

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

ШИЛОВСКИЙ Григорий Александрович

**ПОЛИ(ADP-РИБОЗИЛ)ИРОВАНИЕ БЕЛКОВ В
КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТКАХ: ВЛИЯНИЕ
«СТАЦИОНАРНОГО СТАРЕНИЯ» И РАЗЛИЧНЫХ
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ**

03.01.08 - Биоинженерия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2019

Работа выполнена на биологическом факультете Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» и в Отделе химии физиологически активных веществ Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной генетики Российской академии наук.

Научные руководители: *Хохлов Александр Николаевич*
доктор биологических наук
Шрам Станислав Иванович
кандидат химических наук

Официальные оппоненты: *Михайлов Сергей Николаевич* – доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник Лаборатории дизайна и синтеза биологически активных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук
Сури Александр Михайлович – доктор биологических наук, заведующий Лабораторией нейробиологии и основ развития мозга федерального государственного автономного учреждения "Национальный медицинский исследовательский Центр здоровья детей" Министерства здравоохранения Российской Федерации, главный научный сотрудник Лаборатории фундаментальных и прикладных проблем боли Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»
Акентьева Наталья Павловна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, руководитель группы биохимических и клеточных исследований Отдела кинетики химических и биологических процессов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт проблем химической физики Российской академии наук

Защита состоится «9» октября 2019 г. в 16 часов 30 минут на заседании диссертационного совета МГУ.03.04 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы МГУ, д. 1, стр. 73, Факультет биоинженерии и биоинформатики, ауд. 406.

E-mail: dissovet@belozersky.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова (Москва, Ломоносовский проспект, 27, отдел диссертаций) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/157339526/>

Автореферат разослан «__» сентября 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат химических наук



И.В. Шаповалова

Актуальность проблемы. Старение многоклеточных организмов представляет собой процесс накопления деструктивных онтогенетических изменений, ведущих к увеличению вероятности смерти с возрастом (*Harman D, J Gerontol. 1956. 11:298; Зайнуллин ВГ и Москалев АА, Генетика. 2000. 36:1013*). Ряд доминирующих гипотез о первопричинах развития старения в той или иной степени основаны на феномене накопления с возрастом различных повреждений ДНК (*Kanungo M, Biochemistry of Ageing. 1980; Khokhlov AN, Curr Aging Sci. 2013. 6:14*). Последнее во многом обусловлено снижением потенциала систем, ответственных за поддержание стабильности генома (*Gensler HL and Bernstein H, Q Rev Biol. 1981. 56:279; Muiras M-L, Ageing Res Rev. 2003. 2:129; Vijg J, Mech Ageing Dev. 2008. 129:498*). Важное место в этих процессах в последнее время отводят системе поли(ADP-рибозил)ирования белков (*Shilovsky GA et al., Biochemistry (Moscow). 2013. 78:433*). Обнаружено активное участие белков поли(ADP-рибоза)-полимераз (PARP), особенно PARP-1 и PARP-2, в различных путях репарации повреждений ДНК (*Mortusewicz O et al., NAR. 2007. 35:7665; Khodyreva SN and Lavrik OI, Mol Biol (Mosk). 2016. 50:655*), а также в регуляции транскрипции, клеточной дифференцировки, клеточного цикла и структуры хроматина (*Althaus FR et al., Mol Cell Biochem. 1999. 193:5; Ji Y and Tulin AV, Curr Opin Genet Dev. 2010. 20:512*). При этом участие PARP в этих процессах во многом обусловлено образованием в результате катализируемой ими реакции разветвленного полимера ADP-рибозы (PAR), с которым могут связываться многие регуляторные белки, содержащие PAR-распознающие мотивы (*Krietsch J et al., Mol Aspects Med. 2013. 34:1066*). Обнаружена высокая положительная корреляция между максимальной продолжительностью жизни млекопитающих и активностью PARP (*Grübe K and Bürkle A, PNAS. 1992. 82:11759*). У долгожителей система поли(ADP-рибозил)ирования работает более эффективно, чем у обычных людей (*Muiras M-L et al., J Mol Med. 1998. 76:346*). Однако в условиях патологии активация PARP оказывает негативное воздействие на клетку, поскольку приводит к истощению запасов NAD⁺ и АТФ, запуску механизмов клеточной гибели и усилению экспрессии провоспалительных факторов (*Mangerich A and Bürkle A, Oxid Med Cell Longev. 2012. ID321653*). Поскольку развитие патологий и дисфункций различных систем и органов может приобретать с возрастом хронический характер, применение лекарственных средств, предотвращающих перманентную активацию PARP, является весьма перспективным подходом в терапии ряда возрастных заболеваний (*Berger NA et al., Br J Pharmacol. 2018. 75:192*). В связи с этим представляет большой интерес исследование различных аспектов функционирования системы поли(ADP-рибозил)ирования белков на экспериментальных моделях старения организма, включая и клеточные модели.

Возрастные изменения некоторых показателей системы поли(ADP-рибозил)ирования белков были предметом ряда исследований на животных, преимущественно на крысах (*Shilovsky GA et al., Biochemistry (Moscow). 2017. 82:1391*). Так, ранее было показано, что стимулированная олигонуклеотидами активность PARP в пермеабелизированных лейкоцитах периферической крови человека и крысы отрицательно коррелирует с возрастом, снижаясь в среднем соответственно на 59 и 39% в течение жизни (*Grübe K and Bürkle A., PNAS. 1992. 82:11759*). В то же время,

нестимулированная активность PARP в тканях старых крыс была в несколько раз выше, чем в тканях молодых крыс, и это сопровождалось увеличением с возрастом уровней PAR и повреждений ДНК (Braidy N et al., *PLoS One*. 2011. 6:191). Аналогичные результаты были получены при анализе образцов кожи человека (Massudi H et al., *PLoS One*. 2012. 7:423). Также было обнаружено, что способность клеток активизировать синтез PAR в ответ на различные генотоксические воздействия значительно снижается с возрастом (Strosznajder RP et al., *Acta Biochim Pol*. 2005. 52:909; Malanga M et al., *J Neurochem*. 2005. 93:1000). В целом, выявленные изменения в функционировании системы поли(ADP-рибозил)ирования белков указывают на снижение надежности функционирования поддерживаемых ею систем репарации ДНК с возрастом организма. В литературе описано лишь несколько исследований системы поли(ADP-рибозил)ирования белков на клеточных моделях старения (Dell'Orco RT and Anderson LE, 1991. *J Cell Physiol*. 146:216; Salminen A et al., 1997. *BBRC*. 38:712; Zaniolo K et al., *Biochem J*. 2005. 389:423). Однако полученные в них результаты сложно обобщать и сопоставлять ввиду использования разных подходов к моделированию процессов старения и применения авторами различных методов анализа показателей активности PARP.

При изучении механизмов старения многоклеточного организма в экспериментах *in vitro* известной проблемой является выбор релевантной и удобной клеточной модели старения. Широко известна модель репликативного старения (Hayflick L, *New Engl J Med*. 1976. 295:1302), основанная на феномене истощения митотического потенциала соматических клеток после нескольких десятков удвоений клеточной популяции. Однако многие исследователи указывают на системные недостатки данной модели: 1) функционирование многих важных органов определяется наличием в них постмитотических клеток; 2) организм не гибнет от исчерпания митотического потенциала клеток. Другой крайностью является подход, основанный на применении моделей стресс-индуцированного старения, вызванного различными повреждающими факторами. В этом случае ключевой проблемой является отсутствие четких доказательств того, что в клетках действительно протекают процессы, связанные со старением (в смысле постепенного накопления повреждений), а не с развитием каких-то патологических реакций. В связи с этим примененный в данном исследовании подход, основанный на использовании стационарных клеточных культур для моделирования возрастных нарушений, характерных для старения организма (далее – «стационарного старения» клеток *in vivo*), представляется более обоснованным. Выявленные на этой модели «возрастные» изменения ряда биохимических показателей, характеризующих состояние системы поли(ADP-рибозил)ирования белков, хорошо согласуются с данными, полученными в исследованиях *in vivo*, что является еще одним доказательством релевантности использованной в данной работе клеточной модели старения.

Цель и задачи работы. Целью работы было установить в исследованиях на модели «стационарного старения» клеток животных возможные взаимосвязи между процессом поли(ADP-рибозил)ирования белков, с одной стороны, и жизнеспособностью и старением клеток, с другой. На основе анализа показателей, характеризующих активность PARP в клетках, предложить подходы для оценки биологического возраста животных/человека и

для тестирования фармакологических веществ на их геропротекторную/геропротормотормую активность.

Задачи работы:

1. На примере трансформированных культивируемых клеток китайского хомячка линии ВП-dii-FAF28 исследовать влияние длительного пребывания клеток животных в стационарной фазе роста (в модели «стационарного старения» клеток *in vivo*) на их жизнеспособность, морфологические характеристики и уровень маркеров клеточного старения (cell senescence).
2. Выяснить, как изменяются нестимулированная и стимулированная двухцепочечными дезоксиолигонуклеотидами активности PARP, а также «базальный» и стимулированный генотоксическими агентами уровни PAR при «стационарном старении» клеток ВП-dii-FAF28.
3. Исследовать временную динамику уровней экспрессии генов, кодирующих белки семейства PARP, при «стационарном старении» клеток ВП-dii-FAF28.
4. Выяснить, как влияет фармакологическое ингибирование PARP на выживаемость клеток ВП-dii-FAF28 в ходе их «стационарного старения».
5. Протестировать ряд флавоноидов и флавоноид-содержащих нутриентов, входящих в состав лекарственных средств, на PARP-ингибирующее и цитопротекторное действие.

Научная новизна работы. В работе впервые была исследована временная динамика экспрессии поли(ADP-рибоза)-полимераз и ряда показателей их активности при воспроизведении характерных для старения многоклеточного организма процессов на клеточной модели «стационарного старения». По результатам проведенных исследований было предложено использовать безразмерные показатели, характеризующие способность системы поли(ADP-рибозил)ирования белков реагировать на вновь возникающие повреждения ДНК, в качестве новых биохимических маркеров возрастных процессов, ассоциированных со старением организма. Показано, что ингибиторы PARP существенно не влияют на жизнеспособность клеток в ходе их «стационарного старения». Сделан вывод о том, что наблюдаемые в данной экспериментальной модели изменения в состоянии системы поли(ADP-рибозил)ирования белков не способствуют развитию возраст-зависимых деструктивных процессов в клетках, а, видимо, направлены на адаптацию клеток к усиливающемуся с возрастом давлению неблагоприятных факторов внутренней и внешней среды.

Практическая значимость исследования заключается в том, что соискателем были выявлены новые биохимические маркеры биологического возраста животных и человека и на их основе предложен оригинальный подход для тестирования биологически активных веществ на геропротекторную/геропротормотормую активность в культуре клеток. Кроме того, в работе было установлено наличие выраженной PARP-ингибирующей активности у ряда флавоноид-содержащих лекарственных субстанций растительного происхождения (байкалеина, байкалина, кверцетина, экстракта *Ginkgo biloba* EGb 761). Развитие данного направления в перспективе позволит разработать рекомендации «лечебно-профилактического» рациона для лиц, страдающих рядом хронических заболеваний, при котором подавление активности PARP должно оказывать положительное терапевтическое действие.

