

Санкт-Петербургский Государственный Университет

Биологический факультет

Кафедра Цитологии и гистологии

Грюкова Анастасия Александровна

Старение стволовых клеток человека в контексте mTOR-сигналинга

Магистерская диссертация

Биология

Магистерская программа: Клеточная биология,

цитология, гистология, иммунология

Работа выполнена в Лаборатории

внутриклеточной сигнализации

Института цитологии РАН

Научный руководитель:

к.б.н., доц. Спивак И.М.

Научный консультант:

к.б.н. Бородкина А.В.

Санкт-Петербург

2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	7
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	9
1. Основные понятия о стволовых клетках.....	9
1.1. История открытия стволовых клеток	9
1.2. Свойства и классификация стволовых клеток.....	9
1.3. Мезенхимные стволовые клетки.....	10
1.4. Мезенхимные стволовые клетки человека, выделенные из десквамированного эндометрия	11
2. Клеточное старение.....	13
2.1. История развития представлений о феномене старения клеток	13
2.2. Типы клеточного старения и его признаки.....	14
2.3. Клеточное старение МСК.....	15
2.4. Механизмы, лежащие в основе стресс-индуцированного клеточного старения	15
3. Белок mTOR и его регуляция.....	17
3.1. История открытия mTOR	17
3.2. Доменная структура белка mTOR	18
3.3. Комплексы киназы mTOR.....	19
3.4. Регуляция mTOR сигналинга	21
4. Функциональная роль mTOR в клетке.....	24
4.1. Контроль над синтезом белка в клетке комплексом mTORC1	25
4.2. Регуляция аутофагии комплексом mTORC1	26
4.3. Роль mTOR в старении	27
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	30
1. Клеточная линия и особенности культивирования клеток	30
2. Моделирование окислительного стресса и условия обработки клеток	30
3. Оценка жизнеспособности клеток методом МТТ	30
4. Электрофорез и иммуноблотинг.....	31

4.1. Приготовление проб для электрофоретического разделения	31
4.2. Электрофорез белков в полиакриламидном геле	31
4.3. Иммуноблоттинг со специфическими антителами.....	31
5. Метод проточной цитофлуориметрии.....	32
5.1. Анализ изменения размера и количества клеток	32
5.2. Измерение уровня внутриклеточных АФК.....	33
6. Выявление активности SA-β-Gal	33
7. Используемые реактивы и ингибиторы.....	33
8. Статистическая обработка данных	33
РЕЗУЛЬТАТЫ	34
1. Выявление роли mTORC1 в H ₂ O ₂ -индуцированном старении эМСК.....	34
1.1. Выявление эффектов рапамицина на жизнеспособность клеток и на активность компонентов mTORC1 сигнального пути в H ₂ O ₂ -обработанных эМСК	34
1.2. Оценка влияния ингибирования mTORC1 на пролиферативный статус стареющих эМСК и активность p53/p21/Rb сигнального пути	35
1.3. Исследование эффектов рапамицина на фенотип старения клеток и уровень внутриклеточных АФК в H ₂ O ₂ -обработанных эМСК.....	36
2. Влияние mTOR на Raf/MEK/ERK/p90RSK сигнальный путь в стареющих эМСК.....	38
3. Влияние АКТ киназы на mTORC1 сигнальный путь и ее роль в преждевременном старении эМСК	39
3.1. Установление роли АКТ киназы в регуляции mTORC1 пути при преждевременном старении эМСК.....	40
3.2. Исследование характера изменения основных признаков старения H ₂ O ₂ -обработанных эМСК в условиях ингибирования АКТ.....	40
3.3. Анализ пролиферативного статуса клеток и активности p53/p21/Rb сигнального пути в H ₂ O ₂ -обработанных эМСК при действии LY	41
4. Роль белка ERK1/2 в регуляции mTORC1 сигнального пути при стресс-индуцированном старении эМСК.....	42
4.1. Выявление эффектов U0126 на активность mTORC1 сигнального пути в H ₂ O ₂ -обработанных клетках	42
4.2. Оценка маркеров преждевременного старения клеток в условиях ингибирования активности ERK1/2.....	43
5. Изучение роли АМПК в регуляции mTORC1 пути в процессе H ₂ O ₂ -индуцированного старения эМСК	45

ОБСУЖДЕНИЕ	48
ВЫВОДЫ.....	56
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	57
БЛАГОДАРНОСТИ	73

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АТФ – аденозинтрифосфат
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- МСК – мезенхимные стволовые клетки
- СК – стволовые клетки
- ССК – соматические стволовые клетки
- ЭГДА – этиленгликоль бис (бета-аминоэтил эфир)-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты
- ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
- эмСК – мезенхимные стволовые клетки эндометрия
- ЭСК – эмбриональные стволовые клетки
- АМПК – AMP (adenosine monophosphate) kinase
- АТМ - ataxia teleangiectasia mutated
- BSA – бычий сывороточный альбумин
- CD – кластер дифференцировки
- Chk2 – checkpoint kinase 2
- DDR – DNA (Deoxyribonucleic acid) damage response, ответ на повреждение ДНК
- DMEM – питательная среда Игла в модификации Дюльбекко
- DMSO – диметилсульфоксид
- ERK – extracellular signal regulated kinase
- FAT - FRAP-АТМ-TRRAP
- FATC - FAT C-терминальный домен
- FRB (FKBP12/rapamycin-binding) – FKBP12/рапамицин-связывающий домен
- FS – прямое светорассеяние
- GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа
- H₂O₂ – перекись водорода
- KD – киназный домен
- МАРК – mitogen-activated protein kinase
- MDM-2 – mouse double minute 2
- МЕК – МАРК/ERK kinase
- МК-2 – МАРКАРК-2 – MAP kinase-activated protein kinase-2
- МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид
- PBS – фосфатно-солевой буфер
- PI – йодистый пропиций
- PI3K – фосфотидилинозитол-3-киназы
- PIKK - киназы, подобные фосфотидилинозитол-3-киназам

PMSF – фенилметилсульфонилфторид

Rb – белок ретинобластомы

RSK – ribosomal S6 kinase

SA- β -Gal – ассоциированная со старением β -галактозидаза

SDS – додецилсульфат натрия

TTBS – фосфатно-солевой буфер с Tween 20

ВВЕДЕНИЕ

Эндометриальные мезенхимные стволовые клетки (эМСК) впервые были обнаружены в десквамированном эндометрии, содержащемся в менструальной крови, в 2007 году (Meng et al., 2007). Показано, что эМСК обладают рядом существенных преимуществ по сравнению с мезенхимными стволовыми клетками (МСК), полученными из других источников, важнейшими из которых являются сохранение стабильного кариотипа и высокой пролиферативной активности при длительном культивировании, способность дифференцироваться в 9 типов клеток трех зародышевых листков, а также не инвазивный и не травматичный для пациента способ их изоляции. Эти особенности делают эМСК привлекательным объектом для использования в заместительной клеточной терапии, и в настоящее время уже есть сообщения о положительных результатах трансплантации эМСК людям, страдающим такими заболеваниями, как рассеянный склероз, мышечная дистрофия Дюшена и сердечная недостаточность (Zhong et al., 2009; Ichim et al., 2010; Vockeria et al., 2013; Ulrich et al., 2013). Известно, что развитие многих заболеваний, для которых описано успешное применение эМСК, сопровождается локальным окислительным стрессом (Agarwal et al., 2005; Di Filippo et al., 2006; Tsutsui et al., 2011; Terrill et al., 2013), следовательно, после трансплантации эМСК могут оказаться в неблагоприятном микроокружении. В связи с этим изучение ответов эМСК на окислительный стресс может моделировать реальные ситуации, возникающие в процессе трансплантации этих клеток при лечении различных заболеваний. Наряду с такими широко распространенными реакциями МСК на стрессовые воздействия, как временная остановка клеточного цикла, репарация повреждений и апоптоз, в последнее время активно исследуется феномен преждевременного старения клеток (Wang, Jang, 2009; Brandl et al., 2011b; Kim et al., 2011; Alekseenko et al., 2012; Smielova et al., 2012; Ko et al., 2012; Larsen et al., 2012; Burova et al., 2013). Существенным является то, что стареющие МСК, оставаясь метаболически активными, находятся в состоянии необратимого ареста клеточного цикла и, соответственно, утрачивают способность регенерировать поврежденные ткани. Эти факты подчеркивают необходимость исследования механизмов, лежащих в основе преждевременного старения стволовых клеток. Основной пул данных о преждевременном старении МСК в условиях окислительного стресса получен на МСК, выделенных из костного мозга и пуповинной крови. Важно подчеркнуть, что до недавнего времени в литературе полностью отсутствовали сведения о стресс-индуцированном старении эМСК. Однако в 2013 году сотрудниками нашего отдела было убедительно продемонстрировано, что в условиях сублетального окислительного стресса эМСК подвергаются преждевременному старению, которое сопровождается соответствующими

фенотипическими изменениями клеток и необратимой потерей пролиферации (Burova et al., 2013). При исследовании механизма, лежащего в основе стресс-индуцированного старения эМСК, мы обнаружили, что в H₂O₂-обработанных клетках активируются p53/p21/Rb и p38 MAPK сигнальные каскады (Vorodkina et al., 2014). На основании литературных данных мы предположили, что mTORC1 путь также может быть вовлечен в развитие преждевременного старения эМСК. Таким образом, в настоящей работе представлялось важным изучить роль mTORC1 и его основных регуляторов в процессе H₂O₂-индуцированного старения эМСК.

Цель: исследование роли mTORC1 сигнального пути в регуляции H₂O₂-индуцированного старения эндометриальных стволовых клеток человека.

Задачи:

1. Выявление эффектов рапамицина на активность компонентов mTORC1 сигнального пути в H₂O₂-обработанных эМСК
2. Оценка влияния ингибирования mTORC1 на пролиферативный статус, активность p53/p21/Rb сигнального пути и фенотип стареющих эМСК
3. Анализ влияния mTORC1 на Raf/MEK/ERK/p90RSK сигнальный каскад в H₂O₂-обработанных эМСК
4. Установление роли АКТ киназы в регуляции mTORC1 пути при преждевременном старении эМСК
5. Исследование характера изменения основных признаков старения H₂O₂-обработанных эМСК и активности p53/p21/Rb сигнального пути в условиях ингибирования АКТ
6. Выявление роли ERK1/2 в регуляции mTORC1 пути при стресс-индуцированном старении эМСК
7. Оценка маркеров преждевременного старения эМСК в условиях ингибирования активности ERK1/2
8. Изучение роли АМПК в регуляции mTORC1 пути в процессе H₂O₂-индуцированного старения эМСК

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. Основные понятия о стволовых клетках

1.1. История открытия стволовых клеток

Открытие понятия и появление термина «стволовая клетка» связаны с именем русского ученого-гистолога А.А. Максимова, который в своей статье 1909 года высказал предположение, что в нашем организме пожизненно сохраняются недифференцированные клетки, способные превращаться в специализированные клетки крови и соединительной ткани (Maximow, 1909). Однако лишь в 1961 году Тилл и Маккалоч получили первые экспериментальные доказательства существования стволовых клеток (СК). Оказалось, что после введения взвеси донорского костного мозга смертельно облученным мышам через 1-2 недели у них формировались макроскопические колонии пролиферирующих клеток (Till, McCulloch, 1961). В 1963 году этими же исследователями совместно с А. Бекером было продемонстрировано, что каждая такая колония представляет собой клон – потомство одной клетки (Becker et al., 1963). Чуть позднее российские ученые А.Я. Фриденштейн и И.Л. Чертков описали существование двух видов СК в костном мозге – гемопоэтических, являющихся предшественниками всех типов клеток крови, и стромальных (мезенхимных) стволовых клеток (Чертков, Фриденштейн, 1977). Позже другими авторами были получены эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) мыши из внутренней клеточной массы бластоцисты (Evans, Kaufman, 1981), а также выделено 5 бессмертных линий ЭСК из эмбриобласта бластоцисты человека (Thomson et al., 1998). В настоящее время изучение стволовых клеток является одним из самых перспективных направлений науки.

1.2. Свойства и классификация стволовых клеток

Согласно одному из определений, стволовые клетки представляют собой группу клеток-предшественников, обладающих способностью к самообновлению и дифференцировке в специализированные ткани. Самообновление, или самоподдержание, – способность одной (при ассиметричном делении) или обеих (при симметричном делении) дочерних клеток полностью воспроизводить свойства материнской, что позволяет СК сохранять пролиферативный потенциал на протяжении всей жизни организма. Дифференцировка – это процесс специализации клеток под действием различных стимулов.

На сегодняшний день существует несколько классификаций стволовых клеток, наиболее распространенными из которых являются классификация по способности к дифференцировке и по источнику происхождения. Согласно первой классификации принято выделять следующие типы СК (Wobus, Boheler, 2005):

1. тотипотентные – способны формировать все типы клеток – к ним относятся зигота и бластомеры 2-8 клеточных стадий;

2. плюрипотентные – образуют производные всех трех зародышевых листков (энтодермы, мезодермы, эктодермы) – к ним относятся эмбриональные стволовые клетки, первичные половые клетки и клетки эмбриональных карцином;

3. мультипотентные – клетки, способные дифференцироваться во многие, но не все линии клеток, обычно в пределах одного зародышевого листка;

4. унипотентные – формируют только клетки определенных тканей. Как правило, по происхождению стволовые клетки делят на эмбриональные, первичные половые и соматические клетки.

Разделяют также соматические и эмбриональные стволовые клетки. Соматические СК могут быть либо мультипотентными, либо унипотентными, а эмбриональные стволовые клетки принято относить к плюрипотентным (Fortier, 2005). Соматические стволовые клетки (ССК) являются постнатальными, т.е. их получают после рождения организма. На сегодняшний день ССК обнаружены в большинстве тканей взрослого организма, включая костный мозг, желудочно-кишечный тракт, печень, кожу, головной мозг и др. (Пальцев и др., 2006). В настоящее время большое внимание уделяется изучению свойств мезенхимных стволовых клеток (МСК), являющихся одним из основных типов ССК.

1.3. Мезенхимные стволовые клетки

Основные свойства МСК были установлены еще в конце прошлого века. Во-первых, эти клетки адгезивны к пластику, то есть при культивировании они прикрепляются к поверхности. Во-вторых, МСК обладают клоногенностью, что приводит к формированию колониеобразующих фибробластоподобных единиц из одной СК. Более того, эти клетки могут успешно пролиферировать *in vitro* в присутствии таких митогенов, как основной фактор роста фибробластов-2, эпидермальный фактор роста, инсулиноподобный фактор роста-1 и тромбоцитарный фактор роста (Пальцев и др., 2006). Наиболее распространенный способ идентификации СК на сегодняшний день основан на различиях в экспрессии маркеров клеточной поверхности (CD, cluster of differentiation). Большинство типов МСК не экспрессируют CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45 (маркер лимфоцитов), CD79a, гликофорин-А, а также антигены гистосовместимости HLA-DR. Напротив, у большинства МСК наблюдается экспрессия таких маркеров, как Stro-1 (маркер мезенхимных стволовых клеток), CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 и CD166 (Abdallah et al., 2005; Foster et al., 2005; Dominici et al., 2006; Keating, 2006). Основным источником МСК долгое время оставался костный мозг. Позднее эти клетки были

выделены из скелетной мышцы (Williams et al., 1999), пульпы зуба (Gronthos et al., 2000), пупочного канатика (Erices et al., 2000), жировой ткани (Zuk et al., 2001), периферической крови (Kuznetsov et al., 2001), синовиальной оболочки (De Bari et al., 2001) и амниотической жидкости (Prusa et al., 2003; Tsai et al., 2004). Главной характеристикой МСК является их способность дифференцироваться в трех основных направлениях – в остеобласты, хондроциты и адипоциты (Weissman, 2000). Кроме того, в ряде работ была описана их способность к дифференцировке в клетки не мезенхимальных тканей (Herzog et al., 2003; Wagers, Weissman, 2004; da Silva Meirelles et al., 2006). Подобная трансформация стволовых клеток получила название «пластичности» (Minguell et al., 2001). Было обнаружено, что клетки костного мозга могут образовывать гепатоциты (Petersen et al., 1999), клетки нервной ткани (Mezey et al., 2000) и кардиомиоциты (Orlic et al., 2001), а также способны к миогенезу (Ferrari et al., 1998; Shim et al., 2004). Именно благодаря таким свойствам, как способность к дифференцировке и трансдифференцировке в различные клеточные линии и высокая скорость пролиферации, позволяющая нарастить достаточное количество клеток для трансплантации, МСК привлекают внимание учёных в качестве объекта научных и клинических исследований.

1.4. Мезенхимные стволовые клетки человека, выделенные из десквамированного эндометрия

Эндометрий человека является динамической тканью, претерпевающей около 400 циклов обновления (роста, дифференцировки и отслаивания) в течение репродуктивной жизни женщины (Jabbour et al., 2006; Gargett, 2007). Гистологически человеческий эндометрий подразделяют на два слоя. Базальный слой остается интактным во время менструального цикла, а функциональный почти полностью отслаивается (Padykula, 1991; Patel et al., 2008; Umezawa, Makino, 2008). Ещё более 30 лет назад В.А. Прянишников высказал предположение о существовании в эндометрии популяции резидентных стволовых клеток, ответственных за циклическую регенерацию функционального слоя (Pranishnikov, 1978). Однако первые экспериментальные доказательства этой гипотезы были получены намного позднее. Так, в 2004 году были опубликованы данные, свидетельствующие о наличии в базальном слое эндометрия человека клеток, экспрессирующих поверхностные маркеры стволовых клеток CD117 и CD34 (Cho et al., 2004). В этом же году другие авторы, исследовавшие клоногенность клеток эндометрия, выявили небольшую популяцию активно пролиферирующих и самоподдерживающихся эпителиальных и стромальных клеток в его составе (Chan et al., 2004). В течение последующих 7 лет было опубликовано еще 15 работ, подтверждающих существование резидентных стволовых клеток в человеческом эндометрии (Cervelló et al., 2013). В

подавляющем большинстве исследований по установлению природы этих клеток была продемонстрирована их способность дифференцироваться *in vitro* в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях, а также экспрессия ими специфических поверхностных маркеров (CD73, CD90, CD105), что позволило отнести эти клетки к мезенхимальным. Одним из наиболее распространенных путей получения эндометриальных стволовых клеток является забор биоптата через шейку матки (**рис. 1**). Эта процедура не требует применения анестезии, но, тем не менее, остается инвазивной и травматичной для пациентов. Приняв во внимание, что стволовые клетки были найдены в отслаивающемся функциональном слое матки, ученые предположили, что эти клетки могут также находиться в отторгаемом вместе с менструальной кровью эндометрии (**рис. 1**). Так, в 2007-2008 годах двум группам исследователей независимо друг от друга удалось выделить из десквамированного эндометрия в менструальной крови стволовые клетки, которые сохраняли стабильный кариотип при длительном культивировании (Meng et al., 2007; Patel et al., 2008). Этими авторами были опубликованы данные, свидетельствующие о том, что индекс пролиферации клеток, выделенных из менструальной крови, гораздо выше, чем у стволовых клеток костного мозга и пуповинной крови. Также важной характеристикой этих клеток оказалась их способность дифференцироваться в девять типов клеток всех трех зародышевых листков: мезодерму (остеоциты, хондроциты, миоциты), эктодерму (нейроны, астроциты, клетки эпидермиса) и энтодерму (гепатоциты, панкреатические клетки и клетки дыхательного эпителия) (Meng et al., 2007; Мусина и др., 2008; Patel et al., 2008). Таким образом, в течение последних 7 лет различными группами ученых были получены убедительные доказательства существования мезенхимных стволовых клеток в десквамированном эндометрии менструальной крови человека (эМСК).

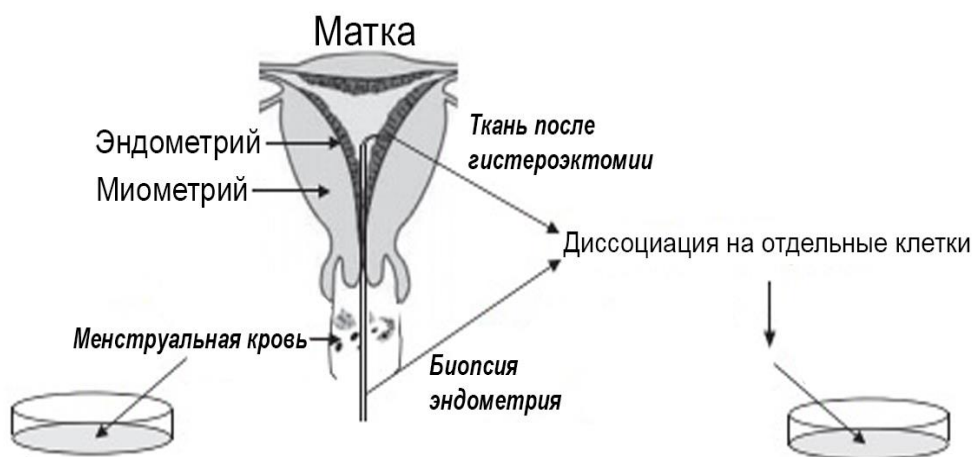


Рис. 1. Способы получения эндометриальных стволовых клеток человека (Gargett et al., 2012).

Несмотря на то что эмСК были обнаружены относительно недавно, уже существуют сведения об их практическом применении. В частности, на моделях экспериментальных животных были получены многообещающие результаты при лечении таких заболеваний, как миопатия Дюшенна (Cui et al., 2007), ишемия нижних конечностей (Murphy et al., 2008), инфаркт миокарда (Hida et al., 2008). Помимо этого, были опубликованы данные о том, что трансплантированные эмСК тормозили рост глиом у крыс (Han et al., 2009). Более того, на сегодняшний день есть несколько сообщений об успешной трансплантации эмСК людям с различными заболеваниями, в том числе с рассеянным склерозом (Zhong et al., 2009), мышечной дистрофией Дюшенна (Ichim et al., 2010), синдромом Ашермана (Nagori et al., 2011) и сердечной недостаточностью (Vokeria et al., 2013). В заключение, представляется важным подчеркнуть преимущества эмСК, дающих основания для разностороннего изучения этого нового типа клеток: (1) не инвазивный и легкодоступный способ получения, (2) высокий индекс пролиферации, (3) сохранение стабильного кариотипа при длительном культивировании, (4) успешное применение в терапии экспериментальных животных и (5) перспективные результаты клинического применения на людях.

2. Клеточное старение

2.1. История развития представлений о феномене старения клеток

Еще в XIX веке А. Вейсманом было выдвинуто предположение, что в основе механизма запрограммированного старения лежит ограничение числа делений соматических клеток. Однако экспериментальные доказательства этой гипотезы были получены лишь в середине XX века, когда Л. Хейфлик обнаружил, что клетки в культуре стареют после прохождения ими определенного количества удвоений. Данный феномен получил название лимита Хейфлика (Hayflick, Moorhead, 1961). Значительно позднее Оловников предположил, что в основе клеточного старения лежит концевая недорепликация хромосом, а именно укорочение 5'-концевой дочерней цепи ДНК (Olovnikov, 1973). Подтверждение теории Оловникова было получено Элизабет Блэкберн, открывшей нуклеотидную последовательность и структуру теломер инфузории *Tetrahymena thermophila* в 1978 году (Blackburn, Gall, 1978). Теломеры – высокоспециализированные гетерохроматиновые структуры, состоящие из ДНК и белка и защищающие концы хромосом эукариотических клеток от повреждений, разрушения, рекомбинации и слипания (Москалев, 2008). Блэкберн установила, что теломеры хромосом *Tetrahymena thermophila* представляют собой повторяющиеся нуклеотидные последовательности (Blackburn, Gall, 1978). В это же время американский ученый Джек

Шостак вводил искусственные последовательности ДНК в клетки дрожжей и наблюдал их постепенную деградацию. Объединив усилия, Шостак и Блэкберн обнаружили, что деградации ДНК не происходит, если к фрагменту ДНК, который вводили в клетки дрожжей, пришить теломерную последовательность инфузории *Tetrahymena thermophila* (Szostak, Blackburn, 1982). Впоследствии Блэкберн и Грэйдер показали, что в клетках инфузорий работает фермент теломеразы, позволяя клетке делиться неограниченное количество раз благодаря своей способности удлинять теломеры, компенсируя таким образом их недорепликацию (Blackburn, Greider, 1985). На сегодняшний день активность теломеразы выявлена в таких типах клеток, как эмбриональные стволовые, половые и раковые клетки, которые обладают способностью к неограниченной пролиферации. В терминально дифференцированных соматических клетках этот фермент отсутствует, следствием чего является укорочение теломер при каждом клеточном делении, приводящее в конечном итоге к старению этих клеток (Wright et al., 1996; Miura et al., 2004).

