

ГЕРОНТОЛОГИЯ

УДК 57.017.6+57.033+576.53+57.022

**УХУДШЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТОК
КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА В НЕПЕРЕСЕВАЕМОЙ КУЛЬТУРЕ
ПОД ВЛИЯНИЕМ ЭКЗОГЕННОГО ОКИСЛЕННОГО ГУАНОЗИДА
ПРОЯВЛЯЕТСЯ ТОЛЬКО В СТАЦИОНАРНОЙ ФАЗЕ РОСТА****Г.В. Моргунова*, А.А. Клебанов***Сектор эволюционной цитогеронтологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12***e-mail: morgunova@mail.bio.msu.ru*

Несмотря на то, что продукты окисления нуклеотидов и нуклеозидов являются маркерами окислительного стресса, всё чаще стали появляться сообщения, свидетельствующие о парадоксальной способности этих соединений защищать клетки от повреждающего воздействия активных форм кислорода. Среди всех азотистых оснований наиболее восприимчив к влиянию окислительного стресса гуанин, поэтому чаще остальных окисляются гуанозины. В настоящей работе исследовано влияние экзогенного 8-оксо-2'-дезоксигуанозина на кинетику роста и "стационарного старения" (накопление "возрастных" изменений клеток при замедлении скорости размножения в пределах одного пассажа и дальнейшем их пребывании в стационарной фазе роста) непересеваемой культуры трансформированных клеток китайского хомячка. Показано, что нуклеозид быстро поглощается клетками из среды, однако он никак не влияет на кинетику роста культуры и ухудшает жизнеспособность клеток, находящихся в поздней стационарной фазе. Таким образом, не было обнаружено митогенного или геропротекторного эффекта 8-оксо-2'-дезоксигуанозина.

Ключевые слова: клеточное старение, кривые выживания, 8-оксо-2'-дезоксигуанозин, окислительный стресс, повреждения ДНК, геропротекторы

ДНК клеток подвержена постоянному влиянию повреждающих её эндогенных и экзогенных факторов. Возникающие ошибки устраняет система репарации, но и её возможности не безграничны. Клетки с терминальными повреждениями в ДНК, как правило, погибают или теряют способность к делению. Для активно пролиферирующей культуры появление подобных клеток не так критично, потому что они могут быть "разбавлены" потомством других клеток [1, 2]. Если же повреждения возникают в клетках, которые по тем или иным причинам не могут поделиться, то остаётся надеяться только на систему репарации ДНК [3, 4]. Опасна и ситуация, когда возникшие в ДНК повреждения приводят к появлению мутаций, которые не мешают клетке размножаться и копировать ошибку. Подобные сбои могут привести к развитию опухоли [5–7].

Наиболее хорошо изучено влияние на ДНК окислительного стресса. Внутриклеточными повреждающими факторами являются активные формы кислорода (перекись водорода, супероксид-радикал, гидроксильный радикал), возникающие при поглощении электронов утечки молекулами кислорода [8–10], и так называемые активные формы азота (пероксинитрит, азотистый ангидрид) [6]. Среди пуринов и пиримидинов нуклеиновых кислот гуанин наиболее восприимчив к воздействию активных форм кислорода, так как он имеет самый низкий окислительно-восстановительный потенциал [7, 11, 12]. Именно по этой причине основными маркерами окислительного стресса являются

продукты окисления гуанина — 8-оксо-7,8-дигидро-дезоксигуанозинтрифосфат, 7,8-дигидро-8-оксо-2'-дезоксигуанозин и др. Всего насчитывается более 100 продуктов окисления азотистых оснований [13]. По подсчётам Парк и соавт. в клетках крысы за день возникает и устраняется системой репарации в среднем около 10^5 окисленных гуанинов в ДНК [14]. Подвержены окислению и нуклеозиды РНК [15–17], а также свободные нуклеотиды [6, 18]. 8-Оксогуанозин является одной из самых опасных форм среди окисленных нуклеозидов, так как он может образовывать Хугстинговскую пару с аденозином [7, 11, 13]. Если подобную ошибку не устранить, может произойти замена пары Г:Ц на пару Т:А. Кроме того, если окисленный гуанозин при репликации встраивается в ДНК, может произойти двунитевой разрыв [5].