Положения, выносимые на защиту

1. В процессе культивирования клеток китайского хомячка ВП-dii-FAF28 в стационарной фазе роста (при моделировании «стационарного старения» клеток) показатели активности системы поли(ADP-рибозил)ирования белков претерпевают ряд «возрастных» изменений:
 - увеличивается базальный уровень PAR в клетках и снижается способность клеток к поли(ADP-рибозил)ированию белков в ответ на кратковременное действие генотоксического агента H₂O₂ в высоких дозах;
 - снижается стимулированная дезоксиолигонуклеотидами активность PARP и увеличивается нестимулированная активность PARP в пермеабилizированных клетках.
2. Уровни экспрессии генов *Parp1* и *Parp2* в клетках ВПd-ii-FAF28 возрастают в ходе их «стационарного старения».
3. Показатели, отражающие способность клетки активировать поли(ADP-рибозил)ирование белков в ответ на вновь возникающие повреждения ДНК, могут быть использованы в качестве нового биомаркера старения, а также при тестировании биологически активных веществ на их геропротекторную/геропротормотную активность.
4. Фармакологическое ингибирование PARP не влияет на скорость развития и выраженность проявлений признаков «стационарного старения» у культивируемых клеток ВП-dii-FAF28, но приводит к увеличению их выживаемости в условиях сильного окислительного стресса.
5. Флавоноиды кверцетин, байкалеин и байкалин вызывают ингибирование PARP тимуса телят в диапазоне концентраций 0,1-1,0 мМ, в то время как изофлавоны (даидзеин) и флаванолы (таксифолин) не оказывают такого действия в указанном диапазоне концентраций.
6. Экстракт *Ginkgo biloba* (EGb 761) содержит компоненты, способные вызывать полное ингибирование поли(ADP-рибоза)-полимеразной активности в клетках животных.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены на международных и всероссийских научных конференциях: Международной научно-практической конференции «Пожилой больной. Качество жизни» (Москва, 2017); «Современные аспекты геронтологии и гериатрии: от теории к практике» (Киев, 2014); «Фундаментальные проблемы геронтологии и гериатрии» (Санкт-Петербург, 2014); Международной научно-практической конференции «Пожилой больной. Качество жизни» (Москва, 2014); Конференции «Актуальные проблемы геронтологии и гериатрии: от теории к практике» (Киев, 2013); Научной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения акад. И.Н. Буланкина «Научное наследие академика И.Н. Буланкина и его развитие в современной биохимии» (Харьков, 2001); III Международном симпозиуме «Биологические механизмы старения» (Харьков, 1998).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 12 печатных работ (из них 6 статей в рецензируемых научных журналах, индексируемых в Scopus или Web of Science, 2 – в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК), а также 4 тезисов докладов в сборниках трудов научных конференций.

Личный вклад автора в проведение исследования. Основные результаты работы были получены самим автором. Личный вклад заключается в анализе литературы по теме диссертации, планировании и проведении экспериментов, статистической обработке полученных данных, представлении результатов на научных конференциях и подготовке материалов к публикации в научных журналах.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 157 страницах, содержит 30 рисунков и 4 таблицы. Она состоит из следующих разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Благодарности» и «Список литературы». В Списке литературы процитировано 312 источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Клетки китайского хомячка линии ВП-dii-FAF28 и феохромоцитомы крысы PC12 получены из коллекций клеточных культур ФГБНУ «Медико-генетический научный центр» (Москва) и Института молекулярной генетики РАН (Москва), соответственно. Мезенхимальные стволовые клетки человека предоставлены Н.С. Линьковой (Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии). Декамерный дезокси-олигонуклеотид CGGAATTCCG синтезирован А.А. Володиным (Институт молекулярной генетики РАН, Москва), а [аденин-³H] NAD – С.И. Шрамом, как было описано ранее (*Шрам СИ и др., Прикл биохим микробиол. 1999. 35:638*). Флавоноиды были любезно предоставлены В.К. Колхином из Всероссийского НИИ лекарственных и ароматических растений (Москва). В качестве экстракта *Ginkgo biloba* (EGb 761) был использован препарат Танакан® производства Beaufour Ipsen Ind. (Франция).

Культивирование клеток. Клетки ВП-dii-FAF28 культивировали в среде MEM с 10% сыворотки крови крупного рогатого скота (СКРС), как было описано ранее (*Shram SI et al., Bull Exp Biol Med. 2006. 141:628*). Клетки PC12 растили в среде DMEM с 15% эмбриональной сыворотки крови теленка. Во всех случаях клетки культивировали в присутствии пенициллина и стрептомицина в атмосфере с 5% CO₂ при 37°C.

Моделирование «стационарного старения» клеток. При моделировании «стационарного старения» клеток использовали два различных дизайна эксперимента. В первом случае («продольное» исследование) клетки ВП-dii-FAF28 одновременно засевали во все флаконы/планшеты с плотностью около 35×10³ клеток/см² из одного стокового пула клеток. Культивирование клеток проводили без замены среды. Далее, на определенных сроках в интервале от 3 до 15 сут после посева, случайным образом отбирали необходимое количество флаконов/планшетов и проводили анализ тех или иных показателей в клетках. Во втором случае («поперечное» исследование) в процессе регулярно проводившихся пересевов культуры (через каждые 3-4 сут) часть клеток засевали во флаконы/планшеты с плотностью около 35×10³ клеток/см². Затем, по истечении 13-15 сут после первого посева клеток, проводили анализ соответствующих показателей одновременно во всех культурах.

Индукция окислительного стресса. Культуры клеток ВП-dii-FAF28 или PC12 переводили на среду без сыворотки, после чего вносили свежеприготовленный раствор

H₂O₂ для получения определенной концентрации H₂O₂ в среде культивирования. По истечении 30 мин инкубации клетки промывали средой без H₂O₂ и оставляли в среде с сывороткой на 24 ч в CO₂-инкубаторе. После этого проводили анализ показателей жизнеспособности клеток.

Определение жизнеспособности клеток. Для оценки жизнеспособности клеток в культуре использовали метод окрашивания клеток трипановым синим и МТТ-тест (Mosmann T, *J Immunol Methods*. 1983. 65:55).

Ассоциированную с клеточным старением активность бета-галактозидазы (SA-β-Gal) определяли классическим цитохимическим методом, как описано у Димри и соавт. (Dimri GP et al., *PNAS USA*. 1995. 92:9363).

Анализ активности PARP. Активность PARP в пермеабилizированных клетках определяли согласно протоколу, описанному в работе Грубе и соавт. (Grübe K et al., *Anal Biochem*. 1991. 193:236). Вкратце процедура анализа выглядит следующим образом. Культивируемые во флаконах клетки (ВII-dii-FAF28 или PC12) снимали с подложки смесью растворов трипсина и ЭДТА, а затем, после осаждения центрифугированием и промывки 0,9 %-ным раствором NaCl, ресуспендировали в охлажденном гипотоническом буфере для пермеабилзации (10 мМ Tris-HCl, 1 мМ Na₂×ЭДТА, 4 мМ MgCl₂, 30 мМ β-меркаптоэтанол, рН 7,8), после чего выдерживали 15 мин в бане со льдом. Стандартная реакционная смесь (100 мкл) для анализа СА содержала: 1×10⁶ пермеабилizированных клеток, 38 мМ Tris-HCl (рН 7,8), 40 мМ MgCl₂, 0,33 мМ NAD, 1 мкКи [аденин-³H] NAD, 10 мкг дезоксиолигонуклеотида CGGAATTCCG и, при необходимости, ингибитор PARP. При анализе НСА дезоксиолигонуклеотид в реакционную смесь не вносили. В стандартных условиях образцы инкубировали в течение 10 мин при 30°C, после чего к инкубационной смеси добавляли 1 мл охлажденного 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Нерастворимую фракцию, содержащую поли(ADP-рибозил)ированные белки, отделяли от растворимой путем фильтрования через стекловолоконные фильтры Whatman GF/C. Содержание меченых тритием продуктов на фильтрах анализировали на приборе Rackbeta 1215 (LKB, Швеция) с использованием толуольного сцинтиллятора. За одну единицу активности (ед. акт.) PARP принимали такое количество фермента, которое при приведенных выше стандартных условиях способно за 1 мин обеспечивать образование ³H-поли(ADP-рибозы) в количестве, эквивалентном 1 распаду в минуту.

Определение активности PARP тимуса телят проводили аналогичным образом за исключением того, что вместо пермеабилizированных клеток в реакционную смесь вносили раствор PARP тимуса телят в фосфатном буфере. Частично очищенный препарат PARP тимуса телят получали согласно методам, описанным в работах Петцольд с соавт. и Гинер с соавт. (Petzold SJ et al., *Biochemistry*. 1981. 20:7075; Giner H et al., *Gene*. 1992. 114:279).

Определение базального и стимулированного генотоксическим стрессом уровней поли(ADP-рибозы) в культивируемых клетках. Клетки ВII-dii-FAF28 растили на покровных стеклах, вложенных в лунки 24-луночного планшета. Затем, на определенных сроках после посева, часть культур клеток оставляли интактными, а часть культур инкубировали в течение 5 мин в среде с 1 мМ H₂O₂. Далее клетки фиксировали охлажденным метанолом и проводили иммунофлуоресцентный анализ содержания PAR в

клетках, как было описано в работе Ефремовой и соавт. (*Efremova AS et al., Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2013. 32:510*). Микрофлуоресцентный анализ полученных препаратов проводили на сканирующем конфокальном микроскопе LSM 510 META (Zeiss, Германия). Количественный анализ иммунофлуоресценции PAR в клетках проводили с использованием программы обработки изображений Image J2 (НИИ, США). Содержание PAR в интактных клетках соответствовало «базальному» уровню PAR в клетках (PAR_b), а содержание PAR в клетках после их обработки H₂O₂ – максимальному стимулированному уровню PAR (PAR_s).

Анализ экспрессии генов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Культивируемые во флаконах клетки ВП-dii-FAF28 снимали с подложки смесью растворов трипсина и ЭДТА, и после осаждения центрифугированием помещали в консервирующий раствор для сохранения РНК – Intact RNA (Евроген, Москва). Для выделения суммарной РНК использовали набор RNeasy MiniKit (Qiagen, Германия). Первую нить кДНК синтезировали с использованием Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Полученную кДНК использовали непосредственно как матрицу для количественной ПЦР, которую проводили на приборе ДТ-322 (ДНК-Технология, Россия) с использованием набора для амплификации qPCRmix-NS SYBR+ROX (Евроген, Россия). Для конструирования олигонуклеотидных праймеров использовали онлайн-сервис NCBI Primer-Blast. Олигонуклеотидные праймеры были синтезированы в НПО Синтол (Москва). Содержание кДНК интересующих генов определяли методом количественной ПЦР с регистрацией в режиме реального времени на приборе CFX96 Real-Time PCR Detection System (BioRad Lab., США) с использованием набора QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Германия) в присутствии интеркалирующего флуоресцентного красителя SYBR Green I.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Германия). Все данные представляли в виде среднее ± стандартное отклонение. Статистическую обработку результатов ПЦР и построение диаграмм осуществляли в автоматическом режиме с помощью программного обеспечения CFX Manager Software.

