

## ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 57.017.6+57.033+576.53+57.022

**ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ «МЯГКОГО РАЗОБЩЕНИЯ»  
2,4-ДИНИТРОФЕНОЛОМ НА РОСТ И ПОСЛЕДУЮЩУЮ ГИБЕЛЬ В  
СТАЦИОНАРНОЙ ФАЗЕ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА****Г.В. Моргунова\*, А.Ф. Кармушаков, А.А. Клебанов, А.Н. Хохлов**

*Сектор эволюционной цитогеронтологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234,  
г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12  
\*e-mail: morgunova@mail.bio.msu.ru*

Частичное разобщение процессов окислительного фосфорилирования и запасаения энергии в виде АТФ («мягкое разобщение») способствует снижению производства активных форм кислорода, а также может имитировать эффект ограничения питания. Целый ряд исследований позволил установить, что разобщители, подобные 2,4-динитрофенолу (ДНФ), оказывают влияние на продолжительность жизни дрозофилы, дрожжей, мышей и крыс, а также воздействуют на проявление «возрастных» изменений в репликативно стареющих культурах клеток млекопитающих и человека. Настоящее исследование посвящено изучению влияния ДНФ на рост и последующую гибель «стационарно стареющих» клеток китайского хомячка. С помощью метода определения эффективности образования колоний клетками подобрана максимально допустимая концентрация –  $5 \cdot 10^{-5}$  М, в которой вещество потенциально способствует проявлению эффекта «мягкого разобщения» и не угнетает пролиферацию. В более высоких концентрациях ДНФ обладает цитотоксическим эффектом. Под влиянием ДНФ в потенциально «мягко разобщающей» концентрации ( $5,6 \cdot 10^{-7}$  М) кинетика роста и гибели культуры клеток не изменяется, не увеличивается её продолжительность жизни. Подобный эффект может быть обусловлен типом исследованных клеток. Кроме того, есть вероятность, что оптимальная концентрация лежит в диапазоне от  $5 \cdot 10^{-7}$  до  $5 \cdot 10^{-5}$  М либо в диапазоне более низких, чем  $5 \cdot 10^{-7}$  М, значений.

**Ключевые слова:** *клеточное старение, «стационарное старение» клеток, 2,4-динитрофенол, эффективность колониеобразования, кривые выживания, геронотекторы*

Окислительное фосфорилирование – биохимический механизм, обеспечивающий сопряжение окислительных реакций с процессом запасаения энергии для жизнедеятельности клетки. При разобщении сопряженных процессов высвобождаемая в ходе окисления энергия рассеивается в виде тепла. Мембранный потенциал митохондрий, создаваемый протонным насосом, определяет образование активных форм кислорода (АФК) – чем больше потенциал, тем больше вырабатывается АФК [1, 2]. Снизить образование АФК можно путем частичного разобщения дыхания и окислительного фосфорилирования при сохранении производства АТФ, достаточного для поддержания нормальной жизнеспособности [3–5]. Этот механизм называется «мягким разобщением» («mild»

uncoupling), он достигается путем повышения проводимости митохондриальной мембраны для протонов  $H^+$ , в результате чего увеличивается потребление  $O_2$ . Такое увеличение замедляет процесс образования АФК за счет понижения концентрации  $O_2$ . Снижение производства АФК подобным способом считается потенциальным механизмом задержки клеточного старения [6, 7]. Кроме того, «мягкое разобщение» уменьшает как мембранный потенциал, так и трансмембранный градиент протонов (именно последний в значительной степени определяет производство АФК [8]), в результате чего происходит частичное подавление производства митохондриального супероксида за счёт снижения эффективного синтеза АТФ [9].

Существует мнение, что «мягкие разобщители» могут быть потенциальными миметиками ограничения питания [1, 10, 11], так как они ограничивают преобразование энергии в работу, и часть энергии, полученная с пищей, рассеивается. Протонофор 2,4-динитрофенол (ДНФ) — широко распространенное в 1930-х гг. средство для борьбы с ожирением, в настоящее время все чаще используется в качестве предполагаемого миметика ограничения питания. ДНФ уменьшает уровень окислительных повреждений и увеличивает среднюю продолжительность жизни у мух [12, 13]. Похожий результат был получен и на мышах: ДНФ в низких дозах способствует улучшению целого ряда физиологических показателей у животных — в том числе, снижает уровень производства АФК и уровень 8-оксо-2'-дезоксигуанозина в мозге, печени и сердце, уменьшает массу тела, увеличивает среднюю продолжительность жизни [11]. У крыс ДНФ также вызывает усиление митохондриального дыхания, уменьшение скорости формирования АФК и увеличение средней продолжительности жизни [14]. Кроме того, у мышей с болезнью Хантингтона ДНФ в низких дозах вызывает снижение уровня окислительного стресса, улучшает моторные функции, однако достоверно не увеличивает среднюю продолжительность жизни [15].