За устранение окисленных нуклеотидов, а также предотвращение их возникновения отвечает эксцизионная репарация оснований. В первую очередь её осуществляют ДНК-гликозилазы [19]. У бактерий — это mutM (formamidopyrimidine-DNA glycosylase, формамидопиримидин-ДНК-гликозилаза), mutT (8-oxo-dGTP diphosphatase, 8-оксо-дГТФ-дифосфатаза) и mutY (adenine DNA glycosylase, адениновая ДНК-гликозилаза) [20, 21], а гомологи млекопитающих — MTH1 (mutT homolog 1, гомолог mutT 1), OGG1 (8-oxoguanine-DNA glycosylase 1, 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза 1) и MUTYH (mutY homolog, гомолог mutY) соответственно [7]. У дрожжей нет mutY и mutT [3], зато есть несколько

вариантов 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы [11]. MutM/OGG1 удаляет окисленный гуанозин (ОГ) из пары ОГ:Ц в ДНК. MutY/MUTYH удаляет из неправильной пары ОГ:А неприемлемое адениновое основание. MutT/MTH1 гидролизует 8-оксо-7,8-дигидродезоксигуанозинтрифосфат, удаляя соединение из пула свободных нуклеотидов, и предотвращает его включение в ДНК. Показано, что мутации в генах, кодирующих эти ферменты, являются причиной развития многих опухолевых заболеваний [7, 10, 22]. Так как из каждых 10^6 гуанозинов в ДНК окислено всего лишь несколько [7], их поиск значительно усложнен. Ряд авторов считают, что наличие определённого количества окисленных нуклеозидов необходимо клетке, потому что окисленный гуанозин через активацию эксцизионной репарации оснований может стимулировать транскрипцию, выполняя таким образом эпигенетическую регуляцию [12]. Также существует точка зрения, согласно которой некоторое базовое количество окисленных гуанозинов не удаляется из ДНК в связи с феноменом гормезисного эффекта [16]. Временное сохранение базового количества оксигуанозинов может быть более выгодно, чем их восстановление. Значительный интерес представляет встраивание в ДНК окисленных нуклеозидов из свободного пула нуклеотидов [6, 8, 9, 18, 23]. К сожалению, некоторые ферменты могут способствовать накоплению ошибок, как, например, ДНК-полимераза бактерий, которая иногда встраивает окисленный нуклеозид из пула свободных нуклеотидов в новосинтезируемую ДНК [18].

При хронологическом старении дрожжей и “стационарном” старении культивируемых клеток млекопитающих происходит ограничение пролиферации вследствие контактного торможения, в результате чего клетки не обновляются и в них происходят разного рода изменения, сходные с изменениями, характерными для стареющих многоклеточных организмов. Наиболее важные среди них — повреждения ДНК, так как любые другие макромолекулы и органеллы можно заменить [24–26]. Ранее было показано, что в условиях этой модельной системы в клетках возникают сшивки ДНК-белок [27] и одонитевые разрывы [28], происходит деметилирование ДНК [29] и ингибирование процесса поли(АДФ-рибозил)ирования белков хроматина [30], изменяется уровень спонтанных сестринских хроматидных обменов [31, 32]. В ДНК “стационарно стареющих” клеток в 4–5 раз увеличивается содержание 8-оксо-2'-дезоксигуанозина (8-охо-dG) [33]. Интересно, что накопление 8-охо-dG происходит и в клетках, претерпевающих старение по Хейфлику [34].

В последнее время появляется информация о том, что экзогенные окисленные нуклеозиды могут положительно влиять на жизнеспособность клеток и тканей. 8-Охо-dG, например, может парадоксальным образом выступать в роли антиок-

сиданта и регулировать продукцию провоспалительных цитокинов [35]. Предполагается, что его можно будет использовать при лечении и профилактике заболеваний и нарушений, сопровождающихся окислительным стрессом и воспалением [36–38]. В настоящей работе было исследовано влияние экзогенного 8-охо-dG на жизнеспособность, рост и гибель непересеваемой культуры трансформированных клеток китайского хомячка.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на трансформированных клетках китайского хомячка перевиваемой линии B11-dii-FAF28 (клон 237), полученной из ФГБНУ “Медико-генетический научный центр” (Москва). Клетки культивировали при 37°C в стеклянных флаконах Карреля, используя среду Игла в модификации Дульбекко (ФГБУ “НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского” Минздрава России, Москва) с добавлением 5–10% сыворотки крови крупного рогатого скота (“РАА”, Австрия), пенициллина (100 ед/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл). Поддерживая культуру, клетки пересевали в соотношении 1:10–1:3 через каждые 3–4 сут. Снимали клетки с поверхности роста с помощью смеси (1:1) 0,02%-го версена и 0,25%-го трипсина (ФГБУ “НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского” Минздрава России, Москва). 8-Охо-dG был синтезирован на кафедре биоорганической химии биологического факультета МГУ из 2'-дезоксигуанозина (Sigma, США), чистота синтезированного соединения подтверждена методами ядерного магнитного резонанса, а также жидкостной хроматографии и tandemной масс-спектрометрии.

