Coppé et al., 2010). Конкретный состав может варьировать в зависимости от типа клеток и способа индукции старения. Популяция МСК, при этом, представляет особый интерес, поскольку выполняет трофическую функцию и обладает рядом регуляторных свойств, способных модулировать функциональный статус окружающих тканей (Fu et al., 2017; Hofer and Tuan, 2016). Несмотря на сложности, многие ключевые факторы и способы их регуляции были определены и описаны. Как оказалось, главными регуляторами SASP являются NF- $\kappa$ B (Nuclear factor  $\kappa$ B) и C/EBP $\beta$  (CCAAT/enhancer-binding protein  $\beta$ ) (Acosta et al., 2008; Kuilman et al., 2008). Однако сложный состав предполагает и другие независимые пути регуляции отдельных элементов секретома (McHugh and Gil, 2018).

Продукция SASP представляет собой частный, но наиболее важный, случай нарушения межклеточной коммуникации, который приводит ко многим последствиям в окружающих тканях (Kuilman and Peepre, 2009). Показано, что некоторые факторы могут стимулировать клеточную пролиферацию путем активации GRO (growth regulated oncogene) (Coppé et al., 2010) и ростового фактора амфирегулина (Bavik et al., 2006), другие - участвовать в неоваскуляризации посредством VEGF-активации (Coppé et al., 2006), третьи - модулировать WNT-активацию с помощью SFRP1 (secreted frizzled related protein 1) (Elzi, Song, Hakala et al., 2012) и продукцию IL-6 и IL-8 (Coppé et al., 2008; Acosta et al., 2008; Kuilman et al., 2008), которые, в свою очередь, могут либо стимулировать, либо ингибировать WNT-сигналинг и пролиферацию клеток, в зависимости от физиологического микроокружения (Krtolica et al., 2011; Zhang et al., 2011). Проведенные исследования на предраковых эпителиальных клетках, подвергнутых воздействию SASP фибробластов после стресс-индуцированного старения, показали повышение частоты эпителиально-мезенхимальных переходов и способности клеток к инвазии. Во многом подобные эффекты связывают с воздействием таких провоспалительных цитокинов, как IL-6 и IL-8. Кроме того, SFRP1, GRO $\alpha$  и IL-6 могут влиять на пролиферативную и дифференцировочную активность стволовых клеток, а также модулировать параметры их ниши (Krtolica et al., 2011; Zhang et al., 2011; Campisi, 2013). Исследования *in vitro*, проводимые на культуре фибробластов, показали, что прямое сокультивирование «молодых» клеток со «старыми» приводит к увеличению частоты формирования очагов повреждения ДНК, одного из признаков пресенсцентного состояния (Nelson et al., 2012).

Одним из наиболее важных эффектов, вызываемых элементами SASP (IL-6 и IL-8, различные MCP (моноцитарные хемоаттрактантные белки), MIP (макрофагальные воспалительные белки), GM-CSF (гранулоцитарный/макрофагальный

колониестимулирующий фактор) и др.), является индукция и/или усиление воспалительного процесса. На сегодняшний день хроническое воспаление, поддерживаемое сенесцентными клетками, рассматривается как один из наиболее негативных факторов, влияющих на развитие заболеваний, ассоциированных с возрастом, включая остеоартрит, фиброз легких, болезнь Альцгеймера, рак и др. (Campisi et al., 2011; Coppé et al., 2010; Freund et al., 2010; Salminen et al., 2011; Campisi and Robert, 2014; Watanabe et al., 2017). Более того, хроническое воспаление ведет к дисфункции эпидермальных стволовых клеток (Doles et al., 2012), что еще раз подтверждает наличие сложной взаимосвязи между различными ключевыми признаками, усиливающими процесс старения (pez-Otin et al., 2013).

Исходя из подобных представлений, были предприняты попытки селективно удалить из организма трансгенных мышей сенесцентные клетки по маркеру p16, которые действительно привели к отсрочке проявлений возрастных нарушений, в частности саркопении, катаракты, атеросклероза, потери жировой ткани, канцерогенеза (Baker et al., 2011; Baker et al., 2016; Childs et al., 2016). Однако остаются вопросы касательно селективности действия используемого суициального гена и необходимости устраниить все p16-позитивные клетки в организме. (Bracken et al., 2007; Hall et al., 2016). В других экспериментах было показано, что сенесцентные гладкомышечные клетки легочной артерии стимулировали пролиферацию и миграцию соседних гладкомышечных клеток (Noureddine et al., 2011). По крайней мере частично, данные процессы были обусловлены секрецией IL-6, IL-8 и белков внеклеточного матрикса. Было предположено, что наблюдаемый эффект может лежать в основе гипертрофии легочных артерий, опосредованных утолщением интимы, что может приводить к легочной гипертензии у пожилых людей. Стоит также отметить, что хроническое воспаление работает по принципу позитивной обратной связи. Повышение уровня провоспалительных цитокинов активирует лейкоциты, которые produцируют еще больше цитокинов. Таким образом, даже слабые стимулы, постоянно производимые сенесцентными клетками, могут привести к серьезным системным последствиям (Freund et al., 2010).

Помимо воспалительных медиаторов, в патологических изменениях могут участвовать и другие элементы SASP. Эксперименты на трехмерных культурах эпителиальных клеток груди показали, что присутствие сенесцентных фибробластов нарушает морфогенез альвеол и протоков, а также продукцию молочного белка. Авторы связывают полученные результаты с секрецией матриксных металлопротеиназ (ММР), компонентов SASP (Partinello et al., 2005, Tsai et al., 2005, Coppe et al., 2008, Coppe et al., 2010). Введение сенесцентных фибробластов мышам с ослабленным иммунитетом

стимулировало пролиферацию как мышиных, так и человеческих эпителиальных раковых клеток. Вероятно, определяющими факторами в этом процессе были MMP3, способствовавшая инвазии, VEGF, опосредующий ангиогенез, GRO и амфирегулин, усиливающие рост и пролиферацию (Coppe et al., 2010; Coppe et al., 2006, Krtolica et al., 2001, Liu and Hornsby, 2007).

### **Инициаторы клеточного старения**

В настоящее время различают репликативное и стресс-индуцированное клеточное старение. Репликативным старением принято обозначать состояние клеточной культуры, при котором ее пролиферативная активность снижается вплоть до полной остановки делений по достижении лимита Хейфлика, что происходит по причине укорочения теломер. Дисфункцию теломерных участков можно рассматривать как частный случай нестабильности генома. Стресс-индуцированное клеточное старение также вызывает ослабление пролиферации, но в отличие от репликативного может проявиться в любое время в ответ на сублетальные воздействия или активацию онкогенов (Oncogene-induced senescence - OIS), независимо от количества делений.

Многие клетки как *in vivo*, так и *in vitro* активируют сенесцентное состояние при значительных повреждениях ДНК, чаще всего, при двунитевых разрывах (Nakamura et al., 2008). Индуцировать клеточное старение возможно при помощи многих физических или химических цитотоксических воздействий. Особенно сильными индукторами сенесцентного состояния являются ионизирующее излучение и ингибиторы топоизомеразы (Robles et al., 1998; Sedelnikova et al., 2004; Wang et al., 2009). Мощным цитотоксическим и цитостатическим действием обладают препараты, используемые в химиотерапии (Coppe et al., 2008; Novakova et al., 2010). Повреждения ДНК, вызванные окислительным стрессом, также могут индуцировать арест клеточного цикла (Pole et al., 2016). Окислительный стресс может повреждать основания ДНК и/или приводить к однонитевым разрывам. Однако во время репликации или эксцизионной reparации оснований эти повреждения могут быть преобразованы в двунитевые разрывы (Sedelnikova et al., 2010). Интересно, что окислительный стресс также может ускорить укорочение теломер (von Zglinicki, 2002), вероятно, из-за большого содержания гуанина (G), основания, являющегося наиболее уязвимым для активных форм кислорода (АФК) (Campisi, 2013).

Сравнительно небольшие повреждения ДНК приводят к временному аресту клеточного цикла. После успешной reparации клетка снова может начать делиться. Более значительные повреждения, длительно не поддающиеся reparации, приводят к

хронической активации сигнального каскада DDR (DNA damage response), реакции клетки на повреждение генетического материала. Хроническая активация DDR обычно возникает при множественных повреждениях ДНК и приводит к стабильному аресту клеточного цикла, главному признаку сенесцентного состояния (Campisi, 2013).

Таким образом, стабильность генома постоянно подвергается опасности со стороны экзогенных (физических, химических и биологических агентов) и эндогенных факторов (ошибки репликации ДНК, реакции спонтанного гидролиза и АФК) (Hoeijmakers, 2009). Генетические нарушения, возникающие из-за повреждений и несовершенства репарационной системы, могут включать точечные мутации, транслокации, укорочение или удлинение хромосом, укорочение теломер и повреждение функции генов, вызванное инсерциями или делециями последовательностей ДНК, в том числе интеграцией вирусов или транспозонов. Все эти формы перестроек в ДНК могут влиять на основные гены и транскрипционные пути, что приводит к появлению неправляющихся со своими функциями клеток, которые могут подвергать опасности тканевой и организменный гомеостаз, если не удаляются апоптозом или не приобретают сенесцентный фенотип (López-Otín et al., 2013).

Дополнительным фактором, способствующим повреждению генома, может быть нарушение пространственной архитектуры хроматина, что делает ДНК более уязвимой. Среди таких нарушений хорошо известны дефекты ядерной ламины, вызывающие прогериодные синдромы - синдром Хатчинсона-Гилфорда и синдром Нестора-Гильермо (Cabanillas et al., 2011; De Sandre-Giovannoli et al., 2003; Eriksson et al., 2003; Dechat et al., 2008). Белки ламины участвуют в формировании сайтов прикрепления хроматина к ядерной мембране (Gonzalez-Suarez et al., 2009). Интересно, что продукция аберрантной изоформы преламина A (прогерина) выявляются не только при прогериях, но и при нормальном старении человека (Ragnauth et al., 2010; Scaffidi and Misteli, 2006). Дисфункция теломер увеличивает продукцию прогерина в нормальных фибробластах в культуре *in vitro*, что дает основания предположить наличие дополнительных связей между поддержанием длины теломер и экспрессией прогерина при нормальном старении (Cao et al., 2011).

Также значительное влияние на структуру хроматина могут оказывать эпигенетические модификации гистонов и ДНК. Так, повышенное ацетилирование гистона H4K16, trimетилирование H4K20 или H3K4, а также снижение метилирования H3K9 или H3K27 относятся к признакам старения (Fraga and Esteller, 2007; Han and Brunet, 2012; Talens et al., 2012). Некоторые данные указывают, что делеция компонентов комплексов метилирования гистонов или ингибирование гистоновых деметилаз может

увеличивать продолжительность жизни ряда модельных объектов (Greer et al., 2010; Siebold et al., 2010; Jin et al., 2011). Тем не менее, не ясно, обусловлен ли эффект влиянием на репарационные процессы или на изменение транскрипционной активности генов, ассоциированных с сигналингом и метаболизмом (López-Otín et al., 2013). Особое внимание исследователи уделяют белкам сиртуинам, обладающим свойствами гистоновой деацетилазы и монорибозилтрансферазы. Сиртуины влияют на плотность упаковки хроматина, а, следовательно, могут регулировать широкий спектр клеточных процессов, включая транскрипцию, репарацию и обмен веществ (Houtkooper et al., 2012; McHugh and Gil, 2018).

Среди факторов, способных оказывать значительное влияние на процессы сенесценции, выделяют клеточный метаболизм и поддержание протеостаза, качественного и количественного белкового состава (López-Otín et al., 2013; McHugh and Gil, 2018). Ряд исследований показал, что ограничение потребления калорий приводит к значительному снижению проявления признаков, ассоциированных со старением (Mitchell et al., 2016). На молекулярном уровне данный эффект связывают с функционированием белка mTOR и инсулиновым/IGF сигналингом (Selman et al., 2008; Harrison et al., 2009). mTORC1 объединяет несколько сигнальных путей, включая распознавание питательных веществ и ростовые сигналы, а также регулирует синтез белка, липидов, уровень аутофагии и метаболизм (Saxton and Sabatini, 2017). Поступление питательных веществ в клетку активирует mTOR и инсулиновый/IGF сигналинг, что приводит к усилинию процессов роста и деления, но при этом подавляется активность транскрипционного фактора FOXO, участникою в процессах стресс-ответа, репарации ДНК, клеточной смерти, аутофагии и др. Ингибирование аутофагии, в свою очередь, способствует нарушению протеостаза. При старении наблюдается усиление аутофагических процессов, а ингибирование аутофагии может приводить к активации сенесцентного состояния из-за нарушений метаболизма и накопления поврежденных белков (Herranz et al., 2015; Laberge et al., 2015; Narita et al., 2011; García-Prat et al., 2016).

### **Механистические теории старения**

Главные задачи биологии старения - выяснение первичных механизмов старения организмов, а также изучение факторов, влияющих на продолжительность жизни. На сегодняшний день существует более 300 различных теорий, пытающихся объяснить механизмы старения и с точки зрения эволюции, и с точки зрения индивида (Yin, Chen, 2005; Анисимов, 2008). Изучение старения отдельного организма предполагает раскрытие конкретных механизмов, определяющих возрастную деградацию функциональности

органов и тканей. Наибольшее внимание в этом случае уделяется клеточному уровню, т.е. рассматривается клеточное старение, т.к. именно клетка представляет собой элементарную структурно-функциональную единицу живого организма. В настоящее время наиболее обсуждаемыми являются 2 теории о механизмах старения: теломерная и окислительная (свободнорадикальная).

### *Теломерная теория*

В 1961 году клеточное старение впервые было описано как прогрессивная и необратимая потеря пролиферативного потенциала соматических клеток человека. Показано, что даже в идеальных условиях культивирования фибробласты эмбриона человека способны делиться только ограниченное число раз ( $50 \pm 10$ ) (Hayflick and Moorhead, 1961). Феномен получил название по имени автора "лимит Хейфлика". Объяснение этого явления предложил А.М. Оловников в 1971 г. (Оловников, 1971), используя данные о принципах синтеза ДНК в клетках. Согласно его гипотезе при каждом клеточном делении хромосомы немного укорачиваются из-за недорепликации теломерного участка ДНК. Теломеры человека представляют собой концевые участки хромосом, которые содержат от 4 до 15 тысяч пар оснований и состоят из повторяющихся последовательностей TTAGGG. Дело в том, что ДНК-полимераза неспособна синтезировать дочернюю копию ДНК с самого конца цепи – она может лишь добавлять нуклеотиды к уже имеющейся 3'-гидроксильной группе, т.е. нуждается в РНК-праймере (рис. 6). После удаления последнего праймера на 3'-конце дочерняя цепь неизбежно окажется короче, что приведет к постепенной потере участка теломеры в процессе последовательных циклов синтеза ДНК (Victorelli and Passos, 2017). Соответственно, должен существовать механизм, поддерживающий длину теломер в половых клетках. В 1985 году был обнаружен фермент теломераза, позволяющий достраивать теломерные участки (Greider and Blackburn, 1985). Позже подтверждено, что эктопическая экспрессия данного фермента противодействует укорочению теломер, вызванному делением клеток, и позволяет преодолеть лимит Хейфлика, препятствует клеточному старению (Bodnar et al., 1998). На сегодняшний день хорошо известно, что активная теломераза является важным элементом раковых клеток, позволяя им делиться потенциально бесконечное количество раз. Ярким примером являются клетки линии HeLa, полученные в 1951 году и культивируемые во многих лабораториях мира по сей день. За несколько десятилетий они в значительной степени адаптировались к условиям *in vitro*, достигнув поразительной скорости пролиферации даже в сравнении с другими раковыми клетками.

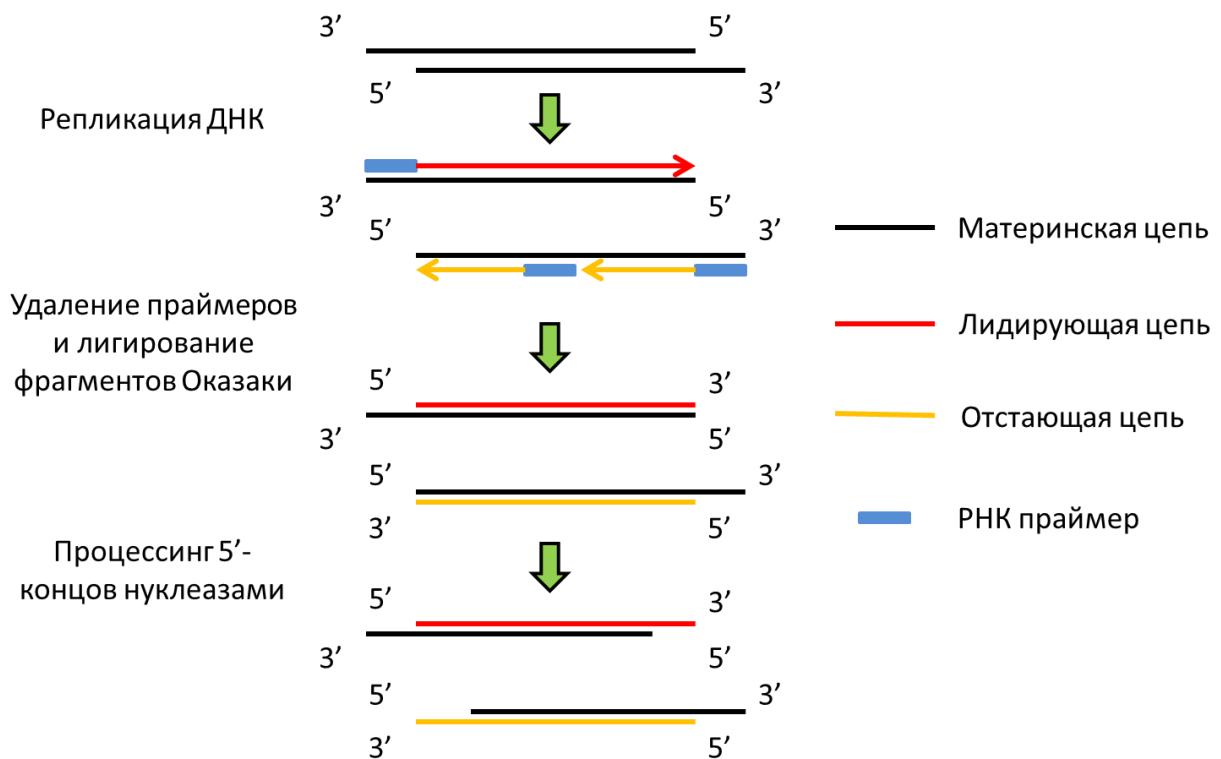


Рисунок 6. Схема укорочения теломер

Теломеры связаны с рядом белков, которые образуют комплекс известный как «Шелтерин» (рис. 7). Считается, что данный комплекс стабилизирует теломерную петлю (t-петлю), препятствуя слипанию и повреждению концов хромосом (de Lange, 2005). С постепенной потерей повторов теломер белки «Шелтерина» могут быть смешены из теломерного участка, дестабилизируя конформацию t-петли (Griffith et al., 1999) и высвобождая конец хромосомы. Подобное нарушение распознается механизмом reparации ДНК как двунитевой разрыв. Показано, что делеция TRF2 (telomeric repeat binding factor 2), компонента Шелтерина, в клетках человека приводит к активации и рекрутированию белков, вовлеченных в осуществление реакции на повреждение ДНК (DDR), таких как 53BP1 (p53-binding protein 1), комплекс Mre11 (meiotic recombination 11) и фосфорилированные формы ATM, γH2AX и Rad17 (Takai et al., 2003). Аналогичным образом делеция Pot1a (protection of telomeres 1), еще одного компонента шелтерина, у мышей приводит к активации DDR в областях теломер и формированию сенесцентного фенотипа (Wu et al., 2006). На модели репликативного старения фибробластов человека показано накопление белков, участвующих в DDR, включая γH2AX, 53BP1, MDC1 и NBS1, в области теломер (d'Adda di Fagagna et al., 2003; Victorelli and Passos, 2017).

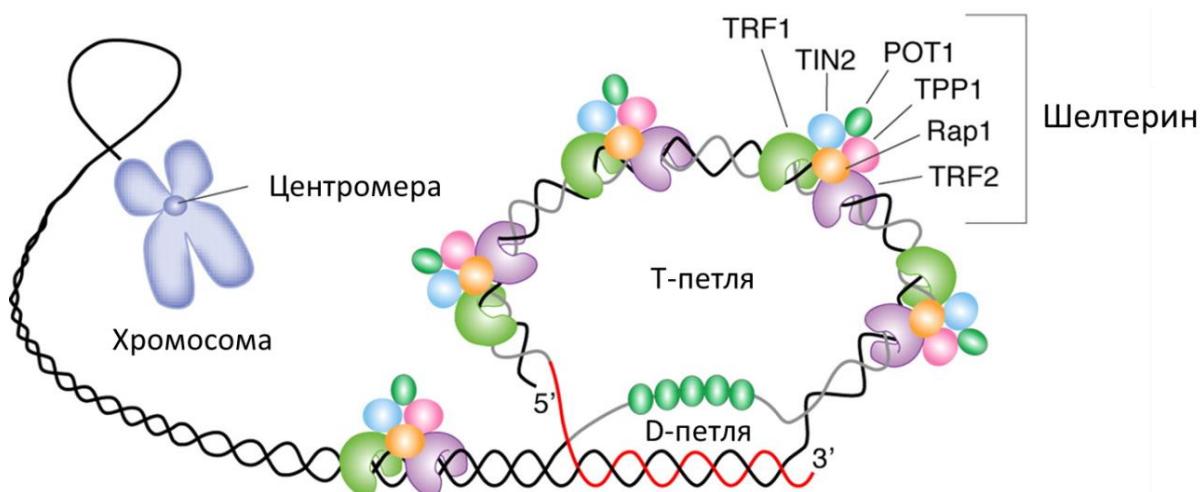


Рисунок 7. Структура теломер (адаптировано из Calado and Young, 2008).

Активация ATM киназы, одного из эффекторов DDR, запускает сигнальные каскады, приводящие к аресту клеточного цикла (Bakkenist, Kastan, 2004; Zhan et al., 2010). Киназа pATM фосфорилирует Chk2 (Checkpoint kinase 2), которая может транслоцироваться в ядро и активировать свои мишени. Chk2 является компонентом сигнального пути, приводящего к остановке клеточного цикла преимущественно в фазе G1 в ответ на повреждение ДНК. (Buscemi et al., 2004; Lukas et al., 2003). Активированная Chk2 способна фосфорилировать p53, который может напрямую фосфорилироваться и киназой ATM (von Zglinicki et al., 2005; Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007). Таким образом, DDR может привести к активации транскрипционного фактора p53, который участвует во многих процессах, включая восстановление ДНК, остановку клеточного цикла и апоптоз. Данный белок является положительным регулятором транскрипции p21 (CDKN1A), ингибитора циклин-зависимой киназы 1A, который участвует в аресте клеточного цикла, наблюдавшемся во время старения как *in vitro*, так и *in vivo*. Делеция p21 улучшает регенеративные возможности кишечных крипт и гемопоэтических стволовых клеток у мышей с недостаточностью теломеразы, имеющих укороченные теломеры и фенотип ускоренного старения (Choudhury et al., 2007).

Помимо пути p53/p21, p16/Rb также является важным эффекторным путем клеточного старения. Однако связь между теломерными нарушениями и активацией p16 менее ясная. В частности, известно, что p16 активируется независимо от нарушения структуры концевых участков хромосом в фибробластах человека (Herbig et al., 2004). Однако в более позднем исследовании сообщалось, что делеция p16 у мышей, имеющих нарушенную структуру теломер, приводила к увеличению пролиферативной способности эмбриональных фибробластов (Zhang et al., 2012). Было показано, что делеция TRF2

индуцирует активацию p16 (Jacobs and de Lange, 2004). Однако дефицит p16 в этих клетках лишь частично отменял арест клеточного цикла, вызванного нарушением структуры теломер. Только когда и p16, и p53 ингибирировали одновременно, наблюдалось полное восстановление пролиферации. Таким образом, можно предположить, что p16 может действовать как вторичный механизм (помимо пути p53/p21), опосредующий арест цикла при теломерных нарушениях (Beausejour et al., 2003; Jacobs and de Lange, 2004; Victorelli and Passos, 2017).

Оба ингибитора - p21 и p16, подавляя активность соответствующих циклин-зависимых киназ, приводят к гипофосфорилированию белка ретинобластомы (Rb) (McConnell et al., 1999; Sherr and Roberts, 1999). Гипофосфорилированная Rb способна связывать транскрипционные факторы семейства E2F, регулирующие клеточный цикл (Sherr and McCormick, 2002). Путем обратимого связывания и, как следствие, функциональной инактивации белков E2F, Rb контролирует экспрессию генов, продукты которых являются важными участниками регуляции клеточного цикла, и блокирует переход клеток из G1 в S фазу. При этом путь p53/p21 активируется первым, предотвращая пролиферацию клеток с серьезными повреждениями ДНК, тогда как p16/Rb путь вовлекается несколько позднее (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). Однако в зависимости от клеточного контекста предпочтение может быть отдано тому или другому пути. Так, для культур эпителиальных клеток ингибирование пролиферации является следствием повышенной экспрессии p16 (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007).

Существует несколько доказательств того, что теломеры могут играть важную роль в процессах старения. В частности, частота нарушений структуры теломер, оцениваемая по ассоциации между белками DDR и теломерными участками, увеличивается с возрастом *in vivo* в коже приматов (Herbig et al., 2006), а также в печени, кишечнике и легких мышей (Hewitt et al., 2012; Birch et al., 2015). Нокаутные мыши с гомозиготной делецией РНК-компонента теломеразы характеризуются укороченными теломерами и ускоренным старением (Blasco et al., 1997; Lee et al., 1998). Показано, что у таких животных нарушается функция стволовых клеток, регенерация органов и снижается продолжительности жизни (Wong et al., 2003). Кроме того, восстановление активности теломеразы может уменьшить фенотипические проявления признаков преждевременного старения, наблюдаемые в селезенке, кишечнике и семенниках (Jaskelioff et al., 2011).

#### *Свободно-радикальная теория*

Другой наиболее плодотворно развивающейся теорией является свободно-радикальная теория старения (Harman, 1956). Согласно ее положениям старение является результатом случайного повреждения тканей АФК, главным образом (до 90% всех

внутриклеточных АФК), производимыми митохондриальной электрон-транспортной цепью (ЭТЦ) клетки при дыхании (Quinlan et al., 2013; Pole et al., 2016). АФК представляют собой высокореактивные радикалы, которые способны повреждать клеточные макромолекулы (белки, липиды, ДНК). Вместе с тем они являются участниками некоторых внутриклеточных сигнальных каскадов, в частности, уровень АФК и концентрация ионов кальция взаимно регулируются друг другом, оказывая значительное влияние на множество процессов, включая рост и клеточную гибель (Görlach et al., 2015). Данная теория объясняет не только причины старения, заключающиеся в накоплении окислительных повреждений макромолекул, но и ряд заболеваний, ассоциированных со старением. Некоторые данные указывают на наличие корреляции между низким уровнем АФК и увеличением продолжительности жизни организма (Ristow and Schmeisser, 2011; Pole et al., 2016).

К АФК относят как свободные радикалы кислорода, включая супероксид-анион ( $O_2^-$ ) и гидроксильный радикал ( $OH^-$ ), так и нерадикальные производные вроде относительно стабильной перекиси водорода ( $H_2O_2$ ). Супероксидные радикалы реагируют с образованием других АФК, а именно перекиси водорода и гидроксильных радикалов, а также могут переходить в активные формы азота и обратно. Активные формы азота могут оказывать схожие с АФК эффекты (Hirst and Robson, 2011). АФК генерируются в процессе клеточного дыхания во всех клетках, как неизбежное следствие аэробной жизни. 95-98% поступающего в клетку  $O_2$  расходуется на выработку энергии и окислительный метаболизм субстратов, а 2-5%  $O_2$  переходит в АФК (Cheeseman, Slater, 1993). При образовании свободных радикалов донорами электронов являются металлы с переменной валентностью (Fe, Cu и другие), которые входят в состав ряда ферментов (Cheeseman, Slater, 1993; Донцов и др., 2006; Pole et al., 2016).

Как правило, линейное увеличение уровня АФК вызывают нелинейную клеточную реакцию (Phaniendra et al., 2015). Для предотвращения повреждений высокими концентрациями АФК в клетке функционирует антиоксидантная система, представляющая собой комплекс тонко организованных компонентов, состоящий из ряда ферментов и низкомолекулярных веществ. Эндогенные антиоксиданты, такие как ферменты каталаза, глутатионредуктаза и супероксиддисмутаза (Bresciani et al., 2015) вместе с экзогенными антиоксидантами в виде восстановленного глутатиона (Pompella et al., 2015), каротиноидов и витаминов С и Е составляют систему детоксикации АФК. Возникновение дисбаланса между АФК и антиоксидантами происходит, в большинстве случаев, в пользу окислителей. При этом уровень АФК возрастает от физиологического до потенциально опасного, что называют окислительным стрессом. Повышенная экспрессия

молекул каталазы и пероксиредоксина-1 рассматривается как маркеры окислительного стресса (Halliwell, 2012; Rahal et al., 2014; Ginter et al., 2016; Davalli et., 2016).

При взаимодействии АФК с биологическими молекулами образуются гидропероксиды ДНК, белков и липидов. В остатках полиненасыщенных жирных кислот АФК вызывают перекисное окисление липидов (ПОЛ) - цепные реакции с образованием липидных радикалов ( $L^*$ ), пероксилов ( $LOO^*$ ), гидропероксилов ( $LOOH$ ) и алкоксилов ( $LO^*$ ). Окисление носит свободнорадикальный, цепной самоускоряющийся характер. Выделяют 4 стадии процесса: инициация, продолжение цепи, разветвление, обрыв цепи (Владимиров, 1987; Донцов и др., 2006). При инициации цепи в слое биологических мембран образуются липидные радикалы ( $L^*$ ), которые вступают в реакцию с растворенным в среде молекулярным кислородом, образуя новый свободный радикал – радикал липоперекиси ( $LOO^*$ ). Радикал  $LOO^*$  атакует одну из соседних молекул фосфолипида с образованием гидроперекиси липида  $LOOH$  и нового радикала  $L^*$ . Цепная реакция перекисного окисления липидов представляет собой чередование этих двух реакций. Существенное ускорение пероксидации липидов наблюдается в присутствии  $Fe^{2+}$ . В этом случае происходит разветвление цепей в результате взаимодействия  $Fe^{2+}$  с гидроперекисями липидов. Цепь обрывается в результате взаимодействия свободных радикалов с антиоксидантами, ионами металлов переменной валентности ( $Fe^{2+}$ ) или друг с другом.

Ускорение процессов ПОЛ является одной из причин дестабилизации мембран. Образование диеновых коньюгатов, гидроксильных радикалов, гидроперекисей липидов вызывают конформационные изменения в комплексе фосфолипидов, что приводит к нарушению функций органоидов клеток.

#### *Митохондриальная теория старения*

Некоторые исследователи полагают, что повышенный уровень митохондриальных мутаций способствует старению и прогрессии возрастных заболеваний (Linnane et al., 1989), другие сомневаются в том, что количество мутаций может достигать достаточного уровня для влияния на процессы старения (Krapko and Vijg , 2009). Поскольку в клетке содержится от сотен до тысяч копий мтДНК, обнаружение мутации не подразумевает дисфункцию. Считается, что мутационная нагрузка должна превышать пороговое значение (более 60% всех митохондрий внутри ткани) для заметного влияния на фенотип (Rossignol et al., 2003; Sun et al. 2016). Для выявления связи между мутациями в мтДНК и старением были проведены исследования на мышах с измененным геном ДНК-полимеразы  $POLG\gamma$ . Этот ген расположен в ядерной ДНК, а его продукт является единственной митохондриальной ДНК-полимеразой. Внесенная мутация в положение

аминокислоты 257 (D257A) нарушала коррекционную активность фермента, но сохраняла нормальную функциональность полимеразы. Согласно полученным результатам, гомозиготные по данному ферменту мыши накапливали значительный уровень митохондриальных мутаций и проявляли фенотип ускоренного старения (Kijoth et al., 2005; Trifunovic et al., 2004). Таким образом, данная модель четко связала накопление митохондриальных мутаций со старением.

В то время как старение сопровождается общим снижением митохондриальной функции во всех тканях, для разных типов клеток данный процесс может быть неодинаково критичным. Поскольку считается, что снижение функции взрослых стволовых клеток способствует различным аспектам старения (Lopez-Otin et al., 2013), роль митохондриальной дисфункции в их биологии стала предметом повышенного интереса. Одной из наиболее хорошо изученных популяций стволовых клеток являются гемопоэтические стволовые клетки (ГСК). В биоэнергетическом профиле ГСК митохондрии играют относительно небольшую роль, что, вероятно, связано с особенностями тканевой ниши. Основным источником АТФ при этом является гликолиз. Предполагается, что данный сдвиг в процессе продукции АТФ может способствовать минимизации повреждений от митохондриальных АФК в долгосрочной перспективе (Suda et al., 2011; Sun et al., 2016).

Стволовые клетки могут обладать специальными механизмами, противодействующими накоплению дисфункциональных митохондрий. Некоторые данные свидетельствуют о том, что районы мозга, обогащенные нейрональными стволовыми клетками, вероятно, обладают повышенной митофагической активностью (Sun et al., 2015). Другой потенциальный механизм заключается в способности стволовых клеток взрослого организма к ассиметричной сегрегации митохондрий при делении, что было обнаружено в экспериментах *in vitro*. Одна из клеток получает более молодые и неповрежденные органеллы, другая после деления содержит относительно большее количество дисфункциональных митохондрий (рис. 8). При этом первые значительно лучше сохраняют свои стволовые свойства (Katajisto et al., 2015). Это неравное распределение митохондрий свойственно только стволовоподобным клеткам и не наблюдается в дифференцированных культурах. Интересно, что неравная сегрегация показана для митохондрий, но не для других органелл, таких как лизосомы и рибосомы (Katajisto et al., 2015). В настоящее время не ясно, присутствует ли это свойство *in vivo*, и если да, то присутствует ли оно во всех или только в некоторых типах стволовых клеток. Стоит отметить, что у дрожжей с ассиметричным делением также происходит неравное наследование митохондрий и поврежденных белков (McFaline-Figueroa et al., 2011; Clay et

al., 2014; Sun et al., 2016). Таким образом, получаемые экспериментальные данные, в целом, согласуются с предположениями митохондриальной теории старения о накоплении достаточного количества поврежденных митохондрий для проявления эффекта на уровне фенотипа.

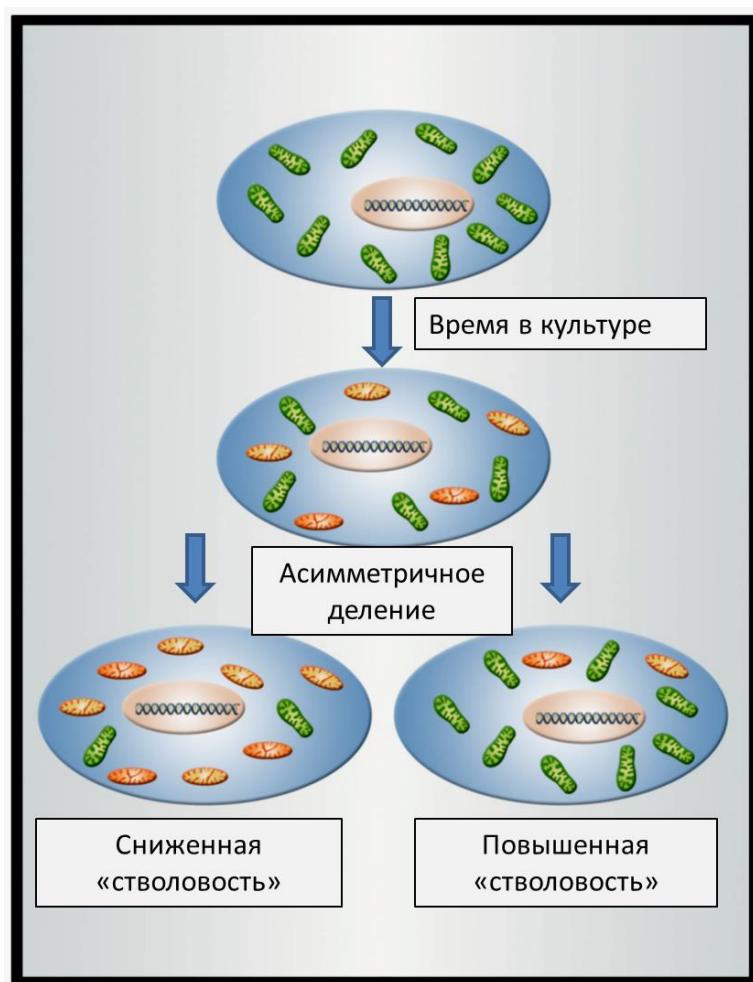


Рисунок 8. Асимметричная сегрегация митохондрий между дочерними клетками  
(Sun et al., 2016)

#### *Свободно-радикальная митохондриальная теория*

Митохондриальная теория тесно переплетается со свободно-радикальной теорией старения, основываясь на том, что наиболее значимым источником АФК *in vivo* является супeroxидный радикал, синтезирующийся как побочный продукт нормального процесса окислительного фосфорилирования. Таким образом, митохондрии могут быть ближайшей и, поэтому, основной мишенью АФК (Linnane et al., 1989; Gruber et al., 2008). Это утверждение дало начало митохондриальной свободнорадикальной теории старения.

Воздействие АФК на ДНК, в том числе на мтДНК, способствует формированию продуктов окислительного повреждения оснований ДНК, таких как 8-гидрокси-2'-

диоксигуанозин (8OHdG), а также может приводить к разрыву цепей (Gruber et al., 2008). Некоторые из таких повреждений ДНК мутагенны, например, 8-гидроксигуанин может вступить в комплементарное взаимодействие с аденином вместо цитозина, что часто приводит к появлению трансверсий (замен пуриновых оснований в ДНК на пиримидиновые и наоборот) GC на TA (Kamiya et al., 1992; Neeley et al., 2006). С другой стороны, окислительное повреждение цитозина чаще приводит к транзициям (простым заменам одного пуринового или пиримидинового основания ДНК на соответствующее другое основание) GC на AT (Kreutzer and Essigmann, 1998). В целом, транзиции GC на AT и трансверсии GC на TA являются наиболее часто встречающимися мутациями, вызываемыми окислительным стрессом (Wang et al., 1998). Стоит отметить, что некоторые компоненты митохондриальной цепи переноса электронов закодированы в mtДНК (Gruber et al., 2008). Таким образом, можно предположить, что повышенный уровень мутаций mtДНК еще больше увеличивает количество АФК, тем самым способствуя дальнейшему накоплению мутаций посредством нарушения целостности цепи переноса электронов. Этот механизм, в котором небольшое количество исходных повреждений может запустить экспоненциальный рост числа новых повреждений, создает механизм положительной обратной связи (Gruber et al., 2008).

Были проведены эксперименты с нейрональными стволовыми клетками, полученными от описанных выше мышей с мутантным вариантом POLG. Показано, что возникновение клеточных дефектов может быть частично нивелировано при введении антиоксиданта N-ацетилцистеина (Ahlqvist et al., 2012). Последующие исследования продемонстрировали, что клетки с мутантным POLG хуже поддаются перепрограммированию в плюрипотентное состояние. Данный факт авторы также связали с повышенной продукцией митохондриальных АФК (Hamalainen et al., 2015). Тем не менее, несмотря на позитивные эффекты по увеличению продолжительности жизни модельных животных вследствие подавления митохондриальных АФК (Schriner et al., 2005), ряд исследований не обнаруживает связи АФК и продолжительности жизни (Sanz et al., 2010; Yang et al., 2007). Более того, в некоторых случаях повышение уровня свободных радикалов может даже увеличивать продолжительность жизни (Yang and Hekimi, 2010; Zarse et al., 2012; Sun et al., 2016). Таким образом, вследствие сложности клеточных систем и недостаточного совершенства методологических подходов роль митохондрий и АФК в процессах старения по-прежнему остается не вполне ясной.