Результаты и их обсуждение

В основе клеточной модели «стационарного старения» лежит теория, согласно которой снижение с возрастом доли делящихся клеток в организме является первопричиной накопления в клетках макромолекулярных повреждений, вызывающих системные нарушения в функционировании органов и тканей и увеличение вероятности смерти с возрастом (*Dell'Orco RT, Adv Exp Med Biol. 1975. 53:41; Khokhlov AN, Curr Aging Sci. 2013. 6:14; Leontieva O and Blagosklonny MV, Aging (Albany NY). 2014. 6:1010*). Для моделирования процессов, характерных для «стационарного старения», клеточная культура, за счет естественного контактного торможения, переводится в неделящееся состояние. В таком состоянии клетки могут долгое время оставаться живыми, но митотически неактивными. Для моделирования «стационарного старения» можно использовать и клетки с неограниченным пролиферативным потенциалом. Проведенные ранее исследования свидетельствуют о том, что обнаруживаемые изменения различных

показателей в культивируемых клетках, подвергнутых «стационарному старению», похожи на таковые в клетках стареющих многоклеточных организмов. Они включают в себя: накопление однонитевых разрывов ДНК и ДНК-белковых сшивок, глобальное деметилирование ДНК, изменение в уровне спонтанных сестринских хроматидных обменов, структурные дефекты в ядре клетки, изменения в плазматической мембране, замедление митоген-стимулированной пролиферации, ухудшение колониеобразующей способности, накопление 8-оксо-2'-дезоксигуанозина в ДНК, увеличение количества клеток, окрашивающихся на активность ассоциированной со старением бета-галактозидазы и т.д. (Хохлов АН и др., *Известия АН СССР. Сер. биол.* 1988. 3:476; Khokhlov AN, *Curr Aging Sci.* 2013. 6:14; Khokhlov AN, *Biogerontology.* 2013. 14:703). Достоинством данной модели является также то, что растянутые во времени процессы, характерные для старения клеток *in vivo*, в стационарных культурах клеток могут быть воспроизведены в течение короткого времени, как правило, в течение нескольких недель после начала эксперимента.

Исследования проводились на стационарных культурах клеток китайского хомячка линии ВП-dii-FAF28, которые дорастивали до определенного «возраста» - от 1 до 14 сут культивирования. Было показано, что культивируемые клетки ВП-dii-FAF28 в стационарной фазе роста стареют «по Гомпертцу» т.е. вероятность их гибели экспоненциально возрастает со временем в соответствии с законом Гомпертца (рис. 1) (Khokhlov AN et al., *Moscow Univ Biol Sci Bull.* 2014. 69:10). В работе использовали два разных дизайна эксперимента, отличающихся способом приготовления культур клеток разного «возраста»: в первом случае («продольное» исследование) клетки высевали одновременно из одного пула, а во втором («поперечное» исследование) – последовательно, через каждые 3-4 сут (подробности см. в Материалах и методах).

Проявления признаков старения при длительном культивировании стационарных культур клеток ВП-dii-FAF28. Было показано, что на ранних стадиях стационарной фазы роста клетки ВП-dii-FAF28 образуют сомкнутый монослой с четко очерченными контурами отдельных клеток, которые при этом сильно распластаны. На поздних стадиях стационарной фазы роста происходит уменьшение количества прикрепленных к поверхности роста клеток (рис. 2 и 3). При этом среди расположенных на поверхности роста клеток увеличивается процентное содержание мертвых клеток, выявляемых красителем трипановым синим, что свидетельствует о более низкой жизнеспособности клеток в «старых» культурах, чем в «молодых» (рис. 2В, 2Г). При дальнейшем культивировании наблюдается усиление деструктивных процессов. Однако следует отметить, что даже в «старых» (23-26-суточных) культурах клеток ВП-dii-FAF28 кондиционированная среда роста, которую не заменяли с момента посева клеток, сохраняла способность стимулировать плановый синтез ДНК и пролиферативную активность клеток (Хохлов АН и др., *Цитология.* 2005. 47:318).



Рисунок 1. Кривая гибели стационарной культуры клеток ВП-dii-FAF28.

Обозначения: N_t – общее число клеток на 1см² поверхности роста; **1** – экспериментальные данные (N_t); **2** - аппроксимация экспериментальных данных (N_t) уравнением Гомпертца ($r^2 = 0,945$); **3** – изменение логарифма силы смертности со временем (см. *Gompertz B, Philos Trans R Soc LA. 1825. 115:513*).

Ассоциированная со старением активность бета-галактозидазы (SA- β -Gal) в клетке – классический маркер сенесцентных клеток (*Гладнева АД и др., Успехи геронтологии. 2014. 27:29*). Клетки ВП-dii-FAF28 достигали состояния монослоя через 5 сут культивирования (рис. 3). На этих сроках в культуре обнаруживаются лишь единичные клетки, окрашиваемые на SA- β -Gal. В отдельных местах на поверхности роста формируются двухслойные структуры клеток (рис. 3Б). При этом как в нижнем слое клеток, так и в расположенном выше слое обнаруживаются клетки, проявляющие повышенную активность SA- β -Gal. Особенно много таких клеток находится в области бислоя, что, возможно, связано с большей уязвимостью этих клеток к действию внешних факторов вследствие недостаточного контакта с субстратом. Через 10 – 13 сут культивирования степень «распластанности» клеток снижается, и появляются свободные от клеток участки поверхности роста (рис. 3В). При этом SA- β -Gal-положительных клеток становится значительно больше, чем в 8-суточных культурах и, что характерно, практически все клетки в многослойных структурах, расположенные выше нижнего слоя, демонстрируют высокую активность SA- β -Gal.

Таким образом, можно констатировать, что в ходе стационарного роста в культуре клеток ВП-dii-FAF28 действительно наблюдается развитие процессов, характерных для старения *in vivo*, а не только деструкция клеток, вызванная контактным торможением.

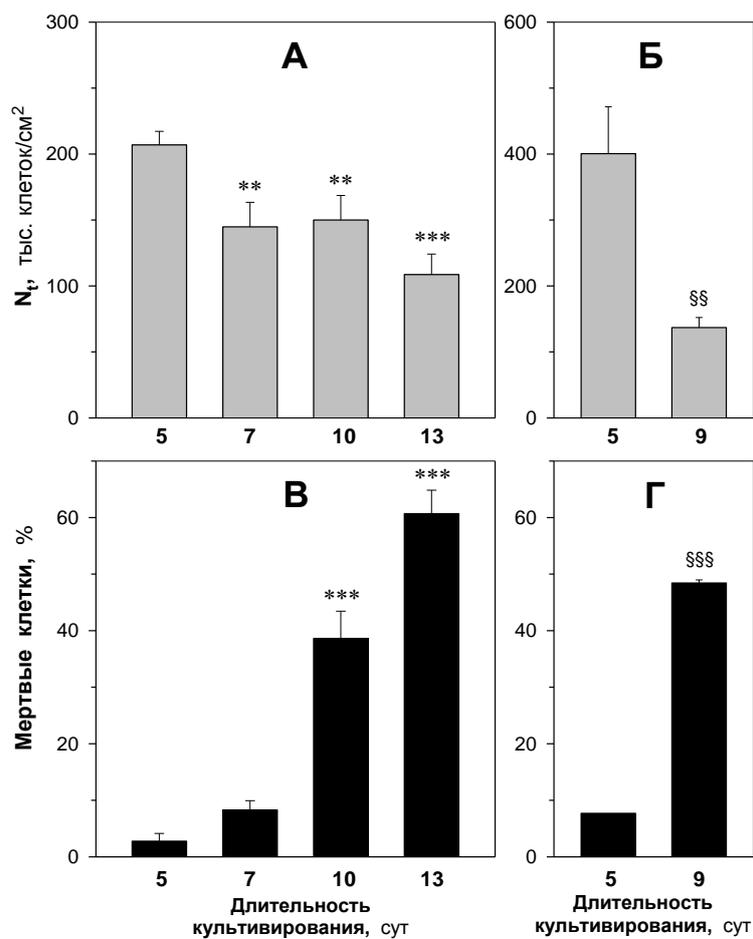


Рисунок 2. Влияние длительного культивирования клеток BII-dii-FAF28 в стационарной фазе роста на жизнеспособность клеток.

А, В – «продольное» исследование; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ – по сравнению со значениями на 5 сут (ANOVA, однофакторный анализ). **Б, Г** – «поперечное» исследование; §§ $p < 0,01$; §§§ $p < 0,001$ – по сравнению со значениями на 5 сут (t-критерий Стьюдента). **А, Б** – общее число клеток на 1см² поверхности роста (N_i); **В, Г** – содержание мертвых клеток, окрашиваемых красителем трипановым синим.

Временная динамика показателей активности поли(ADP-рибоза)-полимераз при «стационарном старении» клеток BII-dii-FAF28. Общую поли(ADP-рибоза)-полимеразную активность в клетках высших эукариот определяют два белка – PARP-1 и PARP-2. Известно, что связывание этих белков с ДНК в местах, содержащих определенные нарушения ее структуры, приводит к многократному увеличению их каталитической активности (*Malanga M and Althaus FR, Biochem Cell Biol. 2005. 83:354*). В норме лишь небольшая доля PARP-1/2 в клетке связана с ДНК, основная же часть этих белков находится в свободном состоянии. Поэтому для определения активности всего клеточного пула PARP необходимо создать условия насыщения этих белков разрывами ДНК, вызванными, например, воздействием гамма-излучения или обработкой ДНКазой I. Однако наиболее удобным и стандартизированным способом является внесение в среду инкубации избыточного количества двухцепочечных дезоксиолигонуклеотидов после проведения процедуры пермеабиллизации клеток.

В настоящей работе определяли два показателя активности PARP в пермеабиллизированных клетках китайского хомячка BII-dii-FAF28: нестимулированную и стимулированную двухцепочечными дезоксиолигонуклеотидами активности PARP - НСА и СА, соответственно (табл. 1; рис. 4).

