

ОБЗОР

УДК 57.017.6+576.53+57.022

Клетки китайского хомячка в биотехнологических и геронтологических исследованиях

Г.В. Моргунова 

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

Одним из наиболее часто используемых в геронтологии модельных объектов являются дрожжи, в первую очередь — *Saccharomyces cerevisiae*. Накоплено значительное количество данных, позволяющих считать, что в претерпевающих хронологическое, или «стационарное», старение дрожжах возникают нарушения, сходные с возрастными нарушениями в клетках многоклеточного организма. Однако дрожжи, как и любые объекты исследований, не лишены недостатков — в частности, они, хотя и являются эукариотами, в эволюционном плане отстоят далеко от млекопитающих, что накладывает ограничение на изучение у дрожжей неконсервативных метаболических путей. В некоторых случаях в экспериментах с хронологической моделью лучше использовать клетки млекопитающих — например, клетки китайского хомячка. Они широко используются в промышленности для получения моноклональных антител и рекомбинантных белков. Значительная доля этих продуктов образуется после остановки пролиферации, которая инициирует хронологическое старение культуры. Накопленные данные об особенностях метаболизма клеток, роста культуры и продолжительности ее функциональной жизни являются крайне ценными для геронтологов. Обмен информацией между двумя этими направлениями — биотехнологическим и геронтологическим — будет полезен обеим сторонам.

Ключевые слова: клеточное старение, клеточные культуры, «стационарное старение», хронологическое старение, метаболизм, лактат, эффект Варбурга

На протяжении всей истории экспериментальной геронтологии (как и любого другого раздела экспериментальной биологии) предпринимаются попытки дополнить ряд модельных объектов новыми. Некоторые из таких объектов становятся классическими (*Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Mus musculus* и др.), другие не приобретают такую же популярность (*Ceratitis capitata*, *Monochamus alternatus*, *Peromyscus leucopus*). Дрожжи, и в первую очередь *Saccharomyces cerevisiae*, входят в число «любимчиков» у геронтологов — количество публикаций о старении дрожжей с конца 90-х гг. выросло в 5–6 раз (если судить по PubMed). Для этого объекта разработаны даже два варианта «состаривания» — хронологическое и репликативное [1, 2]. Каждая из моделей служит своим целям: репликативная модель может помочь в изучении старения активно делящихся клеток организма [3], хронологическая — в изучении старения непролиферирующих или медленно пролиферирующих клеток [4, 5]. Обе модели важны для исследований, посвященных феномену старения клеток стволовой ниши [3].

Дрожжи являются одноклеточными организмами, к тому же эукариотическими, поэтому они считаются одними из лучших объектов для изуче-

ния старения на клеточном уровне. Однако, как и любые экспериментальные объекты, они не лишены своих недостатков. На молекулярном уровне дрожжи в той или иной мере отличаются от млекопитающих [6–8]. Например, один из ключевых регуляторов метаболизма, представляющий значительный интерес для геронтологов, АМФ-активируемая протеинкиназа (АМПК; AMP-activated protein kinase) у дрожжей представлена ортологом — SNF1 (от sucrose-nonfermenting), который отличается не только в структурном плане, но и по своей регуляции — в частности, его активацию вызывает повышенный уровень АДФ, а не АМФ [9]. Подобных отличий много, так как в эволюционном плане млекопитающие далеко ушли от одноклеточных (у дрожжей примерно в 5 раз меньше генов, чем у человека). Так как многие связанные со старением процессы являются эволюционно консервативными метаболическими путями, эксперименты с *S. cerevisiae* будут давать результаты, но не всегда исследователей интересуют только эти пути. Немаловажным моментом является то, что у дрожжей есть клеточная стенка, которая потенциально может помешать проникновению тех или иных лекарственных средств в клетку [10]. В связи с этим ка-

жется целесообразным проводить геронтологические опыты не только на дрожжах, но и на культурах клеток млекопитающих.

Довольно много исследований в этом направлении провели биотехнологи, работающие с клетками млекопитающих для получения моноклональных антител и рекомбинантных белков. В их опытах клеточные культуры претерпевают хронологическое (или «стационарное», если мы говорим о клетках млекопитающих) старение. На данный момент в этой области накоплен обширный материал. Используемые линии клеток являются «бессмертными», однако получать продукты от одной культуры, даже если производить подачу свежей питательной среды и удаление старой, можно лишь в течение ограниченного периода времени [11], так как для этих культур также существует понятие «продолжительность жизни» [12]. Рост культур и продолжительность их жизни могут ограничивать продукты метаболизма (даже при условии проточного культивирования), повышенная осмолярность среды (которая возникает как вследствие накопления продуктов распада, так и из-за вмешательства исследователей в поддержание рН) и т.д. Однако ни при одном из известных способов производства белков и антител не удается получать продукты бесконечно, поэтому продление срока функционирования клеток является первоочередной задачей для биотехнологов.