В последнее время эффекты ДНФ всё чаще изучают в рамках моделей клеточного старения. В модели репликативного старения клеток с помощью ДНФ удалось увеличить количество удвоенных популяции фибробластов человека и снизить активность ассоциированной со старением  $\beta$ -галактозидазы [16]. При изучении старения у дрожжей было обнаружено, что ДНФ увеличивает как хронологическую, так и репликативную продолжительность жизни, снижает образование  $H_2O_2$  и повышает выживаемость клеток [10]. ДНФ в низких концентрациях способствует дифференцировке нейронов линии нервных клеток и разрастанию нейритов в первичных культивируемых нейронах [17, 18], он улучшает дифференцировку, пролиферацию и миграцию эмбриональных стволовых клеток мыши, а также защищает их от гибели [19].

Несмотря на множество доказательств положительного влияния ДНФ на самые разные модельные объекты в экспериментах, необходимо помнить, что есть лишь небольшой диапазон концентраций, в которых он вызывает проявление положительных эффектов [1]. В связи с этим сложно найти ту концентрацию ДНФ, которая будет соответствовать «мягкому разобщению», поэтому необходимо тщательно подбирать дозу для постановки экспериментов.

Интересно было бы изучить, как повлияет ДНФ на продолжительность жизни «стационарно стареющей» культуры клеток млекопитающих. 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 [20–24]. В настоящем исследовании мы попытались изучить действие ДНФ 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 (HyClone, США) с добавлением 5–10% сыворотки крови крупного рогатого скота («РАА», Австрия), пенициллина (100 ед/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл). Поддерживая культуру, клетки пересеивали 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 имени Д.И. Ивановского» Минздрава России, Москва). Перед приготовлением раствора ДНФ произвели его перекристаллизацию и спектрофотометрически подтвердили чистоту полученного вещества. Для этого 2 г водной суспензии ДНФ (0,5 мл воды/г; Merck-Schuchardt GmbH, Германия) поместили в колбу объемом 200 мл. Добавили 100 мл воды, затем довели до кипения с обратным охлаждением. Профильтровали раствор через бумажный фильтр, фильтрат поставили в холодильник для кристаллизации. Полученный осадок профильтровали через стеклянный фильтр, а затем поместили в бюкс и оставили на 2 сут в вакууме в присутствии безводного гидроксида калия. Приготовили раствор ДНФ ( $2,486 \cdot 10^{-2}$  М) в буфере Tris-HCl (pH 8,05). Поглощение раствора измеряли с помощью спектрофотометра «Helios  $\alpha$ » (Unicam, США). Перед измерением поглощения провели калибровку спектрофотометра с использованием стандартных фильтров.

В предварительных исследованиях, направленных на определение цитотоксических и митогенных свойств ДНФ, клетки в «возрасте»

3–4 сут (т.е. культивируемые без пересева в течение 3–4 сут) засеивали в герметично закрывающиеся пенициллиновые флаконы с плотностью около 40 тыс. клеток/см<sup>2</sup>. Через сутки добавляли во флаконы среду, содержащую ДНФ, конечные концентрации – от  $3,73 \cdot 10^{-10}$  М до  $3,73 \cdot 10^{-4}$  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, а затем оценивали их количество с помощью гемоцитометра (камеры Горяева).

