

ИЗМЕРИМЫЕ МЕТРИКИ КЛЕТОЧНОГО СТАРЕНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

DOI: 10.17691/stm2025.17.5.01

УДК 576.366:004.032.26

Поступила 22.04.2025 г.



Д.А. Калашникова, младший научный сотрудник лаборатории эпигенетики¹;

младший научный сотрудник лаборатории геномики²;

С.Е. Романов, к.б.н., научный сотрудник лаборатории эпигенетики¹;

научный сотрудник лаборатории геномики²;

Д.А. Максимов, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории эпигенетики¹;

научный сотрудник лаборатории геномики²;

И.А. Плохих, младший научный сотрудник лаборатории прикладных цифровых технологий¹;

Р.Ю. Епифанов, младший научный сотрудник лаборатории прикладных цифровых технологий¹;

Р.И. Мулладжанов, д.ф.-м.н., зав. лабораторией прикладных цифровых технологий¹;

зав. лабораторией суперкомпьютерных вычислений и искусственного интеллекта в энергетике³;

Л.О. Сидельников, лаборант-исследователь лаборатории эпигенетики¹;

П.А. Антошина, младший научный сотрудник лаборатории геномики²;

Я.А. Осипов, лаборант-исследователь лаборатории эпигенетики¹;

В.В. Шлома, к.б.н., зав. лабораторией геномики²;

А.А. Будилина, лаборант-исследователь лаборатории молекулярных механизмов регенерации и старения⁴; младший научный сотрудник⁶;

Е.М. Самойлова, младший научный сотрудник лаборатории эпигенетики¹;

младший научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов регенерации и старения⁴;

В.П. Баклаушев, д.м.н., зав. лабораторией молекулярных механизмов регенерации и старения⁴;

зав. лабораторией регенеративной медицины⁵; руководитель центра биомедицинских исследований⁶;

зав. отделом разработки клеточных препаратов⁷;

П.П. Лактионов, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории эпигенетики¹;

старший научный сотрудник лаборатории геномики²

¹Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, ул. Пирогова, 1, Новосибирск, 630090;

²Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, проспект академика Лаврентьева, 8/2, Новосибирск, 630090;

³Институт теплофизики им. С.С. Кутателадзе Сибирского отделения Российской академии наук, проспект академика Лаврентьева, 1, Новосибирск, 630090;

⁴Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, ул. Вавилова, 32, Москва, 119991;

⁵Научно-исследовательский институт пульмонологии ФМБА России, Ореховый б-р, 28, стр. 10, Москва, 115682;

⁶Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России, Ореховый б-р, 28, стр. 1–9, Москва, 115682;

⁷Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России, ул. Островитянова, 1, стр. 10, Москва, 117513

Цель исследования — проанализировать проявления отдельных маркеров старения на модели репликативного, стресс-индуцированного и хронологического старения мезенхимальных стволовых клеток человека, а также изучить реализуемость

Для контактов: Лактионов Петр Павлович, e-mail: laktionov@mcb.nsc.ru

предиктивных моделей для оценки возраста и протяженности культивирования *in vitro* на основе транскриптомных данных и исследования клеточной морфологии.

Материалы и методы. На различных моделях клеточного старения методом ПЦР в режиме реального времени проанализирована динамика экспрессии отдельных генов, кодирующих принципиальные регуляторы клеточного старения, а также исследована длина теломер. Проведен анализ данных высокопроизводительного секвенирования транскриптомов мезенхимальных стволовых клеток доноров разного возраста. С помощью методов регрессионного анализа подготовлены предиктивные модели на основе транскриптомных данных для оценки хронологического возраста и протяженности культивирования *in vitro*. Методами микроскопии и последующего анализа изображений алгоритмами машинного обучения изучены морфологические изменения, ассоциированные с клеточным старением, и подготовлена сегментационная нейросетевая модель для экстракции параметров ядерной морфологии и классификации клеток по времени культивации *in vitro*.

Результаты. На моделях репликативного, стресс-индуцированного и хронологического старения мезенхимальных стволовых клеток гены *CDKN1A*, *LMNB1*, *HMGB2* демонстрировали воспроизводимую схожую динамику. Профиль экспрессии компонентов воспалительного фенотипа, ассоциированного со старением, был вариабелен в различных моделях клеточного старения. Анализ транскриптомов мезенхимальных стволовых клеток доноров разного возраста выявил значительную донор-зависимую гетерогенность клеток, что затрудняет разработку эффективных предиктивных моделей на основе транскриптомных данных. Исследование изменения длины теломер продемонстрировало свою применимость для оценки динамики репликативного старения *in vitro*. Разработанная сегментационная нейросетевая модель позволила детектировать ассоциированную со старением динамику изменения ядерной морфологии в ходе репликативного старения.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки; клеточное старение; теломеры; экспрессия; предиктивные модели для оценки старения.

Как цитировать: Kalashnikova D.A., Romanov S.E., Maksimov D.A., Plokhikh I.A., Epifanov R.Yu., Mullyadjanov R.I., Sidelnikov L.O., Antoshina P.A., Osipov Ya.A., Shloma V.V., Budilina A.A., Samoylova E.M., Baklaushev V.P., Laktionov P.P. Measurable metrics of mesenchymal stem cell aging. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2025; 17(5): 5, <https://doi.org/10.17691/stm2025.17.5.01>

English

Measurable Metrics of Mesenchymal Stem Cell Aging

D.A. Kalashnikova, Junior Researcher, Laboratory of Epigenetics¹; Junior Researcher, Laboratory of Genomics²;

S.E. Romanov, PhD, Researcher, Laboratory of Epigenetics¹; Researcher, Laboratory of Genomics²;

D.A. Maksimov, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Epigenetics¹; Researcher, Laboratory of Genomics²;

I.A. Plokhikh, Junior Researcher, Laboratory of Applied Digital Technologies¹;

R.Yu. Epifanov, Junior Researcher, Laboratory of Applied Digital Technologies¹;

R.I. Mullyadjanov, DSc, Head of the Laboratory of Applied Digital Technologies¹; Head of the Laboratory of Supercomputing and Artificial Intelligence in Power Engineering³;

L.O. Sidelnikov, Research Assistant, Laboratory of Epigenetics¹;

P.A. Antoshina, Junior Researcher, Laboratory of Genomics²;

Ya.A. Osipov, Research Assistant, Laboratory of Epigenetics¹;

V.V. Shloma, PhD, Head of the Laboratory of Genomics²;

A.A. Budilina, Research Assistant, Laboratory of Molecular Mechanisms of Regeneration and Aging⁴; Junior Researcher, Laboratory of Regenerative Medicine⁵;

E.M. Samoylova, Junior Researcher, Laboratory of Epigenetics¹; Junior Researcher, Laboratory of Molecular Mechanisms of Regeneration and Aging⁴;

V.P. Baklaushev, MD, DSc, Head of the Laboratory of Molecular Mechanisms of Regeneration and Aging⁴; Head of the Laboratory of Regenerative Medicine⁵; Chief of the Center for Biomedical Research⁶;

Head of the Department of Cellular Preparation Development⁷;

P.P. Laktionov, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Epigenetics¹; Senior Researcher, Laboratory of Genomics²

¹Novosibirsk National Research State University, 1 Pirogova St., Novosibirsk, 630090, Russia;

²Institute of Molecular and Cellular Biology of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 8/2 Acad. Lavrentiev Avenue, Novosibirsk, 630090, Russia;

³Kutateladze Institute of Thermophysics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 1 Acad. Lavrentiev Avenue, Novosibirsk, 630090, Russia;

⁴Engelgard Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences, 32 Vavilova St., Moscow, 119991, Russia;

⁵Research Institute of Pulmonology of Federal Medico-Biological Agency of Russia, 28, Bldg. 10, Orekhoviy Blvd., Moscow, 115682, Russia;

⁶Federal Scientific Clinical Center for Specialized Types of Medical Care and Medical Technologies of the Federal Medico-Biological Agency of Russia, 28, Bldg. 1–9, Orekhoviy Blvd., Moscow, 115682, Russia;

⁷Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies of the Federal Medico-Biological Agency of Russia, 1, Bldg. 10, Ostrovityanova St., Moscow, 117513, Russia

The aim of the study is to analyze the manifestation of selected cellular senescence markers on the models of replicative senescence, stress-induced senescence, and chronological aging of human mesenchymal stem cells and to study the feasibility of predictive models for assessing the age and duration *in vitro* cultivation based on the transcriptomic data and investigation of cell morphology.

Materials and Methods. In the study, the dynamics of expression of individual genes encoding key regulators of cellular aging across various models of cellular senescence, as well as telomere length were investigated by real-time PCR. The analysis of the high-throughput transcriptome sequencing datasets of mesenchymal stem cells from the donors of different ages has been performed. Using regression methods, predictive models based on transcriptomic data were developed to estimate chronological age and the duration of *in vitro* cultivation. Using microscopy methods and subsequent image analysis by machine-learning algorithms, morphological alterations associated with cellular senescence have been explored and segmentation neural network model has been created for extracting nuclear morphology parameters and classification of the cells based on the duration of cultivation *in vitro*.

Results. *CDKN1A*, *LMNB1*, *HMGB2* genes demonstrated reproducible similar dynamics on the models of replicative or stress-induced senescence and chronological aging of mesenchymal stem cells. The expression profile of the senescence-associated inflammatory phenotype components was variable in different models of cell aging. The analysis of mesenchymal stem cell transcriptomes from the donors of various ages revealed considerable donor-dependent heterogeneity of the cells, which complicates the development of precise transcriptome data-based predictive models. Investigation of the changes in the telomere length has demonstrated its applicability for assessing the dynamics of replicative senescence *in vitro*. The developed segmentation neural network model allowed for detecting senescence-associated dynamics of nuclear morphology alterations in the process of replicative aging.

Key words: mesenchymal stem cells; cell senescence; telomeres; expression; predictive models for senescence assessments.

Введение

Препараты аллогенных и аутологичных мезенхимальных стволовых клеток (МСК) рассматриваются в качестве перспективного компонента регенеративной клеточной терапии [1]. В клинических испытаниях применяют высокие дозы, достигающие сотни миллионов клеток на одну процедуру. Это зачастую обуславливает необходимость предварительного масштабирования культуры *in vitro*, что наряду с функциональным состоянием организма донора может снижать качество клеточных препаратов [2–4]. Функциональные методы контроля препаратов МСК для клинического применения подразумевают оценку морфологии, клеточной выживаемости, потенциала к дифференцировке и биобезопасности [5, 6]. Вместе с тем изучение влияния функционального состояния организма донора, условий и протяженности культивации на качество клеточных продуктов требует проведения дополнительных исследований. При классификации признаков старения организма выделяют различные функциональные проявления, такие как метаболические и иммунные нарушения, геномная нестабильность и изменения эпигенома [7]. Одним из признаков старения организма считается накопление стареющих (сенесцентных) клеток, неспособных делиться, устойчивых к апоптозу и обладающих характерным морфологическим и метаболическим фенотипом [3, 7].

