

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 57.087:[576.53+57.032]

ДЕМОГРАФИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ СТАРЕНИЯ НА КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ

А.Н. Хохлов*, Г.В. Моргунова, А.А. Клебанов

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

Стареющие организмы вымирают в соответствии с «законом Гомпертца», т.е. вероятность их смерти увеличивается с возрастом. Построение кривых выживания является основным инструментом геронтологов, позволяющим изучать старение и тестировать геропротекторные препараты. Анализ кривых выживания включает в себя получение целого ряда показателей, характеризующих старение популяции – например, средняя и максимальная продолжительность жизни, сила смертности, темп старения. Тестирование геропротекторов можно корректно производить лишь с помощью получения таких кривых. Вымирание стационарных клеточных популяций – бактерий, дрожжей, клеток млекопитающих в культуре – также происходит в соответствии с уравнением Гомпертца. В связи с этим целесообразно использовать построение кривых выживания и их анализ для изучения «старения» непересеваемых культур клеток и тестирования на них геропротекторных препаратов. Мы использовали этот подход в наших собственных экспериментах, благодаря чему смогли обнаружить положительное геропротекторное влияние препарата «Квинтон» на культуру «стационарно стареющих» клеток китайского хомячка.

Ключевые слова: кривые выживания, закон Гомпертца, продолжительность жизни, клеточное старение, «стационарное старение», геропротекторы

На сегодняшний день построение кривых выживания когорт животных/людей является наиболее надежным способом оценки эффективности влияния физических факторов или биологически активных соединений на процесс старения. Именно этот показатель, а не проявление биомаркёров возраста (которыми так увлеклись многие исследователи) действительно позволяет видеть, как происходит старение в группах исследуемых животных, или тестировать геропротекторы. К сожалению, построение кривых выживания требует трудовых, временных и финансовых затрат, в то время как методика с использованием биомаркёров намного проще. Проявление биомаркёров может хорошо коррелировать с хронологическим возрастом тестируемых организмов, но не со старением, то есть происходящим со временем увеличением вероятности смерти, однако многие исследователи игнорируют этот факт.

Стареющие организмы вымирают в соответствии с «законом Гомпертца». Существуют

и нестареющие организмы, вероятность смерти которых с возрастом не увеличивается, а иногда даже уменьшается [1]. Чтобы отличить первых от вторых, необходимо изучить форму кривых выживания когорт соответствующих организмов [2–5]. В очень редких случаях полного отсутствия смерти – например, в случае с пресноводной гидрой (*Hydra magnipapillata*, или *Hydra vulgaris*) при определенных условиях [1, 6] – кривая выживания представляет собой горизонтальную линию. Заключение о том, влияет тот или иной фактор на процесс старения, делается на основе изменения формы кривых выживания стареющих организмов под его воздействием. Можно предположить, что истинный геропротектор (любой агент, который замедляет процесс старения) должен вызывать смещение кривой выживания без изменения её формы вправо (то есть он должен увеличивать как среднюю, так и максимальную продолжительность жизни).

Кривые выживания строят не только для животных и людей, но и для клеточных популяций.

Например, вымирание клеточной популяции изучают в радиобиологии (вымирание под воздействием радиации) [7–9]. Также кривые выживания строят в экспериментах по изучению старения дрожжей и бактерий в модели хронологического/«стационарного» старения [10–14]. Ранее мы показали, что культура клеток млекопитающих в модели «стационарного старения» вымирает в соответствии с законом Гомпертца [15]. Целью настоящей работы стала попытка использования методов, применяемых для анализа кривых дожития экспериментальных животных, в экспериментах с непересеваемыми культурами клеток млекопитающих, вымирающих в ходе «стационарного старения».

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 (NuClone, США) 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 имени Д.И. Ивановского» Минздрава России, Москва).

