

ГЕРОНТОЛОГИЯ

УДК 576.35:57.017.6

К ВОПРОСУ О СНЯТИИ КРИВЫХ ВЫЖИВАНИЯ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК В ЦИТОГЕРОНТОЛОГИЧЕСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТАХ: КОРОТКИЙ КОММЕНТАРИЙ С ТРЕМЯ ИЕРАРХИЧЕСКИМИ ДИАГРАММАМИ

А.Н. Хохлов, Г.В. Моргунова

(сектор эволюционной цитогеронтологии; e-mail: khokhlov@mail.bio.msu.ru)

Проведен краткий сравнительный анализ различных подходов к оценке жизнеспособности клеток в цитогеронтологических экспериментах. Особый акцент сделан на проблемах, возникающих при снятии кривых выживания культивируемых клеток в модели “стационарного старения”. Подчеркивается, что выбор соответствующих методов определяется главным образом представлениями исследователей о молекулярно-клеточных механизмах старения. Отмечается, что хотя оценка эффективности образования клетками колоний является оптимальным подходом к определению их жизнеспособности, она, к сожалению, неприменима для постмитотических или очень медленно размножающихся клеток. Рассматриваются также некоторые проблемы, возникающие при использовании наиболее популярных молекулярных зондов, предназначенных для оценки соотношения живых и мертвых клеток в клеточной популяции.

Ключевые слова: жизнеспособность, клеточные культуры, цитогеронтология, кривые выживания, эффективность клонирования, молекулярные зонды, старение, обзор.

Список использованных сокращений:

2-NBDG — 2-(N-(7-нитробензо-2-оксо-1,3-диазол-4-ил)амино)-2-дезоксиглюкоза;
BCECF AM — ацетоксиметилловый эфир 2',7'-бис-(2-карбоксиэтил)-5-(6)-карбоксифлуоресцеина;
bis-AAF-R110 — бис-(аланил-аланил-фенилаланил)-родамин 110;
CFDA — диацетат 5-(6)-карбоксифлуоресцеина;
CFDA AM — ацетоксиметилловый эфир диацетата 5-(6)-карбоксифлуоресцеина;
CFDA SE — N-сукцинимидиловый эфир диацетата 5-(6)-карбоксифлуоресцеина;
CMFDA — диацетат 5-хлорметилфлуоресцеина;
di-4-ANEPPS — 3-(4-(2-(6-(дибутиламино)нафтален-2-ил)винил)пиридин-1-ил)пропан-1-сульфонат;
FDA — диацетат флуоресцеина;
H₂DCFDA — диацетат 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина;
JC-1 — иодид 5,5',6,6'-тетрахлор-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазолкарбоцианида;
JC-9 — иодид 3,3'-диметил- α -нафтоксазола;
MTT — бромид 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия;
SFDA — диацетат 5-сульфофлуоресцеина;
SNARF-1 — семинафтародафлуор-1;
XTT — 2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфопенил)-2Н-тетразолий-5-карбоксанид;
СВНК — средневзвешенный номер класса;
ЭОК — эффективность образования колоний.

На протяжении многих лет, работая на нашей модели “стационарного старения” [1–6], мы опре-

деляли этот феномен как накопление в культивируемых клетках, пролиферация которых заторможена каким-либо способом (лучше всего с помощью контактного торможения), “возрастных” повреждений, сходных с изменениями в клетках стареющих многоклеточных организмов. При этом кинетика гибели клеток в данной модельной системе оставалась “за кадром”. Впоследствии нам удалось показать, что при “стационарном старении” клетки вымирают в соответствии с уравнением Гомпертца, т.е. действительно стареют [6, 7]. Иначе говоря, вероятность их гибели со временем увеличивается экспоненциально, как и у стареющих животных/людей. Однако оставался открытым вопрос, как корректно снимать такие кривые выживания. В упомянутых экспериментах количество выживших к данному моменту клеток определяли визуально, просто подсчитывая их в световом микроскопе. При этом никакие специальные методы определения жизнеспособности клеток не использовали. В связи с этим возник вопрос, насколько корректно мы при таком подходе оцениваем жизнеспособность каждой конкретной клетки. Особенно важно это было бы знать при построении “хвоста” кривой выживания, на котором дисперсия получаемых данных становится очень большой в силу значительного уменьшения абсолютной численности клеточной популяции [8].