2.2. Типы клеточного старения и его признаки

Долгое время в биологии господствовало мнение, что единственной причиной клеточного старения является укорочение теломер, возникающее вследствие концевой недорепликации хромосом (Martens et al., 2000; Wright, Shay, 2001; Karlseder et al., 2002). Это легло в основу понятия о репликативном старении, которое сегодня принято рассматривать как явление необратимой потери пролиферативной активности соматическими клетками после прохождения ими определенного числа клеточных делений в соответствии с лимитом Хейфлика. В настоящее время наряду с репликативным выделяют стресс-индуцированную форму клеточного старения, также характеризующуюся блоком клеточного цикла, приводящим к остановке пролиферации. Однако стресс-индуцированное старение может возникать в клетках даже на ранних пассажах в ответ на различные субцитотоксические стрессовые воздействия. Основные признаки репликативного и стресс-индуцированного старения сходны и включают определенные фенотипические изменения (Blagosklonny, 2012). В первую очередь к таким изменениям относятся морфологические – стареющие клетки увеличиваются в размерах, становятся уплощенными и избыточно вакуолизированными (Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007). Другими характерными признаками стареющих клеток являются усиление биогенеза лизосом, что отражается повышением активности ассоциированной со старением β -галактозидазы (SA- β -Gal), отсутствие репликации ДНК и блок клеточного цикла (Dimri et al., 1995; Kurz, 2004; Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007). Несмотря на

необратимую потерю пролиферативного потенциала, стареющие клетки остаются метаболически активными (Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007).

2.3. Клеточное старение МСК

Представляется интересным факт, что в мезенхимных стволовых клетках, несмотря на их стволовую природу, не выявлена экспрессия теломеразы (Zimmermann et al., 2003). Таким образом, МСК характеризуются лимитом Хейфлика и подобно другим нормально пролиферирующим клеткам могут подвергаться репликативному старению (Banfi et al., 2002; Stenderup et al., 2003). Так, опубликованы данные, что при длительном культивировании МСК наблюдается укорочение теломер (Banfi et al., 2002; Baxter et al., 2004), прекращение дифференцировки (Digirolamo et al., 1999), а также повышение β -галактозидазной активности (Stenderup et al., 2003). Более того, в работах последних лет было показано, что МСК человека в условиях сублетального стресса могут подвергаться индуцированному преждевременному старению после повреждения ДНК γ -излучением, теплового шока или окислительного воздействия (Wang, Jang, 2009; Brandl et al., 2011b; Kim et al., 2011; Alekseenko et al., 2012; Smielova et al., 2012; Ko et al., 2012; Larsen et al., 2012; Vurova et al., 2013). Важно отметить, что потеря пролиферативной активности вследствие старения МСК равносильна утрате их способности регенерировать поврежденные ткани, что подчеркивает необходимость изучения механизмов, лежащих в основе этого явления.

2.4. Механизмы, лежащие в основе стресс-индуцированного клеточного старения

Согласно современным представлениям, действие разнообразных стрессовых факторов приводит к повреждению ДНК, вследствие чего происходит запуск каскада внутриклеточных сигнальных событий, называемых ответом на повреждение ДНК (DNA damage response, DDR), и последующая инициация клеточного старения (Ksiazek et al., 2007; Zhan et al., 2010). Одним из ключевых участников ответа на повреждение ДНК является АТМ киназа, которая активирует многочисленные белки-мишени, ответственные за установление блока клеточного цикла (Bakkenist, Kastan, 2004; Zhan et al., 2010). В частности, активированная в результате повреждения ДНК АТМ может фосфорилировать серин-треониновую киназу контрольной точки клеточного цикла Chk2 (checkpoint kinase) по Thr68 (Buscemi et al., 2004). В результате фосфорилирования Chk2 олигомеризуется и автофосфорилируется (Ahn et al., 2004). Далее в таком виде Chk2 транслоцируется в ядро, где активирует свои нижележащие субстраты (Lukas et al., 2003). Другой важной мишенью АТМ является опухолевый супрессор p53. Интересно, что фосфорилирование p53 может осуществляться как напрямую киназой АТМ, так и опосредованно через фосфорилирование Chk2 (von Zglinicki et al., 2005; Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007).

Активированный p53, являясь транскрипционным фактором, взаимодействует с промоторами генов-мишеней, влияя на скорость их транскрипции. Так, связываясь с промотором гена ингибитора циклин-зависимых киназ *p21Waf1/Cip1*, p53 увеличивает уровень его экспрессии и приводит к накоплению белка p21Waf1/Cip1 (p21) (Brown et al., 1997) (рис. 2).

Белок p21 принадлежит к ингибиторам семейства Cip/Kip, которые способны включаться в комплексы циклинов с циклин-зависимыми киназами третьим компонентом и подавлять их активность, регулируя таким образом прохождение клеток по циклу. Известно, что повышенная экспрессия p21 тормозит прохождение клетками S-фазы, в первую очередь, за счет ингибирования комплекса циклина E и циклин-зависимой киназы 2 (Ogryzko et al., 1997) и последующего гипофосфорилирования белка ретинобластомы (Rb) (McConnell et al., 1999; Sherr, Roberts, 1999). В гипофосфорилированном состоянии Rb активна и способна связывать и тем самым инактивировать транскрипционные

факторы семейства E2F, которые ответственны за регуляцию прогрессии клеточного цикла (Sherr, McCormick, 2002). Суммируя представленные литературные сведения, можно заключить, что инициация стресс-индуцированного старения опосредована активацией ответа на повреждение ДНК с последующей передачей сигнала через ATM/Chk2/p53/p21/Rb путь, приводящих к аресту клеточного цикла.

Отдельно стоит подчеркнуть роль p38 MAP киназы в стресс-индуцированном старении клеток. В ходе исследований было установлено, что постоянная активация p38 MAPK способна инициировать преждевременное старение в культуре первичных фибробластов, в то время как подавление киназной активности p38 предотвращает развитие клеточного старения (Wang et al., 2002; Iwasa et al., 2003). Кроме того, было показано, что MAPKAPK-2 (MK-2), мишень

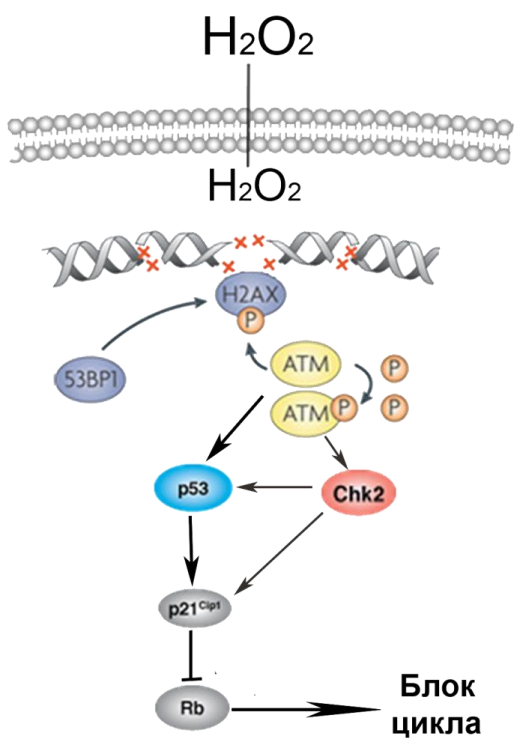


Рис. 2. Активация сигнального каскада ATM/Chk2/p53/p21/Rb в стареющих клетках (Бородкина, 2014, с изменениями).

p38, также играет важную роль и может опосредовать арест клеточного цикла в ответ на повреждение ДНК (Lopez-Aviles et al., 2005; Reinhardt et al., 2007; Reinhardt et al., 2011).

Помимо всего прочего в прогрессию клеточного старения вовлечены внутриклеточные активные формы кислорода (АФК) (Passos et al., 2007b; Lu, Finkel, 2008; Passos et al., 2010). Стареющие клетки характеризуются повышенным уровнем эндогенных АФК (Allen et al., 1999; Hutter et al., 2004; Passos et al., 2007a), который необходим для поддержания DDR в активном состоянии и для стабилизации блока клеточного цикла в процессе развития старения (Passos et al., 2010). Использование различных антиоксидантов, а также овэрэкспрессия ферментов антиоксидантной защиты способствуют частичному предотвращению клеточного старения (Lee et al., 1999; von Zglinicki et al., 2000; Serra et al., 2003; Jung et al., 2004). Известно также, что АФК могут напрямую повреждать ДНК и вызывать тем самым активацию ответа на повреждение ДНК и старение (Chen et al., 1995; Lu, Finkel, 2008; Rai et al., 2008). Более того, основные эффекторы DDR в свою очередь опосредуют продукцию АФК (Polyak et al., 1997; Macip et al., 2002; Macip et al., 2003), образуя «петлю положительной обратной связи», в которой также принимает участие и p38 (Passos et al., 2010).

Особое место в клеточном старении играет киназа mTOR, однако механизмы ее участия в этом процессе до сих пор до конца не ясны. Тем не менее, было показано, что белок mTOR вовлечен в регуляцию ответа на повреждение ДНК и клеточного цикла. Поддержание mTOR в активном состоянии необходимо для экспрессии многих DDR факторов и регуляторов клеточного цикла, в том числе p53 и p21 (Beuvink et al., 2005; Rodriguez-Jimenez et al., 2010; Silvera et al., 2017). Кроме того, mTOR опосредует активацию псевдо-DDR (ответ на повреждение ДНК в отсутствие разрывов ДНК) в стареющих клетках (Pospelova et al., 2009). Интересно, что активность самого mTOR может подавляться белком p53 в ответ на повреждение ДНК, за счет индукции негативных регуляторов mTOR сигналинга (Feng et al., 2005; Budanov, Karin, 2008).

3. Белок mTOR и его регуляция

3.1. История открытия mTOR

Белок mTOR представляет собой серин-треониновую киназу, принимающую участие во многих процессах в клетке, включая клеточный рост и пролиферацию. Интересно, что сначала был обнаружен ингибитор mTOR – рапамицин, а уже потом открыт сам белок. В 1975 году из образца почвы с острова Пасхи (Рапа-Нуи) был изолирован и охарактеризован микроорганизм, обладающий противогрибковой активностью, – *Streptomyces higroscopicus* (Зубова и др., 2012). Из этой бактерии и был выделен антибиотик рапамицин, название которого происходит от наименования острова (Vezina et al., 1975). Сначала рапамицином лечили грибковые заболевания, но вскоре были открыты дополнительные возможности его применения. Оказалось, что рапамицин

подавляет рост опухолей и их метастазирование, а также ослабляет аутоиммунные заболевания и позволяет избежать отторжения при трансплантации (Eng et al., 1984; Bierer et al., 1991; Guba et al., 2002; Sehgal, 2003). Сегодня это соединение используется в качестве иммуносупрессора и химиотерапевтического агента под торговым названием «Сиролимус». Кроме того, свойства рапамицина также оказались полезными для изучения регуляции клеточного роста (Russell et al., 2011). В начале 1990-х гг. с помощью генетического скрининга дрожжей было выявлено два гена, *TOR1* и *TOR2*, мутации в которых уменьшают ингибирующий эффект рапамицина на рост клеток (Heitman et al., 1991; Kunz et al., 1993). Гены *TOR1* и *TOR2* кодируют высокомолекулярные белки TOR1 и TOR2, молекулярный вес которых составляет около 280 кДа (Kunz et al., 1993; Helliwell et al., 1994). Таким образом, белок, активность которого подавляет рапамицин, отвечает за клеточный рост и получил название по наименованию своего ингибитора – TOR – target of rapamycin (мишень рапамицина). Впоследствии был открыт гомолог TOR у млекопитающих – mTOR – mammalian TOR, также известный как FRAP, RAFT, или RAPT (Heitman et al., 1991; Brown et al., 1994; Chiu et al., 1994; Sabatini et al., 1994; Sabers et al., 1995). Стоит отметить, что наличие двух генов *TOR* характерно только для дрожжей, в то время как почти все другие эукариоты, включая растения, червей, мух и млекопитающих, имеют один *TOR* ген (Loewith and Hall, 2011). Несмотря на вариабельность аминокислотных последовательностей, входящих в состав белка TOR различных эукариот, он обладает поразительной функциональной консервативностью (Russell et al., 2011).

3.2. Доменная структура белка mTOR

mTOR представляет собой серин-треониновую протеинкиназу, которая принадлежит к семейству киназ, подобных фосфатидилинозитол 3-киназам (PI3K, PI3 kinase (PIK)-related kinases), и имеет большой вес – 289 кДа. Так же, как и другие члены этого семейства, mTOR содержит С-терминальный киназный домен, который схож с киназным доменом фосфатидилинозитол 3-киназ (PI3K). Кроме того, у mTOR есть многочисленные N-концевые HEAT (huntingtin, elongation factor 3, protein phosphatase 2A, TOR1) повторы, сгруппированные в два блока, каждый из которых содержит приблизительно 40 аминокислот (Groves et al., 1999). HEAT мотивы опосредуют большую часть белок-белковых взаимодействий между mTOR и другими сигнальными белками (Andrade and Bork, 1995). И наконец, в структуру mTOR входят FAT (FRAP, ATM and TTRAP) домен протяженностью примерно в 500 аминокислот, который также есть у других белков семейства PI3K; С-концевой FAT (FATC) домен (~35 аминокислот) и

FKBP12/рапамицин-связывающий FRB (FKBP12/rapamycin-binding) домен, соседствующий с киназным доменом у mTOR (Bosotti et al., 2000; Russell et al., 2011).

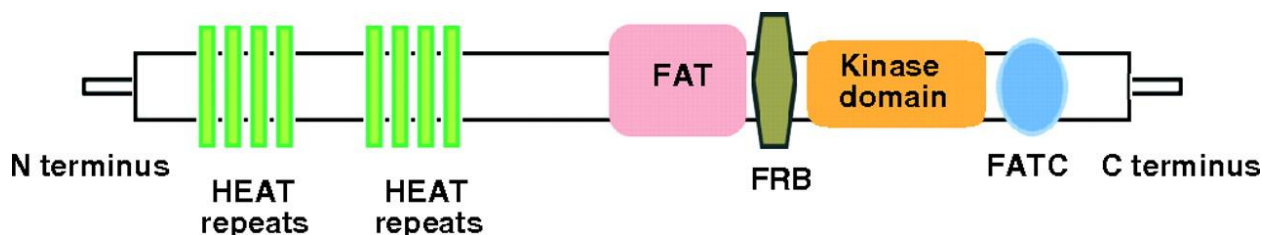


Рис. 3. Доменная структура mTOR (Russell et al., 2011).

3.3. Комплексы киназы mTOR

mTOR – ключевая киназа, регулирующая клеточный метаболизм у млекопитающих, и представляет собой некий активный центр, принимающий и направляющий целый спектр сигналов, вовлеченных в клеточный рост и пролиферацию. В клетке белок mTOR входит в состав двух комплексов – mTORC1 и mTORC2. Основной функцией mTORC1 является инициация трансляции. Кроме того, mTORC1 опосредует ингибирование аутофагии, стимуляцию биогенеза рибосом и продукцию тРНК. mTORC2 регулирует организацию цитоскелета и выживание клеток (Russell et al., 2011).

mTORC1 представляет собой гомодимер. Каждый мономер этого комплекса состоит из следующих субъединиц: mTOR, Raptor (regulatory associated protein of mTOR), PRAS40 (proline-rich AKT substrate 40 kDa), mLST8 (mammalian lethal with Sec-13 protein 8) и Deptor (DEP domain TOR-binding protein) (Takahara et al., 2006; Wang et al., 2006; Zhang et al., 2006; Peterson et al., 2009; Yip et al., 2010). Raptor способствует димеризации mTORC1, напрямую взаимодействуя с HEAT повторами mTOR субъединицы каждого мономера (Hara et al., 2002; Kim et al., 2002; Kim et al., 2008; Sancak et al., 2008; Yip et al., 2010). Субъединица PRAS40 присоединяется к mTORC1 через прямое взаимодействие либо с mTOR, либо с Raptor и ингибирует активность комплекса (Sancak et al., 2007; Vander Haar et al., 2007). mLST8 связывается с киназным доменом mTOR и необходим для стабилизации взаимодействия mTOR с Raptor и функционирования mTOR (Kim et al., 2003). Deptor же взаимодействует с FAT (FRAP, ATM and TTRAP) доменом mTOR и способен подавлять его активность (Peterson et al., 2009).

mTORC2 имеет похожую структуру и общие с mTORC1 субъединицы, включая mTOR, mLST8 и Deptor, а также отличные от mTORC1 компоненты – Rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR), Sin1 (stress-activated protein kinase-interacting protein 1) and Protor (protein-binding Rictor) (Jacinto et al., 2004; Sarbassov et al., 2004; Yang et al., 2006a;

Pearce et al., 2007; Peterson et al., 2009). Rictor содержит консервативные для эукариот домены и взаимодействует с HEAT повторами mTOR. Как Rictor, так и mLST8 необходимы для формирования mTORC2, его каталитической активности и привлечения субстратов (Sarbassov et al., 2004). Sin1 связывается с mTOR через Rictor и способствует присоединению Rictor к mTOR. Sin1 субъединица также требуется для образования комплекса и регулирует киназную активность mTOR (Jacinto et al., 2006). С другой стороны, появились данные о том, что Sin1 опосредует активацию mTORC2 факторами роста через PI3K путь: PIP3 рекрутирует Sin1 к плазматической мембране через PH домен, нарушая его взаимодействие с mTORC2, таким образом активируя комплекс (Liu et al., 2014; Yuan and Guan, 2015). Protor тоже связывается с mTORC2 через Rictor, однако не является необходимым для сборки или каталитической активности комплекса (Pearce et al., 2007). Было показано, что Protor отвечает за взаимодействие комплекса с некоторыми мишенями. Deptor, так же как и в случае с mTORC1, связываясь с FAT доменом, подавляет активность mTORC2 (Peterson et al., 2009).

На дрожжах впервые было показано, что TORC1 чувствителен к рапамицину (Loewith et al., 2002). В клетках эукариот рапамицин взаимодействует с FK506-связывающим белком массой 12 кДа (FKBP12 - FK506-binding protein 12 kDa), известным также как иммунофилин. Образующийся димер связывается с FRB доменом TOR и подавляет его активность за счет аллостерического ингибирования и изменения конформации TOR и TORC1 (Choi et al., 1996; Yang, 2013). В результате комплекс поэтапно диссоциирует, в частности происходит ослабление взаимодействия TOR и Raptor, что может препятствовать фосфорилированию и активации основных мишеней комплекса (Yip et al., 2010; Hare and Harvey, 2017). TORC2, напротив, устойчив к рапамицину, однако стоит отметить, что длительное действие рапамицина способно ингибировать и этот комплекс в некоторых типах клеток (Loewith et al., 2002; Sarbassov et al., 2006). FKBP12-рапамицин оказывает отсроченное влияние на сборку TORC2: связываясь непосредственно с *de novo* синтезированным TOR, препятствует его встраиванию в комплекс, что в конечном итоге приводит к прекращению формирования новых TORC2 комплексов (Russell, 2011).

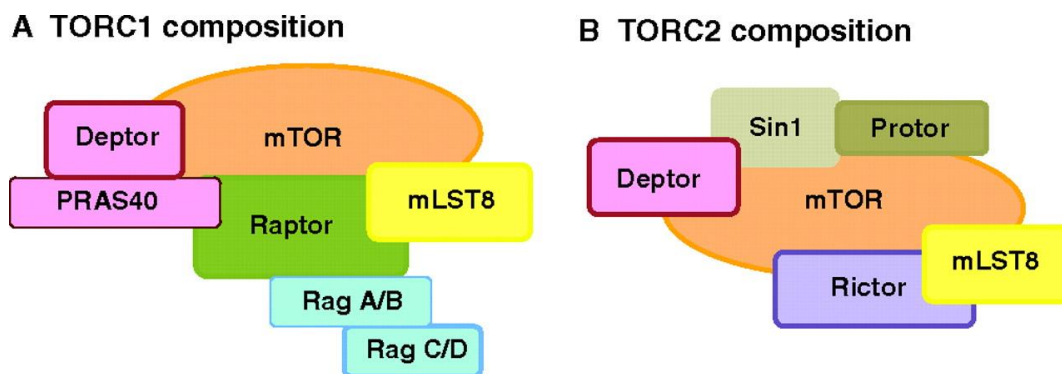


Рис. 4. Состав белковых комплексов mTORC1 и mTORC2 (Russell et al., 2011).

3.4. Регуляция mTOR сигналинга

На сегодняшний день известно множество сигналов, регулирующих mTOR, включая ростовые факторы и уровень АТФ в клетке. Большая часть исследований сосредоточена на сигнальных путях, контролирующих mTORC1, в то время как о регуляции mTORC2 известно немного (Russell et al., 2011).

Ключевым регулятором mTORC1 является комплекс TSC1/2 (tuberous sclerosis complex 1/2), состоящий из белков хамартина и туберина – TSC1 и TSC2, соответственно (Way et al., 2009). Комплекс получил своё название по наименованию синдрома туберозного склероза. Это наследственное заболевание развивается вследствие мутаций генов *tsc1* и *tsc2*, вызывающих опухолеобразование во многих органах и тканях. Туберин содержит С-концевой домен GAP и является белком, активирующим ГТФазу (GAP, GTPase activating protein), а хамартин стабилизирует комплекс. Основной мишенью TSC-комплекса является малая ГТФаза Rheb (Ras homolog enriched in brain), которую TSC1/2 переводит в неактивную GDP-связанную форму из активной GTP-связанной за счёт своей GAP активности. При достаточном количестве питательных веществ, поступающих в клетку, TSC1/2 комплекс неактивен и таким образом позволяет Rheb-GTP активировать mTORC1 (Garami et al., 2003; Inoki et al., 2003a; Tee et al., 2003). Для активации mTORC1 важна его лизосомальная локализация. Предполагается, что фосфорилирование TSC-комплекса вызывает диссоциацию mTORC1 с лизосом и тем самым изолирует от Rheb (Zheng et al., 2014).

К важнейшим регуляторам mTORC1 относится также серин-треониновая протеинкиназа АКТ. АКТ является мишенью фосфатилилинозитол-3-киназы (PI3K, phosphatidylinositol-3-kinase). Получая сигналы от инсулина и факторов роста, PI3K-АКТ сигнальный путь осуществляет всесторонний контроль над активностью mTORC1.

Существует три класса PI3 киназ – I, подразделяющийся на субтипы А и В, II и III классы, каждому из которых присуща своя субстратная специфичность и липидные продукты. У млекопитающих класс I наиболее хорошо изучен и есть во всех типах клеток, поэтому далее под PI3К будет иметься в виду киназа, относящаяся именно к этому классу, а точнее к субтипу А. PI3 киназы класса IA представляют собой гетеродимеры, состоящие из двух субъединиц – регуляторной p85 и каталитической p110, массой 85 кДа и 110 кДа, соответственно (Zhao and Vogt, 2010). Они могут активироваться как рецепторами с тирозинкиназной активностью, так и рецепторами, связанными с G-белками. Чаще всего активация PI3К происходит по следующей схеме: после связывания лиганда происходит фосфорилирование остатков тирозина в цитоплазматических доменах рецептора, p85 узнает фосфотирозины с помощью SH2 (Src-homology 2) домена, и PI3К присоединяется к рецептору (McCubrey et al., 2012). Сигнал от инсулинового рецептора (IR) и от рецептора инсулиноподобного фактора роста (IGF-1R) передается на PI3К через адаптерный белок IRS1 (insulin receptor substrate 1 – субстрат инсулинового рецептора 1). Фосфорилирование рецепторных остатков тирозина индуцирует присоединение IRS1 к рецептору через РТВ (phosphotyrosine binding) домен. Затем рецептор фосфорилирует многочисленные остатки тирозина IRS1, создавая сайты связывания для белков, несущих SH2 домен, в том числе для регуляторной p85 субъединицы PI3К (Hanke and Mann, 2009; Copps and White, 2012). Присоединившись к рецептору, PI3К оказывается в непосредственной близости от плазматической мембраны клетки, где находятся ее субстраты. Здесь каталитическая p110 субъединица PI3К осуществляет перенос фосфатной группы с молекулы аденозинтрифосфата на 3D-положение инозитольного кольца фосфатидилинозитол-4,5,-бифосфата (PIP2 – phosphatidylinositol-4,5-biphosphate) (Shi et al., 2005; O'Reilly et al., 2006; Zhao and Vogt, 2010). Таким образом, PI3К является основным источником фосфатидилинозитол-3,4,5,-трифосфата (PIP3 – phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate), вторичного липидного мессенджера, который привлекает множество других киназ к цитоплазматической мембране, инициируя запуск различных сигнальных каскадов (Martelli et al., 2010; Zhao, Vogt, 2010).