Для оценки влияния тех или иных соединений на кинетику роста клеток и их последующей гибели в стационарной фазе 3-суточные клетки засеивали в герметично закрывающиеся стеклянные флаконы с плотностью 20–40 тыс. клеток/см². На следующие сутки подсчитывали количество прикрепившихся клеток и добавляли во флаконы среду, содержащую исследуемое

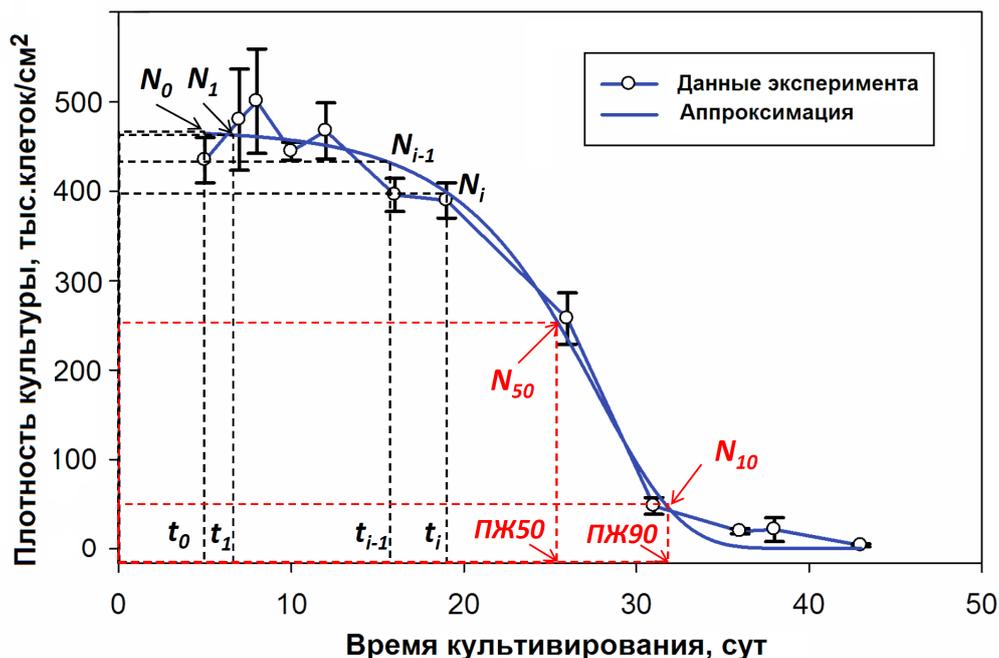


Рис. 1. Аппроксимация экспериментальных данных с помощью уравнения Гомпертца. N_0 — максимальная плотность культуры; t_0 — время начала фазы «плато»; t_1 — время, к которому культура достигла плотности N_1 ; N_{50} — плотность культуры к моменту времени, когда вымерло 50% популяции (ПЖ50 — медианная продолжительность жизни); N_{10} — плотность культуры к моменту времени, когда осталось лишь 10% популяции (ПЖ90 — время 90%-ной смертности). СПЖ рассчитывали по формуле (1).

соединение, а во флаконы контрольной группы — среду с соответствующим объёмом растворителя. Через определённые промежутки времени снимали клетки с поверхности роста смесью растворов версена и трипсина, затем оценивали их количество с помощью камер Горяева (3–4 флакона на каждую точку, 4 камеры на каждый флакон).

На основании полученных данных строили кривые роста, пребывания в стационарной фазе и гибели клеток в контрольной и экспериментальной группах. Используя данные о кинетике вымирания культуры клеток, строили кривые выживания, а также рассчитывали среднюю продолжительность жизни (СПЖ) популяции клеток и определяли время, к которому погибнет 50 и 90% популяции в каждой группе — медианная продолжительность жизни (ПЖ50) и время 90%-ной смертности (ПЖ90) соответственно (рис. 1). В некоторых случаях использовали параметры уравнения Гомпертца, характеризующие вымирание, — такие как модальная продолжительность жизни (МПЖ; момент времени, когда скорость вымирания популяции максимальна — соответствует точке перегиба на кривой Гомпертца), а также сила смертности в нулевой момент времени (R_0) и темп старения (α) культуры. Для получения этих показателей принимали

стартовой точкой по оси времени те сутки, с которых начиналась фаза «плато» на кривой роста – t_0 (рис. 1). Для вычисления СПЖ использовали формулу:

$$\text{СПЖ} = \frac{1}{N_0} \sum_{i=1}^n \left[\left(t_{i-1} + \frac{t_i - t_{i-1}}{2} \right) \cdot (N_{i-1} - N_i) \right], \quad (1)$$

где N_0 – максимальная плотность культуры, t_i – время, к которому культура достигла плотности N_i .