Надо сказать, что проблема оценки жизнеспособности клеток остро стоит практически перед всеми

исследователями, работающими с клеточными культурами. Но особенно она важна как раз для цитогеронтологических экспериментов, в которых основное внимание уделяется динамике изменения со временем соотношения в культуре живых и мертвых клеток. Именно такого рода показатели в первую очередь требуется оценивать при изучении как старения “по Хейфлику” (т.е. при увеличении количества пассажей, пройденных нормальными культивируемыми клетками), так и “стационарного” старения, которое мы теперь также определяем как увеличение вероятности гибели культивируемых клеток при замедлении скорости их пролиферации в пределах одного пассажа и при дальнейшем пребывании в стационарной фазе роста. Однако эта задача далеко не так проста, как может показаться на первый взгляд. Во-первых, клетки могут делиться, нарушая таким образом целостность клеточной “когорты”. А во-вторых, корректно зафиксировать момент смерти конкретной клетки довольно трудно. В частности, время ее умирания может быть сравнимым со временем существования. Сложно сказать, какой из этапов этого растянутого процесса является “точкой невозврата” [9], после прохождения которой клетку однозначно можно считать мертвой.

В настоящее время существует очень много разных так называемых зондов (probes) для определения жизнеспособности клеток (см., в частности, раздел “Viability and Cytotoxicity Assay Reagents — Section 15.2” в электронной книге “The Molecular Probes® Handbook” — <http://www.lifetechnologies.com/ru/ru/home/references/molecular-probes-the-handbook.html>), но, к сожалению, все они дают достаточно сильно различающиеся результаты. И это понятно, так как обоснование целесообразности использования таких зондов базируется на различных представлениях о том, что именно является ключевым критерием жизнеспособности клетки (целостность цитоплазматической мембраны, способность к синтезу АТФ, наличие де-гидрогеназной активности, интенсивность клеточного дыхания и др.). Иначе говоря, довольно распространенной является ситуация, когда одна и та же клетка по результатам одного теста является живой, а по результатам другого — мертвой.

В наших собственных экспериментах мы неоднократно измеряли долю мертвых клеток в одной и той же “стационарно старой” (т.е. находившейся без пересева в течение 2—3 недель) культуре клеток с помощью различных методов. При этом мы применяли как обычную визуальную оценку состояния клеток под микроскопом, так и фотографирование культуры с помощью цифровой камеры с последующим подсчетом доли мертвых клеток на экране компьютера. В обоих

случаях клетки анализировали либо “как есть” (т.е. без использования красителей/зондов), либо после добавления соответствующих препаратов, которые, как считается, обеспечивают дифференциальную окраску живых и мертвых клеток. В частности, использовали трипановый синий, метиленовый синий, нейтральный красный и МТТ. Оказалось, что данные о проценте мертвых клеток в конкретной культуре, получаемые этими методами, во многих случаях достоверно различаются. К сожалению, это ставит под сомнение эффективность такого рода подходов к оценке жизнеспособности клеток в цитогеронтологических экспериментах. Хотелось бы также отметить, что некоторые достаточно широко распространенные красители имеют целый ряд побочных эффектов, о которых исследователи часто не упоминают. Это, в частности, касается солей тетразолия (МТТ, ХТТ и др.). Их можно использовать с самыми разными клетками (от бактерий до клеток млекопитающих), и они достаточно дешевы. Однако существует точка зрения, согласно которой эти зонды хотя и позволяют корректно оценивать метаболическую активность, не являются оптимальными для определения жизнеспособности клеток [10]. Во-первых, метаболическая активность может меняться по самым разным причинам даже при отсутствии изменений количества живых клеток в популяции [11], а во-вторых, в некоторых случаях образующиеся кристаллы формазана могут повреждать цитоплазматическую мембрану, увеличивая таким образом долю мертвых клеток [10]. Использование стандартных наборов реактивов, включающих в себя сразу несколько молекулярных зондов, по-видимому, повышает точность анализа [12], однако не решает проблему в целом.