В предварительных исследованиях, направленных на определение цитотоксических и митогенных свойств 8-охо-dG, клетки в “возрасте” 3–4 сут (т.е. выращиваемые без пересева в течение 3–4 сут) засевали в герметично закрывающиеся пенициллиновые флаконы с плотностью около 40 тыс. клеток/см². Через сутки добавляли во флаконы среду, содержащую 8-охо-dG, конечные концентрации — от 10^{-6} М до 10^{-3} М. В контрольные флаконы добавляли среду с соответствующим количеством дистиллированной воды качества Milli-Q. Флаконы помещали на 4 сут в термостат (37°C), после чего клетки снимали с поверхности роста смесью растворов версена и трипсина, затем оценивали их количество с помощью счётных камер. Также определяли влияние 8-охо-dG в самой низкой и в самой высокой концентрации в длительном эксперименте, когда клетки не пересевали в течение 19-и сут (при этом окисленный нуклеозид также добавляли через 24 ч после посева).

Для оценки влияния 8-охо-dG на кинетику роста клеток и их последующую гибель в стационарной фазе 3-суточные клетки засевали в пенициллиновые флаконы с плотностью 40 тыс. клеток/см². На следующие сутки подсчитывали количество

прикрепившихся клеток и добавляли во флаконы среду, содержащую 8-охо-dG (конечная концентрация — 10^{-3} М), во флаконы контрольной группы — среду с соответствующим объёмом воды. Через определённые промежутки времени снимали клетки с поверхности роста смесью растворов версена и трипсина, затем оценивали их количество с помощью счётных камер (3 флакона на точку, 4 камеры на флакон). Эксперимент был сделан в двух повторях.

Для определения динамики поглощения 8-охо-dG клетки выращивали в течение 5 сут до состояния сомкнутого монослоя, затем добавляли раствор окисленного нуклеозида до конечной концентрации 10^{-3} М и через определённые интервалы времени производили отбор небольшого (20–30 мкл) объёма среды, последний был сделан на 20-е сут. Кроме того, определили стабильность 8-охо-dG в среде с 10% сыворотки без клеток при инкубации (37°C) в течение 21 сут. Оценку содержания 8-охо-dG в среде любезно провели сотрудники кафедры биоорганической химии биологического факультета МГУ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе LC-20AD (Shimadzu Scientific Instruments, Япония), оснащённом спектрофотометрическим детектором SPD-M20A (Shimadzu Corporation, Япония) и автосэмплером SII-20A (Shimadzu Corporation, Япония); использовали колонку Equivalent to Phenomenex® Luna® C18(2) (Phenomenex Inc., США). Хроматограммы регистрировали с помощью программы Shimadzu LCSolution (Shimadzu Corporation, Япония).

При сравнении данных использовали t-критерий Стьюдента или непараметрический критерий

Манна-Уитни (в зависимости от результатов проверки нормальности распределения выборки). Математические расчёты и статистическую обработку данных производили с помощью программы SigmaPlot 12.0 и в среде R с использованием дополнительного пакета “nortest”.

Результаты

8-Охо-dG остаётся стабильным при инкубации в среде с сывороткой. Его концентрация, определённая методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, не изменяется в течение 21 сут. При оценке поглощения клетками 8-охо-dG из среды было обнаружено, что концентрация соединения быстро снижается в течение первых нескольких часов (рис. 1), ко вторым суткам она падает в два раза по сравнению с исходной и далее остаётся на этом уровне (последнее измерение было сделано на 20-е сут).

При оценке цитотоксических и митогенных свойств 8-охо-dG определяли его влияние в концентрациях от 10^{-6} М до 10^{-3} М. Даже в самой высокой из них — 10^{-3} М — окисленный нуклеозид не оказывал воздействия на рост и жизнеспособность клеток, через 4 сут после добавления 8-охо-dG не было различий между группами. При длительном же содержании клеток с 8-охо-dG (в течение 18 сут) плотность культуры оказалась достоверно ниже в группе с самым высоким содержанием нуклеозида в среде (рис. 2), но сопоставима с контрольным показателем в группе с низким его содержанием. В связи с этим концентрацию 10^{-3} М выбрали для проведения следующего эксперимента.