## Положительные эффекты клеточного старения

Как уже было отмечено, клеточное старение принято относить к антагонистическим признакам, которые имеют как отрицательные, так и положительные стороны. Хорошо известно, что активация сенесцентного состояния является важнейшим барьером на пути опухолеобразования. Неконтролируемое деление опухолевых клеток и неспособность к делению сенесцентных клеток представляются противоположными следствиями одних и тех же причин, а именно накопления повреждений в генетическом материале (Collado et al., 2007; Hanahan and Weinberg, 2011). Более того, клеточное старение в контексте супрессии канцерогенеза у млекопитающих представляется даже более важным процессом, чем различные формы клеточной гибели. Так, мыши с нарушениями апоптоза гораздо меньше предрасположены к раку, чем мыши с нарушениями процессов сенесценции. Хорошо известно, что потеря даже одной функционально активной копии p53 или p16 приводит к многократному увеличению частоты опухолеобразования (Sharpless et al., 2001; He and Sharpless, 2017). Введение дополнительных копий данных генов, напротив, повышает устойчивость к раку (Garcia-Cao et al., 2002; Matheu et al., 2004). Полногеномный анализ показал, что потеря функции p16 и/или p53 является наиболее распространенным генетическим событием в раковых клетках человека. Возможно, все виды рака связаны с нарушениями клеточного старения (Beroukhim et al., 2010; Kandoth et al., 2013). Даже в случае белка p53, участвующего и в процессах апоптоза, и в процессах старения, его способность предотвращать рак преимущественно зависит от активности, ассоциированной с сенесценцией (Brady et al., 2011; He and Sharpless, 2017).

Переход в сенесцентное состояние имеет некоторые преимущества перед апоптозом в контексте судьбы поврежденных клеток. Бывают случаи, когда сохранить неделяющиеся, но функционально активные, клетки лучше, чем полностью их элиминировать. Апоптоз уменьшает клonalное разнообразие, что нежелательно в ситуациях, когда оно имеет большое значение для поддержания нормальной физиологии. Ярким примером может быть сохранение сенесцентных Т-клеток памяти, которые несут информацию о давних инфекциях (Akbar and Henson, 2011). Такие случаи стоит учитывать при разработке сенолитических подходов (методов направленных на элиминацию сенесцентных клеток). Стоит также отметить, что размножение некоторых вирусов зависит от пролиферации клеток-хозяев. С этой точки зрения клеточное старение можно рассматривать как механизм антивирусной защиты (Reddel, 2010; Baz-Martínez et al., 2016).

Другим положительным примером может служить необходимость активации сенесцентного состояния для нормального развития эмбриона. Так, клетки с признаками старения были обнаружены в ряде транзиторных анатомических структур в эмбриогенезе, указывая на их роль для нормального протекания органогенеза. Такие клетки обладают сниженной пролиферативной активностью, экспрессируют  $\beta$ -галактозидазу, ассоциированную со старением (SA- $\beta$ -gal), но ДНК в них не повреждена. Также отсутствует активация p53 и p16 каскадов и продукция провоспалительных цитокинов. Такое эмбриональное старение запускается паракринными сигналами и опосредуется экспрессией ингибитора клеточного цикла p21 (Muñoz-Espín et al., 2013; Storer et al., 2013).

Значительное усиление экспрессии p16 (с пиковыми значениями на 4-7 день) было обнаружено в области ранения у взрослых животных (Demaria et al., 2014). Также увеличивалась активность NF-кВ и продукция SASP, что, вероятно, имело значение для нормального заживления раны. Удаление p16+ клеток из области повреждения приводило к нарушению регенеративных процессов. При ранении сенесцентные фибробласты и эндотелиальные клетки могут ускорять reparативные процессы путем индукции дифференцировки миофибробластов посредством секреции тромбоцитарного фактора роста AA (PDGF-AA) (Baker et al., 2016; Demaria et al., 2014). Парадокс состоит в том, что при старении способность к заживлению ран снижается. Таким образом, сенесцентные клетки могут оказывать благоприятное воздействие только при их временном, а не постоянном, присутствии в ткани (Campisi, 2013).

### **Старение МСК**

МСК, как и другие первичные неиммортализованные культуры, не могут поддерживаться *in vitro* бесконечно из-за клеточного старения. Несмотря на их распространенность в организме, для целей регенеративной медицины часто нужны сотни миллионов клеток. Выделить такое количество из тканей пациента не представляется возможным. Поэтому протоколы клеточной терапии предполагают увеличение клеточной биомассы *in vitro*. Иногда в случае получения аутологичных клеток процедура может затягиваться на 10 недель. Стоит отметить, что индивидуальные особенности пациента (клиническая история, возраст, генетика и др.) могут значительно повлиять на скорость прироста культуры и качество конечного клеточного продукта (Sotiropoulou et al., 2006; Duggal and Brinchmann., 2011). В частности, некоторые исследования указывают на сниженную эффективность «старых» культур МСК (Baker et al., 2015), что согласуется с рассмотренными выше данными о клеточном старении и его эффектах, оказываемых на старение организма. Длительное поддержание культуры, необходимое для получения

достаточного количества клеточного материала, может приводить к постепенной модификации свойств МСК, включая клеточное старение (Wang, Han, Song et al., 2012). Таким образом, важно постоянно контролировать предназначенную для медицинского применения культуру, выявляя возникающие изменения. Стоит учитывать риски, возникающие вследствие, в том числе, клеточного старения, которое может повлиять на терапевтический потенциал через модификацию паракринной, иммуномодуляторной, ангиогенной, дифференцировочной, миграционной и др. активностей МСК (Wang, Han, Song et al., 2012).

Старение МСК, в основном, характеризуется уменьшением потенциала к дифференцировке. При этом наблюдается смещение баланса между остеогенным и адипогенным направлениями, хотя сторона сдвига по-прежнему вызывает споры. Некоторые авторы указывают на снижение остеогенного потенциала (Banfi et al., 2000; Kim et al., 2012; Despars et al., 2013), другие сообщают о его сохранении или увеличении (Bruder et al., 1997; Digirolamo et al., 1999; Wagner et al., 2008). По изменениям адипогенного потенциала исследователи достигли больше взаимопонимания. Несмотря на широкий спектр полученных результатов, большинство ученых сходятся во мнении, что адипогенный потенциал снижается при длительном пассивировании в стандартных условиях культивирования (Li et al., 2017).

Недавние исследования иммуномодуляторной активности сенесцентных МСК, полученных при помощи радиационного воздействия, показали снижение защитного регуляторного потенциала на модели сепсиса у мышей (Sepulveda et al., 2014). С одной стороны, сенесцентные МСК сохраняли способность регулировать воспалительную реакцию макрофагов *in vitro* и частично продолжали ингибировать пролиферацию лимфоцитов. С другой стороны, их миграционная активность в ответ на провоспалительные стимулы снижалась, что, вероятно, связано с ингибированием AP-1-сигналинга. Стоит напомнить, что многие из компонентов SASP, секretируемых, в том числе, сенесцентными МСК, связаны с иммунными процессами. Так, IL-8 является хемоаттрактантом нейтрофилов и других гранулоцитов (Baggiolini and Clark-Lewis, 1992), а также мощным индуктором ангиогенеза (Li et al., 2003). VCAM1 опосредует адгезию лейкоцитов и эндотелия, а повышенный уровень циркулирующей растворимой формы связан с системными воспалительными заболеваниями, таким как системная красная волчанка и ишемическая болезнь сердца (Blankenberg et al., 2001). Наконец, MCP1 (CCL2) является хемоаттрактантом для моноцитов и базофилов и играет важную роль в ряде воспалительных заболеваний, таких как рассеянный склероз (Tanuma et al., 2006) и воспалительное заболевание кишечника (Spoettl et al., 2006). Эти данные полностью

подтверждают идею о том, что введение МСК *in vivo* может усугубить воспалительную реакцию на системном уровне и мешать противовоспалительному эффекту этих клеток, показанному *in vitro*. Понимание физиологических и патологических факторов, влияющих на иммуномодуляторную активность МСК, имеет большое значение как для аутоиммунных/воспалительных заболеваний, так и для дегенеративных патологий. Как уже было отмечено регенеративные способности трансплантированных МСК в поврежденных тканях, в частности, при инфаркте миокарда, главным образом являются следствием их паракринной активности, а не специфической дифференцировки (Gallina et al., 2015; Liang, Ding, Zhang et al., 2014).

С другой стороны, известно, что МСК могут способствовать опухолеобразованию (Klopp et al., 2011). Дополнительные исследования показали усиление их канцерогенного влияния при старении через повышение пролиферации и миграции опухолевых клеток. (Li et al., 2015; Di et al., 2014, Skolekova et al., 2016; Minieri et al., 2015). Помимо этого, сенесцентные МСК, секрецирующие большое количество IL-6 и IL-8, повышают резистентность клеток рака молочной железы к цисплатину и способствуют увеличению объема опухоли *in vivo* (Skolekova et al., 2016). Значимость IL-6 в опухолеобразовании подтверждают и другие работы. В частности, секреция данного цитокина стимулирует пролиферацию и миграцию клеток рака молочной железы *in vitro* и *in vivo* (Di et al., 2014). Оценка экспрессии генов сенесцентных МСК показала увеличение количества транскриптов и других секреируемых факторов, многие из которых обладают провоспалительным действием, включая GRO1, MCP-2, RANTES, GM-CSF, металлопротеаза MMP3, ICAM-1 (Minieri et al., 2015; Turinetto et al., 2016). В целом, эти данные свидетельствуют о том, что SASP модифицирует паракринную коммуникацию между МСК и их физиологическим / патологическим микроокружением.

При этом, стоит отметить, что в зависимости от тканевого источника клеток и способа индукции сенесцентного состояния состав секретома может значительно варьировать. Более того, МСК полученные из разных тканей могут с разной чувствительностью реагировать на стрессовые индукторы, что можно обнаружить с помощью анализа на SA- $\beta$ -gal (Özcan et al., 2016). Сравнение культур, выделенных из костного мозга (кмМСК) и пуповинной крови (пкМСК) выявило значительные различия на модели репликативного старения. В частности, пкМСК культивировали до 28 пассажа, в то время как кмМСК полностью исчерпали способность к пролиферации уже к 13 пассажу. Также, были обнаружены значительные различия в экспрессии генов, ассоциированных со старением и дифференцировкой (Cheng et al., 2011).

Для использования МСК в медицине необходимо разработать методы, которые позволяют получать большие объемы клеточного материала, сохраняя их первоначальные свойства. На сегодняшний день существует несколько потенциальных подходов поддержания или повышения терапевтической эффективности путем регулирования конкретных факторов, способных повлиять на характеристики МСК, в том числе на старение. Один из подходов - введение hTERT, гена теломеразы. Метод позволяет увеличить срок жизни культуры при сохранении нормального кариотипа и дифференцировочной активности (Takeuchi et al., 2007; Simonsen et al., 2002). Также, было предложено несколько небольших молекулярных соединений, таких как аспирин, витамин С и цитокин FGF-2 для активации эндогенной теломеразы (Wei et al., 2012). Однако подобный метод не рекомендуется для клинических применений из-за риска злокачественной трансформации.

Второй подход – использование антиоксидантов или ингибиторов некоторых сигнальных путей. N-ацетил-L-цистеин (NAC), предшественник глутатиона, или другие антиоксиданты можно применять в качестве терапевтического агента для устраниния АФК и снижения их повреждающего эффекта на клетку (Lin et al., 2005). Другие антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота и ингибиторы p38 / МАРК или mTOR, также могут способствовать нивелированию влияния АФК (Choi et al., 2008; Li et al., 2017). Модификация условий культивирования, в частности, изменение уровня кислорода может привести к сходным эффектам (Fehrer et al., 2007; Jin et al., 2010; Turinotto et al., 2016; Choi et al., 2015).

Третий подход - генетическая инженерия. Нокдаун p16INK4a / CDKN2A или «молчание» RB в МСК супрессирует проявление сенесцентного фенотипа и увеличивает скорость пролиферации (Galderisi et al., 2006 Gharibi et al., 2014; Okada et al., 2016). Однако методика влияет на дифференцировочный потенциал и увеличивает риск возникновения опухоли.

Четвертый подход – селективное использование факторов роста для поддержания пролиферативного и дифференцировочного потенциала МСК. Известно что, применение экзогенных FGF-2, PDGF и EGF увеличивает способность к пролиферации и задерживает старение клеток, не влияя на остеогенез и адипогенез (Gharibi and Hughes, 2012).

Таким образом, проводимые исследования демонстрируют многообещающие результаты в контексте терапевтического использования МСК в регенеративной медицине. Однако длительное культивирование *in vitro* может приводить к клеточному старению и значительной модуляции свойств клеток. Пролиферативная и функциональная активность МСК снижается в процессе старения, что препятствует получению

достаточного количества клеток для клинического применения. Модификация методологии культивирования, более глубокое понимание фундаментальных механизмов клеточного старения и знания о тканеспецифичных свойствах МСК позволит в значительной степени продвинуться на пути применения стволовых клеток взрослого организма в регенеративной медицине.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Химические реагенты

В работе были использованы следующие реагенты и культуральные среды: раствор 0,05% трипсин-ЭДТА (Gibco, США); раствор антибиотиков, содержащий 5000 ед/мл пенициллина и 5000 мкг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия); диметилсульфоксид (ДМСО) (ПанЭко); набор для определения жизнеспособности клеток ANNEXIN V-FITC Kit (Beckman Coulter, США); йодида пропидия (PI) (Sigma, США); РНКаза А (Sigma); фосфатно-солевой буфер (PBS) (ПанЭко); среды культивирования  $\alpha$ -MEM (Gibco, США); эмбриональная (фетальная) телячья сыворотка (ФТС) (HyClone, США); коллагеназа IA (Sigma); Adipogenesis kit (Millipore, США); индометацин (Sigma); дексаметазон (Sigma); Osteogenesis kit (Millipore); параформальдегид (Merck, Германия); ализариновый красный (Millipore, США); масляный красный О (Millipore); Senescence Cells Histochemical Staining Kit (Sigma); метанол (Merck, Германия); кристалл-виолет (Sigma); фенол (ТОО Компонент, Россия); хлороформ (ТОО Компонент, Россия); этанол (ТОО Компонент, Россия); изопропанол (ТОО Компонент, Россия); QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, США); набор реагентов для синтеза кДНК на основе мРНК QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, США); набор для проведения количественной ПЦР RT<sup>2</sup> - Real Time SYBR Green/ROX PCR master mix (Qiagen, США); «Набор реактивов для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green 1» (Синтол, Россия); флуоресцентные зонды: MitoTracker Red FM (Molecular probes, США), Lysotracker Green DND26 (Molecular Probes), H2DCFDA (Molecular Probes), MitoTracker Red CMXRos (Molecular Probes), Image-iT Lipid Peroxidation Sensor (Molecular Probes), MitoSOX Red (Molecular Probes); набор для определения уровня экспрессии 84 генов, ассоциированных с гипоксией RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Human Hypoxia Signaling Pathway (Qiagen, США) и набор для определения уровня экспрессии 84 генов, ассоциированных со старением RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Human Cellular Senescence (Qiagen, США), оптимизированные для количественной ПЦР, пары праймеров на гены *IGF1*, *GDF15*, *TGFB3*, *BMP6*, *TGFB1*, *VEGFA*, *FGF10*, *IL-8*, *FGF2*, *BDNF*, *GDF7*, *BMP7*, *IL-6*, *PPAR $\gamma$* , *RUNX2* (все - Qiagen, США), наборы для проведения ИФА IL-6, IL-8 (BD, США) и VEGFa, TGF $\beta$  (R&D, США); антитела (Immunotech, Франция, рабочее разведение 1:50), конъюгированных с флуоресцентными красителями изотиоцианат флуоресцеин (FITC) и R-фикаэритрин (R-PE) к антигенам CD29, CD90, CD73, CD44, CD105, HLA-ABC, CD45, CD31, CD34, IgG (изотипический контроль).

## Материалы

Для культивирования клеток и работы с ними использовали чашки Петри (Corning, США) различного диаметра, 6-луночные планшеты (Corning, США), серологические пипетки, центрифужные пробирки различного объема (Corning), криопробирки (Corning), пробирки для проточного цитофлуориметра (Sarstedt, Германия), микропробирки (Eppendorf, Германия), наконечники для автоматических пипеток (Eppendorf). Для микроскопии были использованы покровные и предметные стёкла MENZEL-GLÄSER (Gerhard Menzel GmbH, Германия). При выделении общей РНК, синтезе кДНК и проведении количественной ПЦР использовали наконечники с двойным фильтром (Eppendorf, Германия), микропробирки (Axygen, США), стрипы и планшеты (Eppendorf), рекомендованные для ПЦР и ПЦР в реальном времени и имеющие соответствующую маркировку “RNase & DNase free”.

## Оборудование

В работе использовали: ламинарный шкаф (ВЛ22, Сампо, Россия), СО<sub>2</sub>-инкубатор (Sanyo, Япония), мультигазовый инкубатор (Sanyo, Япония), световой фазово-контрастный инвертированный микроскоп Leica DM5000B (Германия), флуоресцентный фазово-контрастный микроскоп Nikon Eclipse TiU (Nikon, Япония), оснащенный лампой Nikon Intensilight C-HGFI, наборами фильтров для анализа флуоресценции UV-2A (Ex 330-380, DM 400, BA420), DAPI (Ex 340-380, DM 400, BA 435-485), B-2A (BP 450-490, DM 505, BA 520), FITC (BP 465-495, DM 505, BA 515-555), Tex Red (BP 540-580, DM 595, BA 600-660), камерой и системой анализа изображения NIS-elements (Nikon, Япония), конфокальный лазерный сканирующий микроскоп LSM 780 (Zeiss, Германия), оснащенный инкубационной камерой (5% CO<sub>2</sub>, 37°C), ксеноновой лампой X-Cite 120, диодным (405 нм, 30 мВт) и аргоновым (488, 561 и 633 нм, 13 мВт) лазерами, наборами фильтров 488/561/633, 488 – 556 нм, 568 – 685 нм и объективом Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27, амплификаторы 2720 Thermal cycler (Applied Biosystems, США) и Mx3000P (Stratagene, США), ПЦР-бокс (BioSan, Латвия), центрифугу Eppendorf 5810 R (Германия), центрифугу Eppendorf 5417 R (Германия), вортекс-центрифугу (Elmi, Латвия), вортекс (Elmi, Латвия), центрифугу Eppendorf 5204 R (Eppendorf, Германия), водяную баню (BioSan, США), проточный цитофлуориметр BD AccuriC6 (Accuri Cytometers Inc., США), планшетный спектрофотометр (Bio-Rad, США), спектрофотометр Nanodrop ND-2000c (Thermo Scientific, США), аналитические и прецизионные весы Adventure (Ohaus, Китай), миллипоровые фильтры (Millipore, США), сосуды Дьюара для жидкого азота (НПО Гелиймаш, Россия), автоматические пипетки (Eppendorf, Германия), гемоцитометр (Bright

Line, США), холодильник (Indesit, Россия) и низкотемпературный холодильник (Sanyo, Япония), стереомикроскоп Zeiss Stemi 2000-C с камерой для захвата изображения Canon G9 (Zeiss, Германия), термостат (Смоленское СКТБ СПУ, Россия).

### **Выделение МСК**

МСК выделяли из жировой ткани человека, которая была предоставлена многопрофильной медицинской клиникой «Союз» согласно договору, используя стандартную методику (Zuk et al., 2001) с модификациями (Буравкова и др., 2009). Для этого гомогенизированную жировую ткань в стерильных условиях отмывали в PBS и центрифугировали, отделяя основную массу эритроцитов и различных тяжелых составляющих. После центрифугирования жировую фракцию разбавляли ростовой средой α-МЕМ, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки (ФТС), 50 ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина, с добавлением коллагеназы в конечной концентрации 0,075%. Данную суспензию инкубировали на водяной бане (37°C, 15 мин), периодически встряхивая пробирку. При достижении определенной степени однородности содержимого, суспензию разбавляли свежей ростовой средой 1:1 и центрифугировали. Осажденные клетки дополнительно промывали ростовой средой, удаляли оставшиеся тяжелые фракции с помощью фильтра и центрифугировали, после чего сажали в чашки в полной ростовой среде. Через 24 часа клетки промывали, удаляя неадгезировавшие компоненты. Оставшиеся на пластике клетки культивировали в полной ростовой среде α-МЕМ (10% ФТС, 50 ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина) в стандартных условиях (5% CO<sub>2</sub>, 95% воздуха, 37°C, 100% влажность). При достижении 80-90% конфлюентности МСК подвергались криоконсервации. Для стандартизации методологии все дальнейшие работы осуществлялись исключительно на МСК, подвергнутых криоконсервации с последующей разморозкой.

Эксперименты одобрены Комиссией ГНЦ РФ-ИМБП РАН по медицинской биоэтике физиологической секции Российского национального комитета по биоэтике.

### **Криоконсервация МСК**

Для криоконсервации МСК дважды отмывали от среды при помощи PBS, с пластика снимали раствором 0,05% трипсин-ЭДТА (Gibco, США). Далее трипсин инактивировали 2-х кратным объемом полной ростовой среды α-МЕМ. Суспензию клеток (0,7 – 1 млн) переносили в пробирку, центрифугировали (5 минут, 400 g), супернатант сливал. К осажденным клеткам, добавляли 1 мл среды для криоконсервации (ФТС с 10% ДМСО), осторожно ресуспендировали и переносили в пробирки для криоконсервации.

Пробирки с суспензией клеток помещали на -20°C на 1 час, затем на -80°C на 24 часа. Длительное хранение клеток осуществляли в сосудах Дьюара с жидким азотом.

Размораживали МСК при 37°C и отмывали от криопротектора, осторожно перемещая клетки в 10 мл полной ростовой среды. Затем суспензию центрифугировали (5 минут, 400 g). Добавляли к клеточному осадку необходимый объем полной среды, бережно ресуспендировали, подсчитывали в гемоцитометре количество клеток и высевали на культуральную посуду с плотностью  $3 \times 10^3$  клеток/см<sup>2</sup>.

### **Длительное культивирование МСК при различном содержании кислорода**

После разморозки культивирование клеток осуществляли в инкубаторе (Sanyo, Япония) в стандартных условиях при атмосферном уровне кислорода (5% CO<sub>2</sub>, 95% воздуха ( $\approx$ 20% O<sub>2</sub>), 37°C, 100% влажность) и при пониженном содержании кислорода (5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 37°C, 100% влажность) в полной ростовой среде α-MEM (10% ФТС, 50 ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина). На втором пассаже (p2) проводили иммунофенотипирование клеток и оценку потенциала к дифференцировке в остеогенном и адипогенном направлениях для подтверждения соответствия минимальным критериям МСК (Dominici et al., 2006). Анализируемые клетки были имели характерный для МСК иммунофенотип (CD90+, CD73+, CD105+, CD44+, CD29+, HLA-ABC+, CD31-, CD34-, CD45-) и были способны к дифференцировке в канонических направлениях (рис. 9) С культуральной посуды клетки снимали с помощью раствора 0,05% трипсин-ЭДТА (Gibco, США), предварительно дважды промывая PBS. Трипсин ингибиравали избыточным количеством полной среды, клеточную суспензию переносили в пробирки и центрифугировали (5 мин, 400 g), после чего МСК высевали на культуральную посуду в свежей ростовой среде в стандартной плотности 3000 кл/см<sup>2</sup>. Замену среды осуществляли через 3-4 дня культивирования, пересев через 1 неделю. Таким образом, 1 пассаж длился 7 дней, т.е. до достижения 80-90% конфлюентности. Пассирование культуры продолжали до наступления состояния репликативного старения, что происходило через 18-28 пассажей.

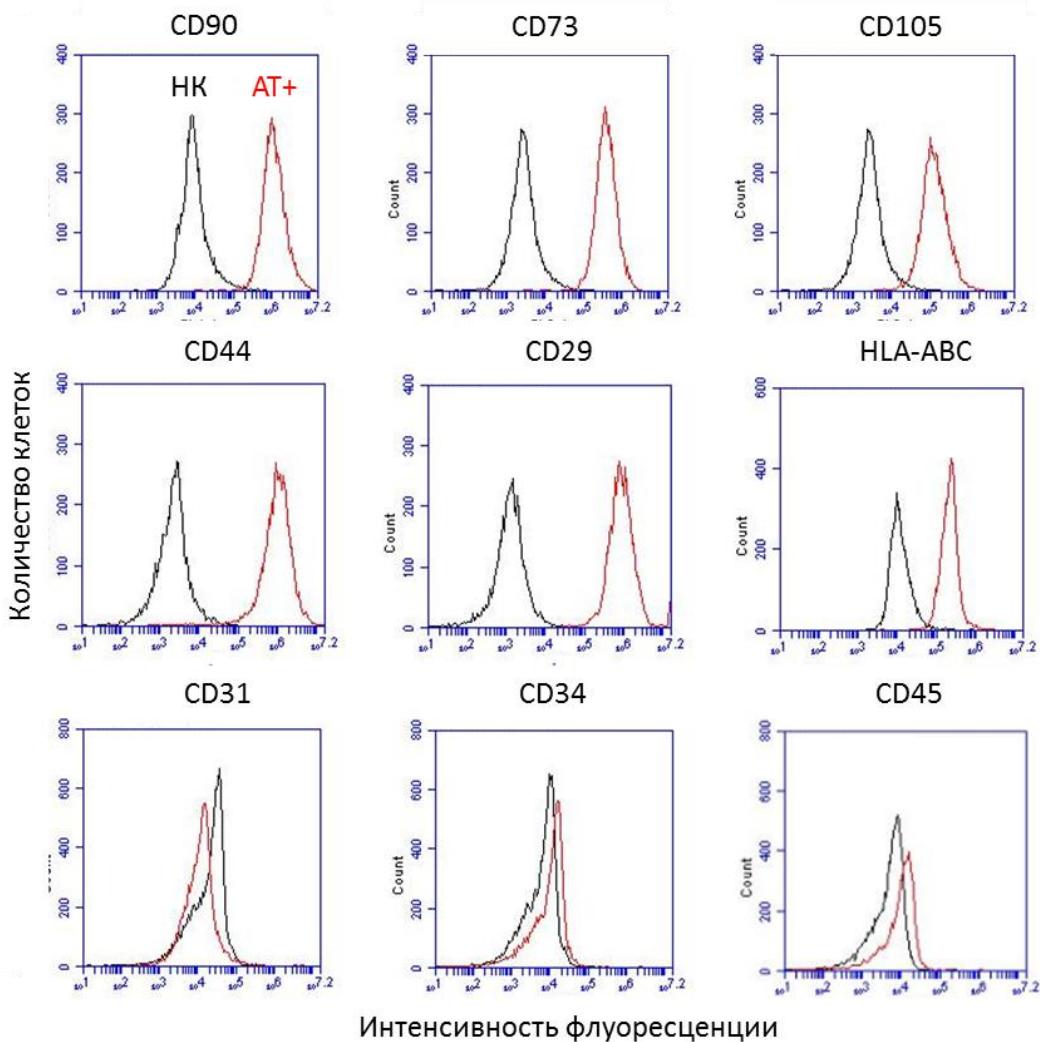


Рисунок 9. Иммунофенотип и потенциал к дифференцировке полученной культуры МСК.

НК – негативный контроль, клетки без специфического окрашивания; АТ+ - клетки, окрашенные специфическими антителами с флуоресцентной меткой.

### Иммунофенотипирование МСК

Для подтверждения иммунофенотипа МСК (Dominici et al., 2006) при культивировании проводили иммунофенотипирование по основным маркерам CD29<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-ABC<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD31<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, экспрессируемым на

поверхности клеточной мембранны. Использовали коммерческие антитела с флуоресцентными метками (BD, США) к соответствующим антигенам.

МСК отмывали фосфатным буфером, снимали с культурального пластика при помощи трипсина. На одну пробу брали 100 мкл суспензии МСК в фосфатном буфере (не менее 50 000 клеток). В пробу добавляли 10 мкл антител, окрашивание проводили 20 мин. После этого добавляли 200 мкл PBS и анализировали с помощью проточного цитофлуориметра Accuri C6 (BD, США).

### **Число удвоений популяции**

Число удвоений популяций (PD) за пассаж (7 дней) подсчитывали по формуле  $PD = [\log(N / N_0)] / \log 2$ , где  $N_0$  и  $N$  – начальное и конечное количество клеток. Сумму PD определяли как кумулятивную величину, отражающую общее число удвоений популяций к определенному дню культивирования.

### **Распределение популяций МСК по фазам клеточного цикла**

Оценку распределения популяции МСК по фазам клеточного цикла проводили методом проточной цитофлуориметрии на приборе Accuri C6 (BD, США) с использованием флуоресцентного красителя йодида пропидия (PI), способного связываться с молекулами ДНК. Клетки снимали с культурального пластика с помощью раствора трипсин-ЭДТА. Суспензию центрифугировали (5 мин, 400 g), затем клетки фиксировали, добавив к осадку 500 мкл 70% охлажденного этанола и инкубировали (1 час, при 4°C). Фиксированные клетки (не менее 100 тысяч клеток) промывали фосфатным буфером и центрифугировали (5 мин, 1500 g). Осадок ресуспендировали в 100 мкл раствора, содержащего 50 мкг/мл PI и 25 мкг/мл РНКазы А в течение 15 минут, затем добавляли 200 мкл PBS и анализировали. В результате были получены данные о распределении МСК по пloidности. Так как PI связывается с ДНК, определение стадии, в которой находится клетка, производится с помощью оценки интенсивности флуоресценции. Так, клетки, находящиеся в фазе G<sub>2</sub>/M, содержат удвоенное количество ДНК и формируют пик с наибольшей интенсивностью флуоресценции, клетки в фазе G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> флуоресцируют в два раза менее интенсивно, а клетки, находящиеся в S фазе, распределяются между пиками. Пик с наименьшей интенсивностью флуоресценции формируют гибнущие клетки, содержащие деградирующую ДНК.

### **Колониеобразующие единицы**

Для оценки колониеобразующей активности МСК высевали с низкой плотностью на чашки Петри, диаметром 35 мм (порядка 100 клеток на чашку). После инкубации (2 недели в стандартных условиях культивирования при соответствующем уровне оксигенации) клетки фиксировали и окрашивали 0,5% раствором кристалл-виолета в метаноле в течение 5 минут. После высушивания препаратов подсчитывали видимые колонии, а также анализировали их с использованием светового фазово-контрастного микроскопа Nikon Eclipse TiU (Nikon, Япония), оснащенного камерой и системой анализа изображения NIS-elements (Nikon, Япония).

### **Экспрессия β-галактозидазы, ассоциированной со старением**

Экспрессию β-галактозидазы в клетках выявляли с помощью Senescence Cells Histochemical Staining Kit (Sigma, США) согласно инструкции производителя. Для подсчета количества окрашенных клеток на каждой чашке Петри анализировали 5 полей зрения, полученных с использованием светового фазово-контрастного микроскопа Nikon Eclipse TiU (Nikon, Япония), оснащенного камерой и системой анализа изображения NIS-elements (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. Данный метод основан на детекции единичных клеток в потоке, который проходит через капилляр, с помощью лазера и светочувствительных датчиков. Датчики регистрируют поглощение и рассеивание света клеткой (прямое светорассеяние под углом 0,5-2° (Forward Scatter - FSC-A) и угловое светорассеяние под углом 90° (Side Scatter - SSC-A)), а также флуоресценцию красителей. Полученная информация выводится в виде частотных гистограмм распределения.

При оценке морфологических признаков анализируемых клеток используют показатели рассеянного света, которые обусловлены размером, формой, плотностью и гранулярностью внутриклеточных структур. Рассеянный свет включает дифракционные, рефракционные и отражающие компоненты. При малых углах рассеяния (<10°) преобладает дифракция, которая используется для оценки размера проходящей через луч клетки. При больших углах (около 90°) основной вклад в рассеяние света вносит рефракция, которая используется для изучения внутриклеточной гранулярности. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре Accuri C6 (BD, США).

## Жизнеспособность

Жизнеспособность МСК определяли методом проточной цитофлуориметрии на приборе Accuri C6 (BD, США) с использованием набора Annexin V-FITC/PI (Immunotech, Франция) согласно инструкции производителя. Для проведения анализа клетки снимали с культуральной посуды при помощи раствора трипсин-ЭДТА (0,05%), который затем ингибиравали полной ростовой средой. Клеточную суспензию отмывали фосфатным буфером и центрифугировали (5 мин, 400 g). Осадок (не менее 100 тысяч клеток) ресуспендировали в 94 мкл предварительно охлажденного при 4°C связывающего буфера (Immunotech, Франция) с добавлением 1 мкл аннексина и 5 мкл пропидия йодида (Immunotech, Франция). Образцы инкубировали (10 мин, 4°C, в темноте), после чего добавляли по 200 мкл чистого связывающего буфера и анализировали.

В присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  аннексин связывается с фосфотидилсерином, который перемещается с внутренней на внешнюю сторону мембранны на ранних этапах апоптоза. Пропидий йодид (PI) проникает в клетку и связывается с ДНК при разрушении мембранны и, таким образом, пул клеток, позитивно окрашенный по обоим данным маркерам, находится на поздней стадии клеточной гибели.

## Дифференцировка в остеогенном и адипогенном направлениях

Для оценки дифференцировочного потенциала МСК рассевали в стандартной плотности  $3 \times 10^3$  клеток/см<sup>2</sup> на чашки Петри с диаметром 35 см.

Индукционную остеогенную дифференцировку осуществляли путем культивирования клеток в полной ростовой среде αMEM, содержащей  $10^{-8}$  М дексаметазона, 10мМ бета-гилцерол-2-фосфата и 0,2 мМ 2-фосфо-L-аскорбиновой кислоты. Период индукции составлял 10 и 21 день с заменой среды каждые 3-4 дня, что позволяло оценить эффективность процессов остеогенеза, действующих на ранних и поздних этапах дифференцировки.

Ранние этапы оценивали путем гистохимического выявления активности щелочной фосфатазы при помощи коммерческого набора «Alkaline phosphatase kit» (Sigma-Aldrich, США) согласно инструкции производителя. Перед окрашиванием из флаконов удаляли среду, клетки промывали буфером, фиксировали 20 минут в 4% параформальдегиде, затем промывали фосфатным буфером и дистиллированной водой. Краситель готовили на месте, окрашивали 1 час в темноте при комнатной температуре.

На поздних этапах определяли степень минерализации матрикса путем гистохимического выявления солей кальция ализариновым красным S. Клетки фиксировали 4% раствором параформальдегида в течение 15 минут при комнатной

температуре, после чего несколько раз промывали PBS и дистиллированной водой. Затем добавляли раствор 40 мМ ализаринового красного S, содержащий 2,8% гидроксида аммония, на 2 минуты при комнатной температуре, после чего реагентсливали, пробы аккуратно промывали дистиллированной водой. Ализариновый красный в ходе реакции придает красное окрашивание кальцифицированным компонентам матрикса. После окраски проводили фотосъемку случайным образом выбранных 3-5 полей зрения в культуральных чашках при помощи микроскопа Nikon Eclipse Ti-U.

Адипогенную дифференцировку осуществляли в полной ростовой среде αMEM, содержащей  $10^{-6}$  М дексаметазона, 200  $\mu$ M индометацина, 0,5 мМ изобутил-метилксантина (IBMX) и 10  $\mu$ M инсулина. Дифференцировка длилась 18 дней. Результат адипогенной дифференцировки оценивали путем визуализации жировых капель 0,36% раствором масляного красного (Oil Red O). Исходный раствор красителя готовили в концентрации 0,5%, в качестве растворителя использовали 98%-ный изопропанол. Рабочий раствор красителя готовили за 10 минут до окрашивания. Для этого исходный раствор разводили в дистиллированной воде в соотношении 3:2 и пропускали через фильтр с порами 0,45 мкм. Клетки фиксировали 4% раствором параформальдегида в течение 15 минут при комнатной температуре, после чего несколько раз промывали PBS и один раз 60% изопропанолом. Затем добавляли 0,36% раствор масляного красного в 60% изопропаноле. Окрашивание осуществляли 15 минут при комнатной температуре, после чего реагентсливали, клетки промывали 60% изопропанолом и в конце – дистиллированной водой два раза. Oil Red O окрашивает липидные капли в красный цвет. После окраски проводили фотосъемку случайным образом выбранных 3-5 полей зрения в культуральных чашках при помощи микроскопа Nikon Eclipse Ti-U.

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

### **Состояние внутриклеточных органелл**

Внутриклеточные органеллы изучали при помощи флуоресцентных зондов. Для определения функциональной активности митохондрий и лизосом использовали катионный потенциал-зависимый краситель Mitotracker Red FM и pH-зависимый маркер Lysotracker Green DND-26, соответственно (все - Life Technologies, США).

Клетки дважды промывали PBS, снимали с чашек Петри раствором трипсин-ЭДТА, ингибировали трипсин избыточным количеством среды культивирования, клеточную суспензию переносили в пробирки и центрифугировали (5 мин, 400 g). Затем МСК ресуспендировали в полной ростовой среде с добавлением с Mitotracker Red FM (500 nM, 30 мин) и Lysotracker Green DND-26 (200 nM, 30 мин) и инкубировали при 37°C в соответствующей газовой среде. Зонды разводили в соответствии с рекомендациями производителя. После инкубации к суспензии добавляли избыток фосфатного буфера и центрифугировали (5 мин, 400 g). Осадок ресуспендировали в 200 мкл PBS и анализировали на проточном цитофлуориметре Accuri C6 (BD, США).

MitoTracker Red FM (ex/em ~581/644 нм) – потенциал-зависимый зонд, который пассивно диффундирует через плазматическую мембрану и накапливается внутри активных митохондрий.

Lysotracker Green DND26 (ex/em ~504/511 нм) – ацидофильный зонд, высоко селективен к органеллам с кислым pH; состоит из флуорофора, связанного со слабым основанием, частично протонированным при нейтральном pH, свободно проникает через клеточные мембранны и накапливается в органеллах с низким pH. Механизм его накопления в органеллах до конца не установлен, но предполагается, что в этом участвует протонирование и удержание в мембранах органелл.

### **Конфокальная микроскопия**

Конфокально-микроскопические исследования проводили совместно с д.м.н. С.В. Буравковым (ФФМ МГУ им. М.В. Ломоносова). Выполняли фотосъемку фиксированных с помощью 4% параформальдегида клеток, покрашенных при помощи флуоресцентного зонда MitoTracker Red CMXRos. Для фотосъемки использовали конфокальный лазерный сканирующий микроскоп LSM 780 (Zeiss, Германия).

### **Окислительный стресс в клетке**

Детекцию активных форм кислорода в МСК проводили с помощью 2,7-дихлорфлуоресцеин диацетата (H2DCFDA) (Sigma, США). Для окрашивания клеток H2DCFDA, растворенный в ДМСО, вносили в среду культивирования МСК в конечной концентрации 20 μM. Инкубацию проводили в течение 30 мин при 37°C, в темноте. Для оценки продукции супероксид-аниона (СОА) в митохондриях МСК использовали индикатор MitoSOX Red (Life Technologies, США) (5 μM, 10 мин), который разводили в соответствии с рекомендациями производителя. Флуоресценцию оценивали на проточном цитофлуориметре Accuri C6

Для оценки окислительной активности АФК в клетке использовали зонд Image-iT Lipid Peroxidation Sensor, позволяющий определить долю окисленных липидов. Данный метод позволяет анализировать степень перекисного окисления, вызванного АФК. Image-iT Lipid Peroxidation Sensor предварительно растворяли в ДМСО, в соответствии с рекомендациями производителя. Клетки инкубировали в среде с красителем (рабочая концентрация 10  $\mu$ M) 30 мин при 37°C. После отмывания красителя МСК инкубировали в чистой ростовой среде еще 30 мин при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, после чего отмывали в PBS и анализировали на проточном цитофлуориметре Accuri C6. Image-iT Lipid Peroxidation Sensor при перекисном окислении смешает флуоресцентный сигнал из красной области (ex/em ~581/591 нм) в зеленую (ex/em ~488/510 нм), что позволяет определить соотношение между нативными и окисленными липидами.

H2DCFDA (ex/em ~492-495/517-527 нм) – нефлуоресцирующая восстановленная и ацетилированная форма 2',7'-дихлорфлуоресцеина, при попадании в клетку подвергается окислению и деацетилированию внутриклеточными эстеразами, в результате чего образуется флуоресцирующий продукт. Эстеразы отщепляют липофильную блокирующую группу, при этом получается заряженная молекула красителя, которая гораздо лучше удерживается в клетке, чем соединение, из которого она образовалась.

MitoSOX Red селективно накапливается в митохондриях, проникая через мембранны живых клеток. Данный краситель окисляется только супероксид-анионом, но не другими видами АФК. Окисленный продукт сильно флуоресцирует при связывании с нуклеиновыми кислотами.

### **Иммуноферментный анализ**

Уровень продуцируемых паракринных факторов в кондиционированной среде определяли при помощи иммуноферментного анализа (ИФА) согласно инструкциям производителей: IL-6, IL-8 – BD (США); VEGFa, TGF $\beta$  – R&D (США). Сразу после сбора образцы кондиционированной среды центрифугировали (5 мин, 400 g), с целью удаления клеточных компартментов, и хранили при -20°C. При проведении ИФА каждый образец измеряли в двух технических повторностях.