В частности, PIP3 является ключевым активатором АКТ киназы. Связывая PH (pleckstrin homology) домен АКТ, PIP3 заякоривает белок в плазматической мембране, куда рекрутирует также фосфоинозитид-зависимую киназу (PDK1, phosphoinositide-dependent kinase-1) (Franke et al., 1997; Coffey, Woodgett, 1991). PDK1 фосфорилирует АКТ по Thr308, однако для полной активации этой киназы требуется ее фосфорилирование и по Ser473, осуществляемое mTORC2 в ответ на стимуляцию ростовыми факторами через PI3К (Alessi et al., 1997; Jacinto et al., 2004; Corradetti, Guan, 2006). Негативным

регулятором АКТ выступает опухолевый супрессор PTEN (phosphatase and tensin homolog), который часто инактивирован при онкологических заболеваниях. PTEN представляет собой фосфатазу и катализирует отщепление фосфатной группы в положении 3D инозитольного кольца PIP3, препятствуя тем самым активации АКТ (Steelman et al., 2011).

Получив сигнал от PI3K, АКТ ингибирует TSC1/2 комплекс, фосфорилируя TSC2 по Ser924 и Thr1518, что ослабляет его GAP активность и взаимодействие с TSC1. Таким образом, АКТ препятствует TSC1/2-опосредованной супрессии Rheb и тем самым усиливает активацию mTORC1 (Inoki et al., 2002; Potter et al., 2002; Miron et al., 2003). Кроме того, АКТ может активировать mTORC1 через прямое фосфорилирование PRAS40, вызывая его связывание с 14-3-3 белками и предотвращая его ингибирующее действие на mTORC1 (Kovacina et al., 2003; Sancak et al., 2007; Vander Haar et al., 2007). Интересно, что mTORC1 также способен фосфорилировать PRAS40, подавляя его активность (Martelli et al., 2010). Как уже упоминалось выше, mTORC2 активирует АКТ, фосфорилируя ее по Ser473. Стоит отметить, что при таком рассмотрении mTORC2 находится выше mTORC1 в цепочке сигнальных событий (Sarbasov et al., 2005). Таким образом, АКТ киназа одновременно является регулятором mTORC1 и мишенью mTORC2 (Guertin and Sabatini, 2007).

Отдельно необходимо подчеркнуть, что Ras/Raf/MEK/ERK/p90RSK1 сигналинг в ответ на ростовые факторы также позитивно регулирует mTORC1 через инактивацию TSC1/2 комплекса (Martelli et al., 2010). Так, ERK 1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1 and 2) способна напрямую фосфорилировать TSC2 по Ser664 или же активировать p90RSK1 (p90 ribosomal S6 kinase 1), которая фосфорилирует TSC2 по Ser1798, так или иначе подавляя его ингибирующее действие на mTORC1. Помимо PI3K-АКТ и Ras-ERK MAPK сигнальных путей mTORC1 контролируется АМФ-активируемой протеин киназой (АМПК, AMP-activated protein kinase) (Russell et al., 2011). Как известно, недостаток энергии в клетке является сигналом к остановке клеточного роста. Если запасы АТФ истощены, повышается уровень АМФ и активирует АМПК – «страж» энергетического баланса клетки (Carling, 2004). Для активации АМПК также необходимо ее фосфорилирование вышестоящими киназами, включая опухолевый супрессор LKB1 (liver kinase B1) (Lizcano et al., 2004). АМПК усиливает катаболические и подавляет анаболические реакции в клетке, передавая сигнал об остановке таких энергозатратных процессов, как биогенез рибосом и трансляция, на mTOR (Inoki et al., 2003b; Hardie., 2007). Механизм такого сигнала подразумевает фосфорилирование TSC2 киназой АМПК по Thr1227 и Ser1345, что увеличивает его ингибирующее действие на Rheb и,

соответственно, на mTORC1. Кроме того, AMPK может напрямую фосфорилировать Raptor, способствуя его связыванию с белками 14-3-3, изолирующих его от mTORC1, и препятствуя тем самым активации субстратов mTORC1 (Inoki et al., 2002; Inoki et al., 2003b; Gwinn et al., 2008). Было также показано, что фосфорилирование TSC2 с помощью AMPK служит «затравкой» для повышения функционирования TSC2 гликоген синтазой 3β (GSK3β, glycogen synthase 3β). Wnt сигналинг, подавляющий активность GSK3β, ослабляет супрессию mTORC1 комплексом TSC1/2 (Inoki et al., 2006).

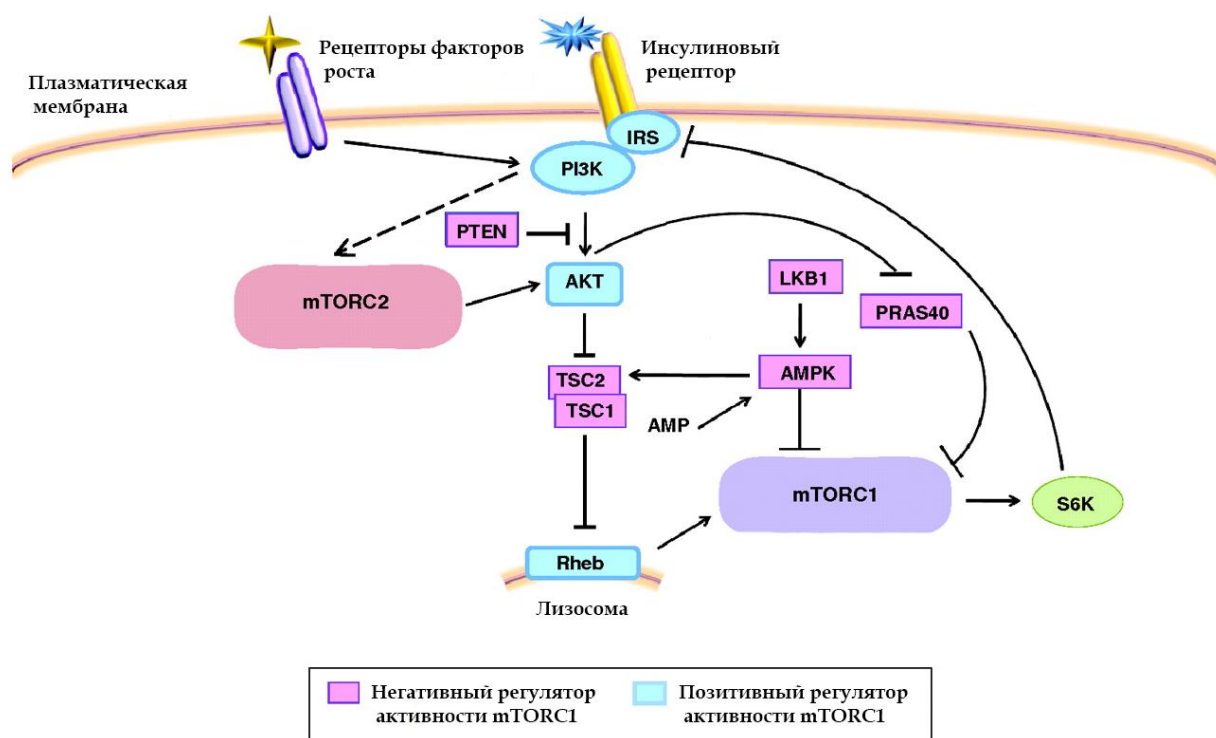


Рис. 5. Регуляция mTOR сигналинга (Russell et al., 2011, с изменениями).

4. Функциональная роль mTOR в клетке

Как уже упоминалось выше, белок mTOR существует в составе двух комплексов. Основной функцией mTORC1 является стимуляция клеточного роста, которую он осуществляет за счет активации трансляции, биогенеза рибосом, продукции тРНК и супрессии аутофагии. mTORC2 участвует в регуляции организации цитоскелета и способствует выживанию клеток. Поскольку большая часть функций, относящихся к mTOR киназе, опосредована mTORC1, далее речь пойдет в основном об этом комплексе (Russell et al., 2011).

В нормальных клетках mTORC1 находится в основном в цитоплазме и ассоциирован с клеточными мембранами, включая мембраны лизосом, митохондрий, эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи (Liu, Zheng, 2007; Zheng et al.,

2014). Воспринимая сигналы от клеточной мембраны, mTORC1 фосфорилирует различные мишени (Li et al., 2007).

4.1. Контроль над синтезом белка в клетке комплексом mTORC1

Наиболее широко изученными субстратами mTORC1 являются рибосомная киназа S6 (p70S6K) и белок, связывающий эукариотический фактор инициации 4E (eukaryotic initiation factor 4E-1 (eIF4E)-binding protein 1, 4E-BP-1). Под действием ростовых факторов и питательных веществ mTORC1 фосфорилирует эти мишени и стимулирует тем самым синтез белка в клетке. 4E-BP-1 связывает и секвестрирует eIF4E и таким образом препятствует сборке и привлечению комплекса инициации трансляции eIF4F к 5'кэпу мРНК (Holz et al., 2005; Ma, Blenis, 2009). mTORC1 фосфорилирует 4E-BP-1, высвобождая eIF4E и позволяя участвовать в сборке комплекса инициации трансляции. Начало трансляции также становится возможным благодаря активации p70S6K комплексом mTORC1 (Fingar et al., 2002; Martelli et al., 2010). mTORC1 напрямую фосфорилирует p70S6K по Thr389, делая возможным ее последующую активацию фосфоинозитид-зависимой киназой PDK1. В свою очередь p70S6K фосфорилирует мишени, вовлеченные в инициацию трансляции мРНК, включая регуляторную субъединицу (eIF4B) РНК геликазы (eIF4A), позитивный регулятор eIF4F, что приводит к продвижению малой рибосомной субъединицы к старт-кодону (Holz et al., 2005; Sarbassov et al., 2005; Ma, Blenis, 2009). p70S6K также фосфорилирует и способствует деградации PDCD4, ингибитора eIF4B (Dorrello et al., 2006), и усиливает эффективность трансляции мРНК после сплайсинга через взаимодействие с SKAR, компонента комплексов соединения экзонов (Ma et al., 2008). Кроме того, активация p70S6K приводит к фосфорилированию 40S рибосомального белка S6 и в конечном итоге управляет трансляцией мРНК, содержащих пиримидин-обогащенные 5'TOP (terminal oligopyrimidine tract) мотивы (Jefferies et al., 1997). Эти мРНК составляют небольшое семейство транскриптов, кодирующих преимущественно рибосомные белки и компоненты аппарата трансляции (Meuhas et al., 1996). Было показано, что ингибирование mTOR умеренно подавляет общую трансляцию мРНК, но сильнее затрагивает трансляцию 5'TOP мРНК (Hsieh et al., 2012; Thoreen et al., 2012).

Интересно, что S6K формирует обратную петлю, негативно регулирующую активность mTORC1 – фосфорилирует и отправляет IRS1 на протеасомную деградацию, препятствуя его взаимодействию с PI3K, а, следовательно, активации АКТ, что приводит к снижению функционирования mTORC1 (Harrington et al., 2004; Shah et al., 2004; Corradetti, Guan, 2006; Foster, Fingar, 2010). Можно рассматривать такую обратную петлю и под другим углом: mTORC1 негативно регулирует PI3K-АКТ сигнальный путь через

S6K-опосредованное фосфорилирование IRS1. Важно отметить, что в клетках с перманентной активацией mTORC1 эта петля отрицательной обратной связи конститутивно подавляет киназу АКТ и ее субстраты, участвующие в пролиферации (Manning et al., 2005). Также S6K фосфорилирует белок Rictor по Thr1135, снижая функционирование mTORC2 (Julien et al., 2010).

Стоит отметить, что активация трансляции способствует быстрой пролиферации, увеличивая уровень транскрипционных факторов (Зубова и др., 2012). Объединение различных сигналов белком mTORC1 (митогенов, ростовых факторов, гормонов) обеспечивает вход в клеточный цикл, только если питательных веществ и энергии достаточно для деления. Таким образом, mTORC1 контролирует множество ступеней, вовлеченных в белковый синтез и значительно увеличивает продукцию регуляторных молекул клеточного цикла, таких как c-Myc, cyclin D1, p27Kip1 и pRb (McCubrey et al., 2011).

Помимо вышеперечисленных функций mTORC1 осуществляет регуляцию биогенеза рибосом и продукции тРНК. mTORC1 индуцирует синтез рибосомальных белков, стимулируя трансляцию 5'ТОР мРНК, как уже упоминалось выше. Кроме того, mTORC1 способствует синтезу рРНК и тРНК, активируя РНК полимеразы I и III. РНК полимеразы I осуществляет транскрипцию рРНК, а РНК полимеразы III – 5S РНК и тРНК (Schmelzle и Hall, 2000). Фосфорилируя TIF1A, ключевую регуляторную субъединицу РНК полимеразы I, mTORC1 контролирует продукцию транскриптов генов РНК в зависимости от количества питательных веществ, поступающих в клетку (Mayer et al., 2004).

4.2. Регуляция аутофагии комплексом mTORC1

Помимо активации анаболических процессов mTORC1 стимулирует клеточный рост также за счет осуществления еще одной важной функции – негативной регуляции аутофагии. Аутофагия впервые была описана Кристианом де Дювом в 1963 году и представляет собой эволюционно консервативный процесс деградации органелл и макромолекул в специфических клеточных компартментах, образующихся при слиянии аутофагосом и лизосом, в условиях недостатка питательных веществ (De Duve, 1963; Зубова и др., 2012). Генерируя таким образом энергию, аутофагия обеспечивает поддержание необходимых для выживания клеточных процессов (Russell et al., 2011). Ключевым регулятором инициации аутофагии у млекопитающих служит белок ULK1 (Unc-51-like kinase 1), который является мишенью как АМПК, так и mTORC1. АМПК фосфорилирует ULK1 по Ser555, активируя ее таким образом в ответ на истощение запасов энергии клетки. mTORC1 фосфорилирует ULK1 по Ser757, препятствуя его

взаимодействию с АМПК, что ослабляет активацию ULK1 и в конечном итоге останавливает процесс аутофагии (Chang and Neufeld, 2009; Jung et al., 2009; Kamada et al., 2010; Egan et al., 2011; Kim et al., 2011).

4.3. Роль mTOR в старении

Способность mTORC1 регулировать метаболизм тесно связана с его ролью в старении. Впервые вовлеченность TORC1 в процесс старения была продемонстрирована в экспериментах на нематоде *Cenorabditis elegans*: пониженная экспрессия seTOR (прежде let-363) или гомолога Raptor (daf-15) продлевают жизнь (Vellai et al., 2003; Jia et al., 2004). Последующие генетические исследования показали, что снижение функционирования TOR сигналинга способствует долголетию плодовых мух *Drosophila melanogaster* (Karahi et al., 2004), почкующихся дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (Kaeberlein et al., 2005), а также мышей (Lamming et al., 2012; Wu et al., 2013). Интересно, что в настоящее время рапамицин является единственным фармакологическим соединением, способным с доказанной эффективностью продлевать жизнь всех этих организмов (Powers et al., 2006; Harrison et al., 2009; Vjedov et al., 2010; Robida-Stubbs et al., 2012). Так, например, Harrison и соавторы продемонстрировали увеличение продолжительности жизни мышей, которым давали рапамицин по достижении 600-суточного возраста (на 14% у самок и на 9% у самцов). Стоит отметить, что эти результаты получены из трех независимых экспериментов на генетически гетерогенных мышах. Авторы предположили, что причиной такого эффекта рапамицина является замедление опухолеобразования, механизмов старения или же обоих процессов. Рапамицин снижал содержание фосфорилированного белка S6 почти в 4 раза как у самцов, так и самок, что подчеркивает роль mTORC1 пути как молекулярного механизма, лежащего в основе увеличения продолжительности жизни с помощью рапамицина (Harrison et al., 2009). Кроме того, в работе Selman и соавторов было показано, что удаление S6K1 приводит к увеличению продолжительности жизни примерно на 10%. У таких мышей не наблюдали появления возрастных патологий, в частности диабета, гипертонии, атеросклероза и остеопороза (Selman et al., 2009). В других экспериментах было показано, что супрессия mTORC1 сигналинга с помощью рапамицина улучшала функционирование печени старых мышей, в то время как активация mTORC1 способствовала развитию ее старения (Sengupta et al., 2010). Кроме того, рапамицин способен продлевать жизнь трансгенным мышам, склонным к образованию опухолей: было продемонстрировано уменьшение массы тела животных, уменьшение размера и количества опухолей (Anisimov et al., 2010).

Помимо снижения функционирования TORC1 сигналинга только ограничение калорий (сокращение потребления питательных веществ без недоедания) увеличивает

продолжительность жизни такого же широкого спектра модельных организмов. Учитывая важную роль TORC1 в восприятии клеткой сигналов от питательных веществ и инсулина, многие ученые пришли к предположению, что положительное влияние снижения калорийности питания на продолжительность жизни также связано с уменьшением активности TORC1. Действительно, в условиях подавления TORC1 пути диетическое питание не оказывает дополнительного эффекта на продолжительность жизни дрожжей, червей или мух, что предполагает одинаковый механизм их действия (Karachi et al., 2004; Kaerberlein et al., 2005; Hansen et al., 2007).

Несмотря на установленный факт вовлеченности mTORC1 в старение млекопитающих, молекулярные механизмы, лежащие в основе этого явления, до сих пор до конца не ясны (Saxton and Sabatini, 2017). Существует точка зрения о том, что центральную роль в организменном старении играет истощение пула взрослых СК, которое, в частности, может быть вызвано старением этих клеток. На сегодняшний день имеется ряд доказательств в пользу взаимосвязи mTORC1 и старения СК. Было показано, что ингибирование mTORC1 способствует самоподдержанию гематopoэтических стволовых клеток и стволовых клеток кишечника мыши (Chen et al., 2009; Yilmaz et al., 2012). Так, удаление *Tsc1* в гематopoэтических стволовых клетках изменяет их фенотип, который становится похожим на фенотип клеток, выделенных из старых мышей. Обработка рапамицином *Tsc1*^{-/-}, а также старых ГСК приводит к усилению их способности самообновляться и восстанавливает гематopoэз *in vivo* (Chen et al., 2009). Кроме того, подавление активности mTORC1 с помощью рапамицина способно отменять гипертрофию стареющих клеток и сохранять их пролиферативный потенциал (Blagosklonny, 2006). Таким образом, активация mTORC1 пути может опосредовать прогрессию клеточного старения, что в свою очередь способствует развитию общего старения организма, а также различных возрастных заболеваний (Saxton and Sabatini, 2017).

На клеточном уровне ингибирование mTORC1 рапамицином приводит к дефосфориливанию его мишеней – S6K и 4E-BP1. Считается, что последующие подавление трансляции мРНК и прекращение сборки рибосом замедляют старение, снижая клеточную массу и накопительное действие протеотоксического и окислительного стресса (Blagosklonny, 2006; Saxton and Sabatini, 2017). В частности, известно, что рапамицин отменяет способность перекиси водорода активировать путь PI3K/TORC1/S6, что приводит к увеличению клеточного объема и содержания белка в клетке (Blagosklonny, 2006). В связи с этим также предполагают, что отмена старения может быть опосредована активацией аутофагии, способствующей избавлению клетками от

поврежденных белков и органелл, например, митохондрий, накопление которых ассоциировано со старением и связанными с ним заболеваниями (Blagosklonny, 2006; Saxton and Sabatini, 2017). Интересные результаты были получены при обработке рапамицином клеток больных прогерией (синдром Хатчинсона-Гилфорда) – синдромом преждевременного старения: подавление активности mTORC1 отменяло ядерный блеббинг, ускоряло деградацию прогерина (мутантная форма ламина А) и замедляло старение. В этом случае также предполагают, что рапамицин способствует активации аутофагии, что приводит к ускоренной утилизации прогерина и восстановлению структуры ядра (Cao et al., 2011). Более того, рапамицин может ингибировать псевдо-DDR, возникающий в отсутствие разрывов ДНК, и гиперсекреторную функцию клеток, что компенсирует мутацию в гене ламина А на эпигенетическом уровне (Blagosklonny, 2011).

Интересно, что обработка стареющих клеток ингибиторами MEK и PI3K, регуляторов mTORC1 пути, также может предотвращать индукцию клеточного и организменного старения (Demidenko et al., 2009a; Mele et al., 2009). Более того, оказалось, что развитие клеточного старения замедляется при использовании фармакологических агентов, применяемых для лечения диабета, например, метформина, являющегося активатором АМПК (Alimova et al., 2009). Все эти соединения косвенным образом подавляют активацию mTORC1, за счет чего, по всей видимости, и имеют положительный эффект в отношении клеточного старения.

Таким образом, исследование эффектов рапамицина, а также соединений, модулирующих активность ключевых регуляторов mTOR, является перспективным в контексте старения. Поскольку существует мнение, что организменное старение опосредовано истощением пула СК, изучение влияния ингибирования mTOR на процесс преждевременного старения стволовых клеток представляется не менее важным. Кроме того, гипертрофия стареющих клеток и повышенное содержание белка в цитоплазме подразумевают вовлеченность mTORC1 в развитие фенотипа старения клеток. Эта идея легла в основу настоящей работы, посвященной исследованию роли mTORC1 пути в H₂O₂-индуцированном старении эндометриальных стволовых клеток человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Клеточная линия и особенности культивирования клеток

В работе использовали эндометриальные мезенхимные стволовые клетки человека (эМСК) линии 2304, полученные сотрудниками Отдела внутриклеточной сигнализации и транспорта Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). эМСК выделяли из десквамированного эндометрия менструальной крови от здоровых доноров (Земелько и др., 2011). Клетки культивировали в среде DMEM/F12 (Gibco, США), содержащей 10 % эмбриональной сыворотки (HyClone, США), 1 % пенициллина-стрептомицина и 1 % глутамакса (Gibco, США), при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂ во флаконах площадью 25 см² или 75 см². Для всех экспериментов клетки рассеивали на культуральные чашки диаметром 35 мм (Corning, США) или 24-луночные платы (NUNC, Дания) в плотности 15×10³ клеток/см². Для всех опытов использовали субконфлюентные культуры 6–9 пассажей через сутки после посева.

2. Моделирование окислительного стресса и условия обработки клеток

Окислительный стресс моделировали добавлением в бессывороточную ростовую среду 2 мМ раствора перекиси водорода (H₂O₂) (конечная концентрация 200 мкМ), который готовили из 30 %-ного раствора H₂O₂ (Sigma, США) непосредственно перед использованием. Обработку клеток проводили в течение 1 ч при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂, после чего клетки дважды промывали раствором PBS (фосфатно-солевой буфер) и далее культивировали в свежей ростовой среде, содержащей сыворотку. В экспериментах использовали следующие соединения: рапамицин в конечной концентрации 200 нМ (Calbiochem, США); LY294002 – 20 мкМ (LC Laboratories, США); U0126 – 10 мкМ (LC Laboratories, США); метформин – 500 мкМ (любезно предоставлен В.Н. Анисимовым). Обработку клеток фармакологическими агентами проводили по следующей схеме: 1) клетки подвергали окислительному стрессу, как описано выше; 2) после промывки PBS клетки инкубировали от 3 до 6 сут в свежей ростовой среде с 10 % содержанием сыворотки при постоянном присутствии в ней какого-либо из перечисленных соединений в указанной концентрации. Для поддержания постоянной концентрации фармакологических агентов культуральную среду меняли через каждые 2 сут и заново добавляли нужное соединение. В отдельных случаях клетки подвергали сначала действию 20 мкМ LY294002 в течение 40 мин в бессывороточной среде, а затем окислительному стрессу в стандартных условиях.