Полученные кривые роста гибели клеток аппроксимировали с помощью уравнения Гомпертца. Сравнение выживаемости в контрольной и в опытной группах осуществляли с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Математические расчёты и статистическую обработку данных производили с помощью программы SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc., США). Все результаты представлены в виде среднего и ошибки среднего.

Результаты и обсуждение

В ходе исследования мы получили некоторое количество кривых гибели непересеваемой культуры. В наших опытах клетки действительно вымирают в соответствии с уравнением Гомпертца, т.е. стареют (рис. 2). Это говорит о том, что вероятность их гибели со временем увеличивается экспоненциально, как и у стареющих животных или людей [15, 16].

Как было указано нами ранее, лучшим способом оценки влияния того или иного геропротектора на старение является построение кривых

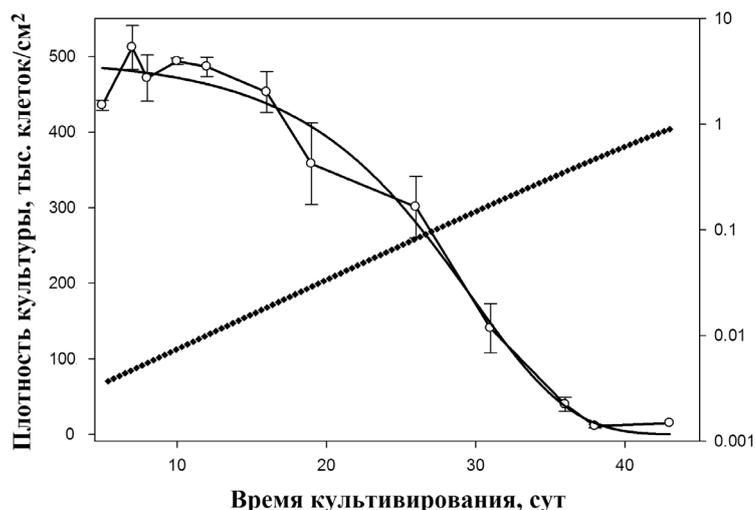


Рис. 2. Кривая гибели стационарной культуры клеток китайского хомячка. Ломаная линия – экспериментальные данные; сплошная линия – кривая, аппроксимированная в соответствии с уравнением Гомпертца ($R^2 = 0,983$); прерывистая линия – увеличение силы смертности со временем (логарифмическая шкала).

выживания/вымирания (survival/death curves) изучаемых модельных объектов. Построение и анализ кривых гибели непересеваемых культур клеток позволяют нам тестировать геропротекторы. Кроме того, мы получаем целый набор дополнительных параметров – среднюю и максимальную продолжительность жизни, скорость вымирания, силу смертности. Так как дисперсия на «хвосте» кривой увеличивается из-за увеличения гетерогенности популяции и уменьшения абсолютного количества клеток, мы заменили понятие максимальной продолжительности жизни на ПЖ90. В большинстве экспериментов мы оценивали полный цикл жизни культуры – рост, пребывание в стационарной фазе и вымирание [17–19]. Такой подход позволил нам условно разделить культуры по «возрасту». «Молодой» мы называем культуру, находящуюся в логарифмической фазе роста, «зрелой» – культуру, которая пребывает в стационарной фазе в течение 2–4 сут, «старой» – культуру в фазе вымирания.

Получать кривые для клеточных популяций проще, чем для некоторых модельных организмов, которые могут существовать длительное время, однако исследователь сталкивается с другой проблемой – не вполне понятно, с какого момента можно считать когорту сформировавшейся. Клетки в начале опыта стремительно делятся, затем их пролиферация замедляется и прекращается, что совпадает с началом фазы «плато». Мы приняли решение принимать за нулевое время (время «рождения» когорты) момент перехода культуры в «стационарную фазу» из фазы логарифмического роста (t_0). От этого момента мы производим аппроксимацию с помощью уравнения Гомпертца и рассчитываем все показатели.

Важно отметить, что для экспериментов с использованием модели «стационарного старения» и анализом кривых гибели клеточной культуры лучше не использовать нормальные (диплоидные) клетки, которые имеют «теломерный счётчик», так как это может вносить дополнительные искажения в получаемые кривые. В частности, рост однозначно будет различаться для двух культур, находящихся на разных пассажах, а от характера роста напрямую зависит вымирание культуры. В связи с этим, лучше использовать трансформированные или иммортализованные клетки, не имеющие пролиферативных ограничений [20].