Клетки китайского хомячка в биотехнологических исследованиях

Наиболее часто используемыми в этой отрасли являются клетки китайского хомячка (чаще клетки яичника китайского хомячка; СНО — Chinese hamster ovary cells). Клетки хомячка удобны вследствие их способности расти на средах, не требующих добавки сыворотки, малого числа хромосом, меньшего риска заражения вирусами человека и т. д. [13–18]. Кроме того, посттрансляционные модификации рекомбинантных белков в СНО совместимы с модификациями у человека [19]. В ходе биотехнологических опытов на этой линии клеток установлено множество интересных закономерностей — изучена динамика поглощения глюкозы клетками и кинетика выделения ими продуктов распада, исследован характер роста таких культур на разных по составу средах [20–24], проведены генетические манипуляции, направленные на искусственное ингибирование/активацию некоторых ключевых ферментов, участвующих в метаболизме глюкозы и аминокислот [25–27]. Исследователи, работающие над производством белков, активно внедряют в практику геронтологические открытия — например, используют при культивировании рапамицин [28], стимулируют аутофагию [29] или вызывают аминокислотную депривацию [30]. Возможно, настало

время геронтологам обратиться к исследованиям биотехнологов.

Основная цель, стоящая перед биотехнологами — получить больше продукта в ходе культивирования как за счет высокого титра антител (или других белков), так и за счет долговечности культуры. Одна из проблем, возникающая при таком производстве, появляется, когда в среде начинают накапливаться продукты распада. Среди основных продуктов распада, которые могут влиять на выживаемость клеток, выделяют лактат (продукт метаболизма глюкозы) и аммиак (продукт распада глутамина) [20, 31]. Аммиак возникает в ходе метаболизма и других аминокислот, но так как содержание глутамина в среде значительно превышает содержание остальных аминокислот, то наибольший вклад вносит именно разложение глутамина [32]. Манипуляции с составом сред (например, замена глюкозы на галактозу, а глутамина на глутамат) продлевают существование непересеваемой культуры клеток СНО [20, 33], однако при этом наблюдается не такой интенсивный рост, а, следовательно, и более низкая продуктивность. В одной из работ было установлено [34], что более токсичным продуктом является лактат, а не аммиак. Авторы исследования установили, что аммоний в высоких концентрациях не препятствует росту и продуктивности клеток, а также потреблению глюкозы и глутамина, в то время как лактат в высоких концентрациях затормаживает рост на 25%, но за счет повышения осмолярности немного улучшает продуктивность клеток (это известный факт — повышение осмолярности усиливает производство белков и антител клетками китайского хомячка [35–38]). С другой стороны, лактат не является конечным продуктом метаболизма глюкозы, поэтому силы многих исследователей направлены на поиск способов, которые могли бы заставить клетки потреблять лактат и метаболизировать его в цикле трикарбоновых кислот (рисунок).

Лактат: ядовитый метаболит или источник углерода

Лактат быстро накапливается в стадии активного роста культуры при промышленном культивировании клеток млекопитающих. Одной из причин его накопления является эффект Варбурга [39], или анаэробный гликолиз. О. Варбург обнаружил, что асцитные раковые клетки потребляют очень много глюкозы и используют гликолиз для получения энергии, несмотря на наличие кислорода [40]. Важно, что при этом они производят столько же энергии в ходе гликолитической ферментации, сколько производили бы при окислительном фосфорилировании за ту же единицу времени [41]. Аэробный гликолиз помогает пролиферирующим клеткам быстро интегрировать питательные вещества из среды, включать их в анаболические процессы, необходимые для ро-

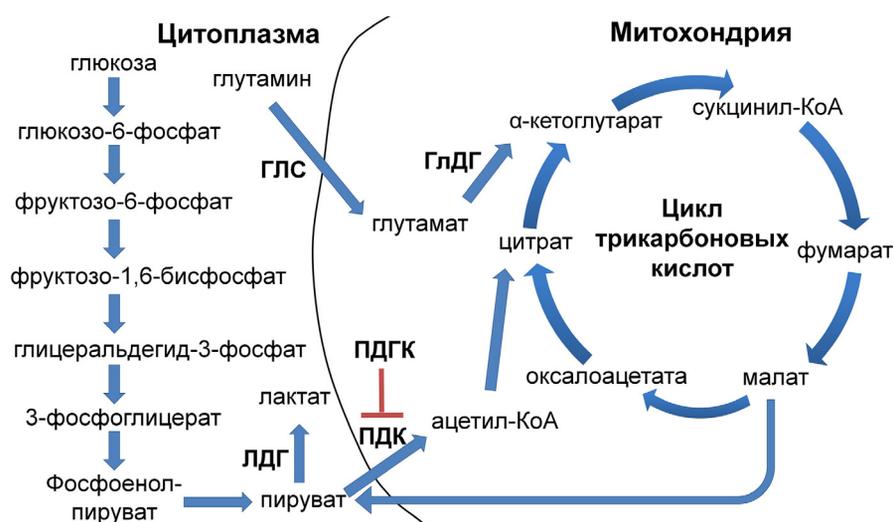


Рисунок. Катаболизм глюкозы и глутамин в клетке.