3. Оценка жизнеспособности клеток методом МТТ

Жизнеспособность клеток после обработки ингибитором в различных концентрациях оценивали методом МТТ, основанном на способности митохондриальных

дегидрогеназ восстанавливать желтый МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид) в темно-фиолетовый формазан. Так как реакция восстановления происходит только в живых клетках с активными митохондриальными ферментами, количество образовавшегося формазана коррелирует с числом живых клеток в популяции. Для этих экспериментов клетки выращивали на 24-луночных платах, оценку жизнеспособности проводили через 24 ч после начала эксперимента. Удалив культуральную среду, к клеткам добавляли раствор МТТ (0,715 мг/мл) (AppliChem, Германия), смешанный с ростовой средой. Через 2 ч раствор заменяли на DMSO (Sigma, США) для растворения образовавшихся кристаллов формазана и инкубировали клетки в течение 15 мин при покачивании на комнатной температуре, после чего измеряли абсорбцию раствора при 570 нм на приборе Fluorofot "Charity" (США).

4. Электрофорез и иммуноблоттинг

4.1. Приготовление проб для электрофоретического разделения

Прикрепленные клетки дважды промывали холодным PBS и лизировали в буфере, содержащем 50 мМ Трис-НСl, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 10 % глицерина, 1 % тритона X-100, 1 мМ Na₃VO₄, 1 мМ NaF, 0,5 мМ PMSF, коктейль ингибиторов протеаз (1:300, Sigma, США), в течение 6 мин на льду. После лизиса клетки соскребали с чашек и центрифугировали в течение 15 мин при 15000 g. К супернатанту добавляли 1/4 часть буфера для электрофоретических проб (40 мМ Трис (pH 6,8), 10 % SDS, 20 % 2-меркаптоэтанола и 40 % глицерина), после чего инкубировали пробы в течение 5 мин при 99 °С. Готовые пробы использовали сразу или хранили при температуре -20 °С. Концентрацию белка в пробах определяли по методу Бредфорд (Bradford, 1976), используя овалбумин для построения калибровочной кривой.

4.2. Электрофорез белков в полиакриламидном геле

Электрофоретическое разделение белков проводили методом SDS-электрофореза в полиакриламидном геле. Процентное содержание акриламида в разделяющем геле варьировали (от 4 до 12 %) в зависимости от молекулярного веса интересующих белков. Разделение белков проводили в блоках геля 90×60×1 мм при силе тока 30 мА на пластину в течение 2-3 ч, используя метод Лэммли (Laemmli, 1970). В форезных камерах использовали Tris-глициновый электродный буфер (pH 8,3), содержащий 25 мМ Tris-НСl, 250 мМ глицина и 0,1 % SDS.

4.3. Иммуноблоттинг со специфическими антителами

Белки из геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C extra (Amersham Pharmacia Biotech, Швеция) методом «мокрого» переноса на трансблоте фирмы Bio-Rad (США) с использованием буфера, содержащего 48 мМ Tris-НСl, 39 мМ

глицина, 0,1 % SDS и 5-20 % метанола в зависимости от молекулярного веса интересующих белков. Для визуализации белковых полос на мембране использовали Ponceau S (Sigma, США). Иммуноблоттинг проводили в соответствии с методикой ECL Western Blotting protocols (Amersham Pharmacia Biotech, Швеция). Мембрану промывали 3 раза по 5 мин в буфере TBS-Tween-20 (TTBS, 20 mM Трис-НСl (рН 7,6), 150 mM NaCl, 0,1 % Tween-20) при покачивании, после чего инкубировали в 5 %-ном растворе сухого обезжиренного молока, приготовленном на TTBS, в течение 1 ч при комнатной температуре. По окончании инкубации мембрану снова промывали в TTBS 3 раза по 5 мин и переносили в раствор первичных антител, приготовленный либо на 5 %-ном молоке в TTBS, либо на 5%-ном растворе BSA в TTBS и содержащий NaN_3 (1:1000), и инкубировали в течение ночи на +4 °С при покачивании. Для специфического выявления белков использовали следующие первичные антитела: моноклональные кроличьи антитела против p21Cip1/Waf1 (clone 12D1), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH, clone 14C10), а также поликлональные кроличьи антитела против фосфо-p70S6K (Thr389), фосфо-S6 (Ser248/244), фосфо-4E-BP1 (Thr37/46), фосфо-p53 (Ser15), фосфо-Rb (Ser807/811), фосфо-c-Raf (Ser338), фосфо-МЕК1/2 (Ser217/221), фосфо-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), фосфо-p90RSK (Ser380), фосфо-Akt (Thr308). По окончании инкубации с первичными антителами мембрану промывали 3 раза по 5 мин в TTBS при покачивании, затем помещали в раствор вторичных антител в 5 %-ном растворе молока в TTBS и инкубировали в течение 1 ч, после чего снова промывали мембрану, как описано выше. В качестве вторичных антител применяли конъюгированные с пероксидазой хрена козы антитела, выработанные против иммуноглобулинов кролика (GAR-HRP). Все антитела были приобретены в фирме Cell Signaling (США). Белки, связавшиеся с антителами, выявляли детекцией пероксидазной активности конъюгатов GAR-HRP с помощью реакции усиленной хемилюминесценции (ECL, Amersham, Швеция). Для этого мембрану инкубировали в растворе ECL в течение 5 мин, а затем регистрировали хемилюминесцентное излучение экспонированием на рентгеновскую пленку СЕА RP NEW (СЕА АВ, Швеция).

5. Метод проточной цитофлуориметрии

5.1. Анализ изменения размера и количества клеток

Прикрепленные клетки снимали с чашек смесью растворов трипсина и Версена (0.05 %), осаждали центрифугированием и промывали раствором PBS. Далее образцы анализировали на цитофлуориметре EPICS XL или CytoFlex (Beckman Coulter, США). Размер клеток оценивали по изменению прямого светорассеяния (FS). Число клеток

определяли по количеству событий. Данные собирали и обрабатывали с помощью программы WinMDI (версия 2.8) или CytExpert (версия 1.2).

5.2. Измерение уровня внутриклеточных АФК

Для оценки внутриклеточного уровня АФК использовали 2,7-дихлорфлуоресцеин диацетат ($H_2DCF-DA$) (Molecular Probes, США; Oyama et al., 1994). Прикрепленные к поверхности чашки клетки инкубировали в течение 20 мин в среде без сыворотки с добавлением флуоресцентного красителя (конечная концентрация 10 мкМ) при 37 °С в темноте. После окончания времени инкубации с красителем клетки переводили в суспензионное состояние при помощи смеси растворов трипсина и Версена (0,05 %) и анализировали на проточном цитофлуориметре EPICS XL или CytoFlex (Beckman Coulter). В каждом образце анализировали не менее 10.000 клеток.

6. Выявление активности SA- β -Gal

Для выявления активности фермента SA- β -Gal использовали фирменный набор «Senescence-galactosidase staining kit» (Cell Signaling, США). Все процедуры осуществляли в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Прикрепленные к поверхности чашек клетки дважды промывали PBS, фиксировали в течение 10 мин при комнатной температуре 1-кратным фиксирующим раствором, после чего снова дважды промывали PBS и окрашивали в β -галактозидазном растворе при 37 °С в течение ночи. Об активности SA- β -Gal судили по появлению синих гранул в цитоплазме клеток.

7. Используемые реактивы и ингибиторы

В работе использовали неорганические соли и перекись водорода производства фирмы Sigma (США), а также ингибиторы: (1) рапамицин (Rapa) – специфический ингибитор mTORC1 (в комплексе с белком FKBP12 Rapa подавляет киназную активность mTORC1) (Calbiochem, США); (2) LY294002 – селективный синтетический ингибитор PI3K, регулирующих активность АКТ (LC Laboratories, США); (3) U0126 – высоко селективный ингибитор MEK1/2 киназ, регулирующих активность ERK1/2 (LC Laboratories, США); (4) метформин (Met) – синтетический активатор AMPK (любезно предоставлен В.Н. Анисимовым).

8. Статистическая обработка данных

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием компьютерных программ Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США). При установлении достоверности различий данных, подчиняющихся нормальному распределению, использовали *t*-критерий Стьюдента. Данные представлены в виде средних значений \pm SD (N=3), * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,005$ по сравнению с контролем, § – $p < 0,05$; §§ – $p < 0,01$; §§§ – $p < 0,005$ по сравнению с H_2O_2 -обработанными клетками.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На сегодняшний день показано, что одним из возможных ответов пролиферирующих клеток на действие субцитотоксического стресса является индукция преждевременного старения (Medrano et al., 1995; Chen et al., 1998; Dumont et al., 2000; Toussaint et al., 2000; Oh et al., 2001; Duan et al., 2005; Brandl et al., 2011a). Такую форму клеточного старения принято называть стресс-индуцированной. Основные признаки стресс-индуцированного старения включают: характерные фенотипические изменения клеток (увеличение размера и уплощение клеток), повышение активности SA- β -Gal в клетках и потерю пролиферативного потенциала вследствие необратимого ареста клеточного цикла. В настоящей работе моделировали окислительный стресс кратковременным (в течение 1 ч) действием H_2O_2 в сублетальной концентрации 200 мкМ на мезенхимальные стволовые клетки человека, выделенные из эндометрия. Выбор концентрации был сделан на основании проведенной ранее оценки устойчивости ЭМСК к окислительному стрессу, показавшей, что действие 200 мкМ H_2O_2 практически не влияет на жизнеспособность клеток (Бурова и др., 2012). Важно отметить, что сравнительно недавно сотрудниками нашей лаборатории впервые было установлено, что окислительный стресс, инициированный действием 200 мкМ H_2O_2 , приводит к преждевременному старению ЭМСК (Burova et al., 2013). В рамках данного исследования была поставлена цель выяснить функциональное значение mTORC1 сигналинга, а также его регуляторов в процессе старения ЭМСК.

1. Выявление роли mTORC1 в H_2O_2 -индуцированном старении ЭМСК

При исследовании механизма стресс-индуцированного старения ЭМСК мы обнаружили, что в H_2O_2 -обработанных клетках активируются p53/p21/Rb и p38 MAPK сигнальные каскады (Borodkina et al., 2014). На основании литературных данных мы предположили, что mTORC1 путь также может быть вовлечен в развитие преждевременного старения ЭМСК. С целью проверки этой гипотезы в настоящей работе мы использовали специфический ингибитор mTORC1 – рапамицин (Rapa).

1.1. Выявление эффектов рапамицина на жизнеспособность клеток и на активность компонентов mTORC1 сигнального пути в H_2O_2 -обработанных ЭМСК

Для выбора рабочей концентрации Rapa была проведена оценка жизнеспособности H_2O_2 -обработанных клеток с помощью метода МТТ после их культивирования в течение 24 ч при постоянном присутствии ингибитора в следующих концентрациях: 50, 200 и 500 нМ. В результате эксперимента нами было установлено, что Rapa не оказывает существенного влияния на жизнеспособность H_2O_2 -обработанных ЭМСК ни в одной из протестированных концентраций (рис. 6, а).

В последующих экспериментах H_2O_2 -обработанные клетки культивировали в среде с добавлением 200 нМ Рара в течение разного времени. Для проверки предположения о возможности обращения уже активированного процесса преждевременного старения эМСК был выбран вариант обработки клеток ингибитором не до, а после стрессового воздействия. Как видно на **рис. 6, в**, постобработка клеток 200 нМ Рара в течение трех суток после индукции старения эффективно снижает уровень фосфорилирования основных мишеней mTORC1: приводит к полному ингибированию фосфорилирования S6K и S6 и значительному уменьшению фосфорилирования 4E-BP1 по сравнению с H_2O_2 -обработанными клетками. Эти результаты свидетельствуют о подавлении активности mTORC1 сигнального пути в стареющих эМСК.

1.2. Оценка влияния ингибирования mTORC1 на пролиферативный статус стареющих эМСК и активность p53/p21/Rb сигнального пути

Для выявления роли mTORC1 в развитии старения H_2O_2 -индуцированных эМСК была проведена оценка влияния Рара на основные маркеры клеточного старения. Определяющим признаком старых клеток является блок клеточного цикла, и, как следствие, остановка пролиферации, поэтому, прежде всего, мы проанализировали эффект Рара на модуляцию пролиферативного потенциала стареющих эМСК, находящихся в состоянии ареста клеточного цикла. Данные, полученные с помощью метода проточной цитометрии, показали, что в условиях подавления активности mTORC1 пролиферация H_2O_2 -обработанных клеток не восстанавливается как минимум в течение 6 сут после индукции старения. Эти результаты отражены на кривых роста контрольных, H_2O_2 - и (H_2O_2 +Рара)-обработанных клеток, приведенных на **рис. 6, б**. Так как кривые роста последних почти полностью совпадают, данные также представлены в виде гистограммы для большей наглядности (**рис. 6, д**).

Отсутствие восстановления пролиферации в условиях ингибирования mTORC1 согласуется с результатами иммуноблотинга. Рара не оказывал влияние на активность p53/p21/Rb сигнального пути, опосредующего установление ареста клеточного цикла в стареющих эМСК. Уровень фосфорилирования компонентов этого сигнального каскада в присутствии Рара не изменяется на 3 сут после окислительного стресса по сравнению с их функциональным статусом в H_2O_2 -обработанных клетках (**рис. 6, г**). Полученные результаты позволяют заключить, что подавление активности mTORC1 не способно изменять функционирование уже активированного p53/p21/Rb пути, а значит отменять блок клеточного цикла и остановку пролиферации стареющих эМСК.

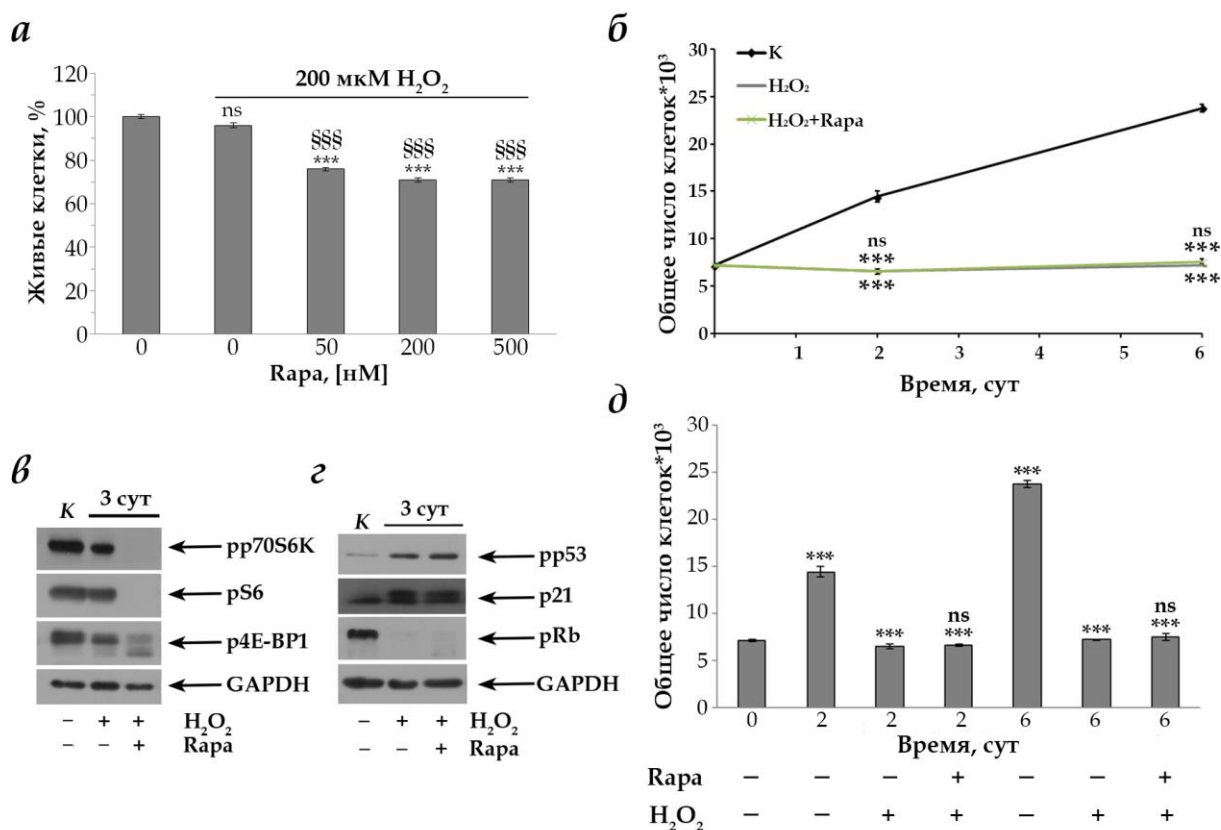


Рис. 6. Влияние рапамицина на выживаемость (а), пролиферацию (б, д) и сигнальные пути (в, з) в H₂O₂-обработанных стволовых клетках эндометрия (ЭМСК).

Клетки подвергали действию 200 мкМ H₂O₂ в течение 1 ч, а затем культивировали в присутствии 200 нМ рапамицина (Rapa) в течение указанного времени. Жизнеспособность (а) клеток определяли методом МТТ; кривые роста (б) построены на основе данных проточной цитометрии; гистограмма (д) отражает данные кривых роста; на иммуноблотах (в, з) с помощью специфических антител выявляли фосфорилированные белки (указаны стрелками) сигнальных каскадов mTORC1 и p53/p21/Rb, соответственно; К – контроль, GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (здесь и на рис. 8, 9, 10, 11, 14). Данные представлены в виде средних значений ± SD (N=3), *** – p<0,005 по сравнению с контролем, §§§ – p<0,005 по сравнению с H₂O₂-обработанными клетками; ns – non significant (не достоверное отличие) по сравнению с контролем или с H₂O₂-обработанными клетками.

1.3. Исследование эффектов рапамицина на фенотип старения клеток и уровень внутриклеточных АФК в H₂O₂-обработанных ЭМСК

Наряду с арестом клеточного цикла, важным признаком старых клеток является модуляция их фенотипических характеристик: увеличение размера, уплощение и избыточная вакуолизация клеток, а также усиление биогенеза лизосом, приводящее к повышению активности ассоциированной со старением β-галактозидазы (Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007). С целью определить влияние Rapa на фенотип старения H₂O₂-индуцированных ЭМСК мы проанализировали изменение размера клеток и активности

SA- β -Gal при обработке данным соединением. Эффект Rapam на модуляцию размера эМСК оценивали на 2 и 6 сут после окислительного стресса с помощью проточной цитометрии по изменению прямого светорассеяния (FS). Принцип метода основан на регистрации светорассеяния от каждой отдельно взятой клетки в суспензии, при этом интенсивность рассеянного под малым углом света пропорциональна размеру клетки – крупные клетки рассеивают свет сильнее, чем мелкие. Как видно на **рис. 7, б**, ингибирование mTORC1 приводит к предотвращению увеличения размера H₂O₂-обработанных клеток.

Повышение активности SA- β -Gal в лизосомах определяется по появлению характерных голубых гранул в цитоплазме после окрашивания клеток. В нормальных клетках β -галактозидаза детектируется при pH 4,0, в то время как в стареющих клетках активность этого фермента обнаруживается уже при pH 6,0 (Dimri et al., 1995). Уровень активности SA- β -Gal в стареющих клетках анализировали через 5 сут после воздействия H₂O₂. В результате эксперимента было установлено, что ингибирование mTORC1 способствует снижению активности SA- β -Gal в H₂O₂-обработанных клетках (**рис. 7, а**). Таким образом, мы показали, что mTORC1 участвует в развитии фенотипа старения H₂O₂-индуцированных эМСК.

В предыдущих исследованиях мы установили, что процесс H₂O₂-индуцированного старения эМСК сопровождается повышенной генерацией эндогенных АФК (Vorodkina et al., 2014). В связи с этим мы также оценивали, какой эффект оказывает Rapam на уровень внутриклеточных АФК в H₂O₂-обработанных клетках, используя краситель H₂DCF-DA. На **рис. 7, в** показано, что в условиях ингибирования mTORC1 в клетках заметно уменьшается продукция АФК на 3 и 5 сут после индукции старения по сравнению с H₂O₂-обработанными клетками. Принимая во внимание полученные результаты, можно предположить, что mTORC1 сигнальный путь вовлечен в регуляцию генерации АФК в стареющих эМСК.

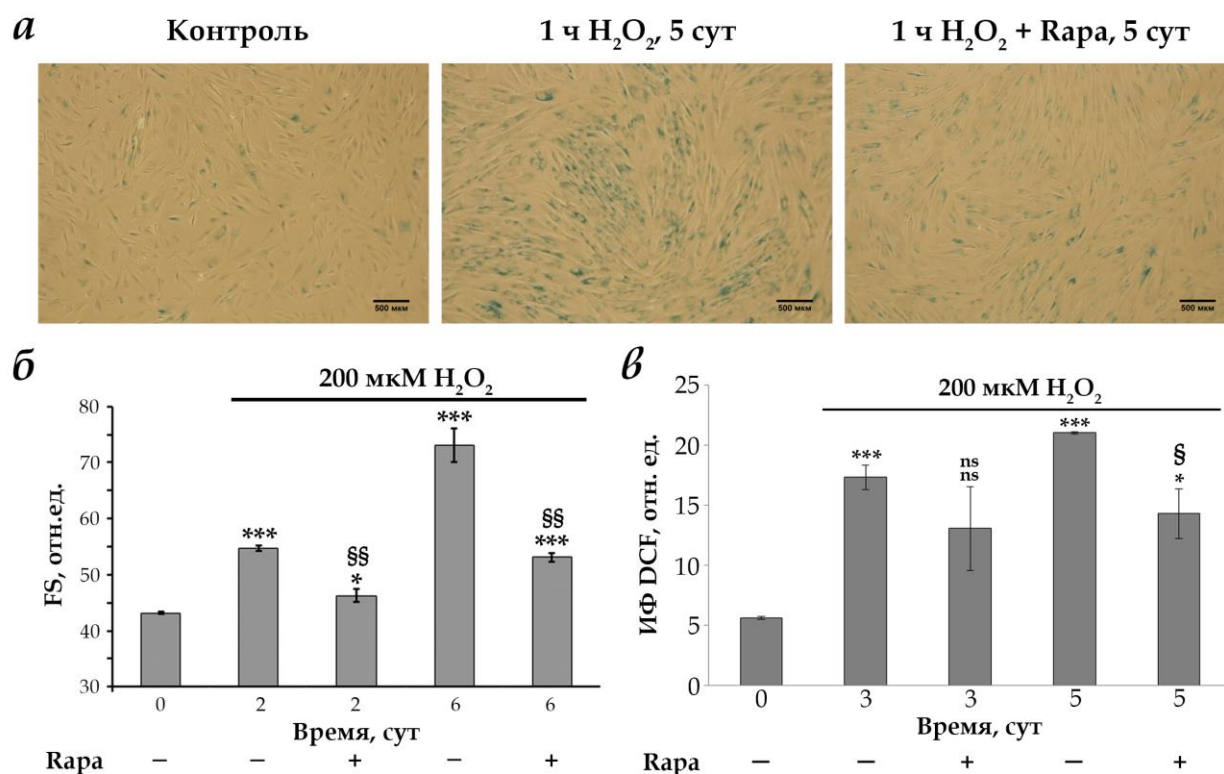


Рис. 7. Модуляция признаков преждевременного старения H₂O₂-обработанных эМСК при действии Rapa.

Клетки обрабатывали, как указано в подписи к рис. 6. а – выявление активности SA-β-Gal в контрольных, H₂O₂- и (H₂O₂+Rapa)-обработанных клетках; б – средний размер клеток, определенный по прямому светорассеянию клеток (FS) методом проточной цитометрии; в – средняя интенсивность флуоресценции (ИФ) АФК-зависимого зонда H₂DCF-DA (проточная цитометрия). Данные представлены в виде средних значений ± SD (N=3), * – p<0,05; *** – p<0,005 по сравнению с контролем, § – p<0,05; §§ – p<0,01 по сравнению с H₂O₂-обработанными клетками; ns – non significant (не достоверное отличие) по сравнению с контролем или с H₂O₂-обработанными клетками.