### **Количественный ПЦР анализ**

Для определения уровня экспрессии генов, ассоциированных с клеточным старением, из клеток выделяли тотальную РНК с помощью лизирующего реагента QIAzol (Qiagen, США) методом фенол-хлороформной экстракции, после чего осуществляли обработку ДНКазой и реакцию обратной транскрипции с использованием QuantiTect

Reverse Transcription Kit (Qiagen, США) согласно инструкциям производителя. Контроль концентрации и чистоты РНК и кДНК в образцах осуществляли при помощи спектрофотометра Nanodrop ND-2000c (Thermo Scientific, США). Анализировали уровни поглощения при длинах волн 230, 260 и 280 нм. Качество проб считали приемлемым, если соотношение значений 260/280 составляло около 1,8 и соотношение 260/230 составляло около 1,8-2,2. Полученную кДНК использовали для проведения количественной ПЦР с применением коммерческого реагента RT2 - Real Time SYBR Green/ROX PCR master mix (Qiagen, США) со всеми необходимыми для реакции компонентами. Реакционную смесь переносили в планшеты RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Human Cellular Senescence (Qiagen, США) и RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Human Hypoxia Signaling Pathway (Qiagen, США) с иммобилизованными лиофилизированными праймерами, после чего проводили ПЦР с детекцией продуктов в режиме реального времени согласно протоколу производителя. Конечный объем реакционной смеси составлял 25 мкл, количество кДНК в каждой отдельной реакции – 0,3 мкг. Для нормализации результатов исследования использовали праймеры референсных генов (*ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *HPRT1*, *RPLP0*), входящие в состав набора. Для определения экспрессии отдельных генов использовали пары праймеров QuantiTect Primer Assay на гены *IGF1*, *GDF15*, *TGFB3*, *BMP6*, *TGFB1*, *VEGFA*, *FGF10*, *IL-8*, *FGF2*, *BDNF*, *GDF7*, *BMP7*, *IL-6*, *PPARγ*, *RUNX2* (все - Qiagen, США) с применением «Набора реактивов для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green 1» (Синтол, Россия). Уровень экспрессии генов оценивали с использованием метода  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak KJ, Schmittgen TD. 2001)

### **Статистическая обработка**

Полученные данные подвергались статистической обработке с использованием компьютерных программ Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США) и STATISTICA 10 (StatSoft, США). В качестве характеристик полученных выборок использовали среднее и стандартное отклонение ( $M \pm SD$ ). Для определения достоверности различий между выборками применяли непараметрический критерий Манна-Уитни при выбранном уровне значимости  $p \leq 0,05$ . Обработка данных, полученных в экспериментах с использованием наборов RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array, осуществлялась с помощью программного обеспечения, доступного на сайте производителя (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### **Феноменологические признаки сенесцентного состояния**

Одним из первых этапов работы являлось получение сенесцентных МСК, подтверждение их сенесцентного состояния, а также определение эффектов, оказываемых физиологическим уровнем кислорода на основные феноменологические признаки клеточного старения. На сегодняшний день существует целый ряд маркеров сенесцентного состояния, однако ни один из них не является универсальным. Поэтому исследователи вынуждены применять одновременно комплекс подходов.

#### *Количество удвоений клеточной популяции*

Одним из главных признаков клеточного старения по определению является неспособность клетки к делению, т.е. необратимая потеря ее пролиферативных свойств. Клетки в культуре можно наблюдать непрерывно, что делает возможным определение клеточного прироста, а значит и числа клеточных делений (PD – population doubling), на каждом пассаже. Очевидно, что наиболее удобный подход для продолжительного наблюдения за культурой с целью достижения репликативного старения – просто подсчет количества пассажей. В стандартных условиях культивирования эта процедура позволяет прогнозировать примерное время активации сенесцентного состояния. Однако, поскольку плотность посева и уровень конфлюентности монослоя при пересеве на следующий пассаж часто сильно варьируют в разных лабораториях (от 10 до  $10^4$  клеток / см<sup>2</sup>) (Wagner et al., 2010, Larson et al., 2008), данные о количестве пассажей могут существенно различаться. Таким образом, оценка только данного параметра затрудняет сравнение результатов, полученных различными исследователями. В этом отношении расчет кумулятивной величины - суммарного количества PD является более точным (Cristofalo et al., 1998).

В данной работе МСК, выделенные из жировой ткани человека, длительно культивировали до достижения лимита Хейфлика. Анализ суммарного количества делений популяций (сумма PD) и среднего количества делений за 1 пассаж (PD на пассаж) 5 клеточных линий выявил неодинаковые изменения в культурах (рис. 10). Так, максимальное время поддержания пролиферирующей культуры варьировало от 98 до 203 дней (14 и 29 пассажей, соответственно), а общее количество удвоений клеточных популяций (сумма PD) от 15,4 до 41,1 в зависимости от донора и уровня кислорода.

Сходное время поддержания культуры жтМСК и суммы PD было показано и другими исследователями (Legzdina et al., 2016; Chen et al., 2015). Стоит отметить, что

сравнение клеток, полученных от 8 разных доноров, также показало значительную вариативность (Legzdina et al., 2016). Авторы предполагают, что МСК разных доноров могли неодинаково отреагировать на выделение их в культуру. Другие исследователи, анализируя кривые роста культур, указывают на различия между МСК, полученными из разных источников – пуповины, жировой ткани и менструальной крови (Chen et al., 2015), что является еще одним доказательством необходимости изучения каждой популяции МСК.

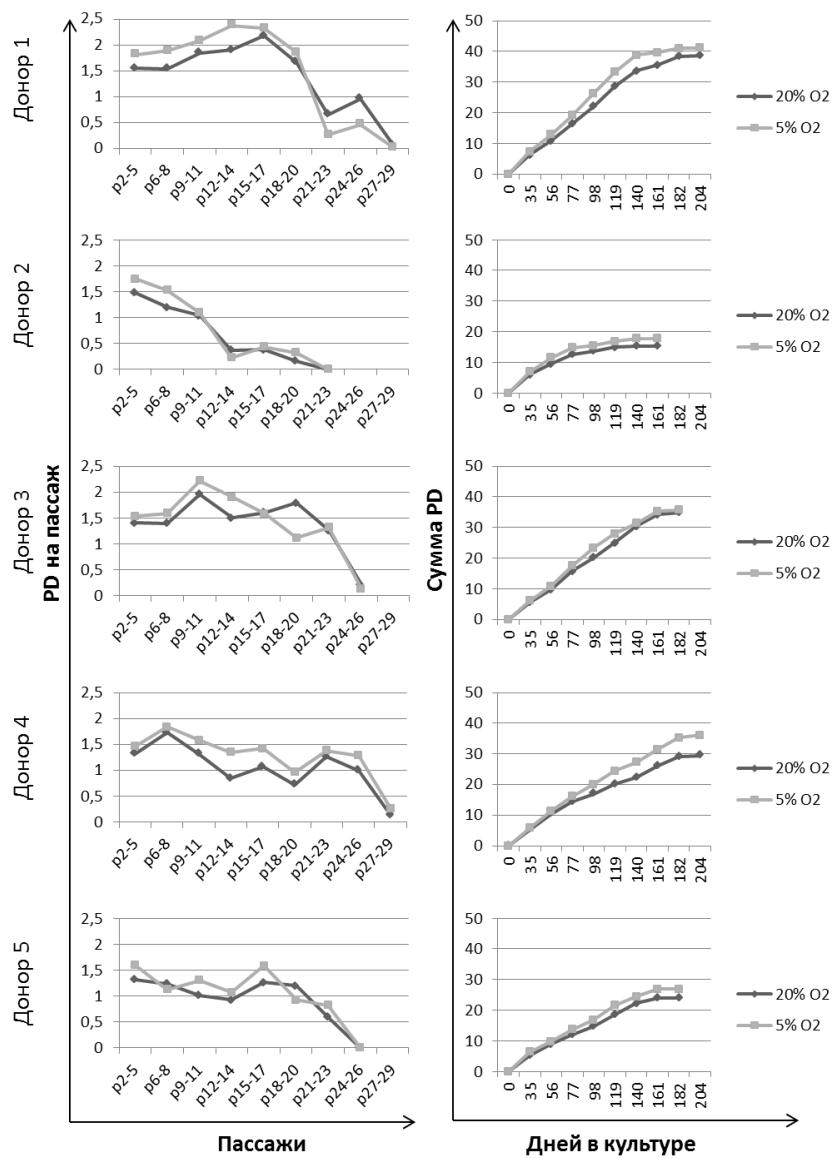


Рисунок 10. Суммарное количество делений популяций (сумма PD) и среднее количество делений за 1 пассаж (PD на пассаж) по каждому донору.

Для более детального статистического анализа данные по динамике роста популяций разных клеточных линий были сгруппированы в несколько выборок по

пассажам (рис. 11). Показано, что среднее время поддержания пролиферирующей культуры жтМСК составляет 21-23 пассажа (147-161 день культивирования), соответствующее  $\approx 30 \pm 5$  удвоениям клеточной популяции. После этого количество удвоений популяции достоверно ( $p<0,05$ ) снижается. Данный факт не только указывает на приобретение соответствующего фенотипа стареющих клеток, но и является одним из главных свидетельств отсутствия спонтанной иммортализации. Также полученные данные указывают на значительные индивидуальные различия в зависимости от донора МСК, поэтому во всех дальнейших экспериментах использовали клетки поздних пассажей (р19-28), для которых предварительно подтверждали значительное снижение пролиферативной активности, указывающее на достижение сенесцентного состояния. Значительные различия между клетками, полученными от разных доноров, не позволяют с достаточной точностью определять клеточное старение по времени поддержания культуры.

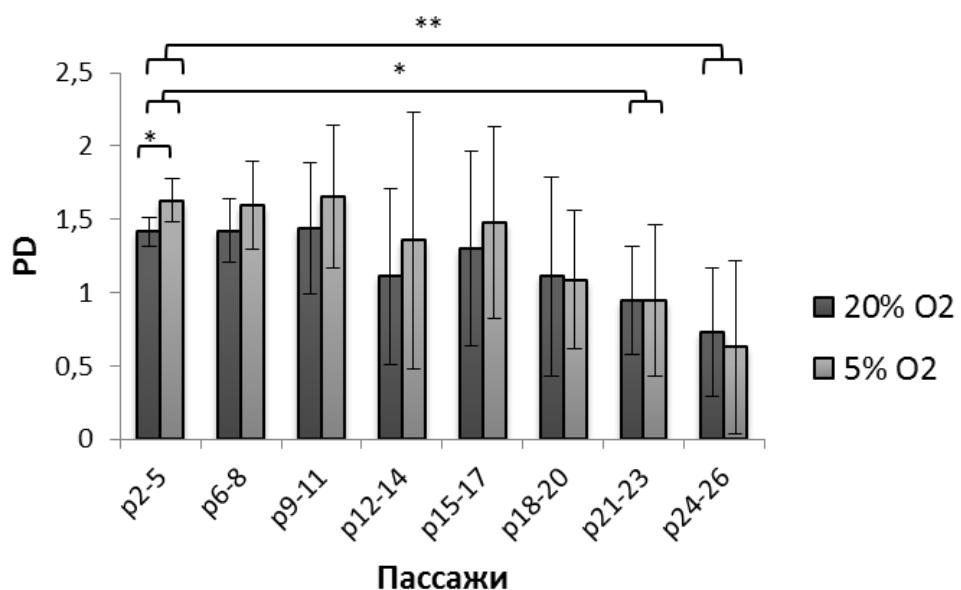


Рисунок 11. Среднее количество удвоений клеточных популяций за 1 пассаж на разных этапах поддержания культуры. Данные представлены как  $M \pm SD$ ,  $n \geq 5$ , \*- $p \leq 0,05$ , \*\*- $p \leq 0,01$ .

В условиях эксперимента МСК параллельно культивировали при атмосферном (20%) и физиологическом (5%) уровнях кислорода. Постоянное культивирование клеток в условиях с физиологическим уровнем кислорода (5%) приводило к увеличению общего количества делений популяций для всех исследованных клеточных линий (рис. 10).

Анализ динамики удвоений популяций за пассаж позволил определить, что данные различия обусловлены достоверным увеличением РД на ранних этапах культивирования. Действительно, целый ряд работ указывает на усиление пролиферативного потенциала МСК, полученных из различных источников, в условиях физиологической гипоксии (1-5% O<sub>2</sub>) (Анохина и др., 2006; Буравкова и др., 2009; Dos Santos et al., 2010; Fotia et al., 2015; Choi et al., 2015; Roth et al., 2015). При этом показано не только усиление пролиферативной активности, но и увеличение жизнеспособности (Choi et al., 2015). Тем не менее, в нашей работе при более длительном поддержании культуры, чем у других авторов, эффект влияния уровня кислорода не был статистически подтвержден после 5-6 пассажей, но тенденция сохранялась (рис. 11).

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 раковой иммортилизации клетки. Как клеточное старение, так и клеточная гибель являются важными процессами, призванными, среди прочего, не допустить бесконтрольной пролиферации. Каскады клеточной гибели активируются в результате значительных повреждений, в то время как более «мягкие» отклонения приводят лишь к аресту клеточного цикла.

При помощи метода проточной цитофлуориметрии с применением окрашивания флуоресцентными красителями Ann/PI (аннексин/йодид пропидия) была проанализирована жизнеспособность МСК на ранних и поздних пассажах. Данная методика позволяет выявлять клетки как на ранних (Ann+PI-), так и на поздних этапах клеточной гибели (Ann+PI+). Было показано, что на поздних пассажах (p19-23) обнаруживается повышение доли нежизнеспособных клеток в 2,5 – 3 раза (рис. 12).

Сходные тенденции были обнаружены и при оценке жизнеспособности методом анализа количества ДНК в клетке с использованием PI (рис. 13). Для этого МСК предварительно фиксировали этанолом для пермеабилизации клеточных мембран и обрабатывали РНКазой для нивелирования неспецифического связывания флуоресцентного красителя с РНК. После чего проводили анализ флуоресценции методом проточной цитофлуориметрии. В пик SubG1 попадали клетки со сниженным количеством

ДНК, что указывает на ее деградацию, характерную для погибающих или уже мертвых клеток.

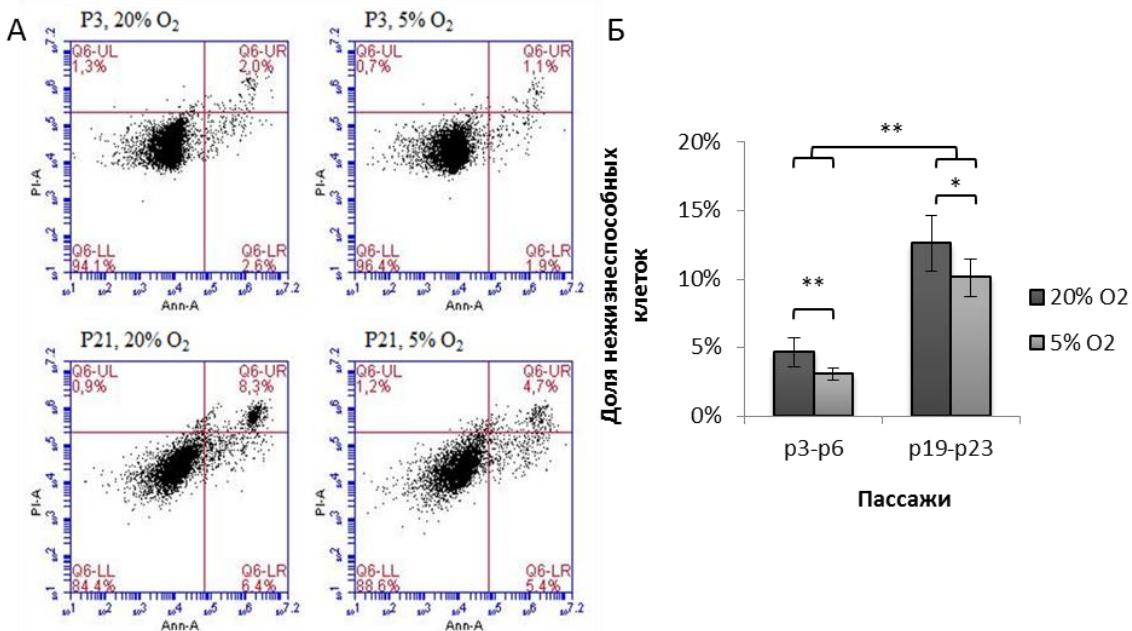


Рисунок 12. Оценка жизнеспособности МСК с применением окрашивания флуоресцентными красителями Ann/PI (аннексин/йодид пропидия). Данные представлены как  $M \pm SD$ ,  $n \geq 5$ , \*- $p \leq 0,05$ , \*\*- $p \leq 0,01$ .

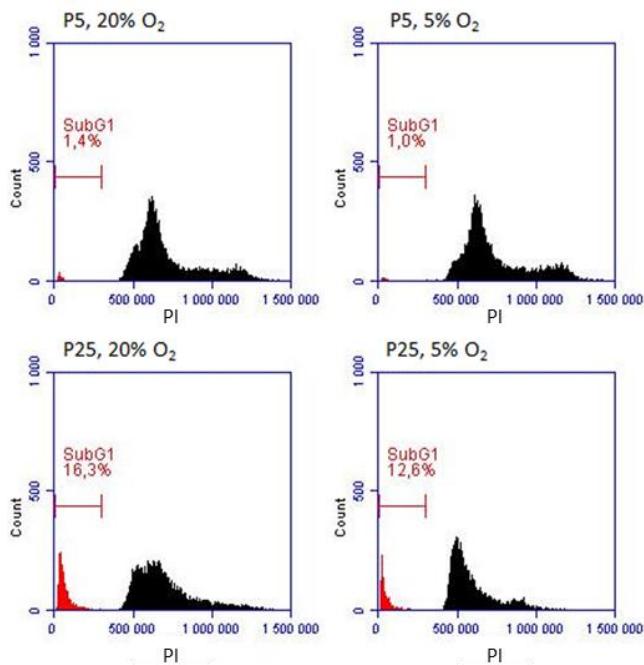


Рисунок 13. Оценка жизнеспособности МСК при помощи анализа количества ДНК методом проточной цитофлуориметрии. Репрезентативные диаграммы.  $n=3$ .

При культивировании жтМСК в условиях с физиологическим уровнем кислорода (5%) доля нежизнеспособных клеток была снижена как на ранних пассажах, так и в сенесцентных культурах (рис. 12, 13). Некоторые авторы заявляют об отсутствии выраженного влияния гипоксических условий на жизнеспособность. В частности, было показано, что МСК, выделенные из костного мозга (кмМСК), сохраняют одинаковую жизнеспособность (порядка 86-90%) при постоянном культивировании в условиях 20% и 3% O<sub>2</sub> (Fehrer et al., 2007). Другие авторы также не обнаружили значительных изменений доли живых клеток-предшественников при 20% и 2-2,5% кислорода (Mathew et al. 2013). В этом случае данный параметр достигал 95-98,3% для МСК, полученных из плаценты, и 96,4-98,9% для кмМСК предшественников. Тем не менее, большинство исследований сходятся во мнении, что физиологическая гипоксия повышает жизнеспособность МСК (Valorani et al., 2012; Pilgaard et al., 2009; Feng et al., 2014; Choi et al., 2015). Было показано, что клетки, культивируемые при атмосферном уровне кислорода, более подвержены повреждению ДНК, чем клетки, культивируемые при пониженном уровне оксигенации. Авторы предполагают связь данного эффекта с уровнем внутриклеточных АФК (Mohyeldin et al., 2010; Choi et al., 2015). Показано увеличение доли апоптотических клеток в условиях с атмосферным уровнем кислорода (Valorani et al., 2012). Резюмируя полученные данные, можно заключить, что снижение содержания кислорода в атмосфере культивирования до физиологических значений может уменьшить уровень клеточной гибели путем понижения повреждающего воздействия на ДНК.

На сегодняшний день существуют данные о механизмах влияния гипоксии на жизнеспособность, полученные на линейных клеточных культурах. Они свидетельствуют о том, что низкое содержание кислорода при культивировании *in vitro* может оказывать как проапоптотический, так и антиапоптотический эффект. Разница в получаемых результатах может являться следствием использования различных методологических подходов (уровень кислорода, сыворотки, длительность экспозиции и др.) и клеточных культур. Ряд авторов полагает, что антиапоптотический эффект проявляется благодаря активации транскрипционного фактора NF-κB, приводящего к увеличению экспрессии IAP-2, который способствует подавлению транслокации Bax (Dong et al. , 2003; Greijer and Wall, 2004). Также устойчивость к апоптозу может поддерживаться за счет PI3K/Akt сигнального пути посредством индукции NF-κB и предотвращения образования гетеродимеров Bad-Bcl-xL (Greijer and Wall, 2004). С другой стороны, проапоптотическое действие может быть обусловлено активацией JNK киназы (Teraishi et al., 2005), повышением проницаемости внутренней мембранны митохондрий, что приводит к выходу

цитохрома С, ингибирированием дыхательной цепи, переноса протонов и снижением трансмембранных потенциала.

Таким образом, на жизнеспособность МСК может повлиять и длительность поддержания клеток в культуре, и уровень оксигенации, используемый при культивировании. Также подобные результаты могут указывать на то, что уровень кислорода в среде культивирования может влиять на процессы возникновения или накопление внутриклеточных повреждений.

### *Пролиферативная активность*

Пролиферативный потенциал культуры МСК оценивали по ряду параметров, в том числе анализировали распределение МСК по фазам клеточного цикла и клоногенную активность.

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, что позволяет разделить МСК по фазам клеточного цикла. Так, в фазе G1/G0 в клетках содержится в 2 раза меньше ДНК, чем в G2 фазе и во время митоза (M). 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. 14), что может указывать на арест клеточного цикла в G1/G0 фазе.

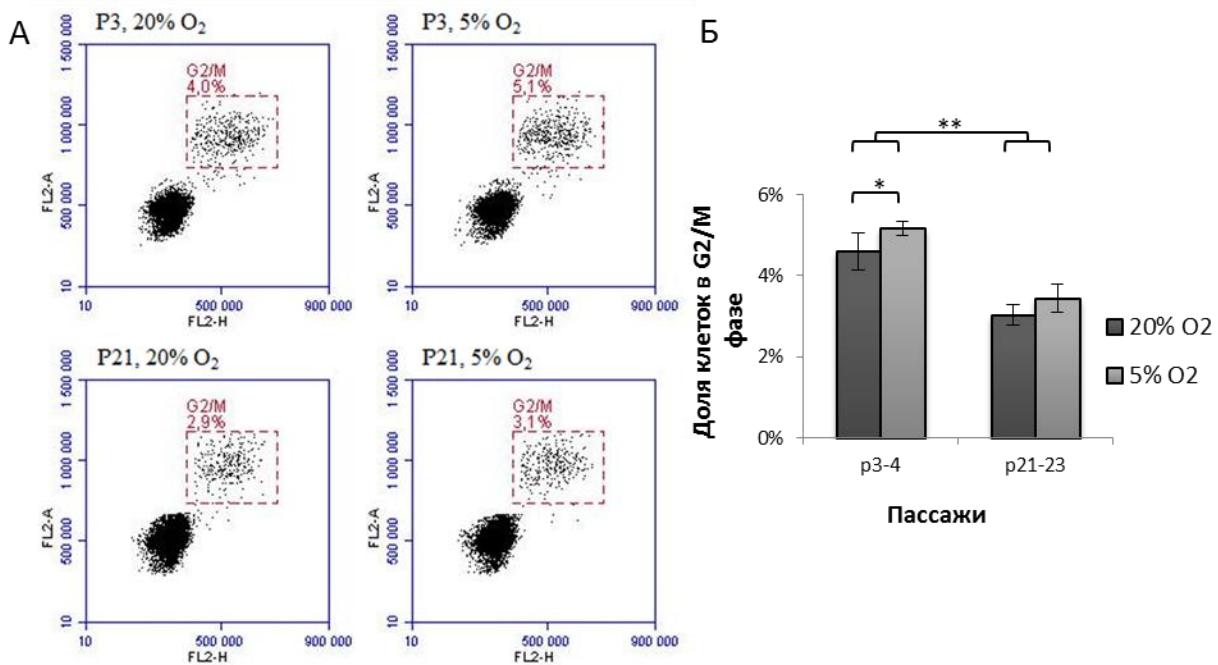


Рисунок 14. Распределение МСК по фазам клеточного цикла при длительном культивировании в условиях различного содержания кислорода. Оценку проводили на стадии 80-90% конфлюентности монослоя. Данные представлены как  $M \pm SD$ ,  $n \geq 5$ , \*-  
 $p \leq 0,05$ , \*\*- $p \leq 0,01$ .

Относительно малая доля делящихся клеток (3-5% от популяции) была обусловлена плотностью клеточного слоя на момент анализа. Как и для подавляющего большинства наших экспериментов клетки анализировали на 7-ой день после пересева. За это время МСК достигали 80-90% конфлюентности, что значительно усиливало влияние контактного ингибирования на пролиферацию. Данное предположение было подтверждено в экспериментах по анализу распределения МСК по фазам клеточного цикла при 40-60%-ной конфлюентности на 4 день после пересева, в так называемой экспоненциальной фазе роста популяции (рис. 15). Было показано, что в экспоненциальной фазе доля делящихся клеток (G2/M) составляет 20-26% на ранних пассажах и 10-13% на поздних. Также значительно более выраженной является доля клеток, находящихся в S-фазе, т.е. на синтетическом этапе клеточного цикла.

Сходные данные были получены и другими исследователями. Так, анализ распределения МСК, выделенных из пуповинной крови, по фазам клеточного цикла на 17 пассаже (p17) выявил очевидное увеличение числа клеток в фазе G0/G1 и уменьшение количества клеток в S-фазе по сравнению с p4 и p11 (Gu et al., 2016). Отдельно авторы указывают на отсутствие полиплоидных аберрантных клеток на поздних этапах

культивирования, что можно отметить и в нашей работе. Помимо анализа эффектов репликативного старения, авторы экспериментировали со стресс-индуцированным клеточным старением. Культуры пкМСК на ранних пассажах обрабатывали  $H_2O_2$  в различных концентрациях (0, 200, 400, 600 и 800 мкМ) в течение 2 часов. Затем клетки инкубировали в свежей ростовой среде в течение 48 часов. Было показано, что с увеличением концентрации  $H_2O_2$  количество пкМСК во фракции G0/G1 увеличивалось (Gu et al., 2016).

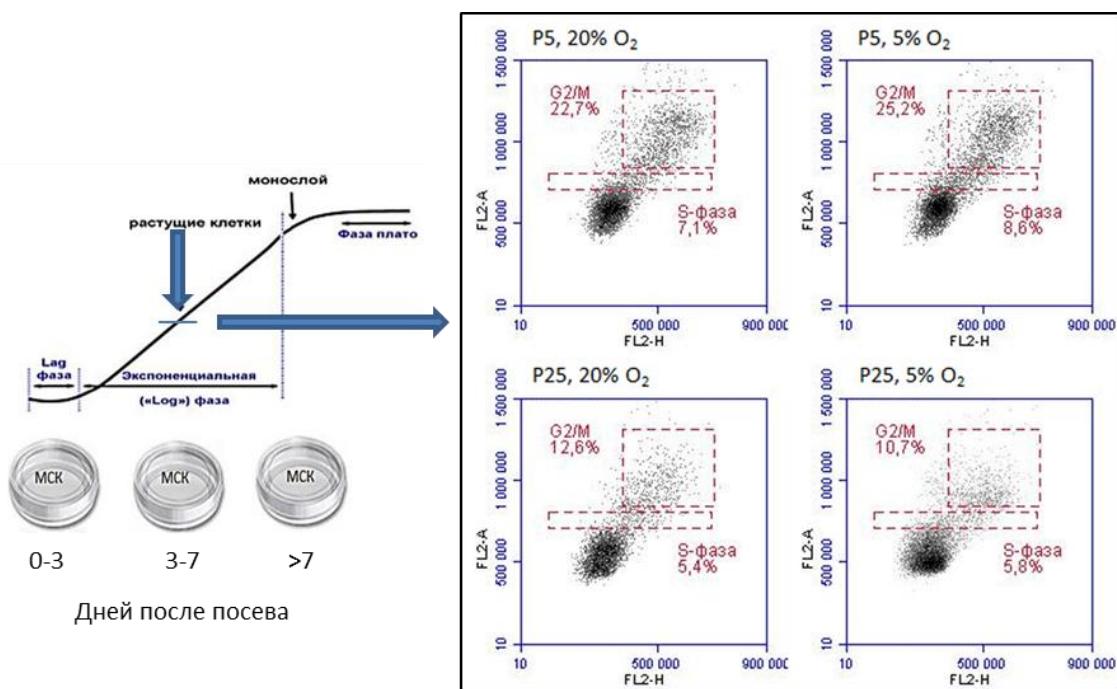


Рисунок 15. Распределение МСК по фазам клеточного цикла при длительном культивировании в условиях различного содержания кислорода. Оценку проводили на стадии 40-60% конфлюентности монослоя. Репрезентативные диаграммы.

Оценка влияния гипоксических условий выявила, что культивирование жтМСК при физиологическом содержании кислорода (5%  $O_2$ ) приводит к достоверному ( $p \leq 0,05$ ) увеличению доли делящихся клеток на ранних пассажах (рис. 14). Однако в сенесцентных культурах значимых различий по данному параметру не выявлено.

Полученные данные подкрепляются работами других исследователей. Так, в культуре жтМСК, помещенной в условия с содержанием кислорода 2%, обнаруживалась повышенная доля клеток в фазах G2/M и S по сравнению с МСК, культивируемыми при 20%  $O_2$  (Choi et al., 2015).

Анализ клоногенной активности показал аналогичную закономерность. Данный метод позволяет оценить долю клеток в популяции, способных к активной пролиферации при минимизации фактора контактного ингибирования. Для этого МСК высевали с низкой плотностью - около 100 клеток на чашку Петри с диаметром 35 мм, после двух недель культивирования подсчитывали количество колоний. На ранних пассажах (р3-6) в условиях с атмосферным уровнем кислорода среднее количество колоний составляло 17,9 на чашку. Результат позволяет сделать вывод о том, что лишь около 18% клеток в культуре МСК *in vitro* обладают значительными пролиферативными свойствами. На поздних пассажах (р23-27) 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. 16). Анализируемые колонии отличались не только количественно, но и качественно. Так, колонии сенесцентных МСК были гораздо менее плотными и занимали меньшую площадь. Широко известно, что плотные колонии состоят из тесно контактирующих друг с другом МСК с высоким пролиферативным потенциалом, в то время как диффузные колонии характеризуются наличием в своём составе клеток, разобщённых между собой и свободно располагающихся в пределах колонии, что указывает на медленное деление. Таким образом, различные по морфологии виды колоний отражают пролиферативный потенциал клеток, их образующих. Полученные результаты позволяют заключить, что при репликативном старении происходит не только снижение доли МСК, способных к активной пролиферации, но и снижение пролиферативного потенциала субпопуляции делящихся клеток.

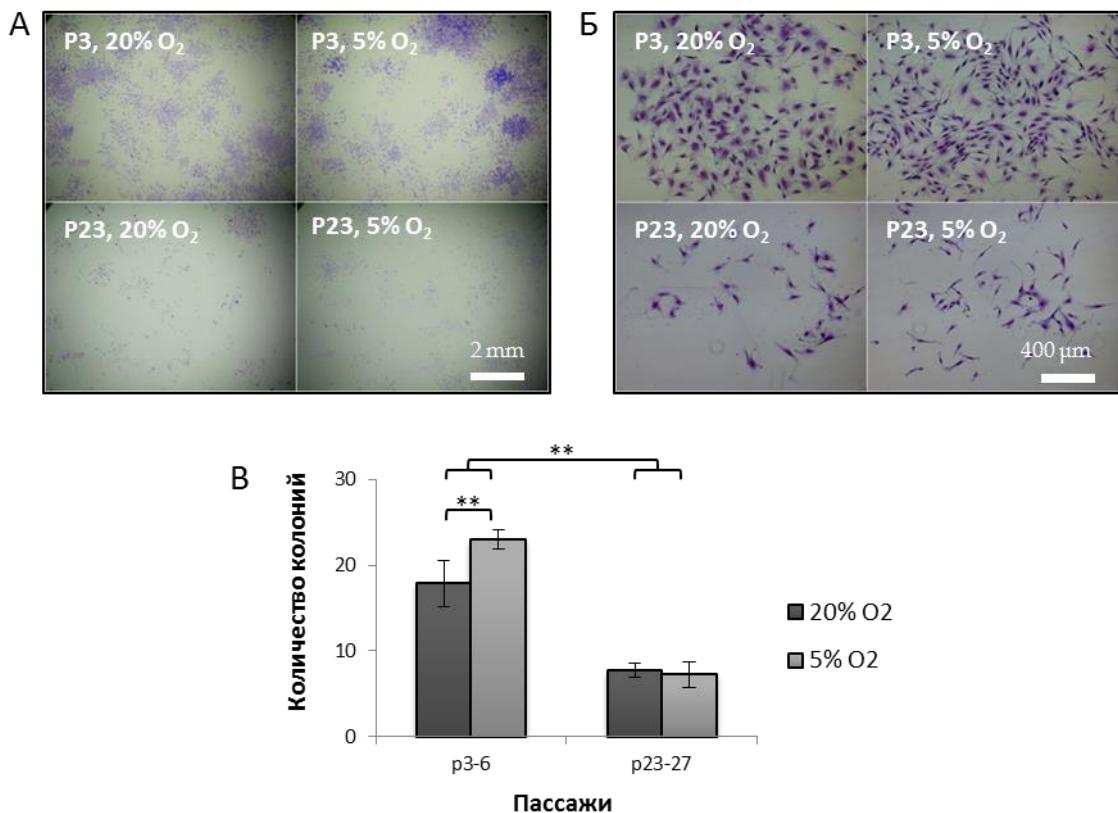


Рисунок 16. Клоногенная активность МСК на ранних и поздних пассажах при длительном культивировании в условиях с различным содержанием кислорода. А – Репрезентативные микрофотографии областей чашек Петри с колониями клеток; Б – репрезентативные микрофотографии отдельных колоний; В – количество колоний. 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 О<sub>2</sub>. Также, стоит отметить, что колонии состояли из большего числа более мелких клеток, что отчетливо видно на микрофотографиях (рис. 16Б). Однако в сенесцентных культурах значимых различий по данному параметру не выявлено (рис. 16).

#### *Активность ассоциированной со старением $\beta$ -галактозидазы*

Длительное культивирование клеток ведет и к другим изменениям, в частности, к изменению активности ассоциированной со старением  $\beta$ -галактозидазы (SA- $\beta$ -gal). Данный фермент относится к лизосомальным гидролазам и в норме проявляет активность при pH 4. Было обнаружено, что в сенесцентных клетках SA- $\beta$ -gal активируется и при pH

6 (Dimri et al., 1995), что послужило доказательством возможности ее использования для количественной оценки сенесцентного состояния клеточной культуры. На настоящий момент специфическая реакция на выявление активности SA- $\beta$ -gal является одним из наиболее широко используемых методов детекции клеточного старения. В то же время существует ряд работ, высказывающих сомнения по поводу использования SA- $\beta$ -gal как маркера старения *in vitro* и *in vivo*. Согласно мнению этих авторов, на выявление SA- $\beta$ -gal может повлиять несколько факторов, включая метод исследования, наличие определенных патологий, а также пролиферативный статус клетки. (Yegorov et al., 1998; Severino et al., 2000; Untergasser et al., 2003).

В ходе нашего исследования выявлено, что при длительном пассировании МСК в условиях атмосферной оксигенации (20% O<sub>2</sub>) доля клеток с активной  $\beta$ -галактозидазой значительно увеличивается на поздних пассажах в среднем до 68,7% против 9% на ранних этапах культивирования (рис. 17). Стоит отметить, что крупные уплощенные клетки наиболее активно подвергались окрашиванию. Данная особенность отчетливо заметна в культурах ранних пассажей. В условиях с физиологическим уровнем кислорода доля позитивно окрашенных клеток была снижена. Влияние уровня кислорода было отмечено как на ранних, так и на поздних пассажах.

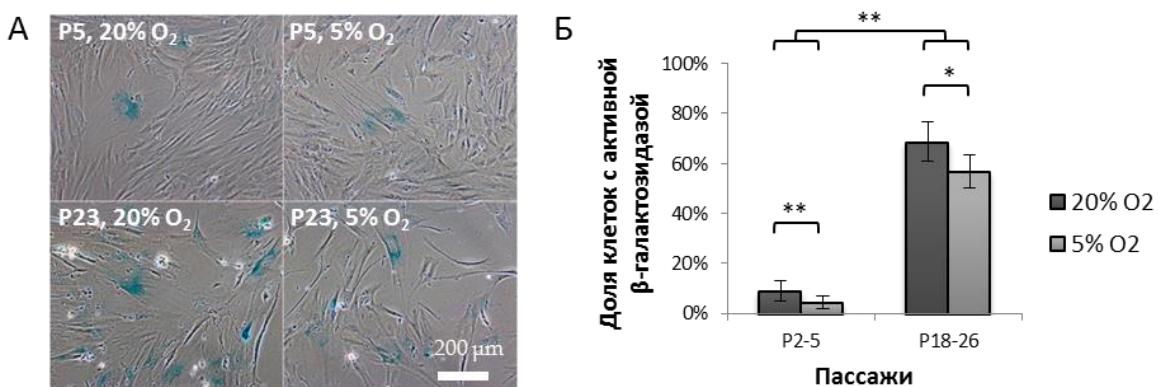


Рисунок 17. Выявление активной  $\beta$ -галактозидазы (SA- $\beta$ -gal) в МСК на ранних и поздних пассажах при длительном культивировании в условиях с различным содержанием кислорода. Окрашивание проводили через семь дней после посева в стандартной плотности (3000 кл/см<sup>2</sup>). Данные представлены как M ± SD, n ≥ 5, \* p ≤ 0,05, \*\* p ≤ 0,01

Для оценки связи детектируемой активной  $\beta$ -галактозидазы с клеточным старением МСК, т.е. именно с необратимым арестом клеточного цикла, было изучено влияние

плотности посева культуры на выявление SA- $\beta$ -gal. Клетки высевали в различной плотности (600, 3000 и 15000 клеток на  $\text{см}^2$ ), спустя 7 дней проводили окрашивание. Увеличение количества высеваемых клеток вызывает более раннее контактное ингибирование пролиферации, которое является обратимым арестом клеточного цикла. В ходе проведенных экспериментов было показано, что повышение плотности посева ведет к резкому увеличению доли клеток с активной SA- $\beta$ -gal pH 6. В то же время на микрофотографиях видно, что изменяется не только процентное соотношение окрашенных и неокрашенных клеток, но и интенсивность окрашивания (рис. 18), что свидетельствует об усилении активности исследуемого белка.

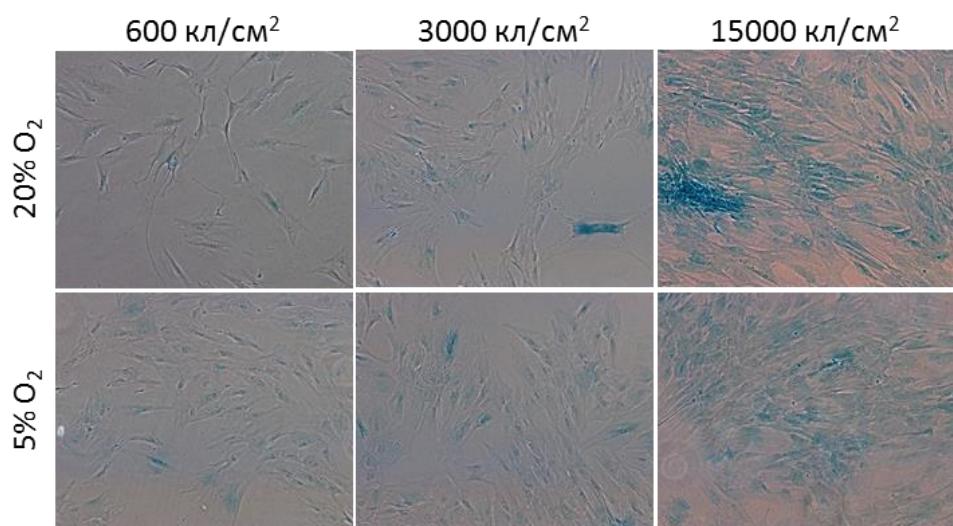


Рисунок 18. Выявление активной  $\beta$ -галактозидазы (SA- $\beta$ -gal) в МСК при различной плотности посева. Окрашивание проводили через семь дней после посева.  
Репрезентативные микрофотографии.