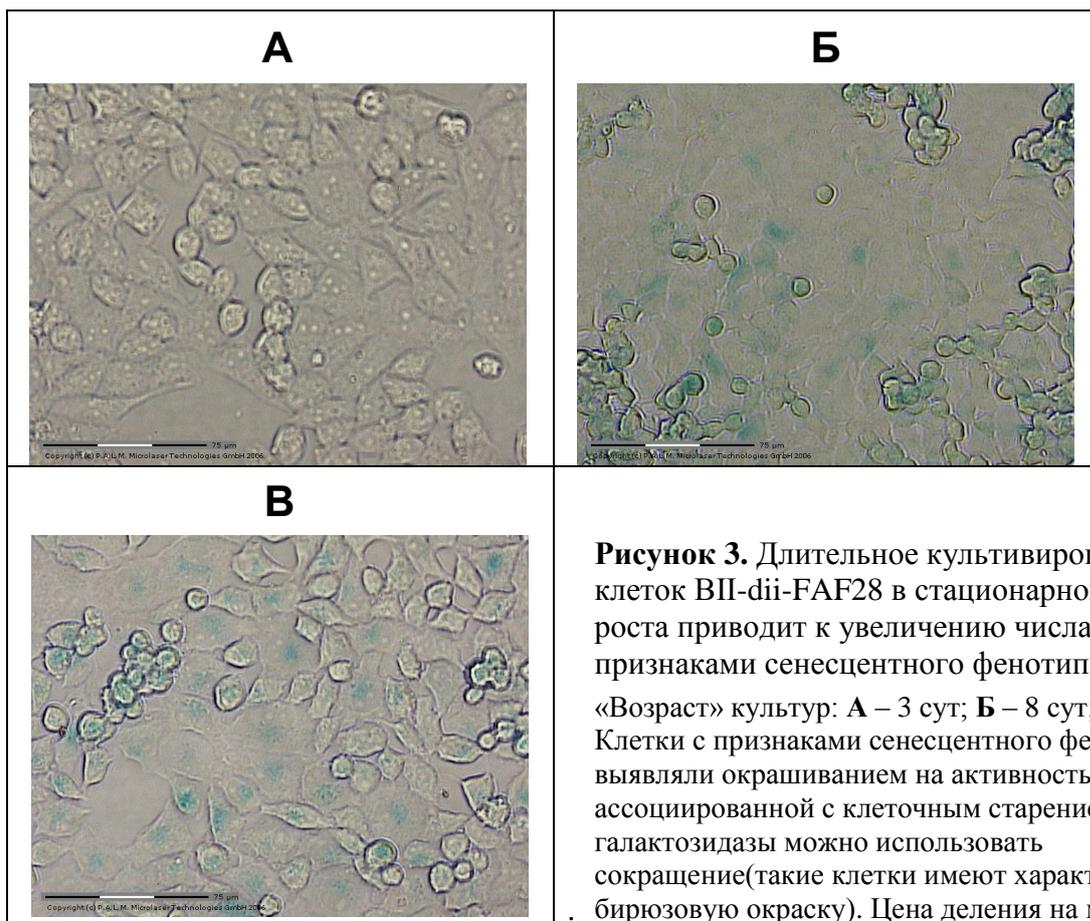


Рисунок 3. Длительное культивирование клеток ВII-dii-FAF28 в стационарной фазе роста приводит к увеличению числа клеток с признаками сенесцентного фенотипа.

«Возраст» культур: **А** – 3 сут; **Б** – 8 сут; **В** – 13 сут. Клетки с признаками сенесцентного фенотипа выявляли окрашиванием на активность ассоциированной с клеточным старением бета-галактозидазы можно использовать сокращение (такие клетки имеют характерную бирюзовую окраску). Цена деления на масштабной линейке - 25 мкм.

С этой целью нами был адаптирован описанный ранее радиометрический метод анализа активности PARP в пермеабиллизированных лейкоцитах периферической крови, основанный на определении количества, включенных в белки радиоактивно меченных остатков ADP-рибозы (Grübe K et al., *Anal Biochem.* 1991. 193:236). В рамках данного исследования были определены оптимальные условия для проведения анализа HCA и CA в пермеабиллизированных клетках ВII-dii-FAF28. Накопление радиоактивно меченной PAR во времени, при инкубации клеток ВII-dii-FAF28 с меченым NAD⁺ в присутствии олигонуклеотидов, описывается типичной для ферментативных реакций зависимостью с выходом на плато примерно через 2 ч инкубации. При этом наблюдали постепенное замедление скорости реакции во всем исследуемом диапазоне времени, что может быть обусловлено аутомодификацией PARP (Ogata N et al., *J Biol Chem.* 1981. 256:4135; Lindahl T et al., *Trends Biochem Sci.* 1995. 20: 405).

Влияние «возраста» культуры клеток ВII-dii-FAF28 на HCA и CA изучали в случае как поперечного, так и продольного исследования (рис. 5). В продольном исследовании эти показатели анализировали на разных стадиях стационарной фазы роста клеток (рис. 5А и 5В). В 7-суточных культурах HCA оказалась в 2,9 раза выше, чем в 3-суточных. На поздних стадиях стационарной фазы (13 сут) этот показатель

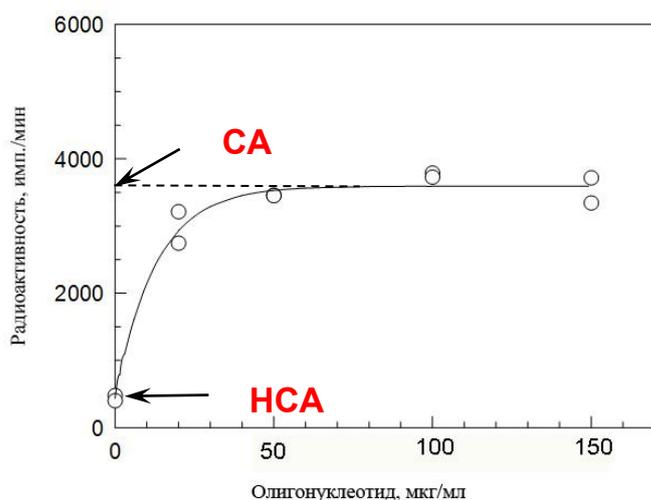


Рисунок 4. Стимуляция синтеза поли(ADP-рибозы) в пермеабилizированных клетках ВП-dii-FAF28 двухцепочечным дезоксиолигонуклеотидом CGGAATTCCG.

По оси ординат – количество радиоактивно меченных полимеров (ADP-рибозы), накопившихся в пермеабилizированных клетках в течение стандартного времени инкубации (15 мин). СА и НСА – стимулированная (олигонуклеотидом) и нестимулированная активности PARP, соответственно.

ниже, чем в 3- и 7-суточных культурах. При этом наблюдали драматическое падение СА в процессе «стационарного старения» клеток ВП-dii-FAF28 (рис. 5В). Так, в 7-суточных культурах СА была примерно в 3 раза ниже, а в 13-суточных – в 45 раз ниже, чем в 3-суточных культурах. Таким образом, нами было показано, что СА в ходе «стационарного старения» клеток неуклонно снижается, а НСА характеризуется сложной колоколообразной зависимостью. Последнее вряд ли может объясняться снижением количества повреждений ДНК на более поздних стадиях стационарной фазы роста (13 сут), наоборот, оно увеличивается, как следует из более ранних исследований на данной модели. Наиболее вероятной причиной наблюдаемого «возрастного» эффекта является значительное обеднение пула каталитически активных молекул PARP в клетке, о чем свидетельствуют результаты анализа СА, полученные в этом же эксперименте.

Способность системы поли(ADP-рибозил)ирования белков эффективно реагировать на вновь возникающие повреждения ДНК можно оценить по показателю СА–НСА (табл. 1 и табл. 2). Расчеты показывают, что этот показатель падает с увеличением «возраста» культуры. При этом возрастные изменения СА и СА–НСА нельзя объяснить только снижением доли живых клеток в культуре, поскольку возрастная динамика этих показателей (доли живых клеток, с одной стороны, и СА или СА–НСА – с другой) достаточно сильно различается. Тем не менее, наличие в культуре значительного числа мертвых клеток может в определенной мере усложнять корректную оценку НСА, СА и СА–НСА, а также интерпретацию полученных результатов. Выходом из этой ситуации могло бы быть использование безразмерных показателей, рассчитываемых из НСА и СА.

Нам показалось целесообразным рассмотреть два таких показателя: «НСА/СА» и «1–НСА/СА» (табл. 1 и 2). Первый из них отражает долю каталитически активных молекул PARP, связанных с ДНК и другими эндогенными активаторами, а второй – долю свободных (не связанных с ДНК и другими эндогенными активаторами) каталитически активных молекул PARP.

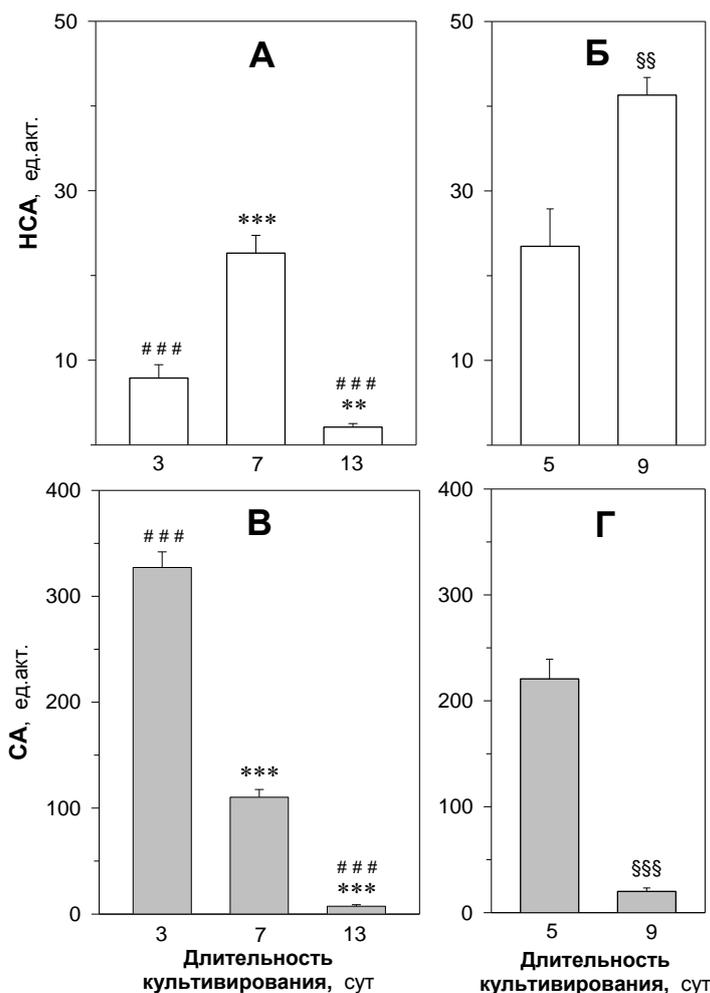


Рисунок 5. Влияние длительного культивирования клеток ВП-dii-FAF28 в стационарной фазе роста на нестимулированную (HSA; **А** и **Б**) и стимулированную (CA; **В** и **Г**) активности PARP.

А, В – "продольное" исследование; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ – по сравнению со значениями на 3 сут; ### $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ – по сравнению со значениями на 7 сут (ANOVA, однофакторный анализ). **Б, Г** – "поперечное" исследование; \$\$ $p < 0,01$; \$\$\$ $p < 0,001$ – по сравнению со значениями на 5 сут (t-критерий Стьюдента).