2. Влияние mTOR на Raf/MEK/ERK/p90RSK сигнальный путь в стареющих эМСК

В предыдущих исследованиях мы установили, что процесс стресс-индуцированного старения эМСК сопровождается взаимной негативной регуляцией между p53/p21 и MAP-киназными сигнальными путями, в том числе Raf/MEK/ERK/p90RSK (Дерябин и др., 2015). В настоящей работе мы оценивали влияние mTORC1 на активность Raf/MEK/ERK/p90RSK-каскада в стареющих эМСК. Для подавления активности mTORC1, как и прежде, использовали рапамицин в концентрации 200 нМ. В качестве положительного контроля проверили действие специфического ингибитора MEK1/2/ERK1/2 – U0126 (U) в концентрации 10 мкМ на уровень активации Raf/MEK/ERK/p90RSK сигнального пути.

Результаты иммуноблотинга демонстрируют подавление фосфорилирования киназ ERK1/2 и p90RSK в H₂O₂-обработанных клетках под действием U0126, при этом уровень фосфорилирования Raf и MEK1/2 киназ повышается в соответствии с принципом обратной связи (**рис. 8**). Интересно, что ингибирование активности mTORC1 с помощью Rара приводит к усилению активации всех компонентов Raf/MEK/ERK/p90RSK сигнального каскада через 3 сут после индукции старения в клетках по сравнению с H₂O₂-индуцированными эМСК, не обработанными Rара (**рис. 8**). Полученные результаты позволяют заключить, что mTORC1 является негативным регулятором Raf/MEK/ERK/p90RSK пути в стареющих эМСК.

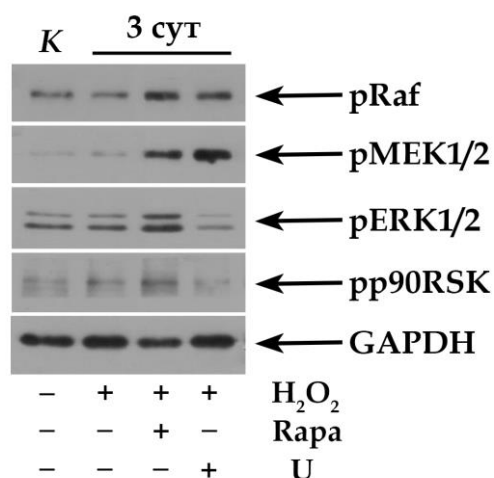


Рис. 8. Действие Rара и U0126 на Raf/MEK/ERK/p90RSK сигнальный путь в стареющих эМСК.

Старение индуцировали 1-часовым действием 200 мкМ H₂O₂. Затем клетки культивировали в течение 3-х сут в ростовой среде, содержащей 200 нМ Rара или 10 мкМ U0126 (U). Фосфорилированные формы белков (показаны *стрелками*) ERK-зависимого сигнального каскада в присутствии ингибиторов выявляли с помощью специфических антител.

3. Влияние АКТ киназы на mTORC1 сигнальный путь и ее роль в преждевременном старении эМСК

Как известно, основными регуляторами mTORC1 сигнального пути являются три ключевые киназы – АКТ, ERK и АМПК. Мы предположили, что модуляция активности каждой из этих киназ может привести к изменениям в функционировании mTORC1 пути в процессе развития стресс-индуцированного старения эМСК. В настоящей работе мы проанализировали эффекты ингибирования АКТ и ERK, а также активации АМПК на активность mTORC1 сигнального пути и маркеры старения клеток.

3.1. Установление роли АКТ киназы в регуляции mTORC1 пути при преждевременном старении эМСК

Для проверки предположения об участии АКТ в регуляции mTORC1 пути в стареющих эМСК мы использовали селективный ингибитор PI3K/АКТ – LY294002 (LY) в концентрации 20 мкМ. Киназа АКТ фосфорилируется в ответ на внешние стимулы по Thr308 посредством PI3K, а также по Ser473 комплексом mTORC2, что требуется для ее полной активации. Как показано на **рис. 10, а**, предобработка эМСК с помощью LY полностью подавляет H₂O₂-индуцированное фосфорилирование АКТ по Thr308, что свидетельствует о специфичности действия ингибитора в выбранной концентрации.

Результаты иммуноблотинга показали, что действие LY в течение 3-5 сут после индукции старения эМСК приводит к подавлению активности мишеней mTORC1, S6K и S6, по сравнению с H₂O₂-обработанными клетками (**рис. 9, б**). Исходя из полученных данных, можно заключить, что АКТ киназа положительно регулирует функционирование mTORC1 в H₂O₂-индуцированных эМСК, так как подавление ее активности вызывает практически полное ингибирование основных компонентов mTORC1 сигнального пути.

3.2. Исследование характера изменения основных признаков старения H₂O₂-обработанных эМСК в условиях ингибирования АКТ

В связи с полученными результатами мы предположили, что АКТ киназа может быть ответственна за установление фенотипа старения эМСК, подвергнутых окислительному стрессу, через mTORC1 путь. Действительно, анализ изменения размера клеток с помощью проточной цитометрии показал, что действие LY на H₂O₂-обработанные эМСК в течение 5 сут препятствует развитию гипертрофии клеток (**рис. 9, в**). Кроме того, в присутствии LY наблюдается снижение активности SA-β-Gal в H₂O₂-обработанных клетках до уровня контроля к 5 сут после индукции старения (**рис. 9, а**). Важно подчеркнуть, что эффекты Rapa (**рис. 7, а, б**) и LY (**рис. 9, а, в**) в отношении развития фенотипа старения H₂O₂-индуцированных эМСК идентичны.

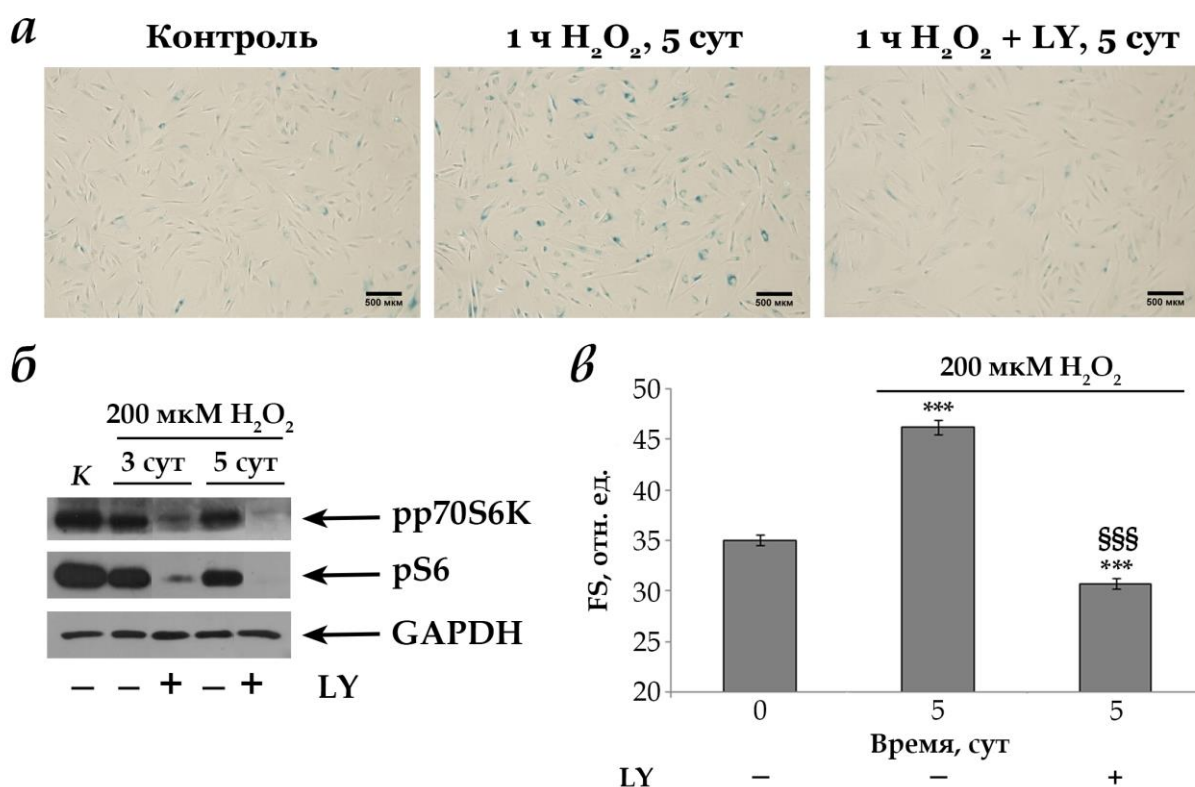


Рис. 9. LY снижает активность SA-β-Gal (а) и mTORC1 пути (б) в H₂O₂-обработанных эМСК, а также предотвращает увеличение размера стареющих клеток (в).

Условия обработки клеток: LY294002 (LY) добавляли в среду после 1-часового действия H₂O₂ и культивировали клетки в течение указанного времени. *а* – выявление активности SA-β-Gal в контрольных, H₂O₂- и (H₂O₂+LY)-обработанных клетках; *б* – уровень фосфорилирования белков p70S6K и S6, выявленный с помощью иммуноблотинга (стрелки); *в* – средний размер клеток, определенный по прямому светорассеянию клеток (FS) методом проточной цитометрии. Данные представлены в виде средних значений ± SD (N=3), *** – p<0,005 по сравнению с контролем, §§§ – p<0,005 по сравнению с H₂O₂-обработанными клетками.

3.3. Анализ пролиферативного статуса клеток и активности p53/p21/Rb сигнального пути в H₂O₂-обработанных эМСК при действии LY

Интересно, что ингибирование АКТ киназы, как и подавление активности комплекса mTORC1, не оказывало влияния на H₂O₂-индуцированный арест клеточного цикла стареющих эМСК, о чем свидетельствуют кривые роста, построенные на основе данных проточной цитометрии (рис. 10, в). Для большей наглядности данные также представлены в виде гистограммы (рис. 10, г).

В этом случае отсутствие восстановления пролиферативного потенциала H₂O₂-обработанных клеток обусловлено сохранением повышенной активности p53/p21/Rb сигнального пути (рис. 10, б), как и в экспериментах с Рапа (рис. 6, г). Интересно, что результаты иммуноблотинга демонстрируют также небольшое увеличение

фосфорилирования p53 в стареющих эМСК, культивированных в среде с добавлением LY (рис. 10, б). Таким образом, ингибирование АКТ, так же как и mTORC1, не модулирует пролиферативный статус H₂O₂-индуцированных клеток в силу отсутствия снижения функционирования p53/p21/Rb пути.

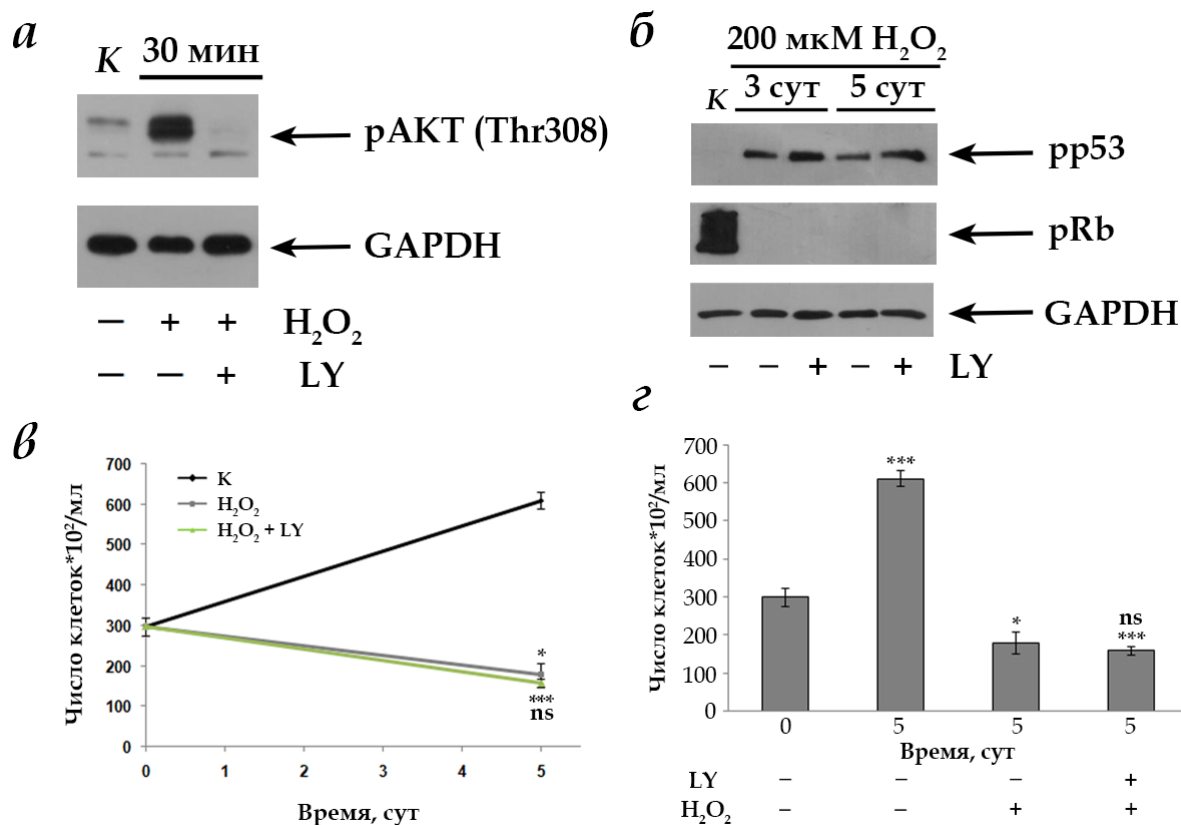


Рис. 10. Ингибирование АКТ усиливает активацию p53 (б) и не влияет на пролиферативный потенциал (в, г) стареющих эМСК.

а – уровень фосфорилирования киназы АКТ по Thr308 (иммуноблот, стрелка) в клетках, подвергнутых обработке 200 мкМ H₂O₂ в течение 30 мин без или с предварительной обработкой 20 мкМ LY; б – уровень фосфорилирования белков p53 и Rb (иммуноблот, стрелки); в – кривые роста контрольных, H₂O₂- и (H₂O₂+LY)-обработанных клеток; гистограмма (г) отражает данные кривых роста (б, в, г – 20 мкМ LY добавляли в среду после 1-часового действия H₂O₂). Данные представлены в виде средних значений ± SD (N=3), * – p<0,05; *** – p<0,005 по сравнению с контролем; ns – non significant (не достоверное отличие) по сравнению с H₂O₂-обработанными клетками.

4. Роль белка ERK1/2 в регуляции mTORC1 сигнального пути при стресс-индуцированном старении эМСК

4.1. Выявление эффектов U0126 на активность mTORC1 сигнального пути в H₂O₂-обработанных клетках

Чтобы оценить влияние MAP-киназы ERK1/2 на активность компонентов mTORC1 сигнального каскада при преждевременном старении эМСК, H₂O₂-обработанные клетки культивировали в среде, содержащей 10 мкМ U0126. Как демонстрируют результаты

иммуноблотинга, уровень фосфорилирования белков S6 и 4E-BP1 почти не изменяется при действии U0126 через 3 сут после индукции старения по сравнению с H₂O₂-обработанными клетками, при этом наблюдается лишь небольшое снижение фосфорилирования S6K (рис. 11). Таким образом, ингибирование ERK1/2 оказывает очень слабое влияние на функционирование mTORC1 сигнального пути в стареющих эМСК.

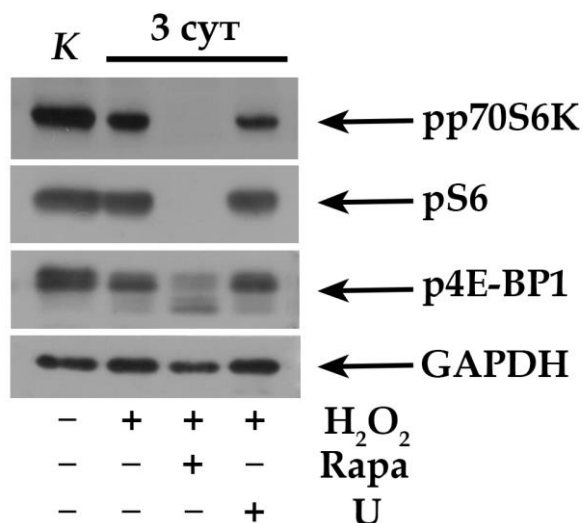


Рис. 11. Действие Rapam и U0126 на mTORC1 сигнальный путь в стареющих эМСК.

Старение индуцировали 1-часовым действием 200 мкМ H₂O₂. Затем клетки культивировали в течение 3-х сут в ростовой среде, содержащей 200 нМ Rapam или 10 мкМ U. Фосфорилированные формы белков (показаны стрелками) mTORC1 сигнального каскада в присутствии ингибиторов выявляли с помощью специфических антител.

4.2. Оценка маркеров преждевременного старения клеток в условиях ингибирования активности ERK1/2

Отсутствие влияния ERK1/2 на активность mTORC1 сигнального каскада объясняет результаты, полученные с помощью метода проточной цитометрии. Обработка эМСК ингибитором ERK1/2 в течение 6 сут после окислительного стресса не предотвращает увеличение размера стареющих клеток (рис. 12, б). Однако мы обнаружили, что культивирование эМСК в присутствии U0126 приводит к существенному снижению активности SA-β-Gal в клетках через 5 сут после индукции старения по сравнению с H₂O₂-индуцированными эМСК, не обработанными U0126 (рис. 12, а). Более того, действие U0126 в течение 6 сут способствует уменьшению продукции АФК в H₂O₂-обработанных клетках (рис. 12, в). Опираясь на полученные результаты, можно предположить, что появление некоторых характеристик стареющих эМСК, в частности повышенная активность SA-β-Gal и генерация внутриклеточных АФК, коррелируют с

активностью MAP-киназ ERK1/2 в обход модуляции активности mTORC1 сигнального пути.

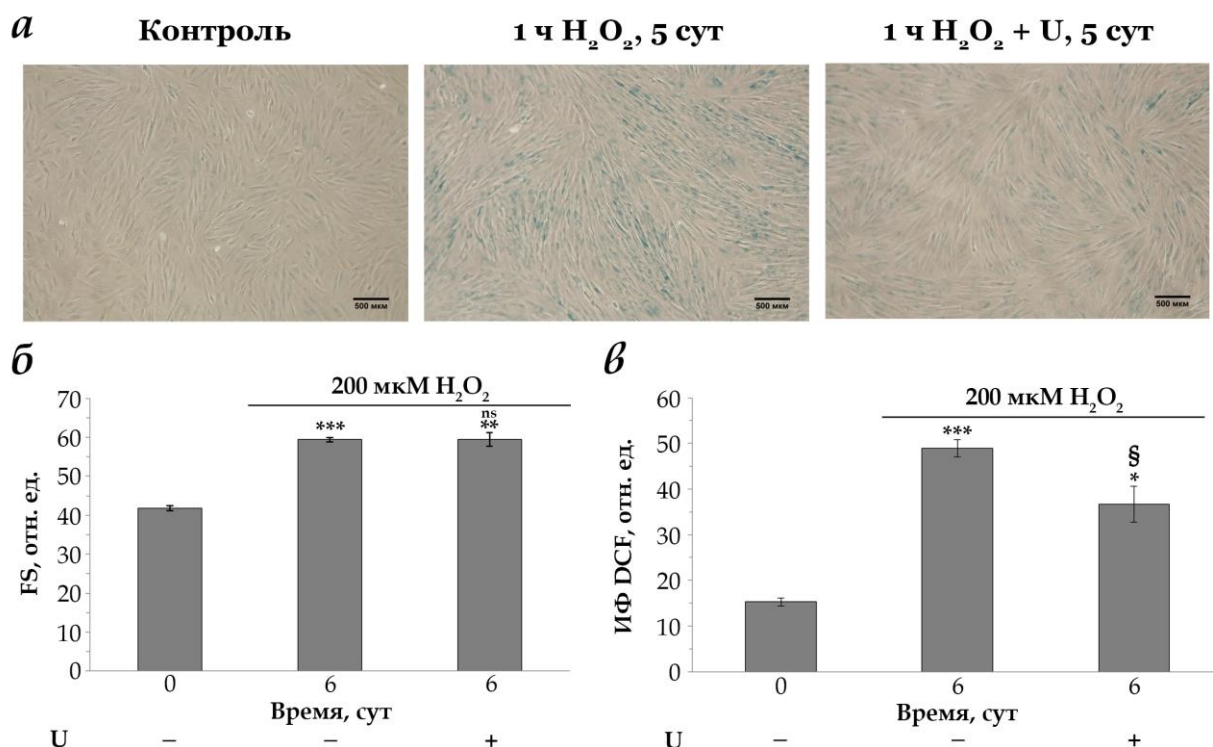


Рис. 12. Изменение активности SA-β-Gal (*а*), размера клеток (*б*), уровня внутриклеточных АФК (*в*) в H₂O₂-обработанных ЭМСК при действии U0126.

Клетки подвергали действию 200 мкМ H₂O₂ в течение 1 ч, а затем культивировали в присутствии 10 мкМ U в течение указанного времени. *а* – выявление активности SA-β-Gal в контрольных, H₂O₂- и (H₂O₂+U)-обработанных клетках; *б* – средний размер клеток, определенный по прямому светорассеянию клеток (FS) методом проточной цитометрии; *в* – интенсивность флуоресценции (ИФ) АФК-зависимого зонда H₂DCF-DA (проточная цитометрия). Данные представлены в виде средних значений ± SD (N=3), * – p<0,5; ** – p<0,01; *** – p<0,005 по сравнению с контролем; § – p<0,5 по сравнению с H₂O₂-обработанными клетками. ns – non significant (не достоверное отличие) по сравнению с H₂O₂-обработанными клетками.

Далее мы проанализировали эффект U0126 на пролиферативную активность H₂O₂-индуцированных ЭМСК. Как видно на **рис. 13, а**, кривые роста H₂O₂- и (H₂O₂+U)-обработанных клеток через 6 сут после индукции старения полностью совпадают. Для большей наглядности результаты также представлены в виде гистограммы (**рис. 13, б**). Эти данные свидетельствуют об отсутствии модулирующего влияния ингибитора ERK1/2 на пролиферативный потенциал стареющих ЭМСК, находящихся в состоянии ареста клеточного цикла. Таким образом, в условиях ингибирования ERK1/2 в H₂O₂-обработанных клетках наблюдается заметное снижение активности SA-β-Gal и уровня

эндогенных АФК, однако активность mTORC1 сигнального каскада, размер и пролиферативный статус клеток не претерпевают изменений.

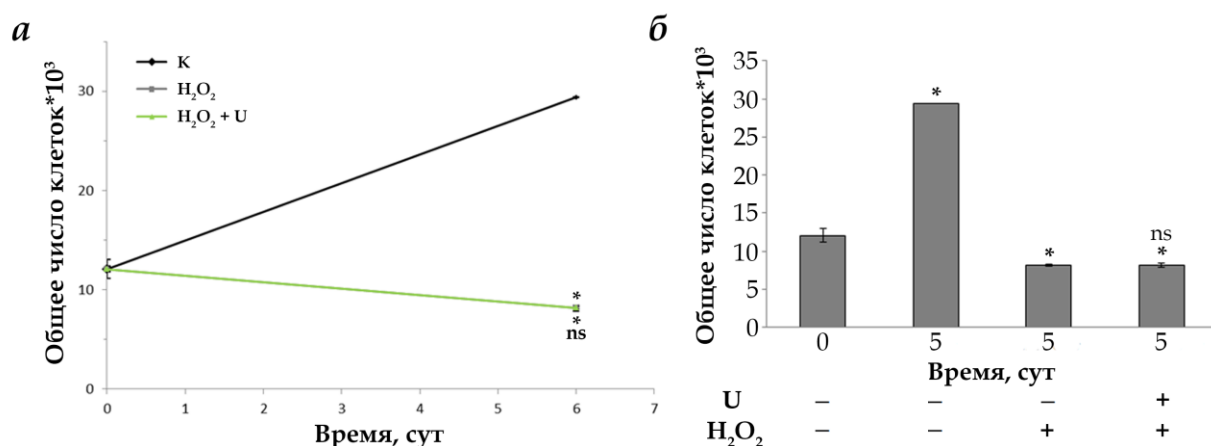


Рис. 13. Влияние U0126 на пролиферативную активность H₂O₂-обработанных ЭМСК.