Индукторами клеточного старения могут служить истощение пролиферативного потенциала, сопря-

женное с критическим укорочением теломер; воздействие токсического, генотоксического и окислительного стресса; индукция онкогенов; воспаление; дисфункция митохондрий, нарушение эпигенетических механизмов регуляции и др. [3, 8–11]. Важно отметить, что перечисленные факторы также могут являться вторичными эффектами клеточного старения, а его фенотипические проявления на клеточном уровне способны варьировать в широком диапазоне.

В связи с подобной гетерогенностью как в культурах, так и на уровне организма на настоящий момент не существует специфичного универсального маркера клеточного старения [12, 13]. По этой причине исследование динамики клеточного старения, как правило, опирается на анализ нескольких маркеров, комбинация которых в большей степени присуща этому процессу [3, 12]. К таким маркерам можно отнести индукцию β -галактозидазы, ассоциированной со старением; активацию ингибиторов клеточного цикла p16^{INK4A}, p21^{CIP1}; снижение экспрессии белков LMNB1 и HMGB2, определяющих структуру и архитектуру клеточного ядра [14–16]. В дополнение к анализу указанных маркеров возможно проведение функциональных тестов для оценки пролиферативного потенциала, проявления маркеров повреждения ДНК и апоптоза [12, 17].

Характерной особенностью сенесцентных клеток является секреция провоспалительных цитокинов, хемокинов, факторов роста и протеаз, которые объединены понятием секреторного фенотипа,

ассоциированного со старением (SASP) [18]. Детекция факторов SASP может служить индикатором клеточного старения, однако их представленность существенно варьирует и зависит, в частности, от функциональной причины индукции клеточного старения [11]. Таким образом, классический подход к исследованию клеточного старения основан на анализе достаточно широкого спектра неисключительных маркеров и проведении функциональных тестов. Вместе с тем в настоящее время развиваются подходы к интегральной оценке клеточного старения предиктивными моделями, построенными на основе анализа паттернов метилирования ДНК, транскриптомных данных и клеточной морфологии [19–21]. Такие предиктивные модели позволяют учитывать вариабельность проявлений клеточного старения и, как правило, в меньшей степени зависят от отдельных маркеров, что позволяет рассматривать их в качестве перспективного инструмента анализа.

Цель исследования — проанализировать проявления отдельных маркеров старения на модели репликативного, стресс-индуцированного и хронологического старения мезенхимальных стволовых клеток человека. В качестве таких маркеров мы рассматривали уровень экспрессии отдельных генов, динамика которых ассоциирована со старением; глобальные изменения транскриптома в ходе хронологического и *in vitro* старения клеток; исследование длины теломера; а также изменения клеточной морфологии и проявления отдельных цитологических маркеров клеточного старения. В рамках работы мы оценили применимость указанных маркеров для оценки старения МСК, а также ограничения используемых методов, потенциально способные исказить анализ. Кроме того, была проанализирована концептуальная возможность построения предиктивных моделей для оценки хронологического возраста и протяженности культивирования *in vitro* на основе транскриптомных данных и исследования клеточной морфологии.

Материалы и методы

Культуры клеток. Образцы клеток были взяты с добровольного информированного согласия доноров. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом Федерального центра мозга и нейротехнологий ФМБА России (протокол №7-5-22 от 6 сентября 2022 г.).

В работе были использованы МСК (n=2), выделенные из вартоновского студня здоровой роженицы на 38–40 нед гестации; МСК костного мозга (KM-МСК) здоровых доноров 18–25 лет (n=3) и старше 65 лет (n=3), взятые из фракции моноклеарных клеток костного мозга, полученных методом градиентного центрифугирования (20 мин, 400 g) в растворе фиколла («ПанЭко», Россия). Клетки культивировали в среде DMEM/F12 (Servicebio, Китай) с добавлением 15% фетальной бычьей сыворотки (Capricorn,

Китай) и коктейля антибиотиков пенициллина (100 ед./мл) и стрептомицина (100 мкг/мл) (Gibco, США). Субкультивирование проводили с коэффициентом разбавления 1:4. Методом проточной цитофлуориметрии анализировали экспрессию маркеров МСК: CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD34, CD45 (FITC/PE; Miltenyi Biotec, Германия) и HLA-DR. Клетки имели морфологию и иммунофенотип, характерные для МСК: CD29⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD34[–], CD45[–].

Для индукции стресс-индуцированного клеточного старения культивировали МСК до достижения 60% конfluence, после чего меняли культуральную среду на среду, содержащую 200 мкМ перекиси водорода («Диазм», Россия). Спустя 4 ч инкубации удаляли среду и дважды промывали МСК фосфатно-солевым буфером. Затем клетки инкубировали в стандартных условиях культивации в течение 3 дней, после чего использовали для дальнейшего анализа.

Иммуноокрашивание и цитохимический анализ активности β-галактозидазы, ассоциированной со старением. Для приготовления препаратов клетки культивировали в 96-луночных планшетах для конфокальной микроскопии (SPL Lifesciences, Южная Корея) либо на покровных стеклах, предварительно покрытых 0,1% раствором желатина (Sigma-Aldrich, США). По достижении необходимой конfluence препараты фиксировали в 4% растворе формальдегида (Sigma-Aldrich, США). Анализ активности β-галактозидазы, ассоциированной со старением, выполняли по описанной ранее методике [22]. Для проведения иммуноокрашивания клетки инкубировали в растворе 0,1% Triton X-100 (Amresco, США) в течение 30 мин, после чего инкубировали в 1% растворе BSA (Sigma-Aldrich, США) в течение 1 ч. Для иммуноокрашивания использовали следующие первичные и вторичные антитела: Ki-67 (Cell Signalling Technology, США либо Miltenyi Biotec, Германия); H3K9me3 (Active Motif, США); Donkey Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488) (Abcam, Великобритания); Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 568) (Abcam, Великобритания); Goat anti-Rabbit IgG (H+L) (PE-Alexa Fluor™ 647) (Invitrogen, США). В качестве ядерного красителя применяли Hoechst 33342 (Invitrogen, США). Анализ препаратов проводили с использованием флуоресцентного микроскопа Olympus BX 51 (Olympus Corporation, Япония) и сканирующего лазерного конфокального микроскопа Nikon A1 (Nikon Corporation, Япония).

Оценка экспрессии генов методом ПЦР в режиме реального времени. Для выделения РНК применяли реагент Rizo (diaGene, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Синтез комплементарной ДНК осуществляли с помощью набора реагентов для обратной транскрипции («Биолабмикс», Россия). ПЦР в режиме реального времени проводили с использованием реакционных смесей «БиоМастер UDG HS-qPCR SYBR Blue»

(«Биолабмикс», Россия). Для нормализации применяли референсные гены *ACTB* и *SDHA*.

Последовательности использованных в работе олигонуклеотидов:

ACTB_F ACAGAGCCTCGCCTTTG, *ACTB_R* RCCTTGACATGCCGGAG;

SDHA_F TTTGATGCAGTGGTGGTAGG, *SDHA_R* CAGAGCAGCATTGATTCCTC;

p21_F TGGAGACTC TCAGGGTCGAAA, *p21_R* GGCCTTTGGAGTG GTAGAAATC;

HMGB2_F CTGGGCACGATATGCAGCAA, *HMGB2_R* CAGCCAAAGATAAACAACCATATGA;

LMNB1_F ACACCTTCTGAACAGGATCAACC, *LMNB1_R* CTGTGACACCAGCGTTTGC;

p16ink4a_F CCCAACGCACCGAATAGTTA, *p16ink4a_R* ACCAGCGTGTCCAGGAAG;

IL6_F GTGGCTGCAGGACATGACAA, *IL6_R* TGAGGTGCCCATGCTACATTT;

IL8_F AAGAGCCAGGAAGAAACCACC, *IL8_R* CTGCAGAAATCAGGAAGGCTG;

IL1b_F CTGTCCTGCGTGTGAAAGA, *IL1b_R* TTGGGTAATTTTGGGATCTACA;

PAI1-F CTCATCAGCCACTGGAAAGGCA, *PAI1_R* GACTCGTGAAGTCAGCCTGAAAC;

MCP1_F CTTCTGTGCCTGCTGCTCATA, *MCP1_R* CTTTGGGACACTTGCTGCTG;

MMP1-F TGGACGTTCCCAAAATCCTG, *MMP1_R* AAGGGATTTGTGCGCATGTAG;

MMP3-F CTGCTGTTGAGAAAGCTCTG, *MMP3_R* AATTGGTCCCTGTTGTATCCT.

Определение длины теломер методом ПЦР в режиме реального времени. ПЦР в режиме реального времени проводили с использованием реакционных смесей «БиоМастер UDG HS-qPCR SYBR Blue» («Биолабмикс», Россия) с парами праймеров Tel-F CG GTTTGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTT и Tel-R GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT, специфичными к повторам теломерной ДНК, а также 36B4u CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC и 36B4d CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA, специфичными к участку гена кислого рибосомного фосфопротеина P0 на хромосоме 12. Копийность генома и суммарную длину теломерной ДНК на старте ПЦР определяли относительно стандартной ДНК, которая представляла собой плазмиду pAL2-T («Евроген», Россия) со встройкой ампликона 36B4 или со встройкой кластера из 14 повторов теломерной ДНК человека суммарной длиной 84 п.н. Программа амплификации — 50°C в течение 5 мин, 95°C в течение 10 мин, 39 циклов 95°C в течение 15 с и 60°C в течение 1 мин.

Анализ данных высокопроизводительного секвенирования транскриптома и построение предиктивных моделей на основе транскриптомных данных. В работе были использованы ранее опубликованные данные, размещенные в репозитории Gene Expression Omnibus (GSE139073, GSE145008) [23, 24]. Выравнивание сырых прочтений на референсный геном GRCh38, препроцессинг

и детекцию генной экспрессии на уровне прочтений проводили с использованием программ STAR, SAMtools и featureCounts [25–27]. Для устранения батч-эффектов в транскриптомных данных применялся метод ComBat-seq, реализованный в пакете *sva* [28]. Анализ дифференциальной экспрессии генов проводили с использованием статистического пакета *edgeR* [29].

Для построения предиктивных моделей хронологического возраста и длительности культивации *in vitro* использовали нормализованные значения генной экспрессии. Были отобраны гены, экспрессия которых статистически значимо коррелировала с пассажем либо хронологическим возрастом доноров с применением коэффициентов корреляции Спирмена и Пирсона (коэффициент $> |0,5|$, скорректированный уровень значимости (p -value-adjusted) $< 0,05$). Регрессионные модели были построены с использованием LASSO-регрессии и метода случайного леса (random forest regressor, RFR) из пакета Scikit-learn [30]. Данные были разделены на обучающую (80%, 84 образца секвенирования) и тестовую (20%, 22 образца секвенирования) выборки. Для модели на основе LASSO-регрессии применена автоматическая настройка гиперпараметра с помощью LassoCV на обучающей выборке. Для RFR-модели использованы базовые параметры количества деревьев. Качество моделей оценивалось на тестовой выборке, которая не участвовала в процессе обучения.

