

УДК 576.32.36

РЕПЛИКАТИВНОЕ СТАРЕНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ АУТОФАГИИ В МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ

© 2020 А.Ю. Ратушный*, Ю.В. Рудимова, Л.Б. Буравкова

Институт медико-биологических проблем Российской академии наук,
123007 Москва, Россия; электронная почта: ratushkin@mail.ru

Поступила в редакцию 21.07.2020

После доработки 05.08.2020

Принята к публикации 05.08.2020

Клеточное старение приводит к изменению ряда свойств мезенхимальных стромальных клеток (МСК), в том числе, увеличивается количество поврежденных структур, которые могут оказывать негативное влияние на внутриклеточные процессы. Устранение поврежденных молекул и органелл происходит посредством аутофагии, что может иметь большое значение в контексте старения. Одним из подходов к усилению терапевтических свойств и «замедлению» клеточного старения является использование для культивирования пониженного уровня кислорода. Цель данной работы заключалась в изучении некоторых морфофункциональных характеристик и экспрессии генов, ассоциированных с аутофагией, при репликативном старении МСК в условиях с различным содержанием кислорода. Проведенное исследование позволило выявить изменения в регуляции аутофагии на транскрипционном уровне. Показано повышение экспрессии генов роста аутофагосомной мембраны – *ATG9A*, *ULK1*, генов созревания аутофагосом – *CTSD*, *CLN3*, *GAA*, *GABARA-PL1*, генов регуляции аутофагии – *TP53*, *TGFBI*, *BCL2L1*, *FADD*, *HTT*, при одновременном снижении экспрессии *IGF1* и *TGM2*. Отмечено увеличение объема лизосомального компартмента, что также указывает на усиление деградационной активности сенесцентных МСК. Использование при длительном культивировании пониженного содержания кислорода (5%) способствовало уменьшению количества лизосом. На транскрипционном уровне репликативное старение МСК в условиях различного содержания кислорода приводило к однонаправленным изменениям экспрессии генов, ассоциированных с аутофагией.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: мезенхимальные стромальные клетки, репликативное старение, аутофагия, гипоксия.

DOI: 10.31857/S032097252010005X

ВВЕДЕНИЕ

Мезенхимальные стромальные/стволовые клетки (МСК) задействованы в физиологическом обновлении тканей [1] и репарации раневых повреждений, поддерживая тканевый гомеостаз. МСК являются популяцией стволовых клеток взрослого организма, наиболее широко используемой в клинических испытаниях [2] в качестве инструмента регенеративной медицины. Регенеративный потенциал МСК обусловлен продукцией широкого спектра цитокинов, что определяет антиапоптотический, иммуномодуляторный, хемоаттрактивный, антифибротический и ангиогенный эффекты [3–6].

Активация клеточного старения (сенесценция), необходимого для предотвращения размножения клеток с поврежденным геномом, приводит к изменению морфофункциональных характеристик МСК и их регенеративных свойств. В значительной степени модифицируется цито-

киновый профиль, что приводит к нарушению межклеточной коммуникации [7–9]. Клеточное старение характеризуется необратимым арестом клеточного цикла, а также включает ряд характерных признаков – дисфункция митохондрий, нарушение протеостаза, увеличение уровня активных форм кислорода, изменение экспрессии определенных генов и др. [7, 8].

Поскольку старение клетки тесно ассоциировано с увеличением доли поврежденных структур и изменением внутриклеточного гомеостаза, этот процесс взаимосвязан с аутофагией, необходимой для деградационной деградации нефункциональных органелл, белковых агрегатов и патогенных частиц. Активность аутофагии резко возрастает в ответ на стресс, что помогает клеткам адаптироваться к условиям окружающей среды. В то же время старение может приводить к снижению эффективности деградационных процессов [10, 11]. Исследования, посвященные взаимосвязи процессов аутофагии и старения, демонстрируют неоднозначные результаты. С одной стороны, аутофагия может проявлять просенесцентные эффекты через ассоциированный со старе-

* Адресат для корреспонденции.

нием секретом (SASP) [12]. Инициация старения с помощью высокой концентрации глюкозы, как и длительное культивирование МСК *in vitro*, приводит к увеличению экспрессии p16, p21, ассоциированной со старением β-галактозидазы (SA-β-Gal) и активации аутофагии. При этом ингибирование аутофагии отменяет проявление признаков старения клеток [13, 14]. С другой стороны, утилизация «неправильных» структур способствует замедлению старения. В гемопоэтических стволовых клетках [15], эмбриональных стволовых клетках [16] и мышечных сателлитных клетках [17] аутофагия может задерживать клеточное старение. Активация аутофагии необходима для пролиферации [18] и дифференцировки МСК [19], а её подавление может ограничивать терапевтический потенциал клеточного препарата [20]. Ассоциированные со старением белки могут ингибировать аутофагию и отменять ее защитные эффекты в фибробластах, проявляющих признаки старения, ускоряя этот процесс [21]. Следовательно, регуляторное влияние аутофагии на процесс старения может зависеть от исходного сенесцентного статуса клеток [22].

Потенциальное использование аутофагии для замедления клеточного старения МСК *in vitro* может быть интересно и в сочетании с другими подходами. В частности, ранее нами было показано, что использование физиологической гипоксии (5% O₂) для длительного культивирования позволяет снизить выраженность изменений маркеров, ассоциированных со старением. Эффект гипоксии при этом интенсивнее проявлялся на ранних пассажах (p2-5), чем на более поздних (p11-20) [23]. Предполагается, что изменение регуляции аутофагических процессов в зависимости от уровня оксигенации может быть одной из причин наблюдаемого эффекта. Цель данной работы заключалась в изучении некоторых морфофункциональных характеристик и экспрессии генов, ассоциированных с аутофагией, при репликативном старении МСК (p21-25) в условиях с различным содержанием кислорода (20% и 5%).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

МСК выделяли из стромально-васкулярной фракции жировой ткани человека с использованием стандартной методики [24] с модификациями [25] и культивировали в среде α-MEM (Gibco, США), содержащей 10%-ную фетальную телячью сыворотку («HyClone», США), 50 ед/мл пенициллина («ПанЭко», Россия), 50 мкг/мл стрептомицина («ПанЭко») в условиях 5%-ной

CO₂, 37°C, 100% влажности при 20% и 5% кислорода. Пересев осуществляли при 80–90% конfluентности клеточного слоя. Для подтверждения иммунофенотипа МСК [26] исследовали экспрессию основных маркеров (CD29⁺, CD90⁺, CD73⁺, CD44⁺, CD105⁺, HLA-ABC⁺, CD45⁻, CD31⁻, CD34⁻) с помощью соответствующих антител («Becton Dickinson», США) методом проточной цитофлуориметрии на приборе Accuri C6 («Becton Dickinson», США). Донорами были женщины 35–45 лет. Длительное культивирование продолжали до репликативного старения (21–25 пассаж).