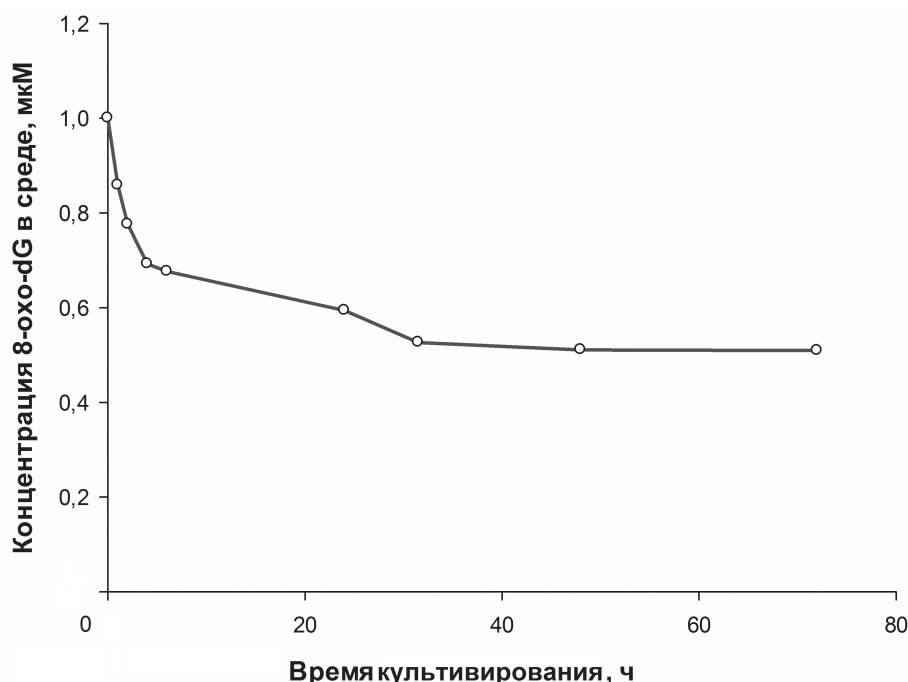


Рис. 1. Динамика изменения концентрации 8-оксо-2'-дезоксигуанозина в культуральной среде в течение первых 70 ч от момента его добавления в среду с 5-суточными (5 сут без пересевов) трансформированными клетками китайского хомячка, находящимися в стационарной фазе роста. Приведено содержание 8-оксо-2'-дезоксигуанозина в среде, измеренное методом обращённо-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии

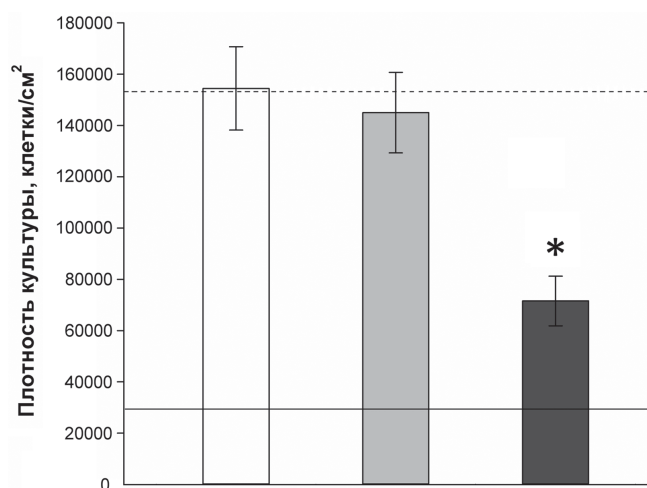


Рис. 2. Плотность культуры находящихся под влиянием 8-оксо-2'-дезоксигуанозина трансформированных клеток китайского хомячка через 19 сут после посева. 8-Оксо-2'-дезоксигуанозина был добавлен в ростовую среду через 24 ч после посева до конечной концентрации 10^{-6} М (серый столбец) и 10^{-3} М (чёрный столбец). Сплошная горизонтальная линия — плотность клеток через 24 ч после посева, пунктирная горизонтальная линия — плотность клеток в контрольной группе через 10 сут после посева. Приведены средние $\pm$ стандартные ошибки среднего

* — достоверное отличие от контрольной группы (белый столбец)