Подготовка данных и обучение нейросетевой сегментационной модели. На первом этапе с использованием модели распознавания изображений Segment Anything с последующей ручной валидацией и коррекцией были подготовлены маски ядер для микроскопических снимков клеточных препаратов пуповинных МСК на разных культуральных пассажах (диапазон пассажей — 3–15, суммарно 27 500 клеток) [31]. На следующем шаге снимки были масштабированы до одинакового разрешения и разделены скользящим окном с шагом 246 пикселей на перекрывающиеся фрагменты размером 256×256 пикселей. Шаг окна обеспечивал перекрытие соседних фрагментов изображений на 10 пикселей с каждой стороны, что позволило уменьшить граничные артефакты при последующей сборке итоговой карты сегментации. Для повышения устойчивости модели к различным вариантам экспозиции и контрастности изображений применяли методы аугментации. Среди использованных преобразований — горизонтальные и вертикальные отражения, случайные изменения яркости и контраста, а также масштабирование с небольшими сдвигами. Итоговый набор данных состоял из 563 примеров и был разделен в соотношении 80/20% для обучения и тестирования, обеспечивая достаточное число примеров для корректной настройки параметров сети.

Для решения задачи сегментации ядер клеток использовали сверточную архитектуру нейронной

сети DeepLabV3+ [32]. В качестве базовой сети был выбран EfficientNet-b0 [33], предобученный на наборе данных ImageNet, что обеспечило моделям начальное представление о низкоуровневых признаках изображений. Обучение проводили в течение 40 эпох, что позволило модели достичь стабильной сходимости. За этот период модель обучалась на вычислительном узле с графическим процессором NVIDIA A100, что обеспечило полное выполнение тренировочного цикла за 3,5 ч. Для минимизации влияния несбалансированности классов (значительной разницы по размерам ядер и тонких границ) и достижения более точной сегментации использовали комбинированную функцию потерь, которая интегрировала в себе две составляющие: функция BCE-Dice Loss обеспечивала высокую чувствительность к дисбалансу между классами (ядро/фон) и учитывала пространственную согласованность предсказаний; функция Focal Loss улучшала обучение за счет снижения влияния легко классифицируемых примеров. В процессе обучения применяли планировщик скорости обучения (scheduler), который корректировал скорость обучения (learning rate) от начальной величины $1e-3$ до $1e-5$ после каждой итерации, обеспечивая постепенное уменьшение шага оптимизации и способствуя стабильной сходимости модели.

Для подсчёта количественных морфометрических характеристик ядер на входе функции анализа передавалась бинарная маска, полученная из результатов сегментации DeepLabV3+. Перед вычислениями из общей маски исключались пиксели, помеченные как «граница», а затем выполнялась последовательная эрозия–дилатация (по 20 пикселей) для удаления тонких артефактов и слияния разорванных контуров. Вычисляемые параметры для каждого ядра: координаты центра (X, Y), площадь, круглость, полуоси эллипса (major/minor) и угол наклона, дистанция Хаусдорфа. Был также установлен коэффициент принадлежности к классу пассажей: класс 1 (3–5-й пассаж), класс 2 (7–9-й пассаж), класс 3 (11–15-й пассаж). Исполняемые скрипты модели выложены в репозитории GitHub (<https://github.com/LabADTCellSeg/cellseg>).

Результаты

Ассоциированные со старением изменения профиля экспрессии генов. Для оценки ассоциированных со старением изменений экспрессии в МСК мы выбрали гены, являющиеся принципиальными регуляторами клеточного старения на уровне контроля клеточного цикла и структуры ядра, а также кодирующие компоненты провоспалительного фенотипа. Нами был исследован уровень экспрессии следующих генов: *P16INK4a/CDKN2A*, *P21CIP1/CDKN1A*, *LMNB1*, *HMGB2*, *IL6*, *IL8/CXCL8*, *IL1B*, *SERPINE1/PAI1*, *MCP1/CCL2*, *MMP1*, *MMP3*. Анализ экспрессии проведен на модели репликативного кле-

точного старения — независимых клеточных линиях пуповинных МСК, подвергнутых длительному культивированию ($n=2$); на модели хронологического старения — образцах КМ-МСК от групп доноров разного возраста: 20–25 лет ($n=2$) и старше 65 лет ($n=2$); на модели стресс-индуцированного старения — линиях пуповинных МСК, подвергнутых индукции клеточного старения пероксидом водорода ($n=2$).

Гены, кодирующие ингибиторы циклин-зависимых киназ (*CDKN2A* и *CDKN1A*), демонстрировали сходную динамику во всех исследованных образцах — их экспрессия увеличивалась в ходе продолжительной культивации, при воздействии окислительного стресса, а также с увеличением возраста доноров (рис. 1). Необходимо отметить, что увеличение экспрессии было более выражено для *CDKN1A*, в то время как изменения экспрессии *CDKN2A* были слабее и, в случае исследования репликативного старения, недостоверны. Уровень экспрессии генов, кодирующих ядерные архитектурные белки *LMNB1* и *HMGB2*, статистически значимо снижался как при репликативном и стресс-индуцированном старении, так и в случае хронологического старения (см. рис. 1). Причем наиболее драматичные изменения наблюдались при репликативном старении, в ходе которого снижение экспрессии в течение культивирования достигало около 90% для *LMNB1* и *HMGB2*. Интересно отметить, что гены, кодирующие компоненты SASP, демонстрировали различную динамику в зависимости от причины старения клеток (см. рис. 1). Так, индукция старения перекисью вызывала повышение уровня экспрессии всех исследованных генов, за исключением *MCP1*, в то время как репликативное старение не вызывало активации генов, кодирующих матриксные металло-протеиназы *MMP1* и *MMP3*. Интересно отметить, что анализ образцов КМ-МСК доноров разного возраста не выявил возраст-зависимых изменений в уровне экспрессии генов, кодирующих цитокины *IL-6*, *IL-1β*, а *CXCL8* достаточно слабо активировался в клетках возрастных доноров. Наиболее стабильно в контексте ассоциированной со старением клеток динамики экспрессии проявил себя ген *SERPINE1/PAI1*, кодирующий белок PAI-1.

Различные проявления провоспалительного фенотипа, ассоциированного со старением, в зависимости от типа старения клеток в целом являются ожидаемыми, однако для независимой проверки полученных результатов был проведен поиск доступных данных высокопроизводительного секвенирования транскриптомов КМ-МСК, содержащих информацию о возрасте доноров, а также клеточном пассаже, в репозитории Gene Expression Omnibus. В результате был подготовлен набор данных ($n=37$, возраст — 3–85 лет, медианное значение — 47 лет; табл. 1) и проведен корреляционный анализ изменения экспрессии исследованных нами генов с продолжительностью культивирования, а также с возрастом доноров. В соответствии с полученными результатами

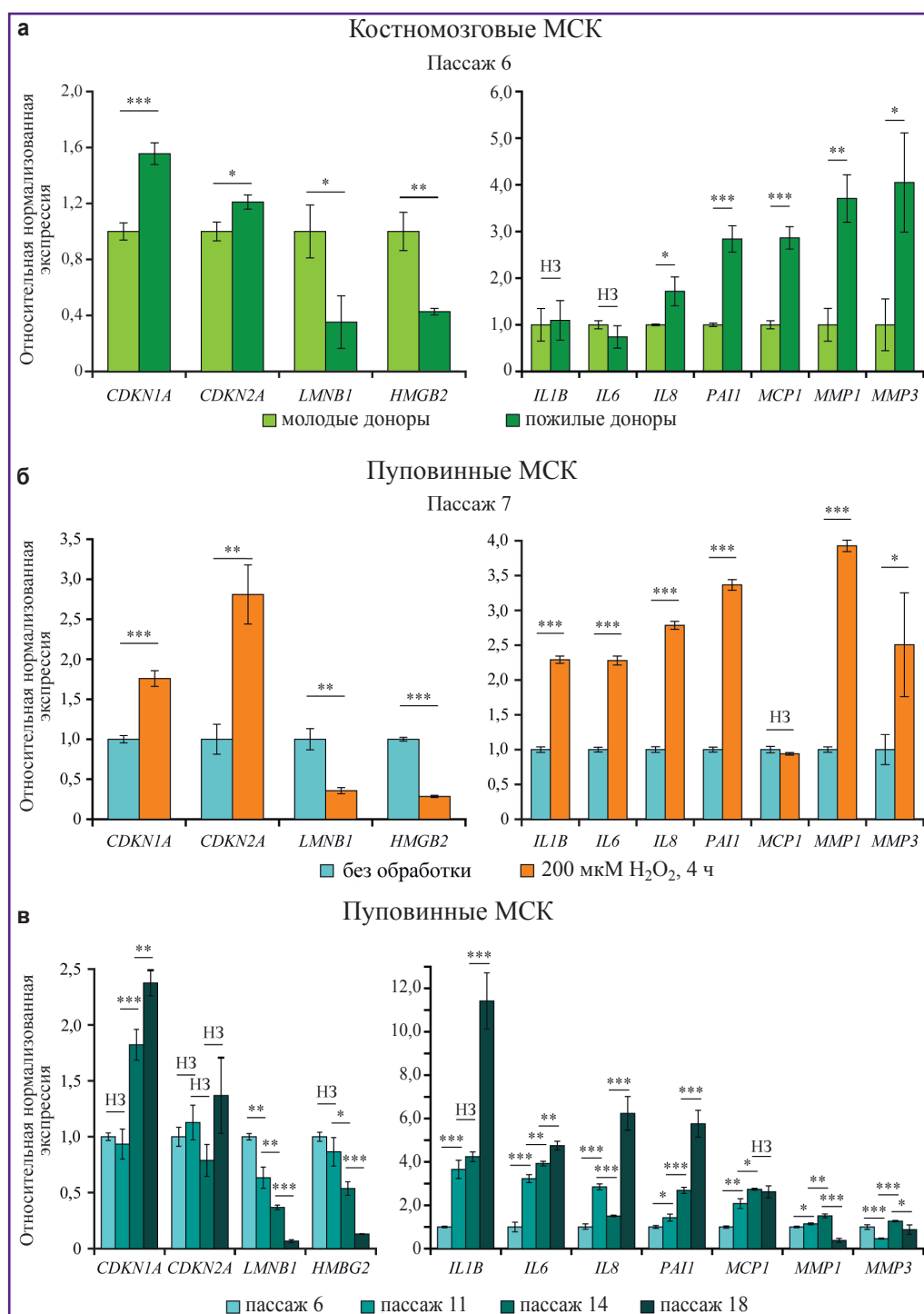


Рис. 1. Относительная нормализованная экспрессия генов, измеренная с помощью количественной ПЦР с обратной транскрипцией в культурах МСК:

а — сравнение экспрессии генов в культурах МСК 6-го пассажа, выделенных от молодых (18–25 лет, $n=3$) и пожилых (>65 лет, $n=3$) доноров; **б** — сравнение между пуповинными МСК на 7-м пассаже в стандартных условиях и после 4-часовой обработки 200 мкМ раствора перекиси; **в** — динамика экспрессии генов в ходе культивации пуповинных МСК в стандартных условиях, представлены измерения на 6, 11, 14 и 18-м пассажах; * $p<0,05$; ** $p<0,005$; *** $p<0,0005$; НЗ — $p\geq 0,05$, тест Стьюдента