Клетки обрабатывали, как указано в подписи к рис. 12. *а* – кривые роста контрольных, H₂O₂- и (H₂O₂+U)-обработанных клеток; гистограмма (*б*) отражает данные кривых роста. Данные представлены в виде средних значений ± SD (N=3), * – p<0,05 по сравнению с контролем; ns – non significant (не достоверное отличие) по сравнению с H₂O₂-обработанными клетками.

5. Изучение роли AMPK в регуляции mTORC1 пути в процессе H₂O₂-индуцированного старения ЭМСК

В настоящей работе мы также оценивали функциональный статус компонентов mTORC1 сигнального пути при активации AMPK метформином в H₂O₂-обработанных ЭМСК, а также исследовали эффекты метформина в отношении стресс-индуцированного старения ЭМСК. Однако мы не обнаружили модуляции фенотипа или пролиферативного статуса стареющих клеток при обработке данным соединением, несмотря на снижение активности участников mTORC1 и p53/p21 сигнальных путей (**рис. 14**). В свете этих результатов, мы предполагаем, что AMPK оказывает слабое влияние на mTORC1 каскад в контексте преждевременного старения ЭМСК и ее активации недостаточно для отмены старения H₂O₂-индуцированных клеток.

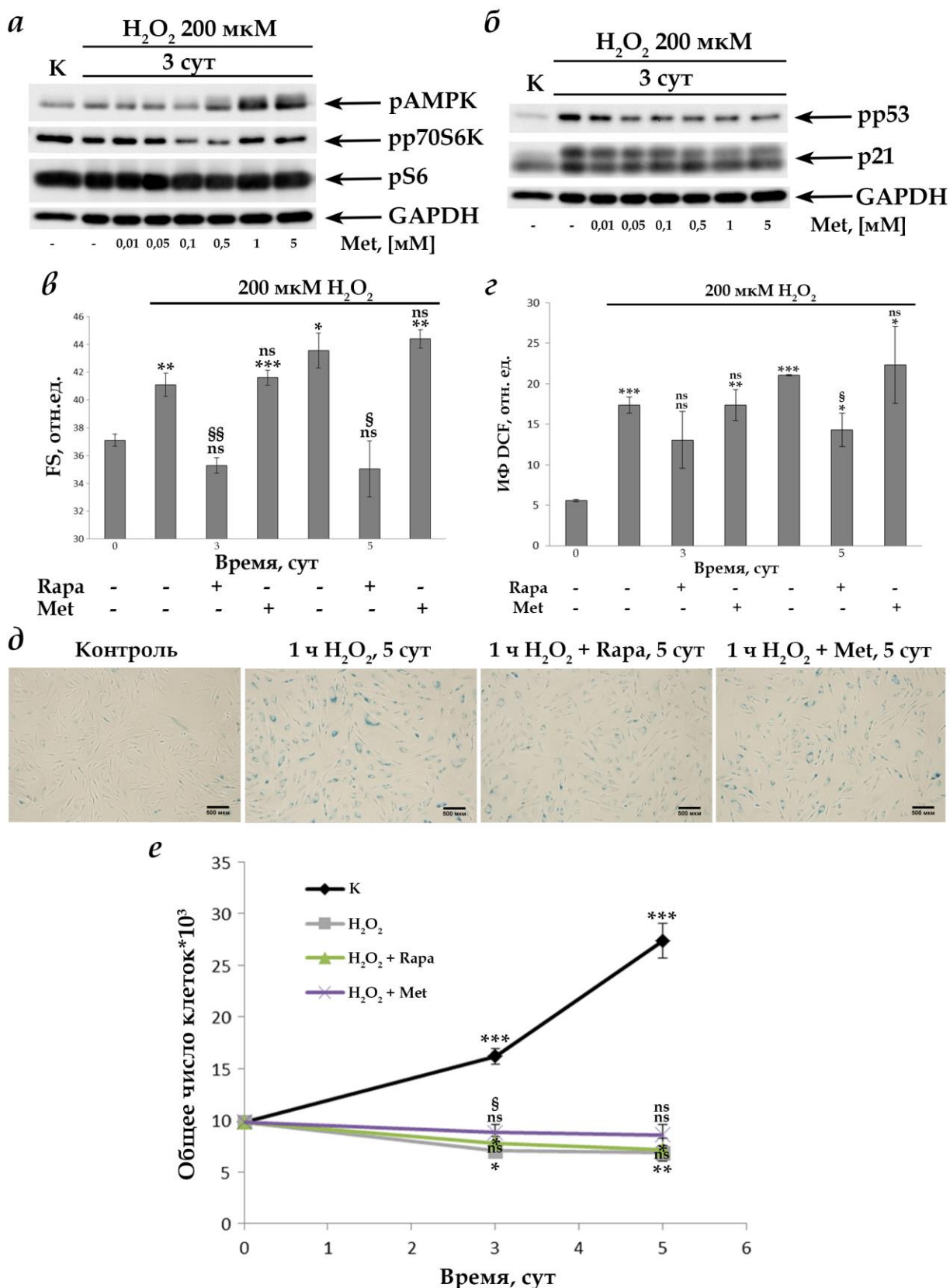


Рис. 14. Эффект метформина на активацию AMPK, активность mTORC1 (а) и p53/p21 (б) сигнальных путей, размер клеток (в), уровень эндогенных АФК (г) и активности SA-β-Gal (д), а также пролиферативный статус (е) H₂O₂-обработанных ЭМСК.

Клетки подвергали окислительному стрессу, инкубируя в среде с добавлением 200 мкМ H_2O_2 в течение 1 ч, а затем культивировали в присутствии 500 мкМ метформина (Met) или 200 нМ Рара в течение указанного времени. С помощью иммуноблотинга проверяли действие метформина в различных концентрациях: для этих экспериментов клетки обрабатывали 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; или 5 мМ метформина в течение 3-х сут после индукции старения. На иммуноблотах (*a*, *б*) с помощью специфических антител выявляли фосфорилированные белки (указаны *стрелками*) сигнальных каскадов mTORC1 и p53/p21, соответственно; *в* – средний размер клеток, определенный по прямому светорассеянию клеток (FS) методом проточной цитометрии; *г* – интенсивность флуоресценции (ИФ) АФК-зависимого зонда $H_2DCF-DA$ (проточная цитометрия); *д* – выявление активности SA- β -Gal в контрольных, H_2O_2 - и (H_2O_2 +Met)-обработанных клетках; кривые роста (*e*) построены на основе данных проточной цитометрии. Данные представлены в виде средних значений \pm SD (N=3), * – $p < 0,005$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,005$ по сравнению с контролем, § – $p < 0,005$; §§ – $p < 0,01$ по сравнению с H_2O_2 -обработанными клетками; ns – non significant (не достоверное отличие) по сравнению с контролем или с H_2O_2 -обработанными клетками.

ОБСУЖДЕНИЕ

В последнее время активно ведутся исследования ответов мезенхимных стволовых клеток человека на различные стрессовые воздействия, такие как окислительный стресс и тепловой шок, УФ- и γ -излучение, так как перспектива практического использования МСК в заместительной клеточной терапии зависит от их всесторонней изученности (Otto, Wright, 2011; Tower, 2012). Было обнаружено, что в ответ на сублетальный стресс МСК могут входить в состояние преждевременного старения (Wang, Jang, 2009; Brandl et al., 2011b; Kim et al., 2011; Alekseenko et al., 2012; Smielova et al., 2012; Ko et al., 2012; Larsen et al., 2012; Burova et al., 2013), сопровождающееся необратимой потерей пролиферации и характерными фенотипическими изменениями. Преждевременное старение стволовых клеток может приводить к утрате их способности регенерировать поврежденные ткани, что следует учитывать при трансплантации стволовых клеток для лечения различных заболеваний. Таким образом, исследование молекулярных механизмов, опосредующих процесс развития преждевременного старения стволовых клеток, имеет несомненную практическую значимость.

Ранее мы показали, что мезенхимные стволовые клетки человека, выделенные из десквамированного эндометрия, подвергаются преждевременному старению в ответ на сублетальный окислительный стресс (Burova et al., 2013). При исследовании механизма стресс-индуцированного старения эМСК мы обнаружили, что в H_2O_2 -обработанных клетках активируются p53/p21/Rb и p38 MAPK сигнальные каскады (Borodkina et al., 2014). На основании литературных данных мы предположили, что mTORC1 путь также может быть вовлечен в развитие преждевременного старения эМСК. С целью проверки этой гипотезы в настоящей работе мы использовали специфический ингибитор mTORC1 – рапамицин (Rapa).

Для подбора условий обработки клеток ингибитором сначала мы оценивали жизнеспособность H_2O_2 -индуцированных эМСК при культивировании их в среде с добавлением Rapa в разных концентрациях. Мы не выявили существенного снижения числа живых клеток в популяции при действии Rapa – выживаемость клеток составила более 70%. Важно подчеркнуть, что такая доля живых клеток остается в популяции при комбинации действия H_2O_2 и Rapa, что согласуется с результатами экспериментов на дермальных фибробластах крайней плоти. При обработке клеток Rapa в разных концентрациях их жизнеспособность была выше 80%. Однако при сочетании УФ-облучения и действия Rapa выживаемость клеток составляла менее 80% (Brenneisen et al., 2000). Далее мы установили, что обработка H_2O_2 -индуцированных клеток Rapa в выбранной нами концентрации приводит к эффективному блокированию

фосфорилирования основных мишеней mTORC1 – S6K, S6 и 4E-BP1, что свидетельствует об ингибировании mTORC1 пути в стареющих эМСК. Другие авторы использовали аналогичную концентрацию ингибитора в своих экспериментах и демонстрировали подавление активности mTORC1 снижением уровня фосфорилирования S6K и S6 (Romanov et al., 2010; Pospelova et al., 2012; Guo et al., 2014). Неполное подавление фосфорилирования белка 4E-BP1 в H₂O₂-стимулированных эМСК в присутствии Rapa можно объяснить тем обстоятельством, что в условиях длительной обработки клеток ингибитором появляется Rapa-устойчивая форма 4E-BP1 (Choo et al., 2008). Нами был выбран вариант постобработки H₂O₂-индуцированных клеток Rapa с постоянным поддержанием ингибитора в ростовой среде для проверки предположения о возможности отмены преждевременного старения эМСК, которое запускается в клетках уже в течение первых минут действия H₂O₂ (Burova et al., 2013). Стоит отметить, что предыдущие попытки обратить H₂O₂-индуцированное старение эМСК в нашей лаборатории были успешными при использовании ингибиторов p38 MAPK – SB203580 и BIRB796 (Borodkina et al., 2014; Бородкина и др., 2016).

Преждевременное старение эМСК характеризуется в первую очередь арестом клеточного цикла и, как следствие, остановкой пролиферации клеток. Таким образом, при выяснении функционального значения mTORC1 в развитии стресс-индуцированного старения эМСК мы, прежде всего, оценивали влияние ингибирования этого белкового комплекса на пролиферативный статус стареющих клеток. Вопреки ожиданиям, мы не наблюдали возобновления пролиферации H₂O₂-обработанных эМСК в присутствии Rapa. Стоит отметить, что литературные сведения, касающиеся восстановления пролиферативного потенциала стареющих клеток в условиях подавления активности mTORC1, противоречивы. С одной стороны, имеются доказательства того, что Rapa способствует возобновлению пролиферативной активности различных типов стареющих клеток. Так, при действии Rapa восстанавливалась пролиферация H₂O₂-индуцированных клеток пигментного эпителия сетчатки ARPE-19, клеток фибросаркомы человека HT1080 с индуцируемым p21 (HT-p21) или p16 (HT-p16) с помощью изопротил-β-тиогалактозидазы (IPTG), NaB-индуцированных HT1080 и эмбриональных фибробластов мышей и крыс ERas (Demidenko et al., 2009b), репликативно стареющих эмбриональных фибробластов крыс (REFs) (Pospelova et al., 2012), гематопозитических стволовых клеток старых мышей (Chen et al., 2014), а также мышинных ГСК ex vivo (Luo et al., 2015). Важно подчеркнуть, что пролиферативный статус H₂O₂- или DOX (доксорубицин)-стимулированных ARPE-19, IPTG-индуцированных HT-p21 и HT-p16, NaB-индуцированных HT1080 и Eras не изменялся в присутствии Rapa, если агент,

вызывающий старение, не удаляли (Demidenko et al., 2009b). С другой стороны, Rara не приводил к возобновлению пролиферации иммортализованных фибробластов человека VJ-T при АКТ-индуцированном старении (Astle et al., 2012), а также NaB-индуцированных эмбриональных фибробластов мышей Eras p21 (Waf1)^{+/+} (Romanov et al., 2010). Такая разница эффектов Rara на пролиферативный потенциал стареющих клеток может быть обусловлена специфичностью использованных клеточных линий, способа индукции старения и его формы. Например, клетки линии HT1080 являются раковыми, что уже предполагает измененный сигналинг и возможность избежать состояние старения этими клетками. Более того, у HT1080 отсутствует белок p16, который мог бы вносить дополнительный вклад в развитие старения. Эмбриональные фибробласты мышей и крыс ERas также являются трансформированными клеточными линиями. В экспериментах с IPTG индукция старения происходит под влиянием только одного фактора – экспрессии p21 или p16. В случае ЭМСК, являющихся первичной клеточной линией, преждевременное старение опосредовано многими факторами, включая повреждение ДНК, и обратить его гораздо сложнее. Стоит отметить, что при H₂O₂-индуцированном старении ARPE-19 не происходило активации белка p53, необходимой для остановки клеточного цикла стареющих ЭМСК, что подразумевает другой механизм старения ARPE-19, который модулируется при действии Rara. Кроме того, схема обработки клеток, у которых восстанавливалась пролиферативная активность, отличается от нашей: как H₂O₂/IPTG/NaB, так и Rara удаляли из ростовой среды и лишь по прошествии нескольких суток оценивали число клеток в популяции.

Отсутствие возобновления пролиферации H₂O₂-обработанных ЭМСК в условиях ингибирования mTORC1 согласуется с тем фактом, что Rara не оказывает влияние на активность p53/p21/Rb сигнального пути, опосредующего установление ареста клеточного цикла в стареющих ЭМСК. В литературе описано сложное взаимовлияние белков mTORC1 и p53. С одной стороны, известно, что p53 ингибирует mTORC1 в ответ на клеточный стресс, включая повреждение ДНК, в частности через активацию PTEN и AMPK (Stambolic et al., 2001; Feng et al., 2005; Reiling, Sabatini, 2006; Hasty et al., 2013). С другой стороны, mTORC1 усиливает функциональную активность p53/p21 пути через активацию S6K, которая в свою очередь фосфорилирует MDM2, негативный регулятор p53, что приводит к накоплению p53 в клетке (Lai et al., 2010). Более того, имеются сведения о подавлении экспрессии белков p53, а также его мишени p21 при действии Rara. Так, Rara снижает экспрессию p53 в диплоидных фибробластах человека, обработанных бромистым этидием (Nacarelli et al., 2014), уровень экспрессии p21 в фибробластах линии WI-38 (Lerner et al., 2013) и в фибробластах кожи VJ (Kolesnichenko

et al., 2012) при их репликативном старении, а также препятствует накоплению p53 и p21 при АКТ-индуцированном старении иммортализованных фибробластов человека ВJ-Т (Astle et al., 2012) и накоплению p53, вызванному отсутствием PTEN в первичных фибробластах мыши (Alimonti et al., 2010). В стареющих эМСК функционирование p53/p21/Rb опосредовано активацией АТМ в ответ на повреждение ДНК (Borodkina et al., 2014). Если Rapa и снижает уровень экспрессии p53, по всей видимости, этого недостаточно для подавления активности p53/p21/Rb пути, запускающегося в клетках в первые минуты после воздействия H₂O₂, так как клетки обрабатывали Rapa уже после окислительного стресса. Таким образом, отменить арест клеточного цикла стареющих эМСК в условиях постобработки Rapa не представляется возможным.

На следующем этапе данной работы представлялось важным исследовать характер изменения основных фенотипических признаков стресс-индуцированного старения эМСК в условиях ингибирования mTORC1. В результате экспериментов нами было установлено, что подавление активности mTORC1 пути с помощью Rapa в H₂O₂-обработанных эМСК приводит к предотвращению увеличения размера клеток, а также способствует снижению активности SA-β-Gal. Таким образом, мы заключили, что mTORC1 участвует в развитии фенотипа старения H₂O₂-стимулированных эМСК. Этот факт представляется вполне логичным в соответствии с многочисленными литературными данными об эффектах Rapa на модуляцию фенотипа стареющих клеток. Показано, что Rapa уменьшает размер H₂O₂-индуцированных кардиомиоцитов крыс (Tu et al., 2002), NaB-индуцированных p21(Waf1)^{+/+} эмбриональных фибробластов мышей ERas (Romanov et al., 2010), а также репликативно стареющих эмбриональных фибробластов крыс (Pospelova et al., 2012); приводит к снижению активности SA-β-Gal в H₂O₂- и DOX-индуцированных клетках пигментного эпителия сетчатки ARPE-19 (Demidenko et al., 2009b), а также в фибробластах линии WI-38 при их репликативном старении (Lerner et al., 2013); способствует уменьшению активности SA-β-Gal и предотвращению гипертрофии IPTG-обработанных клеток фибросаркомы человека HT-p21 (Demidenko, Vlagosklonny, 2008; Demidenko et al., 2009b; Leontieva et al., 2015), а также NaB-индуцированных HT1080 и эмбриональных фибробластов мышей и крыс ERas (Demidenko et al., 2009b); снижает число SA-β-Gal-положительных клеток в популяции ВJ-Т фибробластов человека и препятствует увеличению размера этих клеток при их АКТ-индуцированном старении (Astle et al., 2012); уменьшает количество SA-β-Gal-положительных гломерулярных мезангиальных клеток крыс на 10% в условиях повышенного содержания глюкозы (Li et al., 2012).

Помимо вышеперечисленных результатов, мы показали, что в присутствии Rara в H₂O₂-обработанных клетках существенно уменьшается продукция АФК, вследствие чего можно предположить, что mTORC1 сигнальный путь вовлечен в регуляцию образования АФК в стареющих эМСК. Другие исследователи также наблюдали снижение уровня эндогенных АФК при действии Rara в эндотелиальных клетках роговицы (Shin et al., 2011), в диплоидных фибробластах человека, обработанных бромистым этидием (Nacarelli et al., 2014), а также в репликативно стареющих фибробластах WI-38 (Lerner et al., 2013). Как известно, неблагоприятное действие АФК в клетках нейтрализуют ферменты антиоксидантной защиты. Показано, что Rara усиливает экспрессию генов антиоксидантной защиты в сперматогониальных стволовых клетках старых мышей (Kofman et al., 2012). Возможно, причиной снижения уровня АФК в других клетках может служить подобный эффект Rara.

В ходе настоящей работы мы также установили, что ингибирование активности mTORC1 с помощью Rara приводит к усилению активации всех компонентов Raf/MEK/ERK/p90RSK сигнального каскада в H₂O₂-обработанных клетках. В связи с этим мы заключили, что mTORC1 является негативным регулятором Raf/MEK/ERK/p90RSK пути в стареющих эМСК. Такое же влияние Rara на активность ERK было обнаружено как в нормальных, так и в раковых клетках и осуществлялось через S6K/PI3K/Ras-зависимую петлю обратной связи (Carracedo et al., 2008). Однако другие авторы не наблюдали повышения активности ERK в раковых клетках (Soares et al., 2013). Не исключено, что такое противоречие связано со специфичностью исследуемых клеточных линий.

На следующем этапе исследования мы проанализировали эффекты ингибирования АКТ с помощью LY294002 (LY) на активность mTORC1 сигнального пути в процессе развития стресс-индуцированного старения эМСК, а также на маркеры старения клеток. Как известно, АКТ киназа является основным активатором mTORC1, поэтому мы предположили, что модуляция ее активности может приводить к изменению функционирования mTORC1 пути в H₂O₂-обработанных эМСК, а эффекты LY и Rara на характерные признаки стареющих клеток могут быть идентичными. Кроме того, в литературе описано, что киназа АКТ может выступать индуктором клеточного старения. Показано, что конститутивно активная АКТ запускает преждевременное старение в эндотелиальных клетках человека (Miyachi et al., 2004), в эмбриональных фибробластах мыши (Chen et al., 2005; Mavrakis et al., 2008; Nogueira et al., 2008), в первичных кератиноцитах мыши (Moral et al., 2009), в иммортализованных фибробластах человека ВJ-T (Astle et al., 2012), а также в первичных фибробластах человека (Kolesnichenko et al.,

2012). В результате экспериментов мы выявили индукцию АКТ в клетках вскоре после воздействия H_2O_2 , что согласуется с данными, полученными другими исследователями на первичных неонатальных вентрикулярных миоцитах крыс (Hernández et al., 2011). В таком ключе подавление активности АКТ киназы в H_2O_2 -обработанных эМСК представлялось одним из возможных способов отмены развития их преждевременного старения.

Так как ингибирование АКТ с помощью LY почти полностью блокирует фосфорилирование основных мишеней mTORC1, S6K и S6, мы заключили, что АКТ киназа положительно регулирует функционирование mTORC1 сигнального пути в H_2O_2 -индуцированных эМСК. Исходя из полученных данных, мы предполагаем, что АКТ принимает участие в развитии преждевременного старения эМСК именно за счет активации этого пути, как показано в работах и других авторов (Demidenko, 2009a; Hernández et al., 2011; Astle et al., 2012; Kolesnichenko et al., 2012).

Как и ожидалось, эффекты Rap и LY оказались идентичными. Как и Rap, LY препятствует увеличению размера H_2O_2 -обработанных клеток и повышению активности SA- β -Gal. Эти факты согласуются с результатами других исследователей, которые также наблюдали снижение интенсивности окрашивания на SA- β -Gal в IPTG-обработанных клетках фибросаркомы человека HT1080-p21-9 (HT-p21) (Demidenko, 2009a). Более того, подавление активности АКТ киназы, как и комплекса mTORC1, не способствует возобновлению пролиферации стареющих эМСК. Мы полагаем, что отсутствие эффекта LY на модуляцию пролиферативного статуса H_2O_2 -обработанных клеток, как и в случае с использованием Rap, обусловлено сохранением повышенной активности p53/p21/Rb сигнального пути. Интересно, что Demidenko и соавторы продемонстрировали восстановление пролиферативной активности (IPTG+LY)-обработанных HT-p21 клеток (Demidenko, 2009a). Однако стоит отметить, что в этой работе использовалась совершенно иная схема эксперимента и клеточная линия, как и в других исследованиях, которые подробно обсуждались выше.

В ходе экспериментов нами также было обнаружено, что при действии LY в стареющих эМСК происходит небольшое увеличение фосфорилирования p53 по сравнению с клетками, обработанными только H_2O_2 . В норме АКТ киназа является активатором MDM2, который отправляет p53 на протеасомную деградацию и поддерживает низкий уровень этого белка в клетке (Astle et al., 2012). Принимая во внимание эти литературные сведения, можно предположить, что ингибирование АКТ ведет к повышению уровня активной формы p53 за счет подавления функционирования MDM2.

В настоящей работе мы также оценивали влияние ERK1/2 на активность компонентов mTORC1 сигнального каскада при преждевременном старении эМСК. Вопреки ожиданиям, мы установили, что ингибирование ERK1/2 с помощью U0126 оказывает очень слабый эффект на функционирование mTORC1 сигнального пути в стареющих эМСК. Этот факт противоречит современным представлениям о позитивном влиянии MEK/ERK/p90RSK каскада на функциональный статус mTORC1 (Tee et al., 2002; Brugarolas et al., 2004; Vlagosklonny, 2006; Martelli et al., 2010). Стоит отметить, что в работе Demidenko и соавторов наблюдается подавление активности основных мишеней mTORC1 в присутствии U0126 по прошествии одних суток после индукции старения, однако к третьим суткам, как и в нашем случае, фосфорилирование участников mTORC1 пути восстанавливается (Demidenko, 2009a).