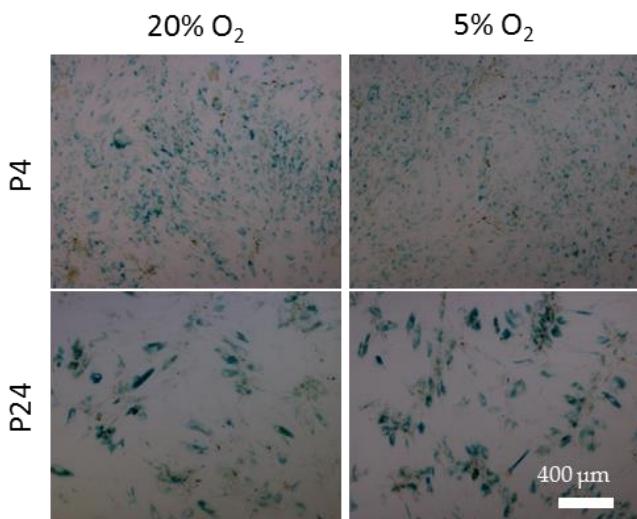


Рисунок 19. Выявление активной  $\beta$ -галактозидазы (SA- $\beta$ -gal) в МСК на ранних и поздних пассажах при длительном культивировании в условиях с различным содержанием кислорода. Окрашивание проводили через 14 дней после посева. Репрезентативные микрофотографии.

Сходные результаты были получены и в экспериментах со стандартной плотностью посева (3000 клеток на  $\text{см}^2$ ) при увеличении времени культивирования с одной недели до двух (рис. 19). В данной модельной системе МСК ранних пассажей также подвергались контактному ингибированию пролиферации, что, в конечном счете, приводило к увеличению клеток с активной SA- $\beta$ -gal pH 6 до близкой к 100%. Исходя из вышесказанного, следует заключить, что получаемые результаты по изучению активности SA- $\beta$ -gal pH 6 стоит связывать не только с необратимым арестом клеточного цикла, определяющим сенесцентное состояние, но и с обратимым снижением пролиферации. Таким образом, несложные эксперименты дополнительно подтверждают необходимость комплексной оценки признаков клеточного старения при проведении исследовательских работ и невозможность использования для этих целей SA- $\beta$ -gal как единственного маркера. Тем не менее, несмотря на ряд ограничений, данный метод остается одним из наиболее удобных и широко распространенных подходов к оценке доли сенесцентных клеток в культуре, по крайней мере, косвенно указывая на пролиферативный потенциал клетки.

### *Морфология*

Другим феноменологическим признаком сенесцентного состояния, косвенно связанным с пролиферативной активностью, является изменение морфологии клеток. В наших экспериментах на ранних этапах культивирования МСК имели преимущественно веретеновидную форму. На поздних пассажах клетки характеризовались увеличением размера и более выраженной популяционной гетерогенностью (рис. 20). Сходные данные были получены и в других исследованиях МСК, выделенных из жировой ткани (Legzdina et al., 2016).

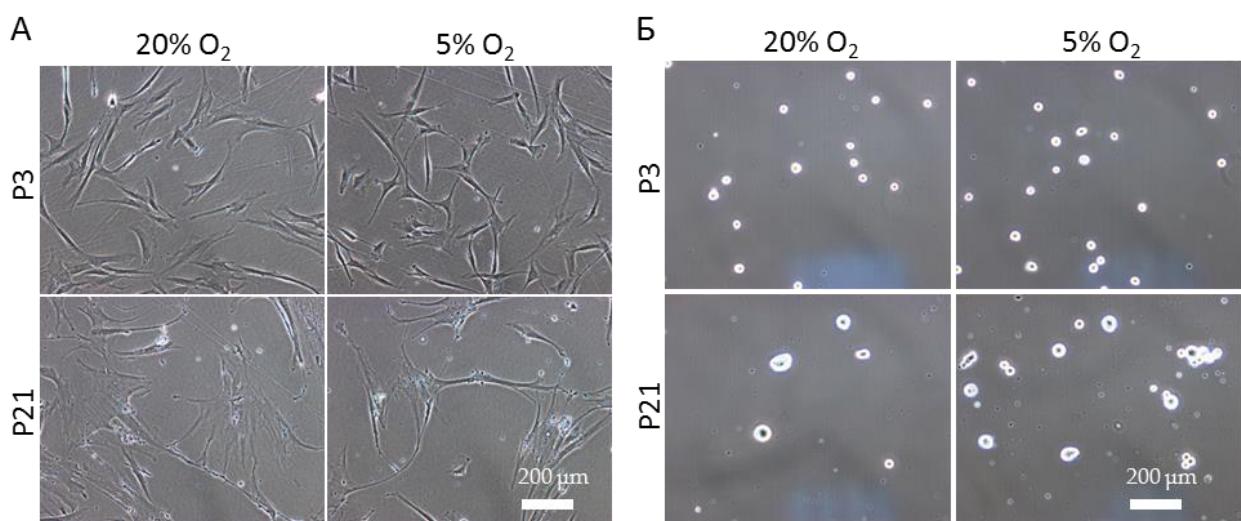


Рисунок 20. Морфология витальных жтМСК на ранних и поздних пассажах при длительном культивировании в условиях с различным содержанием кислорода: А - на пластике и Б - в суспензии. Репрезентативные микрофотографии, световая микроскопия.

Для количественного сравнения морфологических показателей МСК в суспензии использовали метод проточной цитофлуориметрии. Данная методика позволяет оценить показатели рассеянного света, которые обусловлены размером, формой, плотностью клеток и гранулярностью внутриклеточной структуры. Было показано, что по мере увеличения длительности культивирования увеличивался средний размер МСК и их гранулярность, оценка которых осуществлялась по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеиванию, соответственно (рис. 21).

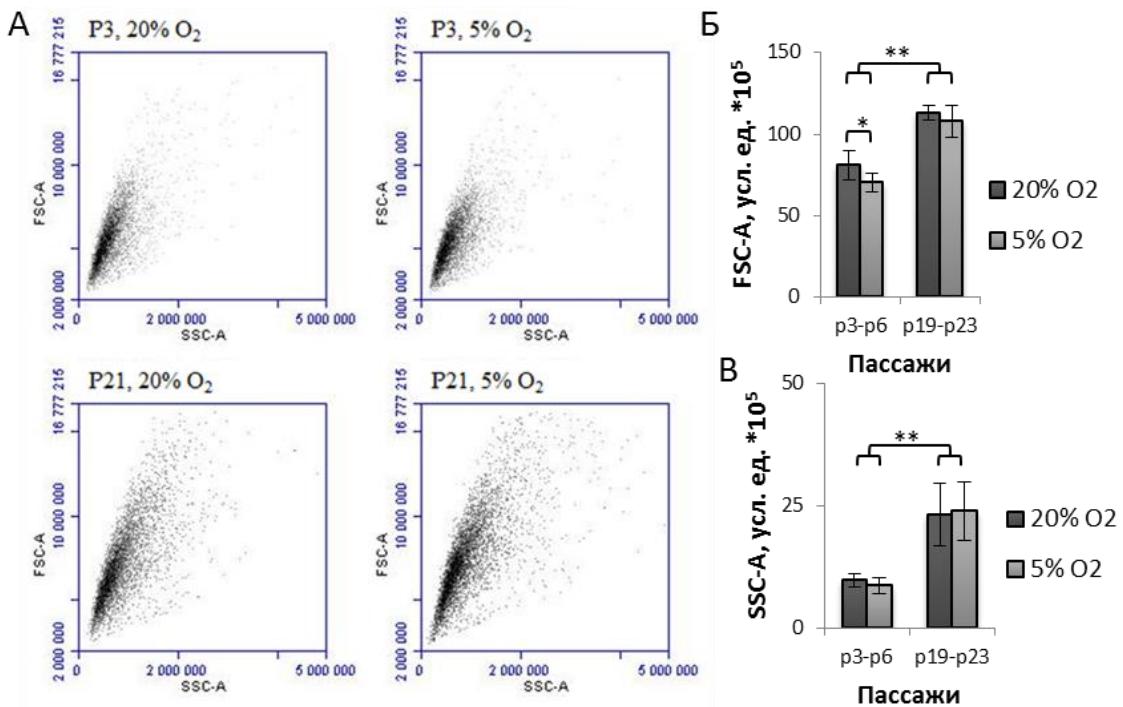


Рисунок 21. Оценка размера/гранулярности МСК по FSC/SSC (размеру/гранулярности) при длительном культивировании в условиях с различным содержанием кислорода, проточная цитометрия. Данные представлены как  $M \pm SD$ ,  $n \geq 5$ , \*- $p \leq 0,05$ , \*\*- $p \leq 0,01$ .

Полученные результаты могут быть следствием снижения 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 et al., 2007; Rodier et al., 2011; Turinotto et al., 2016). Таким образом, увеличение среднего размера клеток и снижение пролиферативной активности являются тесно взаимосвязанными процессами.

Сравнительный анализ МСК, культивируемых в различных условиях оксигенации, показал, что при 5% O<sub>2</sub> средний размер клеток оказался сниженным на ранних пассажах (рис. 21), что также, как и другие наши результаты, указывает на более активную пролиферацию. Значительных различий по морфологии клеток и гранулярности внутриклеточной структуры МСК в зависимости от уровня оксигенации не выявлено. Клетки сохраняют фибробластоподобный фенотип, что отчетливо видно на

представленных микрофотографиях, полученных с помощью световой микроскопии. Сходные данные были получены и другими исследователями при работе с МСК, выделенными из различных тканевых источников (Choi et al., 2015) Тем не менее, методом проточной цитофлуориметрии было показано достоверное уменьшение размеров жтМСК на ранних пассажах. Вероятно, данный эффект обусловлен повышенным пролиферативным потенциалом в гипоксических условиях (5% O<sub>2</sub>), что отмечено при оценке количества удвоений популяции. Последующие эксперименты подтвердили усиление клоногенной активности и увеличение доли делящихся клеток. Наши данные также показывают, что доля жизнеспособных клеток при физиологическом уровне кислорода была выше как на ранних, так и на поздних пассажах.

Таким образом, основываясь на совокупности собственных данных о феноменологических признаках клеточного старения и работах других авторов, можно заключить, что культивирование жтМСК при пониженном содержании кислорода приводит к сглаживанию проявляемых эффектов, ассоциированных со старением, что наиболее выражено на ранних пассажах (рис. 22). Оценка пролиферативной активности культуры и размера клеток указывает на значимое влияние уровня оксигенации на ранних пассажах, в то время как на поздних этапах культивирования значимых различий не выявлено. Тем не менее, постоянное поддержание условий с пониженным содержанием кислорода приводило к увеличению жизнеспособности жтМСК и снижению доли клеток с активной SA-β-gal как на ранних, так и на поздних пассажах.



Рисунок 22. Модуляция феноменологических признаков старения жтМСК: А – влияние репликативного старения (сравнение клеток поздних и ранних пассажей), Б - эффекты, оказываемые длительным культивированием при пониженном уровне кислорода (5%), на клетки ранних и поздних пассажей.

## Характеристика МСК при длительном культивировании

### *Иммунофенотип*

Охарактеризованы иммунофенотип и потенциал дифференцировки в канонических направлениях – остеогенном и адипогенном сенесцентных МСК, чтобы оценить соответствие минимальным критериям МСК (Dominici et al., 2006). При помощи метода проточной цитофлуориметрии и специфических антител, меченых флуорохромами, было показано, что доля позитивных клеток по маркерам CD29, CD90, CD73, CD44, CD105, HLA-ABC оставалась близкой к 100% (рис. 23). Полученные данные позволяют сделать вывод об относительной стабильности иммунофенотипа МСК при длительном культивировании до достижения лимита Хейфлика.

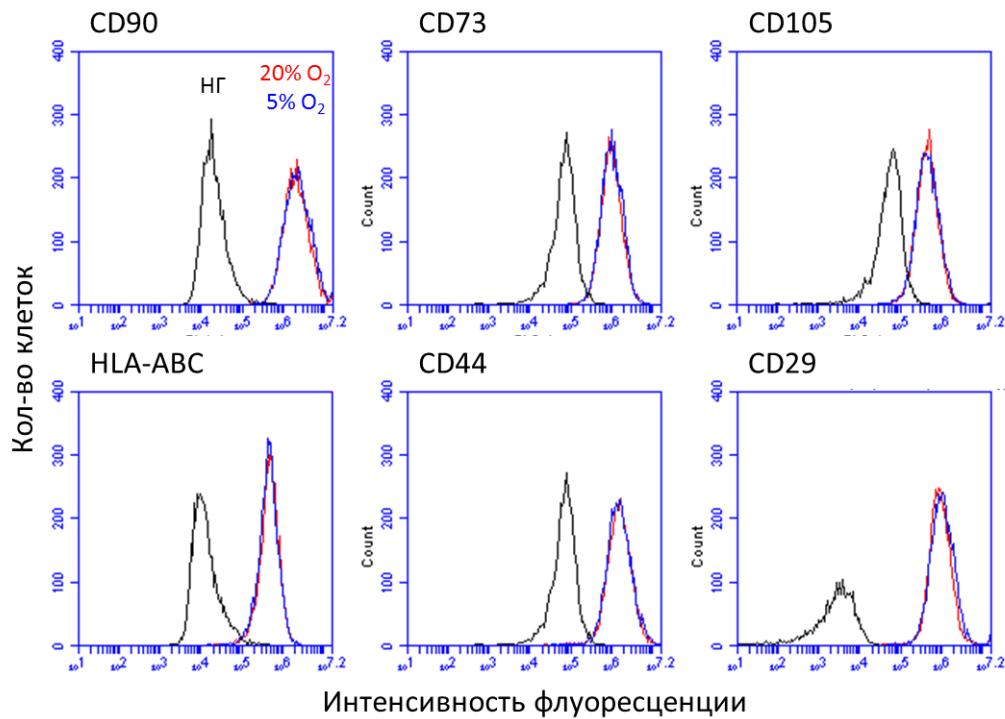


Рисунок 23. Иммунофенотип МСК на поздних пассажах (p21-23), длительно культивируемых при различном содержании кислорода. НГ – негативный контроль (МСК без добавления специфических антител).

### *Потенциал к дифференцировке*

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.

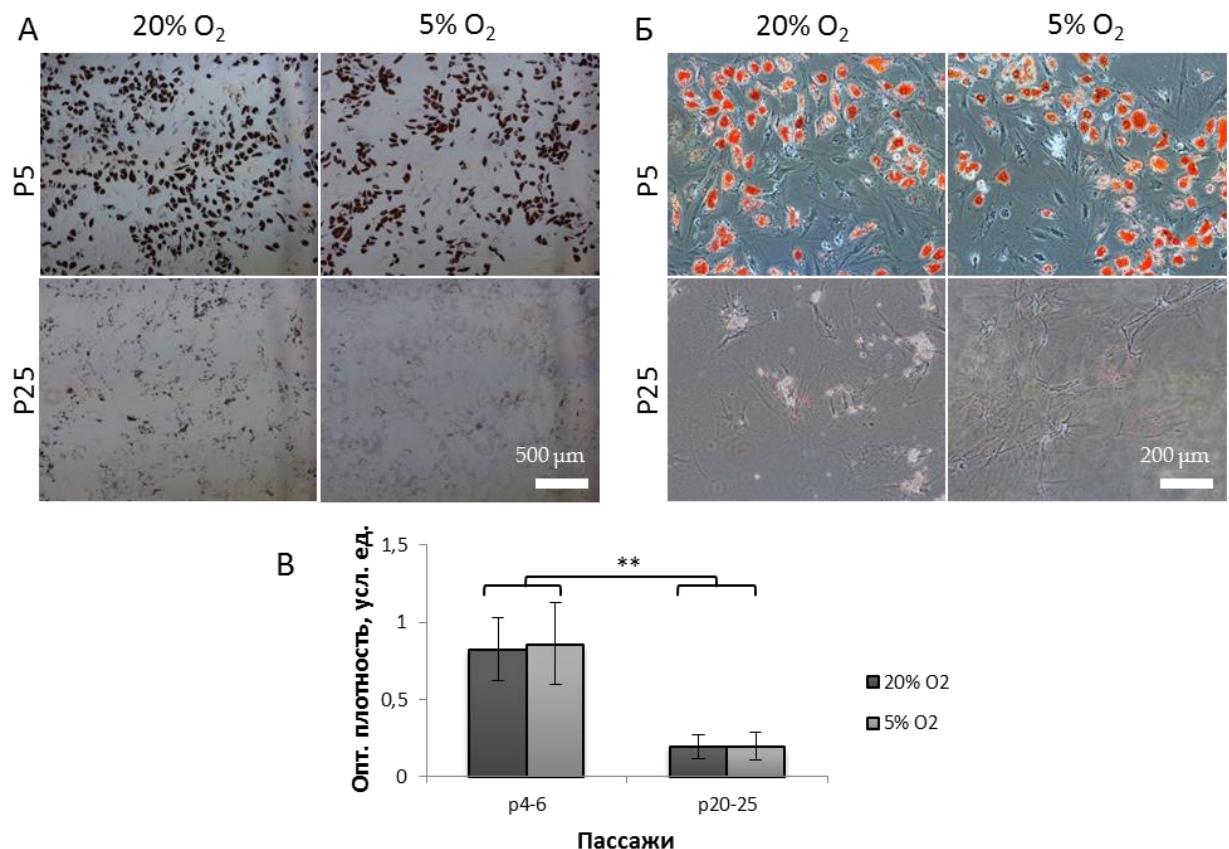


Рисунок 24. Выявление липидных включений при помощи масляного красного для оценки дифференцировки жтМСК в адипогенном направлении через 18 дней после добавления в среду культивирования соответствующего индуктора. Анализировали клетки на ранних и поздних пассажах при длительном культивировании в условиях с различным содержанием кислорода: А и Б – световая микроскопия при различном увеличении; В – количество связавшегося красителя, оцененное при помощи спектрофотометрии. Данные представлены как  $M \pm SD$ ,  $n \geq 4$ , \*- $p \leq 0,05$ , \*\*- $p \leq 0,01$ .

Анализ интенсивности образования липидных включений в МСК на поздних пассажах выявил почти полное отсутствие адипогенного потенциала (рис. 24). На микрофотографиях при большом увеличении можно отметить лишь отдельные клетки с мельчайшими включениями липидов, в то время как на ранних пассажах крупные липидные конгломераты занимают большую часть объема клетки (рис. 24Б). Для количественной оценки связавшийся краситель Oil Red (масляный красный) растворяли

изопрапонолом и анализировали с помощью спектрофотометра (рис. 24В). Показано значительное снижение интенсивности окраски на поздних пассажах.

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, что отчетливо видно на микрофотографиях (рис. 25А, Б) и подтверждается спектрофотометрическим методом оценки растворенного в ДМСО красителя (рис. 25В). При этом, стоит также отметить значительные различия в морфологии минерализованного матрикса между МСК ранних и поздних пассажей (рис. 25А, Б)

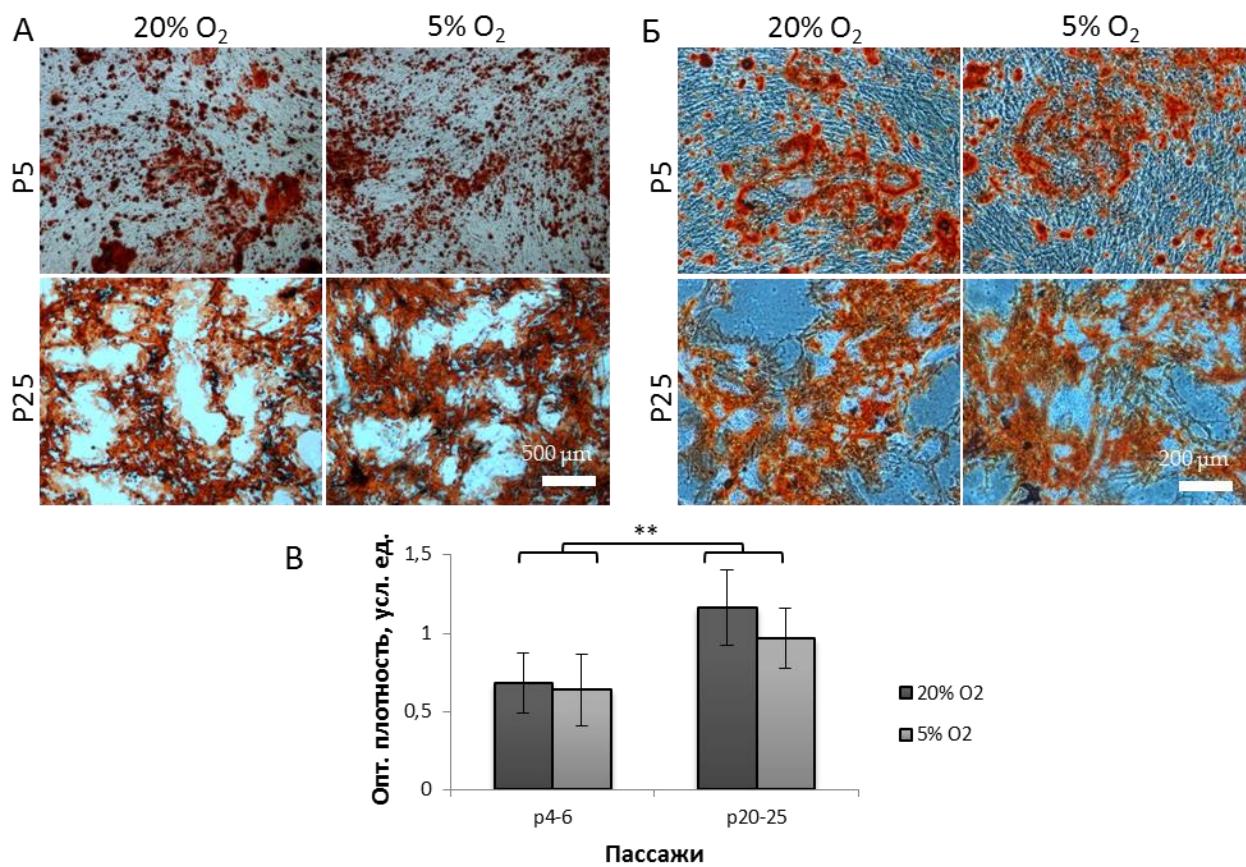


Рисунок 25. Выявление кальцифицированного матрикса при помощи ализаринового красного для оценки дифференцировки жтМСК в остеогенном направлении через 21 день после добавления в среду культивирования соответствующего индуктора. Анализировали клетки на ранних и поздних пассажах при длительном культивировании в условиях с различным содержанием кислорода: А и Б – световая микроскопия при различном увеличении; В – количество связавшегося красителя, оцененное при помощи спектрофотометрии. Данные представлены как  $M \pm SD$ ,  $n \geq 4$ , \* $-p \leq 0,05$ , \*\* $-p \leq 0,01$ .

Несмотря на то, что окраска ализариновым красным выявила отчетливое усиление минерализации матрикса клеток поздних пассажей, анализ активности щелочной фосфатазы, раннего маркера остеодифференцировки, указывал на снижение остеогенного потенциала сенесцентных МСК (рис. 26). Таким образом, используемые методы оценки приводили к противоречивым результатам.

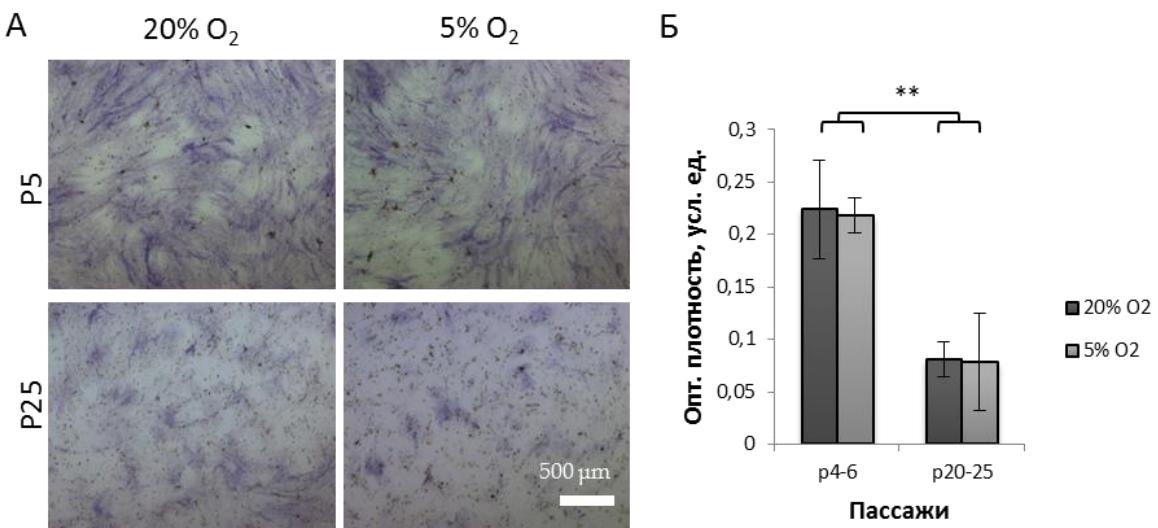


Рисунок 26. Выявление щелочной фосфатазы в жтМСК на ранних и поздних пассажах при длительном культивировании в условиях с различным содержанием кислорода: А – световая микроскопия; Б – количественная оценка окраски при помощи спектрофотометрии. Данные представлены как  $M \pm SD$ ,  $n \geq 3$ , \*- $p \leq 0,05$ , \*\*- $p \leq 0,01$ .

Для более детального анализа была проанализирована экспрессия генов ключевых регуляторов дифференцировки, транскрипционных факторов *RUNX2* и *PPAR $\gamma$* , в МСК не подвергнутых воздействию индукторов дифференцировки. Остеогенный и адипогенный пути дифференцировки являются взаимоисключающими и подавляют друг друга. На молекулярном уровне баланс между ними регулируется многочисленными пересекающимися сигнальными путями, которые сходятся на регуляции двух основных факторов транскрипции: *PPAR $\gamma$*  (peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ ) и *RUNX2* (Runt-related transcription factor 2). *PPAR $\gamma$*  считается основным регулятором адипогенеза, в то время как *RUNX2* позитивно регулирует ряд генов остеобластного пути. Вместе они в значительной степени ответственны за интеграцию сигналов различных цитокинов и определение направления дифференцировки. Как правило, повышенная экспрессия

одного фактора транскрипции связана с подавлением другой (Valenti et al., 2011; Zhang et al., 2006; James, 2013). Известно, что такие сигнальные пути как Wnt, HH (Hedgehog) и NELL-1 проявляют проостеогенные свойства (James et al., 2011), в то время как другие, включая FGF-2 (Xiao et al., 2010), TGF $\beta$ 1 (Lee, Kim, Li et al., 2000; Choy et al., 2000) и Notch (Ugarte et al., 2009), позитивно регулируют адипогенез. Также ряд сигнальных путей, например IGF и BMP, обладает плейотропным действием и способен проявлять проостеогенные или проадипогенные свойства в зависимости от условий (Noël et al., 2004; Wang, Mu, Fan et al., 2012; James, 2013; Chen et al., 2016).

Анализ экспрессии *PPAR $\gamma$*  выявил снижение уровня мРНК адипогенного регулятора более чем в 10 (рис. 27). Значительных изменений транскрипционной активности *RUNX2*, при этом, не обнаружено, что осложняет возможность сделать конкретные выводы об остеокоммитированности сенесцентных МСК в нашей экспериментальной модели.

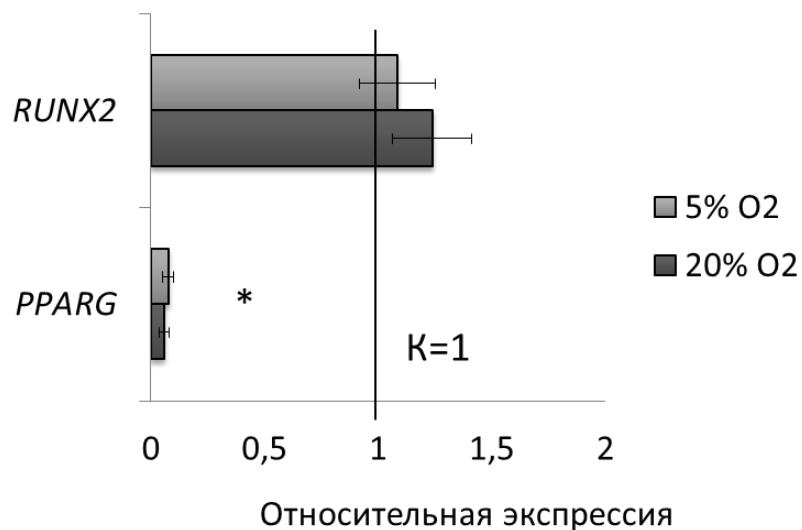


Рисунок 27. Экспрессия генов ключевых регуляторов остео- и адиподифференцировки на поздних пассажах (p24-27) относительно ранних (p4-6) при соответствующем уровне кислорода. Данные представлены как  $M \pm SD$ ,  $n \geq 4$ , \*- $p \leq 0,05$  (относительно K), K – жтМСК ранних пассажей (p4-6) при соответствующем уровне кислорода.

Ряд работ демонстрирует, что при старении способность МСК к дифференцировке снижается, а баланс между остеогенным и адипогенным направлениями нарушается,

однако детали этого процесса по-прежнему вызывают споры. Некоторые исследования показали, что остеогенный потенциал МСК постепенно ухудшается с увеличением длительности культивирования или у старых животных (Banfi et al., 2000; Moerman et al., 2004). Другие работы не обнаруживают подобных изменений или даже указывают на противоположный результат и сообщают об усилении остеогенных свойств. (Wagner et al., 2008; Digirolamo et al., 1999). Столь неоднозначные результаты, получаемые разными научными группами, обычно объясняют различными экспериментальными моделями и методологическими подходами, а также отсутствием достаточно однозначных тестов на остеогенную дифференцировку (Cheng et al., 2011, Kim et al., 2012). Как уже было сказано, наиболее оптимальным показателем остеогенной дифференцировки *in vitro* является минерализация матрикса, которую можно выявить при помощи ализаринового красного. Однако увеличенная клеточная гибель может определить более высокую степень окрашивания данным соединением, что приводит к ложноположительным результатам, вследствие выхода большого количества кальция из погибающих клеток и его связывания с матриксом (Turinotto et al., 2016). Даный факт может быть объяснением обнаруженных нами различий в морфологии минерализованного матрикса между культурами ранних и поздних пассажей (рис. 25 А, Б). Как известно, при клеточном старении значимо повышается доля нежизнеспособных клеток, показанная, в том числе, и в данной работе, затрудняя, таким образом, интерпретацию результатов, получаемых с помощью метода окраски ализариновым красным.

Особое внимание стоит уделить и сложной регуляции ключевых транскрипционных факторов дифференцировки - RUNX2 и PPAR $\gamma$ . Как было описано ранее, данные факторы могут реципрокно регулироваться значительным количеством сигнальных путей, которые могут по-разному изменяться в различных модельных системах клеточного старения. Так, показано, что PPAR $\gamma$  может негативно регулировать RUNX2 на уровне транскрипции через подавление активности Wnt-сигнального пути (Shockley et al., 2009; Rahman et al., 2012; Stechschulte and Lecka-Czernik 2017). Таким образом, сохранение уровня экспрессии RUNX2 на поздних пассажах может быть обусловлено снижением репрессивного действия со стороны PPAR $\gamma$ . Вероятно, при старении происходит общее подавление активности обоих факторов, но в силу наличия негативной регуляции RUNX2 со стороны PPAR $\gamma$ , снижение активности адипогенного регулятора может оказывать компенсаторное действие на уровень экспрессии гена проosteогенного фактора транскрипции (рис. 28). В таком случае еще одна причина различий в получаемых данных по остеогенному потенциалу МСК может быть обусловлена колебаниями баланса между этими разнонаправленными процессами.

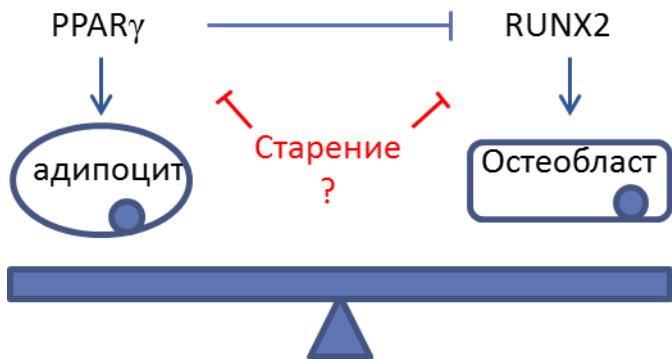


Рисунок 28. Гипотетическая схема определения пути дифференцировки МСК при старении.

Помимо прочего стоит отметить, что PPAR $\gamma$  активирует ряд генов, отвечающих за метаболизм липидов и поддержание уровня глюкозы. Этот белок ответственен за накопление жирового слоя и развитие связанной со старением невосприимчивости к инсулину, также он подавляет хроническое воспаление, сопровождающее старение (Masternak and Bartke, 2007; Cha et al., 2007; Lee et al., 2010, Москалев и др., 2016). Кроме того, геропротекторное действие PPAR $\gamma$  при старении обеспечивается благодаря индукции аутофагии, необходимой для поддержания клеточного гомеостаза (Lee et al., 2015). У мышей с пониженным уровнем экспрессии гена PPAR $\gamma$  в жировой ткани или во всем теле наблюдается ускоренное старение (Argmann et al., 2009). При этом повышение активности белка PPAR $\gamma$  у старых крыс приводит к ослаблению возрастного увеличения окислительного стресса и воспаления в почках (Sung et al., 2006; Москалев и др., 2016).

#### **Характеристика состояния клеточных органелл и уровня окислительных процессов**

Следующим этапом работы было изучение функционального состояния внутриклеточных органелл МСК, выделенных из жировой ткани человека, при достижении сенесцентного состояния, а также влияния на них уровня кислорода.

#### *Mитохондрии*

Митохондрии представляют собой главный источник энергии клетки и имеют собственную кольцевую ДНК (мтДНК), которая кодирует компоненты дыхательной цепи и системы окислительного фосфорилирования. В митохондриях происходит окисление органических веществ до воды и углекислого газа с последующим синтезом АТФ. В

процессе окисления субстрата по разные стороны внутренней мембраны митохондрии формируется градиент концентрации ионов водорода, определяющий наличие трансмембранных потенциалов. Межмембранные пространства митохондрий заряжены положительно, а матрикс – отрицательно. Таким образом, запасенная энергия используется для синтеза АТФ. Помимо этого, митохондрии представляют собой одно из основных звеньев, интегрирующих различные сигналы, которые участвуют в активации или подавлении апоптоза и аутофагии. Смещение трансмембранного потенциала может служить признаком происходящих в клетке функциональных изменений.

Для анализа морфологии и функциональной активности внутриклеточных компартментов на сегодняшний день активно используют различные флуоресцентные метки, в том числе флуоресцентные зонды. В нашей работе изменения среднего трансмембранного потенциала митохондрий в клетке оценивали при помощи потенциал-зависимого зонда MitoTracker Red FM с применением методов проточной цитофлуориметрии. Полученные данные показали снижение средней флуоресценции данного зонда в МСК поздних пассажей относительно ранних (рис. 29А). При этом было обнаружено снижение митохондриального потенциала в клетках, постоянно культивируемых при 5% O<sub>2</sub>. Влияние уровня оксигенации отмечено на обоих анализируемых этапах культивирования МСК (рис. 29А).

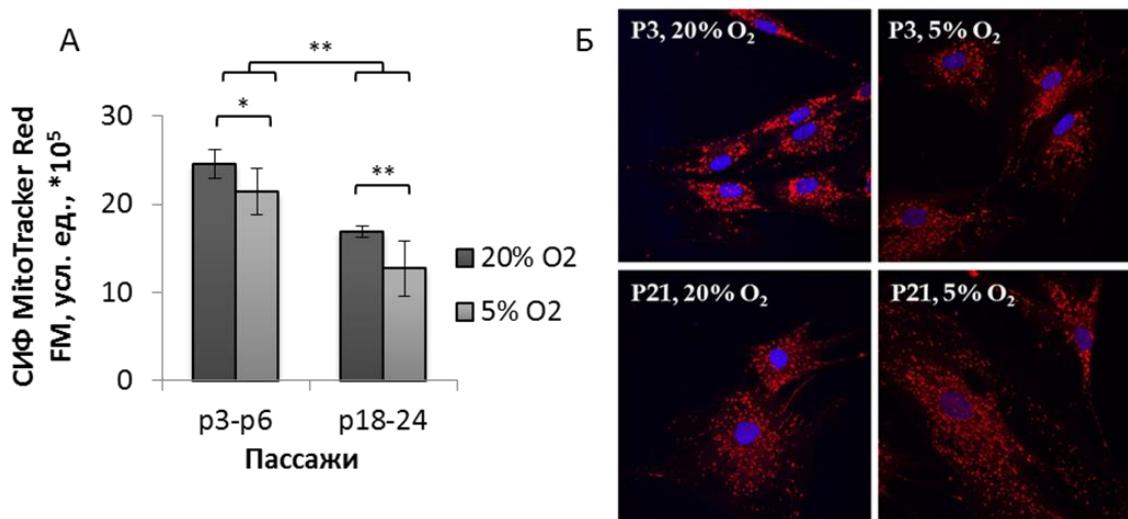


Рисунок 29. Оценка митохондриального компартмента МСК на ранних и поздних пассажах при длительном культивировании в условиях с различным содержанием кислорода: А - средняя интенсивность флуоресценции MitoTracker Red FM, проточная цитофлуориметрия; Б - конфокальная микроскопия. Данные представлены как  $M \pm SD$ ,  $n \geq 5$ ,

\*- $p \leq 0,05$ , \*\*- $p \leq 0,01$ .

Данные, полученные с помощью конфокальной микроскопии (рис. 29Б), указывают на различия в морфологии митохондриального компартмента в зависимости от уровня кислорода. Так, при 20% O<sub>2</sub> митохондрии крупнее и располагаются диффузно, в то время как при 5% O<sub>2</sub> более характерны мелкие митохондрии, выстраивающиеся в линии.

Анализ литературных данных показал, что исследователи по-разному оценивают роль митохондрий в развитии старения. Некоторые авторы не находят аномалий в функционировании ЭТЦ и процессах окислительного фосфорилирования в сенесцентных клетках. При этом они предполагают увеличение количества митохондрий или изменения в функционировании митохондриальных белков, что коррелирует с повышением мембранныго потенциала (Lee, Yin, Lu, et al., 2000). В более поздних работах отмечено снижение мембранныго потенциала при старении, что связывают с повреждением ЭТЦ (Passos et al., 2010). Тем не менее, и те и другие указывают на повреждающую активность АФК, продуцируемых митохондриями.

Согласно мнению ряда исследователей, митохондрии, продуцируя АФК, играют одну из центральных ролей в клеточном старении и его неодинаковом проявлении в одних и тех же клеточных линиях. Более того, в своих работах они продемонстрировали зависимость длины теломер от функционального состояния митохондриального аппарата. Данный факт позволил им предположить, что клеточное старение не настолько запрограммированный укорочением теломер процесс как принято считать, и имеет довольно большую «случайную» составляющую, опосредованную воздействием митохондриальных АФК (Passos et al., 2007).

### *АФК*

АФК являются важным элементом процессов, происходящих во время репликативного старения. Они представляют собой высокоактивные молекулы, способные вызывать перекисное окисление белков и липидов, повреждения ДНК. С другой стороны, АФК являются одним из индукторов апоптотического каскада, а также выполняют сигнальную функцию. В норме в клетке постоянно образуются АФК. В основном они являются побочным продуктом, появляющимся в митохондриях в процессе функционирования электрон-транспортной цепи. Для предотвращения повреждений внутриклеточных компартментов служат антиоксидантные системы, активность которых с возрастом может снижаться (Papa and Skulachev, 1997; Addabbo et al., 2009).