гены *SERPINE1/PAI1*, *CDKN1A* и *CDKN2A* демонстрировали положительную корреляцию с протяженностью культивирования, а *LMNB1* и *HMGB2* — отри-

цательную (корреляция Спирмена, $p<0,05$; табл. 2). Корреляция с возрастом доноров была выявлена для генов *CDKN1A* и *LMNB1* при условии отсутствия

Таблица 1

Список образцов РНК-секвенирования донорских МСК костного мозга, использованных в исследовании, с указанием идентификаторов публичной базы данных Gene Expression Omnibus и Sequence Read Archive

Идентификатор образца	Возраст донора	Пол	Пассаж	Идентификационный номер донора
<i>Идентификатор проекта — GSE139073</i>				
SRR10307337	73	Ж	4	777
SRR10307338	73	Ж	4	777
SRR10307339	48	Ж	4	819
SRR10307340	48	Ж	4	819
SRR10307341	75	Ж	4	821
SRR10307342	75	Ж	4	821
SRR10307343	24	М	3	126
SRR10307344	24	М	3	126
SRR10307345	16	Ж	3	127
SRR10307346	16	Ж	3	127
SRR10307347	61	М	3	237
SRR10307348	61	М	3	237
SRR10307349	25	Ж	3	264
SRR10307350	25	Ж	3	264
SRR10307351	63	М	3	265
SRR10307352	63	М	3	265
SRR10307353	48	Ж	3	276
SRR10307354	48	Ж	3	276
SRR10307355	82	Ж	3	278
SRR10307356	82	Ж	3	278
SRR10307357	35	Ж	3	285
SRR10307358	35	Ж	3	285
SRR10307359	45	Ж	3	289
SRR10307360	45	Ж	3	289
SRR10307361	48	М	3	293
SRR10307362	48	М	3	293
SRR10307363	47	Ж	3	308
SRR10307364	47	Ж	3	308
SRR10307365	71	Ж	3	316
SRR10307366	71	Ж	3	316
SRR10307367	51	М	3	324
SRR10307368	51	М	3	324
SRR10307369	57	М	3	329
SRR10307370	57	М	3	329
SRR10307371	80	М	3	336
SRR10307372	80	М	3	336
SRR10307373	85	М	3	354
SRR10307374	85	М	3	354
SRR10307375	37	М	3	357
SRR10307376	37	М	3	357
SRR10307377	68	М	3	374

Продолжение табл. 1

Идентификатор образца	Возраст донора	Пол	Пассаж	Идентификационный номер донора
SRR10307378	68	М	3	374
SRR10307379	78	М	3	378
SRR10307380	78	М	3	378
SRR10307381	68	Ж	3	386
SRR10307382	68	Ж	3	386
SRR10307383	65	Ж	3	660
SRR10307384	65	Ж	3	660
SRR10307385	69	Ж	3	651
SRR10307386	69	Ж	3	651
SRR10307387	73	Ж	3	777
SRR10307388	73	Ж	3	777
SRR10307389	33	М	3	784
SRR10307390	33	М	3	784
SRR10307391	24	М	6	126
SRR10307392	24	М	6	126
SRR10307393	16	Ж	6	127
SRR10307394	16	Ж	6	127
SRR10307395	35	Ж	6	285
SRR10307396	35	Ж	6	285
SRR10307397	48	М	6	293
SRR10307398	48	М	6	293
SRR10307399	51	М	6	324
SRR10307400	51	М	6	324
SRR10307401	33	М	6	784
SRR10307402	33	М	6	784
Идентификатор проекта — GSE145008				
SRR11050732	14	Ж	3	1
SRR11050733	14	Ж	3	1
SRR11050734	14	Ж	3	1
SRR11050735	14	Ж	3	1
SRR11050736	20	М	3	2
SRR11050737	20	М	3	2
SRR11050738	20	М	3	2
SRR11050739	20	М	3	2
SRR11050740	9	Ж	3	3
SRR11050741	9	Ж	3	3
SRR11050742	9	Ж	3	3
SRR11050743	9	Ж	3	3
SRR11050744	5	М	3	4
SRR11050745	5	М	3	4
SRR11050746	9	Ж	3	5
SRR11050747	9	Ж	3	5
SRR11050748	9	Ж	3	5
SRR11050749	9	Ж	3	5

Окончание табл. 1

Идентификатор образца	Возраст донора	Пол	Пассаж	Идентификационный номер донора
SRR11050750	13	Ж	3	6
SRR11050751	13	Ж	3	6
SRR11050752	13	Ж	3	6
SRR11050753	13	Ж	3	6
SRR11050754	29	М	3	7
SRR11050755	29	М	3	7
SRR11050756	29	М	3	7
SRR11050757	29	М	3	7
SRR11050758	17	М	3	8
SRR11050759	17	М	3	8
SRR11050760	33	Ж	3	9
SRR11050761	33	Ж	3	9
SRR11050762	33	Ж	3	9
SRR11050763	33	Ж	3	9
SRR11050764	13	Ж	3	10
SRR11050765	13	Ж	3	10
SRR11050766	13	Ж	3	10
SRR11050767	13	Ж	3	10
SRR11050768	3	Ж	3	11
SRR11050769	3	Ж	3	11
SRR11050770	3	Ж	3	11
SRR11050771	3	Ж	3	11

Таблица 2

Корреляция экспрессии генов-маркеров клеточного старения с продолжительностью культивирования МСК костного мозга согласно транскриптомным данным

Ген	Коэффициент корреляции Спирмена	p-значение	p-значение скорректированное (метод Бенджамини-Хохберга)
<i>SERPINE1/PAI1</i>	0,45	1,04E-06	0,000053
<i>HMGB2</i>	-0,33	0,00049	0,0052
<i>LMNB1</i>	-0,31	0,0013	0,011
<i>CDKN1A</i>	0,31	0,0015	0,012
<i>CDKN2A</i>	0,30	0,0017	0,014
<i>CXCL8</i>	0,25	0,011	0,054
<i>CCL2</i>	0,22	0,023	0,090
<i>IL6</i>	0,22	0,024	0,091
<i>IL1B</i>	0,12	0,22	0,44
<i>MMP3</i>	-0,10	0,29	0,53

поправки на множественное тестирование (табл. 3). Анализ дифференциальной экспрессии в образцах КМ-МСК от группы доноров 20–35 лет ($n=7$) и доноров 60–85 лет ($n=13$) выявил лишь 50 генов, демонстрирующих статистически значимые существен-

ные отличия уровня экспрессии ($|\log FC| > 2$, $p < 0,05$) (табл. 4). По всей вероятности, донор-зависимая вариабельность паттернов экспрессии генов в КМ-МСК может быть достаточно высока, что затрудняет выявление транскрипционных маркеров хронологического

Таблица 3

Корреляция экспрессии генов-маркеров клеточного старения с возрастом доноров костномозговых МСК согласно транскриптомным данным

Ген	Коэффициент корреляции Спирмена	p-значение	p-значение скорректированное (метод Бенджамини–Хохберга)
<i>CDKN1A</i>	0,21	0,027	0,14
<i>LMNB1</i>	–0,21	0,032	0,16
<i>HMGB2</i>	–0,19	0,050	0,21
<i>MMP3</i>	0,17	0,078	0,27
<i>CXCL8</i>	0,17	0,086	0,28
<i>SERPINE1/PAI1</i>	0,11	0,27	0,53
<i>CCL2</i>	0,10	0,29	0,54
<i>IL6</i>	0,045	0,65	0,82
<i>IL1B</i>	–0,024	0,80	0,91
<i>CDKN2A</i>	–0,014	0,89	0,95

Таблица 4

Дифференциальная экспрессия генов МСК костного мозга при сравнении возраста доноров согласно транскриптомным данным

Ген	logFC	logCPM	LR	p-значение	FDR
<i>IDO1</i>	–6,74201	0,130015	17,82139	2,43E–05	0,010439
<i>IGKC</i>	–6,03135	1,491429	33,98931	5,54E–09	4,51E–05
<i>CSF3</i>	–6,00031	–0,9205	13,5434	0,00023311	0,038058
<i>CXCL9</i>	–5,91117	–0,96128	13,78282	0,000205204	0,035238
<i>IGHG1</i>	–5,75566	–0,59634	36,87759	1,26E–09	2,66E–05
<i>IGLC2</i>	–5,718	–1,29152	36,70287	1,38E–09	2,66E–05
<i>EEF1DP5</i>	–5,41503	–0,55565	13,93917	0,000188822	0,034148
<i>IGHA1</i>	–5,19498	–1,61628	29,47482	5,66E–08	0,000181
<i>IGKV4-1</i>	–4,98465	–1,7487	30,30424	3,69E–08	0,000151
<i>MYOD1</i>	–4,95005	–1,06079	20,98677	4,62E–06	0,004005
<i>MUC5AC</i>	–4,60036	–1,35788	14,91265	0,000112605	0,02448
<i>IGHG3</i>	–4,53654	–1,75797	22,59954	2,00E–06	0,002714
<i>IGLC3</i>	–4,45419	–1,9868	20,78149	5,15E–06	0,004046
<i>IGHG2</i>	–4,45175	–1,99772	21,74035	3,12E–06	0,003496
<i>GBX2</i>	–4,38756	–1,50842	27,1453	1,89E–07	0,000514
<i>IGLV3-19</i>	–4,23956	–2,06218	20,88334	4,88E–06	0,004005
<i>IGLV3-21</i>	–4,16984	–2,11667	21,59141	3,37E–06	0,003535
<i>IGLV2-14</i>	–3,91505	–2,21161	19,31244	1,11E–05	0,006177
<i>IGHM</i>	–3,60855	–1,94161	13,95801	0,000186939	0,033957
<i>MYOG</i>	–3,60479	–1,94571	13,91752	0,000191009	0,034342
<i>LAIR1</i>	–3,57773	–2,32914	24,23182	8,54E–07	0,001396
<i>TMEM176B</i>	–3,57146	–0,45584	22,1179	2,56E–06	0,003122
<i>ALKAL1</i>	–3,54348	–2,1191	18,05065	2,15E–05	0,00947
<i>IGLV2-11</i>	–3,49343	–2,32861	16,19594	5,71E–05	0,016806
<i>IGKV3-20</i>	–3,40265	–2,3715	15,44576	8,49E–05	0,021421
<i>GCGR</i>	–3,23964	–2,16184	17,18263	3,40E–05	0,01235
<i>IGKV3-15</i>	–3,19646	–2,42303	17,2754	3,23E–05	0,012124