Надо отметить, что в исследованиях с использованием модели хронологиче-

ского старения дрожжей также оценивают хронологическую продолжительность жизни культуры (среднее и максимальное время её выживания) [21, 22]. В таких исследованиях строятся кривые вымирания, однако нам не встречались работы, в которых была бы проведена аппроксимация полученных результатов. Более того, часто по форме кривых вымирания дрожжей видно, что их не получится аппроксимировать с помощью уравнения Гомпертца, так как на этих кривых нет так называемого «плеча». Такое «плечо» возникает в некоторых исследованиях, где изменяют условия культивирования, например, добавляют буфер [23] или изменяют состав питательных сред [11]. Это означает, что только при определённых условиях можно говорить о «старении» дрожжей [24], во многих случаях экспериментаторы изучают вымирание от других причин — истощение питательных веществ или отравление продуктами распада, но не старение.

В нашем эксперименте, проведённом ещё в 2015 г., при нашей обычной обработке данных мы не обнаружили геропротекторного эффекта у исследуемого препарата «Квинтон», или QMP (Quinton Marine Plasma) [17]. Мы оценивали различия только в отдельных точках и обнаружили, что в случае замены 44,4% среды Игла в модификации Дульбекко физиологическим раствором или QMP плотность культуры клеток китайского хомячка на 5-е сут в группе «физраствор» достоверно выше, чем в двух других (рис. 3А), также выше она на 31-е и 36-е сут в этой же группе, но по сравнению только лишь с контрольными показателями (рис. 3А). Такие результаты, на первый взгляд, свидетельствуют о том, что добавление физраствора улучшает пролиферативную активность клеток и их выживаемость в поздней стационарной фазе, а препарат QMP никак не действует на культуру. Однако более детальный анализ данных о вымирании с использованием нашего клеточно-кинетического подхода показал, что СПЖ культуры, выращенной на физрастворе, ниже на 17%, а культуры, выращенной на QMP, — выше на 7%, чем в контроле (СПЖ_{контроль} = 20,2 сут, СПЖ_{физраствор} = 16,8 сут, СПЖ_{QMP} = 21,56 сут; t_0 — 5 сут). Вымирание в группе «физраствор» происходило не в соответствии с уравнением Гомпертца (рис. 3Б), а по прямой, что свидетельствует о худшем состоянии культуры, чем в двух других группах. Можно полагать, что в этой группе