ЛДГ – лактатдегидрогеназа, ПДК – пируватдегидрогеназный комплекс, ПДГК – киназа пируватдегидрогеназы, ГЛС – глутаминаза, ГлДГ – глутаматдегидрогеназа.

ста клеточной биомассы, и компенсировать снижение производства АТФ за счет быстрого потребления глюкозы [42, 43]. Другим источником лактата является глутаминолиз – еще один способ активного потребления и неполного разложения, но в данном случае уже не глюкозы, а глутамин. В укороченном цикле окисления глутамин превращается в яблочную кислоту, которая затем превращается в пируват и уже в цитозоле – в лактат [44]. За счет глутаминолиза клетки получают необходимый для анаболических процессов НАДФН [45]. Переход культуры из экспоненциальной фазы роста в стационарную происходит, вероятно, из-за переключения с аэробного гликолиза и глутаминолиза на окислительное фосфорилирование (фазу потребления лактата) [23, 46]. Это похоже на то, что наблюдается у дрожжей: в присутствии глюкозы они предпочитают бескислородный способ образования АТФ и метаболизируют моносахарид через пируват до этанола и ацетата, а когда уровень глюкозы падает, дрожжи начинают использовать этанол и ацетат в качестве альтернативных источников углерода [47, 48].

Окислительное фосфорилирование подразумевает более эффективный с энергетической точки зрения обмен веществ, так как в этом случае углеродные субстраты окисляются до углекислого газа через цикл Кребса, поэтому усилия специалистов-биотехнологов направлены на поиск способов, заставляющих клетки использовать питательные вещества из культуральной среды максимально эффективно. Помимо упомянутого выше способа замены глюкозы и глутамин в среде на галактозу и глутамат существует и ряд других мер. Для того чтобы метаболизм глюкозы шел через цикл трикарбоновых кислот, в клетке должен активно работать пируватдегидрогеназный комплекс, который превращает пируват в ацетил-

коэнзим А (ацетил-КоА). Активность этого комплекса тормозит фермент киназа пируватдегидрогеназы. Подавление этой киназы может значительно снизить накопление лактата и увеличить производство антител, не влияя при этом на рост культуры и качество продукта [25, 49]. Можно также создавать линии СНО, экспрессирующие цитозольную пируваткарбоксилазу 2 (PCC2; pyruvate carboxylase 2) дрожжей. Экспрессия PCC2 в клетках СНО увеличивает продолжительность жизни культуры и снижает производство лактата [23, 50]. Кроме того, можно подавлять активность лактатдегидрогеназы. Частичное подавление гена лактатдегидрогеназы А (LDHA) с помощью малых интерферирующих РНК (siРНК) или малых РНК, образующих шпильки (shRNA), в клетках СНО снижает выработку лактата и потребление глюкозы [12, 21, 25, 27]. Полный нокаут гена лактатдегидрогеназы А (LDHA) в клетках СНО оказывается летальным [26].

Сокращение производства лактата клетками, вероятно, не так перспективно, как смещение метаболизма СНО на его потребление. При повышенном парциальном давлении CO_2 ($p\text{CO}_2$) не происходит метаболического сдвига в сторону потребления лактата [24], поэтому эффективным оказывается добавление экзогенного лактата СНО при пониженном $p\text{CO}_2$ [22]. Другая причина, по которой не может произойти сдвиг – снижение мембранного потенциала митохондрий [45]. В упомянутых выше экспериментах с заменой элементов среды также обнаружены некоторые особенности метаболизма лактата. В исследовании Альтамирано и соавт. [51] при культивировании клеток китайского хомячка на средах, содержащих глюкозу в концентрации не 20 мМ (как это обычно принято), а в 4 раза меньшей, рост культуры довольно быстро останавливался. Если же в среде содержа-