Ген	logFC	logCPM	LR	p-значение	FDR
ABO	-3,19078	-1,62966	25,39491	4,67E-07	0,000909
SHD	-3,17845	-1,93949	13,36813	0,000255936	0,039473
TNMD	-3,12462	-1,51833	26,04848	3,33E-07	0,000846
MTND1P23	-3,10661	-0,32258	14,56727	0,000135243	0,027729
IGLV2-23	-2,973	-2,26645	12,53699	0,000398975	0,049474
CLDN5	-2,81786	-2,22574	12,53175	0,000400096	0,049474
IGLV6-57	-2,75739	-2,51936	15,10868	0,000101495	0,023174
KRTAP7-1	-2,70262	-2,40336	15,37327	8,82E-05	0,021723
ZFP42	-2,62331	-2,1215	13,22307	0,000276524	0,041179
SCN5A	-2,5801	-1,27536	33,64228	6,62E-09	4,51E-05
NPPB	-2,43186	-1,75835	15,13791	9,99E-05	0,022947
LINC01012	-2,32618	-2,10984	25,94058	3,52E-07	0,000846
KLHL34	-2,29995	-2,32066	13,33429	0,000260597	0,039816
CYP19A1	-2,27558	-2,59913	14,27137	0,000158254	0,031096
CACNA1S	-2,24875	-2,60108	13,49961	0,000238613	0,038058
FAM181B	-2,20795	-1,61487	21,35758	3,81E-06	0,003709
TREML3P	-2,20459	-1,64722	18,8168	1,44E-05	0,007261
SLC51B	-2,08324	-2,08956	20,25594	6,77E-06	0,004944
TRIM72	-2,07456	-2,22947	14,87855	0,000114659	0,024664
HOXC12	-2,02755	0,297099	25,10952	5,42E-07	0,000963
GPX1P2	-2,02304	-2,63327	12,67682	0,000370216	0,048132
LINC03004	-2,00501	-1,67803	13,22407	0,000276377	0,041179
CRTAC1	-1,98816	-1,90343	24,45347	7,61E-07	0,001296
GPR83	-1,95678	-2,02969	19,58557	9,62E-06	0,006084
NKX2-2	-1,95335	-1,98009	15,052	0,000104589	0,023548
PDE1B	-1,93211	-2,01438	13,0485	0,000303527	0,04321
HEY2-AS1	-1,89023	-2,0207	12,65258	0,000375047	0,048415
NOTCH4	-1,88533	-2,50867	12,50129	0,00040667	0,049615
MYH14	-1,88023	0,589392	15,27985	9,27E-05	0,022663
ZNF728	-1,87424	-2,18341	14,43592	0,00014501	0,02877
ZNF99	-1,8592	-2,06605	19,20551	1,17E-05	0,00634
WNK2	-1,80691	-2,04595	16,79481	4,16E-05	0,013727
RSAD2	-1,79102	-1,69653	12,85613	0,000336376	0,046134
DUSP15	-1,73147	-0,94925	22,6271	1,97E-06	0,002714
SUNO1	-1,73101	-1,89769	16,7206	4,33E-05	0,013937
GIPC3	-1,70111	-1,47442	35,46025	2,60E-09	2,66E-05
XIRP1	-1,70079	-0,95231	22,31142	2,32E-06	0,002961
LINC02182	-1,70015	-1,38832	32,94003	9,50E-09	4,86E-05
PCSK1N	-1,69436	-0,279	35,46079	2,60E-09	2,66E-05
RBM12B-DT	-1,68636	-2,31889	13,81687	0,000201519	0,035154
APCDD1	-1,6716	-0,15046	22,09332	2,60E-06	0,003122
TMEM63C	-1,65885	-1,67849	14,07606	0,000175564	0,032973
DUSP26	-1,65032	-1,58372	17,78676	2,47E-05	0,01052
GDF10	-1,6433	-0,98772	16,74222	4,28E-05	0,013937
PHLDA2	-1,6418	0,535531	15,23313	9,50E-05	0,022711

Продолжение табл. 4

Ген	logFC	logCPM	LR	p-значение	FDR
LTK	-1,63865	-1,58262	21,49046	3,56E-06	0,003627
LINC00937	-1,59819	-2,06279	19,78999	8,64E-06	0,005791
LHX4	-1,59619	-2,04904	15,95387	6,49E-05	0,017804
TRIM67	-1,59194	-0,12995	13,15763	0,000286351	0,041865
PLXDC1	-1,56106	-1,03286	27,39377	1,66E-07	0,000485
L1CAM	-1,52989	0,276793	14,43591	0,00014501	0,02877
SERPINA12	-1,5203	-0,61139	29,44086	5,76E-08	0,000181
SLC30A3	-1,51219	0,315307	18,86388	1,40E-05	0,007172
FAM162B	-1,50741	-1,53032	15,20718	9,63E-05	0,022759
CMPK2	-1,50377	-1,52247	15,84972	6,86E-05	0,018562
HSPB3	-1,50214	-0,89656	22,53947	2,06E-06	0,002714
TMEM191B	-1,49286	-2,02685	13,79539	0,000203835	0,035154
TMEM156	-1,45208	-1,7143	12,83349	0,00034047	0,046385
TMOD1	-1,43636	-0,74442	21,17288	4,20E-06	0,00393
GPAT2P1	-1,40596	-1,70658	12,56297	0,000393465	0,049474
GPR27	-1,40062	0,30417	19,32474	1,10E-05	0,006177
CDH8	-1,39788	-0,37092	17,14553	3,46E-05	0,01235
CACNA2D3	-1,39769	2,11436	14,7683	0,000121562	0,025479
HEY2	-1,39228	2,025565	19,43099	1,04E-05	0,006177
ST8SIA2	-1,39093	-0,49211	17,53827	2,82E-05	0,010961
LINC02056	-1,38857	-1,62073	12,69264	0,000367098	0,048132
LRP2	-1,37985	-1,28367	23,2891	1,39E-06	0,00211
TGFA	-1,37091	-0,4596	25,61174	4,17E-07	0,000853
WFDC1	-1,36441	2,938302	15,38643	8,76E-05	0,021703
HES4	-1,34238	2,562402	17,64995	2,66E-05	0,010735
PTH1R	-1,33645	0,127042	20,95353	4,71E-06	0,004005
SYN2	-1,26943	1,567083	12,94207	0,000321279	0,044663
HOXC13	-1,26823	-0,37058	19,43103	1,04E-05	0,006177
RAI2	-1,26422	-0,02813	12,60263	0,000385204	0,048893
LONRF2	-1,21634	0,213618	16,65195	4,49E-05	0,014227
HEYL	-1,2162	2,019352	18,99141	1,31E-05	0,00688
CSPG5	-1,21002	-1,72016	18,2359	1,95E-05	0,008993
HEY1	-1,20268	-0,67351	13,30536	0,000264648	0,040107
SLFN14	-1,19595	-1,77817	13,91193	0,000191579	0,034342
ADCY2	-1,1846	2,069172	15,06383	0,000103936	0,023548
RASGRP2	-1,17855	-0,48357	14,0089	0,000181948	0,033347
HOXC13-AS	-1,17836	-1,28119	15,17852	9,78E-05	0,022901
WIPF3	-1,17172	-0,55415	19,45319	1,03E-05	0,006177
PDZD4	-1,16655	0,813909	17,21875	3,33E-05	0,01235
CCDC3	-1,16413	1,018813	15,73623	7,28E-05	0,0192
NPTX1	-1,15928	-1,25645	13,03203	0,000306208	0,04321
CNTN1	-1,15545	0,424462	12,51781	0,000403091	0,049474
ADAP1	-1,1469	-0,05287	25,73178	3,92E-07	0,000853
ITIH5	-1,13921	6,341922	13,5147	0,000236702	0,038058
LINC00547	-1,13275	0,376618	17,9216	2,30E-05	0,010009

Ген	logFC	logCPM	LR	p-значение	FDR
SOX18	-1,12464	1,243256	15,23793	9,48E-05	0,022711
LGALS9	-1,11907	-0,08648	14,93291	0,000111402	0,024348
LINC01362	-1,07221	-1,14826	16,16752	5,80E-05	0,016806
NAP1L2	-1,06613	-1,41077	18,36179	1,83E-05	0,008698
SLC24A3	-1,06481	3,570396	14,93962	0,000111007	0,024348
KNDC1	-1,04924	-0,4902	12,71091	0,000363528	0,048132
TMEM151A	-1,04248	0,0769	13,21936	0,000277072	0,041179
CX3CL1	-1,0329	-0,55568	19,79463	8,62E-06	0,005791
GNAO1	-1,02459	0,68505	12,50729	0,000405366	0,049604
KCNB1	-1,00315	1,293309	13,64308	0,000221055	0,036797
KL	-0,99468	-1,5026	12,69037	0,000367543	0,048132
CDH15	-0,96785	3,09543	21,71385	3,16E-06	0,003496
FGFR3	-0,96435	1,855654	18,18702	2,00E-05	0,008993
RTN1	-0,95672	-0,85915	13,51578	0,000236566	0,038058
SORBS1	-0,91465	0,58739	12,917	0,000325611	0,045108
GPRC5C	-0,91125	1,346111	17,15483	3,45E-05	0,01235
FOLR1	-0,90256	0,48096	12,62354	0,000380919	0,048707
ADCY1	-0,89133	0,016148	16,82263	4,10E-05	0,013637
CD247	-0,88122	-0,95038	20,89899	4,84E-06	0,004005
PHOSPHO1	-0,87691	-1,10453	19,19722	1,18E-05	0,00634
RNASEK	-0,8769	-1,24948	15,80022	7,04E-05	0,018682
LRRC3	-0,87242	2,006731	17,69325	2,60E-05	0,010735
ACAN	-0,87036	10,49467	19,38983	1,07E-05	0,006177
WDR87BP	-0,86428	0,707841	14,02695	0,000180209	0,033327
AKAP6	-0,85959	2,440635	18,39394	1,80E-05	0,008698
TSPAN15	-0,85178	2,428343	15,81195	7,00E-05	0,018682
CARMIL2	-0,83114	-0,62056	12,58457	0,000388945	0,049215
FAM83H	-0,80075	-0,53574	19,45025	1,03E-05	0,006177
MARK1	-0,79935	1,851002	17,57187	2,77E-05	0,010872
TPD52	-0,79811	0,520582	15,93241	6,56E-05	0,017887
DYSF	-0,79424	5,192088	14,96679	0,00010942	0,0243
FAM169A	-0,77762	-0,93632	13,44043	0,00024626	0,038563
NOG	-0,77472	3,337352	13,13857	0,000289278	0,042065
ADRA1B	-0,77342	-0,31774	12,53894	0,000398558	0,049474
SHANK2	-0,76822	2,303994	13,88607	0,000194233	0,034666
BRSK2	-0,74595	0,213741	13,98842	0,00018394	0,033562
DNAH10	-0,73965	-0,88267	13,19353	0,000280917	0,041599
RYSR1	-0,73799	-0,41911	13,08336	0,00029793	0,042876
LEPR	-0,73782	8,314245	13,50392	0,000238066	0,038058
SHC4	-0,73431	1,564619	15,21512	9,59E-05	0,022759
GIPR	-0,73217	0,662796	15,49546	8,27E-05	0,021049
ENPEP	-0,71631	1,032989	14,88719	0,000114135	0,024664
LINC02600	-0,71439	-0,12262	13,67039	0,000217862	0,036643
RASL11A	-0,70716	2,188546	14,50159	0,000140041	0,028335
NPTXR	-0,707	5,032025	13,53486	0,000234173	0,038058