Экспрессию β-галактозидазы (SA-β-gal) в клетках выявляли с помощью Senescence Cells Histochemical Staining Kit («Sigma-Aldrich», США) согласно инструкции производителя. Окрасивание проводили через семь дней после посева в стандартной плотности (3000 кл/см²). Анализировали клетки с использованием светового фазово-контрастного микроскопа Nikon Eclipse TiU («Nikon», Япония).

Морфологию клеток оценивали с помощью светового фазово-контрастного микроскопа Nikon Eclipse TiU («Nikon»). Для количественной оценки относительного размера и гранулярности МСК использовали метод проточной цитофлуориметрии. Датчики регистрируют поглощение и рассеивание света клеткой (прямое (Forward Scatter – FSC-A) и угловое (Side Scatter – SSC-A)). FSC-A позволяет судить о размерах клетки, а SSC-A – о гранулярности цитоплазмы.

Жизнеспособность МСК определяли методом проточной цитофлуориметрии на приборе Accuri C6 («Becton Dickinson») с использованием набора Annexin V-FITC/PI («Immunotech», Франция) согласно инструкции производителя. Annexin V позволяет выявлять апоптотические клетки, а PI метит клетки на поздних стадиях клеточной гибели.

Аутофлуоресценция и выявление лизосом. Аутофлуоресценцию анализировали при длине волны 530 нм. Измерения проводили на проточном цитофлуориметре Accuri C6 («Becton Dickinson»). Для выявления лизосомальных включений использовали pH-зависимый маркер LysoTracker Green DND-26 («Life Technologies», США). Флуоресцентный зонд селективно накапливается в клеточных компартментах с низким внутренним pH в живых клетках. Возбуждение/эмиссия: 504/511 нм. Клетки с зондом (200 нМ) культивировали 30 мин при 37°C.

Количественная ПЦР. Для определения уровня экспрессии генов выделяли тотальную РНК с помощью лизирующего реагента QIAzol («Qiagen», США), после чего осуществляли ре-

акцию обратной транскрипции с использованием QuantiTect Reverse Transcription Kit («Qiagen») согласно инструкциям производителя. Контроль концентрации и чистоты РНК в образцах осуществляли с помощью спектрофотометра Nanodrop ND-2000с («Thermo Scientific»). Полученную кДНК использовали для проведения количественной ПЦР с применением коммерческого реагента RT2 – Real Time SYBR Green/ROX PCR master mix («Qiagen», США) и планшетов Autophagy RT2 Profiler PCR Array («Qiagen») с иммобилизованными лиофилизированными праймерами. Измерения проводили на приборе Mx3000P («Stratagene», США). Уровень экспрессии оценивали с использованием метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [27]. В качестве референсных генов использовали *ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *HPRT*, *RPLP0*, включенные в состав набора.

Статистическая обработка данных. Статистическую достоверность различий между двумя группами данных оценивали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

МСК длительно культивировали до достижения лимита Хейфлика, используя физиологический (5%) и атмосферный (20%) уровни кислорода. Ранее нами было показано, что значительное снижение пролиферативной активности МСК происходит после 20-ого пассажа [9]. Исходя из этого, в клетках на ранних (p2-5) и поздних (p21-25) пассажах при культивировании в различных условиях оксигенации оценивали ряд морфофункциональных параметров (активность β -галактозидазы, ассоциированной со старением, жизнеспособность, морфология, аутофлуоресценция, лизосомальный компартмент) и транскрипционную активность 84 генов, ассоциированных с аутофагией.

Активность β -галактозидазы, ассоциированной со старением. Широко используемым в настоящее время маркером клеточного старения является активность ассоциированной со старением β -галактозидазы (SA- β -gal) [28]. Показано

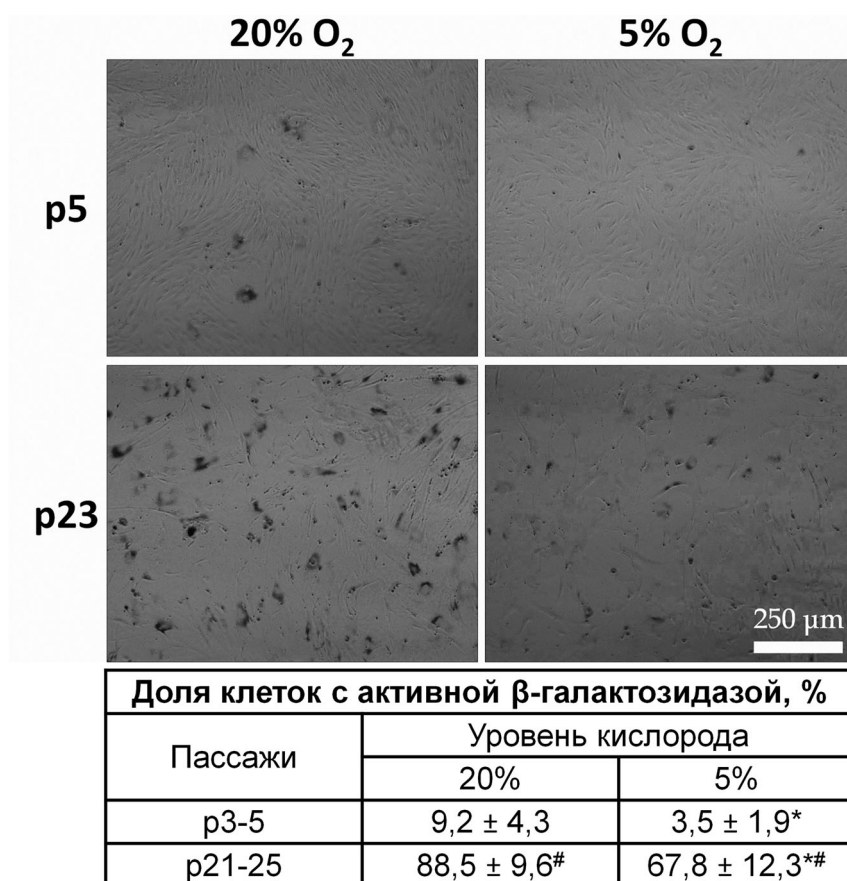


Рис. 1. Выявление активной β -галактозидазы (SA- β -gal), ассоциированной со старением, в МСК на ранних и поздних пассажах при длительном культивировании в условиях с различным содержанием кислорода. Световая микроскопия. Данные представлены как $M \pm SD$, $n \geq 5$, *,# $p \leq 0,05$ (* – сравнение с клетками, культивируемыми при 20% O_2 , # – сравнение с клетками p2-5)