На рис. 1, 2 и 3 в схематическом виде представлены три группы подходов к определению жизнеспособности культивируемых клеток. Диаграммы не охватывают все возможные варианты тестов “живая/мертвая клетка”, однако позволяют представить,

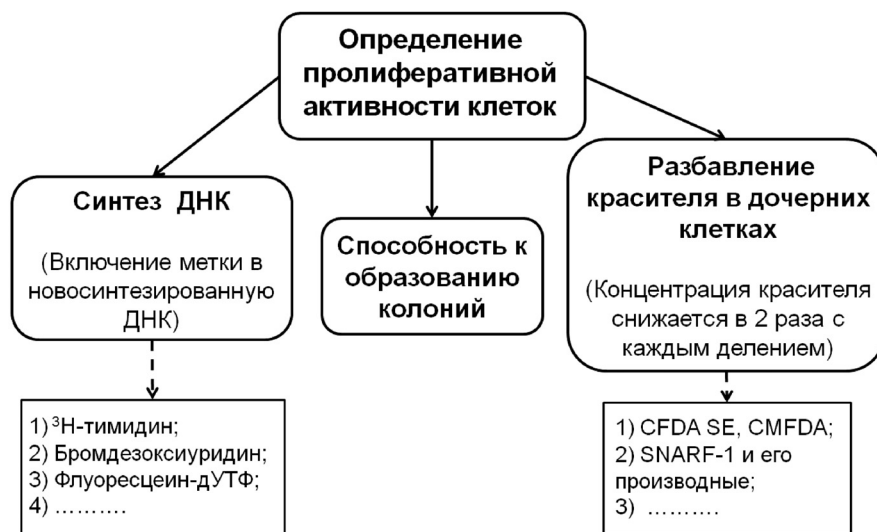


Рис. 1. Методы оценки жизнеспособности культивируемых клеток, основанные на анализе их способности к делению



Рис. 2. Методы оценки жизнеспособности культивируемых клеток, основанные на анализе целостности цитоплазматической мембраны

насколько широким является спектр таких подходов. У всех методов есть как свои плюсы, так и минусы. В частности, наличие “дырок” в цитоплазматической мембране, как оказалось, не всегда обязательно ведет к смерти клетки в силу существования такого феномена, как репарация мембран [13].

Впрочем, существует один метод, который, как правило, действительно дает корректный ответ на вопрос о доле мертвых клеток в изучаемой культуре. Он основан на определении жизнеспособности клеток путем оценки эффективности образования ими колоний (ЭОК) [14–16]. Метод начал широко использоваться в цитогеронтологических экспериментах 70-х гг. прошлого столетия в рамках изучения феномена Хейфлика, т.е. старения *in vitro* [17, 18]. В частности, это было связано с тем обстоятельством, что

доля образующихся колоний, состоящих из 64 и более клеток (в некоторых работах — из 16 и более клеток), как оказалось, является показателем “биологического возраста” культуры нормальных клеток, хорошо коррелирующим с числом пройденных удвоений клеточной популяции. Очень широко метод оценки ЭОК используется и при тестировании митогенной или цитотоксической активности различных соединений [14, 19].