В связи с отсутствием модуляции активности mTORC1 сигнального каскада в условиях ингибирования ERK1/2 сохранение морфологии стареющих эМСК при действии U0126 представляется вполне логичным. Однако, несмотря на то что U0126 не предотвращает гипертрофию H₂O₂-обработанных клеток, мы обнаружили значительное снижение активности SA-β-Gal, чего не было отмечено для (IPTG+U0126)-обработанных НТ-p21 клеток (Demidenko, 2009a). Опираясь на полученные результаты, можно предположить, что повышенная активность SA-β-Gal в стареющих эМСК коррелирует с активностью MAP-киназ ERK1/2 в обход модуляции функционирования mTORC1 сигнального пути. Кроме того, мы показали, что U0126 препятствует увеличению продукции внутриклеточных АФК в H₂O₂-обработанных эМСК. Интересно, что ERK1/2 негативно регулируют FOXO3a, усиливая его взаимодействие с MDM2, в раковых клетках (Yang et al., 2008). Как известно, FOXO3a является транскрипционным фактором и индуцирует экспрессию генов антиоксидантной защиты. Возможно, ERK1/2 опосредуют повышение уровня эндогенных АФК в стареющих эМСК именно через ингибирование FOXO3a, а U0126 нейтрализует этот процесс.

При оценке влияния подавления активности ERK1/2 на пролиферативный статус H₂O₂-обработанных эМСК мы не наблюдали увеличения числа клеток в популяции. Отсутствие возобновления пролиферации стареющих клеток в присутствии U0126 можно объяснить тем, что MEK/ERK/p90RSK сигнальный каскад является каноническим путем, стимулирующим деление клеток в ответ на факторы роста, и подавление его активности, напротив, применяется для остановки пролиферации раковых клеток (Carracedo et al., 2008). Интересно, что IPTG-индуцированные НТ-p21 клетки восстанавливали пролиферативную активность при обработке U0126 (Demidenko, 2009a). Такой эффект

может быть связан с особенностями использованной клеточной линии и способа индукции старения, как уже обсуждалось выше.

При изучении стресс-индуцированного старения эМСК в контексте mTOR сигналинга нам также представлялось интересным исследовать роль АМПК в этом процессе. Мы выявили небольшое подавление активности mTORC1 и p53/p21 сигнальных путей в H₂O₂-обработанных клетках при активации АМПК метформином. Однако нами не была зафиксирована модуляция основных маркеров старения клеток, несмотря на то что в литературе описан положительный эффект индукции АМПК в отношении клеточного старения, в том числе вызванного окислительным стрессом (Ido et al., 2012; Han et al., 2016; Hooten et al., 2016; Marycz et al., 2016). Возможно, отсутствие влияния метформина на фенотип и пролиферативный статус стареющих эМСК связано с тем, что активность АМПК не изменяется в H₂O₂-обработанных клетках по сравнению с интактными, а значит эта киназа вносит небольшой вклад в развитие преждевременного старения эМСК. Таким образом, АМПК оказывает слабое влияние на mTORC1 и не имеет ключевого значения при стресс-индуцированном старении эМСК.

Суммируя все вышеизложенные результаты, можно заключить, что mTOR сигналинг несомненно играет важную роль в преждевременном старении эМСК, главным образом, в развитии фенотипа старения клеток, что согласуется с многочисленными литературными данными о вкладе mTOR в старение клеток различных типов.

ВЫВОДЫ

1. Рапамицин в концентрации 200 нМ эффективно подавляет фосфорилирование основных мишеней mTORC1, S6K, S6 и 4E-BP1, в H₂O₂-обработанных эМСК.
2. Ингибирование mTORC1 не способствует восстановлению пролиферативного потенциала стареющих клеток; не влияет на активность p53/p21/Rb сигнального пути; предотвращает увеличение размера клеток и приводит к снижению уровня АФК и активности SA-β-Gal в стареющих эМСК.
3. Подавление активности mTORC1 способствует усилению активации каждого компонента Raf/MEK/ERK/p90RSK сигнального каскада в H₂O₂-обработанных эМСК.
4. Ингибирование АКТ приводит к снижению активности mTORC1 пути при преждевременном старении эМСК.
5. Подавление активности АКТ киназы способствует предотвращению увеличения размера H₂O₂-обработанных клеток и снижению активности SA-β-Gal, но не приводит к возобновлению пролиферации стареющих клеток и модуляции функционирования p53/p21/Rb пути.
6. Ингибирование ERK1/2 почти не оказывает влияние на активность mTORC1 пути в стареющих эМСК.
7. Подавление активности ERK1/2 способствует снижению уровня АФК и активности SA-β-Gal в H₂O₂-обработанных эМСК, но при этом не приводит к восстановлению пролиферативного потенциала и предотвращению увеличения размера стареющих клеток.
8. АМПК оказывает слабое влияние на mTORC1 и не играет ключевой роли в процессе H₂O₂-индуцированного старения эМСК.

Исполнитель

Грюкова А.А.

Научный руководитель

к.б.н., доц. Спивак И.М.

Научный консультант

к.б.н. Бородкина А.В.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Бородкина А.В., Шатрова А.Н., Никольский Н.Н., Булова Е.Б.* 2016. Роль MAP-киназы p38 в развитии стресс-индуцированного старения эндометриальных стволовых клеток человека. *Цитология*. 58 (6) : 429–435.
2. *Булова Е.Б., Люблинская О.Г., Шатрова А.Н., Бородкина А.В., Никольский Н.Н.* 2012. Сравнительный анализ устойчивости к окислительному стрессу стволовых клеток эндометрия и фибробластов человека. *Цитология*. 54 (6) : 478–483.
3. *Дерябин П.И., Бородкина А.В., Никольский Н.Н., Булова Е.Б.* 2015. Взаимное влияние p53/p21/Rb и MAP-киназных сигнальных путей в эндометриальных стволовых клетках человека в условиях окислительного стресса. *Цитология*. 57 (11) : 788–795.
4. *Земелько В.И., Гринчук Т.М., Домнина А.П., Арцыбашева И.В., Зенин В.В., Кирсанов А.А., Бичева Н.К., Корсаков В.С., Никольский Н.Н.* 2011. Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки десквамированного эндометрия. Выделение, характеристика и использование в качестве фидерного слоя для культивирования эмбриональных стволовых линий человека. *Цитология*. 53 (12) : 919–929.
5. *Зубова С.Г., Шитикова Ж.В., Поспелова Т.В.* 2012. TOR-центрическая концепция регуляции митогенных, метаболических и энергетических сигнальных путей в клетке. *Цитология*. 54 (8) : 589–602.
6. *Москалев А.А.* 2008. Старение и гены. Санкт-Петербург: Наука. 358 с.
7. *Мусина Р.А., Белявский А.В., Тарусова О.В., Соловьева Е.В., Сухих Г.Т.* 2008. Мезенхимальные стволовые клетки эндометрия, полученные из менструальной крови. *Кл. техн. Биол. Мед.* 2 : 110–114.
8. *Пальцев М.А., Смирнов В.Н., Романов Ю.А., Иванов А.А.* 2006. Перспективы использования стволовых клеток в медицине. *Вестник Российской академии наук*. 76 (2) : 99–111.
9. *Чертков П.Л., Фриденштейн А.Я.* 1977. Клеточные основы кроветворения. Кроветворные клетки-предшественники. *Медицина*. 274.
10. *Abdallah B.M., Haack-Sørensen M., Burns J.S., Elsnab B., Jakob F., Hokland P., Kassem M.* 2005. Maintenance of differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene despite [corrected] extensive proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*. 326 : 527–538.
11. *Agarwal A., Gupta S., Sharma R.K.* 2005. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol*. 3 : 28.
12. *Ahn J., Urist M., Prives C.* 2004. The Chk2 protein kinase. *DNA Repair*. 3 : 1039–1047.

13. *Alekseenko L.L., Zemelko V.I., Zenin V.V., Pugovkina N.A., Kozhukharova I.V., Kovaleva Z.V., Grinchuk T.M., Fridlyanskaya I.I., Nikolsky N.N.* 2012. Heat shock induces apoptosis in human embryonic stem cells but a premature senescence phenotype in their differentiated progeny. *Cell Cycle*. 11 : 3260–3269.
14. *Alimonti A., Nardella C., Chen Z., Clohessy J.G., Carracedo A., Trotman L.C., Cheng K., Varmeh S., Kozma S.C., Thomas G., Rosivatz E., Woscholski R., Cognetti F., Scher H.I., Pandolfi P.P.* 2010. A novel type of cellular senescence that can be enhanced in mouse models and human tumor xenografts to suppress prostate tumorigenesis. *J Clin Invest*. 120 (3) : 681–693.
15. *Alimova I.N., Liu B., Fan Z., Edgerton S.M., Dillon T., Lind S.E., Thor A.D.* 2009. Metformin inhibits breast cancer cell growth, colony formation and induces cell cycle arrest in vitro. *Cell Cycle*. 8 : 909–915.
16. *Allen R.G., Tresini M., Keogh B.P., Doggett D.L., Cristofalo V.J.* 1999. Differences in electron transport potential, antioxidant defenses, and oxidant generation in young and senescent fetal lung fibroblasts (WI-38). *J Cell Physiol*. 180 : 114–122.
17. *Astle M.V., Hannan K.M., Ng P.Y., Lee R.S., George A.J., Hsu A.K., Haupt Y., Hannan R.D., Pearson R.B.* 2012. AKT induces senescence in human cells via mTORC1 and p53 in the absence of DNA damage: implications for targeting mTOR during malignancy. *Oncogene* 31 : 1949–1962.
18. *Bakkenist C.J., Kastan M.B.* 2004. Initiating Cellular Stress Responses. *Cell*. 118 : 9–17.
19. *Banfi A., Bianchi G., Notaro R., Luzzatto L., Cancedda R., Quarto R.* 2002. Replicative aging and gene expression in long-term cultures of human bone marrow stromal cells. *Tissue Eng*. 8 : 901–910.
20. *Baxter M.A., Wynn R.F., Jowitt S.N., Wraith J.E., Fairbairn L.J., Bellantuono I.* 2004. Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells*. 22 : 675–682.
21. *Becker A.J., McCulloch E.A., Till J.E.* 1963. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*. 197 : 452–454.
22. *Beuvink I., Boulay A., Fumagalli S., Zilbermann F., Ruetz S., O'Reilly T., Natt F., Hall J., Lane H.A., Thomas G.* 2005. The mTOR inhibitor RAD001 sensitizes tumor cells to DNA-damaged induced apoptosis through inhibition of p21 translation. *Cell*. 120 : 747–759.
23. *Blackburn E.H., Gall J.G.* 1978. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena. *J Mol Biol*. 120 : 33–53.
24. *Blagosklonny M.V.* 2006. Aging and immortality: quasi-programmed senescence and its pharmacologic inhibition. *Cell Cycle*. 5 (18) : 2087–2102.

25. *Blagosklonny M.V.* 2012. Cell cycle arrest is not yet senescence, which is not just cell cycle arrest: terminology for TOR-driven aging. *Aging*. 4 : 159–165.
26. *Bokeria L., Bogin V., Bokeria O., Le T., Alekryan B., Woods E.J., Brown A.A., Ichim T.E., Patel A.N.* 2013. Endometrial regenerative cells for treatment of heart failure: a new stem cells in clinic. *J Transl Med*. 11: 56.
27. *Bokeria L., Bogin V., Bokeria O., Le T., Alekryan B., Woods E.J., Brown A.A., Ichim T.E., Patel A.N.* 2013. Endometrial regenerative cells for treatment of heart failure: a new stem cells in clinic. *J Transl Med*. 11 : 56.
28. *Borodkina A., Shatrova A., Abushik P., Nikolsky N., Burova E.* 2014. Interaction between ROS dependent DNA damage, mitochondria and p38 MAPK underlies senescence of human adult stem cells. *Aging*. 6 : 481–495.
29. *Bosotti R., Isacchi A., Sonnhammer E.L.* 2000. FAT: A novel domain in PIK-related kinases. *Trends Biochem. Sci.* 25 : 225-227.
30. *Bradford M.M.* 1976. A rapid and sensitive method for the quantification microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*. 72 : 248–254.
31. *Brandl A., Hartmann A., Bechmann V., Graf B., Nerlich M., Angele P.* 2011a. Oxidative stress induces senescence in chondrocytes. *J Orthop Res*. 29 : 1114–1120.
32. *Brandl A., Meyer M., Bechmann V., Nerlich M., Angele P.* 2011b. Oxidative stress induces senescence in human mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res*. 317 : 1541–1547.
33. *Brenneisen P., Wenk J., Wlaschek M., Krieg T., Scharffetter-Kochanek K.* 2000. Activation of p70 ribosomal protein S6 kinase is an essential step in the DNA damage-dependent signaling pathway responsible for the ultraviolet B-mediated increase in interstitial collagenase (MMP-1) and stromelysin-1 (MMP-3) protein levels in human dermal fibroblasts. *The Journal Of Biological Chemistry*. 275 (6) : 4336–4344.
34. *Brown J.P., Wei W., Sedivy J.M.* 1997. Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science*. 277 : 831–834.
35. *Brugarolas J., Lei K., Hurley R.L., Manning B.D., Reiling J.H., Hafen E., Witters L.A., Ellisen L.W., Kaelin W.G. Jr.* 2004. Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev*. 18 (23) : 2893–2904.
36. *Budanov A.V., Karin M.* 2008. p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell*. 134 : 451–460.
37. *Burova E., Borodkina A., Shatrova A., Nikolsky N.* 2013. Sublethal oxidative stress induces the premature senescence of human mesenchymal stem cells derived from endometrium. *Oxid Med Cell Longev*. 2013 : 474931.

38. Buscemi G., Perego P., Carenini N., Nakanishi M., Chessa L., Chen J., Khanna K., Delia D. 2004. Activation of ATM and Chk2 kinases in relation to the amount of DNA strand breaks. *Oncogene*. 23 : 7691–7700.
39. Campisi J., d'Adda di Fagagna F. 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8 : 729–740.
40. Carracedo A., Ma L., Teruya-Feldstein J., Rojo F., Salmena L., Alimonti A., Egia A., Sasaki A. T., Thomas G., Kozma S. C., Papa A., Nardella C. Cantley L. C., Baselga J., Pandolfi P. 2008. Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J. Clin. Invest*. 118 : 3065–3074.
41. Cervelló I., Mas A., Gil-Sanchis C., Simón C. 2013. Somatic stem cells in the human endometrium. *Semin Reprod Med*. 31 : 69–76.
42. Chan R.W., Schwab K.E., Gargett C.E. 2004. Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells. *Biol Reprod*. 70 : 1738–1750.
43. Chappell W.H., Steelman L.S., Long J.M., Kempf R.C., Abrams S.L., Franklin R.A., Bäsecke J., Stivala F., Donia M., Fagone P., Malaponte G., Mazzarino M.C., Nicoletti F., Libra M., Maksimovic-Ivanic D., Mijatovic S., Montalto G., Cervello M., Laidler P., Milella M., Tafuri A., Bonati A., Evangelisti C., Cocco L., Martelli A.M., McCubrey J. 2011. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health. *Oncotarget*. 2 : 135–164.
44. Chen C., Liu Y., Liu Y., Zheng P. 2009. mTOR regulation and therapeutic rejuvenation of aging hematopoietic stem cells. *Sci Signal*. 2 (98) : ra75.
45. Chen Q.M., Bartholomew J.C., Campisi J., Acosta M., Reagan J.D., Ames B.N. 1998. Molecular analysis of H₂O₂-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication. *Biochem J*. 332 : 4–50.
46. Chen Q.M., Fischer A., Reagan J.D., Yan L.J., Ames B.N. 1995. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci*. 92 : 4337–4341.
47. Chen Z., Trotman L.C., Shaffer D., Lin H.K., Dotan Z.A., Niki M., Koutcher J.A., Scher H.I., Ludwig T., Gerald W., Cordon-Cardo C., Pandolfi P.P. 2005. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature*. 436 (7051) : 725–730.
48. Cho N.H., Park Y.K., Kim Y.T., Yang H., Kim S.K. 2004. Lifetime expression of stem cell markers in the uterine endometrium. *Fertil Steril*. 81 : 403–407.
49. Choo A.Y., Yoon S.O., Kim S.G., Roux P.P., Blenis J. 2008. Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 105 : 17414–17419.

50. *Cmielova J., Havelek R., Soukup T., Jiroutova A., Visek B., Suchanek J., Vavrova J., Mokry J., Muthna D., Bruckova L., Filip S., English D., Rezacova M.* 2012. Gamma radiation induces senescence in human adult mesenchymal stem cells from bone marrow and periodontal ligaments. *Int J Radiat. Biol.* 88 : 393–404.
51. *Cui C.H., Uyama T., Miyado K., Terai M., Kyo S., Kiyono T., Umezawa A.* 2007. Menstrual blood-derived cells confer human dystrophin expression in the murine model of Duchenne muscular dystrophy via cell fusion and myogenic transdifferentiation. *Mol Biol Cell.* 18 : 1586–1594.
52. *da Silva Meirelles L., Chagastelles P.C., Nardi N.B.* 2006. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci.* 119 : 2204–2213.
53. *De Bari C., Dell'Accio F., Tylzanowski P., Luyten F.P.* 2001. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 44 : 1928–1942.
54. *Demidenko Z.N., Blagosklonny M.V.* 2008. Growth stimulation leads to cellular senescence when the cell cycle is blocked. *Cell Cycle.* 7 : 3355–3361.
55. *Demidenko Z.N., Shtutman M., Blagosklonny M.V.* 2009a. Pharmacologic inhibition of MEK and PI-3K converges on the mTOR/S6 pathway to decelerate cellular senescence. *Cell Cycle.* 8 : 1896–1900.
56. *Demidenko Z.N., Zubova S.G., Bukreeva E.I., Pospelov V.A., Pospelova T.V., Blagosklonny M.V.* 2009b. Rapamycin decelerates cellular senescence. *Cell Cycle.* 8 : 1888–1895.
57. *Di Filippo C., Cuzzocrea S., Rossi F., Marfella R., D'Amico M.* 2006. Oxidative stress as the leading cause of acute myocardial infarction in diabetics. *Cardiovasc Drug Rev.* 24 : 77–87.
58. *Digirolamo C.M., Stokes D., Colter D., Phinney D.G., Class R., Prockop D.J.* 1999. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colonyforming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol.* 107 : 275–281.
59. *Dimri G., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E., Linskens M., Rubelj I., Pereira-Smith O., Peacocke M., Campisi J.* 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Nat Acad Sci.* 92 : 9363–9367.
60. *Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop Dj., Horwitz E.* 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells: the international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy.* 8 : 315–317.

61. Duan J., Zhang Z., Tong T. 2005. Irreversible cellular senescence induced by prolonged exposure to H₂O₂ involves DNA-damage-and-repair genes and telomere shortening. *Int J Biochem Cell Biol.* 37 : 1407–1420.
62. Dumont P., Burton M., Chen Q.M., Gonos E.S., Frippiat C., Mazarati J.B., Eliaers F., Remacle J., Toussaint O. 2000. Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free Rad Biol Med.* 28 : 361–373.
63. Erices A., Conget P., Minguell J.J. 2000. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol.* 109 : 235–242.
64. Evans M.J., Kaufman M.H. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 292 : 154–156.
65. Feng Z., Zhang H., Levine A.J., Jin S. 2005. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102 (23) : 8204–8209.
66. Ferrari G., Cusella-De Angelis G., Coletta M., Paolucci E., Stornaiuolo A., Cossu G., Mavilio F. 1998. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science.* 279 : 1528–1530.
67. Fortier L.A. 2005. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Vet Surg.* 34 : 415–423.
68. Foster K.G., Fingar D.C. 2010. Mammalian target of rapamycin (mTOR) conducting the cellular signaling symphony. *J. Biol. Chem.* 285 : 14071–14077.
69. Foster L.J., Zeemann P.A., Li C., Mann M., Jensen O.N., Kassem M. 2005. Differential expression profiling of membrane proteins by quantitative proteomics in a human mesenchymal stem cell line undergoing osteoblast differentiation. *Stem Cells.* 23 : 1367–1377.
70. Gargett C.E. 2007. Uterine stem cells: what is the evidence? *Hum Reprod Update.* 13 : 87–101.
71. Greider C.W., Blackburn E.H. 1985. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell.* 43 (2 Pt 1) : 405–413.
72. Gronthos S., Mankani M., Brahimi J., Robey P.G., Shi S. 2000. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci.* 97 : 13625–13630.
73. Guo N., Yan A., Gao X., Chen Y., He X., Hu Z., Mi M., Tang X., Gou X. 2014. *Molecular Medicine Reports.* 10 : 3132–3138.
74. Han X., Meng X., Yin Z., Rogers A., Zhong J., Rillema P., Jackson J.A., Ichim T.E., Mineev B., Carrier E., Patel A.N., Murphy M.P., Min W.P., Riordan N.H. 2009. Inhibition of intracranial glioma growth by endometrial regenerative cells. *Cell Cycle.* 8 : 606–610.

75. Han X., Tai H., Wang X., Wang Z., Zhou J., Wei X., Ding Y., Gong H., Mo C., Zhang J., Qin J., Ma Y., Huang N., Xiang R., Xiao H. 2016. AMPK activation protects cells from oxidative stress-induced senescence via autophagic flux restoration and intracellular NAD⁺ elevation. *Aging Cell*. 15 : 416–427.
76. Harbo M., Koelvraa S., Serakinci N., Bendix L. 2012. Telomere dynamics in human mesenchymal stem cells after exposure to acute oxidative stress. *DNA Repair (Amst)*. 11 : 774–779.
77. Hasty P., Sharp Z.D., Curiel T.J., Campisi J. 2013. mTORC1 and p53. Clash of the gods? *Cell Cycle*. 12 (1) 20–25.
78. Hayflick L., Moorhead P.S. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 25 : 585–621.
79. Hernández G., Lal H., Fidalgo M., Guerrero A., Zalvide J., Force T., Pombo C.M. 2011. A novel cardioprotective p38-MAPK/mTOR pathway. *Exp Cell Res*. 317 (20) : 2938–2949.
80. Herzog E.L., Chai L., Krause D.S. 2003. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood*. 102 : 3483–3493.
81. Hida N., Nishiyama N., Miyoshi S., Kira S., Segawa K., Uyama T., Mori T., Miyado K., Ikegami Y., Cui C., Kiyono T., Kyo S., Shimizu T., Okano T., Sakamoto M., Ogawa S., Umezawa A. 2008. Novel cardiac precursor-like cells from human menstrual blood-derived mesenchymal cells. *Stem Cells*. 26 : 1695–1704.
82. Hooten N.N., Martin-Montalvo A., Dluzen D.F., Zhang Y., Bernier M., Zonderman A.B., Becker K.G., Gorospe M., de Cabo R., Evans M.K. 2016. Metformin-mediated increase in DICER1 regulates microRNA expression and cellular senescence. *Aging Cell*. 15 : 572–581.
83. Hutter E., Renner K., Pfister G., Stöckl P., Jansen-Dürr P., Gnaiger E. 2004. Senescence-associated changes in respiration and oxidative phosphorylation in primary human fibroblasts. *Biochem J*. 380 : 919–928.
84. Ichim T.E., Alexandrescu D.T., Solano F., Lara F., Campion Rde N., Paris E., Woods E.J., Murphy M.P., Dasanu C.A., Patel A.N., Marleau A.M., Leal A., Riordan N.H. 2010. Mesenchymal stem cells as anti-inflammatories: implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Cell Immunol*. 260 : 75–82.
85. Ido Y., Durantón A., Lan F., Cacicedo J.M., Chen T.C., Breton L., Ruderman N.B. 2012. Acute activation of AMP-activated protein kinase prevents H₂O₂-induced premature senescence in primary human keratinocytes. *PLoS ONE* 7 (4) : e35092.
86. Iwasa H., Han J., Ishikawa F. 2003. Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway. *Genes Cells*. 8 : 131–144.