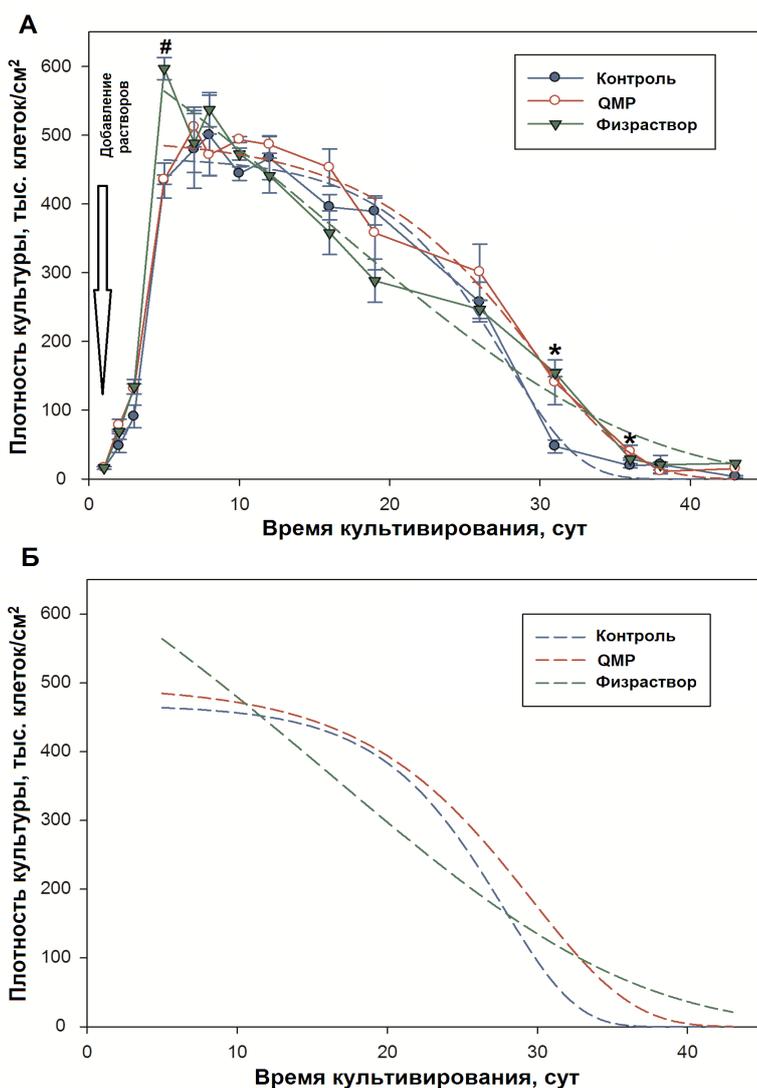


Рис. 3. Влияние разбавления на 44,4% среды Игла в модификации Дульбекко физиологическим раствором или препаратом «Квинтон» (QMP) на кинетику роста и «стационарное старение» культуры клеток китайского хомячка. А — экспериментальные данные с наложенной аппроксимацией (пунктирные линии); Б — только аппроксимация уравнением Гомпертца. Приведены средние ± стандартные ошибки среднего. * — достоверное отличие от контрольной группы, # — достоверное отличие и от контрольной группы, и от группы «QMP»; $p < 0,05$.

небольшая часть популяции клеток существует длительное время (даже больше, чем в двух других группах: ПЖ90_{физраствор} = 32 сут, ПЖ90_{контроль} = 27 сут, ПЖ90_{QMP} = 30 сут), но до середины эксперимента (приблизительно 20-е сут) доживает меньше клеток, чем в двух других группах (ПЖ50_{физраствор} = 16 сут; ПЖ50_{контроль} = 22 сут, ПЖ50_{QMP} = 23 сут). В группе «QMP» МПЖ, наряду с СПЖ и ПЖ90, оказывается выше, чем в контрольной группе (МПЖ_{контроль} = 22,8 сут, МПЖ_{QMP} = 23,7 сут, МПЖ_{физраствор} = 11 сут). Во всех трёх группах достоверно различаются распределения величин продолжительности жизни, при этом аппроксимированная кривая выжива-

ния в группе «QMP» лежит правее контрольной на протяжении всего периода гибели культуры (рис. 3Б), что позволяет предполагать наличие геропротекторных свойств у препарата QMP.

Таким образом, наш новый метод с использованием анализа кривых вымирания позволяет нам более точно анализировать характер «старения» культуры клеток. Благодаря этому мы можем тестировать потенциальные геропротекторные препараты, подбирать оптимальные для длительного культивирования условия и изучать старение самых разных клеточных линий и штаммов. Остаётся открытым вопрос о том, происходит ли вымирание в соответствии с законом Гомпертца и в стационарных клеточных популяциях организма, например, в популяции

нейронов. Так как известно, что вымирание компонентов системы не обязательно должно происходить по тем же законам, что и вымирание самих систем, клеточные популяции составляющие организм не обязательно должны вымирать в соответствии с законом Гомпертца, но тем не менее можно предположить, что этот закон распространяется и на них.

Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ, ч. 2 (фундаментальные научные исследования, № АААА-А16-116021660098-8).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jones O.R., Scheuerlein A., Salguero-Gymes R., Camarda C.G., Schaible R., Casper B.B., Dahlgren J.P., Ehrlén J., García M.B., Menges E.S., Quintana-Ascencio P.F., Caswell H., Baudisch A., Vaupel J.W. Diversity of ageing across the tree of life // *Nature*. 2014. Vol. 505. N 7482. P. 169–173.
2. Comfort A. Ageing: The biology of senescence. London: Routledge & Kegan Paul, 1964. 365 pp.
3. Дубина Т.Л., Разумович А.Н. Введение в экспериментальную геронтологию. Минск: Наука и техника, 1975. 168 с.
4. Holliday R. Aging: The paradox of life. Why we age. Dordrecht: Springer, 2007. 134 pp.
5. 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.
6. Martínez D.E., Bridge D. Hydra, the everlasting embryo, confronts aging // *Int. J. Dev. Biol.* 2012. Vol. 56. N 6–8. P. 479–487.
7. Shuryak I., Sun Y., Balajee A.S. Advantages of binomial likelihood maximization for analyzing and modeling cell survival curves // *Radiat. Res.* 2016. Vol. 185. N 3. P. 246–256.
8. Kehwar T.S., Chopra K.L., Rai D.V. A unified dose response relationship to predict high dose fractionation response in the lung cancer stereotactic body radiation therapy // *J. Med. Phys.* 2017. Vol. 42. N 4. P. 222–233.
9. Herskind C., Liu Q., Liu X., Zhang Y., Ma L., Angelie E., Ma H.H., Liu J., Giordano F.A., Wenz F., Veldwijk M.R. A hypothesis of radioresistance and cell-survival curve shape based on cell-cycle progression and damage tolerance // *Radiat. Prot. Dosimetry*. 2018. Vol. 183. N 1–2. P. 107–110.
10. Fabrizio P., Longo V.D. The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae* // *Aging Cell*. 2003. Vol. 2. N 2. P. 73–81.
11. Kawalek A., van der Klei I.J. At neutral pH the chronological lifespan of *Hansenula polymorpha* increases upon enhancing the carbon source concentrations // *Microb. Cell*. 2014. Vol. 1. N 6. P. 189–202.
12. Li X., Snyder M.P. Yeast longevity promoted by reversing aging-associated decline in heavy isotope content // *NPJ Aging Mech. Dis.* 2016. Vol. 2: 16004.
13. Belak Z.R., Harkness T., Eskiw C.H. A rapid, high-throughput method for determining chronological lifespan in budding yeast // *J. Biol. Methods*. 2018. Vol. 5. N 4: e106.
14. Yang Y., Santos A.L., Xu L., Lotton C., Taddei F., Lindner A.B. Temporal scaling of aging as an adaptive strategy of *Escherichia coli* // *Sci. Adv.* 2019. Vol. 5. N 5: eaaw2069.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.

19. *Morgunova G.V., Karmushakov A.F., Klebanov A.A., Khokhlov A.N.* Studies into the effect of «mild» uncoupling with 2,4-dinitrophenol on the growth of Chinese hamster cell culture and its subsequent dying out in the stationary phase // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2019. Vol. 74. N 3. P. 163–169.

20. *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.

21. *Fabrizio P., Longo V.D.* Chronological aging-induced apoptosis in yeast // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 2008. Vol. 1783. N 7. P. 1280–1285.

22. *Khokhlov A.N.* Which aging in yeast is «true»? // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2016. Vol. 71. N 1. P. 11–13.

23. *Burtner C.R., Murakami C.J., Kennedy B.K., Kaerberlein M.* A molecular mechanism of chronological aging in yeast // *Cell Cycle.* 2009. Vol. 8. N 8. P. 1256–1270.

24. *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.

Поступила в редакцию 05.06.2019 г.

После доработки 16.08.2019 г.

Принята в печать 11.09.2019 г.

SHORT COMMUNICATION

DEMOGRAPHIC APPROACHES TO THE STUDY OF AGING ON CELL CULTURES

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

Evolutionary Cytoogerontology Sector, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia
*e-mail: khokhlov@mail.bio.msu.ru

Aging organisms die out in accordance with the «Gompertz law», i.e. the probability of their death increases with age. Survival curve construction is the main tool for gerontologists to study aging and test anti-aging drugs. The analysis of survival curves includes obtaining some indices characterizing aging of the population, for example, average and maximum life span, mortality rate, and aging rate. Testing of geroprotectors can be correctly performed only by obtaining such curves. The dying out of stationary cell populations – bacteria, yeast, and mammalian cell cultures – also occurs in accordance with the Gompertz equation. In this regard, it is reasonable to use the construction of survival curves and their analysis to study the «aging» of non-subcultured cell cultures and testing of anti-aging drugs on them. We used this approach in our own experiments, due to which we were able to detect the positive anti-aging effect of the Quinton Marine Plasma on stationary phase aging culture of Chinese hamster cells.

Keywords: *survival curves, Gompertz law, lifespan, cell aging, stationary phase aging, geroprotectors*

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 – 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