Контрольные и экспериментальные данные, полученные при оценке влияния 8-оксо-dG на динамику роста и “стационарного старения” культуры клеток, сравнивали в каждой отдельной точке подсчёта количества живых клеток. Всего было проведено два эксперимента. В первом эксперименте опыт (данные не приведены) был завершён на 22-е сут (когда клетки только вступили в фазу вымирания), достоверных различий между группами не было обнаружено. Второй эксперимент

был завершён к 52-м сут (рис. 3), практически все клетки в обеих группах погибли к этому времени. На рис. 3 видно, что кривая, описывающая кинетику роста и гибели клеток экспериментальной группы, начиная с фазы плато, пролегает несколько ниже контрольной, достоверные отличия удалось обнаружить на 27-е и 31-е сут. Таким образом, под влиянием 8-оксо-dG в концентрации 10^{-3} М кинетика роста не изменяется и несколько ухудшается жизнеспособность “стационарно старой” культуры клеток.

Обсуждение

8-Оксо-dG даже в высокой концентрации не оказывает никакого влияния на рост и жизнеспособность молодых активно делящихся или только вступивших в стационарную фазу роста клеток. При этом нуклеозид активно поглощается из среды в течение первых суток (особенно в течение первых нескольких часов). Можно предположить, что так как раковые клетки лучше адаптированы к влиянию окислительного стресса и уровень активности МТН1 у них высокий [10], то, вероятно, это позволяет им преобразовывать поглощённые окисленные продукты, потенциально способные навредить клеткам, в безопасные. С другой стороны, хотя 8-оксо-dG и поглощается клетками в первые часы, влияние его обнаруживается лишь на позднем этапе стационарной фазы.

Существующие литературные данные свидетельствуют о том, что положительный эффект 8-оксо-dG проявляется преимущественно в модельных системах, где объекты подвергаются влиянию неблагоприятных или повреждающих факторов, вызывающих развитие окислительного стресса [36–38]. И в нашем случае некоторое влияние на

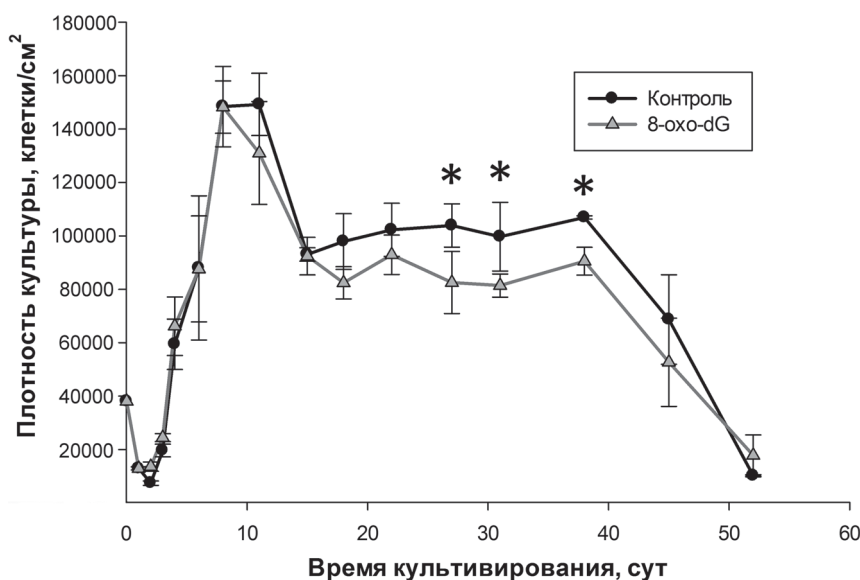


Рис. 3. Влияние добавления 8-оксо-2'-дезоксигуанозина в концентрации 10^{-3} М на кинетику роста и “стационарного старения” культуры трансформированных клеток китайского хомячка (методические подробности — в тексте). Приведены средние $\pm$ стандартные ошибки среднего. Чёрная кривая — контроль, серая кривая — 8-оксо-2'-дезоксигуанозин. * — достоверное отличие от контрольной группы

жизнеспособность было обнаружено только в случае, когда клетки длительное время находились в стационарной фазе роста. Однако этот эффект не только не был положительным, но, напротив, выражался в ухудшении жизнеспособности клеток (рис. 2–3). Остаётся открытым вопрос, как вещество, поглощённое клетками практически сразу, вызывает эффект только спустя 18–40 сут. Происходит ли встраивание 8-охо-dG в собственные структуры, либо он влияет на ход определённых метаболических реакций.