Детекцию активных форм кислорода в МСК проводили при помощи методов проточной цитофлуориметрии с применением флуоресцентных зондов, способных реагировать с АФК. Согласно полученным данным, при репликативном старении МСК

уровень внутриклеточных АФК увеличивается (рис. 30 А, 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. 30 В)

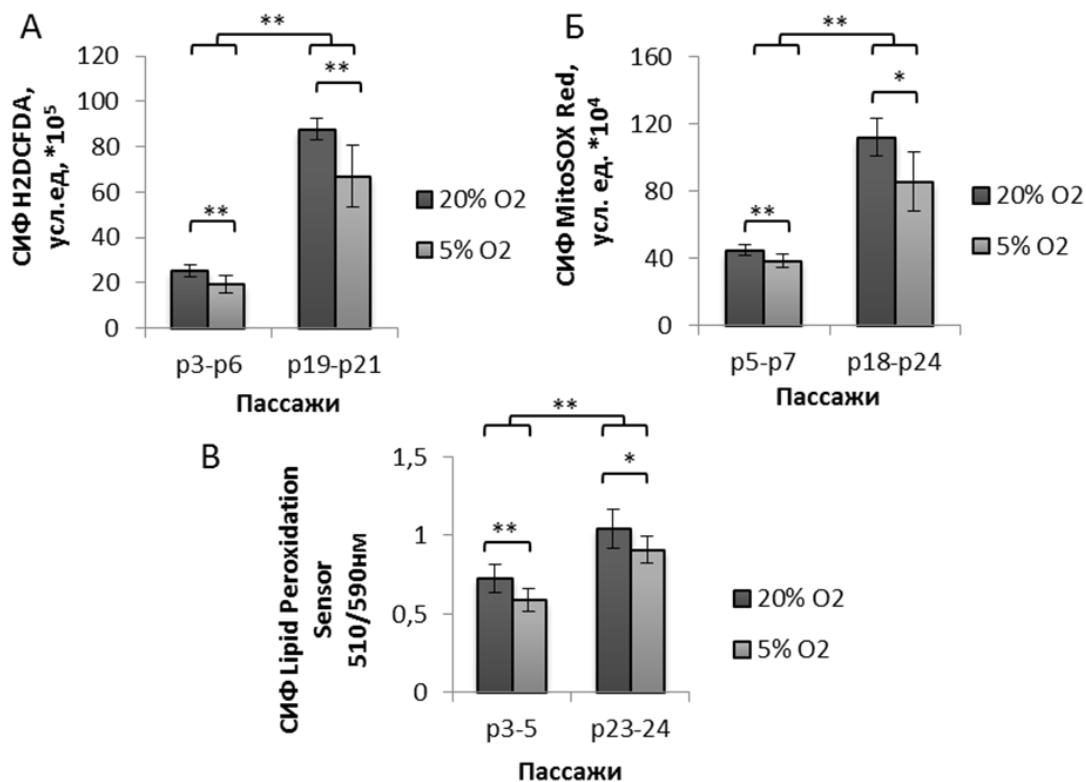


Рисунок 30. Уровень окислительного стресса в жтМСК на ранних и поздних пассажах при длительном культивировании в условиях с различным содержанием кислорода: А - средняя интенсивность флуоресценции зонда H2DCFDA, детектирующего общий уровень активных форм кислорода; Б - средняя интенсивность флуоресценции зонда MitoSox Red, детектирующего уровень супероксид аниона митохондрий; В – уровень перекисного окисления липидов. Данные представлены как  $M \pm SD$ ,  $n \geq 5$ , \*- $p \leq 0,05$ , \*\*- $p \leq 0,01$ .

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% O<sub>2</sub>) привело к уменьшению количества детектируемых АФК (рис 30А). Схожие тенденции были обнаружены при анализе содержания супероксид-аниона (СОА), который является

одной из наиболее опасных форм АФК (рис. 30Б). СОА в больших количествах генерируется в митохондриях, где может повреждать митохондриальную ДНК и способствовать нарушению синтеза белков, участвующих в переносе электронов в электрон-транспортной цепи (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).

### *Лизосомы*

Другой немаловажной органеллой при изучении клеточного старения является лизосома. Лизосомы участвуют в аутофагических процессах, выполняя функцию утилизации широкого спектра органических частиц, в том числе дефектных белков и поврежденных органелл. Для выполнения этой функции данные органеллы содержат множество гидролитических ферментов, включая протеазы, липазы, нуклеазы, гликозидазы, фосфолипазы, фосфатазы и сульфатазы, которые обычно достигают максимальной ферментативной активности при низком рН. Кислая среда лизосом ( $\text{pH} \leq 5$ ) поддерживается вакуолярной АТФазой, которая перекачивает протоны из цитоплазмы в лизосомальный просвет (Mindell, 2012; Gómez-Sintes et al., 2016).

Для исследования активности лизосомального компартмента был использован зонд LysoTracker Green DND-26, который селективно накапливается в везикулах с пониженным рН, главным образом – в лизосомах. В результате проведенных исследований было показано повышение флуоресценции данного зонда в МСК на поздних пассажах (рис. 31). Это может быть связано с увеличением количества лизосом, что дополнительно подтверждается повышением гранулярности клеток (рис. 21В).

Как уже обсуждалось выше, свободные радикалы образуются в результате нормального метаболизма и накапливаются в течение всей жизни, что приводит к характерному накоплению окисленных белков, липидов и ДНК в старых тканях. Это особенно очевидно в постмитотических клетках, где отсутствие клеточного деления предотвращает «разбавление» поврежденных клеточных компонентов. В настоящее время считается, что старение приводит к снижению общей способности клеток к деградации и сопровождается общим снижением активности протеасом и лизосом (Reeg and Grune, 2015). Более того, некоторые возрастные изменения могут сделать лизосомы чувствительнее к стрессу, увеличивая вероятность пермеабилизации лизосомальной мембранны и последующей клеточной гибели, вследствие высвобождения катепсинов в цитоплазму. У большинства клеток наблюдается возрастное увеличение количества и

размера лизосом. При этом увеличение размера органеллы сопряжено с повышением ее уязвимости для различных повреждений (Kurz et al., 2000; Ono et al., 2000; Gómez-Sintes et al., 2016). Кроме того, в старых лизосомах наблюдается накопление неразлагаемого материала, который состоит из окисленных макромолекул, подвергнутых вторичным модификациям, что делает их менее восприимчивыми к действию кислых гидролаз. Эти посттрансляционные модификации включают перекисное окисление липидов и карбонилирование белков.

Наиболее известным примером является липофусцин, также известный как возрастной пигмент, который используется в качестве маркера старения. Липофусцин преимущественно накапливается внутри лизосом и его образование ускоряется реакциями Фентона, которые происходят внутри этих органелл в ответ на окислительный стресс. Вероятно, повышенное накопление липофусцина в лизосоме может изменить его деградационную функцию (Brunk and Terman, 2002). В то же время, накопление липофусцина вызывает дестабилизацию лизосом, что подтверждается недавними исследованиями (Reeg and Grune, 2015; Gómez-Sintes et al., 2016). Стоит отметить, что органеллы с липофусцином при этом остаются кислыми, туда даже продолжают поступать гидролитические ферменты, хотя свои функции по расщеплению уже не выполняют. Данный факт стал обоснованием идеи, согласно которой при старении функциональная активность лизосом снижается, что ведет к накоплению «неправильных» белков и целых клеточных структур вроде дефектных митохондрий (Brunk and Terman, 2002). В то же время исследования на линии клеток HeLa также показали рост флуоресценции зонда LysoTracker при различных стрессовых воздействиях и подтвердили повышение противомикробной и апоптотической функции выделенных лизосом (Yoon et al., 2011), а изучение гидролитических ферментов указывает на рост их активности (Knaś et al., 2012).

Таким образом, детектируемое увеличение флуоресценции зонда LysoTracker Green DND-26 может быть доказательством повышения активности аутофагических процессов, ассоциированных с функциональной активностью лизосомального компартмента, при старении, что является реакцией клетки на постепенное увеличение количества дефектных структур. При этом утилизирующий потенциал клетки ограничен, тогда как количество внутриклеточного «мусора» продолжает расти, что ведет к постепенному увеличению включений с липофусцином и сокращению реальной способности клетки к аутофагии. Таким образом, обнаруженное повышение вакуолизации цитоплазмы сенесцентных МСК может являться одним из следствий усиления аутофагических процессов и накопления «неперевариваемых» лизосомальных гранул.

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. 31).

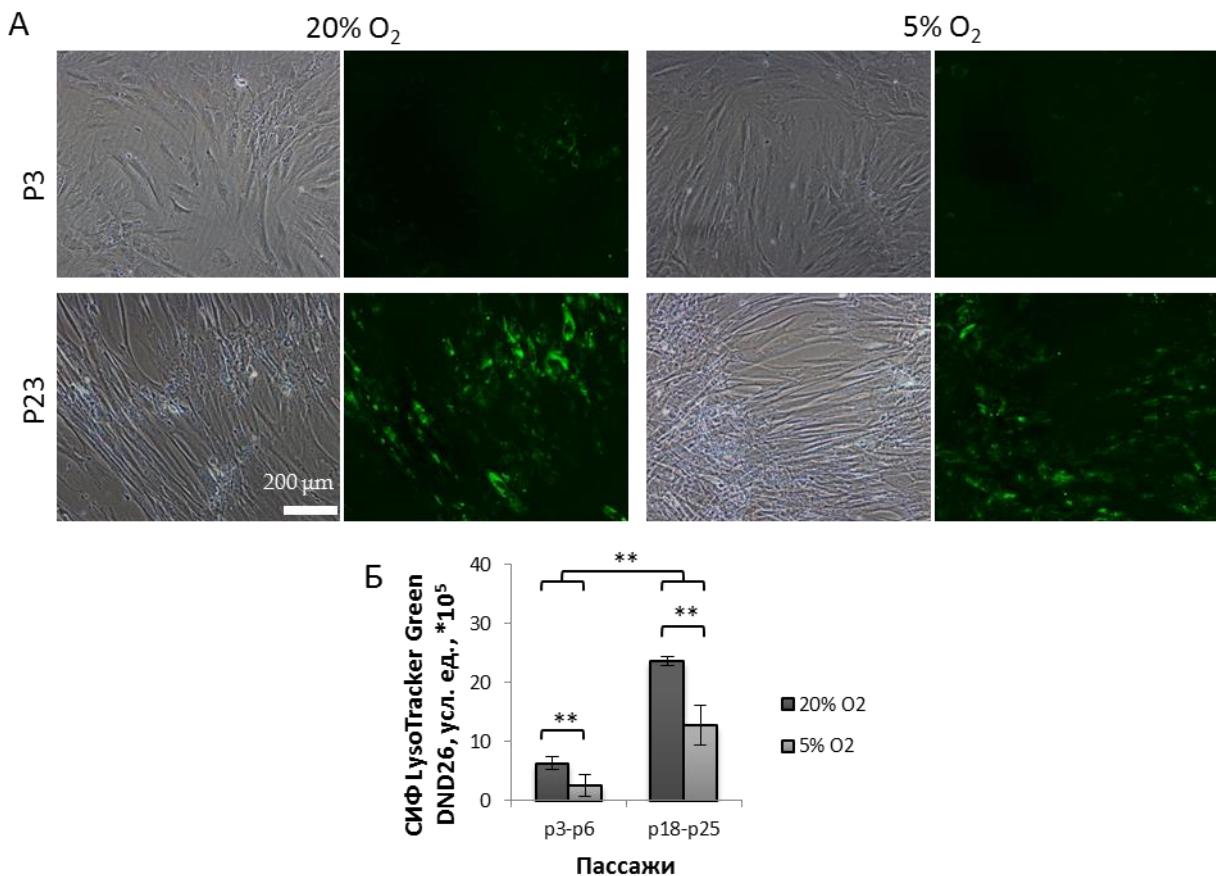


Рисунок 31. Средняя интенсивность флуоресценции LysoTracker Green DND26 в МСК на ранних и поздних пассажах при длительном культивировании в условиях с различным содержанием кислорода. Данные представлены как  $M \pm SD$ ,  $n \geq 5$ , \* $-p \leq 0,05$ , \*\* $-p \leq 0,01$ .

Согласно литературным данным основными источниками АФК, как и их ближайшими мишениями, являются активные митохондрии (Brunk and Terman, 2002). Повреждение данных органелл вызывает биогенез лизосом для их утилизации и, таким образом, запускает постепенное накопление кислых включений с липофусцином. Падение же утилизирующей способности клетки ведет к накоплению дефектных митохондрий, что усиливает продукцию внутриклеточных АФК, замыкая цикл. Культивирование МСК при 5% O<sub>2</sub> вызывало снижение детектируемой флуоресценции LysoTracker Green DND-26 в 1.5-2 раза (рис. 31). Стоит напомнить, что, согласно полученным данным, при 5%

кислорода также снижался уровень АФК (рис. 30) и митохондриальная активность (рис. 29). Таким образом, снижение содержания кислорода в среде культивирования, вероятно, позволяет снизить скорость появления дефектных структур, возникающих вследствие оксидативных повреждений, и замедлить проявление негативных эффектов старения (рис. 32). В этом случае общий объем кислых лизосомальных включений может косвенно указывать на количество поврежденных внутриклеточных структур. Некоторые исследования также указывают на прямую зависимость между уровнем кислорода в атмосфере культивирования и скоростью накопления липофусцина сердечных миоцитах крысы (Sohal et al., 1989).

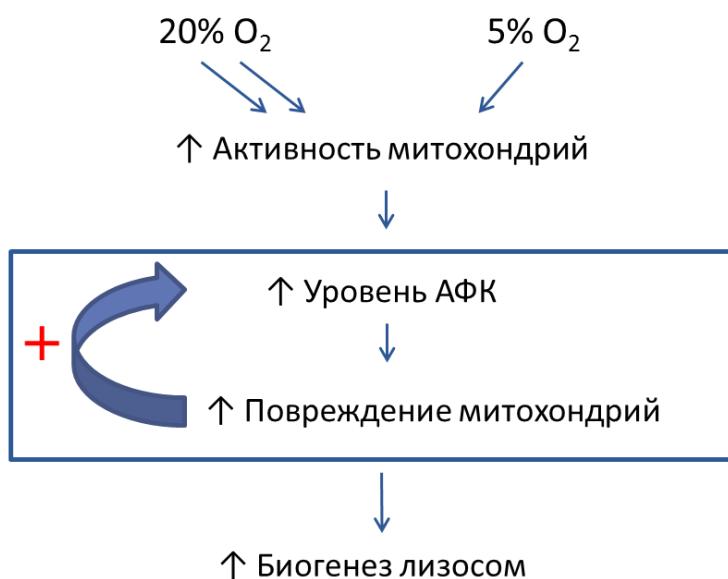


Рисунок 32. Гипотетическая схема влияния уровня оксигенации на окислительные процессы и состояние внутриклеточных органелл МСК.

### Параокринные медиаторы

Старение на уровне организма не представляет собой прямого следствия клеточного старения. В экспериментах на мышах было показано, что у молодых особей доля сенесцентных клеток — 8%, а у старых грызунов данный показатель стремится к 17%. При этом, в ряде органов, таких как сердце и почки, доля клеток с признаками клеточного старения в течение жизни не изменялась (Wang et al., 2009). Следовательно, старение организма сложнее суммы старений его отдельных клеток, что является, в том числе, следствием нарушений межклеточных взаимодействий (López-Otín et al., 2013).

Оценку основных провоспалительных элементов SASP МСК проводили при помощи иммуноферментного анализа (ИФА). При длительном культивировании в кондиционированной среде выявили постепенное повышение концентрации цитокина IL-6 с увеличением длительности поддержания культуры (рис. 33). Данные по продукции культурами IL-8 не показали достоверных различий содержания данного цитокина между ранними (р2-6) и средними (р10-17) пассажами. Тем не менее, на поздних пассажах обнаруживалось значимое повышение продукции IL-8. Достоверно влияния уровня оксигенации на содержание данных цитокинов в среде культивирования отмечено не было (рис. 33).

Другими немаловажными паракринными агентами, в контексте изучения МСК, являются VEGFa и TGF $\beta$ . Данные белки относятся к антиапоптотическим факторам, при этом VEGFa обладает ярко выраженным проангиогенным действием, а TGF $\beta$  проявляет иммуномодуляторные свойства (Meirelles et al., 2009). Исследование влияния репликативного старения на продукцию VEGFa показало, что максимальное содержание данного фактора в среде культивирования детектируется на средних пассажах (р10-17). При этом не выявлено значимых отличий между гипоксическими (5% O<sub>2</sub>) и нормоксическими (20% O<sub>2</sub>) условиями на ранних (р2-6) и средних (р10-17) пассажах (рис. 33). Анализ содержания в среде TGF $\beta$  указывает на отсутствие выраженной зависимости продукции данного цитокина от этапа культивирования. Однако обнаружено значимое снижение концентрации TGF $\beta$  при культивировании МСК в условиях с пониженным содержанием O<sub>2</sub> (5%) на всех исследуемых пассажах (рис. 33). Некоторые исследователи считают, что TGF $\beta$ 1 может выступать в качестве индуктора клеточного старения (Senturk et al. 2010).

Сигнальный путь трансформирующего ростового фактора бета (TGF $\beta$ ) вовлечен во многие клеточные процессы, такие как рост, дифференциация, апоптоз, поддержание гомеостаза (Aschner and Downey, 2016). Рецепторы TGF $\beta$  фосфорилируют транскрипционные факторы SMAD, которые регулируют экспрессию генов-мишеней, таких как *FOXO3*, *TERT*, *MYC*, *CDKN2B*, *CDKN1A*, *APP*, *TNC*, *MET* (Weiss and Attisano, 2013, Москалев и др., 2016). Эти гены обеспечивают дифференцировку остеобластов, нейрогенез, центральную специализацию мезодермы, развитие гонад, ангиогенез, неогенез внеклеточного матрикса, участвуют в аресте G1-фазы клеточного цикла и во многих других процессах (Hannon and Beach, 1994). TGF $\beta$ 1 обеспечивает индукцию генов-маркеров клеточного старения и участвует в формировании сенесцентного фенотипа клеток в условиях окислительного стресса (Frappiat et al., 2002). В исследованиях на нематодах было показано, что выключение гена, кодирующего гомолог TGF $\beta$ , приводит к

увеличению продолжительности жизни (Shaw et al., 2007) и продлению репродуктивного периода животных (Luo et al., 2009). В то же время полиморфизм в кодирующей TGF $\beta$ 1 последовательности ассоциирован с долголетием у человека (Carrieri et al., 2004, Москалев и др., 2016 ).

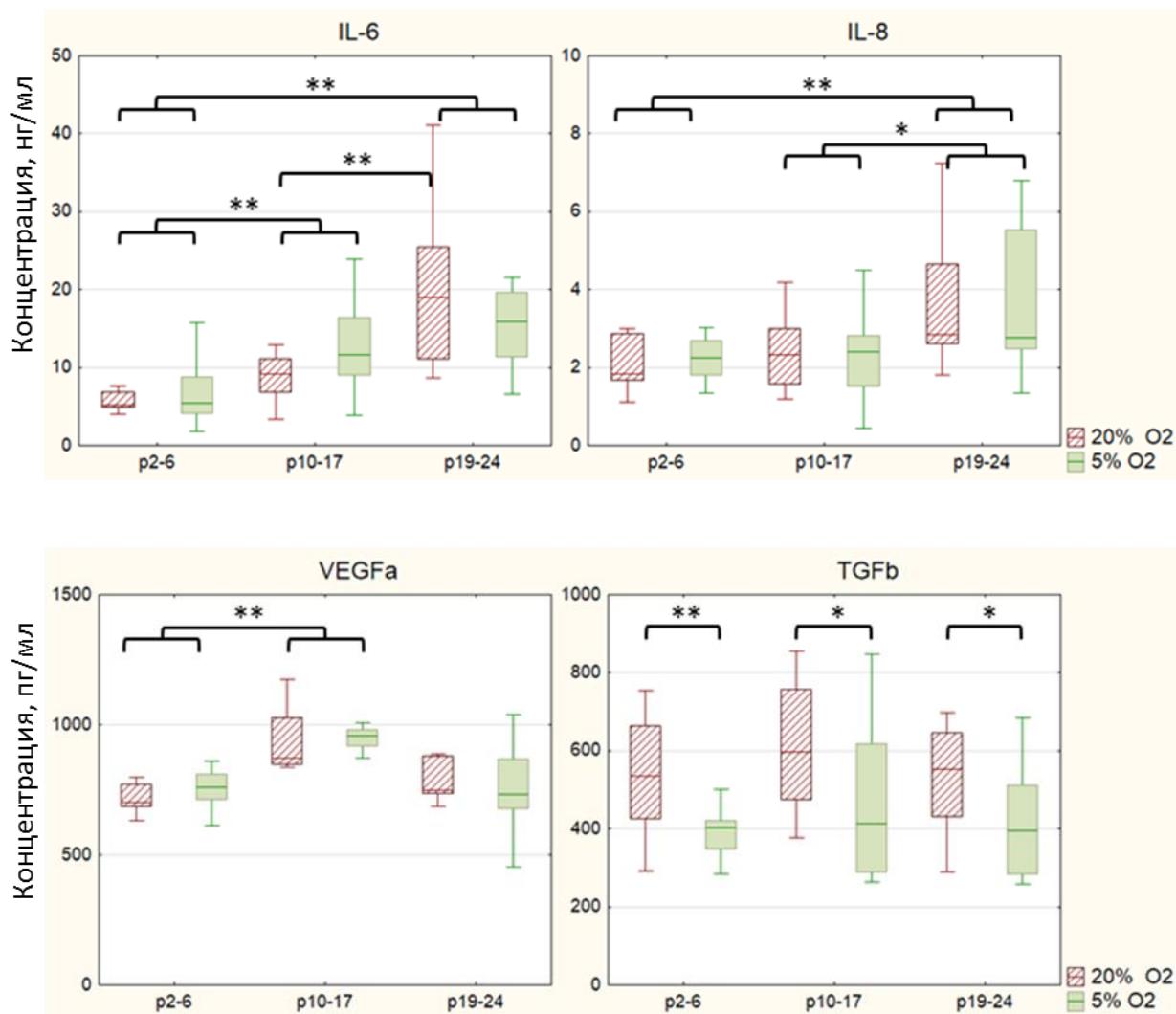


Рисунок 33. Концентрация цитокинов в кондиционированной среде жтМСК при длительном культивировании в условиях с различным содержанием кислорода. Данные представлены как Boxplots (медиана, интерквартильное расстояние, минимальное и максимальное значения),  $n \geq 10$ , \* $-p \leq 0,05$ , \*\* $-p \leq 0,01$ .

В случае анализа эффектов клеточного старения на секреторную активность стоит учитывать различия скорости клеточного прироста, так как пролиферативная активность сенесцентных клеток значительно снижена. В наших экспериментах, также, на

пролиферацию влиял и уровень оксигенации. Таким образом, чтобы определить секреторную активность клеток и нивелировать различия в общей концентрации секрецируемых агентов, возникающих вследствие разной плотности клеточного слоя, было определено отношение концентрации паракринных медиаторов на  $10^5$  клеток на чашке (рис. 34). Данный подход подтвердил обнаруженные тенденции изменений по провоспалительным цитокинам, а также выявил увеличение продукции VEGFa и TGF $\beta$  на поздних пассажах.

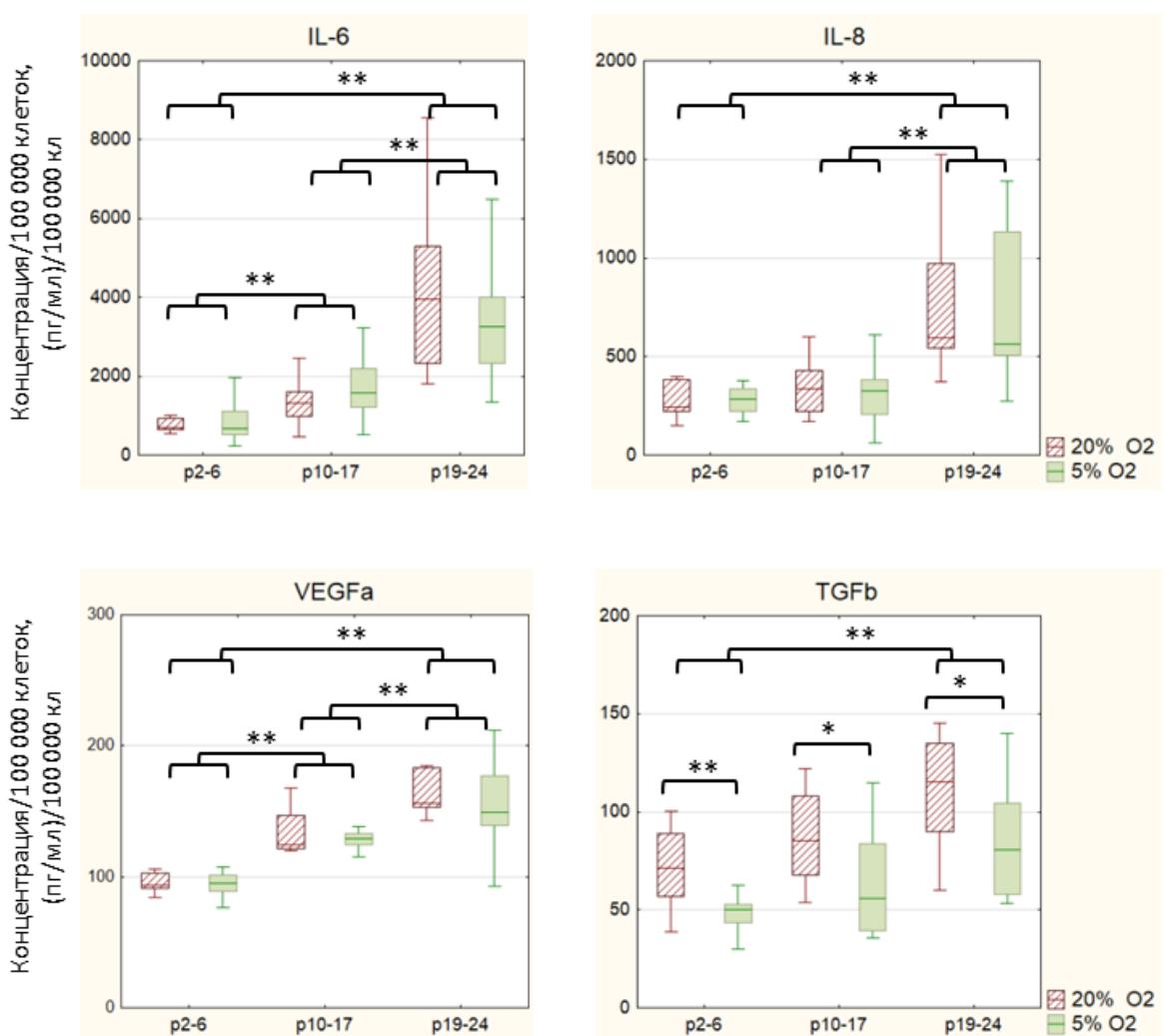


Рисунок 34. Продукция цитокинов, рассчитанная на  $10^5$  клеток. Данные представлены как Boxplots (медиана, интерквартильное расстояние, минимальное и максимальное значения),  $n \geq 10$ , \*- $p \leq 0,05$ , \*\*- $p \leq 0,01$ .

Оценка экспрессии генов ряда паракринных медиаторов сенесцентных клеток относительно ранних пассажей выявила разнонаправленные изменения (табл. 1). Отмечено повышение транскрипционной активности *TGFB1*, *VEGFA*, *FGF10*, *IL-8*, *FGF2*, *BDNF*, *GDF7*, *BMP7* в 2-6 раз. Наибольшее увеличение экспрессии (в 14 раз) было обнаружено для *IL-6*, одного из основных провоспалительных цитокинов. Вместе с тем происходит снижение транскрипционной активности, *GDF15*, *TGFB3*, *BMP6* в 2-8 раз. Особенно выражено снижение уровня мРНК *IGF1* (в 20 раз), инсулиноподобного ростового фактора, участвующего в процессах роста, развития и дифференцировки клеток, а также играющего важную роль в процессах старения. Таким образом, данные о продукции секреции белков согласуются с данными о транскрипционной активности их генов. Сенесцентные жтМСК активно экспрессируют и продуцируют провоспалительные интерлейкины (*IL-6* и *IL-8*), в то время как экспрессия генов ростовых факторов изменяется разнонаправленно.

Таблица 1. Экспрессия генов цитокинов МСК на поздних пассажах (p17-23) относительно ранних (p2-6)

Ген	Продукт гена	Относительная экспрессия гена
<i>IGF1</i>	Insulin-like growth factor 1	-20,79
<i>GDF15</i>	Growth differentiation factor 15	-7,70
<i>TGFB3</i>	Transforming growth factor beta-3	-3,74
<i>BMP6</i>	Bone morphogenetic protein 6	-2,54
<i>TGFB1</i>	Transforming growth factor beta 1	2,46
<i>VEGFA</i>	Vascular endothelial growth factor A	2,88
<i>FGF10</i>	Fibroblast growth factor 10	3,05
<i>IL8</i>	Interleukin 8	4,13
<i>FGF2</i>	Fibroblast growth factor 2	4,17
<i>BDNF</i>	brain-derived neurotrophic factor	4,19
<i>GDF7</i>	Growth differentiation factor 7	4,93
<i>BMP7</i>	Bone morphogenetic protein 7	5,42
<i>IL6</i>	Interleukin 6	14,05

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

Полученные данные указывают на то, что сенесцентные МСК 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 $\beta$ , который часто рассматривают как позитивный регулятор сенесценции (Katakura, 2006), и уровнем кислорода в атмосфере культивирования. Так, при физиологическом содержании O<sub>2</sub> (5%) продукция TGF $\beta$  оказалась ниже, чем в стандартных условиях культивирования, что может быть одной из причин сниженного количества сенесцентных клеток, детектируемых, в том числе, с помощью SA- $\beta$ -gal, при 5% O<sub>2</sub>.

### **Транскрипционная активность генов, ассоциированных со старением и реакцией на гипоксию.**

#### *Экспрессия генов, ассоциированных со старением*

В дальнейших экспериментах усилия были сосредоточены на анализе транскрипционной активности генов, ассоциированных со старением и реакцией на гипоксические условия. В первой серии опытов были изучены МСК 12 и 3 пассажей, постоянно культивируемые в различных условиях оксигенации. Анализ проводили методом количественной ПЦР с помощью системы RT<sup>2</sup> Profiler<sup>TM</sup> PCR Array Human Cellular Senescence (“Qiagen”, США). При культивировании МСК в различных условиях оксигенации на ранних пассажах не происходило существенных изменений транскрипционной активности генов, продукты которых участвуют в процессах старения,. При 20% O<sub>2</sub> по сравнению с клетками при 5% O<sub>2</sub> наблюдалось двукратное повышение экспрессии лишь двух генов из анализируемых 84 – ATM и PTEN (рис. 35).

Известно, что продукт гена ATM участвует в ответе на повреждения ДНК, а повышенная экспрессия PTEN способствует снижению пролиферативной активности клеток (Xu et al. 2015). Активация ATM-киназы, одного из эффекторов DDR (DNA Damage Response), запускает сигнальные каскады, приводящие к аресту клеточного цикла (Bakkenist and Kastan, 2004; Zhan et al., 2010). Киназа pATM фосфорилирует Chk2, которая может транслоцироваться в ядро и активировать свои мишени. Chk2 является компонентом сигнального пути, приводящего к остановке клеточного цикла преимущественно в фазе G1 в ответ на повреждение ДНК (Buscemi et al., 2004; Lukas et al.,

2003). Активированная Chk2 способна фосфорилировать p53, который может напрямую фосфорилироваться и киназой ATM (Collado et al., 2007; von Zglinicki et al., 2005).

Продукт гена PTEN, в свою очередь, является негативным регулятором пролиферации, способствует апоптозу и вызывает остановку клеточного цикла посредством подавления сигнального пути PI3K / AKT / hTERT, что было продемонстрировано на модели клеток аденокарциномы легкого A549 (Lu et al., 2016). Полученные нами данные могут указывать на то, что стандартное культивирование при 20% O<sub>2</sub> оказывает некоторое повреждающее действие на ДНК клетки и способствует снижению скорости клеточного деления, что соотносится с нашими ранее полученными результатами о пролиферативной активности и жизнеспособности.

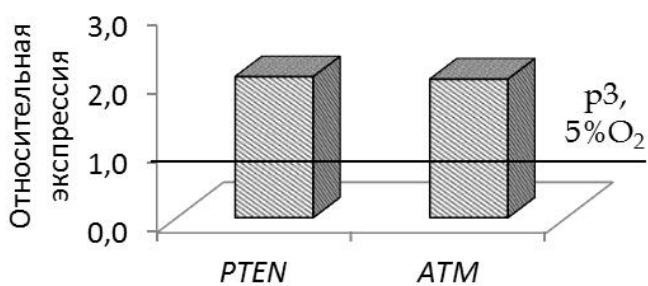


Рисунок 35. Экспрессия генов жтМСК третьего пассажа при культивировании в условиях атмосферного уровня кислорода (20%) относительно клеток, культивируемых при физиологическом содержании кислорода (5%) (20% vs 5% O<sub>2</sub>)

При изучении МСК 12-го пассажа была проведена оценка относительной экспрессии генов, ассоциированных с клеточным старением, по сравнению с клетками 3-го пассажа в аналогичных условиях оксигенации (табл. 2). При длительном культивировании увеличивалась экспрессия гена циклина D1, который, как известно, наряду с активной β-галактозидазой является одним из основных маркёров репликативного старения (Leontieva et al. 2012). Наиболее значительное возрастание количества мРНК *CCND1* наблюдали при 20% O<sub>2</sub>, что превышало значения показателей при 5% O<sub>2</sub>. Установлено, что при длительном культивировании в МСК также происходит увеличение экспрессии гена *TGFB1*, что соотносится с ранее полученными результатами касательно клеток поздних пассажей (p17-23). Белок SERPINE1, вовлеченный в ремоделирование внеклеточного матрикса, также активно экспрессируется в

сенесцентных клетках (Kortlever et al., 2006). В нашем исследовании количество мРНК данного гена изменялось аналогично *CCND1* с максимальным увеличением при 20% O<sub>2</sub>.

Таблица 2. Изменение экспрессии генов в жтМСК при длительном культивировании до 12 пассажа в условиях различного содержания кислорода

Ген	Продукт гена	20% O <sub>2</sub>	5% O <sub>2</sub>
<i>CCND1</i>	Циклин D1	8,55	2,34
<i>EGR1</i>	Фактор раннего ростового ответа 1	-4,53	-6,66
<i>GSK3B</i>	Киназа 3-бета гликогенсинтазы	-5,24	-2,44
<i>ID1</i>	Ингибитор связывания с ДНК 1	-311,61	-30,62
<i>IGF1</i>	Инсулиноподобный фактор роста 1	-83,21	-43,61
<i>MDM2</i>	Белок, связывающий p53	-5,54	-2,76
<i>PIK3CA</i>	Фосфоинозитид-3-киназа, каталитическая субъединица	-7,61	-2,31
<i>SERPINE1</i>	Ингибитор активатора плазминогена 1	7,14	3,11
<i>TERF2</i>	Связывающий теломерные повторы фактор 2	-2,33	-2,31
<i>TGFB1</i>	Трансформирующий фактор роста бета-1	3,3	3,07

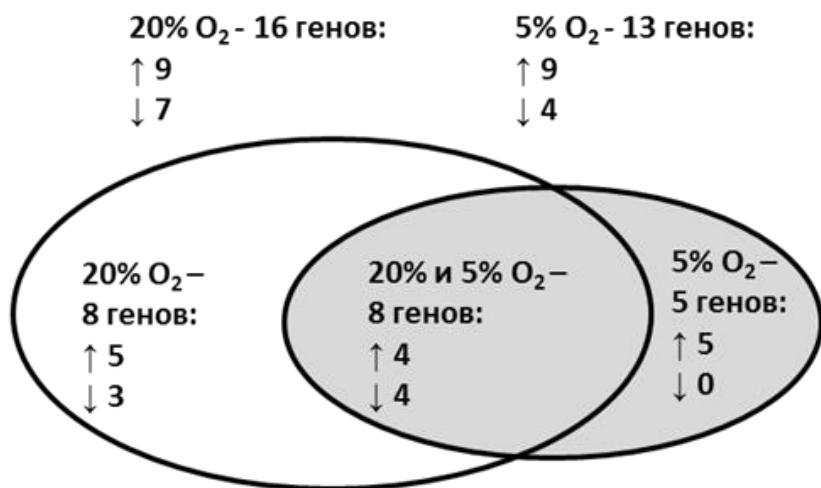
Примечание. Представлены гены, экспрессия которых достоверно ( $p < 0,05$ ) изменилась более чем в 2 раза.

Как при 20%, так и при 5% O<sub>2</sub> в клетках 12-го пассажа наблюдали пониженную экспрессию *EGR1*. Ранее на раковых клетках было показано, продукт данного гена способствует активации пролиферации путем действия на сигнальные пути β-катенина, NF-κB и AP-1(Parra et al., 2011; Sun et al., 2013). В то же время было продемонстрировано, что EGR-1 может действовать как трансактиватор p53 (Nair et al., 1997; Das et al., 2001; Yu et al., 2006). В зависимости от содержания кислорода в 5,2–2,4 раза снижался уровень мРНК гена *GSK3B*, инактивация которого индуцирует клеточное старение. Необходимо отметить, что этот фермент вовлечен также в регуляцию выживаемости клеток, клеточного деления, метаболизма глюкозы и белкового синтеза (Kim et al. 2013).

Длительное культивирование МСК на порядок и более супрессировало экспрессию генов *ID1* и *IGF1*. Известно, что продукт гена *ID1* ингибирует клеточное старение путем подавления функций p16/Ink4a (Zebedee and Hara, 2001), а *IGF1* повышает пролиферацию. Негативная регуляция экспрессии данных генов более выражена при 20% O<sub>2</sub>. В зависимости от содержания кислорода в 5,5–2,8 раза уменьшалась экспрессия гена *MDM2*, продукт которого определяет функционирование p53, а ингибирование *MDM2* приводит к старению клеток (Efeyan et al. 2007, Gannon et al. 2011).

Таким образом, при длительном культивировании МСК до 12 пассажа наиболее выраженное увеличение экспрессии генов маркеров клеточного старения (*CCND1*, *SERPINE1*) наблюдается в стандартных условиях (20% O<sub>2</sub>). При этом уменьшается уровень мРНК ингибиторов данного процесса и активаторов пролиферации (*ID1*, *IGF1*). В условиях с физиологическим уровнем кислорода (5% O<sub>2</sub>) данные изменения менее выражены.

Во второй серии опытов были изучены МСК 21 и 3 пассажей, постоянно культивируемые в различных условиях оксигенации, также с помощью системы RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Human Cellular Senescence (“Qiagen”, США). Оценку экспрессии генов МСК 21 пассажа проводили относительно МСК 3 пассажа, культивируемых в аналогичных условия оксигенации (рис. 36). Полученные результаты указывали на изменение экспрессии 16 генов (*ALDH1A3*, *CCNA2*, *CCNB1*, *CCND1*, *CDKN1C*, *CREG1*, *ID1*, *PLAU*, *SERPINE1*, *IGF1*, *CALR*, *TBX2*, *TBX3*, *CD44*, *EGRI*, *NOX4*) при атмосферном уровне кислорода и 13 (*CCND1*, *CCNE1*, *CDKN2A*, *CDKN1C*, *ID1*, *SERPINE1*, *IGF1*, *IGFBP5*, *IGFBP7*, *CALR*, *CD44*, *NOX4*, *MAP2K3*) при 5% O<sub>2</sub>. 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 однозначно, что было характерно и для результатов, полученных на МСК 12 пассажа. Стоит отметить, что при 20% O<sub>2</sub> изменения транскрипционной активности, как правило, более выражены.



Ген	Продукт гена	относительная экспрессия	
		20% O <sub>2</sub>	5% O <sub>2</sub>
<b>p53 / pRb сигналинг и клеточный цикл</b>			
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
<b>IGF-ассоциированные факторы</b>			
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
<b>Эффекторы p21 и p16</b>			
CALR	Calreticulin	2,52	2,13
TBX2	T-box 2	-3,38	-
TBX3	T-box 3	2,65	-
<b>Другие гены</b>			
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 36. Экспрессия генов, ассоциированных со старением, при длительном культивировании в условиях с различным содержанием кислорода (p21-23 vs p3-4). Представлены гены, экспрессия которых достоверно ( $p < 0,05$ ) изменилась более чем в 2 раза. n=3.

В сенесцентных клетках был обнаружен повышенный уровень экспрессии генов циклинов A2, B1 и D1 при 20% O<sub>2</sub> и циклинов E2 и D1 при 5% O<sub>2</sub>. Известно, что отсутствие митогенов (факторов роста) приводит к обратимой остановке клеточного цикла в G0 фазе, активации т.н. состояния покоя («quiescence»). Данное состояние характеризуется низким уровнем циклинов, РНК, синтеза белка и метаболизма, в целом. В этом случае не происходит увеличения размера клетки со временем. Иные стрессы могут приводить к необратимому аресту клеточного цикла, характеризующемуся повышением уровня циклинов и их ингибиторов. В этом случае наблюдается гипертрофия клетки (Blagosklonny MV, 2006; Wang, Liu, Qu et al., 2013). В основном, регуляция клеточного цикла происходит на уровне активности белка, но некоторые изменения можно обнаружить на уровне мРНК.

Анализ результатов выявил снижение экспрессии *ALDH1A3* при 20% O<sub>2</sub> и отсутствие изменений при 5% O<sub>2</sub>. Некоторые авторы продемонстрировали, что МСК, полученные от более старых мышей, проявляли сниженную активность сигнальных путей, связанных с ретиноевой кислотой (*ALDH1A3* и *RBP4*). *ALDH1A3* при этом рассматривается как прорегенеративный ген, способствующий выживанию клеток (Paxson et al., 2013).