Из произведенных расчетов видно, что с возрастом стационарной культуры показатель 1–HSA/CA снижается (табл. 2). При этом прослеживается удивительно четкая положительная корреляция между показателями CA–HSA и 1–HSA/CA. Это позволяет использовать показатель 1–HSA/CA, наряду с показателем CA–HSA, для оценки способности системы поли(ADP-рибозил)ирования реагировать на вновь возникающие повреждения ДНК. Снижение показателя 1–HSA/CA с «возрастом» указывает на ухудшение способности клеток к мобилизации системы поли(ADP-рибозил)ирования белков в ответ на вновь возникающие повреждения ДНК. Наоборот, соотношение HSA/CA с «возрастом» культуры увеличивалось, что, видимо, указывает на то, что все большая доля молекул PARP переходит в связанное с сайтами повреждений ДНК состояние, а это, в свою очередь, приводит к повышению уровня поли(ADP-рибозил)ированных белков. При этом наиболее сильное изменение этих двух показателей наблюдали в интервале 3 – 7 сут, тогда как в интервале 7 – 13 сут изменения были не столь существенными. Видимо, это свидетельствует о том, что наиболее значительные изменения фенотипа происходят именно на ранних стадиях стационарной фазы роста клеток.

Таблица 1. Показатели активности PARP, использованные для анализа возрастных изменений в системе поли(ADP-рибозил)ирования белков, в исследованиях на клеточной модели «стационарного старения».

Показатель ^a	Чему соответствует показатель
CA – стимулированная активность PARP {PAR_s – стимулирован- ный уровень PAR}	Максимально достижимая активность PARP/{ Максимально достижимый уровень PAR } в клетке при сочетанной стимуляции PARP эндогенными индукторами (имеющимися в клетке повреждениями ДНК и другими активаторами) и внешними искусственными индукторами (насыщающие концентрации двухцепочечных дезоксирибонуклеотидов/{ высокие концентрации H₂O₂ }). CA/{PAR _s } зависит от общего количества каталитически активных молекул PARP в клетке.
HCA – нестимулирован- ная активность PARP {PAR_b - базальный уровень PAR}	Активность PARP/{ Уровень PAR } при стимуляции PARP эндогенными индукторами. HCA/{PAR _b } зависит как от уровня эндогенных индукторов, так и от количества каталитически активных молекул PARP в клетке (в случае дефицита последних)
CA–HCA {PAR_s–PAR_b}	Способность клетки активизировать поли(ADP-рибозил)ирование белков в ответ на вновь возникающие повреждения ДНК
HCA/CA {PAR_b/PAR_s}	Доля каталитически активных молекул PARP в клетке, связанных с ДНК и другими эндогенными активаторами
1–HCA/CA {1–PAR_b/PAR_s}	Доля свободных (не связанных с ДНК и другими эндогенными активаторами) каталитически активных молекул PARP

^a Показатели CA, HCA, CA–HCA, HCA/CA и 1–HCA/CA определяли или рассчитывали из данных, полученных при радиометрическом методе анализа активности PARP в пермеабилizированных клетках; показатели PAR_s, PAR_b, PAR_s–PAR_b, PAR_b/PAR_s и 1–PAR_b/PAR_s определяли или рассчитывали из данных, полученных при иммунофлуоресцентном анализе PAR в нативных клетках (все, что касается этих показателей, выделено жирным шрифтом и заключено в фигурные скобки).

Таким образом, на основе полученных результатов можно сделать предположение, согласно которому ограничение пролиферации вызывает накопление в клетках нерепарированных разрывов ДНК, что выражается в росте HCA и показателя HCA/CA. С другой стороны, с «возрастом» культур наблюдали снижение показателей CA, CA–HCA и 1–HCA/CA, что свидетельствует о снижении надежности функционирования поддерживаемых PARP механизмов репарации ДНК. Среди возможных причин падения CA и 1–HCA/CA в ходе «стационарного старения» клеток – снижение уровня экспрессии генов *Parp1* и *Parp2*, нарушение баланса между синтезом и деградацией поли(ADP-рибозы), модификация сульфгидрильных групп остатков цистеина, формирующих цинковые пальцы и др. Ранее другими исследователями было установлено, что показатель CA положительно коррелирует с видовой продолжительностью жизни и отрицательно – с возрастом животных (*Grübe K and Bürkle A, PNAS. 1992. 82:11759*).

Таблица 2. Показатели активности PARP в пермеабиллизированных клетках на разных стадиях роста культур клеток ВП-dii-FAF28.

«Возраст» культуры, сут	Содержание живых клеток в культуре ^a , %	НСА, ед.акт.	СА, ед.акт.	СА – НСА ^b , ед.акт.	1 – НСА/СА ^b (НСА/СА ^b)
3	97,2±1,4	7,9±1,6	327,2±14,7	319,0	0,976 (0,024)
7	61,4±4,8	22,6±2,1	110,3±7,4	87,7	0,795 (0,205)
13	39,3±4,1	2,1±0,4	7,4±1,5	5,3	0,716 (0,284)

Расчеты произведены на основе данных, представленных на рис. 5А и 5В. Обозначения: НСА – нестимулированная активность PARP; СА – стимулированная активность PARP; ^a данные представлены на рисунке 2В; ^b при расчетах значений параметров использовали средние значения НСА и СА

Изменение уровней экспрессии генов белков семейства PARP при «стационарном старении» клеток ВП-dii-FAF28. Как было указано выше, одной из возможных причин наблюдаемого в процессе «стационарного старения» клеток ВП-dii-FAF28 снижения СА и СА–НСА может являться снижение уровня экспрессии генов, кодирующих белки PARP-1 и PARP-2. С использованием количественной ПЦР в режиме реального времени было установлено, что уровни экспрессии генов *Parp1*, *Parp2* и *Parp6* (другое обозначение – *Tnks2*) в клетках ВП-dii-FAF28 значительно возрастают с увеличением «возраста» стационарных культур. При этом экспрессия указанных генов характеризуется различной временной динамикой (рис. 6). На 10-е сут обнаруживали достоверное увеличение экспрессии *Parp1* и *Parp2* – в 2,6 и 9,4 раза, соответственно, по сравнению с этим показателем на 4-е сут (начальная стадия стационарной фазы роста), а на 13-е сут – достоверное увеличение экспрессии *Parp1* и *Parp6* – в 2,6 и 1,6 раза, соответственно, по сравнению с этим показателем на 4-е сут. Полученные данные согласуются с результатами другого исследования, выполненного на фибробластах мыши NIH/3T3, «стационарное старение» которых вызывали депривацией сыворотки, что приводило к приостановке клеточных делений (*Levros L-C et al., BBA. 2010. 1803:1062*). Полученные результаты указывают на то, что снижение СА и показателя 1–НСА/СА не вызвано падением уровня экспрессии генов, кодирующих белки PARP-1 и PARP-2. Сходные по направленности изменения уровней экспрессии ортологов этих же генов у человека были нами выявлены в «стационарно стареющей» культуре мезенхимальных стволовых клеток человека.

Влияние «стационарного старения» на способность клеток к поли(ADP-рибозил)ированию белков в ответ на генотоксический стресс. Значения «базального» и «стимулированного» (5-минутная обработка клеток 1мМ H₂O₂) уровней PAR – PAR_b и PAR_s, соответственно (табл. 1), в клетках ВП-dii-FAF28 сложным образом зависели от «возраста» культур. В 8-13-суточных культурах уровень PAR_b был в среднем в 2 раза выше, чем у 3-суточных, когда культуры достигали монослойного состояния, а при более длительном культивировании наблюдали снижение уровня PAR_b (рис. 7).

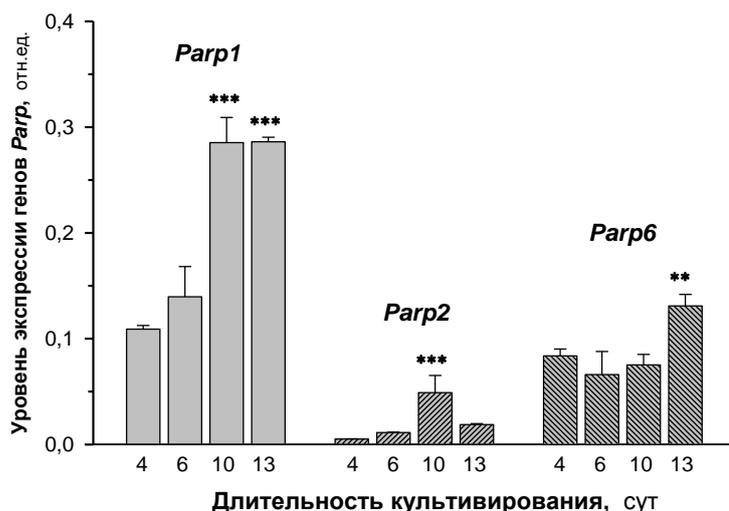


Рисунок 6. Временная динамика экспрессии генов белков семейства PARP при длительном культивировании клеток Vll-dii-FAF28 в стационарной фазе роста.

** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ – по сравнению со значениями на 4-е сут (ANOVA, однофакторный анализ).

При этом уровень PARs с «возрастом» постепенно снижался: если для 3-суточных культур наблюдали более чем трехкратную стимуляцию уровня PAR при воздействии H_2O_2 , то в случае 13 и 15-суточных культур (конец поздней фазы роста) обработка клеток H_2O_2 уже не вызывала увеличения уровня PAR (рис. 7А и 7Б). Полученные результаты хорошо коррелируют с представленными выше данными по изменению показателей НСА и СА с увеличением «возраста» культур (см. выше). По аналогии с показателями СА–НСА, НСА/СА и 1–НСА/СА было предложено ввести показатели PAR_s-PAR_b , PAR_b/PAR_s и $1-PAR_b/PAR_s$ (табл. 1). Значения этих параметров претерпевали те же возрастные изменения, что и в случае параметров, рассчитываемых из НСА и СА (сравнение результатов, представленных в табл. 2 и на рис. 7). Как следует из данных произведенных расчетов, наибольшие значения показателя PAR_s-PAR_b , который также характеризует способность системы поли(ADP-рибозил)ирования белков реагировать на вновь возникающие в клетке повреждения ДНК, получены для культур, находящихся в самом начале стационарной фазы роста (в данном случае – 3-суточные культуры), а по мере увеличения «возраста» культур величина этого показателя неуклонно снижается, вплоть до нулевых значений в 15-суточных культурах (рис. 7В). Сопоставление результатов анализа PAR_s-PAR_b и процента живых клеток в культуре указывает на отсутствие тесной взаимосвязи между этими показателями (рис. 7Б и рис. 8В). В тоже время, обнаружена высокая положительная линейная корреляция между показателями PAR_s-PAR_b и $1-PAR_b/PAR_s$ ($r = 0,985$, $p < 0,001$; рис. 7Г). Следовательно, для оценки способности системы поли(ADP-рибозил)ирования белков реагировать на вновь возникающие повреждения ДНК наряду с показателем PAR_s-PAR_b может быть использован удобный на практике безразмерный показатель $1-PAR_b/PAR_s$.

Таким образом, с использованием альтернативного подхода было установлено, что по мере увеличения «возраста» стационарных культур клеток Vll-dii-FAF28 наблюдается снижение способности системы поли(ADP-рибозил)ирования белков реагировать на вновь возникающие повреждения ДНК (значения показателей PAR_s-PAR_b и $1-PAR_b/PAR_s$ снижаются) и увеличение доли молекул PARP, активируемых повреждениями эндогенной ДНК (показатель PAR_b/PAR_s увеличивается), что, в свою очередь, вызывает повышение базального уровня поли(ADP-рибозил)ирования белков в клетке.