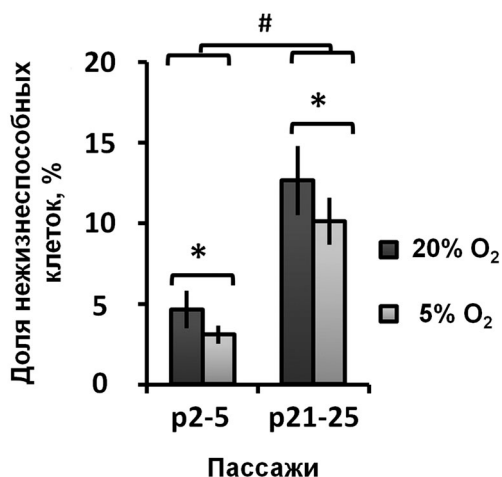


Рис. 2. Оценка жизнеспособности МСК при длительном культивировании в условиях с различным содержанием кислорода, с применением окрашивания флуоресцентными красителями Ann V/PI. Данные представлены как $M \pm SD$, $n \geq 5$, *, # $p \leq 0,05$ (* – сравнение с клетками, культивируемыми при 20% O₂, # – сравнение с клетками p2-5)

значительное увеличение количества клеток с активной SA-β-gal на поздних пассажах (рис. 1), что подтверждает сенесцентное состояние МСК. При этом культуры, постоянно экспонируемые при 5% O₂, содержали меньше клеток, экспрессирующих SA-β-gal.

Жизнеспособность МСК. С помощью метода проточной цитофлуориметрии с применением окрашивания флуоресцентными красителями Annexin V / Propidium Iodide была проанализи-

рована жизнеспособность МСК на ранних и поздних пассажах. Было показано, что на поздних пассажах обнаруживается повышение доли нежизнеспособных клеток в 2,5–3 раза (рис. 2). При культивировании МСК в условиях с физиологическим уровнем кислорода (5%) доля нежизнеспособных клеток была снижена как на ранних пассажах, так и в сенесцентных культурах, т.е. при 5% O₂ жизнеспособность МСК повышается (рис. 2). Доля нежизнеспособных клеток включает как Ann⁺/PI⁻, так и Ann⁺/PI⁺ популяции. Во всех исследуемых образцах жизнеспособность оставалась выше 85%.

Морфология клеток. Еще одним феноменологическим признаком сенесцентного состояния, косвенно связанным с пролиферативной активностью, является изменение морфологии клеток. В наших экспериментах на ранних этапах культивирования МСК имели преимущественно веретеновидную форму. На поздних пассажах клетки характеризовались увеличением размера, более выраженной популяционной гетерогенностью и увеличением количества цитоплазматических включений (рис. 3).

Для количественного сравнения морфологических показателей МСК в суспензии использовали метод проточной цитофлуориметрии. Данная методика позволяет оценить показатели рассеянного света, которые обусловлены размером, формой, плотностью клеток и гранулярностью внутриклеточной структуры. Было показано, что на поздних пассажах увеличивался средний размер МСК и их гранулярность, оцен-

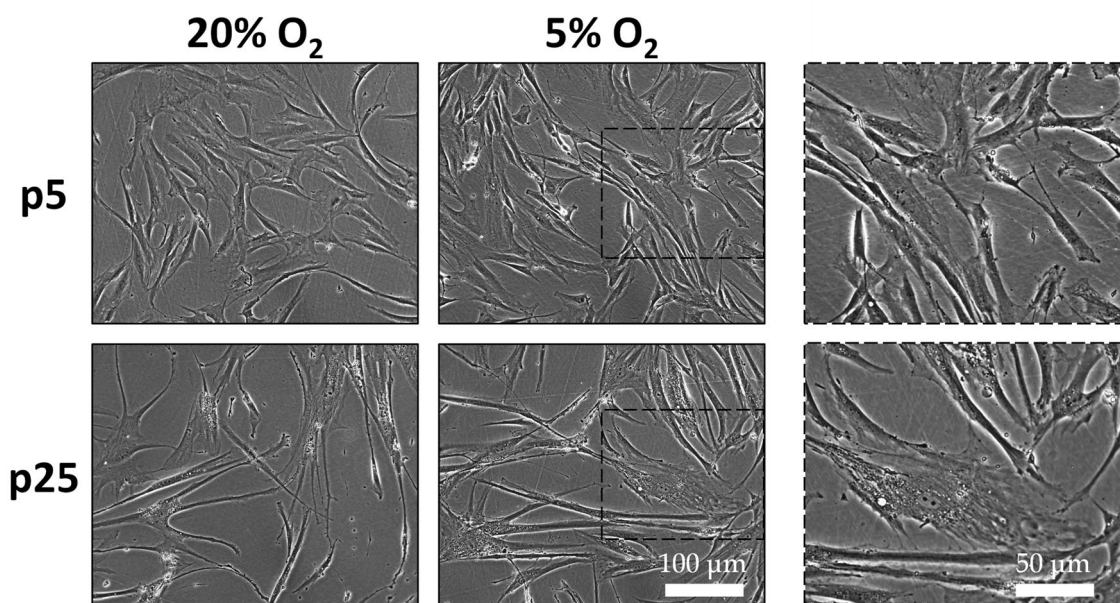


Рис. 3. Морфология МСК при длительном культивировании в условиях с различным содержанием кислорода. Световая микроскопия

Таблица 1. Оценка размера и гранулярности МСК по FSC-A и SSC-A, соответственно, при длительном культивировании в условиях с различным содержанием кислорода, проточная цитометрия. Данные представлены как $M \pm SD$, $n \geq 5$, *, # $p \leq 0,05$ (* – сравнение с клетками, культивируемыми при 20% O₂, # – сравнение с клетками p3-5)

FSC-A (прямое светорассеяние), усл. ед. $\times 10^3$			SSC-A (боковое светорассеяние), усл. ед. $\times 10^3$		
Пассажи	Уровень кислорода		Пассажи	Уровень кислорода	
	20%	5%		20%	5%
p3-5	62,0 \pm 3,7	57,2 \pm 1,3*	p3-5	8,3 \pm 1,2	7,2 \pm 1,3
p21-25	74,5 \pm 5,0#	75,8 \pm 1,6#	p21-25	11,0 \pm 2,2#	11,2 \pm 2,1#

Таблица 2. Средняя интенсивность флуоресценции LysoTracker Green DND26 и аутофлуоресценции на длине волны 530 нм в МСК на ранних и поздних пассажирах при длительном культивировании в условиях с различным содержанием кислорода, проточная цитофлуориметрия. Данные представлены как $M \pm SD$, $n \geq 5$, *, # $p \leq 0,05$ (* – сравнение с клетками, культивируемыми при 20% O₂, # – сравнение с клетками p3-5)

LysoTracker Green DND26, усл. ед. $\times 10^3$			Аутофлуоресценция, усл. ед. $\times 10^3$		
Пассажи	Уровень кислорода		Пассажи	Уровень кислорода	
	20%	5%		20%	5%
p3-5	397,6 \pm 44,1	292,6 \pm 58,9*	p3-5	10 \pm 0,5	8 \pm 0,8*
p21-25	782,8 \pm 75,8#	640,3 \pm 78,1*.#	p21-25	15 \pm 0,6#	14 \pm 0,5#

ка которых осуществлялась по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеиванию соответственно (табл. 1). При 5% O₂ средний размер клеток оказался сниженным на ранних пассажах. Значительных различий по морфологии клеток и гранулярности внутриклеточной структуры МСК в зависимости от уровня оксигенации на поздних пассажах не было выявлено.