Можно заметить некоторое расхождение контрольных и экспериментальных кривых, описывающих рост и гибель клеток в поздней стационарной фазе (рис. 3), хотя достоверные различия были обнаружены не во всех точках. Впрочем, сложность постановки опытов с оценкой кинетики роста и гибели клеток не позволяет задействовать достаточно большое количество флаконов в каждой группе. В экспериментах по цитотоксичности, где на 19-е сут после посева различия обнаруживались, выборка была больше (7 флаконов на точку), поэтому не исключено, что увеличение количества флаконов в каждой группе от 3 до 5–7 позволило бы обнаружить достоверные различия и в других точках снятия клеток, пребывающих в стационарной фазе роста.

Отрицательный эффект был более ожидаемым, так как накопление окисленных нуклеозидов, свидетельствующее об окислительном стрессе, значительно нагружает клетку, заставляя тратить ресурсы на работу гликозилаз эксцизионной репарации оснований. Возможно, некоторая активация этой репарационной системы и способствует улучшению транскрипции, но значительное увеличение количества продуктов окисления нуклеиновых кислот не может положительно влиять на жизнеспособность клеток и только усложняет их существование, особенно в поздней стационарной фазе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *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.
2. *Khokhlov A.N.* On the immortal hydra. Again // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2014. Vol. 69. N 4. P. 153–157.
3. *Barnes D.E., Lindahl T.* Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells // *Annu. Rev. Genet.* 2004. Vol. 38. P. 445–476.
4. *Khokhlov A.N., Morgunova G.V.* Testing of geroprotectors in experiments on cell cultures: pros and cons // *Anti-aging drugs: From basic research to clinical practice* / Ed. A.M. Vaiserman. Royal Society of Chemistry, 2017. P. 53–74.
5. *Cheng K.C., Cahill D.S., Kasai H., Nishimura S., Loeb L.A.* 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G → T and A → C substitutions // *J. Biol. Chem.* 1992. Vol. 267. N 1. P. 166–172.
6. *Kamiya H.* Mutagenic potentials of damaged nucleic acids produced by reactive oxygen/nitrogen species: approaches using synthetic oligonucleotides and nucleotides: survey and summary // *Nucleic Acids Res.* 2003. Vol. 31. N 2. P. 517–531.
7. *David S.S., O'shea V.L., Kundu S.* Base-excision repair of oxidative DNA damage // *Nature.* 2007. Vol. 447. N 7147. P. 941–950.
8. *Russo M.T., Blasi M.F., Chiera F., Fortini P., Degan P., Macpherson P., Furuichi M., Nakabeppu Y., Karran P., Aquilina G., Bignami M.* The oxidized deoxynucleoside triphosphate pool is a significant contributor to genetic instability in mismatch repair-deficient cells // *Mol. Cell. Biol.* 2004. Vol. 24. N 1. P. 465–474.
9. *Satou K., Kawai K., Kasai H., Harashima H., Kamiya H.* Mutagenic effects of 8-hydroxy-dGTP in live mammalian cells // *Free Radic. Biol. Med.* 2007. Vol. 42. N 10. P. 1552–1560.