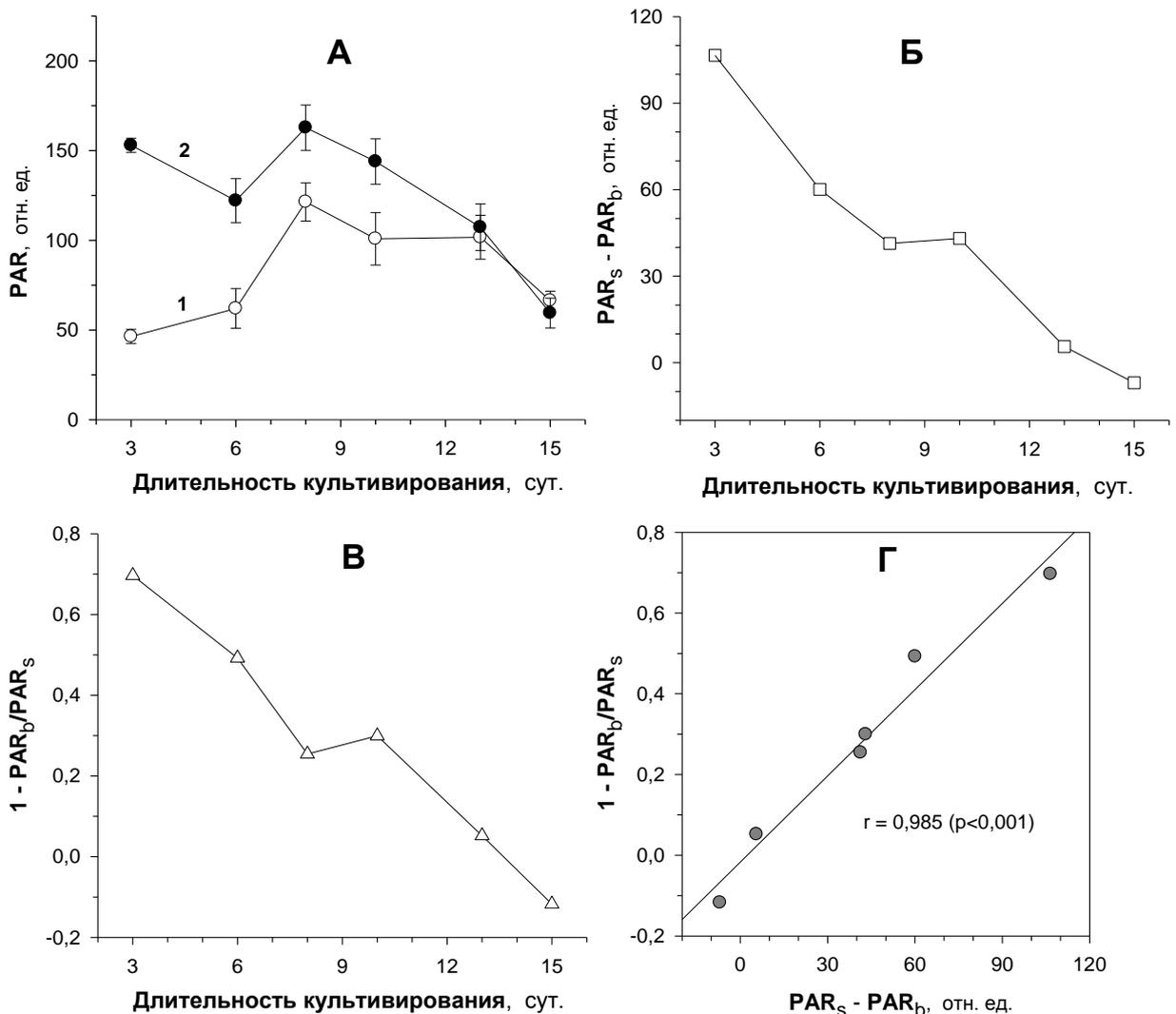


Рисунок 7. Влияние «стационарного старения» на стимулируемый генотоксическим стрессом синтез поли(ADP-рибозы) в культивируемых клетках VII-dii-FAF28.

А – базальный (PAR_b; кривая 1) и стимулированный H₂O₂ (PAR_s; кривая 2) уровни поли(ADP-рибозы) в клетке; **Б** – показатель PAR_s–PAR_b; **В** – показатель 1–PAR_b/PAR_s; **Г** – корреляция между значениями показателей PAR_s–PAR_b и 1–PAR_b/PAR_s. Данные по оценке жизнеспособности клеток приведены на рис. 8 и в табл. 2.

Влияние ингибиторов PARP на выживаемость клеток VII-dii-FAF28 в ходе их «стационарного старения». Полученные в ходе данного исследования результаты ясно указывают на то, что по мере «стационарного старения» в клетках постепенно развивается дефицит каталитически активной PARP, причем сопровождаемый увеличением уровней экспрессии генов *Parp1* и *Parp2*. В этой связи логично было предположить, что в случае, если наблюдаемое с возрастом культур падение СА является причиной происходящих в клетках деструктивных процессов, характерных для старения, полное фармакологическое ингибирование PARP должно привести к ускоренному развитию этих процессов. Для проверки этого предположения исследовали влияние известного ингибитора PARP – 3-AB (0.5 мМ) на рост и выживаемость клеток VII-dii-FAF28 в стационарной культуре. Как видно из представленных на рисунке 8 данных, в интервале 6-15 сут плотность клеток

(живых+мертвых) в культуре существенно не изменяется (рис. 8А). Однако после 8 сут культивирования наблюдали резкое снижение доли живых клеток и увеличение доли мертвых клеток, сохраняющих при этом свои адгезивные свойства (рис. 8Б и рис. 8В). Динамика накопления мертвых клеток в культуре совпадает с таковой, полученной в других экспериментах (см. рис. 2). Внесение в среду культивирования 3-АВ существенно не повлияло на рост и выживаемость клеток ВП-dii-FAF28 в стационарной культуре.

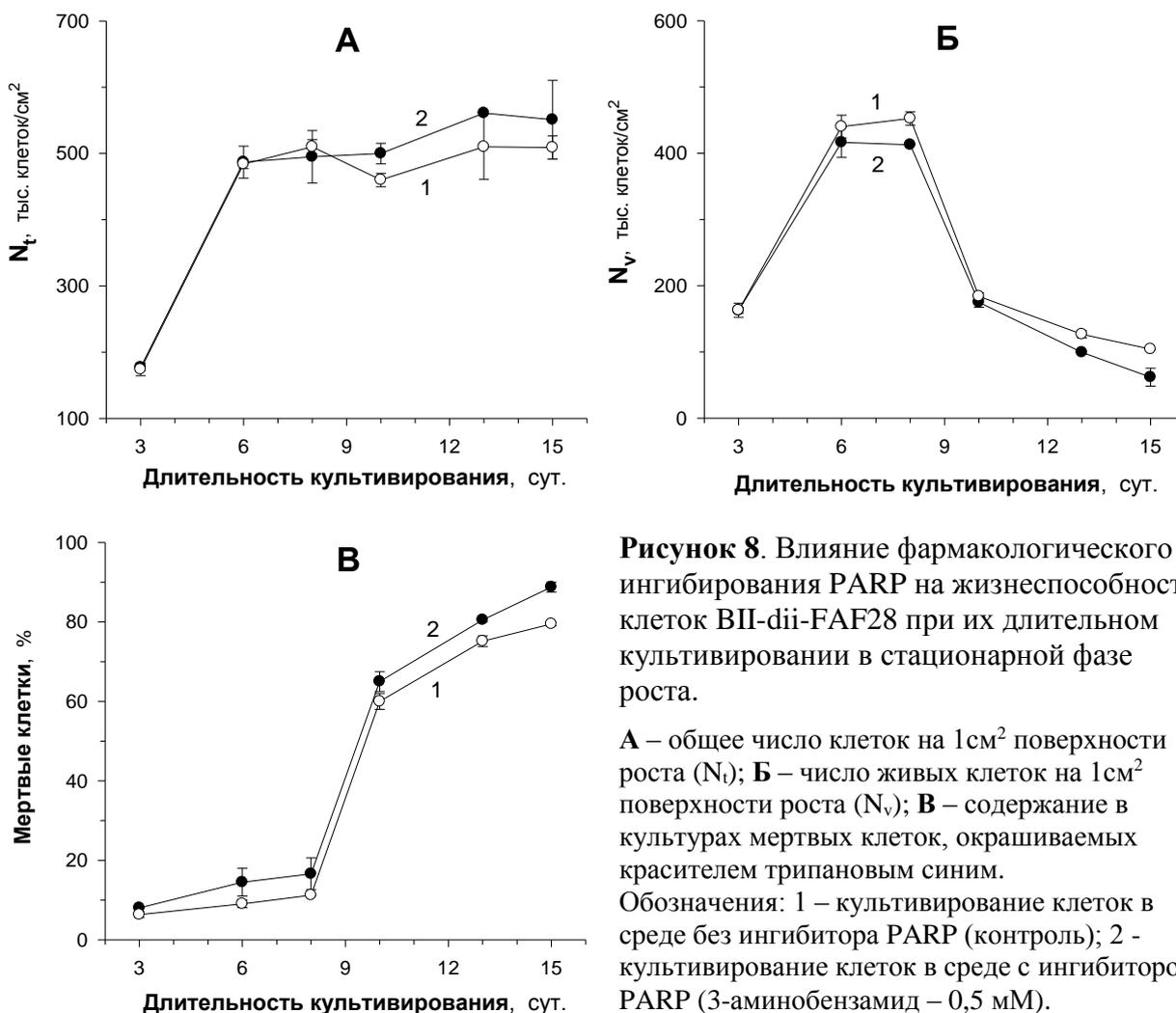


Рисунок 8. Влияние фармакологического ингибирования PARP на жизнеспособность клеток ВП-dii-FAF28 при их длительном культивировании в стационарной фазе роста.

А – общее число клеток на 1см² поверхности роста (N_т); **Б** – число живых клеток на 1см² поверхности роста (N_в); **В** – содержание в культурах мертвых клеток, окрашиваемых красителем трипановым синим.

Обозначения: 1 – культивирование клеток в среде без ингибитора PARP (контроль); 2 – культивирование клеток в среде с ингибитором PARP (3-аминобензамид – 0,5 мМ).

Флавоноиды – новая группа ингибиторов PARP, обладающих цитопротекторным действием. Флавоноиды представляют собой фенолсодержащие пигменты растительного происхождения. Они входят в состав рациона питания и обладают лекарственными свойствами. В частности, они проявляют выраженное терапевтическое действие при лечении воспалительных болезней у человека (*Middleton E et al., Pharmacol Rev. 2000. 52:673; Geraets L et al., Eur J Pharmacol. 2007. 573:241*).