Лизосомальный компартмент. Для исследования активности лизосомального компартмента был использован зонд LysoTracker Green DND-26, который селективно накапливается в везикулах с пониженным pH, главным образом – в лизосомах. В результате проведенных исследований было показано значительное повышение флуоресценции данного зонда в МСК на поздних пассажах. Культивирование клеток в условиях с физиологическим уровнем кислорода приводило к значимому снижению средней интенсивности флуоресценции (СИФ) зонда LysoTracker Green DND-26 как на ранних, так и на поздних пассажах (табл. 2). Постоянное ведение культуры МСК при 5% O₂ вызывало снижение флуоресценции LysoTracker Green DND-26 в 1,5–2 раза (табл. 2).

На поздних пассажах также было детектировано значительное увеличение аутофлуоресценции МСК, что связывают, в первую очередь, с

накоплением липофусцина (табл. 2). На ранних пассажах отмечено снижение аутофлуоресценции при культивировании в условиях физиологической гипоксии.

Транскрипция генов аутофагии. Анализ результатов транскриптомной активности 84 генов, ассоциированных с аутофагическими процессами, в МСК ранних и поздних пассажей не выявил значимых различий в зависимости от уровня оксигенации (рис. 4). Тем не менее, длительное культивирование клеток приводило к значимому изменению экспрессии ряда генов. В сенесцентных клетках повышалась экспрессия *ATG9A*, *BCL2L1*, *CTSD*, *FADD*, *GAA*, *GABARAPL1*, *HTT*, *NPC1*, *TGFB1*, *TP53 (p53)*, *ULK1* и снижалась экспрессия *IGF1* и *TGM2* (рис. 4, 5). Данные гены можно условно разделить на три группы: гены регуляции аутофагии (*IGF1*, *TP53*, *TGFB1*, *BCL2L1*, *FADD*, *HTT*), гены инициации сборки аутофагосомы (*ATG9A*, *ULK1*) и гены созревания аутофагосомы (*TGM2*, *CTSD*, *CLN3*, *GAA*, *GABARAPL1*).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Используемая в работе модель репликативного старения МСК позволила получить клеточные

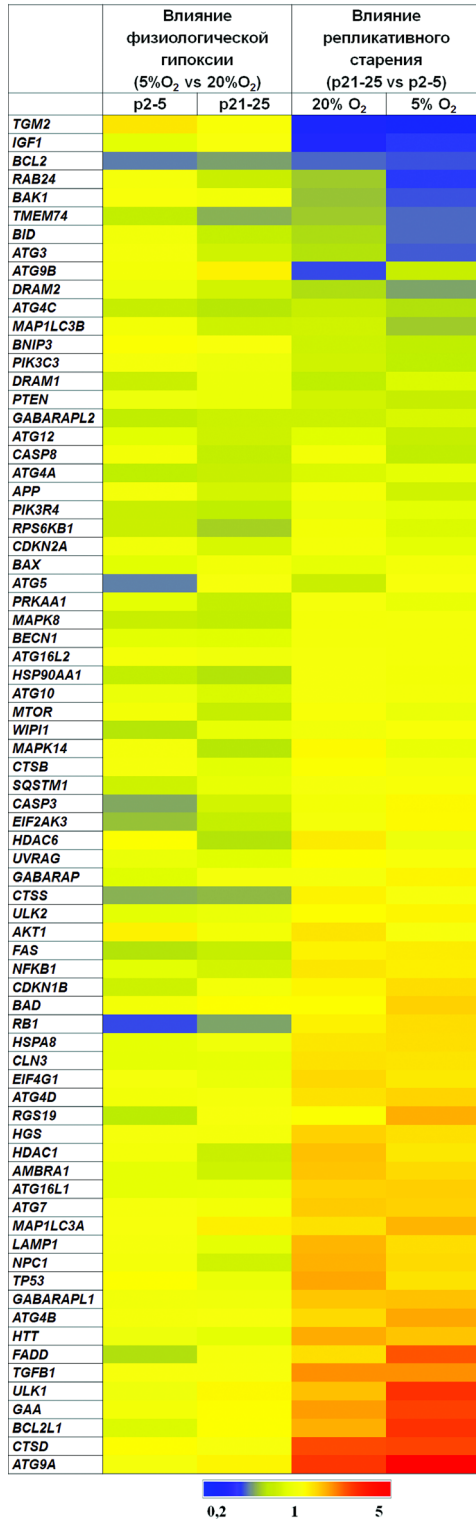


Рис. 4. Тепловая карта относительной экспрессии генов, ассоциированных с аутофагическими процессами. Рассматривается влияние физиологической гипоксии (5% O₂ vs 20% O₂) на ранних и поздних пассажах и влияние репликативного старения (p21-25 vs p2-5) при культивировании МСК в условиях различной оксигенации. (С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>)

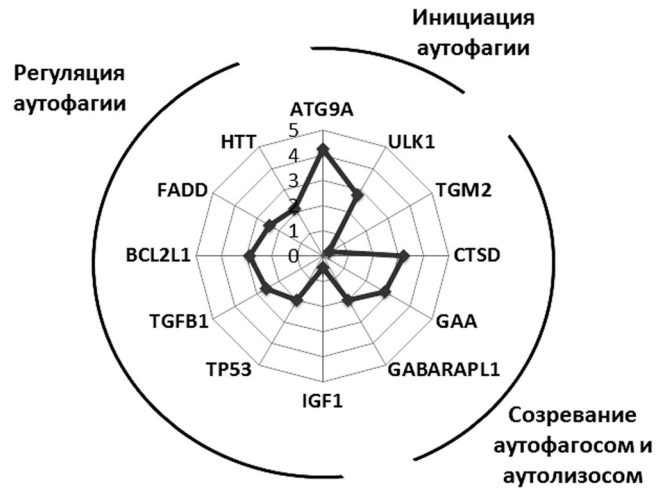


Рис. 5. Изменение экспрессии генов, ассоциированных с аутофагическими процессами, в сенесцентных МСК относительно клеток на ранних пассажах. Представлены гены, экспрессия которых значительно изменилась ($p \leq 0,05$) более чем в 2 раза

культуры с характерными морфофункциональными модификациями, включая понижение жизнеспособности, увеличение размера, гранулярности, аутофлуоресценции и уровня флуоресценции LysoTracker Green DND-26. Несмотря на то, что сенесцентные клетки могут проявлять устойчивость к апоптозу [7, 29], некоторое снижение жизнеспособности при длительном культивировании является для них характерным признаком. При этом данные о влиянии пониженного содержания кислорода на процессы апоптоза в МСК противоречивы. Показано, что МСК, выделенные из костного мозга, сохраняют одинаковую жизнеспособность при постоянном культивировании в условиях 20% и 2–3% O₂ [30, 31]. Однако большинство исследователей сходятся во мнении, что физиологическая гипоксия повышает жизнеспособность МСК [32–34]. Клетки, культивируемые при атмосферном уровне кислорода, более подвержены повреждению ДНК, чем клетки, культивируемые при пониженной оксигенации. Исследователи предполагают связь данного эффекта с уровнем внутриклеточных активных форм кислорода (АФК) [34, 35].