В связи с необходимостью поиска концентрации ДНФ, которую можно будет назвать «мягко разобщающей», определяли его цитотоксическое влияние с использованием метода оценки эффективности образования колоний (ЭОК) и определением разработанного в нашей лаборатории показателя средневзвешенного номера класса (СВНК) распределения клеточных колоний по размеру [25, 26]. Для этого в чашки Петри («Nunclon», Дания) площадью 10 см<sup>2</sup> добавляли 2,5 мл суспензии клеток (100 или 200 клеток) в ростовой среде, содержащей 90% среды Игла в модификации Дульбекко и 10% эмбриональной телячьей сыворотки FetalClone III (HyClone; GE Healthcare Life Sciences, США). Помещали чашки в СО<sub>2</sub>-инкубатор EG 115 IR (Joan, США), условия культивирования – 37°C, 10% СО<sub>2</sub>; через сутки в часть из них добавляли водные растворы ДНФ (конечные концентрации в культуральной среде составили  $5 \cdot 10^{-6}$  М,  $5 \cdot 10^{-5}$  М,  $7,5 \cdot 10^{-5}$  М,  $1 \cdot 10^{-4}$  М,  $2 \cdot 10^{-4}$  М,  $6,4 \cdot 10^{-4}$  М), в чашки из контрольной группы – дистиллированную воду. По окончании инкубации (через 4 сут) клетки промывали средой без сыворотки, фиксировали в течение 8 мин 75%-ным раствором этанола, промывали дистиллированной водой, окрашивали в течение 3 мин 0,1%-ным водным раствором метиленового синего и снова промывали дистиллированной водой. Затем производили подсчёт как количества образовавшихся колоний, так и количества клеток в этих колониях. Для определения ЭОК мы считали колониями образования, включавшие в себя 16 и более клеток, для СВНК – 2 и более клетки (для того, чтобы повысить чувствительность метода). При оценке СВНК мы разбивали все колонии на 17 классов в зависимости от их величины: 1-й класс – 2–15 клеток, 2-й класс – 16–31 клетка, 3-й класс – 32–47 клеток, ..., 16-й класс – 240–255 клеток, 17-й класс – 256 и более клеток. Сдвиг распределения в сторону колоний большего размера приводит к возрастанию СВНК и сви-

детельствует об улучшении функционального состояния изучаемой культуры, сдвиг в сторону колоний меньшего размера говорит о снижении пролиферативной активности клеток. Для расчёта ЭОК использовали формулу:

$$\text{ЭОК} = \frac{K}{N} \cdot 100 \%, \quad (1)$$

где  $N$  – количество посеянных клеток,  $K$  – количество выросших колоний. Расчёт СВНК производили по формуле:

$$\text{СВНК} = \sum_{i=1}^n \left( \frac{C_i}{M} \cdot i \right), \quad (2)$$

где  $i$  – номер класса,  $n$  – количество классов,  $C_i$  – количество колоний в классе « $i$ »,  $M$  – общее количество колоний.

Для оценки влияния ДНФ на кинетику роста клеток и их последующую гибель в стационарной фазе 3-суточные клетки засеивали в пенициллиновые флаконы с плотностью 45 тыс. клеток/см<sup>2</sup>. На следующие сутки подсчитывали количество прикрепившихся клеток и добавляли во флаконы среду, содержащую ДНФ (конечная концентрация –  $5,6 \cdot 10^{-4}$  М как «сильно разобщающая» и  $5,6 \cdot 10^{-7}$  М – как потенциально «мягко разобщающая»), во флаконы контрольной группы – среду с соответствующим объёмом воды. Через определенные промежутки времени снимали клетки с поверхности роста смесью растворов версена и трипсина, затем оценивали их количество с помощью камер Горяева (3 флакона на точку, 4 камеры на флакон).

При сравнении данных по цитотоксичности использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Полученные кривые гибели клеток аппроксимировали с помощью уравнения Гомпертца [27]. Математические расчёты и статистическую обработку данных производили с помощью программы SigmaPlot 12.0. Все результаты представлены в виде среднего и ошибки среднего.

### Результаты и обсуждение

В первую очередь проверили чистоту используемого ДНФ. Для этого произвели перекристаллизацию вещества и оценили спектрофотометрически его качество. Форма спектра (рис. 1) и коэффициент молярной экстинкции при 360 нм ( $14656 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ) совпали с литературными данными [28], что позволяет судить о достаточной чистоте препарата.

В предварительном эксперименте оценили влияние ДНФ в широком диапазоне concentra-

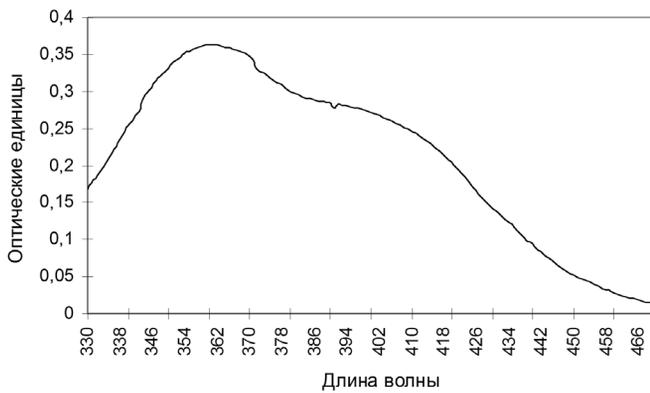


Рис. 1. Спектр поглощения УФ-излучения раствором перекристаллизованного 2,4-динитрофенола

ций — от  $3,73 \cdot 10^{-10}$  М до  $3,73 \cdot 10^{-4}$  М — на рост и жизнеспособность клеток. Установили, что через 4 сут после посева достоверно плотность культуры клеток снижается только в группе, подвергнутой влиянию ДНФ в самой высокой из использованных концентраций —  $3,73 \cdot 10^{-4}$  М (рис. 2). Подобный цитотоксический эффект позволяет предполагать, что данная концентрация может считаться «сильно разобщающей».