Наряду со снижением экспрессии *CDKN1C*, *NOX4* и *CREG1*, ассоциированными с подавлением пролиферации, также снижается экспрессия *ID1*, продукт которой ингибирует клеточное старение посредством подавления функций p16/Ink4a. Было показано, что *ID1* замедляет старение на различных моделях клеток человека, в том числе первичных кератиноцитах (Alani et al., 1999), эндотелиальных клетках (Tang et al., 2002) и диплоидных фибробластах (Zheng et al., 2004) путем подавления активности промотора p16 (Zheng et al., 2004; Rhoda et al., 2001).

При 20% O<sub>2</sub> экспрессия генов, продукты которых участвуют в передаче сигналов p53/pRb и регуляции цитоскелета (циклины A2, B1, SERPINE1 и PLAU), эффектора p21 CALR и эффектора p16 TBX3 также увеличивалась. Роль TBX3 в МСК не совсем ясна. Было отмечено участие данного гена в клеточной пролиферации, но направление его эффектов зависит от типа клетки. Известно, что экспрессия TBX2 и TBX3 увеличивается при некоторых видах рака. Есть основания полагать, что, в то время как TBX2 функционирует как позитивный регулятор пролиферации, а TBX3 ингибирует процесс клеточного деления, но способствует миграции и инвазии раковых клеток (Li J, Ballim D, Rodriguez M. 2014). В нашей работе показана разнонаправленная регуляция данных факторов при 20% O<sub>2</sub>, но не обнаружено изменений при 5% O<sub>2</sub>. Экспрессия активатора плазминогена урокиназы (PLAU) была повышена при атмосферном уровне кислорода, но

не менялся при гипоксии (5% O<sub>2</sub>). Усиление транскрипционной активности данного гена может быть связано с повреждением ДНК (Jiang et al. 2016).

Транскрипционная активность *IGF1*, продукт которого усиливает пролиферацию и ингибирует клеточное старение, значительно снижалась на поздних пассажах (более чем в 33 раза при 20% O<sub>2</sub> и в 30 раз при 5% O<sub>2</sub>). Инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF-1) играет определяющую роль в регуляции клеточного роста и пролиферации, а снижение активности данного сигнального каскада приводит к замедлению роста (David et al., 2011). Каскад IGF-1/инсулина также контролирует продолжительность жизни и старение организма от червей до млекопитающих. Интересно, что снижение активности сигналинга IGF-1 может оказывать благотворное влияние на продолжительность жизни (Bartke A. 2011). В ряде работ было продемонстрировано влияние IGF-1 через АФК на индукцию клеточного старения по p53-зависимому пути (Handayaningsih et al., 2012; Nishizawa et al., 2016).

Экспрессия гена *SERPINE1* повышалась в 6,3 раза при 20% O<sub>2</sub> и в 2,4 раза при 5% O<sub>2</sub> при длительном культивировании. Повышенная экспрессия *SERPINE1* является одним из характерных признаков сенесцентных клеток (Kortlever et al., 2006). Продукт данного гена известен как ингибитор активатора плазминогена (PAI-1) и относится к семейству ингибиторов сериновых протеаз. PAI-1 является транскрипционной мишенью для p53, вследствие чего его экспрессия *SERPINE1* возрастает при повреждении ДНК (Elzi, Lai, Song et al., 2012).

Таким образом, изменения экспрессии генов, ассоциированных со старением, в сенесцентных жтМСК более выражены при культивировании клеток в условиях атмосферного содержания кислорода, чем при физиологической гипоксии (5% O<sub>2</sub>). На ранних пассажах при тканевом уровне O<sub>2</sub> снижена экспрессия генов *ATM* и *PTEN*, участвующих в реакции клетки на повреждение ДНК и ингибировании пролиферации, соответственно. На поздних пассажах различий в содержании мРНК данных генов в зависимости от уровня оксигенации не выявлено. При этом наиболее выраженными маркерами клеточного старения МСК на транскрипционном уровне являются увеличение количества мРНК *CCND1*, *SERPINE1* и снижение экспрессии *ID1*, *IGF1*, которое было отмечено уже на 12 пассаже. В то время как значительных изменений количества удвоений популяции (PD) на данном этапе длительного культивирования еще не обнаруживается. Вероятно, изменение экспрессии данных генов может быть ранним признаком сенесцентного состояния, проявляющимся еще до значительного изменения пролиферативного потенциала.

### *Экспрессия генов, ассоциированных с реакцией на гипоксию*

Другой интересующей нас транскрибуемой частью генома были гены, ассоциированные с реакцией на гипоксию. Стоит еще раз отметить, что условия эксперимента не предполагали воздействия жесткой гипоксии ( $\leq 1\% O_2$ ), как фактора стресса. Напротив, создание т.н. физиологической гипоксии (5%) приближает условия культивирования к условиям, в которых МСК существуют *in vivo*, и не должно значительно активировать транскрипцию генов, ассоциированных с выживанием клеток при кислородном голодании. Тем не менее, данные о различиях в экспрессии генов, связанных с реакцией на изменение условий оксигенации, представляют интерес с точки зрения их участия в процессах, ассоциированных со старением.

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. Анализ проводили методом количественной ПЦР с помощью системы RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Human Hypoxia Signaling Pathway («Qiagen», США). Показано, что при длительном культивировании независимо от содержания  $O_2$  изменялась экспрессия семи генов (табл. 3). В сенесцентных клетках повышалась экспрессия генов *PKM2*, *SERPINE1*, *VEGFA* и снижалась экспрессия генов *ANKRD37*, *DDIT4*, *HIF1A*, *TXNIP*.

Таблица 3. Экспрессия генов, ассоциированных с реакцией на гипоксию, при длительном культивировании в условиях с различным содержанием кислорода (р21-23 vs р3-4).

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.

По сравнению с культурами клеток 3-го пассажа, в сенесцентных клетках наблюдалось снижение уровня экспрессии гена *HIF1A*, кодирующего  $\alpha$ -субъединицу HIF-1 (фактора 1, индуцируемого гипоксией). HIF-1 функционирует как главный регулятор клеточного и системного гомеостатического ответа на гипоксию, активируя транскрипцию многих генов, вовлеченных в энергетический метаболизм, ангиогенез, апоптоз, а также генов, белковые продукты которых увеличивают доставку кислорода или облегчают метаболическую адаптацию к гипоксии. Механизм его действия изучен довольно подробно (Semenza, 2007). Синтез субъединицы HIF-1 $\alpha$  происходит конститутивно, однако в присутствии кислорода она деградирует: пролилгидроксилазы, неактивные при низком уровне  $O_2$  (1–4%  $O_2$ ), гидроксилируют консервативные пролиловые остатки на HIF-1 $\alpha$ . После этого следует связывание с белком фон Хиппель–Линдау, который направляет субъединицу на убиквитин-зависимую протеасомную деградацию.

Также в сенесцентных МСК отмечалось снижение уровня экспрессии ряда HIF-зависимых генов. Было выявлено уменьшение количества мРНК *DDIT4*. Продукт этого гена действует как негативный регулятор mTOR, серин/ треонинкиназы, опосредующей различные клеточные функции, такие как рост, пролиферация и аутофагия (Sofer et al., 2005; Gharibi et al., 2016). На модели клеток рака желудка показано, что *DDIT4* является позитивным регулятором пролиферации и может способствовать прогрессии опухолеобразования через пути p53 и MAPK (Du et al., 2018). Обычно продукция этого транскрипта резко возрастает в ответ на гипоксию, поскольку *DDIT4* является мишенью как для HIF-1 $\alpha$ , так и для HIF-2 $\alpha$  (Shoshani et al., 2002; Wolff et al., 2011; Kucejova et al., 2011). Таким образом, снижение пролиферативной активности сенесцентных клеток может частично быть следствием снижения активности HIF-1 и регулируемого им *DDIT4*.

В сенесцентных клетках также отмечено снижение уровня экспрессии гена *ANKRD37*, продукт которого малоизучен, хотя известно, что данный ген является белком-мишенью HIF-1 и имеет четыре сайта связывания с ним (Benita et al., 2009).

Культивирование МСК до 23-го пассажа выявило снижение уровня экспрессии гена *TXNIP*, кодирующего тиоредоксинсвязывающий белок. Тиоредоксин представляет собой тиолоксидоредуктазу, которая является основным регулятором редокс-сигнализации и защищает клетки от окислительного стресса. Тиоредоксинсвязывающий белок ингибирует антиоксидантную функцию тиоредоксина, что приводит к накоплению активных форм кислорода и клеточному стрессу. С другой стороны, новые работы демонстрируют, что нокаут гена *TXNIP* в клетках линии MEF, культивируемых в условиях высокого содержания глюкозы, также может приводить усилиению продукции АФК и

проявлению признаков сенесцентного состояния. Сходные результаты были получены и в экспериментах с дефицитными по данному гену мышами. Авторы предполагают, что недостаток TXNIP приводит к усилению активности АКТ и экспрессии генов, ассоциированных со старением (Hu et al., 2018). Также известно, что повышение экспрессии *TXNIP*, которое регулируется белком HIF-1, может приводить к увеличению чувствительности к стрессу и повышению уровня апоптоза. Некоторые авторы полагают, что TXNIP играет роль «противовеса» для функций HIF-1, направленных на усиление жизнеспособности (Baker et al., 2008). Таким образом, снижение экспрессии *TXNIP* в сенесцентных клетках может быть обусловлено снижением экспрессии *HIF1A* и может быть одной из причин повышения уровня эндогенных АФК.

Культивирование МСК до 23-го пассажа приводило к усилению экспрессии генов *SERPINE1*, *VEGFA* и *PKM2* как при 20%-ном уровне кислорода, так и при физиологической гипоксии (5% O<sub>2</sub>). Ген *SERPINE1* кодирует сериновую протеазу, которая вовлечена в ремоделирование внеклеточного матрикса и активно экспрессируется в клетках при старении (Kortlever et al., 2006). Увеличение транскрипционной активности данного гена уже было отмечено ранее. Ген *VEGFA* кодирует эндотелиальный фактор роста сосудов А, который в свою очередь индуцирует пролиферацию и миграцию сосудистых эндотелиальных клеток, а также играет важную роль как в физиологическом, так и в патологическом ангиогенезе. Увеличение его экспрессии при длительном культивировании уже было отмечено в предыдущих экспериментах (табл. 1), также было показано усиление продукции соответствующего белка при анализе паракринной активности МСК с помощью ИФА (рис. 34). Ген *PKM2* кодирует пируваткиназу, которая катализирует последнюю стадию гликолиза, превращение фосфоенолпирувата до енольной формы пирувата с образованием одной молекулы АТФ.

Большинство активно пролиферирующих клеток экспрессируют изоформу M2 пируваткиназы (PKM2), получаемую в результате альтернативного сплайсинга, тогда как неделящиеся клетки экспрессируют изоформу PKM1, что подчеркивает особую ценность гликолитических интермедиатов в качестве биосинтетических строительных блоков (Mazurek et al., 2005). Дело в том, что PKM2 обладает меньшей активностью, чем PKM1 и, таким образом, приводит к некоторому торможению конечной стадии гликолиза. Сниженная скорость финальной реакции позволяет накапливать промежуточные гликолитические продукты, которые затем могут быть использованы в биосинтетических путях, а не только как источник АТФ (Finley and Thompson, 2014). Вероятно, повышенная экспрессия *PKM2* в сенесцентных клетках указывает на активные синтетические процессы, что уже было отмечено выше и соотносится с повышенным уровнем

экспрессии ряда циклинов и выраженной гипертрофией МСК на поздних пассажах. Также можно предположить, что дополнительной причиной необходимости усиления биосинтетической активности является повышенный уровень внутриклеточных повреждений, стимулирующий клетку восстанавливать поврежденные компартменты.

Результаты сравнительного анализа дифференциальной экспрессии генов МСК, культивируемых при 5% O<sub>2</sub> по сравнению с клетками, культивируемыми при 20% O<sub>2</sub> на ранних пассажах выявили изменение транскрипционной активности 3 генов (табл. 4). Если репликативное старение приводило к усилению экспрессии *PKM2*, *SERPINE1* и снижению *ANKRD37*, то культивирование жтМСК в гипоксических условиях (5% O<sub>2</sub>) уже на ранних пассажах оказывало противоположный эффект. Так, при 5% O<sub>2</sub> экспрессия *PKM2*, *SERPINE* снижалась, а *ANKRD37* повышалась, что указывает на некоторую разнонаправленность эффектов, оказываемых репликативным старением и культивированием при пониженном содержании O<sub>2</sub>.

Таблица 4. Изменение экспрессии генов, ассоциированных с реакцией на гипоксию, в жтМСК, культивируемых при пониженном содержании кислорода (5%) на ранних пассажах (р3-4).

Ген	Продукт гена	Относительная экспрессия, 5% O <sub>2</sub> vs 20% O <sub>2</sub>
<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 (р < 0,05) изменилась более чем в 2 раза.

Как отмечено ранее, экспрессия *PKM2* значимо повышается в сенесцентных клетках, что может указывать на усиление биосинтетических процессов, в том числе из-за повышенного уровня внутриклеточных окислительных повреждений. В этом случае

снижение экспрессии данного гена может быть следствием уменьшения количества продуцируемых АФК как на ранних, так и на поздних пассажах, что несколько нивелирует необходимость восстановительных процессов в клетке. Изменения экспрессии *SERPINE1* соответствуют ранее полученным данным и подтверждают разнонаправленные модификации активности данного гена при старении и воздействии гипоксических условий (5%).

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% O<sub>2</sub>).

Несмотря на преимущественно посттрансляционную регуляцию активности HIF-1, в нашей работе показано снижение уровня экспрессии гена *HIF1A* в сенесцентных МСК, что указывает на связь этого транскрипционного фактора и ряда регулируемых им генов с процессом клеточного старения. При этом не обнаружено значительных различий между МСК, постоянно культивируемых в условиях 5%-ного и 20%-ного содержания кислорода. Ранее в нашей лаборатории были получены данные, касающиеся динамики экспрессии *HIF1A* в МСК при кратковременных экспозициях (до 24 ч) в условиях физиологической гипоксии (5% O<sub>2</sub>) (Погодина и Буравкова, 2015). Показано, что экспрессия этого гена значительно увеличивается лишь в первые 8 ч после смены условий (при перемещении клеток в условия даже относительно мягкой гипоксии – 5% O<sub>2</sub>). Новые результаты также демонстрируют, что изменение транскрипционной активности *HIF1A* носит транзиторный характер и не выявляется при постоянном культивировании в условиях 5%-ного содержания O<sub>2</sub>.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

МСК одна из самых распространённых и гетерогенных клеточных популяций в организме человека, которую можно обнаружить почти во всех органах и тканях. Данный тип клеток участвует не только в регенерации повреждений и физиологическом обновлении, но и поддерживает локальный тканевой гомеостаз, регулируя некоторые параметры ниши при помощи секреторной активности и определяя функциональный статус окружающих клеток. Для исследовательских и прикладных целей МСК извлекают из их естественной тканевой ниши и культивируют в условиях *iv vitro* в значительной степени изменения функциональный статус и реакцию клетки на внешние стимулы. Одним из таких определяющих параметров ниши является уровень кислорода, который значительно различается в тканях организма и в стандартных условиях культивирования, что создаёт необходимость отдельного изучения эффектов, связанных с изменением параметров оксигенации.

В последнее время активно обсуждается вопрос старения организма и отдельных клеток. Клетки, достигающие лимита Хейфлика или активирующие сенесцентное состояние по другим причинам, остаются метаболически активными и продолжают продуцировать целый ряд секрециируемых сигнальных молекул. Отличительной особенностью такого секретома являются провоспалительные цитокины. В последние годы исследователи уделяют все больше внимания роли хронического воспаления, поддерживаемого сенесцентными клетками, в процессе старения организма. Благодаря своей регуляторной роли МСК могут быть важным звеном в поддержании провоспалительного микроокружения и создании условий для развития заболеваний, ассоциированных со старением.

Данные, полученные в ходе исследования могут внести значительный вклад в имеющиеся представления о биологии старения тканеспецифичных МСК (табл. 5). 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. 5).

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

Параметр	Эффекты репликативного старения	Эффекты гипоксии (5% O <sub>2</sub> )	
		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	↑	↓	↓
Производство параакринных медиаторов: IL-6 / IL-8 VEGFα / TGFβ	↑/↑ ↑/↑	=/= =/ <b>↓</b>	=/= =/ <b>↓</b>
Экспрессия генов: <i>CCND1 / SERPINE1</i> <i>ID1 / IGF1</i> <i>ATM / PTEN</i> <i>PKM2 / VEGFA</i> <i>HIF1A</i>	↑/↑ ↓/↓ =/ ↑/↑ ↓	=/= =/ ↓/↓ ↓/= =	<b>↓/↓</b> ↑/↑ =/ =/ =

Сравнительный анализ свойств жтМСК, длительно культивируемых до лимита Хейфлика в условиях с различным содержанием кислорода, показал, что клетки достигают репликативного старения через 25-35 удвоений клеточной популяции, сохраняя

характерный иммунофенотип, но теряя способность дифференцироваться в адипогенном направлении. Культивирование в условиях физиологической гипоксии (5%) приводит к повышению жизнеспособности и снижению доли клеток с активной  $\beta$ -галактозидазой, ассоциированной со старением, на поздних пассажах. При этом на ранних пассажах эффекты гипоксии (5%  $O_2$ ) более выражены и включают также усиление пролиферативных свойств и уменьшение размера.

Оценка состояния внутриклеточных органелл и уровня окислительного стресса указывает на снижение трансмембранных потенциала митохондрий в сенесцентных жтМСК. Также обнаружен повышенный уровень АФК и окисленных липидов, увеличение активности лизосомального компартмента. Постоянное культивирование клеток при тканевом уровне кислорода (5%) способствует снижению уровня окислительного стресса, активности митохондрий и количества лизосом как на ранних, так и на поздних пассажах. Вероятно, изменение продукции АФК происходит из-за повышения активности митохондрий и окислительного фосфорилирования, что, в свою очередь, может усиливать повреждение электрон-транспортной цепи и приводить к дополнительной генерации АФК, создавая петлю положительной обратной связи (табл. 3)

Анализ паракринной активности МСК показал усиление продукции провоспалительных цитокинов – IL-6 и IL-8 в сенесцентных культурах. Также отмечено повышение продукции эндотелиального фактора роста (VEGF) и трансформирующего фактора роста  $\beta$  (TGF $\beta$ ), являющегося одним из индукторов старения. Провоспалительное микроокружение и другие модификации цитокиновых сигналов могут приводить к нарушению работы соседних клеток вплоть до опухолевой трансформации или преждевременной активации сенесцентного состояния. Интересно, что культивирование жтМСК в условиях тканевого содержания кислорода позволяло несколько снизить продукцию TGF $\beta$ .

Исследование отдельных элементов транскриптома выявило, что наиболее выраженными маркерами клеточного старения жтМСК на транскрипционном уровне являются увеличение количества мРНК *CCND1*, *SERpine1* и снижение экспрессии *ID1*, *IGF-1*. Эти изменения можно отметить уже на 12 пассаже, что составляет около 15 удвоений клеточной популяции. При этом экспрессия генов, ассоциированных со старением, в жтМСК была более выражена при длительном культивировании клеток в условиях атмосферного содержания кислорода (20%), чем при 5%  $O_2$ , что свидетельствует о негативном влиянии повышенного уровня оксигенации. На ранних пассажах при тканевом уровне  $O_2$  снижена экспрессия генов *ATM*, участвующего в реакции на повреждение ДНК, и *PTEN*, негативного регулятора пролиферации, что подтверждает

предположение о повреждающем действии атмосферного уровня кислорода и согласуется с данными о различиях в пролиферативной активности МСК на ранних пассажах, культивируемых в различных условиях оксигенации.

Среди генов, ассоциированных с реакцией на гипоксию, в сенесцентных жтМСК повышается экспрессия *PKM2*, *SERPINE1*, *VEGFA* и снижается экспрессия *ANKRD37*, *DDIT4*, *HIF1A*, *TXNIP*. При этом репликативное старение и культивирование при тканевом уровне кислорода разнонаправленно модулируют экспрессию ряда генов, участвующих в реакции на гипоксию, в том числе *PKM2*, *ANKRD37*, *SERPINE1*. Так, усиление экспрессии *PKM2* на поздних пассажах может быть связано с повышением биосинтетической активности, что отличает сенесцентные клетки от покоящихся, подвергнутых временному аресту клеточного цикла. Снижение транскрипционной активности *DDIT4* и *TXNIP*, вероятно, связано со снижением пролиферативной активности и стрессоустойчивости. О функциях *ANKRD37* мало известно, но в нашей работе этот ген, относящийся к группе гипоксия-зависимых, наиболее ярко выраженно модулировал свою активность при репликативном старении, что может позволить использовать его в будущем как один из маркеров сенесцентного состояния. Стоит также отметить, что постоянное культивирование МСК при 5% O<sub>2</sub> не приводит к повышению экспрессии гена основного регулятора реакции на гипоксию - *HIF1*. При этом происходит снижение его экспрессии в сенесцентных клетках. Известно, что активность HIF-1 направлена на выживание клетки, поэтому ее снижение может быть одной из причин уменьшения доли жизнеспособных клеток при репликативном старении.

## 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% O<sub>2</sub>, 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% O<sub>2</sub> 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, ассоцииированного со старением (SASP) как при 5% O<sub>2</sub>, так и при 20% O<sub>2</sub>. Увеличивается продукция провоспалительных цитокинов IL-6 и IL-8, а также ростовых факторов VEGFa и TGFβ. При 5% O<sub>2</sub> 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% O<sub>2</sub>. На ранних пассажах при 5% O<sub>2</sub> 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% O<sub>2</sub> приводит к снижению экспрессии *PKM2* на ранних пассажах, но не влияет на *HIF1A* и *VEGFA*.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева Е.Р., Буравкова Л.Б. Паракринная активность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и ее особенности в условиях гипоксии // Физиология человека. - 2013. - Т. 39(3). - С. 104-113.
2. Анисимов В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения: В 2-х т. // СПб: Наука. - 2008. - Т. 1. - С.49-54.
3. Анохина Е.Б., Буравкова Л.Б. Гетерогенность стромальных клеток-предшественников, выделенных из костного мозга крыс // Цитология. – 2007. – Т. 49(1). – С. 40 – 47.
4. Анохина Е.Б., Буравкова Л.Б., Воложин А.И., Григорьева О.В. Влияние гипоксии на длительно культивируемые стромальные клетки-предшественники, выделенные из костного мозга крыс. // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2006. - №4. – С.26-28.
5. Буравкова Л.Б., Андреева Е.Р., Григорьев А.И. Роль кислорода как физиологического фактора в проявлении функциональных свойств мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека // Физиология человека. -2012. - Т. 38(4). - С. 1.
6. Буравкова Л.Б., Анохина Е.Б. Мезенхимальные стромальные клетки-предшественники: общая характеристика и особенности функционального состояния при пониженном содержании кислорода.// Российский физиологический журнал. – 2008. – Т. 94(7). – С. 737 – 757.
7. Буравкова Л.Б., Гринаковская О.С, Андреева Е.Р., Жамбалова А.П., Козионова М.П. Характеристика мезенхимных стромальных клеток из липоаспирата человека, культивируемых при пониженном содержании кислорода. // Цитология. – 2009. - Т. 51 (1). – С. 5-11
8. Бурнаевский Н.С., Вишнякова Х.С., Сафенина А.В. Рыбалко Д.В., Попов К.В., Егоров Е.Е. Влияние парциального давления кислорода на эффективность колониеобразования и дифференцировки мезенхимальных стромальных клеток человека, полученных из различных источников // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. 5(4). – С. 24 – 30.
9. Владимиров Ю.А. Свободнорадикальное окисление липидов и физические свойства липидного слоя биологических мембран.// Биофизика. - 1987. - Т. 32 (5). - С.830-844.
10. Горностаева А.Н., Андреева Е.Р., Буравкова Л.Б. Изменение иммуносупрессивной активности ММСК при пониженном напряжении кислорода:

непосредственный клеточный контакт и паракринная регуляция. Физиология человека. - 2013. - Т. 39(2). - С. 31–42.

11. Гринаковская О.С., Андреева Е.Р., Буравкова Л.Б., Рылова Ю.В., Косовский Г.Ю. Пониженное содержание О<sub>2</sub> замедляет коммитирование культивируемых мезенхимальных стромальных клеток-предшественников из жировой ткани в ответ на остеогенные стимулы // Бюлл. эксп.биол. мед. - 2009. - Т. 147(6). - С. 704-707.

12. Донцов В.И., Крутько В.Н., Мрикаев Б.М., Уханов С.В. Активные формы кислорода как система: значение в физиологии, патологии и естественном старении. // Труды ИСА РАН. – 2006. - Т. 19. - С.50-69.

13. Ефименко А.Ю., Старостина Е.Е., Рубина К.А., Калинина Н.И., Парфенова Е.В.. влияние гипоксии и воспалительных факторов на жизнеспособность и ангиогенную активность мезенхимных стромальных клеток из жировой ткани и костного мозга. Цитология. - 2010. - Т. 52(2). - С. 144-154.

14. Калинина Н.И., Сысоева В.Ю., Рубина К.А., Парфенова Е.В., Ткачук В.А. Мезенхимальные стволовые клетки в процессах роста и репарации тканей // Acta naturae. - 2011. - Т. 3(4). - С. 32-39.

15. Москалев А.А., Прошкина Е.Н., Белый А.А., Соловьев И.А. Генетика старения и долголетия. // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2016. – Т. 20(4). – С.426-440.

16. Оловников А.М. Принцип маргинотомии в матричном синтезе полинуклеотидов. // Докл. Акад. Наук. – 1971. – Т. 201. – С.1496-1499.

17. Парфенова Е.В., Ткачук В.А. Терапевтический ангиогенез: достижения, проблемы, перспективы. // Кардиологический вестник. – 2007. – Т. 2(2). – С.5-15.

18. Паюшина О.В. Локализация и функции мезенхимных стромальных клеток *in vivo* // Журнал общей биологии. - 2015. - № 2. - С. 161-172.

19. Погодина М.В., Буравкова Л.Б. Особенности экспрессии HIF-1 $\alpha$  в мультипотентных мезенхимных стромальных клетках при гипоксии. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – Т.159(3). – С.333-335.

20. Рубина К.А., Калинина Н.И., Ефименко А.Ю., Лопатина Т.В., Мелихова В.С., Цоколаева З.И., Сысоева В.Ю., Ткачук В.А., Парфенова Е.В. Механизм стимуляции ангиогенеза в ишемизированном миокарде с помощью стромальных клеток жировой ткани // Кардиология. - 2010. - № 50. - С. 51.

21. Рылова Ю.В., Андреева Е.Р., Гогвадзе В.Г., Животовский Б.Д., Буравкова Л.Б. Этопозид и гипоксия не активируют апоптоз мультипотентных мезенхимальных

стромальных клеток *in vitro*. // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2012. - №3. - С.148-151.

22. Рылова Ю.В., Буравкова Л.Б. Постоянное культивирование мультипотентных мезенхимных стромальных клеток при пониженном содержании кислорода. // Цитология. – 2013. - № 12. - С. 852-859.

23. Трактуев Д.О., Парфенова Е.В., Ткачук В.А., Марч К.Л. Стромальные клетки жировой ткани-пластический тип клеток, обладающих высоким терапевтическим потенциалом. // Цитология. – 2006. – Т. 48 (2). – С.83-94.

24. Acosta J.C., O'Loughlen A., Banito A., Guijarro M.V., Augert A., Raguz S., Fumagalli M., Da Costa M., Brown C., Popov N., Takatsu Y., Melamed J., d'Adda di Fagagna F., Bernard D., Hernando E., Gil J. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. // Cell. – 2008. – Vol. - 133(6). P.1006-18.

25. Addabbo F., Montagnani M., Goligorsky M.S. Mitochondria and reactive oxygen species. // Hypertension. – 2009. – Vol. 53(6). – P.885-92.

26. Ahlvist K.J., Hämäläinen R.H., Yatsuga S., Uutela M., Terzioglu M., Götz A., Forsström S., Salven P., Angers-Loustau A., Kopra O.H., Tyynismaa H., Larsson N.G., Wartiovaara K., Prolla T., Trifunovic A., Suomalainen A.. Somatic progenitor cell vulnerability to mitochondrial DNA mutagenesis underlies progeroid phenotypes in Polg mutator mice. // Cell Metab. – 2012. – Vol. 15(1). - P.100-9.

27. Akbar A.N., Henson S.M. Are senescence and exhaustion intertwined or unrelated processes that compromise immunity? // Nat Rev Immunol. – 2011. – Vol. 11(4). – P.289-95.

28. Alani R.M., Hasskarl J., Grace M., Hernandez M.C., Israel M.A., Münger K. Immortalization of primary human keratinocytes by the helix-loop-helix protein, Id-1. // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1999. – Vol. 96(17). – P. 9637-41.

29. Alani R.M., Young A.Z., Shifflett C.B. Id1 regulation of cellular senescence through transcriptional repression of p16/Ink4a. // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2001. – Vol. 98(14). – P.7812–7816.

30. Andreeva E.R., Udartseva O.O., Zhidkova O.V., Buravkov S.V., Ezdakova M.I., Buravkova L.B. IFN-gamma priming of adipose-derived stromal cells at "physiological" hypoxia. // J Cell Physiol. – 2018. – Vol. 233(2). – P.1535-1547.

31. Argmann C., Dobrin R., Heikkinen S., Auburtin A., Pouilly L., Cock T.- A., Koutnikova H., Zhu J., Schadt E.E., Auwerx J. Ppary2 is a key driver of longevity in the mouse. // PLoS Genet. – 2009. – Vol. 5(12). - e1000752.

32. Aschner Y., Downey G.P. Transforming growth factor- $\beta$ : master regulator of the respiratory system in health and disease. // Am J Respir Cell Mol Biol. – 2016. – Vol. 54(5). – P.647-55.
33. Bagliolini M., Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. // FEBS Lett. – 1992. – Vol. 307. – P.97–101.
34. Bai Q., Desprat R., Klein B., Lemaître J.M., De Vos J. Embryonic stem cells or induced pluripotent stem cells? A DNA integrity perspective. // Curr Gene Ther. – 2013. –Vol. 13(2). – P.93-8.
35. Baker A.F., Koh M.Y., Williams R.R., James B., Wang H., Tate W.R., Gallegos A., Von Hoff D.D., Han H., Powis G. Identification of thioredoxin-interacting protein 1 as a hypoxia-inducible factor 1alpha-induced gene in pancreatic cancer. // Pancreas. – 2008. –Vol. 36(2). – P.178-86.
36. Baker D.J., Childs B.G., Durik M., Wijers M.E., Sieben C.J., Zhong J., Saltness R.A., Jegannathan K.B., Verzosa G.C., Pezeshki A., Khazaie K., Miller J.D., van Deursen J.M. Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. // Nature. – 2016. – Vol. 530(7589). – P.184-9.
37. Baker D.J., Wijshake T., Tchkonia T., LeBrasseur N.K., Chils B.G., van de Sluis B., Kirkland J.L., van Deursen J.M. Clearance of p16INK4a – positive senescent cells delays aging-associated disorders. // Nature. – 2011. – Vol. 479. – P.232–236.
38. Baker N., Boyette L.B., Tuan R.S. Characterization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in aging. // Bone. – 2015. – Vol. 70. – P.37–47.
39. Bakkenist C.J., Kastan M.B. Initiating cellular stress responses. // Cell. – 2004. – Vol. 118(1). – P.9-17.
40. Banfi A., Muraglia A., Dozin B., Mastrogiacomo M., Cancedda R., Quarto R. Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. // Exp Hematol. – 2000. – Vol. 28(6). – P.707-15.
41. Bartke A. Growth hormone, insulin and aging: the benefits of endocrine defects. // Exp Gerontol. – 2011. – Vol. 46(2-3). – P.108-11.
42. Basciano L., Nemos C., Foliguet B., de Isla N., de Carvalho M., Tran N., Dalloul A. Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status. // BMC Cell Biol. – 2011. – Vol. 12. - P. 12.

43. Bavik C., Coleman I., Dean J.P., Knudsen B., Plymate S., Nelson P.S. The gene expression program of prostate fibroblast senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through paracrine mechanisms. // *Cancer Res.* – 2006. – Vol. 66(2). – P.794-802.
44. Baz-Martínez M., Da Silva-Álvarez S., Rodríguez E., Guerra J., Motiam A., Vidal A., García-Caballero T., González-Barcia M., Sánchez L., Muñoz-Fontela C., Collado M., Rivas C. Cell senescence is an antiviral defense mechanism. // *Sci Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P.37007.
45. Beausejour C.M., Krtolica A., Galimi F., Narita M., Lowe S.W., Yaswen P., Campisi J. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. // *EMBO J.* – 2003. – Vol. 22(16). - P.4212–4222.
46. Benita Y., Kikuchi H., Smith A.D., Zhang M.Q., Chung D.C., Xavier R.J. An integrative genomics approach identifies Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)-target genes that form the core response to hypoxia. // *Nucleic Acids Res.* – 2009. – Vol. 37(14). – P.4587-602.
47. Beroukhim R., Mermel C.H., Porter D., Wei G., Raychaudhuri S., Donovan J., Barretina J., Boehm J.S., Dobson J., Urashima M., Mc Henry K.T., Pinchback R.M., Ligon A.H., Cho Y.J., Haery L., Greulich H., Reich M., Winckler W., Lawrence M.S., Weir B.A., Tanaka K.E., Chiang D.Y., Bass A.J., Loo A., Hoffman C., Prensner J., Liefeld T., Gao Q., Yecies D., Signoretti S., Maher E., Kaye F.J., Sasaki H., Tepper J.E., Fletcher J.A., Tabernero J., Baselga J., Tsao M.S., Demichelis F., Rubin M.A., Janne P.A., Daly M.J., Nucera C., Levine R.L., Ebert B.L., Gabriel S., Rustgi A.K., Antonescu C.R., Ladanyi M., Letai A., Garraway L.A., Loda M., Beer D.G., True L.D., Okamoto A., Pomeroy S.L., Singer S., Golub T.R., Lander E.S., Getz G., Sellers W.R., Meyerson M. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. // *Nature.* – 2010. – Vol. 463(7283). – P.899-905.
48. Bétous R., Renoud M.L., Hoede C., Gonzalez I., Jones N., Longy M., Sensebé L., Cazaux C., Hoffmann J.S. Human adipose-derived stem cells expanded under ambient oxygen concentration accumulate oxidative DNA lesions and experience procarcinogenic DNA replication stress. // *Stem Cells Transl Med.* – 2017. – Vol. 6(1). – P.68-76.
49. Bigildeev A.E., Zhironkina O.A., Shipounova I.N., Sats N.V., Kotyashova S.Y., Drize N.I. Clonal composition of human multipotent mesenchymal stromal cells. // *Exp Hematol.* – 2012. – Vol. 40(10). – P.847-56.e4.
50. Birch J., Anderson R.K., Correia-Melo C., Jurk D., Hewitt G., Marques F.M., Green N.J., Moisey E., Birrell M.A., Belvisi M.G., Black F., Taylor J.J., Fisher A.J., De Soyza A., Passos J.F. DNA damage response at telomeres contributes to lung aging and chronic obstructive pulmonary disease. // *Am. J. Phys. Lung Cell. Mol. Phys.* – 2015. – Vol. 309(10). – P.1124–1137.

51. Blagosklonny M.V. Cell senescence: hypertrophic arrest beyond the restriction point. // *J Cell Physiol.* – 2006. – Vol. 209(3). – P.592-7.
52. Blankenberg S., Rupprecht H.J., Bickel C., Peetz D., Hafner G., Tiret L., Meyer J. Circulating cell adhesion molecules and death in patients with coronary artery disease. // *Circulation.* – 2001. – Vol. 104. – P.1336–1342.
53. Blasco M.A., Lee H.W., Hande M.P., Samper E., Lansdorp P.M., DePinho R.A., Greider C.W. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. // *Cell.* – 1997. – Vol. 91(1). – P.25–34.
54. Bodnar A.G., Ouellette M., Frolkis M., Holt S.E., Chiu C.P., Morin G.B., Harley C.B., Shay J.W., Lichtsteiner S., Wright W.E. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. // *Science.* – 1998. – Vol. 279(5349). - P.349–352.
55. Bracken A.P., Kleine-Kohlbrecher D., Dietrich N., Pasini D., Gargiulo G., Beekman C., Theilgaard-Mönch K., Minucci S., Porse B.T., Marine J.C., Hansen K.H., Helin K. The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells. // *Genes Dev.* – 2007. – Vol. 21(5). – P.525-30.
56. Brady C.A., Jiang D., Mello S.S., Johnson T.M., Jarvis L.A., Kozak M.M., Kenzelmann Broz D., Basak S., Park E.J., McLaughlin M.E., Karnezis A.N., Attardi L.D. Distinct p53 transcriptional programs dictate acute DNA-damage responses and tumor suppression. // *Cell.* – 2011. – Vol. 145(4). – P.571-83.
57. Bresciani G., da Cruz I. B., González-Gallego X. Manganese superoxide dismutase and oxidative stress modulation. // *Adv Clin Chem.* – 2015. – Vol. 68. – P.87-130.
58. Bruder S.P., Jaiswal N., Haynesworth S.E. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. // *J Cell Biochem.* – 1997. – Vol. 64. – P.278-94.
59. Brunk U.T., Terman A. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. // *Free Radic Biol Med.* – 2002. – Vol. 33(5). – P.611-9.
60. Buravkova L.B., Andreeva E.R., Gogvadze V., Zhivotovsky B. Mesenchymal stem cells and hypoxia: where are we? // *Mitochondrion.* – 2014. – Vol. 19 Pt A. - P.105-12.
61. Buscemi G., Perego P., Carenini N., Nakanishi M., Chessa L., Chen J., Khanna K., Delia D. Activation of ATM and Chk2 kinases in relation to the amount of DNA strand breaks. // *Oncogene.* – 2004. – Vol. 23(46). – P.7691-700.
62. Cabanillas R., Cadiñanos J., Villameytide J.A., Pérez M., Longo J., Richard J.M., Alvarez R., Durán N.S., Illán R., González D.J., López-Otín C. Néstor-Guillermo progeria syndrome: a novel premature aging condition with early onset and chronic development caused by BANF1 mutations. // *Am J Med Genet A.* – 2011. –Vol. 155A(11). – P.2617-25.

63. Calado R.T., Young N.S. Telomere maintenance and human bone marrow failure. // Blood. – 2008. – Vol. 111(9). – P. 4446-55.
64. Campisi J., Andersen J.K., Kapahi P., Melov S. Cellular senescence: a link between cancer and age-related degenerative disease? // Semin Cancer Biol. – 2011. – Vol. 21(6). – P.354-9.
65. Campisi J., d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. // Nat Rev Mol Cell Biol. – 2007. – Vol. 8(9). – P.729-40.
66. Campisi J., Robert L. Cell senescence: role in aging and age-related diseases. // Interdiscip Top Gerontol. – 2014. – Vol. 39. – P.45-61.
67. Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. // Annu Rev Physiol. – 2013. – Vol. 75. – P.685-705.
68. Cao K., Blair C.D., Faddah D.A., Kieckhafer J.E., Olive M., Erdos M.R., Nabel E.G., Collins F.S. Progerin and telomere dysfunction collaborate to trigger cellular senescence in normal human fibroblasts. // J Clin Invest. – 2011. – Vol. 121(7). – P.2833-44.
69. Caplan A.I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. // J Pathol. – 2009. – Vol. 217(2). – P.318-24.
70. Carrieri G., Marzi E., Olivieri F., Marchegiani F., Cavallone L., Cardelli M., Giovagnetti S., Stecconi R., Molendini C., Trapassi C., De Benedictis G., Kletsas D., Franceschi C. The G/C915 polymorphism of transforming growth factor beta1 is associated with human longevity: a study in Italian centenarians. // Aging Cell. – 2004. – Vol. 3(6). – P.443-448.
71. Cha D.R., Han J.Y., Su D.M., Zhang Y., Fan X., Breyer M.D., Guan Y. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha deficiency protects aged mice from insulin resistance induced by high-fat diet. // Am. J. Nephrol. – 2007. – Vol. 27(5). – P.479-482.
72. Chacko S.M., Ahmed S., Selvendiran K., Kuppusamy M.L., Khan M., Kuppusamy P. Hypoxic preconditioning induces the expression of prosurvival and proangiogenic markers in mesenchymal stem cells. // Am J Physiol Cell Physiol. – 2010. – Vol. 299(6). – P.1562-70.
73. Chan R.W.S., Schwab K.E., Gargett C.E. Clonogenicity of Human Endometrial Epithelial and Stromal Cells // Biology of Reproduction. - 2004. - Vol. 70(6) – P. 1738-1750.
74. Cheeseman K.H., Slater T.F. An introduction to free radical biochemistry. // Br Med Bull. – 1993. – Vol. 49(3). – P.481-93.
75. Chen J.Y., Mou X.Z., Du X.C., Xiang C. Comparative analysis of biological characteristics of adult mesenchymal stem cells with different tissue origins. // Asian Pac J Trop Med. – 2015. – Vol. 8(9). – P.739-46.