лась глюкоза в концентрации 5 мМ и галактоза в концентрации 20 мМ, то наблюдался хороший рост культуры (сопоставимый с ростом на глюкозе в концентрации 20 мМ), но при этом после истощения глюкозы клетки начинали потреблять галактозу и лактат. В подробном исследовании Вилкенс и соавт. [32] было протестировано еще больше вариантов добавки глюкозы и галактозы в разных пропорциях. Подтвердились описанные выше результаты, и, кроме того, было выдвинуто предположение, что использование лактата в качестве источника углерода становится возможным, потому что содержание глюкозы в среде уменьшается, а галактоза потребляется медленно (пропускная способность переносчиков глюкозы выше, чем переносчиков галактозы). Того количества галактозы, которое попадает в клетку, недостаточно для поддержания жизнеспособности, поэтому культура начинает потреблять лактат. Если на этапе, когда клетки использовали глюкозу, они выделяли лактат в среду, за счет чего рН среды снижался, то после истощения глюкозы клетки начинают использовать сначала внутриклеточный, а затем внеклеточный лактат, что приводит к повышению рН среды. Таким образом, потребление лактата выгодно и в плане энергетики клетки, и в плане кислотно-щелочного баланса.

Долгое время считалось, что и в организме лактат — лишь метаболический отход, притом вредным. Однако в конце XX в. отношение к нему изменилось, так как стало понятно, что он является важным посредником во многих метаболических процессах, в том числе субстратом для аэробного метаболизма [52]. Лактат обладает нейропротекторным действием, даже более того — мозг предпочитает его глюкозе [53, 54]. В самых разных тканях существует так называемый «лактатный челнок», который играет важную роль в метаболических взаимодействиях между клетками. Например, такое взаимодействие существует между глией и нейронами — астроциты передают лактат нейронам, которые метаболизируют его через цикл трикарбоновых кислот [55]. Кроме того, лактат больше не считается причиной мышечной усталости, зато он, вероятно, играет важную роль в заживлении ран [52]. Накопление лактата в тканях коррелирует с возникновением некоторых нарушений, но неверно считать накопление этого метаболита причиной возникновения таких нарушений.

Перспективы использования клеток китайского хомячка в геронтологии

Описанные метаболические особенности клеток китайского хомячка крайне ценны для геронтологии. Представляются перспективными исследования, в которых рост культуры и потребление питательных веществ будут изучены вместе с активностью метаболических регуляторов — таких, как TOR (target of rapamycin) и AMPK. Активная

пролиферация культуры не всегда означает, что в итоге будет получен большой объем продукта, так как важно еще и то, сколько времени просуществуют клетки после остановки пролиферации. Опыты с заменой части глюкозы на галактозу подтверждают это [51]. Продуктивность клеток китайского хомячка является хорошим показателем не только жизнеспособности, но и функциональной активности культуры. Очевидно, что производящие антитела или другие продукты клетки не находятся в «спящем» состоянии, вызванном нехваткой питательных веществ или отравлением метаболитами.

Дрожжи также используют в промышленных целях, и заинтересованные в высокой продуктивности исследователи пытаются найти способы продления их жизни. Например, при производстве вина дрожжи (чаще всего *S. cerevisiae*) претерпевают хронологическое старение, так как большую часть времени находятся в неделящемся состоянии. Установлены разные причины, вызывающие преждевременную гибель дрожжей, и способы продления их существования [56, 57]. Например, оказалось, что полифенол ресвератрол (антиоксидант и миметик ограничения питания) отрицательно влияет на продолжительность жизни дрожжей, как и добавка смеси витаминов [56]. Положительно влияет снижение концентрации этанола, при этом добавление небольшого его количества, в среду, в которой он предварительно был выпарен, не сокращает продолжительность жизни культуры и даже способствует достижению чуть более высокой плотности. Таким образом, преждевременное вымирание дрожжей после достижения стационарной фазы связано с накоплением избыточного количества продуктов неполного метаболизма глюкозы. Если же количество таких метаболитов не является избыточным, то клетки могут адаптироваться к новым условиям (переходят на новый этап их жизни). Нет оснований считать, что они запрограммированы на обязательную гибель по окончании ферментации [56]. Более того, наблюдается более интенсивный рост свежей культуры дрожжей в присутствии ацетата и лактата [58].

При производстве антител и белков выгоднее использовать суспензионные культуры клеток китайского хомячка (еще одно их преимущество), но существуют клетки млекопитающих, которые могут существовать только на субстрате. Способ культивации не столь важен для геронтологических экспериментов, в своих опытах мы используем именно адгезивные культуры клеток китайского хомячка [59, 60, 61].