Так как подобрать концентрацию ДНФ, в которой препарат будет вызывать эффект «мягкого разобщения», довольно сложная задача, провели более детальный анализ с использованием метода определения ЭОК. Помимо подсчёта колоний определяли количество клеток в каждой колонии, а также строили распределение колоний по размерам с последующей оценкой СВНК. Определение показателя СВНК позволяет выявить более тонкие изменения ЭОК, чем простой подсчёт количества колоний. Исследовали влияние ДНФ в концентрациях от

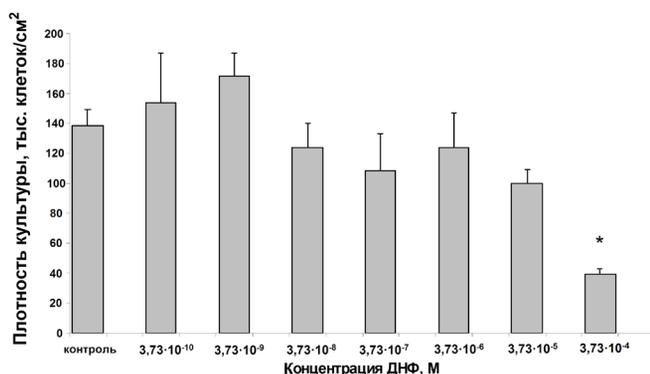


Рис. 2. Влияние 2,4-динитрофенола в различных концентрациях на плотность культуры клеток китайского хомячка на 4-е сут роста (плотность посева 40 тыс. клеток/см<sup>2</sup>). Приведены средние  $\pm$  стандартные ошибки средних. \* — достоверное отличие от контроля,  $p < 0,05$

$5 \cdot 10^{-5}$  до  $6,4 \cdot 10^{-4}$ . ДНФ в концентрации  $2 \cdot 10^{-4}$  М почти полностью (рис. 3), а в концентрации  $6,4 \cdot 10^{-4}$  М — полностью подавляет пролиферацию клеток. Только в самой малой концентрации,  $5 \cdot 10^{-5}$  М, соединение не снижает ЭОК и не влияет на СВНК (таблица). Результаты согласуются с данными других авторов [29], в работах которых было показано, что ДНФ в концентрации  $1 \cdot 10^{-4}$  М на 20% снижает уровень АТФ в нормальных фибробластах человека и в то же время увеличивает их чувствительность к действию  $H_2O_2$ .

В дополнительных экспериментах оценили ЭОК и СВНК при добавлении ДНФ в среду до конечной концентрации  $5 \cdot 10^{-5}$  и  $5 \cdot 10^{-6}$  М. ЭОК в обеих группах ( $20,68 \pm 1,8$  и  $23,12 \pm 2,3$  соответственно) достоверно не отличается от контрольного показателя ( $20,6 \pm 1,6$ ). СВНК выше в группе  $5 \cdot 10^{-6}$  М ( $4,01 \pm 0,17$ ), чем в группе  $5 \cdot 10^{-5}$  М ( $2,75 \pm 0,25$ ), но оба показателя не отличаются достоверно от значения в контроле

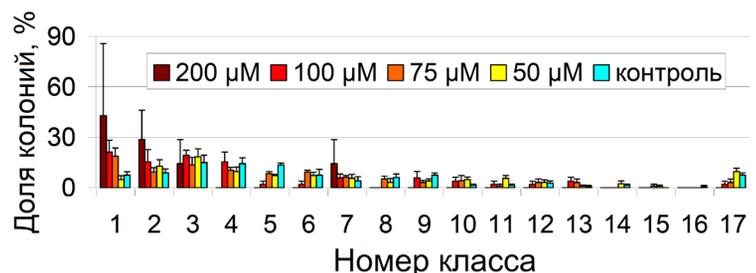


Рис. 3. Влияние 2,4-динитрофенола в различных концентрациях на колониеобразующую способность культуры трансформированных клеток китайского хомячка (пояснения в тексте). Приведены средние  $\pm$  стандартные ошибки средних