Продолжение табл. 4

Ген	logFC	logCPM	LR	p-значение	FDR
TMEM54	-0,69739	0,126718	13,38037	0,000254272	0,039365
FOXCUT	-0,694	0,89011	16,11985	5,95E-05	0,017113
ARHGEF16	-0,68756	1,494923	12,51938	0,000402753	0,049474
FAM89A	-0,68137	3,487588	15,6699	7,54E-05	0,019758
GPAT2	-0,67632	1,848891	14,75442	0,00012246	0,025536
ITGAL	-0,6678	0,188307	15,82416	6,95E-05	0,018682
IGFBP2	-0,66553	8,122881	13,76376	0,000207297	0,035238
CASQ1	-0,65423	-0,07883	13,49412	0,000239312	0,038058
IL7R	-0,64593	4,366858	13,44428	0,000245754	0,038563
SLC16A14	-0,6331	0,173104	13,79726	0,000203632	0,035154
MICA	-0,6268	2,579888	17,04439	3,65E-05	0,012756
GP1BB	-0,614	2,047757	15,41856	8,61E-05	0,021598
DGKG	-0,61299	1,438626	14,59997	0,000132917	0,027437
JPH2	-0,60239	5,92529	13,87562	0,000195316	0,0347
EDN1	-0,59572	2,794714	12,7033	0,00036501	0,048132
CCDC158	-0,5949	1,517501	14,05138	0,000177883	0,033047
ADRA2C	-0,59458	3,684148	12,98359	0,000314233	0,043983
EGFL7	-0,59008	3,282763	14,19471	0,000164834	0,032081
ITGB1BP2	-0,58525	-0,13723	13,22001	0,000276977	0,041179
LYL1	-0,58504	0,516555	12,62508	0,000380605	0,048707
ZSWIM5	-0,5718	0,176161	15,03511	0,000105529	0,023569
QPRT	-0,57054	1,791185	20,97442	4,65E-06	0,004005
CKB	-0,54894	6,4886	21,15728	4,23E-06	0,00393
SYNGR2	-0,54869	4,063023	17,63299	2,68E-05	0,010735
C3orf70	-0,53617	2,258994	14,40221	0,000147629	0,029148
SEPTIN5	-0,53548	5,850167	17,71423	2,57E-05	0,010735
LGMN	-0,5295	7,390066	13,44756	0,000245325	0,038563
CRIP1	-0,5278	5,915864	15,04709	0,000104862	0,023548
LINC00702	-0,52483	1,68425	18,78584	1,46E-05	0,007289
SLC37A1	-0,51686	2,285977	15,25594	9,39E-05	0,022704
SRRM3	-0,50967	1,020992	12,7151	0,000362716	0,048132
ZNF469	-0,50237	6,320352	21,44639	3,64E-06	0,003627
CRYAB	-0,50215	8,082892	18,24895	1,94E-05	0,008993
DNAJC6	-0,50021	3,746198	16,17961	5,76E-05	0,016806
PPFIA3	-0,49208	1,786657	18,40639	1,78E-05	0,008698
CGREF1	-0,48846	3,916935	15,49059	8,29E-05	0,021049
DNAH5	-0,48696	1,114283	14,10597	0,000172794	0,032848
HES6	-0,48063	1,574922	20,41189	6,24E-06	0,00464
CSPG4	-0,47527	7,532437	13,59239	0,000227104	0,037427
IRAG1	-0,45697	4,251489	12,48452	0,000410338	0,04986
TBXA2R	-0,45102	2,367274	17,31301	3,17E-05	0,011997
HS6ST1	-0,44571	5,327054	13,75934	0,000207785	0,035238
DMPK	-0,44482	6,388112	29,74076	4,94E-08	0,000181
LYSMD2	-0,41007	1,900144	13,60586	0,00022548	0,03731
ANKRD9	-0,40992	4,467814	17,67927	2,61E-05	0,010735

Ген	logFC	logCPM	LR	p-значение	FDR
NOTCH3	-0,40918	9,646443	15,15878	9,88E-05	0,022945
ISG20	-0,39744	2,672711	13,30319	0,000264954	0,040107
ADORA2B	-0,39485	2,24752	14,86052	0,000115761	0,024756
GPC4	-0,39132	6,164633	16,08634	6,05E-05	0,017248
HSPB1	-0,38434	9,410244	22,73045	1,86E-06	0,002714
CYB5R1	-0,38118	5,770637	15,1487	9,94E-05	0,022945
SLC2A6	-0,3756	4,189715	15,40244	8,69E-05	0,021651
MSRB1	-0,3701	5,511516	14,55164	0,00013637	0,027729
ENDOD1	-0,36543	6,610153	14,06412	0,000176682	0,032973
SIX2	-0,36102	5,707384	13,44129	0,000246147	0,038563
RAVER2	-0,35903	4,2544	19,80343	8,58E-06	0,005791
TUBB2A	-0,34554	5,187744	14,4532	0,000143686	0,02877
MIEN1	-0,34286	1,951609	13,04021	0,000304874	0,04321
RGS19	-0,33713	3,360489	12,52686	0,000401143	0,049474
PSEN2	-0,33481	4,018959	19,30059	1,12E-05	0,006177
GSN	-0,32799	9,22319	21,84951	2,95E-06	0,003444
MAP2K3	-0,32026	6,621549	25,12837	5,36E-07	0,000963
MGAT5	-0,30153	6,814577	15,61065	7,78E-05	0,020257
SNTA1	-0,29562	5,384169	12,61557	0,000382546	0,048707
PTPN3	-0,29194	3,537507	18,04734	2,15E-05	0,00947
SORT1	-0,29142	7,62097	16,69438	4,39E-05	0,014021
SRD5A1	-0,28284	4,729072	25,68423	4,02E-07	0,000853
TPST2	-0,28145	6,976341	18,20642	1,98E-05	0,008993
CALM1	-0,27529	8,260706	17,00462	3,73E-05	0,012807
ROGDI	-0,27022	4,824984	15,59218	7,86E-05	0,020327
DAB2IP	-0,26752	5,951331	17,01764	3,70E-05	0,012807
DIRAS1	-0,2544	5,512156	12,89333	0,000329755	0,045378
FAM219A	-0,25096	5,24701	21,62318	3,32E-06	0,003535
EHD1	-0,24981	7,699704	23,91399	1,01E-06	0,001584
BCAP31	-0,24721	7,121209	13,18563	0,000282103	0,041624
CTNNB1	-0,24353	8,746768	16,89087	3,96E-05	0,013263
RHOC	-0,23978	8,846199	13,7611	0,000207591	0,035238
HDAC5	-0,23914	5,900239	15,55691	8,01E-05	0,020579
INPP5A	-0,23369	5,185924	12,83613	0,00033999	0,046385
CUEDC1	-0,23047	6,109555	17,66143	2,64E-05	0,010735
LASP1	-0,22691	9,744295	18,35837	1,83E-05	0,008698
FEZ2	-0,22165	6,185835	13,57329	0,000229427	0,037658
IGHMBP2	-0,22138	4,300589	14,06617	0,00017649	0,032973
EMP3	-0,22047	7,715333	12,61791	0,000382068	0,048707
PREB	-0,2187	5,839774	12,72631	0,000360548	0,048132
DDRKG1	-0,21732	5,515303	15,17375	9,81E-05	0,022901
HDAC11	-0,20866	4,352068	17,601	2,72E-05	0,010811
PITPNM1	-0,20846	5,371332	13,86789	0,000196121	0,0347
LDLRAP1	-0,20678	5,838397	13,05207	0,000302949	0,04321
ARHGEF10L	-0,20518	5,919073	12,77922	0,000350491	0,04727

Продолжение табл. 4

Ген	logFC	logCPM	LR	p-значение	FDR
NPTN	-0,20116	8,061508	14,95693	0,000109993	0,0243
SNX11	-0,20075	4,663461	17,13849	3,48E-05	0,01235
NAPA	-0,19531	4,064688	14,61631	0,000131769	0,027338
TMEM109	-0,19072	6,596263	14,83157	0,000117551	0,024893
SPRYD3	-0,18655	6,312584	12,77161	0,000351921	0,04727
MAPRE3	-0,17976	4,672064	12,48096	0,000411121	0,04986
KIF1C	-0,17932	8,266324	19,72121	8,96E-06	0,005907
PPP2CB	-0,17822	6,651028	16,61981	4,57E-05	0,014249
RHBDD2	-0,17806	5,673687	19,5745	9,68E-06	0,006084
SELENOS	-0,17695	6,242757	13,12572	0,00029127	0,042065
SLC27A4	-0,17567	5,214289	12,51806	0,000403037	0,049474
ARMCX3	-0,17348	6,995281	13,15464	0,000286808	0,041865
RMDN3	-0,16785	5,427733	13,50392	0,000238065	0,038058
LRRFIP2	-0,15981	6,355986	13,13037	0,000290548	0,042065
PPP2R1A	-0,15488	7,886332	12,99828	0,000311777	0,043789
SEC14L1	-0,15293	6,814728	15,27059	9,32E-05	0,022663
EHBP1L1	-0,14069	7,671404	14,1189	0,000171611	0,032848
BLCAP	-0,13762	6,3339	13,40166	0,000251401	0,039069
LZTS2	-0,13014	6,888952	12,78966	0,000348541	0,04727
GART	0,144891	5,426869	16,73461	4,30E-05	0,013937
NUDT21	0,146174	5,944158	12,67975	0,000369637	0,048132
PTGR3	0,151359	4,48144	12,68544	0,000368514	0,048132
HEATR6	0,168375	4,60623	16,04382	6,19E-05	0,017446
PSIP1	0,174873	5,351493	12,7672	0,00035275	0,04727
CMTR2	0,176201	4,585269	17,05302	3,64E-05	0,012756
RAD21	0,190763	5,803668	12,67307	0,00037096	0,048132
FUT8	0,197327	5,011198	12,5474	0,000396759	0,049474
CARD8	0,223999	3,931231	16,5491	4,74E-05	0,014568
S100BPB	0,246188	4,671997	20,87633	4,90E-06	0,004005
USP28	0,249203	4,178656	20,00123	7,74E-06	0,005454
BDH2	0,253192	3,366615	14,47918	0,000141717	0,028533
CASP4	0,256899	4,924556	20,10625	7,33E-06	0,005253
ZCCHC8	0,260018	4,188864	20,62361	5,59E-06	0,004311
B4GALT5	0,262408	5,952676	14,25092	0,000159983	0,031285
IRAK1BP1	0,275405	2,588981	13,84753	0,000198258	0,034817
IFI16	0,278147	6,395011	14,08274	0,000174942	0,032973
AMMECR1	0,278167	4,031016	13,71351	0,000212917	0,035959
SH2D4A	0,295128	5,667351	13,02964	0,000306599	0,04321
DPH5-DT	0,301347	2,46994	16,22833	5,61E-05	0,016806
TMEM116	0,310949	2,121463	13,07266	0,000299638	0,04297
DPYD	0,325722	5,376649	13,1719	0,000284178	0,041779
SRPX	0,330869	5,435651	18,19592	1,99E-05	0,008993
ARHGEF3	0,366546	2,935045	16,02308	6,26E-05	0,017517
SERAC1	0,374418	5,547421	16,32552	5,33E-05	0,016149
CDK14	0,379537	5,705607	16,07847	6,08E-05	0,017248