Как правило, при изучении ЭОК на чашку Петри высевает 100–200 клеток из конкретной культуры и через несколько дней оценивают количество выросших клеточных колоний. Сходным образом можно определять и ЭОК клетками, полученными от доноров разного возраста при изучении старения *in vivo*. Правда, этот метод, по очевидным причинам, неприменим для изу-

чения неделящихся или очень медленно делящихся клеток организма (нейроны, кардиомиоциты, гепатоциты и др.), образующих критически важные для процесса старения ткани и органы. Оценить жизнеспособность таких клеток, к сожалению, можно только с помощью упомянутых препаратов-зондов, обеспечивающих измерение того или иного функционального показателя. Однако выбор такого показателя сильно зависит от концепции старения, которой придерживается конкретный исследователь. В то же время положение о том, что если клетка делится, то она уж точно живая, является очевидным для всех геронтологов. Поэтому всегда, когда это возможно, имеет смысл измерять именно ЭОК как наилучший показатель жизнеспособности клеток в изучаемой популяции. К сожалению, достаточно часто данный

метод не позволяет выявить “тонкие” модификации ЭОК, проявляющиеся в изменении не числа образованных колоний, а их распределения по размерам. Сравнение нескольких полученных для разных чашек Петри гистограмм, описывающих распределение клеточных колоний по размерам, сопряжено со значительными трудностями. Хотелось бы для каждой гистограммы иметь некий численный показатель, являющийся ее интегральной характеристикой. В таком случае становится возможным достаточно простое статистическое сравнение данных, касающихся распределения клеточных колоний по размеру и полученных, например, при изучении влияния на клеточную культуру тех или иных биологически ак-

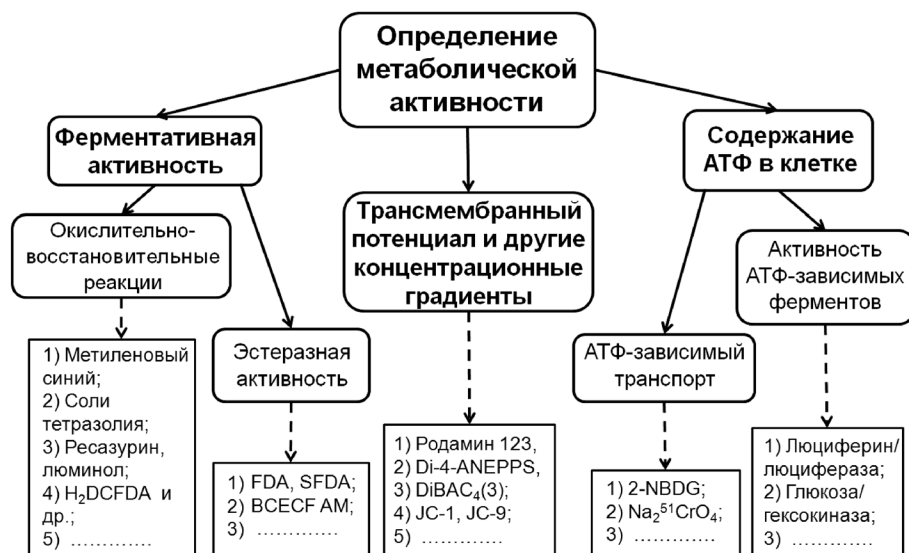


Рис. 3. Методы оценки жизнеспособности культивируемых клеток, основанные на анализе метаболической активности

тивных соединений (например, потенциальных геропротекторов и геропромоторов).

Для решения указанной проблемы мы модифицировали метод оценки ЭОК, введя понятие средневзвешенного номера класса (СВНК) распределения клеток по размерам колоний [8, 20]. Предполагалось, что сдвиг распределения в сторону колоний большего размера, приводящий к возрастанию СВНК, свидетельствует об улучшении функционального состояния изучаемой культуры, т.е. об уменьшении ее “биологического возраста”. И наоборот, уменьшение СВНК должно происходить при “постарении” изучаемой культуры. Конечно, в некоторых случаях этот метод не будет работать, ибо в принципе можно представить себе изменения формы гистограммы без изменения СВНК, но в наших экспериментах мы пока такого не наблюдали. Еще одно преимущество рассматриваемого подхода заключается в сглаживании разброса данных, получаемых разными исследователями для одних и тех же чашек Петри с колониями. Это позволяет ускорить достаточно трудоемкий процесс подсчета количества клеток во всех выросших колониях за счет увеличения количества производящих подсчет исследователей без значительного возрастания вклада субъективизма оценок в дисперсию получаемых результатов. Распределение колоний мы строим, разбивая результаты по 17 классам, определяемым количеством клеток в колонии: 1—15, 16—31, 32—47, ..., 240—255, 256 и более. Таким образом, размер всех классов, кроме первого и последнего, является одинаковым и составляет 16 клеток.