Метаболизм глюкозы является одной из центральных тем в геронтологии. Именно с нарушением чувствительности к глюкозе связано развитие диабета второго типа, ожирения и других возрастных заболеваний. Некоторые из таких нарушений могут проявляться уже на клеточном уровне. Кроме того, важным является изучение

эффекта Варбурга, так как неконтролируемый рост опухолей осуществляется с его помощью [40]. Поиск способов, предотвращающих аэробный гликолиз, может оказаться полезным и для онкологии. Не менее важно изучение метаболизма глутамина — например, ингибирование глутамина является одним из способов метаболической терапии опухолей [62].

Возможно, разработанный нами для оценки геропротекторных свойств метод построения кривых выживания и расчета показателей продолжительности жизни [63] окажется полезным и для биотехнологов, так как с помощью этого подхода можно будет оценивать условия культивирования («благополучие» культуры) — чем идеальнее подобраны условия, тем более ректангуляризованной получится кривая выживания культуры клеток.

В целом, изучение «стационарного», или хронологического, старения по-прежнему остается

перспективным. Более того, появляются работы с новыми интересными вариантами установок для проведения опытов. Например, в исследовании «стационарного» старения бактерий была разработана установка для проточного культивирования *Escherichia coli* [64], не позволяющая бактериям делиться (так как в каждой лунке этой установки может поместиться лишь одна бактерия). Создание новых технологических решений поможет устранить существующие недостатки модели «стационарного» старения и, возможно, усовершенствовать процесс получения рекомбинантных белков, антител и других продуктов.

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

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kaerberlein M., Burtner C.R., Kennedy B.K. Recent developments in yeast aging // *PLoS Genet.* 2007. Vol. 3. N 5: e84.
2. Longo V.D., Shadel G.S., Kaerberlein M., Kennedy B. Replicative and chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae* // *Cell Metab.* 2012. Vol. 16. N 1. P. 18–31.
3. Aging research in yeast // *Subcellular Biochemistry* / Ed. M. Breitenbach, S.M. Jazwinski, and P. Laun. Dordrecht; Heidelberg; London; N.Y.: Springer, 2012. 368 pp.
4. MacLean M., Harris N., Piper P.W. Chronological lifespan of stationary phase yeast cells; a model for investigating the factors that might influence the ageing of postmitotic tissues in higher organisms // *Yeast.* 2001. Vol. 18. N 6. P. 499–509.
5. Fabrizio P., Longo V.D. The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae* // *Aging Cell.* 2003. Vol. 2. N 2. P. 73–81.
6. Barnes D.E., Lindahl T. Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells // *Annu. Rev. Genet.* 2004. Vol. 38. P. 445–476.
7. Faucher F., Duclos S., Bandaru V., Wallace S.S., Doublié S. Crystal structures of two archaeal 8-oxoguanine DNA glycosylases provide structural insight into guanine/8-oxoguanine distinction // *Structure.* 2009. Vol. 17. N 5. P. 703–712.
8. Herrera-Cruz M.S., Simmen T. Of yeast, mice and men: MAMs come in two flavors // *Biol. Direct.* 2017. Vol. 12: 3.
9. Morgunova G.V., Klebanov A.A. Age-Related AMP-activated protein kinase alterations: From cellular energetics to longevity // *Cell Biochem. Funct.* 2019. Vol. 37. N 3. P. 169–176.
10. Zimmermann A., Hofer S., Pendl T., Kainz K., Mado F., Carmona-Gutierrez D. Yeast as a tool to identify antiaging compounds // *FEMS Yeast Res.* 2018. Vol. 18. N 6: foy020.
11. Chartrain M., Chu L. Development and production of commercial therapeutic monoclonal antibodies in Mammalian cell expression systems: an overview of the current upstream technologies // *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2008. Vol. 9. N 6. P. 447–467.
12. Jeong D.W., Cho I.T., Kim T.S., Bae G.W., Kim I.H., Kim I.Y. Effects of lactate dehydrogenase suppression and glycerol-3-phosphate dehydrogenase overexpression on cellular metabolism // *Mol. Cell. Biochem.* 2006. Vol. 284. N 1–2. P. 1–8.
13. Lai T., Yang Y., Ng S.K. Advances in mammalian cell line development technologies for recombinant protein production // *Pharmaceuticals.* 2013. Vol. 6. N 5. P. 579–603.
14. Lewis N.E., Liu X., Li Y., Nagarajan H., Yerganian G., O'Brien E., Bordbar A., Roth A.M., Rosenbloom J., Bian C., Xie M. Genomic landscapes of Chinese hamster ovary cell lines as revealed by the *Cricetulus griseus* draft genome // *Nat. Biotechnol.* 2013. Vol. 31. N 8. P. 759–765.
15. Fischer S., Handrick R., Otte K. The art of CHO cell engineering: a comprehensive retrospect and future perspectives // *Biotechnol. Adv.* 2015. Vol. 33. N 8. P. 1878–1896.
16. Brown A.J., James D.C. Precision control of recombinant gene transcription for CHO cell synthetic biology // *Biotechnol. Adv.* 2016. Vol. 34. N 5. P. 492–503.
17. Golabgir A., Gutierrez J.M., Hefzi H., Li S., Palsion B.O., Herwig C., Lewis N.E. Quantitative feature extraction from the Chinese hamster ovary bioprocess bibliome using a novel meta-analysis workflow // *Biotechnol. Adv.* 2016. Vol. 34. N 5. P. 21–633.
18. Hefzi H., Ang K.S., Hanscho M., Bordbar A., Ruckerbauer D., Lakshmanan M., Orellana C.A., Baycin-Hizal D., Huang Y., Ley D., Martinez V.S. A consensus genome-scale reconstruction of Chinese hamster ovary cell metabolism // *Cell Systems.* 2016. Vol. 3. N 5. P. 434–443.
19. Kim J.Y., Kim Y.G., Lee G.M. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012. Vol. 93. N 3. P. 917–930.
20. Altamirano C., Paredes C., Cairo J.J., Godia F. Improvement of CHO cell culture medium formulation: simultaneous substitution of glucose and glutamine // *Biotechnol. Progr.* 2000. Vol. 16. N 1. P. 69–75.
21. Kim S.H., Lee G.M. Functional expression of human pyruvate carboxylase for reduced lactic acid formation of Chinese hamster ovary cells (DG44) // *Appl. Microbiol. Biot.* 2007. Vol. 76. N 3. P. 659–665.
22. Li J., Wong C.L., Vijayasankaran N., Hudson T., Amanullah A. Feeding lactate for CHO cell culture processes: ВЕСТН. МОСК. УН-ТА. СЕР. 16. БИОЛОГИЯ. 2020. Т. 75. № 4