10. Nakabeppu Y. Cellular levels of 8-oxoguanine in either DNA or the nucleotide pool play pivotal roles in carcinogenesis and survival of cancer cells // *Int. J. Mol. Sci.* 2014. Vol. 15. N 7. P. 12543–12557.
11. Faucher F., Duclos S., Bandaru V., Wallace S.S., Doublé S. Crystal structures of two archaeal 8-oxoguanine DNA glycosylases provide structural insight into guanine/8-oxoguanine distinction // *Structure*. 2009. Vol. 17. N 5. P. 703–712.
12. Fleming A.M., Burrows C.J. 8-Oxo-7,8-dihydroguanine, friend and foe: Epigenetic-like regulator versus initiator of mutagenesis // *DNA repair*. 2017. Vol. 56. P. 75–83.
13. Aguiar P.H., Furtado C., Repolês B.M., Ribeiro G.A., Mendes I.C., Peloso E.F., Gadelha F.R., Macedo A.M., Franco G.R., Pena S.D., Teixeira S.M. Oxidative stress and DNA lesions: the role of 8-oxoguanine lesions in *Trypanosoma cruzi* cell viability // *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013. Vol. 7. N 6. e2279.
14. Park E.M., Shigenaga M.K., Degan P., Korn T.S., Kitzler J.W., Wehr C.M., Kolachana P., Ames B.N. Assay of excised oxidative DNA lesions: isolation of 8-oxoguanine and its nucleoside derivatives from biological fluids with a monoclonal antibody column // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992. Vol. 89. N 8. P. 3375–3379.
15. Yoshimura D., Sakumi K., Ohno M., Sakai Y., Furuchi M., Iwai S., Nakabeppu Y. An oxidized purine nucleoside triphosphatase, MTH1, suppresses cell death caused by oxidative stress // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278. N 39. P. 37965–37973.
16. Radak Z., Boldogh I. 8-Oxo-7,8-dihydroguanine: links to gene expression, aging, and defense against oxidative stress // *Free Radic. Biol. Med.* 2010. Vol. 49. N 4. P. 587–596.
17. Poulsen H.E., Specht E., Broedbaek K., Henriksen T., Ellervik C., Mandrup-Poulsen T., Tonnesen M., Nielsen P.E., Andersen H.U., Weimann A. RNA modifications by oxidation: a novel disease mechanism? // *Free Radic. Biol. Med.* 2012. Vol. 52. N 8. P. 1353–1361.
18. Shimizu M., Gruz P., Kamiya H., Kim S.R., Pisani F.M., Masutani C., Kanke Y., Harashima H., Hanaoka F., Nohmi T. Erroneous incorporation of oxidized DNA precursors by Y-family DNA polymerases // *EMBO Rep.* 2003. Vol. 4. N 3. P. 269–273.
19. Baute J., Depicker A. Base excision repair and its role in maintaining genome stability // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2008. Vol. 43. N 4. P. 239–276.
20. Michaels M.L., Miller J.H. The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine) // *J. Bacteriol.* 1992. Vol. 174. N 20. P. 6321–6325.
21. Bjørås M., Luna L., Johnsen B., Hoff E., Haug T., Rognes T., Seeberg E. Opposite base-dependent reactions of a human base excision repair enzyme on DNA containing 7,8-dihydro-8-oxoguanine and abasic sites // *EMBO J.* 1997. Vol. 16. N 20. P. 6314–6322.
22. Tsuzuki T., Egashira A., Igarashi H., Iwakuma T., Nakatsuru Y., Tominaga Y., Kawate H., Nakao K., Nakamura K., Ide F., Kura S. Spontaneous tumorigenesis in mice defective in the MTH1 gene encoding 8-oxo-dGTPase // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001. Vol. 98. N 20. P. 11456–11461.
23. Inoue M., Kamiya H., Fujikawa K., Ootsuyama Y., Murata-Kamiya N., Osaki T., Yasumoto K., Kasai H. Induction of chromosomal gene mutations in *Escherichia coli* by direct incorporation of oxidatively damaged nucleotides. New evaluation method for mutagenesis by damaged DNA precursors *in vivo* // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273. N 18. P. 11069–11074.
24. Khokhlov A.N., Morgunova G.V. On the constructing of survival curves for cultured cells in cytogerontological experiments: a brief note with three hierarchy diagrams // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2015. Vol. 70. N 2. P. 67–71.
25. Morgunova G.V., Klebanov A.A., Khokhlov A.N. Some remarks on the relationship between autophagy, cell aging, and cell proliferation restriction // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2016. Vol. 71. N 4. P. 207–211.
26. Morgunova G.V., Klebanov A.A., Marotta F., Khokhlov A.N. Culture medium pH and stationary phase/chronological aging of different cells // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2017. Vol. 72. N 2. P. 47–51.
27. Khokhlov A.N., Chirkova E.Yu., Gorin A.I. Strengthening of the DNA-protein complex during stationary phase aging of cell cultures // *Bull. Exp. Biol. Med.* 1986. Vol. 101. N 4. P. 437–440.
28. Хохлов А.Н., Чиркова Е.Ю., Наджарян Т.Л. Дегра- дация ДНК в покоящихся культивируемых клетках китай- ского хомячка // *Цитология*. 1984. Т. 26. № 8. С. 965–968.
29. Хохлов А.Н., Кирнос М.Д., Ванюшин Б.Ф. Уро- вень метилирования ДНК и “стационарное старение” культивируемых клеток // *Изв. АН СССР. Сер. биол.* 1988. № 3. С. 476–478.
30. Shram S.I., Shilovskii G.A., Khokhlov A.N. Poly(ADP-ribose)-polymerase-1 and aging: experimental study of possible relationship on stationary cell cultures // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2006. Vol. 141. N 5. P. 628–632.
31. Хохлов А.Н., Чиркова Е.Ю., Чеботарёв А.Н. Из- менения уровня сестринских хроматидных обменов в куль- тивируемых клетках китайского хомячка при ограниче- нии их пролиферации // *Цитол. генет.* 1985. Т. 19. № 2. С. 90–92.
32. Хохлов А.Н., Чиркова Е.Ю., Чеботарёв А.Н. Из- менения уровня сестринских хроматидных обменов в культивируемых клетках китайского хомячка при ограни- чении их пролиферации. Дополнительные исследова- ния // *Цитол. генет.* 1987. Т. 21. № 3. С. 186–190.
33. Есипов Д.С., Горбачёва Т.А., Хайруллина Г.А., Клебанов А.А., Нгуен Тхи Нгок Ту, Хохлов А.Н. Изучение накопления 8-оксо-2-дезоксигуанозина в ДНК при “ста- ционарном старении” культивируемых клеток // *Усп. геронтол.* 2008. Т. 21. № 3. С. 485–487.
34. Chen Q., Fischer A., Reagan J.D., Yan L.J., Ames B.N. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995. Vol. 92. N 10. P. 4337–4341.
35. Ock C.Y., Kim E.H., Choi D.J., Lee H.J., Hahn K.B., Chung M.H. 8-Hydroxydeoxyguanosine: not mere biomarker for oxidative stress, but remedy for oxidative stress-implicated gastrointestinal diseases // *World J. Gastroenterol.* 2012. Vol. 18. N 4. P. 302–308.
36. Kim D.H., Cho I.H., Kim H.S., Jung J.E., Kim J.E., Lee K.H., Park T., Yang Y.M., Seong S.Y., Ye S.K., Chung M.H. Anti-inflammatory effects of 8-hydroxydeoxyguanosine in LPS-induced microglia activation: suppression of STAT3-mediated intercellular adhesion molecule-1 expres- sion // *Exp. Mol. Med.* 2006. Vol. 38. N 4. P. 417–427.
37. Huh J.Y., Son D.J., Lee Y., Lee J., Kim B., Lee H.M., Jo H., Choi S., Ha H., Chung M.H. 8-Hydroxy-2-deoxy- guanosine prevents plaque formation and inhibits vascular