Нами было проанализировано влияние ряда флавоноидов на активность частично очищенной PARP-1 тимуса телят. Показано, что наибольшей PARP-ингибиторной активностью обладает байкалеин (5,6,7-тригидроксифлавоноид), который в концентрации 100 мкМ практически наполовину подавляет активность PARP (рис. 9). Кверцетин (3',4',5,7-тетрагидроксифлавоноид) и байкалин ингибировали PARP только в концентрации

1 мМ, а даидзеин и таксифолин не оказывали ингибиторного действия на PARP. Сопоставление структуры и ингибиторной активности протестированных соединений позволяет сделать ряд заключений: 1) изофлавоны (даидзеин) и флаваны (таксифолин), в отличие от флавонов (кверцетин, байкалеин), не способны ингибировать PARP; 2) гликозилированные производные флавонов (байкалин) менее активны по сравнению с негликозилированными аналогами (байкалеин); 3) расположение гидроксильных групп в молекуле флавона имеет важное значение для PARP-ингибиторной активности соединения (кверцетин – байкалеин).

Таким образом, нами была протестирована PARP-ингибиторная активность ряда природных флавоноидов. На основе полученных данных проведен анализ взаимосвязи структура-активность. Показано, что байкалеин обладает выраженным PARP-ингибирующим действием, соизмеримым по своей эффективности с известными синтетическими ингибиторами, производными никотинамида. Известно, что действие ингибиторов PARP на клетку связано не только с ослаблением надежности PARP-зависимых систем репарации ДНК, но также с подавлением транскрипции провоспалительных генов и прерыванием путей клеточной гибели, и это может иметь положительное терапевтическое и профилактическое действие при многих патологиях, включая ишемии органов, хронические воспалительные и нейродегенеративные заболевания и др.

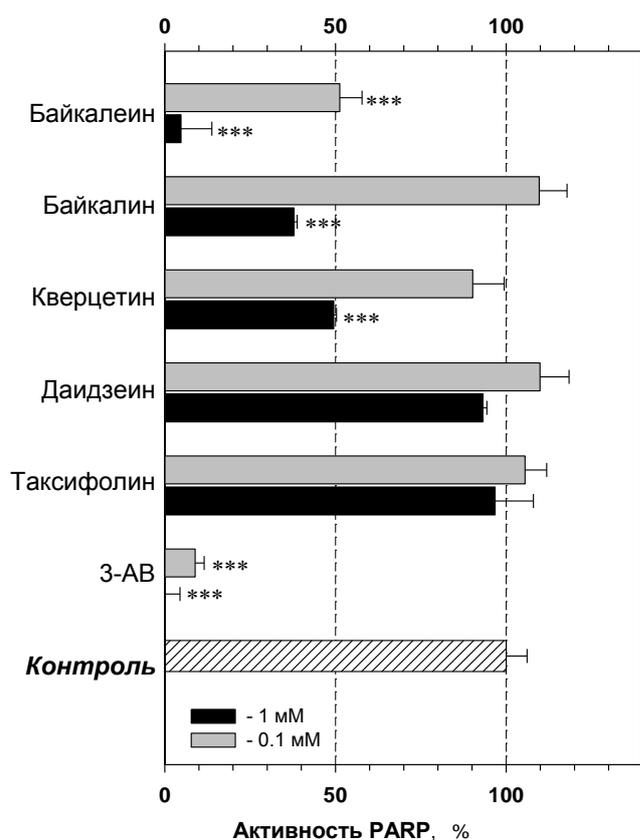


Рисунок 9. Сравнение PARP-ингибиторной активности ряда флавоноидов.

Обозначения: 3-AB – 3-аминобензамид (положительный контроль); *** $p < 0,001$ по сравнению с контролем (ANOVA, однофакторный анализ).

Было исследовано влияние на активность PARP экстракта *Ginkgo biloba* EGb 761, в состав которого входят флавоноиды. Известно, что этот препарат эффективен при лечении некоторых возрастных расстройств, в том числе нарушений когнитивных функций при болезни Альцгеймера (*Heui S and Lavretsky H, Int Psychogeriatr. 2012. 24:1*) и возрастной макулярной дегенерации у человека (*Evans JR, Cochrane Database Syst. 2013. 1:CD001775*). Мы предположили, что эти эффекты EGb 761, по крайней мере, частично, могут быть обусловлены его влиянием на активность PARP.

Было обнаружено, что EGb 761, как и некоторые флавоноиды, обладает способностью ингибировать активность PARP тимуса теленка. Рассчитанное значение IC_{50} составило 0,27 мг/мл (рис. 10). Показано, что при высоких концентрациях он полностью подавляет активность PARP.

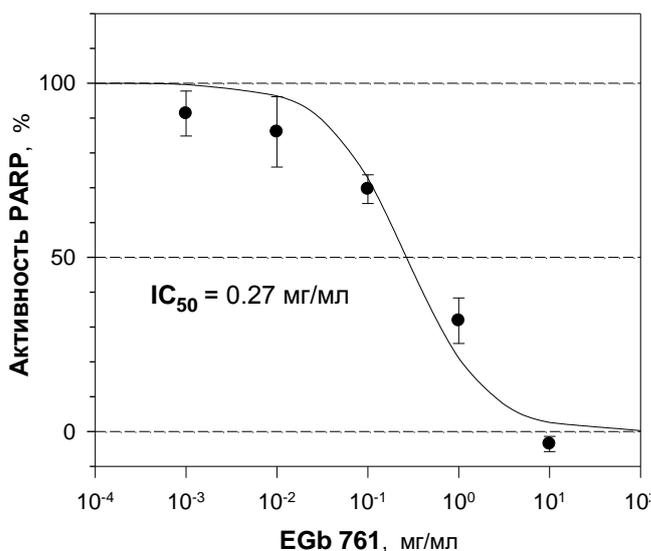
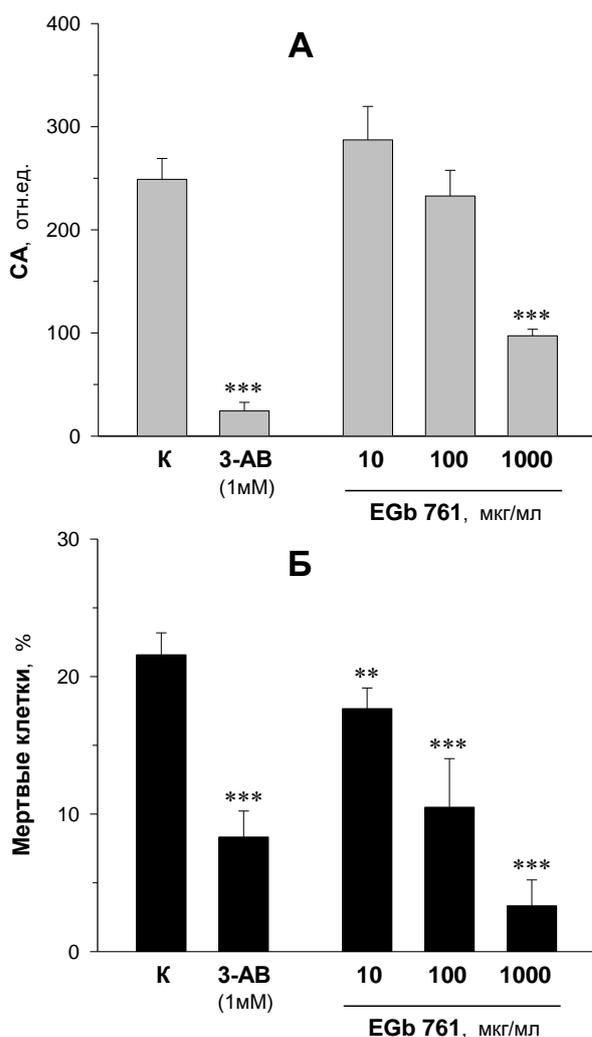


Рисунок 10. Влияние экстракта *G. biloba* EGb 761 на активность PАРР тимуса теленка.



Нами также исследовалось влияние EGb 761 на СА в пермеабелизованных клетках PC12. EGb 761 дозозависимым образом подавлял СА (рис. 11А).

Кроме того, EGb 761 увеличивал выживаемость клеток PC12 при окислительном стрессе, подобно используемому в качестве положительного контроля ингибитору PАРР - 3-AB (рис. 11Б). При этом изменение обоих показателей (ингибирование СА и цитопротекторное действие) в исследуемом диапазоне концентраций EGb 761 происходило синхронно. Таким образом, нами была впервые продемонстрирована способность EGb 761 эффективно подавлять активность PАРР. Видимо, это свойство экстракта связано с присутствием в его составе флавоноидов, которые, как было показано выше, являются хорошими ингибиторами PАРР. Наличие у EGb 761 PАРР-ингибиторной активности во многом определяет способность этой субстанции оказывать выраженное цитопротекторное действие в условиях окислительного стресса.

Рисунок 11. Влияние экстракта *Ginkgo biloba* EGb 761 на стимулированную активность PАРР (А) и гибель клеток PC12, индуцированную окислительным стрессом (Б).

Окислительный стресс вызывали 30-минутной обработкой клеток H₂O₂ (1мМ). Обозначения: К - контроль; СА – стимулированная активность PАРР; ** p<0,01; *** p<0,001 – по сравнению с контролем (ANOVA, однофакторный анализ).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Актуальной проблемой биоинженерии является разработка удобных тест-систем, включая и клеточных, для оценки фармакологической активности природных и синтетических веществ. Изучение действия «антивозрастных» препаратов предполагает моделирование на клеточных культурах деструктивных изменений, ведущих к увеличению вероятности смерти с возрастом (т.е. к старению). В данном исследовании для моделирования таких процессов нами была выбрана описанная ранее и хорошо охарактеризованная клеточная модель «стационарного старения» (*Dell'Orco RT, Adv Exp Med Biol. 1975. 53:41; Khokhlov AN, Curr Aging Sci. 2013. 6:14; Leontieva O and Blagosklonny MV, Aging (Albany NY). 2014. 6:1010*). В экспериментах были использованы стационарные культуры клеток китайского хомячка ВП-dii-FAF28.

В работе впервые было подробно изучено влияние «возраста» культуры на показатели активности PARP в стационарной фазе роста животных клеток. Показано, что в процессе «стационарного старения» СА, отражающая общее количество каталитически активных молекул фермента в клетке, неуклонно снижается, причем на фоне усиления экспрессии генов, кодирующих белки семейства PARP. Обнаруженный феномен может быть обусловлен одной из следующих причин: накоплением в клетке неактивных посттрансляционно-модифицированных молекул PARP (*Wagner LP et al., 1982. Exp Gerontol. 17:359; Zilio N et al., DNA Repair (Amst.). 2013. 12:761*), снижением активности ядерной PAR-гликогидролазы (*Bizec JC et al., 1989. Ophthalmic Res. 21:175*) и неферментативным повреждением белков PARP активными формами кислорода и азота вследствие развития хронического окислительного и/или нитрозилирующего стресса. Можно предположить, что вызываемое этими факторами снижение общего пула каталитически активных молекул PARP на ранних стадиях стационарной фазы роста компенсируется увеличенной экспрессией генов, кодирующих PARP, а на более поздних сроках процесс инактивации PARP значительно усиливается, и это приводит к развитию дефицита каталитически активной PARP. В результате этого даже спонтанно возникающие в клетке повреждения ДНК остаются «нераспознанными» PARP (снижение HCA и PAR_b после 7-8 сут культивирования). Это указывает на возможное ослабление контроля PARP над основными системами репарации ДНК.