76. Chen Q., Shou P., Zheng C., Jiang M., Cao G., Yang Q., Cao J., Xie N., Velletri T., Zhang X., Xu C., Zhang L., Yang H., Hou J., Wang Y., Shi Y. Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts? // *Cell Death Differ.* – 2016. – Vol. 23(7). – P.1128-39.
77. Cheng H., Qiu L., Ma J., Zhang H., Cheng M., Li W., Zhao X., Liu K. Replicative senescence of human bone marrow and umbilical cord derived mesenchymal stem cells and their differentiation to adipocytes and osteoblasts. // *Mol Biol Rep.* – 2011. – Vol. 38(8). – P.5161-8.
78. Childs B.G., Baker D.J., Wijshake T., Conover C.A., Campisi J., van Deursen J.M. Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis. // *Science.* – 2016. – Vol. 354. – P.472–7.
79. Choi J.R., Pinguan-Murphy B., Wan Abas W.A., Noor Azmi M.A., Omar S.Z., Chua K.H., Wan Safwani W.K. Impact of low oxygen tension on stemness, proliferation and differentiation potential of human adipose-derived stem cells. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2014. – Vol. 448(2). – P.218-24.
80. Choi J.R., Pinguan-Murphy B., Wan Abas W.A., Yong K.W., Poon C.T., Noor Azmi M.A., Omar S.Z., Chua K.H., Xu F., Wan Safwani W.K. In situ normoxia enhances survival and proliferation rate of human adipose tissue-derived stromal cells without increasing the risk of tumourigenesis. // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10(1). - e0115034.
81. Choi K.M., Seo Y.K., Yoon H.H., Song K.Y., Kwon S.Y., Lee H.S., Park J.K. Effect of ascorbic acid on bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. // *J Biosci Bioeng.* – 2008. – Vol. 105(6). – P.586-94.
82. Choudhury A.R., Ju Z., Djojosubroto M.W., Schienke A., Lechel A., Schaetzlein S., Jiang H., Stepczynska A., Wang C., Buer J., Lee H.W., von Zglinicki T., Ganser A., Schirmacher P., Nakauchi H., Rudolph K.L. Cdkn1a deletion improves stem cell function and lifespan of mice with dysfunctional telomeres without accelerating cancer formation. // *Nat Genet.* – 2007. – Vol. 39(1). – P.99-105.
83. Choy L., Skillington J., Derynck R. Roles of autocrine TGF-beta receptor and Smad signaling in adipocyte differentiation. // *J Cell Biol.* – 2000. – Vol. 149(3). – P.667-82.
84. Clay L., Caudron F., Denoth-Lippuner A., Boettcher B., Buvelot Frei S., Snapp E.L., Barral Y. A sphingolipid-dependent diffusion barrier confines ER stress to the yeast mother cell. // *Elife.* – 2014. – Vol. 3. – e01883.
85. Collado M., Blasco M.A., Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging. // *Cell.* – 2007. – Vol. 130(2). – P.223-33.
86. Coppé J.P., Desprez P.Y., Krtolica A., Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. // *Annu Rev Pathol.* – 2010. – Vol. 5. – P.99-118.

87. Coppé J.P., Kauser K., Campisi J., Beauséjour C.M. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. // *J Biol Chem.* – 2006. – Vol. 281(40). – P.29568-74.
88. Coppé J.P., Patil C.K., Rodier F., Sun Y., Muñoz D.P., Goldstein J., Nelson P.S., Desprez P.Y., Campisi J. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell non-autonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. // *PLoS Biol.* – 2008. – Vol. 6. – P.2853–68.
89. Crisan M., Yap S., Casteilla L., Chen C.W., Corselli M., Park T.S., Andriolo G., Sun B., Zheng B., Zhang L., Norotte C., Teng P.N., Traas J., Schugar R., Deasy B.M., Badylak S., Buhring H.J., Giacobino J.P., Lazzari L., Huard J., Péault B. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. // *Cell Stem Cell.* – 2008. – Vol. 3(3). – P.301-13.
90. Cristofalo V.J., Allen R.G., Pignolo R.J., Martin B.G., Beck J.C. Relationship between donor age and the replicative lifespan of human cells in culture: a reevaluation. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1998. – Vol. 95(18). – P.10614-9.
91. Csete M. Oxygen in the cultivation of stem cells. // *Ann N Y Acad Sci.* – 2005. – Vol. 1049. – P.1-8.
92. d'Adda di Fagagna F., Reaper P.M., Clay-Farrace L., Fiegler H., Carr P., von Zglinicki T., Saretzki G., Carter N.P., Jackson S.P. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. // *Nature.* – 2003. – Vol. 426(6963). – P.194–198.
93. Das A., Chendil D., Dey S., Mohiuddin M., Mohiuddin M., Milbrandt J., Rangnekar V.M., Ahmed M.M. Ionizing radiation down-regulates p53 protein in primary Egr-1-/- mouse embryonic fibroblast cells causing enhanced resistance to apoptosis. // *J Biol Chem.* – 2001. – Vol. 276(5). – P.3279-86.
94. Das R., Jahr H., van Osch G.J., Farrell E. The role of hypoxia in bone marrow-derived mesenchymal stem cells: considerations for regenerative medicine approaches. // *Tissue Eng Part B Rev.* – 2010. – Vol. 16(2). – P.159-68.
95. Davalli P., Mitic T., Caporali A., Lauriola A., D'Arca D. ROS, Cell Senescence, and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related Diseases. // *Oxid Med Cell Longev.* – 2016. – Vol. 2016. – P.3565127.
96. David A., Hwa V., Metherell L.A., Netchine I., Camacho-Hübner C., Clark A.J., Rosenfeld R.G., Savage M.O. Evidence for a continuum of genetic, phenotypic, and biochemical abnormalities in children with growth hormone insensitivity. // *Endocr Rev.* – 2011. – Vol. 32(4). – P.472-97.

97. De Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. // *Genes Dev.* – 2005. – Vol. 19(18). – P.2100–2110.
98. De Sandre-Giovannoli A., Bernard R., Cau P., Navarro C., Amiel J., Boccaccio I., Lyonnet S., Stewart C.L., Munnich A., Le Merrer M., Lévy N. Lamin a truncation in Hutchinson-Gilford progeria. // *Science*. – 2003. – Vol. 300(5628). – P.2055.
99. Dechat T., Pfleghaar K., Sengupta K., Shimi T., Shumaker D.K., Solimando L., Goldman R.D. Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. // *Genes Dev.* – 2008. – Vol. 22. – P.832–853.
100. Demaria M., Ohtani N., Youssef S.A., Rodier F., Toussaint W., Mitchell J.R., Laberge R.M., Vijg J., Van Steeg H., Dollé M.E., Hoeijmakers J.H., de Bruin A., Hara E., Campisi J. An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. // *Dev Cell*. – 2014. – Vol. 31(6). – P.722-33.
101. Despars G., Carbonneau C.L., Bardeau P., Coutu D.L., Beauséjour C.M. Loss of the osteogenic differentiation potential during senescence is limited to bone progenitor cells and is dependent on p53. // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8(8). – e73206.
102. Di G.H., Liu Y., Lu Y., Liu J., Wu C., Duan H.F. IL-6 secreted from senescent mesenchymal stem cells promotes proliferation and migration of breast cancer cells. // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9(11). – e113572.
103. Digirolamo C.M., Stokes D., Colter D., Phinney D.G., Class R., Prockop D.J. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. // *Br J Haematol*. – 1999. – Vol. 107(2). – P.275-81.
104. Dimri G.P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E.E., Linskens M., Rubelj I., Pereira-Smith O., et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1995. Vol. 92(20). – P.9363-7.
105. D'Ippolito G., Diabira S., Howard G.A., Roos B.A., Schiller P.C. Low oxygen tension inhibits osteogenic differentiation and enhances stemness of human MIAMI cells. // *Bone*. – 2006. – Vol. 39(3). – P.513-22.
106. Doles J., Storer M., Cozzuto L., Roma G., Keyes W.M. Age-associated inflammation inhibits epidermal stem cell function. // *Genes Dev.* – 2012. – Vol. 26(19). – P.2144-53.
107. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop Dj., Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent

mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. // Cytotherapy. – 2006. – Vol. 8(4). – P.315-7.

108. Dong Z., Wang J.Z., Yu F., Venkatachalam MA. Apoptosis-resistance of hypoxic cells: multiple factors involved and a role for IAP-2. // Am J Pathol. – 2003. – Vol. 163(2). – P.663-71.

109. Dos Santos F., Andrade P.Z., Boura J.S., Abecasis M.M., da Silva C.L., Cabral J.M. Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells: a more effective cell proliferation kinetics and metabolism under hypoxia. // J Cell Physiol. – 2010. – Vol. 223(1). – P.27-35.

110. Du F., Sun L., Chu Y., Li T., Lei C., Wang X., Jiang M., Min Y., Lu Y., Zhao X., Nie Y., Fan D. DDIT4 promotes gastric cancer proliferation and tumorigenesis through the p53 and MAPK pathways. // Cancer Commun (Lond). – 2018. – Vol. 38(1). – P.45.

111. Duggal S., Brinchmann J.E. Importance of serum source for the in vitro replicative senescence of human bone marrow derived mesenchymal stem cells. // J Cell Physiol. – 2011. – Vol. 226(11). – P.2908-15.

112. Efeyan A., Ortega-Molina A., Velasco-Miguel S., Herranz D., Vassilev L.T., Serrano M. Induction of p53-dependent senescence by the MDM2 antagonist nutlin-3a in mouse cells of fibroblast origin. // Cancer Res. – 2007. – Vol. 67(15). – P.7350-7.

113. Ejtehadifar M., Shamsasenjan K., Movassaghpoor A., Akbarzadehlaleh P., Dehdilani N., Abbasi P., Molaeipour Z., Saleh M. The Effect of Hypoxia on Mesenchymal Stem Cell Biology. // Adv Pharm Bull. – 2015. – Vol. 5(2). – P.141-9.

114. Elzi D.J., Song M., Hakala K., Weintraub S.T., Shiio Y. Wnt antagonist SFRP1 functions as a secreted mediator of senescence. // Mol Cell Biol. – 2012. – Vol. 32(21). – P.4388-99.

115. Elzi D.J., Lai Y., Song M., Hakala K., Weintraub S.T., Shiio Y. Plasminogen activator inhibitor 1--insulin-like growth factor binding protein 3 cascade regulates stress-induced senescence. // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2012. – Vol. 109(30). – P.12052-7.

116. Eriksson M., Brown W.T., Gordon L.B., Glynn M.W., Singer J., Scott L., Erdos M.R., Robbins C.M., Moses T.Y., Berglund P., Dutra A., Pak E., Durkin S., Csoka A.B., Boehnke M., Glover T.W., Collins F.S. Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. // Nature. – 2003. – Vol. 423(6937). – P.293-8.

117. Evans M.J., Kaufman M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. // Nature. – 1981. – Vol. 292(5819). – P.154-6.

118. Fehrer C., Brunauer R., Laschober G., Unterluggauer H., Reitinger S., Kloss F., Güll C., Gassner R., Lepperdinger G. Reduced oxygen tension attenuates differentiation

capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. // Aging Cell. – 2007. – Vol. 6(6). – P.745-57.

119. Feng Y., Zhu M., Dangelmayer S., Lee Y.M., Wijesekera O., Castellanos C.X., Denduluri A., Chaichana K.L., Li Q., Zhang H., Levchenko A., Guerrero-Cazares H., Quiñones-Hinojosa A. Hypoxia-cultured human adipose-derived mesenchymal stem cells are non-oncogenic and have enhanced viability, motility, and tropism to brain cancer. // Cell Death Dis. – 2014. – Vol. 5. – e1567.

120. Finley L.W.S., Thompson C.B. The Metabolism of Cell Growth and Proliferation. // The Molecular Basis of Cancer: Fourth Edition. - 2014. – P.191-208.

121. Firsanov D.V., Solovjeva L.V., Svetlova M.P. H2AX phosphorylation at the sites of DNA double-strand breaks in cultivated mammalian cells and tissues. // Clin Epigenetics. – 2011. – Vol. 2(2). – P.283-97.

122. Fischbach G.D., Fischbach R.L. Stem cells: science, policy, and ethics. // J Clin Invest. – 2004. – Vol. 114(10). – P.1364-70.

123. Forostyak S., Jendelova P., Sykova E.. The role of mesenchymal stromal cells in spinal cord injury, regenerative medicine and possible clinical applications. // Biochimie. – 2013. – Vol. 95(12). – P.2257-70.

124. Fotia C., Massa A., Boriani F., Baldini N., Granchi D. Hypoxia enhances proliferation and stemness of human adipose-derived mesenchymal stem cells. // Cytotechnology. - 2015. – Vol. 67(6). – P.1073-84.

125. Fraga M.F., Esteller M. Epigenetics and aging: the targets and the marks. // Trends Genet. - 2007. – Vol. 23(8). – P.413-8.

126. Freund A., Orjalo A., Desprez P.Y., Campisi J. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. // Trends Mol Med. – 2010. – Vol. 16. – P.238–248.

127. Friedenstein A.J., Gorskaja J.F., Kulagina N.N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. // Exp Hematol. – 1976. – Vol. 4(5). – P.267-74.

128. Frippiat C., Dewelle J., Remacle J., Toussaint O. Signal transduction in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced senescence-like phenotype in human diploid fibroblasts. // Free Radic. Biol. Med. – 2002. – Vol. 33(10). – P.1334-1346.

129. Fu Y., Karbaat L., Wu L., Leijten J., Both S.K., Karperien M. Trophic effects of mesenchymal stem cells in tissue regeneration. // Tissue Eng Part B Rev. – 2017. – Vol. 23(6). – P.515-528.

130. Galderisi U., Cipollaro M., Giordano A. The retinoblastoma gene is involved in multiple aspects of stem cell biology. // Oncogene. - 2006. – Vol. 25(38). – P.5250-6.

131. Gallina C., Turinotto V., Giachino C. A new paradigm in cardiac regeneration: The mesenchymal stem cell secretome. // *Stem Cells Int.* – 2015. – Vol. 2015 – P.765846.
132. Gannon H.S., Donehower L.A., Lyle S., Jones S.N. Mdm2-p53 signaling regulates epidermal stem cell senescence and premature aging phenotypes in mouse skin. // *Dev Biol.* – 2011. – Vol. 353(1). – P.1-9.
133. Garcia-Cao I., Garcia-Cao M., Martin-Caballero J., Criado L.M., Klatt P., Flores J.M., Weill J.C., Blasco M.A., Serrano M. “Super p53” mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally. // *The EMBO journal.* – 2002. – Vol. 21. P.6225–6235.
134. García-Prat L., Martínez-Vicente M., Perdigero E., Ortet L., Rodríguez-Ubreva J., Rebollo E., Ruiz-Bonilla V., Gutarría S., Ballestar E., Serrano A.L., Sandri M., Muñoz-Cánoves P. Autophagy maintains stemness by preventing senescence. // *Nature.* – 2016. – Vol. 529(7584). – P.37-42.
135. Gharibi B., Farzadi S., Ghuman M., Hughes F.J. Inhibition of Akt/mTOR attenuates age-related changes in mesenchymal stem cells. // *Stem Cells.* – 2014. – Vol. 32(8). – P.2256-66.
136. Gharibi B., Ghuman M., Hughes F.J. DDIT4 regulates mesenchymal stem cell fate by mediating between HIF1 $\alpha$  and mTOR signalling. // *Sci Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P.36889.
137. Gharibi B., Hughes F.J. Effects of medium supplements on proliferation, differentiation potential, and in vitro expansion of mesenchymal stem cells. // *Stem Cells Transl Med.* – 2012. – Vol. 1(11). – P.771-82.
138. Ginter E., Simko V., Panakova V. Antioxidants in health and disease. // *Bratisl Lek Listy.* – 2014. – Vol. 115(10). – P.603-6.
139. Gnechi M., Danieli P., Malpasso G., Ciuffreda M.C. Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cells in tissue repair. // *Methods Mol Biol.* – 2016. – Vol. 1416. – P.123-46.
140. Gómez-Sintes R., Ledesma M.D., Boya P. Lysosomal cell death mechanisms in aging. // *Ageing Res Rev.* – 2016. – Vol. 32. – P.150-168.
141. Gonzalez-Suarez I., Redwood A.B., Perkins S.M., Vermolen B., Lichtensztejn D., Grotsky D.A., Morgado-Palacin L., Gapud E.J., Sleckman B.P., Sullivan T., Sage J., Stewart C.L., Mai S., Gonzalo S. Novel roles for A-type lamins in telomere biology and the DNA damage response pathway. // *EMBO J.* – 2009. – Vol. 28(16). – P.2414-27.
142. Görlich A., Bertram K., Hudecova S., Krizanova O. Calcium and ROS: A mutual interplay. // *Redox Biol.* – 2015. – Vol. 6. – P.260-71.

143. Gornostaeva A., Andreeva E., Buravkova L. Factors governing the immunosuppressive effects of multipotent mesenchymal stromal cells in vitro. // Cytotechnology. – 2016. – Vol. 68(4). – P.565-77.
144. Greer E.L., Maures T.J., Hauswirth A.G., Green E.M., Leeman D.S., Maro G.S., Han S., Banko M.R., Gozani O., Brunet A. Members of the H3K4 trimethylation complex regulate lifespan in a germline-dependent manner in *C. elegans*. // Nature. – 2010. – Vol. 466. – P.383–387.
145. Greider C.W, Blackburn E.H. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. // Cell. – 1985. – Vol. 43(2 Pt 1). – P.405-13.
146. Greijer A.E, van der Wall E. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. // J Clin Pathol. – 2004. – Vol. 57(10). – P.1009-14.
147. Griffith J.D., Comeau L., Rosenfield S., Stansel R.M., Bianchi A., Moss H., de Lange T. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. // Cell. – 1999. – Vol. 97(4). – P.503–514.
148. Gruber J., Schaffer S., Halliwell B. The mitochondrial free radical theory of ageing--where do we stand? // Front Biosci. – 2008. – Vol. 13. – P.6554-79.
149. Gu Y., Li T., Ding Y., Sun L., Tu T., Zhu W., Hu J., Sun X. Changes in mesenchymal stem cells following long-term culture in vitro. // Mol Med Rep. – 2016. – Vol. 13(6). – P.5207-15.
150. Hall B.M., Balan V., Gleiberman A.S., Strom E., Krasnov P., Virtuoso L.P., Rydkina E., Vučić S., Balan K., Gitlin I., Leonova K., Polinsky A., Chernova O.B., Gudkov A.V. Aging of mice is associated with p16(*Ink4a*)- and  $\beta$ -galactosidase-positive macrophage accumulation that can be induced in young mice by senescent cells. // Aging (Albany NY). – 2016. – Vol. 8(7). – P.1294-315.
151. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. // Nutr Rev. – 2012. – Vol. 70(5). – P.257-65.
152. Hamalainen R.H., Ahlqvist K.J., Ellonen P., Lepisto M., Logan A., Otonkoski T., Murphy M.P., Suomalainen A. mtDNA Mutagenesis Disrupts Pluripotent Stem Cell Function by Altering Redox Signaling. // Cell Rep. – 2015. – Vol. 11. – P.1614–1624.
153. Han S., Brunet A. Histone methylation makes its mark on longevity. // Trends Cell Biol. – 2012. – Vol. 22(1). – P.42-9.
154. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. // Cell. – 2011. – Vol. 144(5). – P.646-74.
155. Handayaningsih A.E., Takahashi M., Fukuoka H., Iguchi G., Nishizawa H., Yamamoto M., Suda K., Takahashi Y. IGF-I enhances cellular senescence via the reactive

oxygen species-p53 pathway. // Biochem Biophys Res Commun. – 2012. – Vol. 425(2). – P.478-84.

156. Hannon G.J., Beach D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta induced cell cycle arrest. // Nature. – 1994. – Vol. 371(6494). – P.257-261.

157. Haque N., Rahman M.T., Abu Kasim N.H., Alabsi A.M. Hypoxic culture conditions as a solution for mesenchymal stem cell based regenerative therapy. // ScientificWorldJournal. – 2013. – Vol. 2013. – P.632972.

158. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. // J Gerontol. – 1956. – Vol. 11(3). – P.298-300.

159. Harrison D.E., Strong R., Sharp Z.D., Nelson J.F., Astle C.M., Flurkey K., Nadon N.L., Wilkinson J.E., Frenkel K., Carter C.S., Pahor M., Javors M.A., Fernandez E., Miller R.A. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. // Nature. – 2009. – Vol. 460. – P.392–395

160. Hass R., Kasper C., Böhm S., Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. // Cell Commun Signal. – 2011. – Vol. 9. – P.12.

161. Hayflick L., Moorhead P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains. // Exp Cell Res. – 1961. – Vol. 25. – P.585-621.

162. He S., Sharpless N.E. Senescence in Health and Disease. // Cell. – 2017. – Vol. 169(6). – P.1000-1011.

163. Herbig U., Ferreira M., Condel L., Carey D., Sedivy J.M. Cellular senescence in aging primates. // Science. – 2006. – Vol. 311. – P.1257.

164. Herbig U., Jobling W.A., Chen B.P., Chen D.J., Sedivy J.M. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). // Mol. Cell. – 2004. – Vol. 14(4). – P.501–513.

165. Herranz, N., Gallage S., Mellone M., Wuestefeld T., Klotz S., Hanley C.J., Raguz S., Acosta J.C., Innes A.J., Banito A., Georgilis A., Montoya A., Wolter K., Dharmalingam G., Faull P., Carroll T., Martínez-Barbera J.P., Cutillas P., Reisinger F., Heikenwalder M., Miller R.A., Withers D., Zender L., Thomas G.J., Gil J. mTOR regulates MAP KAPK2 translation to control the senescence-associated secretory phenotype. // Nat Cell Biol. – 2015. – Vol. 17(9). – P.1205-17.

166. Hewitt G., Jurk D., Marques F.D., Correia-Melo C., Hardy T., Gackowska A., Anderson R., Taschuk M., Mann J., Passos J.F. Telomeres are favoured targets of a persistent DNA damage response in ageing and stress-induced senescence. // Nat. Commun. – 2012. – Vol. 3. – P.708.

167. Hill R.P., Marie-Egyptienne D.T., Hedley D.W. Cancer stem cells, hypoxia and metastasis. // Semin Radiat Oncol. – 2009. – Vol. 19(2). – P.106-11.
168. Hirst D.G., Robson T. Nitric oxide physiology and pathology. // Methods Mol Biol. – 2011. – Vol. 704. – P.1-13.
169. Hodgkinson C.P., Bareja A., Gomez J.A., Dzau V.J. Emerging concepts in paracrine mechanisms in regenerative cardiovascular medicine and biology. // Circ Res. – 2016. – Vol. 118(1) – P. 95-107.
170. Hoeijmakers J.H. DNA damage, aging, and cancer. // N Engl J Med. – 2009. – Vol. 361(15). – P.1475-85.
171. Hofer H.R., Tuan R.S. Secreted trophic factors of mesenchymal stem cells support neurovascular and musculoskeletal therapies. // Stem Cell Res Ther. – 2016. – Vol. 7(1). – P.131.
172. Hoogduijn M.J., Betjes M.G., Baan C.C. Mesenchymal stromal cells for organ transplantation: different sources and unique characteristics? // Curr Opin Organ Transplant. – 2014. – Vol. 19(1). – P.41-6.
173. Houtkooper R.H., Pirinen E., Auwerx J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. // Nat Rev Mol Cell Biol. – 2012. – Vol. 13(4). – P.225-238.
174. Huy H., Song H.Y., Kim M.J., Kim W.S., Kim D.O., Byun J.E., Lee J., Park Y.J., Kim T.D., Yoon S.R., Choi E.J., Lee C.H., Noh J.Y., Jung H., Choi I. TXNIP regulates AKT-mediated cellular senescence by direct interaction under glucose-mediated metabolic stress. // Aging Cell. – 2018. – Vol. 17(6). - e12836.
175. Iida K., Takeda-Kawaguchi T., Tezuka Y., Kunisada T., Shibata T., Tezuka K. Hypoxia enhances colony formation and proliferation but inhibits differentiation of human dental pulp cells. // Arch Oral Biol. – 2010. – Vol. 55(9). – P.648-54.
176. Imai Y., Takahashi A., Hanyu A., Hori S., Sato S., Naka K., Hirao A., Ohtani N., Hara E. Crosstalk between the Rb pathway and AKT signaling forms a quiescence-senescence switch. // Cell Rep. – 2014. – Vol. 7(1). – P.194-207.
177. Ivanova-Todorova E., Bochev I., Moudjeva M., Dimitrov R., Bukarev D., Kyurkchiev S., Tivchev P., Altunkova I., Kyurkchiev D.S. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. // Immunol Lett. – 2009. – Vol. 126(1–2). – P.37–42.
178. Ivanovic Z. Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm. // J Cell Physiol. – 2009. – Vol. 219(2). – P.271-5.
179. Jacobs J.J., de Lange T. Significant role for p16INK4a in p53-independent telomere-directed senescence. // Curr. Biol. – 2004. – Vol. 14(24). – P.2302–2308.

180. James A.W., Pan A., Chiang M., Zara J.N., Zhang X., Ting K., Soo C. A new function of Nell-1 protein in repressing adipogenic differentiation. // Biochem Biophys Res Commun. – 2011. – Vol. 411(1). – P.126-31.
181. James A.W. Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation. // Scientifica (Cairo). – 2013. – Vol. 2013. – P.684736.
182. Jaskelioff M., Muller F.L., Paik J.H., Thomas E., Jiang S., Adams A.C., Sahin E., Kost-Alimova M., Protopopov A., Cadinanos J., Horner J.W., Maratos-Flier E., Depinho R.A. Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase-deficient mice. // Nature. – 2011. – Vol. 469(7328). – P.102–106.
183. Jiang H., Liang L., Qin, Lu Y., Li B., Wang Y., Lin C., Zhou, Feng S., Yip S.H., Xu F., Lai E.Y., Wang J., Chen J. Functional networks of aging markers in the glomeruli of IgA nephropathy: a new therapeutic opportunity. // Oncotarget. – 2016. – Vol. 7(23). – P. 33616-26.
184. Jin C., Li J., Green C.D., Yu X., Tang X., Han D., Xian B., Wang D., Huang X., Cao X., Yan Z., Hou L., Liu J., Shukeir N., Khaitovich P., Chen C.D., Zhang H., Jenuwein T., Han J.D. Histone demethylase UTX-1 regulates *C. elegans* life span by targeting the insulin/IGF-1 signaling pathway. // Cell Metab. – 2011. – Vol. 14. – P.161–172.
185. Jin H.J., Bae Y.K., Kim M., Kwon S.J., Jeon H.B., Choi S.J., Kim S.W., Yang Y.S., Oh W., Chang J.W. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy. // Int J Mol Sci. – 2013. – Vol. 14(9). – P.17986–8001.
186. Jin Y., Kato T., Furu M., Nasu A., Kajita Y., Mitsui H., Ueda M., Aoyama T., Nakayama T., Nakamura T., Toguchida J. Mesenchymal stem cells cultured under hypoxia escape from senescence via down-regulation of p16 and extracellular signal regulated kinase. // Biochem Biophys Res Commun. – 2010. – Vol. 391(3). – P.1471-6.
187. Kamiya H., Miura K., Ishikawa H., Inoue H., Nishimura S., Ohtsuka E. c-Ha-ras containing 8-hydroxyguanine at codon 12 induces point mutations at the modified and adjacent positions. // Cancer Res. – 1992. – Vol. 52(12). – P.3483-5.
188. Kandoth C., McLellan M.D., Vandine F., Ye K., Niu B., Lu C., Xie M., Zhang Q., McMichael J.F., Wyczalkowski M.A., Leiserson M.D.M., Miller C.A., Welch J.S., Walter M.J., Wendl M.C., Ley T.J., Wilson R.K., Raphael B.J., Ding L. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. // Nature. – 2013. – Vol. 502(7471). – P.333-339.
189. Karagianni M., Brinkmann I., Kinzebach S., Grassl M., Weiss C., Bugert P., Bieback K. A comparative analysis of the adipogenic potential in human mesenchymal stromal cells from cord blood and other sources. // Cytotherapy. – 2013. – Vol. 15(1). – P.76–88.

190. Katakura Y. Molecular basis for the cellular senescence program and its application to anticancer therapy. // Biosci Biotechnol Biochem. – 2006. – Vol. 70(5). – P.1076-81.
191. Katajisto P., Dohla J., Chaffer C.L., Pentimikko N., Marjanovic N., Iqbal S., Zoncu R., Chen W., Weinberg R.A., Sabatini D.M. Stem cells. Asymmetric apportioning of aged mitochondria between daughter cells is required for stemness. // Science. – 2015. – Vol. 348. – P.340–343.
192. Kern S., Eichler H., Stoeve J., Klüter H., Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. // Stem Cells. – 2006. – Vol. 24(5). – P.1294-301.
193. Khrapko K., Vijg J. Mitochondrial DNA mutations and aging: devils in the details? // Trends Genet. – 2009. – Vol. 25. – P.91–98.
194. Kim D.S., Ko Y.J., Lee M.W., Park H.J., Park Y.J., Kim D.I., Sung K.W., Koo H.H., Yoo K.H. Effect of low oxygen tension on the biological characteristics of human bone marrow mesenchymal stem cells. // Cell Stress Chaperones. – 2016. – Vol. 21(6). – P.1089-1099.
195. Kim M., Kim C., Choi Y.S., Kim M., Park C., Suh Y. Age-related alterations in mesenchymal stem cells related to shift in differentiation from osteogenic to adipogenic potential: implication to age-associated bone diseases and defects. // Mech Ageing Dev. – 2012. – Vol. 133(5). – P.215-25.
196. Kim Y.M., Song I., Seo Y.H., Yoon G. Glycogen synthase kinase 3 inactivation induces cell senescence through sterol regulatory element binding protein 1-mediated lipogenesis in chang cells. // Endocrinol Metab (Seoul). – 2013. – Vol. 28(4). – P.297-308.
197. Klopp A.H., Gupta A., Spaeth E., Andreeff M., Marini F., 3rd Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: Do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth? // Stem Cells. – 2011. – Vol. 29. – P.11–19.
198. Knaś M., Zalewska A., Krętowski R., Niczyporuk M., Waszkiewicz N., Cechowska-Pasko M., Waszkiel D., Zwierz K. The profile of lysosomal exoglycosidases in replicative and stress-induced senescence in early passage human fibroblasts. // Folia Histochem Cytobiol. – 2012. – Vol. 50(2). – P.220-7.
199. Kortlever R.M., Higgins P.J., Bernards R. Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. // Nat Cell Biol. – 2006. – Vol. 8(8). – P.877-84.
200. Kreutzer D.A., Essigmann J.M. Oxidized, deaminated cytosines are a source of C --> T transitions in vivo. // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1998. – Vol. 95(7). – P.3578-82.

201. Krtolica A., Larocque N., Genbacev O., Ilic D., Coppe J.P., Patil C.K., Zdravkovic T., McMaster M., Campisi J., Fisher S.J. GRO $\alpha$  regulates human embryonic stem cell self-renewal or adoption of a neuronal fate. // *Differentiation*. – 2011. – Vol. 81(4). – P.222-32.
202. Krtolica A., Parrinello S., Lockett S., Desprez P., Campisi J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2001. – Vol. 98. – P.12072–77.
203. Kucejova B., Sunny N.E., Nguyen A.D., Hallac R., Fu X., Peña-Llopis S., Mason R.P., Deberardinis R.J., Xie X.J., Debose-Boyd R., Kodibagkar V.D., Burgess S.C., Brugarolas J. Uncoupling hypoxia signaling from oxygen sensing in the liver results in hypoketotic hypoglycemic death. // *Oncogene*. – 2011. – Vol. 30(18). – P.2147-60.
204. Kuilman T., Michaloglou C., Mooi W.J., Peepoer D.S. The essence of senescence. // *Genes Dev.* – 2010. – Vol. 24(22). – P.2463-79.
205. Kuilman T., Michaloglou C., Vredeveld L.C., Douma S., van Doorn R., Desmet C.J., Aarden L.A., Mooi W.J., Peepoer D.S. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. // *Cell*. – 2008. – Vol. 133(6). – P.1019-31.
206. Kuilman T., Peepoer D.S. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. // *Nat Rev Cancer*. – 2009. – Vol. 9(2). – P.81-94.
207. Kujoth G.C., Hiona A., Pugh T.D., Someya S., Panzer K., Wohlgemuth S.E., Hofer T., Seo A.Y., Sullivan R., Jobling W.A., Morrow J.D., Van Remmen H., Sedivy J.M., Yamasoba T., Tanokura M., Weindruch R., Leeuwenburgh C., Prolla T.A. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. // *Science*. – 2005. – Vol. 309. – P.481–484.
208. Kuo L.J., Yang L.X. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. // *In Vivo*. – 2008. – Vol. 22(3). – P.305-9.
209. Kurz D.J., Decary S., Hong Y., Erusalimsky J.D. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. // *J Cell Sci*. – 2000. – Vol. 113 ( Pt 20). – P.3613-22.
210. Kuznetsov S.A., Mankani M.H., Bianco P., Robey P.G. Enumeration of the colony-forming units-fibroblast from mouse and human bone marrow in normal and pathological conditions. // *Stem Cell Res*. – 2009. – Vol. 2(1). – P.83-94.
211. Laberge R.-M., Sun Y., Orjalo A.V., Patil C.K., Freund A., Zhou L., Curran S.C., Davalos A.R., Wilson-Edell K.A., Liu S., Limbad C., Demaria M., Li P., Hubbard G.B., Ikeno Y., Javors M., Desprez P.Y., Benz C.C., Kapahi P., Nelson P.S., Campisi J. MTOR regulates the

pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. // Nat Cell Biol. – 2015. – Vol. 17(8). – P.1049-61.

212. Larson B.L., Ylöstalo J., Prockop D.J. Human multipotent stromal cells undergo sharp transition from division to development in culture. // Stem Cells. – 2008. – Vol. 26(1). – P.193-201.

213. Lee E.Y., Xia Y., Kim W.S., Kim M.H., Kim T.H., Kim K.J., Park B.S., Sung J.H. Hypoxia-enhanced wound-healing function of adipose-derived stem cells: increase in stem cell proliferation and up-regulation of VEGF and bFGF. // Wound Repair Regen. – 2009. – Vol. 17(4). – P.540-7.

214. Lee H.W., Blasco M.A., Gottlieb G.J., Horner J.W., 2nd, Greider C.W., DePinho R.A. Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. // Nature. – 1998. – Vol. 392(6676). – P.569–574.

215. Lee H.C., Yin P.H., Lu C.Y., Chi C.W., Wei Y.H. Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. // Biochem J. – 2000. – Vol. 348(Pt 2). – P.425–432.

216. Lee K.S., Kim H.J., Li Q.L., Chi X.Z., Ueta C., Komori T., Wozney J.M., Kim E.G., Choi J.Y., Ryoo H.M., Bae S.C. Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. // Mol Cell Biol. – 2000. – Vol. 20(23). – P.8783-92.

217. Lee Y.H., Lee H.Y., Kim T.G., Lee N.H., Yu M.K., Yi H.K. PPARgamma maintains homeostasis through autophagy regulation in dental pulp. // J. Dent. Res. – 2015. – Vol. 94(5). – P.729-737.

218. Lee Y.H., Lee N.H., Bhattacharai G., Yun J.S., Kim T.I., Jhee E.C., Yi H.K. PPAR $\gamma$  inhibits inflammatory reaction in oxidative stress induced human diploid fibroblast. // Cell Biochem. Funct. – 2010. – Vol. 28(6). – P.490-496.

219. Legzdina D., Romanauska A., Nikulshin S., Kozlovska T., Berzins U. Characterization of Senescence of Culture-expanded Human Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells. // Int J Stem Cells. – 2016. – Vol. 9(1). – P.124-36.

220. Lennon D.P., Edmison J.M., Caplan A.I. Cultivation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells in reduced oxygen tension: effects on in vitro and in vivo osteochondrogenesis. // J Cell Physiol. – 2001. – Vol. 187(3). – P.345-55.

221. Leontieva O.V., Lenzo F., Demidenko Z.N., Blagosklonny M.V. Hyper-mitogenic drive coexists with mitotic incompetence in senescent cells. // Cell Cycle. – 2012. – Vol. 11(24). – P.4642-9.

222. Leroux L., Descamps B., Tojais N.F., Séguy B., Oses P., Moreau C., Daret D., Ivanovic Z., Boiron J.M., Lamazière J.M., Dufourcq P., Couffinhal T., Duplàa C. Hypoxia preconditioned mesenchymal stem cells improve vascular and skeletal muscle fiber regeneration after ischemia through a Wnt4-dependent pathway. // Mol Ther. – 2010. – Vol. 18(8). – P.1545-52.
223. Li A., Dubey S., Varney M.L., Dave B.J., Singh R.K. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. // J. Immunol. – 2003. – Vol. 170. – P.3369–3376.
224. Li J., Ballim D., Rodriguez M., Cui R., Goding C.R., Teng H., Prince S. The anti-proliferative function of the TGF- $\beta$ 1 signaling pathway involves the repression of the oncogenic TBX2 by its homologue TBX3. // J Biol Chem. – 2014. – Vol. 289(51). – P.35633-43.
225. Li Y., Wu Q., Wang Y., Li L., Bu H., Bao J. Senescence of mesenchymal stem cells (Review). // Int J Mol Med. – 2017. – Vol. 39(4). – P.775-782.
226. Li Y., Xu X., Wang .L, Liu G., Li Y., Wu X., Jing Y., Li H., Wang G. Senescent mesenchymal stem cells promote colorectal cancer cells growth via galectin-3 expression. // Cell Biosci. – 2015. – Vol. 5. – P.21.
227. Liang X., Ding Y., Zhang Y., Tse H.F., Lian Q. Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: Current status and perspectives. // Cell Transplant. – 2014. – Vol. 23. – P.1045–1059.
228. Lin C.S., Ning H., Lin G., Lue T.F. Is CD34 truly a negative marker for mesenchymal stromal cells? // Cytotherapy. – 2012. – Vol. 14(10). – P.1159-1163.
229. Lin T.M., Tsai J.L., Lin S.D., Lai C.S., Chang C.C. Accelerated growth and prolonged lifespan of adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells in a medium using reduced calcium and antioxidants. // Stem Cells Dev. – 2005. – Vol. 14(1). – P.92-102.
230. Linnane A.W., Marzuki S., Ozawa T., Tanaka M. Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases. // Lancet. – 1989. – Vol. 1. – P.642–645.
231. Liu D., Hornsby P.J. Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. // Cancer Res. – 2007. – Vol. 67. – P.3117–26.
232. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. // Methods. – 2001. – Vol. 25(4). – P.402-8.
233. Locke M., Feisst V., Dunbar P. Concise review: human adipose-derived stem cells: separating promise from clinical need. // Stem cells. – 2011. – Vol. 29(3). – P.404-411.

234. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. // *Cell*. – 2013. – Vol. 153(6). – P.1194-217.
235. Lu X.X., Cao L.Y., Chen X., Xiao J., Zou Y., Chen Q. PTEN inhibits cell proliferation, promotes cell apoptosis, and induces cell cycle arrest via downregulating the PI3K/AKT/hTERT pathway in lung adenocarcinoma A549 cells. // *Biomed Res Int*. – 2016. – Vol. 2016. – P.2476842.
236. Lukas C., Falck J., Bartkova J., Bartek J., Lukas J. Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage. // *Nat Cell Biol*. – 2003. – Vol. 5(3). – P.255-60.
237. Lukas C., Falck J., Bartkova J., Bartek J., Lukas, J. 2003. Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage. // *Nature Cell Biol*. – Vol. 5. – P.255–260.
238. Lunyak V.V., Amaro-Ortiz A., Gaur M. Mesenchymal Stem Cells Secretory Responses: Senescence Messaging Secretome and Immunomodulation Perspective. // *Front Genet*. – 2017. – Vol. 8. – P.220.
239. Luo S., Shaw W.M., Ashraf J., Murphy C.T. TGF-beta Sma/Mab signaling mutations uncouple reproductive aging from somatic aging. // *PLoS Genet*. – 2009. – Vol. 5(12). – e1000789.
240. Ma T., Grayson W.L., Fröhlich M., Vunjak-Novakovic G. Hypoxia and stem cell-based engineering of mesenchymal tissues. // *Biotechnol Prog*. – 2009. – Vol. 25(1). – P.32-42.
241. Malladi P., Xu Y., Chiou M., Giaccia A.J., Longaker M.T. Effect of reduced oxygen tension on chondrogenesis and osteogenesis in adipose-derived mesenchymal cells. // *Am J Physiol Cell Physiol*. – 2006. – Vol. 290(4). – P.1139-46.
242. Masternak M.M., Bartke A. PPARs in calorie restricted and genetically long-lived mice. // *PPAR Res*. – 2007. – Vol. 2007. – P.28436.
243. Matheu A., Pantoja C., Efeyan A., Criado L.M., Martin-Caballero J., Flores J.M., Klatt P., Serrano M. Increased gene dosage of Ink4a/Arf results in cancer resistance and normal aging. // *Genes & development*. – 2004. – Vol. 18. – P.2736–2746.
244. Mathew S.A., Rajendran S., Gupta P.K., Bhonde R. Modulation of physical environment makes placental mesenchymal stromal cells suitable for therapy. // *Cell Biol Int*. – 2013. – Vol. 37(11). – P.1197-204.
245. Mattar P., Bieback K. Comparing the Immunomodulatory Properties of Bone Marrow, Adipose Tissue, and Birth-Associated Tissue Mesenchymal Stromal Cells. // *Front Immunol*. – 2015. – Vol. 6. – P.560.