Снижение содержания кислорода в среде культивирования, вероятно, позволяет снизить скорость появления дефектных структур, возникающих вследствие окислительных повреждений. Культивирование МСК при 5% O₂ вызывало снижение детектируемой флуоресценции LysoTracker Green DND-26. В этом случае общий объем кислых лизосомальных включений может косвенно указывать на количество поврежденных внутриклеточных структур. В настоящее

время считается, что старение приводит к снижению общей способности клеток к деградации и сопровождается общим снижением активности протеасом и лизосом [36]. При этом количество и размер лизосом у большинства клеток увеличивается с возрастом [37, 38]. В сенесцентных лизосомах наблюдается накопление неразлагаемого материала, который состоит из окисленных макромолекул, подвергнутых вторичным модификациям, что делает их менее восприимчивыми к действию кислых гидролаз. Эти посттрансляционные модификации включают перекисное окисление липидов и карбонилирование белков.

Основным примером является способный к аутофлуоресценции липофусцин, также известный как возрастной пигмент, который используется в качестве маркера старения [39]. В нашей работе показано значительное увеличение аутофлуоресценции МСК на поздних пассажах, что свидетельствует, в первую очередь, о накоплении липофусцина. Данный пигмент старения преимущественно накапливается внутри лизосом и его образование ускоряется реакциями Фентона, которые происходят внутри этих органелл в ответ на окислительный стресс. Вероятно, повышенное накопление липофусцина в лизосоме может изменить его деградационную функцию [40]. Стоит отметить, что органеллы с липофусцином при этом остаются кислыми, туда даже продолжают поступать гидролитические ферменты, хотя свои функции по расщеплению уже не выполняют. Нарушение работы лизосом ведет к накоплению «неправильных» белков и целых клеточных структур вроде дефектных митохондрий. Недостаточность аутофагии приводит к интенсификации процессов старения [40]. Таким образом, детектируемое увеличение флуоресценции зонда LysoTracker Green DND-26, аутофлуоресценции и повышение вакуолизации цитоплазмы может быть доказательством увеличения количества и размеров лизосомальных включений. Тем не менее, большинство из них, вероятно, не способны в полной мере выполнять утилизирующую функцию, а отсутствие клеточных делений не позволяет уменьшить их количество на клетку.

Отсутствие клеточных делений не приводит к остановке роста клетки, что и обуславливает увеличение среднего размера МСК на поздних пассажах. При этом сенесцентные клетки способны сохранять жизнеспособность и функциональную активность довольно долго, не запуская апоптотические каскады и продолжая увеличиваться в размерах и накапливать широкий спектр различных цитоплазматических включений [7, 29, 41]. Сходные данные об изменениях морфологии при клеточном старении были по-

лучены и в других исследованиях МСК, выделенных из жировой ткани [42]. Значимое снижение среднего размера клеток при физиологической гипоксии на ранних пассажах, вероятно, связано с повышенной пролиферативной активностью, что было продемонстрировано нами и другими авторами ранее [34, 43].

Необходимо отметить, что в работе была изучена экспрессия ряда генов, многие из которых участвуют не только в аутофагии, но и в широком спектре других внутриклеточных процессов. Обнаруженные изменения экспрессии указывают на активацию аутофагии. Важным является снижение уровня мРНК *IGF1* (Insulin-like growth factor 1). Известно, что ингибирование сигнального пути *IGF1* увеличивает продолжительность жизни, защищает от нейродегенерации и рассматривается как потенциальная терапевтическая мишень [44]. Обнаружено, что пониженная экспрессия *IGF1* защищает сенесцентные МСК через активацию аутофагии, увеличивая, тем самым, выживаемость клеток после трансплантации в очаг инфаркта миокарда [45].

В клетках поздних пассажей было также обнаружено увеличение транскрипта *TP53* (tumor protein p53), который в ядре осуществляет контроль генов, участвующих в отрицательной регуляции mTORC1 и запускающих аутофагию [46]. Y. Ma et al. показали, что аутофагия играет важную роль в поддержании МСК при старении и отметили, что аутофагический контроль может частично защитить от проявления возрастных признаков МСК посредством регуляции ROS-p53 [11]. В ряде работ продемонстрирована активация аутофагии, когда МСК входят в состояние репликативного старения [14]. Подавление p53 приводило к снижению преобразования LC3-I до LC3-II и увеличению экспрессии mTOR, показывая, что он представляет собой критический триггер для активации аутофагии в культивируемых МСК [47].

Еще одним фактором, способным активировать аутофагию, является трансформирующий фактор роста- β (*TGF β 1*). TGF- β стимулирует синтез коллагена типа I α 2 и фибронектина в миофибробластах предсердий человека (hATMyofbs), и это сопровождается увеличением аутофагической активности. Ингибирование аутофагии или нокаут *ATG7* и *ATG5* снижало фиброзный эффект TGF- β 1, что подтверждает тесную взаимосвязь процесса дифференцировки и аутофагии [48].

HTT (huntingtin), кодирующий белок гентинтин, который, по-видимому, играет несколько ролей в регулировании динамики аутофагии, также был более экспрессирован в сенесцентных МСК. Взаимодействуя с моторным белком

микротрубочек динеином, Htt участвует в транспортировке аутофагосом вдоль микротрубочек. Кроме того, показано, что Htt после посттрансляционной модификации может участвовать в регуляции аутофагии, так как присутствие в клетке укороченной формы Htt ассоциируется с повышением уровня LC3-II и сопровождается увеличением аутофагии [49].

В МСК при репликативном старении увеличивалась транскрипция гена *BCL2L1* (BCL2-like 1) антиапоптотического белка Bcl-xl. Участие этого белка показано не только в апоптотическом процессе, но и аутофагии [50]. Длительное культивирование МСК приводило к увеличению экспрессии гена *FADD* (Fas (TNFRSF6)-associated via death domain). Кроме участия в апоптозе, *FADD* также играет роль в других процессах, включая пролиферацию клеток и регуляцию клеточного цикла. В эксперименте с нормальными эпителиальными клетками, экспрессирующими *FADD*, в ответ на провоспалительную активацию, было показано присутствие в цитоплазме многочисленных мембраносвязанных везикул, характерных для аутофагии, при этом детектировалась агрегация LC3 в ответ на FADD-DD, которая начиналась до проявления морфологических признаков гибели клеток [51].