87. *Jabbour H.N., Kelly R.W., Fraser H.M., Critchley H.O. 2006.* Endocrine regulation of menstruation. *Endocr Rev.* 27 : 17–46.
88. *Julien L.-A., Carriere A., Moreau J., Roux P. P. 2010.* mTORC1-activated S6K1 phosphorylates rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling. *Mol. Cell. Biol.* 30 : 908–921.
89. *Jung M.S., Jin D.H., Chae H.D., Kang S., Kim S.C., Bang Y.J., Choi T.S., Choi K.S., Shin D.Y. 2004.* Bcl-xL and E1B-19K proteins inhibit p53-induced irreversible growth arrest and senescence by preventing reactive oxygen species-dependent p38 activation. *J Biol Chem.* 279 : 17765–17771.
90. *Karlseder J., Smogorzewska A., de Lange T. 2002.* Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. *Science.* 295 : 2446–2449.
91. *Keating A. 2006.* Mesenchymal stromal cells. *Curr Opin Hematol.* 13 : 419–425.
92. *Kim J.S., Kim E.J., Kim H.J., Yang J.Y., Hwang G.S., Kim C.W. 2011.* Proteomic and metabolomic analysis of H₂O₂-induced premature senescent human mesenchymal stem cells. *Exp Gerontol.* 46 : 500–510.
93. *Ko E., Lee K.Y., Hwang D.S. 2012.* Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells undergo cellular senescence in response to oxidative stress. *Stem Cells Develop.* 21 : 1877–1886.
94. *Kofman A.E., McGraw M.R., Payne C.J. 2012.* Rapamycin increases oxidative stress response gene expression in adult stem cells. *Aging (Albany NY).* 4 (4) : 279–289.
95. *Kolesnichenko M., Hong L., Liao R., Vogt P.K., Sun P. 2012.* Attenuation of TORC1 signaling delays replicative and oncogenic RAS-induced senescence. *Cell Cycle.* 11 : 2391–2401.
96. *Ksiazek K., Passos J.F., Olijslagers S., Saretzki G., Martin-Ruiz C., von Zglinicki T. 2007.* Premature senescence of mesothelial cells is associated with non-telomeric DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun.* 362 : 707–711.
97. *Kurz D.J. 2004.* Telomere biology in cardiovascular disease. *Kardiovaskulare Medizin.* 7 : 433–442.
98. *Kuznetsov S.A., Mankani M.H., Gronthos S., Satomura K., Bianco P., Robey P.G. 2001.* Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol.* 153 : 1133–1140.
99. *Laemmli U.K. 1970.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227 : 680–685.

100. *Lai K.P., Leong W.F., Chau J.F., Jia D., Zeng L., Liu H., He L., Hao A., Zhang H., Meek D., Velagapudi C., Habib S.L., Li B. 2010.* S6K1 is a multifaceted regulator of Mdm2 that connects nutrient status and DNA damage response. *EMBO J.* 29 (17) : 2994–3006.
101. *Larsen S.A., Kassem M., Rattan S.I. 2012.* Glucose metabolite glyoxal induces senescence in telomerase-immortalized human mesenchymal stem cells. *Chem Cent J.* 6 : 18.
102. *Lee A.C., Fenster B.E., Ito H., Takeda K., Bae N.S., Hirai T., Yu Z.X., Ferrans V.J., Howard B.H., Finkel T. 1999.* Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *J Biol Chem.* 274 : 7936–7940.
103. *Leontieva O.V., Demidenko Z.N., Blagosklonny M.V. 2015.* Dual mTORC1/C2 inhibitors suppress cellular geroconversion (a senescence program). *Oncotarget.* 6 (27) : 23238–23248.
104. *Lerner C., Bitto A., Pulliam D., Nacarelli T., Konigsberg M., Remmen H.V., Torres C., Sell C. 2013.* Reduced mammalian target of rapamycin activity facilitates mitochondrial retrograde signaling and increases life span in normal human fibroblasts *Aging Cell.* 12 : 966–977.
105. *Li J., Bai X., Cui S., Fu B., Chen X. 2012.* Effect of rapamycin on high glucose-induced autophagy impairment, oxidative stress and premature senescence in rat mesangial cells in vitro. *Journal Of Southern Medical University.* 32 (4) : 467–471.
106. *Loewith R., Jacinto E., Wullschleger S., Lorberg A., Crespo J., Bonenfant D., Oppliger W., Jenoe P., Hall M. N. 2002.* Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol. Cell.* 10 : 457–468.
107. *Lopez-Aviles S., Grande M., Gonzalez M., Helgesen A.L., Alemany V., Sanchez-Piris M., Bachs O., Millar J.B., Aligue R. 2005.* Inactivation of the Cdc25 phosphatase by the stressactivated Srk1 kinase in fission yeast. *Mol Cell.* 17 : 49–59.
108. *Lu T., Finkel T. 2008.* Free radicals and senescence. *Exp Cell Res.* 314 : 1918–1922.
109. *Lukas C., Falck J., Bartkova J., Bartek J., Lukas, J. 2003.* Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage. *Nature Cell Biol.* 5 : 255–260.
110. *Luo Y., Li L., Zou P., Wang J., Shao L., Zhou D., Liu L. 2014.* Rapamycin enhances long-term hematopoietic reconstitution of ex vivo expanded mouse hematopoietic stem cells by inhibiting senescence. *Transplantation.* 97 (1) : 20–9.
111. *Ma X. M., Blenis J. 2009.* Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 10 : 307–318.
112. *Macip S., Igarashi M., Berggren P., Yu J., Lee S.W., Aaronson S.A. 2003.* Influence of induced reactive oxygen species in p53-mediated cell fate decisions. *Mol Cell Biol.* 23 : 8576–8585.

113. *Macip S., Igarashi M., Fang L., Chen A., Pan Z.Q., Lee S.W., Aaronson S.A. 2002.* Inhibition of p21-mediated ROS accumulation can rescue p21-induced senescence. *EMBO J.* 21 : 2180–2188.
114. *Martelli A.M., Evangelisti C., Chiarini F., McCubrey J. A. 2010.* The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR signaling network as a therapeutic target in acute myelogenous leukemia patients. *Oncotarget.* 1 : 89–103.
115. *Martens U.M., Chavez E.A., Poon S.S., Schmoor C., Lansdorp P.M. 2000.* Accumulation of short telomeres in human fibroblasts prior to replicative senescence. *Exp Cell Res.* 256 : 291–299.
116. *Marycz K., Tomaszewski K.A., Kornicka K., Henry B.M., Wronski S., Tarasiuk J., Maredziak M. 2016.* Metformin decreases reactive oxygen species, enhances osteogenic properties of adipose-derived multipotent mesenchymal stem cells *in vitro*, and increases bone density *in vivo*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2016 : 9785890.
117. *Mavrakis K.J., Zhu H., Silva R.L.A., Mills J.R., Teruya-Feldstein J., Lowe S.W., Tam W., Pelletier J., Wendel H.G. 2008.* Tumorigenic activity and therapeutic inhibition of Rheb GTPase. *Genes Dev.* 22 : 2178–2188.
118. *Maximow A.A. 1909.* Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere. *Folia Haematologica.* 8 : 125–134.
119. *McConnell B.B., Gregory F.J., Stott F.J., Hara E., Peters G. 1999.* Induced expression of p16 (INK4a) inhibits both CDK4- and CDK2-associated kinase activity by reassortment of cyclin-CDK inhibitor complexes. *Mol Cell Biol.* 19 : 1981–1989.
120. *Medrano E.E., Im S., Yang F., Abdel-Malek Z.A. 1995.* Ultraviolet B light induces G1 arrest in human melanocytes by prolonged inhibition of retinoblastoma protein phosphorylation associated with long-term expression of the p21Waf-1/SDI-1/Cip-1 protein. *Cancer Res.* 55 : 4047–4052.
121. *Meng X., Ichim T.E., Zhong J., Rogers A., Yin Z., Jackson J., Wang H., Ge W., Bogin V., Chan K.W., Thébaud B., Riordan N.H. 2007.* Endometrial regenerative cells: A novel stem cell population. *J Transl Med.* 5 : 57.
122. *Mezey E., Chandross K.J., Harta G. Maki R.A., McKercher S.R. 2000.* Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated *in vivo* from bone marrow. *Science.* 290 : 1779–1782.
123. *Minguell J.J., Erices A., Conget P. 2001.* Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med.* 226 : 507–520.

124. *Miura T., Mattson M.P., Rao M.S. 2004.* Cellular lifespan and senescence signaling in embryonic stem cells. *Aging Cell.* 3 : 333–343.
125. *Miyauchi H., Minamino T., Tateno K., Kunieda T., Toko H., Komuro I. 2004.* Akt negatively regulates the in vitro lifespan of human endothelial cells via a p53/p21-dependent pathway. *EMBO J.* 23 (1) : 212–220.
126. *Moral M., Segrelles C., Lara M., Martinez-Cruz A., Lorz C., Santos M., García-Escudero R., Lu J., Kiguchi K., Buitrago A., Costa C., Saiz C., Rodriguez-Peralto J.L., Martinez-Tello F.J., Rodriguez-Pinilla M., Sanchez-Céspedes M., Garín M., Grande T., Bravo A., DiGiovanni J., Paramio J.M. 2009.* Akt activation synergizes with Trp53 loss in oral epithelium to produce a novel mouse model for head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 69 : 1099–1108.
127. *Murphy M.P., Wang H., Patel A.N., Kambhampati S., Angle N., Chan K., Marleau A.M., Pysznik A., Carrier E., Ichim T.E., Riordan N.H. 2008.* Allogeneic endometrial regenerative cells: An «Off the shelf solution» for critical limb ischemia? *J Transl Med.* 6 : 45.
128. *Nacarelli T., Azar A., Sell C. 2014.* Inhibition of mTOR prevents ROS production initiated by ethidium bromide-induced mitochondrial DNA depletion. *Front Endocrinol (Lausanne).* 5 : 122.
129. *Nagori C.B., Panchal S.Y., Patel H. 2011.* Endometrial regeneration using autologous adult stem cells followed by conception by in vitro fertilization in a patient of severe Asherman’s syndrome. *J Hum Reprod Sci.* 4 : 43–48.
130. *Nogueira V., Park Y., Chen C.-C., Xu P.-Z., Chen M.-L., Tonic I., Unterman T., Hay N. 2008.* Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis. *Cancer Cell.* 14 (6) : 458–470.
131. *Ogryzko V.V., Wong P., Howard B.H. 1997.* WAF1 retards S-phase progression primarily by inhibition of cyclin-dependent kinases. *Mol Cell Biol.* 17 : 4877–4882.
132. *Oh C.W., Bump E.A., Kim J.S., Janigro D., Mayberg M.R. 2001.* Induction of a senescence-like phenotype in bovine aortic endothelial cells by ionizing radiation. *Radiat Res.* 156 : 232–240.
133. *Olovnikov A.M. 1973.* A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol.* 41 : 181–190.
134. *Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Jakoniuk I., Anderson S. M., Li B., Pickel J., McKay R., Nadal-Ginard B., Bodine D.M., Leri A., Anversa P. 2001.* Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410 : 701–705.

135. *Otto W.R., Wright N.A. 2011. Mesenchymal stem cells: from experiment to clinic. Fibrogenesis Tissue Repair. 4 : 20.*
136. *Oyama Y., Hayashi A., Ueha T., Maekawa K. 1994. Characterization of 2',7'dichlorofluorescein fluorescence in dissociated mammalian brain neurons: estimation on intracellular content of hydrogen peroxide. Brain Res. 635 : 113–117.*
137. *Padykula H.A. 1991. Regeneration in the primate uterus: the role of stem cells. Ann NY Acad Sci. 622 : 47–56.*
138. *Passos J.F., Nelson G., Wang C., Richter T., Simillion C., Proctor C.J., Miwa S., Olijslagers S., Hallinan J., Wipat A., Saretzki G., Rudolph K.L., Kirkwood T.B., von Zglinicki T. 2010. Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. Mol Syst Biol. 6 : 347.*
139. *Passos J.F., Saretzki G., Ahmed S., Nelson G., Richter T., Peters H., Wappler I., Birket M.J., Harold G., Schaeuble K., Birch-Machin M.A., Kirkwood T.B., von Zglinicki T. 2007a. Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence. PLoS Biol. 5 : e110.*
140. *Passos J.F., Saretzki G., von Zglinicki T. 2007b. DNA damage in telomeres and mitochondria during cellular senescence: is there a connection? Nucleic Acids Res. 35: 7505–7513.*
141. *Patel A.N., Park E., Kuzman M., Benetti F., Silva F.J., Allickson J.G. 2008. Multipotent menstrual blood stromal stem cells: isolation, characterization, and differentiation. Cell Transpl. 17 : 303–311.*
142. *Petersen B.E., Bowen W.C., Patrene K.D., Mars W.M., Sullivan A.K., Murase N., Boggs S.S., Greenberger J.S., Goff J.P. 1999. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. Science. 284 : 1168–1170.*
143. *Polyak K., Xia Y., Zweier J.L., Kinzler K.W., Vogelstein B. 1997. A model for p53-induced apoptosis. Nature. 389 : 300–305.*
144. *Pospelova T.V., Demidenko Z.N., Bukreeva E.I., Pospelov V.A., Gudkov A.V., Blagosklonny M.V. 2009. Pseudo-DNA damage response in senescent cells. Cell Cycle. 8 (24) : 4112–4118.*
145. *Pospelova T.V., Leontieva O.V., Bykova T.V., Zubova S.G., Pospelov V.A., Blagosklonny M.V. 2012. Suppression of replicative senescence by rapamycin in rodent embryonic cells. Cell Cycle. 11 (12) : 2402-2407.*
146. *Prianishnikov V.A. 1978. On the concept of stem cell and a model of functionalmorphological structure of the endometrium. Contraception. 18 : 213–223.*

147. Prusa A.R., Marton E., Rosner M., Bernaschek G., Hengstschlager M. 2003. Oct4 expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research? *Hum Reprod.* 18 (7) : 1489–1493.
148. Rai P., Onder T.T., Young J.J., McFaline J.L., Pang B., Dedon P.C., Weinberg R.A. 2008. Continuous elimination of oxidized nucleotides is necessary to prevent rapid onset of cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci.* 106 : 169–174.
149. Reiling J.H., Sabatini D.M. 2006. Stress and mTOR signaling. *Oncogene.* 25 : 6373–6383.
150. Reinhardt H.C., Aslanian A.S., Lees J.A. Yaffe M.B. 2007. p53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage. *Cancer Cell.* 11 : 175–189.
151. Reinhardt H.C., Cannell I.G., Morandell S., Yaffe M.B. 2011. Is post-transcriptional stabilization, splicing and translation of selective mRNAs a key to the DNA damage response? *Cell Cycle.* 10 : 23–27.
152. Rodríguez-Jiménez F.J., Moreno-Manzano V., Mateos-Gregorio P., Royo I., Erceg S., Murgua J.R., Sánchez-Puelles J.M. 2010. FM19G11: A new modulator of HIF that links mTOR activation with the DNA damage checkpoint pathways. *Cell Cycle.* 2010. 9 (14) : 2803–2813.
153. Romanov V.S., Abramova M.V., Svetlikova S.B., Bykova T.V., Zubova S.G., Aksenov N.D., Fornace A.J., Pospelova T.V., Pospelov V.A. 2010. p21Waf1 is required for cellular senescence but not for cell cycle arrest induced by the HDAC inhibitor sodium butyrate. *Cell Cycle.* 9 (19) : 3945-3955.
154. Russell R.C., Fang C., Guan K.-L. 2011. An emerging role for TOR signaling in mammalian tissue and stem cell physiology. *Development.* 138 : 3343–3356.
155. Sarbassov D.D., Ali S.M., Sabatini D.M. 2005a. Growing roles for the mTOR pathway. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 17 : 596–603.
156. Sarbassov D.D., Ali S.M., Sengupta S., Sheen J.H., Hsu P.P., Bagley A.F., Markhard A.L., Sabatini D.M. 2006. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol. Cell.* 22 : 159–168.
157. Sarbassov D.D., Guertin D.A., Ali S.M., Sabatini D.M. 2005b. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* 307 : 1098–1101.
158. Sengupta S., Peterson T.R., Sabatini D.M. 2010. Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Mol Cell.* 40 : 310–322.

159. Serra V., von Zglinicki T., Lorenz M., Saretzki G. 2003. Extracellular superoxide dismutase is a major antioxidant in human fibroblasts and slows telomere shortening. *J Biol Chem.* 278 : 6824–6830.
160. Sherr C.J., McCormick F. 2002. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell.* 2 : 103–112.
161. Sherr C.J., Roberts J.M. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1 phase progression. *Genes Dev.* 13 : 1501–1512.
162. Shim W.S., Jiang S., Wong P., Tan J., Chua Y.L., Tan Y.S., Sin Y.K., Lim C.H., Chua T., Teh M., Liu T.C., Sim E. 2004. Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 324 : 481–488.
163. Shin Y.J., Cho D.Y., Chung T.Y., Han S.B., Hyon J.Y., Wee W.R. 2011. Rapamycin reduces reactive oxygen species in cultured human corneal endothelial cells. *Curr Eye Res.* 36 (12) : 1116–1122.
164. Silvera D., Ernlund A., Arju R., Connolly E., Volta V., Wang J., Schneider R.J. 2017. mTORC1 and -2 coordinate transcriptional and translational reprogramming in resistance to DNA damage and replicative stress in breast cancer cells. *Mol Cell Biol.* 37 (5). pii: e00577-16.
165. Soares H.P., Ni Y., Kisfalvi K., Sinnett-Smith J., Rozengurt E. 2013. Different patterns of Akt and ERK feedback activation in response to rapamycin, active-site mTOR inhibitors and metformin in pancreatic cancer cells. *PLoS One.* 8 (2) : e57289.
166. Stambolic V., MacPherson D., Sas D., Lin Y., Snow B., Jang Y., Benchimol S., Mak T.W. 2001. Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol Cell.* 8 : 317–325.
167. Steelman L.S., Chappell W.H., Abrams S.L., Kempf R.C., Long J., Laidler P., Mijatovic S., Maksimovic-Ivanic D., Stivala F., Mazzarino M.C., Donia M., Fagone P., Malaponte G., Nicoletti F., Libra M., Milella M., Tafuri A., Bonati A., Bäsecke J., Cocco L., Evangelisti C., Martelli A.M., Montalto G., Cervello M., McCubrey J.A. 2011. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging (Albany NY).* 3 : 192–222.
168. Stenderup K., Justesen J., Clausen C., Kassem M. 2003. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone.* 33 : 919–926.
169. Szostak J.W., Blackburn E.H. 1982. Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. *Cell* 29 (1) : 245–55.
170. Tee A.R., Fingar D.C., Manning B.D., Kwiatkowski D.J., Cantley L.C., Blenis J. 2002. Tuberous sclerosis complex-1 and -2 gene products function together to inhibit mammalian

- target of rapamycin (mTOR)-mediated downstream signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99 (21) : 13571–13576.
171. *Terrill J.R., Radley-Crabb H.G., Iwasaki T., Lemckert F.A., Arthur P.G., Grounds M.D.* 2013. Oxidative stress and pathology in muscular dystrophies: focus on protein thiol oxidation and dysferlinopathies. *FEBS J*. 280 : 4149–4164.
172. *Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M.* 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 282 (5391) : 1145–1147.
173. *Till J.E., McCulloch E.A.* 1961. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*. 14 (2): 213–222.
174. *Toussaint O., Medrano E.E., von Zglinicki T.* 2000. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol*. 35 : 927–945.
175. *Tower J.* 2012. Stress and stem cells. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 1 : 789–802.
176. *Tsai M.S., Lee J.L., Chang Y.J., Hwang S.M.* 2004. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod*. 19 : 1450–1456.
177. *Tsutsui H., Kinugawa S., Matsushima S.* 2011. Oxidative stress and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 301 : 2181–2190.
178. *Tu V.C., Bahl J.J., Chen Q.M.* 2002. Signals of oxidant-induced cardiomyocyte hypertrophy: key activation of p70 S6 kinase-1 and phosphoinositide 3-kinase. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 300 : 1101–1110.
179. *Ulrich D., Muralitharan R., Gargett E.* 2013. Toward the use of endometrial and menstrual blood mesenchymal stem cells for cell-based therapies. *Expert Opin Biol Ther*. 13: 1387–1400.
180. *Umezawa A., Makino H.* 2008. Cell source for regenerative medicine. *Nihon Rinsho*. 66 : 865–872.
181. *Vezina C., Kudelski A., Sehgal S.N.* 1975. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 28 : 721–726.
182. *von Zglinicki T., Pilger R., Sitte N.* 2000. Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts. *Free Rad Biol Med*. 28 : 64–74.
183. *von Zglinicki T., Saretzki G., Ladhoff J., d'Adda di Fagagna F., Jackson S.P.* 2005. Human cell senescence as a DNA damage response. *Mech Ageing Dev*. 126 : 111–117.
184. *Wagers A.J., Weissman I.L.* 2004. Plasticity of adult stem cells. *Cell*. 116 : 639–648.

185. Wang D., Jang D.J. 2009. Protein kinase CK2 regulates cytoskeletal reorganization during ionizing radiation-induced senescence of human mesenchymal stem cells. *Cancer Res.* 69 : 8200–8207.
186. Wang W., Chen J.X., Liao R., Deng Q., Zhou J.J., Huang S., Sun P. 2002. Sequential activation of the MEK-extracellular signal regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogenactivated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence. *Mol Cell Biol.* 22 : 3389–3403.
187. Weissman I.L. 2000. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell.* 100 : 157–168.
188. Williams J.T., Southerland S.S., Souza J. et al. 1999. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *Am Surg.* 65 : 22–26.
189. Wobus A.M., Boheler K.R. 2005. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev.* 85 : 635–678.
190. Wright W.E., Piatyszek M.A., Rainey W.E., Byrd W., Shay J.W. 1996. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet.* 18 : 173–179.
191. Wright W.E., Shay J.W. 2001. Cellular senescence as a tumor-protection mechanism: the essential role of counting. *Curr Opin Genet Dev.* 11 : 98–103.
192. Yang J.-Y., Zong C.S., Xia W., Yamaguchi H., Ding Q., Xie X., Lang J.-Y., Lai C.-C., Chang C.-J., Huang W.-C., Huang H., Kuo H.-P., Lee D.-F., Li L.-Y., Lien H.-C., Cheng X., Chang K.-J., Hsiao C.-D., Tsai F.-J., Tsai C.-H., Sahin A.A., Muller W.J., Mills G.B., Yu D., Hortobagyi G.N., Hung M.-C. 2008. ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation. *Nat Cell Biol.* 10 (2) : 138–148.
193. Zhan H., Suzuki T., Aizawa K., Miyagawa K., Nagai R. 2010. Ataxia Telangiectasia Mutated-mediated DNA damage response in oxidative stress-induced vascular endothelial cell senescence. *J Biol Chem.* 285 : 29662–29670.
194. Zhong Z., Patel A.N., Ichim T.E., Riordan N.H., Wang H., Min W.-P., Woods E.J., Reid M., Mansilla E., Martin G.H., Drago H., Murphy M.P., Minev B. 2009. Feasibility investigation of allogeneic endometrial regenerative cells. *J Transl Med.* 7:15.
195. Zimmermann S., Voss M., Kaiser S., Kapp U., Waller C.F., Martens U.M. 2003. Lack of telomerase activity in human mesenchymal stem cells. *Leukemia.* 17 : 1146–1149.
196. Zuk P.A., Zhu M., Misino H., Huang J., Futrell J.W., Katz A.J., Benheim P., Lorenz H.P., Hedrick M.H. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implication for cell based therapies. *Tissue Eng.* 7 : 211–228.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю искреннюю признательность и благодарность моему научному руководителю Бородкиной Александре Васильевне за внимание, терпение и всестороннюю помощь на всех этапах выполнения этой работы. От души благодарю сотрудников Лаборатории внутриклеточной сигнализации ИНЦ РАН, в особенности Е.Б. Бурову, А.Н. Шатрову и П.И. Дерябина за помощь и поддержку. Выражаю глубокую признательность и благодарю преподавателей и сотрудников Кафедры Цитологии и гистологии СПбГУ за ценные советы и понимание. Отдельное «спасибо» моей семье, родственникам, друзьям, педагогам и всем тем, кто поддерживал меня в самые трудные минуты и не переставал верить в мой успех.