246. Mazurek S., Boschek C.B., Hugo F., Eigenbrodt E. Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. // Semin Cancer Biol. – 2005. – Vol. 15(4). – P.300-8.
247. McConnell B.B., Gregory F.J., Stott F.J., Hara E., Peters G. Induced expression of p16(INK4a) inhibits both CDK4- and CDK2-associated kinase activity by reassortment of cyclin-CDK inhibitor complexes. // Mol Cell Biol. – 1999. – Vol. 19. – P.1981–1989.
248. McFaline-Figueroa J.R., Vevea J., Swayne T.C., Zhou C., Liu C., Leung G., Boldogh I.R., Pon L.A. Mitochondrial quality control during inheritance is associated with lifespan and mother-daughter age asymmetry in budding yeast. // Aging Cell. – 2011. – Vol. 10. – P.885–895.
249. McHugh D., Gil J. Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. // J Cell Biol. – 2018. – Vol. 217(1). – P.65-77.
250. McLeod C.M., Mauck R.L. On the origin and impact of mesenchymal stem cell heterogeneity: new insights and emerging tools for single cell analysis. // Eur Cell Mater. – 2017. – Vol. 34. – P.217-231.
251. Meirelles Lda S., Fontes A.M., Covas D.T., Caplan A.I. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. // Cytokine Growth Factor Rev. – 2009. – Vol. 20(5-6). – P.419-27.
252. Mindell J.A. Lysosomal acidification mechanisms. // Annu Rev Physiol. – 2012. – Vol. 74. – P.69-86.
253. Minieri V., Saviozzi S., Gambarotta G., Lo Iacono M., Accomasso L., Cibrario Rocchietti E., Gallina C., Turinetto V., Giachino C. A new paradigm in cardiac regeneration: The mesenchymal stem cell secretome. Stem Cells Int. 2015;2015:765846.
254. Mitchell S.J., Madrigal-Matute J., Scheibye-Knudsen M., Fang E., Aon M., González-Reyes J.A., Cortassa S., Kaushik S., Gonzalez-Freire M., Patel B., Wahl D., Ali A., Calvo-Rubio M., Burón M.I., Guterrez V., Ward T.M., Palacios H.H., Cai H., Frederick D.W., Hine C., Broeskamp F., Habering L., Dawson J., Beasley T.M., Wan J., Ikeno Y., Hubbard G., Becker K.G., Zhang Y., Bohr V.A., Longo D.L., Navas P., Ferrucci L., Sinclair D.A., Cohen P., Egan J.M., Mitchell J.R., Baur J.A., Allison D.B., Anson R.M., Villalba J.M., Madeo F., Cuervo A.M., Pearson K.J., Ingram D.K., Bernier M., de Cabo R. Effects of sex, strain, and energy intake on hallmarks of aging in mice. // Cell Metab. – 2016. – Vol. 23(6). – P.1093-1112.
255. Moerman E.J., Teng K., Lipschitz D.A., Lecka-Czernik B. Aging activates adipogenic and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma/stem cells: the role of PPAR-gamma2 transcription factor and TGF-beta/BMP signaling pathways. // Aging Cell. – 2004. – Vol. 3(6). – P.379-89.

256. Mohyeldin A., Garzón-Muvdi T., Quiñones-Hinojosa A. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. // *Cell Stem Cell.* – 2010. – Vol. 7(2). – P.150-61.
257. Muñoz-Espín D., Cañamero M., Maraver A., Gómez-López G., Contreras J., Murillo-Cuesta S., Rodríguez-Baeza A., Varela-Nieto I., Ruberte J., Collado M., Serrano M. Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. // *Cell.* – 2013. – Vol. 155(5). – P.1104-18.
258. Muñoz-Espín D., Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2014. – Vol. 15(7). – P.482-96.
259. Murphy M.B., Moncivais K., Caplan A.I. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. // *Exp Mol Med.* – 2013. – Vol. 45. – e54.
260. Naaldijk Y., Johnson A.A., Ishak S., Meisel H.J., Hohaus C., Stolzing A. Migrational changes of mesenchymal stem cells in response to cytokines, growth factors, hypoxia, and aging. // *Exp Cell Res.* – 2015. – Vol. 338(1). – P.97-104.
261. Nair P., Muthukumar S., Sells S.F., Han S.S., Sukhatme V.P., Rangnekar V.M. Early growth response-1-dependent apoptosis is mediated by p53. // *J Biol Chem.* – 1997. – Vol. 272(32). – P.20131-8.
262. Nakamura A.J., Chiang Y.J., Hathcock K.S., Horikawa I., Sedelnikova O.A., Hodes R.J., Bonner W.M. Both telomeric and non-telomeric DNA damage are determinants of mammalian cellular senescence. // *Epigenetics Chromatin.* – 2008. – Vol. 1(1). – P.6.
263. Narita M., Núñez S., Heard E., Narita M., Lin A.W., Hearn S.A., Spector D.L., Hannon G.J., Lowe S.W. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. // *Cell.* – 2003. – Vol. 113(6). – P.703-16.
264. Narita, M., Young A.R.J., Arakawa S., Samarajiwa S.A., Nakashima T., Yoshida S., Hong S., Berry L.S., Reichelt S., Ferreira M., Tavaré S., Inoki K., Shimizu S., Narita M. Spatial coupling of mTOR and autophagy augments secretory phenotypes. // *Science.* – 2011. – Vol. 332(6032). – P.966-70.
265. Natesan S., Zhang G., Baer D.G., Walters T.J., Christy R.J., Suggs L.J. A bilayer construct controls adipose-derived stem cell differentiation into endothelial cells and pericytes without growth factor stimulation // *Tissue Eng Part A.* – 2011. – Vol. 17(7-8). – P. 941-953.
266. Neeley W.L., Essigmann J.M. Mechanisms of formation, genotoxicity, and mutation of guanine oxidation products. // *Chem Res Toxicol.* – 2006. – Vol. 19(4). – P.491-505.

267. Nelson G., Wordsworth J., Wang C., Jurk D., Lawless C., Martin-Ruiz C., von Zglinicki T. A senescent cell bystander effect: senescence-induced senescence. // *Aging Cell.* – 2012. – Vol. 11(2). – P.345-9.
268. Nishizawa H., Iguchi G., Fukuoka H., Takahashi M., Suda K., Bando H., Matsumoto R., Yoshida K., Odake Y., Ogawa W., Takahashi Y. IGF-I induces senescence of hepatic stellate cells and limits fibrosis in a p53-dependent manner. // *Sci Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P.34605.
269. Noël D., Gazit D., Bouquet C., Apparailly F., Bony C., Plence P., Millet V., Turgeman G., Perricaudet M., Sany J., Jorgensen C. Short-term BMP-2 expression is sufficient for *in vivo* osteochondral differentiation of mesenchymal stem cells. // *Stem Cells.* – 2004. – Vol. 22(1). – P.74-85.
270. Nombela-Arrieta C., Ritz J., Silberstein L.E. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2011. – Vol. 12(2) – P.126-131.
271. Noureddine H., Gary-Bobo G., Alifano M., Marcos E., Saker M., Vienney N., Amsellem V., Maitre B., Chaouat A., Chouaid C., Dubois-Rande J.L., Damotte D., Adnot S. Pulmonary artery smooth muscle cell senescence is a pathogenic mechanism for pulmonary hypertension in chronic lung disease. // *Circ Res.* – 2011. – Vol. 109(5). – P.543-53.
272. Novakova Z., Hubackova S., Kosar M., Janderova-Rossmeislova L., Dobrovolna J., Vasicova P., Vancurova M., Horejsi Z., Hozak P., Bartek J., Hodny Z. Cytokine expression and signaling in drug-induced cellular senescence. // *Oncogene.* – 2010. – Vol. 29. – P.273–84.
273. Okada M., Kim H.W., Matsuura K., Wang Y.G., Xu M., Ashraf M. Abrogation of age-induced microRNA-195 rejuvenates the senescent mesenchymal stem cells by reactivating telomerase. // *Stem Cells.* – 2016. – Vol. 34(1). – P.148-59.
274. Ono K., Kim S.O., Han J. Susceptibility of lysosomes to rupture is a determinant for plasma membrane disruption in tumor necrosis factor alpha-induced cell death. // *Mol Cell Biol.* – 2003. – Vol. 23(2). – P.665-76.
275. Özcan S., Alessio N., Acar M.B., Mert E., Omerli F., Peluso G., Galderisi U. Unbiased analysis of senescence associated secretory phenotype (SASP) to identify common components following different genotoxic stresses. // *Aging (Albany NY).* – 2016. – Vol. 8(7). – P.1316-29.
276. Papa S., Skulachev V.P. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. // *Mol Cell Biochem.* – 1997. – Vol. 174(1-2). – P.305-19.
277. Parra E., Ferreira J., Saenz L. Inhibition of Egr-1 by siRNA in prostate carcinoma cell lines is associated with decreased expression of AP-1 and NF-κB. // *Int J Mol Med.* – 2011. – Vol. 28(5). – P.847-53.

278. Parrinello S., Coppe J.P., Krtolica A., Campisi J. Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: Senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. // *J Cell Sci.* – 2005. – Vol. 118. – P.485–96.
279. Passos J.F., Nelson G., Wang C., Richter T., Simillion C., Proctor C.J., Miwa S., Olijslagers S., Hallinan J., Wipat A., Saretzki G., Rudolph K.L., Kirkwood T.B., von Zglinicki T. Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. // *Mol Syst Biol.* – 2010. – Vol. 6. – P.347.
280. Passos J.F., Saretzki G., Ahmed S., Nelson G., Richter T., Peters H., Wappler I., Birket M.J., Harold G., Schaeuble K., Birch-Machin M.A., Kirkwood T.B., von Zglinicki T. Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence. // *PLoS Biol.* – 2007. – Vol. 5(5). – e110.
281. Paxson J.A., Gruntman A.M., Davis A.M., Parkin C.M., Ingenito E.P., Hoffman A.M. Age dependence of lung mesenchymal stromal cell dynamics following pneumonectomy. // *Stem Cells Dev.* – 2013. – Vol. 22(24). – P.3214-25.
282. Phaniendra A., Jestadi D. B., Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. // *Indian J Clin Biochem.* – 2015. – Vol. 30(1). – P.11-26.
283. Pilgaard L., Lund P., Duroux M., Lockstone H., Taylor J., Emmersen J., Fink T., Ragoussis J., Zachar V. Transcriptional signature of human adipose tissue-derived stem cells (hASCs) preconditioned for chondrogenesis in hypoxic conditions. // *Exp Cell Res.* – 2009. – Vol. 315(11). – P.1937-52.
284. Pole A., Dimri M., Dimri G.P. Oxidative stress, cellular senescence and ageing. // *AIMS Molecular Science.* – 2016. – Vol. 3(3). – P.300-324.
285. Pompella A., Visvikis A., Paolicchi A., De Tata V., Casini A.F. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. // *Biochem Pharmacol.* – 2003. – Vol. 66(8). – P.1499-503.
286. Quinlan C.L., Perevoshchikova I.V., Hey-Mogensen M., Orr A.L., Brand M.D. Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates. // *Redox Biol.* – 2013. – Vol. 1. – P.304-12.
287. Ragnauth C.D., Warren D.T., Liu Y., McNair R., Tajsic T., Figg N., Shroff R., Skepper J., Shanahan C.M. Prelamin A. acts to accelerate smooth muscle cell senescence and is a novel biomarker of human vascular aging. // *Circulation.* – 2010. – Vol. 121. – P.2200–2210.
288. Rahal A., Kumar A., Singh V., Yadav B., Tiwari R., Chakraborty S., Dhama K. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. // *Biomed Res Int.* – 2014. – Vol. 2014. – P.761264.

289. Rahman S., Czernik P.J., Lu Y., Lecka-Czernik B.  $\beta$ -catenin directly sequesters adipocytic and insulin sensitizing activities but not osteoblastic activity of PPAR $\gamma$ 2 in marrow mesenchymal stem cells. // PLoS One. – 2012. – Vol. 7(12). – e51746.
290. Reddel R.R. Senescence: an antiviral defense that is tumor suppressive? // Carcinogenesis. – 2010. – Vol. 31(1). – P.19-26.
291. Reeg S., Grune T. Protein Oxidation in aging: does it play a role in aging progression? // Antioxid Redox Signal. – 2015. – Vol. 23(3). – P.239-55.
292. Ribeiro A., Laranjeira P., Mendes S., Velada I., Leite C., Andrade P., Santos F., Henriques A., Grãos M., Cardoso C.M., Martinho A., Pais M., da Silva C.L., Cabral J., Trindade H., Paiva A. Mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix, adipose tissue and bone marrow exhibit different capability to suppress peripheral blood B, natural killer and T cells. // Stem Cell Res Ther. – 2013. – Vol. 4(5). – P.125.
293. Richardson S.M., Kalamegam G., Pushparaj P.N., Matta C., Memic A., Khademhosseini A., Mobasher R., Poletti F.L., Hoyland J.A., Mobasher A. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine: Focus on articular cartilage and intervertebral disc regeneration. // Methods. – 2016. – Vol. 99. – P.69-80.
294. Ristow M., Schmeisser S. Extending life span by increasing oxidative stress. // Free Radic Biol Med. – 2011. – Vol. 51(2). – P.327-36.
295. Robles S.J., Adami G.R. Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. // Oncogene. – 1998. – Vol. 16. – P.1113–23.
296. Rodier F., Muñoz D.P., Teachenor R., Chu V., Le O., Bhaumik D., Coppé J.P., Campeau E., Beauséjour C.M., Kim S.H., Davalos A.R., Campisi J. DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. // J Cell Sci. – 2011. – Vol. 124(Pt 1). – P.68-81.
297. Rossignol R., Faustin B., Rocher C., Malgat M., Mazat J.P., Letellier T. Mitochondrial threshold effects. // Biochem J. – 2003. – Vol. 370. – P.751–762.
298. Roth M., Spaniol K., Kordes C., Schwarz S., Mertsch S., Häussinger D., Rotter N., Geerling G., Schrader S. The influence of oxygen on the proliferative capacity and differentiation potential of lacrimal gland-derived mesenchymal stem cells. // Invest Ophthalmol Vis Sci. – 2015. – Vol. 56(8). – P.4741-52.
299. Rubina K., Kalinina N., Efimenko A., Lopatina T., Melikhova V., Tsokolaeva Z., Parfyonova Y.. Adipose stromal cells stimulate angiogenesis via promoting progenitor cell differentiation, secretion of angiogenic factors, and enhancing vessel maturation. // Tissue Engineering Part A. – 2009. – Vol. 15(8). – P.2039-2050.

300. Salama R, Sadaie M, Hoare M, Narita M. Cellular senescence and its effector programs. // *Genes Dev.* – 2014. – Vol. 28(2). – P.99-114.
301. Salminen A., Olaja J., Kaarniranta K., Haappasalo A., Hiltunen M., Soininen H. Astrocytes in the aging brain express characteristics of senescence-associated secretory phenotype. // *Eur J Neurosci.* – 2011. – Vol. 34. – P.3–11.
302. Sanz A., Fernandez-Ayala D.J., Stefanatos R.K., Jacobs H.T. Mitochondrial ROS production correlates with, but does not directly regulate lifespan in *Drosophila*. // *Aging (Albany NY)*. – 2010. –Vol. 2. – P.200–223.
303. Sart S., Song L., Li Y. Controlling redox status for stem cell survival, expansion, and differentiation. // *Oxid Med Cell Longev.* – 2015. – Vol. 2015. – P.105135.
304. Saxton R.A., Sabatini D.M. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. // *Cell.* – 2017. – Vol. 168(6). – P.960-976.
305. Scaffidi P., Misteli T.. Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. // *Science.* – 2006. – Vol. 312. – P.1059–1063.
306. Schriner S.E., Linford N.J., Martin G.M., Treuting P., Ogburn C.E., Emond M., Coskun P.E., Ladiges W., Wolf N., Van Remmen H., Wallace D.C., Rabinovitch P.S. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. // *Science.* – 2005. – Vol. 308(5730). – P.1909-11.
307. Sedelnikova O.A., Horikawa I., Zimonjic D.B., Popescu N.C., Bonner W.M., Barrett J.C. Senescent human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unrepairable double-strand breaks. // *Nat Cell Biol.* – 2004. – Vol. 6. – P.168–70.
308. Sedelnikova O.A., Redon C.E., Dickey J.S., Nakamura A.J., Georgakilas A.G., Bonner W.M. Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis. // *Mutat Res.* – 2010. – Vol. 704. – P.152–59.
309. Selman C., Lingard S., Choudhury A.I., Batterham R.L., Claret M., Clements M., Ramadani F., Okkenhaug K., Schuster E., Blanc E., Piper M.D., Al-Qassab H., Speakman J.R., Carmignac D., Robinson I.C., Thornton J.M., Gems D., Partridge L., Withers D.J. Evidence for lifespan extension and delayed age-related biomarkers in insulin receptor substrate 1 null mice. // *FASEB J.* – 2008. – Vol. 22(3). – P.807-18.
310. Selman C., Tullet J.M., Wieser D., Irvine E., Lingard S.J., Choudhury A.I., Claret M., Al-Qassab H., Carmignac D., Ramadani F., Woods A., Robinson I.C., Schuster E., Batterham R.L., Kozma S.C., Thomas G., Carling D., Okkenhaug K., Thornton J.M., Partridge L., Gems D., Withers D.J. Ribosomal protein S6 kinase 1 signaling regulates mammalian life span. // *Science.* – 2009. – Vol. 326(5949). – P.140-4.

311. Semenza G.L. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. // Sci STKE. – 2007. – Vol. 2007(407). – cm8.
312. Senturk S., Mumcuoglu M., Gursoy-Yuzugullu O., Cingoz B., Akcali K.C., Ozturk M. Transforming growth factor-beta induces senescence in hepatocellular carcinoma cells and inhibits tumor growth. // Hepatology. – 2010. – Vol. 52(3). – P.966-74.
313. Sepúlveda J.C., Tomé M., Fernández M.E., Delgado M., Campisi J., Bernad A., González M.A. Cell senescence abrogates the therapeutic potential of human mesenchymal stem cells in the lethal endotoxemia model. // Stem Cells. – 2014. – Vol. 32(7). – P.1865-77.
314. Serrano M., Lin A.W., McCurrach M.E., Beach D., Lowe S.W. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. // Cell. – 1997. – Vol. 88(5). – P.593-602.
315. Severino J., Allen R.G., Balin S., Balin A., Cristofalo V.J. Is beta-galactosidase staining a marker of senescence in vitro and in vivo? // Exp Cell Res. – 2000. – Vol. 257(1). – P.162-71.
316. Sharpless N.E., Bardeesy N., Lee K.H., Carrasco D., Castrillon D.H., Aguirre A.J., Wu E.A., Horner J.W., DePinho R.A. Loss of p16Ink4a with retention of p19Arf predisposes mice to tumorigenesis. // Nature. – 2001. – Vol. 413. – P.86–91.
317. Shaw W.M., Luo S., Landis J., Ashraf J., Murphy C.T. The *C. elegans* TGF-beta Dauer pathway regulates longevity via insulin signaling. // Curr. Biol. – 2007. – Vol. 17(19). – P.1635-1645.
318. Sherr C.J., McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. // Cancer Cell. – 2002. – Vol. 2. – P.103–112.
319. Sherr C.J., Roberts J.M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. // Genes Dev. – 1999. – Vol. 13. – P.1501–1512
320. Shockley K.R., Lazarenko O.P., Czernik P.J., Rosen C.J., Churchill G.A., Lecka-Czernik B. PPARgamma2 nuclear receptor controls multiple regulatory pathways of osteoblast differentiation from marrow mesenchymal stem cells. // J Cell Biochem. – 2009. – Vol. 106(2). – P.232-46.
321. Shoshani T., Faerman A., Mett I., Zelin E., Tenne T., Gorodin S., Moshel Y., Elbaz S., Budanov A., Chajut A., Kalinski H., Kamer I., Rozen A., Mor O., Keshet E., Leshkowitz D., Einat P., Skaliter R., Feinstein E. Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene, RTP801, involved in apoptosis. // Mol Cell Biol. – 2002. – Vol. 22(7). – P.2283-93.

322. Siebold A.P., Banerjee R., Tie F., Kiss D.L., Moskowitz J., Harte P.J. Polycomb repressive complex 2 and trithorax modulate drosophila longevity and stress resistance. // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2010. – Vol. 107. – P.169–174.
323. Simonsen J.L., Rosada C., Serakinci N., Justesen J., Stenderup K., Rattan S.I., Jensen T.G., Kassem M. Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. // Nat Biotechnol. – 2002. – Vol. 20(6). – P.592-6.
324. Singer N.G., Caplan A.I. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. // Annu Rev Pathol. – 2011. – Vol. 6. – P.457-78.
325. Skolekova S., Matuskova M., Bohac M., Toro L., Durinikova E., Tyciakova S., Demkova L., Gursky J., Kucerova L. Cisplatin-induced mesenchymal stromal cells-mediated mechanism contributing to decreased antitumor effect in breast cancer cells. // Cell Commun Signal. – 2016. – Vol. 14. – P.4.
326. Sofer A., Lei K., Johannessen C.M., Ellisen L.W. Regulation of mTOR and cell growth in response to energy stress by REDD1. // Mol Cell Biol. – 2005. – Vol. 25(14). – P.5834-45.
327. Sohal R.S., Marzabadi M.R., Galaris D., Brunk U.T. Effect of ambient oxygen concentration on lipofuscin accumulation in cultured rat heart myocytes--a novel in vitro model of lipofuscinogenesis. // Free Radic Biol Med. – 1989. – Vol. 6(1). – P.23-30.
328. Sotiropoulou P.A., Perez S.A., Salagianni M., Baxevanis C.N., Papamichail M. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. // Stem Cells. – 2006. – Vol. 24. – P.462–471.
329. Spoettl T., Hausmann M., Herlyn M., Gunckel M., Dirmeier A., Falk W., Herfarth H., Schoelmerich J., Rogler G. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) inhibits the intestinal-like differentiation of monocytes. // Clin. Exp. Immunol. – 2006. – Vol. 145. – P.190–199.
330. Squillaro T., Peluso G., Galderisi U. Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells: An Update. // Cell Transplant. – 2016. – Vol. 25(5). – P.829-48.
331. Stechschulte L.A., Lecka-Czernik B. Reciprocal regulation of PPAR $\gamma$  and RUNX2 activities in marrow mesenchymal stem cells: Fine balance between p38 MAPK and Protein Phosphatase 5. // Curr Mol Biol Rep. – 2017. – Vol. 3(2). – P.107-113.
332. Storer M., Mas A., Robert-Moreno A., Pecoraro M., Ortells M.C., Di Giacomo V., Yosef R., Pilpel N., Krizhanovsky V., Sharpe J., Keyes W.M. Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. // Cell. – 2013. – Vol. 155(5). – P.1119-30.

333. Strioga M., Viswanathan S., Darinskas A., Slaby O., Michalek J. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. // *Stem Cells Dev.* – 2012. – Vol. 21(14). – P.2724-52.
334. Suda T., Takubo K., Semenza G.L. Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. // *Cell Stem Cell.* – 2011. – Vol. 9. – P.298–310.
335. Sun N., Youle R.J., Finkel T.. The Mitochondrial Basis of Aging. // *Mol Cell.* – 2016. – Vol. 61(5). – P.654-666.
336. Sun N., Yun J., Liu J., Malide D., Liu C., Rovira I.I., Holmström K.M., Fergusson M.M., Yoo Y.H., Combs C.A., Finkel T. Measuring in vivo mitophagy // *Molecular cell.* – 2015. – Vol. 60(4) – P.685-696.
337. Sun T., Tian H., Feng Y.G., Zhu Y.Q., Zhang W.Q. Egr-1 promotes cell proliferation and invasion by increasing  $\beta$ -catenin expression in gastric cancer. // *Dig Dis Sci.* – 2013. – Vol. 58(2). – P.423-30.
338. Sung B., Park S., Yu B.P., Chung H.Y. Amelioration of age-related inflammation and oxidative stress by PPAR $\gamma$  activator: suppression of NF- $\kappa$ B by 2, 4-thiazolidinedione. // *Exp. Gerontol.* – 2006. – Vol. 41(6). – P.590-599.
339. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. // *Cell.* – 2006. – Vol. 126(4). – P.663-76.
340. Takai H., Smogorzewska A., de Lange T. DNA damage foci at dysfunctional telomeres. // *Curr. Biol.* – 2003. – Vol. 13(17). – P.1549–1556.
341. Takeuchi M., Takeuchi K., Kohara A., Satoh M., Shioda S., Ozawa Y., Ohtani A., Morita K., Hirano T., Terai M., Umezawa A, Mizusawa H. Chromosomal instability in human mesenchymal stem cells immortalized with human papilloma virus E6, E7, and hTERT genes. // *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* – 2007. – Vol. 43(3-4). – P.129-38.
342. Talens R.P., Christensen K., Putter H., Willemse G., Christiansen L., Kremer D., Suchiman H.E., Slagboom P.E., Boomsma D.I., Heijmans B.T. Epigenetic variation during the adult lifespan: cross-sectional and longitudinal data on monozygotic twin pairs. // *Aging Cell.* – 2012. – Vol. 11(4). – P.694-703.
343. Tang J., Gordon G.M., Nickoloff B.J., Foreman K.E. The helix-loop-helix protein id-1 delays onset of replicative senescence in human endothelial cells. // *Lab Invest.* – 2002. – Vol. 82(8). – P.1073-9.
344. Tanuma N., Sakuma H., Sasaki A., Matsumoto Y. Chemokine expression by astrocytes plays a role in microglia/macrophage activation and subsequent neurodegeneration in secondary progressive multiple sclerosis. // *Acta Neuropathol.* – 2006. – Vol. 112. – P.195–204.

345. Teraishi F., Wu S., Zhang L., Guo W., Davis J.J., Dong F., Fang B. Identification of a novel synthetic thiazolidin compound capable of inducing c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase-dependent apoptosis in human colon cancer cells. // *Cancer Res.* – 2005. – Vol. 65(14). – P.6380-7.
346. Trifunovic A., Wredenberg A., Falkenberg M., Spelbrink J.N., Rovio A.T., Bruder C.E., Bohlooly Y.M., Gidlof S., Oldfors A., Wibom R., Törnell J., Jacobs H.T., Larsson N.G. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. // *Nature*. – 2004. – Vol. 429. – P.417–423.
347. Tsai C.C., Chen Y.J., Yew T.L., Chen L.L., Wang J.Y., Chiu C.H., Hung S.C. Hypoxia inhibits senescence and maintains mesenchymal stem cell properties through down-regulation of E2A-p21 by HIF-TWIST. // *Blood*. – 2011. – Vol. 117(2). – P.459-69.
348. Tsai K.K., Chuang E.Y., Little J.B., Yuan Z.M. Cellular mechanisms for low-dose ionizing radiation-induced perturbation of the breast tissue microenvironment. // *Cancer Res.* – 2005. – Vol. 65. – P.6734–44.
349. Turinetto V., Vitale E., Giachino C. Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells: Functional Changes and Implications in Stem Cell-Based Therapy. // *Int J Mol Sci.* – 2016. – Vol. 7(7). – pii: E1164.
350. Uccelli A., Moretta L., Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. // *Nat Rev Immunol.* – 2008. – Vol. 8(9). – P.726-36.
351. Udartseva O.O., Lobanova M.V., Andreeva E.R., Burakov S.V., Ogneva I.V., Buravkova L.B. Acute Hypoxic Stress Affects Migration Machinery of Tissue O<sub>2</sub>-Adapted Adipose Stromal Cells. // *Stem Cells Int.* – 2016. – Vol. 2016. – P.7260562.
352. Ugarte F., Ryser M., Thieme S., Fierro F.A., Navratiel K., Bornhäuser M., Brenner S. Notch signaling enhances osteogenic differentiation while inhibiting adipogenesis in primary human bone marrow stromal cells. // *Exp Hematol.* – 2009. – Vol. 37(7). – P.867-875.e1.
353. Ullah I., Subbarao R.B., Rho GJ. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. // *Biosci Rep.* – 2015. – Vol. 35(2). - pii: e00191
354. Untergasser G., Gander R., Rumpold H., Heinrich E., Plas E., Berger P.. TGF-beta cytokines increase senescence-associated beta-galactosidase activity in human prostate basal cells by supporting differentiation processes, but not cellular senescence. // *Exp Gerontol.* – 2003. – Vol. 38(10). – P.1179-88.
355. Valenti M.T., Garbin U., Pasini A., Zanatta M., Stranieri C., Manfro S., Zucal C., Dalle Carbonare L. Role of ox-PAPCs in the differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs)

and Runx2 and PPAR $\gamma$ 2 expression in MSCs-like of osteoporotic patients. // PLoS One. – 2011. – Vol. 6(6). – e20363.

356. Valorani MG, Montelatici E, Germani A, Biddle A, D'Alessandro D, Strollo R, Patrizi MP, Lazzari L, Nye E, Otto WR, Pozzilli P, Alison MR. Pre-culturing human adipose tissue mesenchymal stem cells under hypoxia increases their adipogenic and osteogenic differentiation potentials. // Cell Prolif. – 2012. – Vol. 45(3). – P.225-38.

357. Victorelli S, Passos JF. Telomeres and cell senescence - size matters not. // EBioMedicine. – 2017. – Vol. 21. – P.14-20.

358. von Zglinicki T. Oxidative stress shortens telomeres. // Trends Biochem Sci. – 2002. – Vol. 27. – P.339–44.

359. von Zglinicki T., Saretzki G., Ladhoff J., d'Adda di Fagagna F., Jackson S.P. Human cell senescence as a DNA damage response. // Mech Ageing Dev. – 2005. – Vol. 126. – P.111– 17

360. Vunjak-Novakovic G., Scadden D.T. Biomimetic platforms for human stem cell research. // Cell Stem Cell. – 2011. – Vol. 8(3) - P.252–261.

361. Wagner W, Ho AD, Zenke M. Different facets of aging in human mesenchymal stem cells. // Tissue Eng Part B Rev. – 2010. – Vol. 16(4). – P.445-53.

362. Wagner W, Horn P, Castoldi M, Diehlmann A, Bork S, Saffrich R, Benes V, Blake J, Pfister S, Eckstein V, Ho AD. Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. // PLoS One. – 2008. – Vol. 3(5). – e2213.

363. Wang C, Jurk D, Maddick M, Nelson G, Martin-Ruiz C, von Zglinicki T. DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. // Aging Cell. – 2009. – Vol. 8. – P.311–23.

364. Wang D, Kreutzer DA, Essigmann JM. Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions. // Mutat Res. – 1998. – Vol. 400(1-2). – P.99-115.

365. Wang DW, Fermor B, Gimble JM, Awad HA, Guilak F. Influence of oxygen on the proliferation and metabolism of adipose derived adult stem cells. // J Cell Physiol. – 2005. – Vol. 204(1). – P.184-91.

366. Wang J, Liao L, Wang S, Tan J. Cell therapy with autologous mesenchymal stem cells-how the disease process impacts clinical considerations. // Cytotherapy. – 2013. –Vol. 15(8). – P.893-904.

367. Wang S, Mu J, Fan Z, Yu Y, Yan M, Lei G, Tang C, Wang Z, Zheng Y, Yu J, Zhang G. Insulin-like growth factor 1 can promote the osteogenic differentiation and osteogenesis of stem cells from apical papilla. // Stem Cell Res. – 2012. – Vol. 8(3). – P.346-56.

368. Wang W, Liu Z, Qu P, Zhou Z, Zeng Y, Fan J, Liu Y, Guo Y, Qiu J. Knockdown of regulator of cullins-1 (ROC1) expression induces bladder cancer cell cycle arrest at the G2 phase and senescence. // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8(5). – e62734.
369. Wang Y, Han ZB, Song YP, Han ZC. Safety of mesenchymal stem cells for clinical application. // *Stem Cells Int.* – 2012. – Vol. 2012. – P.652034.
370. Watanabe S, Kawamoto S, Ohtani N, Hara E. Impact of senescence-associated secretory phenotype and its potential as a therapeutic target for senescence-associated diseases. // *Cancer Sci.* – 2017. – Vol. 108(4). – P.563-569.
371. Wei F, Qu C, Song T, Ding G, Fan Z, Liu D, Liu Y, Zhang C, Shi S and Wang S. Vitamin C treatment promotes mesenchymal stem cell sheet formation and tissue regeneration by elevating telomerase activity. // *J Cell Physiol.* – 2012. – Vol. 227(9). – P.3216-24.
372. Wei X, Yang X, Han ZP, Qu FF, Shao L, Shi YF. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. // *Acta Pharmacol Sin.* – 2013. – Vol. 34(6). – P.747-54.
373. Weiss A., Attisano L. The TGFbeta superfamily signaling pathway. // *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* – 2013. Vol. - 2(1). – P.47-63.
374. Wolff NC, Vega-Rubin-de-Celis S, Xie XJ, Castrillon DH, Kabbani W, Brugarolas J. Cell-type-dependent regulation of mTORC1 by REDD1 and the tumor suppressors TSC1/TSC2 and LKB1 in response to hypoxia. // *Mol Cell Biol.* – 2011. – Vol. 31(9). – P.1870-84.
375. Wong K.K., Maser R.S., Bachoo R.M., Menon J., Carrasco D.R., Gu Y., Alt F.W., DePinho R.A. Telomere dysfunction and Atm deficiency compromises organ homeostasis and accelerates ageing. // *Nature.* – 2003. – Vol. 421(6923). – P.643–648.
376. Wu L., Multani A.S., He H., Cosme-Blanco W., Deng Y., Deng J.M., Bachilo O., Pathak S., Tahara H., Bailey S.M., Deng Y., Behringer R.R., Chang S. Pot1 deficiency initiates DNA damage checkpoint activation and aberrant homologous recombination at telomeres. // *Cell.* – 2006. – Vol. 126(1). – P.49–62.
377. Xiao L, Sobue T, Esliger A, Kronenberg MS, Coffin JD, Doetschman T, Hurley MM. Disruption of the Fgf2 gene activates the adipogenic and suppresses the osteogenic program in mesenchymal marrow stromal stem cells. // *Bone.* – 2010. – Vol. 47(2). – P.360-70.
378. Xishan Z, Baoxin H, Xinna Z, Jun R. Comparison of the effects of human adipose and bone marrow mesenchymal stem cells on T lymphocytes. // *Cell Biol Int.* – 2013. –Vol. 37(1). – P.11-8.
379. Xu LN, Lin N, Xu BN, Li JB, Chen SQ. Effect of human umbilical cord mesenchymal stem cells on endometriotic cell proliferation and apoptosis. // *Genet Mol Res.* – 2015. – Vol. 14(4). – P.16553-61.

380. Xu Y, Malladi P, Chiou M, Bekerman E, Giaccia AJ, Longaker MT. In vitro expansion of adipose-derived adult stromal cells in hypoxia enhances early chondrogenesis. // *Tissue Eng.* – 2007. – Vol. 13(12). – P.2981-93.
381. Yang W, Hekimi S. A mitochondrial superoxide signal triggers increased longevity in *Caenorhabditis elegans*. // *PLoS Biol.* – 2010. – Vol. 8. – e1000556.
382. Yang W, Li J, Hekimi S. A Measurable increase in oxidative damage due to reduction in superoxide detoxification fails to shorten the life span of long-lived mitochondrial mutants of *Caenorhabditis elegans*. // *Genetics*. – 2007. – Vol. 177. – P.2063–2074.
383. Yang ZX, Han ZB, Ji YR, Wang YW, Liang L, Chi Y, Yang SG, Li LN, Luo WF, Li JP, Chen DD, Du WJ, Cao XC, Zhuo GS, Wang T, Han ZC. CD106 identifies a subpopulation of mesenchymal stem cells with unique immunomodulatory properties. // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8(3). – e59354.
384. Yegorov YE, Akimov SS, Hass R, Zelenin AV, Prudovsky IA. Endogenous beta-galactosidase activity in continuously nonproliferating cells. // *Exp Cell Res.* – 1998. – Vol. 243(1). – P.207-11.
385. Yin D, Chen K. The essential mechanisms of aging: Irreparable damage accumulation of biochemical side-reactions. // *Exp Gerontol.* – 2005. – Vol. 40(6). – P.455-65.
386. Yin T., Li L. The stem cell niches in bone. // *J Clin Invest.* – 2006. – Vol. 116 (5) - P. 1195-1201.
387. Yoon J, Bang SH, Park JS, Chang ST, Kim YH, Min J. Increased in vitro lysosomal function in oxidative stress-induced cell lines. // *Appl Biochem Biotechnol*. – 2011. – Vol. 163(8). – P.1002-11.
388. Yu J, Baron V, Mercola D, Mustelin T, Adamson ED. A network of p73, p53 and Egr1 is required for efficient apoptosis in tumor cells. // *Cell Death Differ.* – 2007. – Vol. 14(3). – P.436-46.
389. Zarse K, Schmeisser S, Groth M, Priebe S, Beuster G, Kuhlwe D, Guthke R, Platzer M, Kahn CR, Ristow M. Impaired insulin/IGF1 signaling extends life span by promoting mitochondrial L-proline catabolism to induce a transient ROS signal. // *Cell Metab.* – 2012. – Vol. 15. – P.451–465.
390. Zebedee Z, Hara E. Id proteins in cell cycle control and cellular senescence. // *Oncogene*. – 2001. – Vol. 20(58). – P.8317-25.
391. Zhan H, Suzuki T, Aizawa K, Miyagawa K, Nagai R. Ataxia telangiectasia mutated (ATM)-mediated DNA damage response in oxidative stress-induced vascular endothelial cell senescence. // *J Biol Chem.* – 2010. – Vol. 285(38). – P.29662-70.

392. Zhan H., Suzuki T., Aizawa K., Miyagawa K., Nagai R. Ataxia Telangiectasia Mutated-mediated DNA damage response in oxidative stress-induced vascular endothelial cell senescence. // *J Biol Chem.* – 2010. – Vol. 285. – P.29662—29670.
393. Zhang D.Y., Wang H.J., Tan Y.Z.. Wnt/β-catenin signaling induces the aging of mesenchymal stem cells through the DNA damage response and the p53/p21 pathway. // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6(6). – e21397.
394. Zhang X., Wu X., Tang W., Luo Y. Loss of p16(Ink4a) function rescues cellular senescence induced by telomere dysfunction. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2012. – Vol. 13(5). – P.5866–5877.
395. Zhang X., Yang M., Lin L., Chen P., Ma K.T., Zhou C.Y., Ao Y.F. Runx2 overexpression enhances osteoblastic differentiation and mineralization in adipose-derived stem cells in vitro and in vivo. // *Calcif. Tissue Int.* – 2006. – Vol. 79. – P.169–178.
396. Zhang Y., Lv J., Guo H., Wei X., Li W., Xu Z. Hypoxia-induced proliferation in mesenchymal stem cells and angiotensin II-mediated PI3K/AKT pathway. // *Cell Biochem Funct.* – 2015. – Vol. 33(2). – P.51-8.
397. Zheng W., Wang H., Xue L., Zhang Z., Tong T. Regulation of cellular senescence and p16(INK4a) expression by Id1 and E47 proteins in human diploid fibroblast. // *J Biol Chem.* – 2004. – Vol. 279(30). – P.31524-32.
398. Zuk P.A. The Adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead // *Molecular Biology of the Cell.* - 2010. – Vol. 21(11). – P.1783-1787.
399. Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J.W., Katz A.J., Benhaim P., Lorenz H.P., Hedrick M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. // *Tissue Eng.* – 2001. –Vol. 7(2). – P.211-28.