Анализируя группу генов, относящихся к процессам инициации аутофагии, следует отметить повышенную транскрипцию генов *ATG9A* (ATG9 autophagy related 9 homolog A) и *ULK1* (Unc-51-like kinase 1) в культурах МСК 21–24 пассажа. В клетках млекопитающих Atg9a-содержащая везикула участвует в доставке к месту инициации или фагофору и контролируется комплексами *ULK1/2*, являющимся первым иницирующим сборку омегасомы событием [52].

Наряду с увеличенной экспрессией генов регуляции и инициации аутофагии, культивирование МСК до репликативного старения вызывало увеличение мРНК гена *CLN3* (ceroid-lipofuscinosis, neuronal 3), входящего в группу созревания аутофагосом. Подтверждено, что белок *CLN3* присутствует в аутофагосомах и аутолизосомах, и потеря его функциональной активности тормозит созревание деградационных аутолизосом [53].

Длительное культивирование увеличивало транскрипцию *GABARAPL1* (gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein - like 1), кодирующего убиквитин-подобный модификатор. Этот высококонсервативный белок участвует в образовании аутофагосомальных вакуолей на поздней стадии созревания. При сниженной продукции данного белка процессы аутофагии ослабевают, а количество лизосом уменьшается [54].

В стареющих МСК отмечался повышенный уровень мРНК генов лизосомальных фермен-

тов, таких как *CTSD* (cathepsin D) и *GAA* (glucosidase, alpha; acid). Показано, что высокая экспрессия CatD в клетках HeLa значительно активировала аутофагию. Предполагают, что CatD может функционировать как антиапоптотический медиатор, вызывая аутофагию при клеточном стрессе [55].

Транскрипция гена фермента тканевой транслгутаминазы 2 (*TGM2*) в сенесцентных МСК была снижена. Известно, что этот фермент накапливается до высоких уровней в клетках в стрессовых условиях. Однако отмечается, что отсутствие экспрессии транслгутаминазы 2 как *in vivo*, так и *in vitro* приводит к накоплению LC3 II на преаутофагических везикулах, что указывает на заметную индукцию аутофагии [56].

Таким образом, проведенное исследование позволило выявить изменения в регуляции аутофагии на транскрипционном уровне при репликативном старении МСК. Показана модификация экспрессии ряда генов, которая может указывать на усиление деградационной активности клетки. Отмечено увеличение объема лизосомального компартмента. Отсутствие пролиферации не позволяет уменьшить количество поврежденных и неразлагаемых структур путем их разделения между дочерними клетками. В этом случае активация транскрипционных механизмов, запускающих аутофагию, выглядит логичным шагом. Обнаружено изменение экспрессии генов, ассоциированных с ростом аутофагосомной мембраны, созреванием аутофагосом и регуляцией аутофагии. Однако в сенесцентных клетках рост количества поврежденных структур происходит быстрее, чем их деградация. Использование для культивирования физиологической гипоксии позволяло снизить количество лизосом, что может быть ассоциировано с уменьшением внутриклеточных повреждений. Тем не менее на транскрипционном уровне значительных модификаций обнаружено не было. Длительное культивирование МСК в условиях с различным содержанием кислорода приводит к однотипным изменениям экспрессии генов, ассоциированных с аутофагией.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (19-015-00150-А).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chan, R. W. S., Schwab, K. E., and Gargett, C. E. (2004) Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells, *Biol. Reprod.*, **70**, 1738-1750, doi: 10.1095/biol-reprod.103.024109.
2. Trounson, A., and McDonald, C. (2015) Stem cell therapies in clinical trials: progress and challenges, *Cell Stem Cell*, **17**, 11-22, doi: 10.1016/j.stem.2015.06.007.
3. Caplan, A. I. (2009) Why are MSCs therapeutic? New data: new insight, *J. Pathol.*, **217**, 318-324, doi: 10.1002/path.2469.
4. Hodgkinson, C. P., Bareja, A., Gomez, J. A., and Dzau, V. J. (2016) Emerging concepts in paracrine mechanisms in regenerative cardiovascular medicine and biology, *Circ. Res.*, **118**, 95-107, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.305373.
5. Gornostaeva, A., Andreeva, E., and Buravkova, L. (2016) Factors governing the immunosuppressive effects of multipotent mesenchymal stromal cells *in vitro*, *Cytotechnology*, **68**, 565-577, doi: 10.1007/s10616-015-9906-5.
6. Lunyak, V. V., Amaro-Ortiz, A., and Gaur, M. (2017) Mesenchymal stem cells secretory responses: senescence messaging secretome and immunomodulation perspective, *Front. Genet.*, **8**, 220-240, doi: 10.3389/fgene.2017.00220.
7. Turinetto, V., Vitale, E., and Giachino, C. (2016) Senescence in human mesenchymal stem cells: functional changes and implications in stem cell-based therapy, *Int. J. Mol. Sci.*, **17**, 1164, doi: 10.3390/ijms17071164.
8. Li, Y., Wu, Q., Wang, Y., Li, L., Bu, H., and Bao, J. (2017) Senescence of mesenchymal stem cells, *Int. J. Mol. Med.*, **39**, 775-782, doi: 10.3892/ijmm.2017.2912.
9. Ratushnyy, A., Ezdakova, M., and Buravkova, L. (2020) Secretome of senescent adipose-derived mesenchymal stem cells negatively regulates angiogenesis, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 1802-1817, doi: 10.3390/ijms21051802.
10. Morgunova, G. V., Klebanov, A. A., and Khokhlov, A. N. (2016) Some remarks on the relationship between autophagy, cell aging, and cell proliferation restriction, *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.*, **71**, 207-211, doi: 10.3103/S0096392516040088.
11. Ma, Y., Qi, M., An, Y., Zhang, L., Yang, R., Doro, D. H., Liu, W., and Jin, Y. (2018) Autophagy controls mesenchymal stem cell properties and senescence during bone aging, *Aging Cell*, **17**, 12709, doi: 10.1111/acer.12709.
12. Rastaldo, R., Vitale, E., and Giachino, C. (2020) Dual role of autophagy in regulation of mesenchymal stem cell senescence, *Front. Cell Dev. Biol.*, **8**, 276-282, doi: 10.3389/fcell.2020.00276.
13. Chang, T. C., Hsu, M. F., and Wu, K. K. (2015) High glucose induces bone marrow-derived mesenchymal stem cell senescence by upregulating autophagy, *PLoS One*, **10**, e0126537, doi: 10.1371/journal.pone.0126537.
14. Zheng, Y., Hu, C. J., Zhuo, R. H., Lei, Y. S., Han, N. N., and He, L. (2014) Inhibition of autophagy alleviates the senescent state of rat mesenchymal stem cells during long-term culture, *Mol. Med. Rep.*, **10**, 3003-3008, doi: 10.3892/mmr.2014.2624.
15. Liu, F., Lee, J. Y., Wei, H., Tanabe, O., Engel, J. D., Morrison, S. J., and Guan, J.-L. (2010) FIP200 is required for the cell-autonomous maintenance of fetal hematopoietic stem cells, *Blood*, **116**, 4806-4814, doi: 10.1182/blood-2010-06-288589.
16. Ou, X., Lee, M. R., Huang, X., Messina-Graham, S., and Broxmeyer, H. E. (2014) SIRT1 positively regulates autophagy and mitochondria function in embryonic stem cells under oxidative stress, *Stem Cells*, **32**, 1183-1194, doi: 10.1002/stem.1641.
17. García-Prat, L., Martínez-Vicente, M., Perdiguero, E., Ortet, L., Rodríguez-Ubreva, J., Rebollo, E., Ruiz-Bonilla, V., Gutarra, S., Ballestar, E., Serrano, A. L., Sandri, M., and Muñoz-Cánoves, P. (2016) Autophagy maintains stemness by preventing senescence, *Nature*, **529**, 37-42, doi: 10.1038/nature16187.
18. Herberg, S., Shi, X., Johnson, M. H., Hamrick, M. W., Isales, C. M., and Hill, W. D. (2013) Stromal cell-derived factor-1beta mediates cell survival through enhancing autophagy in bone marrow-derived mesenchymal stem cells, *PLoS One*, **8**, e58207, doi: 10.1371/journal.pone.0058207.
19. Lu, J., Li, Z., Wu, X., Chen, Y., Yan, M., Ge, X., and Yu, J. (2019) iRoot BP Plus promotes osteo/odontogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells via MAPK pathways and autophagy, *Stem Cell Res. Ther.*, **10**, 222-235, doi: 10.1186/s13287-019-1345-3.
20. Ceccariglia, S., Cargnoni, A., Silini, A. R., and Parolini, O. (2020) Autophagy: a potential key contributor to the therapeutic action of mesenchymal stem cells, *Autophagy*, **16**, 28-37, doi: 10.1080/15548627.2019.1630223.
21. Kang, C., Xu, Q., Martin, T. D., Li, M. Z., Demaria, M., Aron, L., Lu, T., Yankner, B. A., Campisi, J., and Elledge, S. J. (2015) The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4, *Science*, **349**, 5612, doi: 10.1126/science.aaa5612.
22. Kang, C., and Elledge, S. J. (2016) How autophagy both activates and inhibits cellular senescence, *Autophagy*, **12**, 898-899, doi: 10.1080/15548627.2015.1121361.
23. Ratushnyy, A., Lobanova, M., and Buravkova, L. B. (2017) Expansion of adipose tissue-derived stromal cells at "physiologic" hypoxia attenuates replicative senescence, *Cell Biochem. Funct.*, **35**, 232-243, doi: 10.1002/cbf.3267.
24. Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., Benhaim, P., Lorenz, H. P., and Hedrick, M. H. (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies, *Tissue Eng.*, **7**, 211-228, doi: 10.1089/107632701300062859.
25. Buravkova, L. B., Grinakovskaya, O. S., Andreeva, E. R., Zhambalova, A. P., and Kozionova, M. P. (2009) Characteristics of mesenchymal stromal cells from human lipoaspirate cultivated at decreased oxygenation, *Tsitologiya*, **51**, 5-11, doi: 10.1134/S1990519X09010039.
26. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. J., and Horwitz, E. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement, *Cytotherapy*, **8**, 315-317, doi: 10.1080/14653240600855905.
27. Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, *Methods*, **25**, 402-408, doi: 10.1006/meth.2001.1262.
28. Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., et al. (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 9363-9367, doi: 10.1073/pnas.92.20.9363.
29. Campisi, J., and d'Adda di Fagagna, F. (2007) Cellular senescence: when bad things happen to good cells, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 729-740, doi: 10.1038/nrm2233.