В одной из наших работ [8] в качестве иллюстрации вышеописанного подхода к тестированию биологически активных соединений на клеточных куль-

турах приведены результаты исследования влияния гидратированного C_{60} -фуллерена на ЭОК трансформированными клетками китайского хомячка. Эти данные подтвердили геропромоторный характер влияния агента, выявленный перед этим в эксперименте на модели “стационарного старения”. Оказалось, что расчет ЭОК и особенно СВНК, во-первых, позволяет сильно упростить интерпретацию получаемых результатов, а во-вторых, практически полностью устраняет проблемы субъективизма при подсчете количества клеток в колониях. Следует подчеркнуть, что и другие полученные нами к настоящему времени результаты испытаний различных потенциальных геропротекторов и геропромоторов в экспериментах на культивируемых клетках подтвердили целесообразность использования предложенного подхода для экспресс-тестирования соединений такого рода [20, 21].

Объективности ради хотелось бы все же отметить, что изучение “стационарного старения” клеток с помощью анализа ЭОК может быть осложнено тем обстоятельством, что культивируемые клетки необходимо сначала снять с поверхности роста с помощью специальных препаратов, разрушающих связывающие клетки с субстратом кальциево-белковые “мостики” (как правило, это делают смесью растворов версена и трипсина), и посеять с очень низкой плотностью в чашки Петри/планшеты со свежей средой. Процедура является достаточно травматичной, особенно для клеток-“старичков”, которые просто могут ее не перенести. В связи с этим дисперсия данных по ЭОК может резко возрастать на последних этапах выживания клеток в этой модельной системе [8].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хохлов А.Н. Пролиферация и старение // Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР. Сер. Общие проблемы физико-химической биологии. Т. 9. М.: ВИНТИ, 1988. 176 с.
2. Khokhlov A.N. Stationary cell cultures as a tool for gerontological studies // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1992. Vol. 663. P. 475—476.
3. Khokhlov A.N. Does aging need its own program, or is the program of development quite sufficient for it? Stationary cell cultures as a tool to search for anti-aging factors // Curr. Aging Sci. 2013. Vol. 6. N 1. P. 14—20.
4. Khokhlov A.N. Impairment of regeneration in aging: appropriateness or stochasticity? // Biogerontology. 2013. Vol. 14. N 6. P. 703—708.
5. Khokhlov A.N. Evolution of the term “cellular senescence” and its impact on the current cytogerontological research // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2013. Vol. 68. N 4. P. 158—161.
6. Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Karmushakov A.F., Shilovsky G.A., Nasonov M.M., Morgunova G.V. Testing of geroprotectors in experiments on cell cultures: choosing the correct model system // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2014. Vol. 69. N 1. P. 10—14.
7. Khokhlov A.N. From Carrel to Hayflick and back, or what we got from the 100-year cytogerontological studies // Biophysics. 2010. Vol. 55. N 5. P. 859—864.
8. Yablonskaya O.I., Ryndina T.S., Voeikov V.L., Khokhlov A.N. A paradoxical effect of hydrated C_{60} -fullerene at an ultralow concentration on the viability and aging of cultured Chinese hamster cells // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2013. Vol. 68. N 2. P. 63—68.
9. Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009 // Cell Death Differ. 2009. Vol. 16. N 1. P. 3—11.
10. Berridge M.V., Herst P.M., Tan A.S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction // Biotechnol. Annu. Rev. 2005. Vol. 11. P. 127—152.
11. Keepers Y.P., Pizao P.E., Peters G.J., van Ark-Otte J., Winograd B., Pinedo H.M. Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing // Eur. J. Cancer. 1991. Vol. 27. N 7. P. 897—900.
12. Stoddart M.J. Cell viability assays: introduction // Methods Mol. Biol. 2011. Vol. 740. P. 1—6.