Ген	logFC	logCPM	LR	p-значение	FDR
GLT8D2	0,386548	4,708298	16,93926	3,86E-05	0,013037
ESR1	0,387471	1,004918	13,63949	0,000221478	0,036797
FGF2	0,388723	4,715732	17,35999	3,09E-05	0,011813
PLSCR1	0,393244	3,954516	19,12633	1,22E-05	0,006494
RUNX1T1	0,395472	3,164303	13,35076	0,000258318	0,039691
IGFBP3	0,398171	12,15029	16,00963	6,30E-05	0,017522
FMNL2	0,401245	4,579389	13,79527	0,000203849	0,035154
ZEB1-AS1	0,405514	1,250406	16,35924	5,24E-05	0,015982
RHOBTB3	0,421879	4,703756	19,29777	1,12E-05	0,006177
PTPRE	0,456301	2,718066	15,96502	6,45E-05	0,017804
OR2A1-AS1	0,460911	0,345043	14,55567	0,000136078	0,027729
MISFA	0,467977	-0,147	12,54327	0,000397636	0,049474
SIM2	0,487467	2,960039	16,63429	4,53E-05	0,014249
CELF6	0,557284	-0,13149	16,17211	5,78E-05	0,016806
ABCA12	0,579788	0,062118	14,17864	0,000166247	0,032202
SEMA5A	0,582161	6,489798	17,20552	3,35E-05	0,01235
IRS2	0,591112	4,466242	14,10983	0,00017244	0,032848
LINC01277	0,786045	-0,53122	14,16108	0,000167806	0,032351
ZFPM2	0,801454	0,340995	12,91085	0,000326684	0,045108
TWIST2	0,831999	4,611952	12,65027	0,000375512	0,048415
KCNK15	0,843858	2,00907	16,57159	4,68E-05	0,014505
LYPLAL1-AS1	0,870673	-0,54629	20,83813	5,00E-06	0,004005
CTSK	0,892649	4,827643	20,56693	5,76E-06	0,004358
RARRES1	0,89793	1,201195	33,30716	7,87E-09	4,59E-05
CELSR1	0,899855	3,295554	12,7837	0,000349652	0,04727
EPHA3	0,942838	2,566101	16,95059	3,84E-05	0,013037
LINC00906	0,952773	-1,22901	19,67965	9,16E-06	0,005941
DENND2A	0,959001	0,240724	13,41387	0,00024977	0,038963
EIF4A2P3	1,000457	-1,55854	14,77132	0,000121367	0,025479
ABCA6	1,018584	2,061196	13,22672	0,000275986	0,041179
USP6	1,140794	-0,65042	13,33082	0,000261079	0,039816
C3	1,160315	4,277584	13,64326	0,000221033	0,036797
FOLR3	1,242528	-1,2425	14,01678	0,000181187	0,033347
LHX9	1,30102	1,764174	32,56135	1,15E-08	5,24E-05
ST3GAL6-AS1	1,400417	-2,06166	12,94407	0,000320936	0,044663
LINC02385	1,512722	-1,89567	18,89287	1,38E-05	0,007153
SLC15A5	1,512989	-1,98155	17,51228	2,85E-05	0,011007
CASP16P	1,513554	-2,07019	13,84536	0,000198486	0,034817
CNTNAP3B	1,785434	2,465226	16,2065	5,68E-05	0,016806
ZNF232	3,397878	-2,27352	14,85184	0,000116294	0,024756

старения. Вместе с тем для оценки клеточного старения *in vitro* анализ экспрессии отдельных генов представляется оправданным.

С целью концептуальной проверки применимости анализа транскриптомных данных для предска-

ния хронологического возраста доноров либо протяженности культивации клеток мы подготовили соответствующие предиктивные регрессионные модели на основе двух подходов: LASSO-регрессии и RFR. Отбор генов, используемых в качестве предикторов,

Таблица 5

Производительность предиктивных моделей на основе LASSO-регрессии и RFR для оценки хронологического возраста

Показатели	RFR		LASSO	
	Коэффициент корреляции Пирсона	Коэффициент корреляции Спирмена	Коэффициент корреляции Пирсона	Коэффициент корреляции Спирмена
Количество генов ($r > 0,5 $)	26	135	26	135
MAE	10,516	10,060	9,858	12,731
R ²	0,684	0,742	0,755	0,655

Таблица 6

Производительность предиктивных моделей на основе LASSO-регрессии и RFR для оценки длительности культивирования *in vitro* (номер пассажа)

Показатели	RFR		LASSO	
	Коэффициент корреляции Пирсона	Коэффициент корреляции Спирмена	Коэффициент корреляции Пирсона	Коэффициент корреляции Спирмена
Количество генов ($r > 0,5 $)	26	186	26	186
MAE	0,490	0,440	0,508	0,682
R ²	0,261	0,323	0,583	0,267

проводили на основе коэффициентов корреляции Пирсона и Спирмена, с целью учета как линейных, так и монотонных зависимостей между признаками и целевыми переменными — хронологическим возрастом и протяженностью культивирования. В результате модели на основе LASSO-регрессии и RFR показали близкую производительность: R²=0,755; MAE=9,858 года и R²=0,742, MAE=10,060 года соответственно (табл. 5). При предсказании клеточного пассажа наивысшую точность предсказания на тестовой выборке продемонстрировала модель на основе LASSO-регрессии — R²=0,583; MAE=0,508 пассажей (табл. 6).

Анализ длины теломер для оценки старения клеток. Одним из традиционных маркеров оценки клеточного старения является анализ длины теломер. Для проведения подобного анализа нами был использован метод ПЦР в режиме реального времени. Проанализированы образцы пуповинных МСК разных пассажей и образцы КМ-МСК доноров возрастной группы 20–25 лет (n=2) и старше 65 лет (n=2) на 6-м культуральном пассаже. Данный метод позволил детектировать динамику укорочения теломер в ходе культивирования МСК, при этом статистически значимые отличия были детектированы спустя 7 пассажей (рис. 2). Вместе с тем при сравнении образцов от доноров разного возраста мы не обнаружили достоверных отличий.

Анализ морфологии ядра в качестве маркера клеточного старения. Для оценки динамики изменения морфологии ядра и проявления отдель-

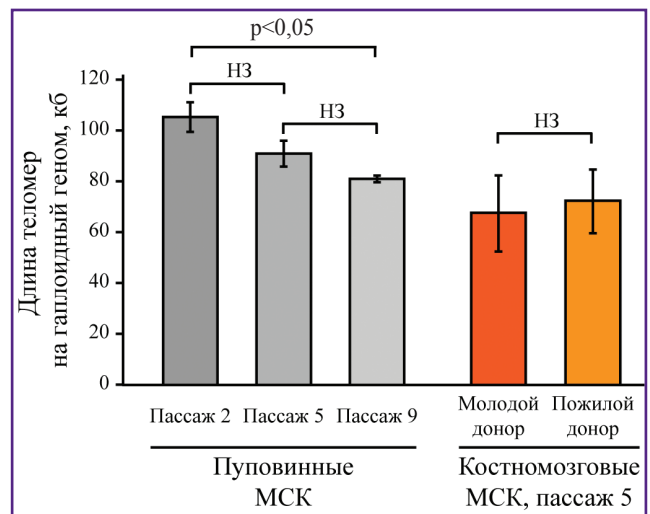


Рис. 2. Сравнение абсолютной длины теломер в пересчете на гаплоидный геном в культивируемых МСК Измерение проводили при помощи количественной ПЦР. Длину теломер сравнивали между пуповинными МСК на разных пассажах, а также между донорскими костномозговыми МСК, выделенными от молодых (20–25 лет, n=3) и пожилых (>60 лет, n=3) доноров. НЗ — $p \geq 0,05$, тест Стьюдента

ных белковых маркеров в ходе старения клеток различного генеза мы проанализировали препараты КМ-МСК трех доноров молодой (18–25 лет) и старшей (более 65 лет) возрастных групп, подвергнутые продолжительному культивированию; препараты

пуповинных МСК; а также клеточные препараты, обработанные перекисью для индукции клеточного старения. При цитохимическом исследовании

активности β -галактозидазы, ассоциированной со старением (рис. 3), наблюдалось увеличение ее активности в ходе репликативного и стресс-индуци-

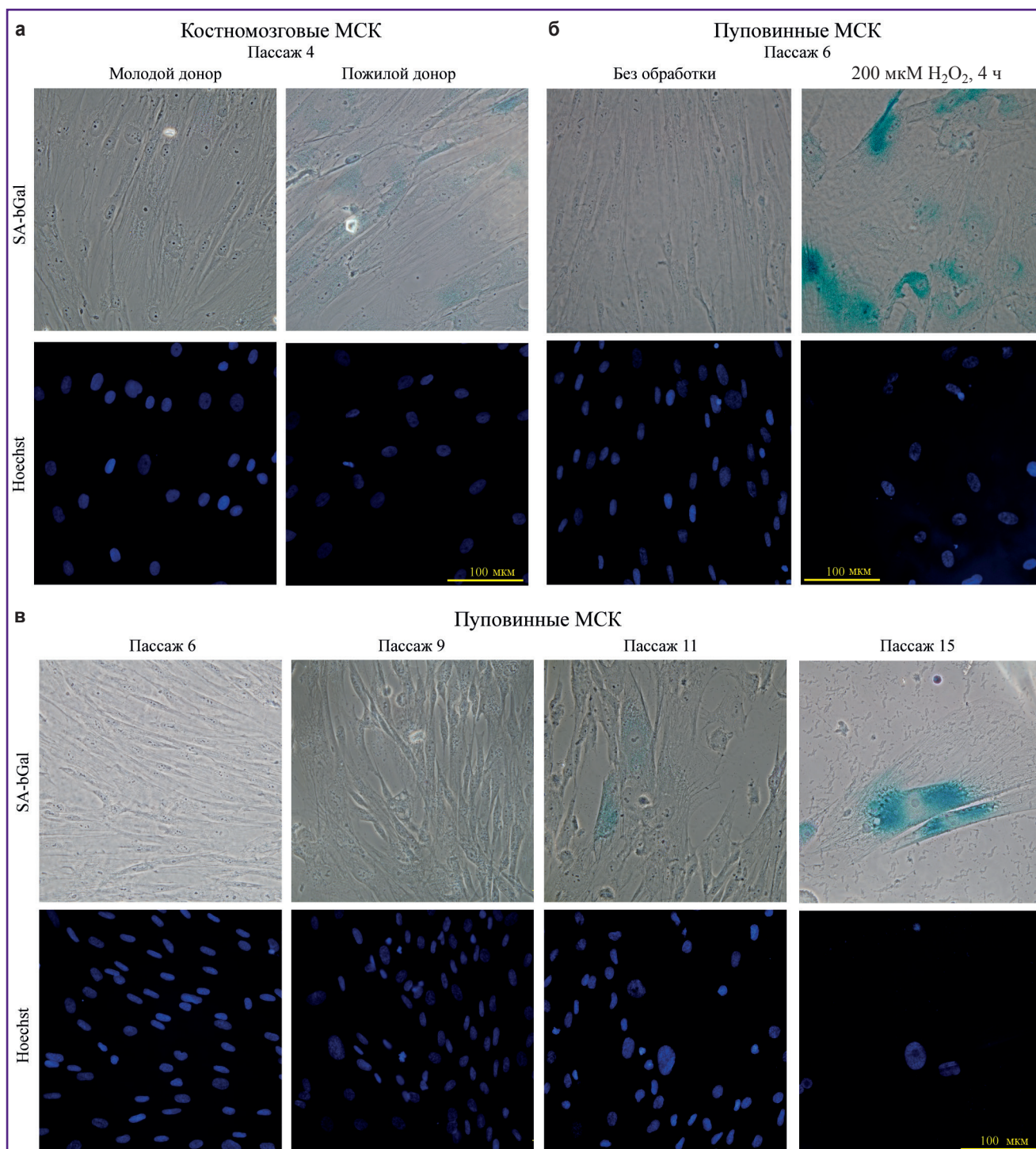


Рис. 3. Исследование активности, ассоциированной со старением β -галактозидазы (SA-βGal), в культивируемых МСК