30. Fehrer, C., Brunauer, R., Laschober, G., Unterluggauer, H., Reitingger, S., Kloss, F., Gully, C., Gassner, R., and Lepperdinger, G. (2007) Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan, *Aging Cell*, **6**, 745-757, doi: 10.1111/j.1474-9726.2007.00336.x.
31. Mathew, S. A., Rajendran, S., Gupta, P. K., and Bhone, R. (2013) Modulation of physical environment makes placental mesenchymal stromal cells suitable for therapy, *Cell Biol. Int.*, **37**, 1197-1204, doi: 10.1002/cbin.10154.
32. Valorani, M. G., Montelatici, E., Germani, A., Biddle, A., D'Alessandro, D., Strollo, R., Patrizi, M. P., Lazzari, L., Nye, E., Otto, W. R., Pozzilli, P., and Alison, M. R. (2012) Pre-culturing human adipose tissue mesenchymal stem cells under hypoxia increases their adipogenic and osteogenic differentiation potentials, *Cell Prolif.*, **45**, 225-238, doi: 10.1111/j.1365-2184.2012.00817.x.
33. Pilgaard, L., Lund, P., Duroux, M., Fink, T., Ulrich-Vinther, M., Søballe, K., and Zachar, V. (2009) Effect of oxygen concentration, culture format and donor variability on *in vitro* chondrogenesis of human adipose tissue-derived stem cells, *Regen. Med.*, **4**, 539-548, doi: 10.2217/rme.09.28.
34. Choi, J. R., Pinguan-Murphy, B., Wan Abas, W. A., Yong, K. W., Poon, C. T., et al. (2015) *In situ* normoxia enhances survival and proliferation rate of human adipose tissue-derived stromal cells without increasing the risk of tumorigenesis, *PLoS One*, **10**, e0115034, doi: 10.1371/journal.pone.0115034.
35. Mohyeldin, A., Garzón-Muñdi, T., Quiñones-Hinojosa, A. (2010) Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche, *Cell Stem Cell*, **7**, 150-161, doi: 10.1016/j.stem.2010.07.007.
36. Reeg, S., and Grune, T. (2015) Protein oxidation in aging: does it play a role in aging progression? *Antioxid. Redox. Signal.*, **23**, 239-255, doi: 10.1089/ars.2014.6062.
37. Kurz, D. J., Decary, S., Hong, Y., and Erusalimsky, J. D. (2000) Senescence-associated (Beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells, *J. Cell Sci.*, **113**, 3613-3622, PMID: 11017877.
38. Gómez-Sintes, R., Ledesma, M. D., and Boya, P. (2016) Lysosomal cell death mechanisms in aging, *Ageing Res Rev.*, **32**, 150-168, doi: 10.1016/j.arr.2016.02.009.
39. Bertolo, A., Baur, M., Guerrero, J., Pötzel, T., and Stoyanov, J. (2019) Autofluorescence is a reliable *in vitro* marker of cellular senescence in human mesenchymal stromal cells, *Sci. Rep.*, **9**, 2074-2088, doi: 10.1038/s41598-019-38546-2.
40. Brunk, U. T., and Terman, A. (2002). Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function, *Free Radic. Biol. Med.*, **33**, 611-619, doi: 10.1016/s0891-5849(02)00959-0.
41. Rodier, F., and Campisi, J. (2011) Four faces of cellular senescence, *J. Cell Biol.*, **192**, 547-556, doi: 10.1083/jcb.201009094.
42. Legzdina, D., Romanauska, A., Nikulshin, S., Kozlovska, T., and Berzins, U. (2016) Characterization of senescence of culture-expanded human adipose-derived mesenchymal stem cells, *Int. J. Stem Cells*, **9**, 124-136, doi: 10.15283/ijsc.2016.9.1.124.
43. Ratushnyy, A. Y., Rudimova, Y. V., and Buravkova, L. B. (2019) Alteration of hypoxia-associated gene expression in replicatively senescent mesenchymal stromal cells under physiological oxygen level, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 263-271, doi: 10.1134/S0006297919030088.
44. Korovilaa, I., Hugoa, M., Castroa, J. P., Webera, D., Höhna, A., Grunea, T., and Junga, T. (2017) Proteostasis, oxidative stress and aging, *Redox Biol.*, **13**, 550-567, doi: 10.1016/j.redox.2017.07.008.
45. Yang, M., Wen, T., Chen, H., Deng, J., Yang, C., and Zhang, Z. (2018) Knockdown of insulin-like growth factor 1 exerts a protective effect on hypoxic injury of aged BM-MSCs: role of autophagy, *Stem Cell Res. Ther.*, **9**, 284-301, doi: 10.1186/s13287-018-1028-5.
46. Kovaleva, O. V., Shitova, M. S., and Zborovskaya, I. B. (2014) Autophagy: the cell death or a manner of survival? *Klinich. Onkogematologiya*, **7**, 103-113.
47. Zhang, M., Du, Y., Lu, R., Shu, Y., Zhao, W., et al. (2016). Cholesterol retards senescence in bone marrow mesenchymal stem cells by modulating autophagy and ROS/P53/P21Cip1/Waf1 pathway, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2016**, 7524308, doi: 10.1155/2016/7524308.
48. Ghavami, S., Cunnington, R. H., Gupta, S., Yeganeh, B., Filomeno, K. L., Freed, D. H., Chen, S., Klonisch, T., Halayko, A. J., Ambrose, E., Singal, R., and Dixon, I. M. C. (2015) Autophagy is a regulator of TGF- β 1-induced fibrogenesis in primary human atrial myofibroblasts, *Cell Death Dis.*, **6**, 1696, doi: 10.1038/cddis.2015.36.
49. Martin, D. D. O., Ladha, S., Ehrnhoefer, D. E., and Hayden, M. R. (2015) Autophagy in Huntington disease and huntingtin in autophagy, *Trends. Neurosci.*, **38**, 26-35, doi: 10.1016/j.tins.2014.09.003.
50. Zhou, F., Yang, Y., and Xing, D. (2011) Bcl-2 and Bcl-xL play important roles in the crosstalk between autophagy and apoptosis, *FEBS J.*, **278**, 403-413, doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07965.x.
51. Thorburn, J., Moore, F., Rao, A., Barclay, W. W., Thomas, L. R., Grant, K. W., Cramer, S. D., and Thorburn, A. (2005) Selective inactivation of a Fas-associated death domain protein (FADD)-dependent apoptosis and autophagy pathway in immortal epithelial cells, *Mol. Biol. Cell*, **16**, 1189-1199, doi: 10.1091/mbc.e04-10-0906.
52. Judith, D., Jefferies, H. B. J., Boeing, S., Frith, D., Snijders, A. P., and Tooze, S. A. (2019) ATG9A shapes the forming autophagosome through Arfaptin 2 and phosphatidylinositol 4-kinase III β , *J. Cell Biol.*, **218**, 1634-1652.
53. Chandrachud, U., Walker, M. W., Simas, A. M., Heetveld, S., Petcherski, A., et al. (2015) Unbiased cell-based screening in a neuronal cell model of batten disease highlights an interaction between Ca²⁺ homeostasis, autophagy, and CLN3 protein function, *J. Biol. Chem.*, **290**, 14361-14380, doi: 10.1074/jbc.M114.621706.
54. Boyer-Guittaut, M., Poillet, L., Liang, Q., Bôle-Richard, E., Ouyang, X., et al. (2014) Affiliations expand the role of GABARAP1/GEC1 in autophagic flux and mitochondrial quality control in MDA-MB-436 breast cancer cells, *Autophagy*, **10**, 986-1003, doi: 10.4161/auto.28390.
55. Hah, Y. S., Noh, H. S., Ha, J. H., Ahn, J. S., Hahm, J. R., Cho, H. Y., and Kim, D. R. (2012) Cathepsin D inhibits oxidative stress-induced cell death via activation of autophagy in cancer cells, *Cancer Lett.*, **323**, 208-214, doi: 10.1016/j.canlet.2012.04.012.
56. D'Eletto, M., Farrace, M. G., Falasca, L., Reali, V., Oliverio, S., Melino, G., Griffin, M., Fimia, G. M., and Piacentini, M. (2009) Transglutaminase 2 is involved in autophagosome maturation, *Autophagy*, **5**, 1145-1154.