13. Reddy A., Caler E.V., Andrews N.W. Plasma membrane repair is mediated by Ca^{2+} -regulated exocytosis of lysosomes // *Cell*. 2001. Vol. 106. N 2. P. 157–169.
14. Khokhlov A.N., Prokhorov L.Yu., Ivanov A.S., Archakov A.I. Effects of cholesterol- or 7-ketocholesterol-containing liposomes on colony-forming ability of cultured cells // *FEBS Lett*. 1991. Vol. 290. N 1–2. P. 171–172.
15. Smith J.R., Venable S., Roberts T.W., Metter E.J., Monticone R., Schneider E.L. Relationship between in vivo age and in vitro aging: assessment of 669 cell cultures derived from members of the Baltimore Longitudinal Study of Aging // *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2002. Vol. 57. N 6. P. B239–B246.
16. Maier A.B., Maier I.L., van Heemst D., Westendorp R.G. Colony formation and colony size do not reflect the onset of replicative senescence in human fibroblasts // *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2008. Vol. 63. N 7. P. 655–659.
17. Good P.I., Smith J.R. Age distribution of human diploid fibroblasts. A stochastic model for in vitro aging // *Biophys. J.* 1974. Vol. 14. N 11. P. 811–823.
18. Smith J.R., Pereira-Smith O., Good P.I. Colony size distribution as a measure of age in cultured human cells. A brief note // *Mech. Ageing Dev.* 1977. Vol. 6. N 4. P. 283–286.
19. Kuczek T., Axelrod D.E. Tumor cell heterogeneity: divided-colony assay for measuring drug response // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1987. Vol. 84. N 13. P. 4490–4494.
20. Alinkina E.S., Vorobyova A.K., Misharina T.A., Fatkullina L.D., Burlakova E.B., Khokhlov A.N. Cytoogerontological studies of biological activity of oregano essential oil // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2012. Vol. 67. N 2. P. 52–57.
21. Khokhlov A.N., Morgunova G.V., Ryndina T.S., Coll F. Pilot study of a potential geroprotector, “Quinton Marine Plasma”, in experiments on cultured cells // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2015. Vol. 70. N 1. P. 7–11.

Поступила в редакцию
28.11.14

ON THE CONSTRUCTING OF SURVIVAL CURVES FOR CULTURED CELLS IN CYTOGERONTOLOGICAL EXPERIMENTS: A BRIEF NOTE WITH THREE HIERARCHY DIAGRAMS

A.N. Khokhlov, G.V. Morgunova

A brief comparative analysis of different approaches to cell viability testing in cytoogerontological experiments is made. Particular emphasis is placed upon problems arising under constructing of survival curves for cultured cells in the “stationary phase aging” model. It is noted that the choice of the appropriate methods is mainly determined by the researchers’ ideas about molecular and cellular mechanisms of aging. It is emphasized that the evaluation of cell cloning efficiency, though optimal for cell viability determination, is, unfortunately, non-applicable to postmitotic or very slowly propagating cells. Some problems encountered when using the most popular molecular probes designed for “live/dead” assays of cell population are also briefly reviewed.

Key words: *viability, cell culture, cytoogerontology, survival curves, cloning efficiency, molecular probes, aging, review.*

Сведения об авторах

Хохлов Александр Николаевич — докт. биол. наук, зав. сектором эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-15-90; e-mail: khokhlov@mail.bio.msu.ru

Моргунова Галина Васильевна — аспирант сектора эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-15-90; e-mail: morgunova@mail.bio.msu.ru