Для корректной оценки способности системы PARP реагировать на вновь возникающие повреждения ДНК в клетках мы предложили использовать безразмерные показатели: 1–HCA/CA – в пермеабелизованных клетках, и 1–PAR_b/PAR_s – в живых клетках, которые (показатели), как оказалось, хорошо коррелировали с использовавшимися ранее показателями CA–HCA и PAR_s–PAR_b, соответственно. Очевидно, что эти безразмерные показатели не должны зависеть от доли мертвых клеток в культуре, так как клетки, не участвующие в проявлении HCA, также не будут участвовать в проявлении СА. Таким образом, все индивидуальные различия или различия в приготовлении проб нивелируются при расчете этих показателей, что значительно снижает дисперсию значений в выборке. В данной работе было показано, что значения 1–HCA/CA и 1–PAR_b/PAR_s, отражающие фактически долю свободных (не связанных с ДНК и другими эндогенными активаторами) каталитически активных молекул PARP, снижается, тогда как показатели HCA/CA и PAR_b/PAR_s (отражают долю каталитически

активных молекул PARP, связанных с ДНК и другими эндогенными активаторами) наоборот, неуклонно увеличиваются с «возрастом» культур клеток ВП-dii-FAF28. Расчет этих показателей из данных, приведенных в некоторых публикациях, посвященных аналогичным исследованиям, показал, что у животных с возрастом – так же, как и в нашей модели *in vitro* – происходит снижение показателей, эквивалентных 1–HCA/CA в клетках крови, мозга и селезенки (Grübe K and Bürkle A, *PNAS*. 1992. 82:11759; Ушакова ТЕ и др., *Радиация Биол Радиоэкол*. 2004. 44:509; Malanga M et al., *J Neurochem*. 2005. 93:1000; Strosznajder RP et al., *Acta Biochim Pol*. 2005. 52:909; Kunzmann A et al., *Exp Gerontol*. 2008. 43:409). Следовательно, безразмерные показатели 1–HCA/CA или 1–PAR_b/PAR_s могут быть успешно использованы в качестве биохимического маркера клеточного фенотипа «состарившихся» клеток. Основываясь на этом, мы предлагаем применить его для оценки геропротекторного/геропротомоторного действия различных фармакологических веществ в клеточных тест-системах.

В настоящее время в клиническую практику активно внедряются лекарственные препараты на основе ингибиторов PARP. Их предлагают использовать преимущественно для сенсibilизации раковых клеток к химио- и радиотерапии. Однако из результатов экспериментальных исследований на животных известно также, что ингибиторы PARP могут предотвращать или замедлять развитие таких возрастных патологий, как сердечная недостаточность, диабет, ишемия, нейродегенеративные заболевания (Kirkland JB, *Exp Biol Med (Maywood)*. 2010. 235:561; Berger NA et al., *Br J Pharmacol*. 2018. 75:192; Henning RJ et al., *Cardiovasc Toxicol*. 2018. 18:493). Выявление различий между проявлениями нормального старения (successful aging) и возрастных заболеваний является одной из важных задач геронтологии. В экспериментах на клеточных культурах мы не обнаружили влияния ингибиторов PARP на выживаемость клеток при их длительном культивировании в стационарных культурах, тогда как при действии сильного окислительного/генотоксического стресса они проявляли ярко выраженное цитопротекторное действие.

Анализ литературы показывает, что для эффективного подавления активности PARP могут быть использованы не только лекарственные средства, содержащие синтетические ингибиторы PARP, но также и природные соединения, обладающие высоким PARP-ингибиторным потенциалом. Среди последних особого внимания, на наш взгляд, заслуживают флавоноиды. Было показано, что прием с пищей флавоноидов положительно влияет на здоровье человека и способствует замедлению развития возрастных заболеваний (Wang X et al., *Br J Nutr*. 2014. 111:1). Выявленные эффекты флавоноидов, как правило, связывают с их антиоксидантным и противовоспалительным действием (Egert S et al., *Br J Nutr*. 2009. 102:1065).

В данном исследовании нами было установлено, что ряд флавоноидов и содержащий флавоноиды экстракт *Ginkgo biloba* (EGb 761) способны эффективно подавлять активность PARP. Однако следует обратить внимание на то, что длительное подавление активности PARP может, наряду с их положительными терапевтическими эффектами (ослабление последствий ишемии, хронического окислительного стресса и хронического воспаления), способствовать увеличению нестабильности генома и вероятности возникновения злокачественных новообразований.

ВЫВОДЫ

1. С увеличением длительности культивирования клеток китайского хомячка линии ВП-dii-FAF28 в стационарной фазе роста (при моделировании «стационарного старения» клеток *in vivo*) происходит постепенное увеличение базального уровня поли(ADP-рибозы) в клетках и снижение способности клеток к поли(ADP-рибозил)ированию белков в ответ на кратковременное действие высоких доз генотоксического агента H₂O₂. Выявленные изменения в состоянии системы поли(ADP-рибозил)ирования белков указывают на снижение надежности функционирования поддерживаемых ею систем репарации ДНК при «стационарном старении» клеток.
2. По мере «стационарного старения» клеток ВПd-ii-FAF28 происходит постепенное снижение стимулированной дезоксиолигонуклеотидом активности поли(ADP-рибоза)-полимераз и увеличение их нестимулированной активности в пермеабелизованных клетках. Наблюдаемое снижение стимулированной активности поли(ADP-рибоза)-полимераз, преимущественно зависящей от содержания активных форм поли(ADP-рибоза)-полимераз-1 и -2, не связано со снижением уровней экспрессии кодирующих их генов. Обнаружено, что уровни экспрессии генов *Parp1* и *Parp2* в клетках ВПd-ii-FAF28 возрастают в ходе их «стационарного старения».
3. Выявленные изменения в показателях активности системы поли(ADP-рибозил)ирования белков хорошо коррелируют с известными проявлениями «стационарного старения» клеток в культуре: снижением жизнеспособности клеток и накоплением в культуре сенесцентных клеток. Предложено использовать безразмерные показатели, отражающие способность клетки активировать поли(ADP-рибозил)ирование белков в ответ на вновь возникающие повреждения ДНК (1-HCA/CA или 1-PAR_b/PAR_s), в качестве нового маркера возрастных изменений, характерных для старения организма, а также при тестировании биологически активных веществ на геропротекторное/геропротормотное действие.
4. Фармакологическое ингибирование поли(ADP-рибоза)-полимераз не влияет на скорость развития и выраженность проявлений признаков «стационарного старения», но приводит к увеличению выживаемости клеток в условиях окислительного стресса.
5. Ряд флавоноид-содержащих лекарственных субстанций растительного происхождения (байкалеин, байкалин, кверцетин, экстракт *Ginkgo biloba* EGb 761) способны эффективно подавлять активность поли(ADP-рибоза)-полимераз. Показано, что гликозилированные производные флавонов менее активны в сравнении с их негликозилированными аналогами. Производные изофлавона и флавана не оказывают ингибиторное действие на активность поли(ADP-рибоза)-полимераз.

НАУЧНЫЕ СТАТЬИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ В ЖУРНАЛАХ SCOPUS, WOS, RSCI

1. **Shilovsky G.A.**, Shram S.I., Morgunova G.V., and Khokhlov A.N. Protein poly(ADP-ribosyl)ation system: Changes in development and aging as well as due to restriction of cell proliferation // *Biochemistry (Moscow)* 2017, V. 82, № 11, P. 1391-1401. (IF = 1,724).

2. **Shilovsky G.A.**, Khokhlov A.N., and Shram S.I. The protein poly(ADP-ribosyl)ation system: its role in genome stability and lifespan determination // *Biochemistry (Moscow)* 2013, V.78, №5, P. 433-444. (IF = 1,724).
3. Shram S.I., **Shilovsky 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, V. 141, № 5, P. 628-632. (IF = 0,51)
4. Шрам С.И., Рыбакова И.Г., Лазуркина Т.Ю., Сидоров Г.В., **Шиловский Г.А.**, Хохлов А.Н., Мясоедов Н.Ф. Ферментативный синтез селективно меченного тритием по аденину beta-NAD⁺ и его использование для определения активности поли(ADP-рибоза)-полимеразы // *Прикл. биохим. микробиол.* 1999, Т. 35, № 6, С. 638-646. (IF = 0,855)
5. 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 // *Mosc. Univ. Biol. Sci. Bull.* 2014, V. 69, № 1, P.10-14. (IF = 0,62)
6. Хохлов А.Н., Прохоров Л.Ю., Акимов С.С., **Шиловский Г.А.**, Щеглова М.В., Сорока А.Е. «Стационарное старение» клеточных культур: попытка оценки влияния «возраста» среды // *Цитология.* 2005, Т. 47, № 4, С. 318-322. (IF = 0,481)

ДРУГИЕ НАУЧНЫЕ РАБОТЫ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Шиловский Г.А.**, Шрам С.И., Хохлов А.Н. Антивозрастная медицина и поли(ADP-рибоза)-полимеразы: активировать или ингибировать? // *Клиническая геронтология* 2017, Т. 23 № 9-10, стр. 76-78. (IF РИНЦ = 0,234)
2. **Шиловский Г.А.**, Шрам С.И., Хохлов А.Н. «Стационарное старение» клеточной культуры: вызванная накоплением повреждений ДНК «перегрузка» системы поли(ADP-рибозил)ирования белков при ограничении клеточной пролиферации // *Клиническая геронтология* 2014, Т. 20 № 9-10, стр. 121-122 (IF РИНЦ = 0,234).
3. **Шиловский Г.А.**, Хохлов А.Н., Шрам С.И. Флавоноиды как ингибиторы поли(ADP-рибоза)-полимеразы: новые свойства известных препаратов // *Проблемы старения и долголетия* 2013, Т. 22 (Прилож.), стр. 66-67.
4. Гладнева А.Д., Моргунова Г.В., **Шиловский Г.А.**, Шрам С.И., Хохлов А.Н. Бета-галактозидаза РН 6.0 - биомаркер старения или ограничения клеточной пролиферации? // *Успехи геронтологии* 2014, Т. 27 № 2 (Прилож.), С. 29.
5. Хохлов А.Н., Шрам С.И., **Шиловский Г.А.** Поли(ADP-рибоза)-полимераза и клеточное старение // *Биологические механизмы старения. III международный симпозиум (Харьков, 19-21мая 1998 г.), Харьков, Украина, 1998.*
6. **Shilovsky G.A.**, Shram S.I., Khokhlov A.N. Does the aging affect the cell proliferation status and DNA damage-dependent poly(ADP-ribosyl)ation in the same way? // 2nd International Conference «Genetics of Aging and Longevity», 2012. - April 22-25, Russia, - Moscow, P. 79.

Ссылки на другие публикации соискателя приведены в базах данных:

РИНЦ https://elibrary.ru/author_items.asp?authorid=94610;

ИСТИНА <https://istina.msu.ru/profile/gregory.shilovsky/> (IstinaResearcherID: 14748468)