( $3,42 \pm 0,33$ ). Можно предположить, что «мягко разобщающая» концентрация для клеток китайского хомячка должна быть близка к значению  $5 \cdot 10^{-6}$  М. Однако известно, что ДНФ в концентрациях  $1 \cdot 10^{-5}$  и  $5 \cdot 10^{-5}$  М, а другие разобщители и в более низких концентрациях (carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone, СССР —  $5 \cdot 10^{-6}$  и  $1 \cdot 10^{-5}$  М; carbonyl cyanide-*p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone, СССР —  $1,5 \cdot 10^{-6}$  и  $3 \cdot 10^{-6}$  М) ухудшают пролиферацию как клеток млекопитающих, так и дрожжей [30, 31]. Также установлено, что ДНФ в сниженных по сравнению с рекомендованными другими авторами концентрациях уменьшает протонный градиент митохондрий [32], в связи с чем даже для модельных организмов, таких как рыбка данио (*Danio rerio*), в качестве разобщающей предлагается использовать концентрацию  $5 \cdot 10^{-7}$  М. В работах, в которых удалось увеличить продолжительность жизни дрожжей, использовались довольно низкие концентрации —  $10^{-8}$  и даже  $10^{-9}$  М [10]. Для построения кривой роста и гибели

Таблица

**Влияние ДНФ в разных концентрациях на показатель эффективности образования колоний (ЭОК) клетками китайского хомячка, а также на средневзвешенный номер класса (СВНК) распределения колоний по размеру для каждой из групп. Приведены средние  $\pm$  ошибки среднего**

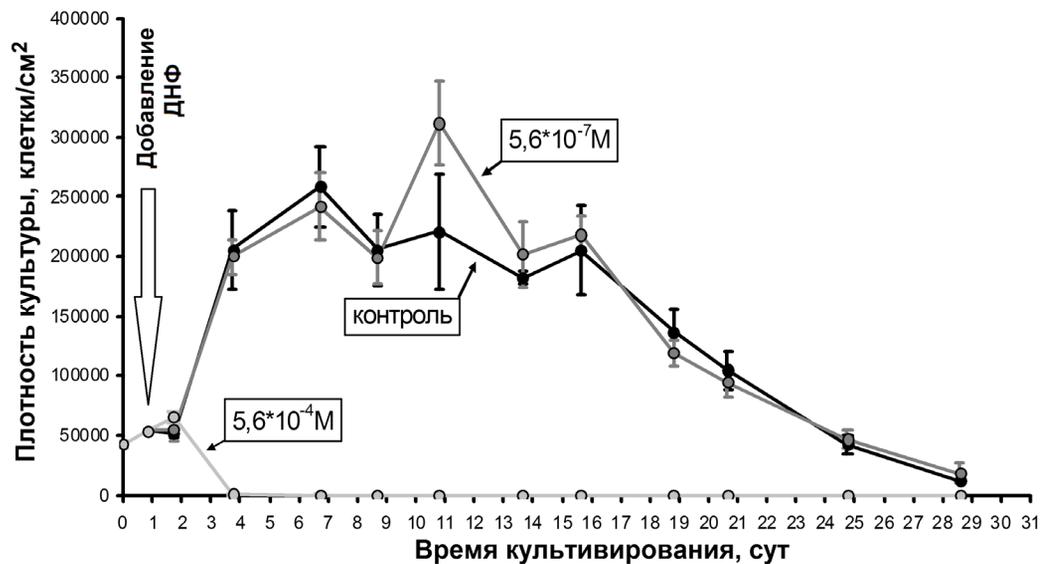
Концентрация ДНФ, М	ЭОК, %	СВНК
$2 \cdot 10^{-4}$	$0,8 \pm 0,4$ (*)	$2,2 \pm 1,3$ (*)
$1 \cdot 10^{-4}$	$8,2 \pm 1,2$ (*)	$4,4 \pm 0,6$ (*)
$7,5 \cdot 10^{-5}$	$15,6 \pm 1,8$ (*)	$5,2 \pm 0,5$
$5 \cdot 10^{-5}$	$23,8 \pm 1,3$	$6,9 \pm 0,6$
контроль	$27,2 \pm 3,7$	$6,3 \pm 0,4$

Примечание: \* – обозначено достоверное отличие от показателя в контрольной группе,  $p < 0,05$

культуры клеток под влиянием ДНФ мы выбрали две концентрации –  $5,6 \cdot 10^{-4}$  М (как «сильно разобшающую») и  $5,6 \cdot 10^{-7}$  М (как потенциально «мягко разобшающую», гарантированно не вызывающую цитотоксического эффекта).