impact on culture metabolism and performance // *Biotechnol. Bioeng.* 2012. Vol. 109. N 5. P. 1173–1186.

23. *Toussaint C., Henry O., Durocher Y.* Metabolic engineering of CHO cells to alter lactate metabolism during fed-batch cultures // *J. Biotechnol.* 2016. Vol. 217. P. 122–131.

24. *Brunner M., Doppler P., Klein T., Herwig C., Fricke J.* Elevated pCO₂ affects the lactate metabolic shift in CHO cell culture processes // *Eng. Life Sci.* 2018. Vol. 18. N 3. P. 204–214.

25. *Zhou M., Crawford Y., Ng D., Tung J., Pynn A.F., Meier A., Yuk I.H., Vijayasankaran N., Leach K., Joly J., Snedecor B.* Decreasing lactate level and increasing antibody production in Chinese Hamster Ovary cells (CHO) by reducing the expression of lactate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase kinases // *J. Biotechnol.* 2011. Vol. 153. N 1–2. P. 27–34.

26. *Yip S.S., Zhou M., Joly J., Snedecor B., Shen A., Crawford Y.* Complete knockout of the lactate dehydrogenase A gene is lethal in pyruvate dehydrogenase kinase 1, 2, 3 down-regulated CHO cells // *Mol. Biotechnol.* 2014. Vol. 56. N 9. P. 833–838.

27. *Noh S.M., Park J.H., Lim M.S., Kim J.W., Lee G.M.* Reduction of ammonia and lactate through the coupling of glutamine synthetase selection and downregulation of lactate dehydrogenase-A in CHO cells // *App. Microbiol. Biotechnol.* 2017. Vol. 101. N 3. P. 1035–1045.

28. *Oguchi S., Saito H., Tsukahara M., Tsumura H.* pH Condition in temperature shift cultivation enhances cell longevity and specific hMab productivity in CHO culture // *Cytotechnology.* 2006. Vol. 52. N 3. P. 199–207.

29. *Kim Y.J., Baek E., Lee J.S., Lee G.M.* Autophagy and its implication in Chinese hamster ovary cell culture // *Biotechnol. Lett.* 2013. Vol. 35. N 11. P. 1753–1763.

30. *Fomina-Yadlin D., Gosink J.J., McCoy R., Follstad B., Morris A., Russell C.B., McGrew J.T.* Cellular responses to individual amino-acid depletion in antibody-expressing and parental CHO cell lines // *Biotechnol. Bioeng.* 2014. Vol. 111. N 5. P. 965–979.

31. *Yoon S.K., Choi S.L., Song J.Y., Lee G.M.* Effect of culture pH on erythropoietin production by Chinese hamster ovary cells grown in suspension at 32.5 and 37.0 C // *Biotechnol. Bioeng.* 2005. Vol. 89. N 3. P. 345–356.