SENESCENCE AND AUTOPHAGY GENE EXPRESSION IN MESENCHYMAL STROMAL CELLS

A. Ratushnyy*, Y. Rudimova, and L. Buravkova

*Institute of Biomedical Problems (IBMP), Russian Academy of Sciences,
123007 Moscow, Russia; E-mail: ratushkin@mail.ru*

Received July 21, 2020

Revised August 5, 2020

Accepted August 5, 2020

Cell senescence leads to a number of changes in the properties of mesenchymal stromal cells (MSCs). In particular, the number of damaged structures is increased producing negative effect on intracellular processes. Elimination of the damaged molecules and organelles occurs via autophagy that can be important in the context of aging. Cultivation under low oxygen level can be used as an approach for enhancement of MSC therapeutic properties and “slowing down” cell senescence. The goal of this work was to study some morphological and functional characteristics and expression of autophagy-associated genes during replicative senescence of MSCs under different oxygen concentration. The study revealed changes in the regulation of autophagy at the transcriptional level. Upregulation of the expression of autophagosome membrane growth genes *ATG9A* and *ULK1*, of the autophagosome maturation genes *CTSD*, *CLN3*, *GAA*, and *GABARAPL1*, of the autophagy regulation genes *TP53*, *TGFB1*, *BCL2L1*, *FADD*, and *HTT* was shown. These changes were accompanied by downregulation of *IGF1* and *TGM2* expression. Increase of the lysosomal compartment volume was observed in the senescent MSCs that also indicated increase of their degradation activity. The number of lysosomes was decreased following prolonged cultivation under low oxygen concentration (5%). The replicative senescence of MSCs under conditions of different oxygen levels led to the similar modifications in the expression of the autophagy-associated genes.

Keywords: mesenchymal stromal cells, replicative senescence, autophagy, hypoxia