Как и ожидалось, клетки из группы, в среду которой добавляли ДНФ в концентрации  $5,6 \cdot 10^{-4}$  М, погибали через 3 сут. Что же касается концентрации  $5,6 \cdot 10^{-7}$  М, которая должна была вызывать «мягкое разобшение», то ДНФ в этом случае никак не повлиял на кинетику роста и последующее вымирание культуры (рис. 4). Мы аппроксимировали данные о гибели культуры с помощью уравнения Гомпертца ( $R^2$  для контрольной группы – 0,951,  $R^2$  для опытной группы – 0,826), чтобы получить параметры, характеризующие вымирание, – такие как модальная продолжительность жизни (момент времени, когда скорость вымирания популяции максимальна – соответствует точке перегиба на кривой Гомпертца), а также сила смертности в нулевой

момент времени и темп старения культуры. Ни по одному из параметров не обнаружили достоверных различий между группами. Отсутствие какого-либо эффекта может быть обусловлено тем, что «мягкое разобшение» не влияет либо на старение в целом, либо на «стационарное старение» культур клеток. Также нельзя исключить, что оно не даёт никаких преимуществ конкретной изучаемой культуре клеток. Возможно, эффект «мягкого разобшения» является тканеспецифичным, т.е. с его помощью может увеличиваться продолжительность жизни только определённых типов тканей [33, 34]. Так, например, было показано, что мышцы, состоящие преимущественно из быстрых волокон, обладают лучшей выживаемостью, несмотря на их высокую функциональную активность, по сравнению с мышцами, в состав которых входят медленные волокна. При этом для быстрых волокон характерны увеличенное потребление  $O_2$ , более низкий уровень АФК и сниженный уровень поврежденных митохондрий [35]. Также по-разному влияет «мягкое разобшение», вызван-



**Рис. 4.** Влияние 2,4-динитрофенола в концентрациях  $5,6 \cdot 10^{-4}$  М («сильно разобшающая») и  $5,6 \cdot 10^{-7}$  М (потенциально «мягко разобшающая») на кинетику роста и последующую гибель культуры трансформированных клеток китайского хомячка. После добавления ДНФ в разобшающей концентрации клетки перестают пролиферировать и вымирают через 3 сут. При добавлении ДНФ в потенциально «мягко разобшающей» концентрации клетки растут и погибают так же, как и в контрольной группе (модальная продолжительность жизни в контрольной группе –  $18,495 \pm 0,824$  сут, в группе  $5,6 \cdot 10^{-7}$  М –  $17,793 \pm 1,452$  сут; плотность культуры к моменту начала вымирания в контроле –  $230655 \pm 16377$  клеток/см<sup>2</sup>, в группе  $5,6 \cdot 10^{-7}$  М –  $243255 \pm 30548$  клеток/см<sup>2</sup>). Приведены средние  $\pm$  стандартные ошибки средних

ное добавлением ДНФ, на метаболизм различных линий клеток [30]. Кроме того, нельзя исключить, что выбранная доза разобшителя не является оптимальной. Мы установили, что «мягко разобшающие» концентрации

необходимо искать в диапазоне от сверхнизких значений до  $5 \cdot 10^{-5}$  М, так как ДНФ в более высокой концентрации способствует угнетению пролиферации. Необходимо проверить, как изменятся поглощение  $O_2$  клетками и уровень АТФ при воздействии соединения в разных концентрациях, не превышающих найденное пограничное значение, при этом подходящая концентрация может быть как выше  $5,6 \cdot 10^{-7}$  М, так и между  $5 \cdot 10^{-5}$  М и  $5,6 \cdot 10^{-7}$  М.

Авторы выражают признательность Д.С. Есипову за помощь с определением чистоты ДНФ. Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-34-00813 мол\_а).