32. *Wilkens C.A., Altamirano C., Gerdtzen Z.P.* Comparative metabolic analysis of lactate for CHO cells in glucose and galactose // *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2011. Vol. 16. N 4. P. 714–724.

33. *Tsao Y.S., Cardoso A.G., Condon R.G., Voloch M., Lio P., Lagos J.C., Kearns B.G., Liu Z.* Monitoring Chinese hamster ovary cell culture by the analysis of glucose and lactate metabolism // *J. Biotechnol.* 2005. Vol. 118. N 3. P. 316–327.

34. *Lao M.S., Toth D.* Effects of ammonium and lactate on growth and metabolism of a recombinant Chinese hamster ovary cell culture // *Biotechnol. Prog.* 1997. Vol. 13. N 5. P. 688–691.

35. *Kim T.K., Ryu J.S., Chung J.Y., Kim M.S., Lee G.M.* Osmoprotective effect of glycine betaine on thrombopoietin production in hyperosmotic Chinese hamster ovary cell culture: clonal variations // *Biotechnol. Progr.* 2000. Vol. 16. N 5. P. 775–781.

36. *Kim M.S., Kim N.S., Sung Y.H., Lee G.M.* Biphasic culture strategy based on hyperosmotic pressure for improved humanized antibody production in Chinese hamster ovary cell culture // *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal.* 2002. Vol. 38. N 6. P. 314–319.

37. *Takagi M., Hayashi H., Yoshida T.* The effect of osmolarity on metabolism and morphology in adhesion and suspension Chinese hamster ovary cells producing tissue plasminogen activator // *Cytotechnology.* 2000. Vol. 32. N 3. P. 171–179.

38. *Zhang X., Garcia I.F., Baldi L., Hacker D.L., Wurm F.M.* Hyperosmolarity enhances transient recombinant protein yield in Chinese hamster ovary cells // *Biotechnol. Lett.* 2010. Vol. 32. N 11. P. 1587–1592.

39. *Warburg O.* On the origin of cancer cells // *Science.* 1956. Vol. 123. N 3191. P. 309–314.

40. *Liberti M.V., Locasale J.W.* The Warburg effect: how does it benefit cancer cells? // *Trends Biochem. Sci.* 2016. Vol. 41. N 3. P. 211–218.

41. *Shestov A.A., Liu X., Ser Z., Cluntun A.A., Hung Y.P., Huang L., Kim D., Le A., Yellen G., Albeck J.G., Locasale J.W.* Quantitative determinants of aerobic glycolysis identify flux through the enzyme GAPDH as a limiting step // *eLife.* 2014. Vol. 3: e03342.

42. *DeBerardinis R.J., Lum J.J., Hatzivassiliou G., Thompson C.B.* The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation // *Cell Metab.* 2008. Vol. 7. N 1. P. 11–20.

43. *Vander Heiden M.G., Cantley L.C., Thompson C.B.* Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation // *Science.* 2009. Vol. 324. N 5930. P. 1029–1033.

44. *Brand K.* Aerobic glycolysis by proliferating cells: protection against oxidative stress at the expense of energy yield // *J. Bioenerg. Biomembr.* 1997. Vol. 29. N 4. P. 355–364.

45. *Zagari F., Jordan M., Stettler M., Broly H., Wurm F.M.* Lactate metabolism shift in CHO cell culture: the role of mitochondrial oxidative activity // *N. Biotechnol.* 2013. Vol. 30. N 2. P. 238–245.

46. *Hong J.K., Nargund S., Lakshmanan M., Kyriakopoulos S., Kim D.Y., Ang K.S., Leong D., Yang Y., Lee D.Y.* Comparative phenotypic analysis of CHO clones and culture media for lactate shift // *J. Biotechnol.* 2018. Vol. 283. P. 97–104.

47. *Gray J.V., Petsko G.A., Johnston G.C., Ringe D., Singer R.A., Werner-Washburne M.* “Sleeping beauty”: quiescence in *Saccharomyces cerevisiae* // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2004. Vol. 68. N 2. P. 187–206.

48. *Wierman M.B., Maqani N., Strickler E., Li M., Smith J.S.* Caloric restriction extends yeast chronological lifespan by optimizing the Snf1 (AMPK) signaling pathway // *Mol. Cell. Biol.* 2017. Vol. 37. N 13: e00562-16.

49. *Buchsteiner M., Quek L.E., Gray P., Nielsen L.K.* Improving culture performance and antibody production in CHO cell culture processes by reducing the Warburg effect // *Biotechnol. Bioeng.* 2018. Vol. 115. N 9. P. 2315–2327.

50. *Wilkens C.A., Gerdtzen Z.P.* Comparative metabolic analysis of CHO cell clones obtained through cell engineering, for IgG productivity, growth and cell longevity // *PLoS One.* 2015. Vol. 10. N 3: e0119053.