smooth muscle cell activation through Rac1 inactivation // Free Radic. Biol. Med. 2012. Vol. 53. N 1. P. 109–121.

38. Lee J.K., Ko S.H., Ye S.K., Chung M.H. 8-Oxo-2'-deoxyguanosine ameliorates UVB-induced skin damage in

hairless mice by scavenging reactive oxygen species and inhibiting MMP expression // J. Dermatol. Sci. 2013. Vol. 70. N 1. P. 49–57.

Поступила в редакцию
29.01.2018

Принята в печать
15.05.2018

GERONTOLOGY

IMPAIRMENT OF THE VIABILITY OF TRANSFORMED CHINESE HAMSTER CELLS IN A NONSUBCULTURED CULTURE UNDER THE INFLUENCE OF EXOGENOUS OXIDIZED GUANOSIDE IS MANIFESTED ONLY IN THE STATIONARY PHASE OF GROWTH

G.V. Morgunova*, A.A. Klebanov

*Evolutionary Cyto gerontology Sector, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia*

**e-mail: morgunova@mail.bio.msu.ru*

Despite the fact that oxidation products of nucleotides and nucleosides are markers of oxidative stress, reports of the paradoxical ability of these compounds to protect cells from the harmful effects of reactive oxygen species began to appear more often. Among all nitrogenous bases, guanine is most susceptible to the influence of oxidative stress, therefore, guanosine is oxidized more often than other bases. In the present work, the effect of exogenous 8-oxo-2'-deoxyguanosine on the growth and "stationary phase aging" (accumulation of "age" changes in cultured cells during cell proliferation slowing down within a single passage and subsequent "aging" in the stationary phase of growth) of a nonsubcultured culture of transformed Chinese hamster cells was studied. We showed that the nucleoside is rapidly absorbed by the cells from the medium, but it does not affect the growth of the culture, and in the late stationary phase of growth impairs the viability of the cells. Thus, no mitogenic or geroprotective effect of 8-oxo-2'-deoxyguanosine was found.

Keywords: *cell aging, survival curve, 8-oxo-2'-deoxyguanosine, oxidative stress, DNA damage, geroprotectors*

Сведения об авторах

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

Клебанов Александр Александрович — науч. сотр. сектора эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-15-90; e-mail: klebanov@mail.bio.msu.ru