Исследование выполнено без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mookerjee S.A., Divakaruni A.S., Jastroch M., Brand M.D. Mitochondrial uncoupling and lifespan // *Mech. Ageing Dev.* 2010. Vol. 131. N 7–8. P. 463–472.
2. Zorova L.D., Popkov V.A., Plotnikov E.Y., Silachev D.N., Pevzner I.B., Jankauskas S.S., Babenko V.A., Zorov S.D., Balakireva A.V., Juhaszova M., Sollott S.J. Mitochondrial membrane potential // *Anal. Biochem.* 2018. Vol. 552. P. 50–59.
3. Skulachev V.P. Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants // *Q. Rev. Biophys.* 1996. Vol. 29. N 2. P. 169–202.
4. Korshunov S.S., Skulachev V.P., Starkov A.A. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria // *FEBS Lett.* 1997. Vol. 416. N 1. P. 15–18.
5. Starkov A.A. “Mild” uncoupling of mitochondria // *Bioscience Rep.* 1997. Vol. 17. N 3. P. 273–279.
6. Papa S., Skulachev V.P. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging // *Detection of mitochondrial diseases*, vol. 21 / Eds. F.N. Gellerich and S. Zierz. Boston: Springer, 1997. P. 305–319.
7. Brand M.D. Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing // *Exp. Gerontol.* 2000. Vol. 35. N 6–7. P. 811–820.
8. Lambert A.J., Brand M.D. Superoxide production by NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) depends on the pH gradient across the mitochondrial inner membrane // *Biochem. J.* 2004. Vol. 382. N 2. P. 511–517.
9. Brand M.D., Affourtit C., Esteves T.C., Green K., Lambert A.J., Miwa S., Pakay J.L., Parker N. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins // *Free Radic. Biol. Med.* 2004. Vol. 37. N 6. P. 755–767.
10. Barros M.H., Bandy B., Tahara E.B., Kowaltowski A.J. Higher respiratory activity decreases mitochondrial reactive oxygen release and increases life span in *Saccharomyces cerevisiae* // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. N 48. P. 49883–49888.
11. Caldeira da Silva C.C., Cerqueira F.M., Barbosa L.F., Medeiros M.H., Kowaltowski A.J. Mild mitochondrial uncoupling in mice affects energy metabolism, redox balance and longevity // *Aging Cell.* 2008. Vol. 7. N 4. P. 552–560.
12. Miquel J., Fleming J., Economos A.C. Antioxidants, metabolic rate and aging in *Drosophila* // *Arch. Gerontol. Geriatr.* 1982. Vol. 1. N 2. P. 159–165.
13. Padalko V.I. Uncoupler of oxidative phosphorylation prolongs the lifespan of *Drosophila* // *Biochemistry (Mosc.)*. 2005. Vol. 70. N 9. P. 986–989.
14. Падалко В.И., Леонова И.С., Козлова Е.В. Влияние 2,4-динитрофенола на интенсивность окислительных процессов в печени крыс в длительном эксперименте // *Усп. геронтол.* 2010. Т. 23. № 1. С. 98–103.
15. Wu B., Jiang M., Peng Q., Li G., Hou Z., Milne G.L., Mori S., Alonso R., Geisler J.G., Duan W. 2,4 DNP improves motor function, preserves medium spiny neuronal identity, and reduces oxidative stress in a mouse model of Huntington’s disease // *Exp. Neurol.* 2017. Vol. 293. P. 83–90.
16. 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.L., von Zglinicki T. Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence // *PLoS Biol.* 2007. Vol. 5. N 5. P. 1138–1151.
17. Wasilewska-Sampaio A.P., Silveira M.S., Holub O., Goecking R., Gomes F.C., Neto V.M., Linden R., Ferreira S.T., De Felice F.G. Neuritogenesis and neuronal differentiation promoted by 2,4-dinitrophenol, a novel anti-amyloidogenic compound // *FASEB J.* 2005. Vol. 19. N 12. P. 1627–1636.
18. Sebollela A., Freitas-Corrêa L., Oliveira F.F., Mendes C.T., Wasilewska-Sampaio A.P., Camacho-