51. *Altamirano C., Illanes A., Becerra S., Cairó J.J., Gòdia F.* Considerations on the lactate consumption by CHO cells in the presence of galactose // *J. Biotechnol.* 2006. Vol. 125. N 4. P. 547–556.

52. *Gladden L.B.* Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium // *J. Physiol.* 2004. Vol. 558. N 1. P. 5–30.

53. *Zilberter Y., Zilberter T., Bregestovski P.* Neuronal activity in vitro and the in vivo reality: the role of energy homeostasis // *Trends Pharmacol. Sci.* 2010. Vol. 31. N 9. P. 394–401.

54. Wyss M.T., Jolivet R., Buck A., Magistretti P.J., Weber B. *In vivo* evidence for lactate as a neuronal energy source // *J. Neurosci. Res.* 2011. Vol. 31. N 20. P. 7477–7485.
55. Pellerin L., Bouzier-Sore A.K., Aubert A., Serres S., Merle M., Costalat R., Magistretti P.J. Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update // *Glia.* 2007. Vol. 55. N 12. P. 1251–1262.
56. Orozco H., Matallana E., Aranda A. Two-carbon metabolites, polyphenols and vitamins influence yeast chronological life span in winemaking conditions // *Microbial cell factories.* 2012. Vol. 11: 104.
57. Aranda A., Orozco H., Picazo C., Matallana E. Yeast life span and its impact on food fermentations // *Fermentation.* 2019. Vol. 5. N 2: 37.
58. Thomas K.C., Hynes S.H., Ingledew W.M. Influence of medium buffering capacity on inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by acetic and lactic acids // *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. Vol. 68. N 4. P. 1616–1623.
59. Morgunova G.V., Klebanov A.A., Marotta F., Khokhlov A.N. Culture medium pH and stationary phase/chronological aging of different cells // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2017. Vol. 72. N 2. P. 47–51.
60. Morgunova G.V., Klebanov A.A. Impairment of the viability of transformed Chinese hamster cells in a nonsub-cultured culture under the influence of exogenous oxidized guanoside is manifested only in the stationary phase of growth // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2018. Vol. 73. N 3. P. 124–129.
61. Morgunova G.V., Karmushakov A.F., Klebanov A.A., Khokhlov A.N. Studies into the effect of “mild” uncoupling with 2,4-dinitrophenol on the growth of Chinese hamster cell culture and its subsequent dying out in the stationary phase // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2019. Vol. 74. N 3. P. 163–169.
62. Matés J.M., Di Paola F.J., Campos-Sandoval J.A., Mazurek S., Márquez J. Therapeutic targeting of glutaminolysis as an essential strategy to combat cancer // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2020. Vol. 98. P. 34–43.
63. Khokhlov A.N., Morgunova G.V., Klebanov A.A. Demographic approaches to the study of aging on cell cultures // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2019. Vol. 74. N 4. P. 262–267.
64. Yang Y., Santos A.L., Xu L., Lotton C., Taddei F., Lindner A.B. Temporal scaling of aging as an adaptive strategy of *Escherichia coli* // *Sci. Adv.* 2019. Vol. 5: eaaw2069.

Поступила в редакцию 08.06.2020 г.

После доработки 26.08.2020 г.

Принята в печать 15.09.2020 г.

REVIEW

Chinese hamster cells in biotechnological and gerontological research

G.V. Morgunova 

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

One of the most frequently used model objects in gerontology is yeast, primarily *Saccharomyces cerevisiae*. A significant amount of data has been accumulated, allowing to believe that in yeast undergoing chronological or “stationary phase” aging, damage is similar to age-related lesions in the cells of multicellular organism. However, studies on yeast, like on any objects, are not without drawbacks; in particular, although yeasts are eukaryotes, in terms of evolution they are far from mammals, which impose a limitation on the studies of non-conservative metabolic pathways in yeast. In some cases, mammalian cells are better for chronological model experiments, for example, Chinese hamster cells. They are actively used in industry for the manufacturing of monoclonal antibodies and recombinant proteins. A significant proportion of these products are produced after cessation of proliferation which initiates chronological aging of the culture. The accumulated data on the features of the function of cell metabolism, growth, culture and the duration of its functional activity are extremely valuable for gerontologists. The exchange of information between these two branches – biotechnological and gerontological – will be beneficial to both parties.

Keywords: *cell aging, cell cultures, “stationary phase aging”, chronological aging, metabolism, lactate, Warburg effect*

Сведения об авторах

Моргунова Галина Васильевна – канд. биол. наук, науч. сотр. сектора эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-15-90; e-mail: *morgunova@mail.bio.msu.ru*; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5259-0861>