- Pereira J., Galina A., Brentani H., Passetti F., De Felice F.G., Dias-Neto E. Expression profile of rat hippocampal neurons treated with the neuroprotective compound 2,4-dinitrophenol: up-regulation of cAMP signaling genes // *Neurotox. Res.* 2010. Vol. 18. N 2. P. 112–123.
19. Freitas-Correa L., Lourenco M.V., Acquarone M., da Costa R.F.M., Galina A., Rehen S.K., Ferreira S.T. 2,4-dinitrophenol induces neural differentiation of murine embryonic stem cells // *Stem Cell Res.* 2013. Vol. 11. N 3. P. 1407–1416.
20. Morgunova G.V., Klebanov A.A., Khokhlov A.N. Interpretation of data about the impact of biologically active compounds on viability of cultured cells of various origin from a gerontological point of view // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2016. Vol. 71. N 2. P. 67–70.
21. 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.
22. 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.
23. Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Morgunova G.V. On choosing control objects in experimental gerontological research // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2018. Vol. 73. N 2. P. 59–62.
24. Morgunova G.V., Klebanov A.A. 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 // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2018. Vol. 73. N 3. P. 124–129.
25. Alinkina E.S., Vorobyova A.K., Misharina T.A., Fatkullina L.D., Burlakova E.B., Khokhlov A.N. Cytogerontological studies of biological activity of oregano essential oil // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2012. Vol. 67. N 2. P. 52–57.
26. Yablonskaya O.I., Ryndina T.S., Voeikov V.L., Khokhlov A.N. A paradoxical effect of hydrated C<sub>60</sub>-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.
27. Khokhlov A.N. Cell kinetic approaches to the search for anti-aging drugs: Thirty years after // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2018. Vol. 73. N 4. P. 185–190.
28. Chappelet-Tordo D., Fosset M., Iwatsubo M., Gaché C., Lazdunski M. Intestinal alkaline phosphatase. Catalytic properties and half of the sites reactivity // *Biochemistry.* 1974. Vol. 13. N 9. P. 1788–1795.
29. Miyoshi N., Oubrahim H., Chock P.B., Stadtman E.R. Age-dependent cell death and the role of ATP in hydrogen peroxide-induced apoptosis and necrosis // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006. Vol. 103. N 6. P. 1727–1731.
30. Desquirit V., Loiseau D., Jacques C., Douay O., Malthiury Y., Ritz P., Roussel D. Dinitrophenol-induced mitochondrial uncoupling *in vivo* triggers respiratory adaptation in HepG2 cells // *BBA-Bioenergetics.* 2006. Vol. 1757. N 1. P. 21–30.
31. Stöckl P., Zankl C., Hütter E., Unterluggauer H., Laun P., Heeren G., Bogengruber E., Herndler-Brandstetter D., Breitenbach M., Jansen-Dürr P. Partial uncoupling of oxidative phosphorylation induces premature senescence in human fibroblasts and yeast mother cells // *Free Radic. Biol. Med.* 2007. Vol. 43. N 6. P. 947–958.
32. Bestman J.E., Stackley K.D., Rahn J.J., Williamson T.J., Chan S.S. The cellular and molecular progression of mitochondrial dysfunction induced by 2,4-dinitrophenol in developing zebrafish embryos // *Differentiation.* 2015. Vol. 89. N 3–4. P. 51–69.
33. 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.
34. Morgunova G.V., Klebanov A.A. Age-related AMP-activated protein kinase alterations: From cellular energetics to longevity // *Cell Biochem. Funct.* 2019. Vol. 37. N 3. P. 169–176.
35. Amara C.E., Shankland E.G., Jubrias S.A., Marcinek D.J., Kushmerick M.J., Conley K.E. Mild mitochondrial uncoupling impacts cellular aging in human muscles *in vivo* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007. Vol. 104. N 3. P. 1057–1062.

Поступила в редакцию 30.04.2019 г.  
После доработки 10.06.2019 г.  
Принята в печать 08.07.2019 г.

## RESEARCH ARTICLE

**STUDIES OF THE EFFECT OF «MILD» UNCOUPLING WITH 2,4-DINITROPHENOL ON GROWTH AND SUBSEQUENT DEATH OF CULTURE OF CHINESE HAMSTER CELLS IN THE STATIONARY PHASE****G.V. Morgunova\***, A.F. Karmushakov, A.A. Klebanov, A.N. Khokhlov*Evolutionary Cytoogerontology Sector, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia**\*e-mail: morgunova@mail.bio.msu.ru*

Partial uncoupling of processes of oxidative phosphorylation and energy storage in the form of ATP («mild» uncoupling) helps reduce the production of reactive oxygen species and can also mimic the effect of calorie restriction. A number of studies have shown that uncouplers like 2,4-dinitrophenol (DNP) affect the lifespan of *Drosophila*, yeast, mice and rats, as well as the manifestation of «age-related» changes in replicative senescence mammalian and human cell cultures. This paper is devoted to studying the effect of DNP on the growth and death of «stationary phase aging» Chinese hamster cells. Using the method for determining the colony-forming efficiency of cells, the maximum permissible concentration was selected,  $5 \cdot 10^{-5}$  M, in which the substance potentially contributes to the manifestation of the effect of «mild» uncoupling and does not inhibit cell proliferation. At higher concentrations, DNP has a cytotoxic effect for the studied cell culture. Under the influence of DNP, the kinetics of cell growth and cell death does not change in the potentially «mild» uncoupling concentration ( $5.6 \cdot 10^{-7}$  M), the lifespan of the cell culture does not increase. A similar effect may be due to the type of cells studied. In addition, there is a probability that the optimal concentration lies in the range from  $5 \cdot 10^{-7}$  to  $5 \cdot 10^{-5}$  M, or lower than  $5 \cdot 10^{-7}$  M.

**Keywords:** *cell aging, «stationary phase aging», 2,4-dinitrophenol, colony-forming efficiency, survival curve, 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*

*Кармушаков Азар Фатфулович* – инженер сектора эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-15-90; e-mail: *karmushakov@mail.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*

*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*