Клетки были фиксированы и окрашены для определения SA-βGal, ядерная ДНК окрашена красителем Hoechst; а — сравнение костномозговых МСК молодого (группа 18–25 лет) и пожилого (группа >65 лет) донора на 4-м пассаже культивации; б — сравнение пуповинных МСК на 6-м пассаже культивации в нормальных условиях и после 4-часовой обработки 200 мкМ раствора перекиси; в — сравнение пуповинных МСК на 6, 9, 11 и 15-м пассажах культивации в стандартных условиях

рованного старения (рис. 3, б, в). При анализе препаратов, полученных от доноров разного возраста, отличия не были ярко выраженными (рис. 3, а). Иммуноокрашивание клеток антителами против

маркера пролиферации Ki-67 (рис. 4, а–в) позволило установить относительное снижение количества Ki-67-позитивных клеток, ассоциированное с продолжительностью культивирования (см. рис. 4, а;

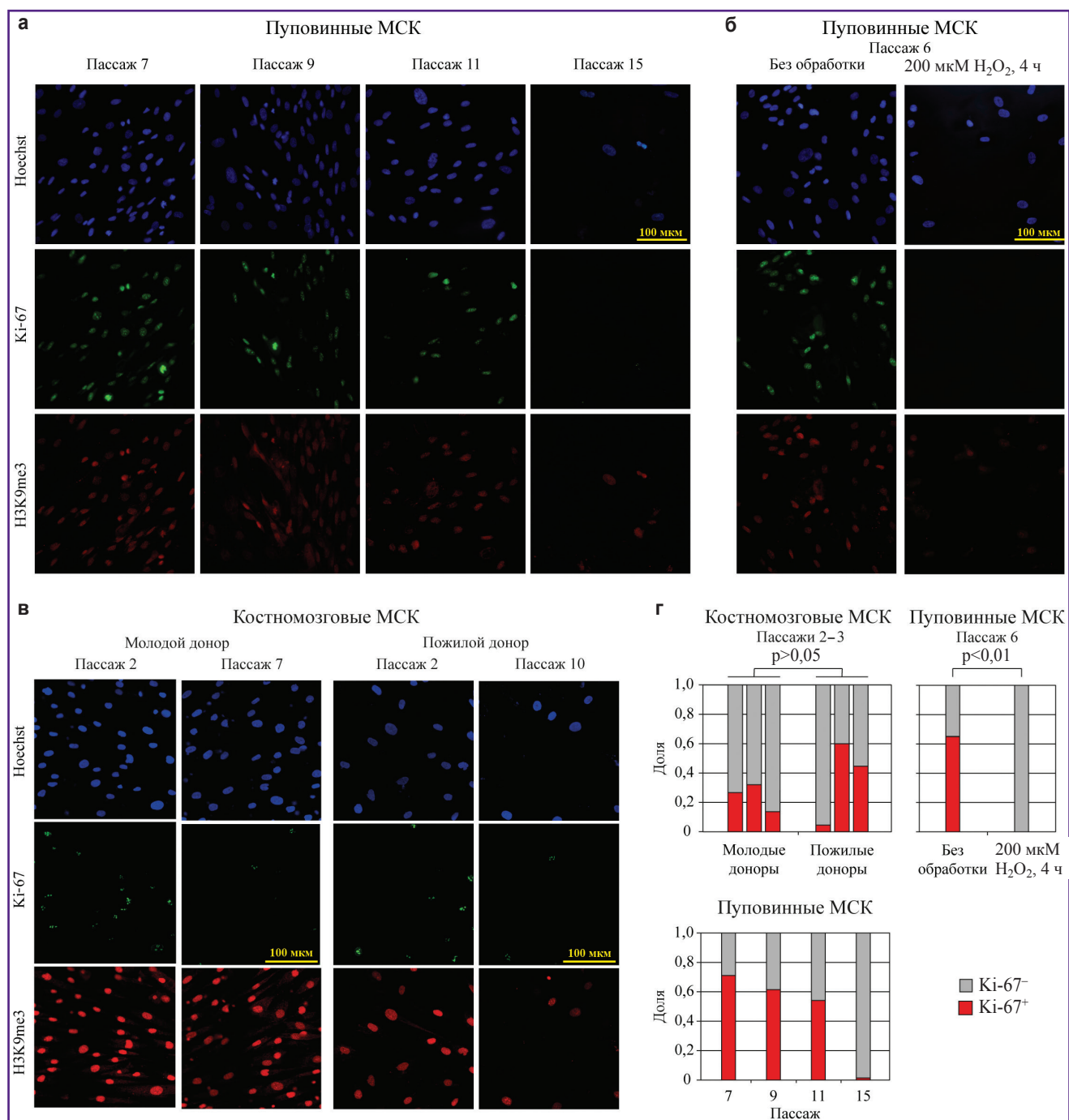


Рис. 4. Исследование ядерного маркера Ki-67 в культурах МСК

Фиксированные формальдегидом препараты МСК были окрашены антителами против маркера клеточной пролиферации Ki-67 (а, б, в), после чего была определена частота Ki-67-позитивных ядер на препаратах (г). Для визуализации ядер хроматин был окрашен антителами против гистоновой модификации H3K9me3, ядерная ДНК — Hoechst; а — сравнение пуповинных МСК на 7, 9, 11 и 15-м пассажах; б — сравнение пуповинных МСК на 6-м пассаже культивации в нормальных условиях и после 4-часовой обработки 200 мкМ раствора перекиси; в — сравнение окраски донорских костномозговых МСК на ранних и поздних пассажах культивации; г — частота Ki-67-позитивных клеток на окрашенных препаратах МСК

рис. 4, а), при этом мы не обнаружили явных отличий при сравнении клеточных препаратов от доноров разного возраста (см. рис. 4, в, г). На уровне морфологии ядер наблюдалось снижение интенсивности сигнала H3K9me3, что соотносится с эрозией гетерохроматина, наблюдаемой при старении, а также увеличение размера ядер как при анализе клеток на более поздних пассажах, так и в случае повышения возраста доноров. Аналогичные эффекты отмечались и при продолжительном культивировании, а также стресс-индуцированном старении пуповинных МСК (см. рис. 4, а–в).

Интересно отметить, что накапливается все больше свидетельств в пользу возможности использования изменения морфологии ядра в качестве самостоятельного признака старения клеток. С технической точки зрения такой анализ выглядит наиболее устойчивым, поскольку фактически требует обработки препарата лишь флуоресцентными ядерными красителями и последующего микроскопического анализа. Кроме того, современные подходы в области машинного распознавания изображений позволяют значительно ускорить итоговую обработку результатов и сбор необходимой статистики. По этой причине для систематического анализа изменения ядерной морфологии в ходе старения мы обучили сегментационную нейросетевую модель, описывающую такие параметры ядерной морфологии, как площадь, круглость и параметры эллипса (см. «Материалы и методы»). Модель продемонстрировала высокое качество сегментации на тестовой выборке (рис. 5, а). В качестве основной метрики оценки эффективности модели использовался показатель Intersection over Union (IoU). Для разработанной модели он составил 0,88, что свидетельствует об эффективном выделении ядер клеток и их границ даже при наличии шумов и вариаций в исходных изображениях. Для каждого ядра вычисляли ряд параметров:

1) координаты центра (X, Y) позволяют сопоставлять ядро с другими клеточными структурами и использовать для пространственного анализа; определяются как центроид, полученный из моментов контура;

2) площадь — маркер общей крупности ядра; рост площади может быть ассоциирован с переходом клеток к поздним пассажам;

3) круглость характеризует компактность формы; увеличение значения свидетельствует о приобретении ядром более круглой формы, что может быть ассоциировано с более поздними стадиями клеточного старения;

4) полуоси эллипса и угол наклона позволяют оценить степень вытянутости и ориентацию ядра;

5) дистанция Хаусдорфа служит критерием качества аппроксимации; низкие значения (<10) указывают на соответствие формы ядра эллипсу.

С помощью разработанной модели были собраны данные о размерах и форме ядер МСК (рис. 5,

б–г) доноров разного возраста (n=9308), подвергнутых культивации *in vitro* различной протяженности (n=5157), а также до и после индукции стресс-опосредованного клеточного старения (n=564). Клетки доноров старшей возрастной группы демонстрировали более широкий диапазон размеров ядер на первых этапах культивации, тогда как с увеличением пассажа размеры ядер у клеток от доноров разного возраста выравнивались (см. рис. 5, в). В ходе продолжительной культивации размер ядра также существенно увеличивался, причем такое увеличение размера происходит градуально (см. рис. 5, б). Стресс-индуцированное старение было сопряжено с наиболее драматичным увеличением размера ядер (см. рис. 5, г).

На следующем шаге мы оценили возможность предсказания протяженности культивации клеток, выраженной в порядковом номере культурального пассажа, по морфологии ядра. Разработанная модель классифицировала клетки на три класса — ранние культуральные пассажи (3–5-й пассаж), промежуточные (7–9-й пассаж) и поздние (11–15-й пассаж), согласно структуре обучающего набора данных. В результате работы модели анализируемым клеткам присваивался коэффициент принадлежности к какому-либо из перечисленных классов. Алгоритм вычисления коэффициентов принадлежности к классу состоял из нескольких этапов. На первом этапе была сформирована область клетки, для этого объединены маска границы и маски классов, затем по результатам сегментации извлекался и заполнялся контур клетки. На следующем этапе проводили подсчет перекрытий с масками классов для определения числа пикселей, лежащих одновременно в области клетки и в маске соответствующего класса. Затем выполняли нормировку по площади клетки, в рамках которой для каждого класса отношение числа перекрывающихся пикселей к общей площади клетки превращается в долю от 0 до 100%. Полученные доли корректировались таким образом, чтобы их сумма равнялась 100%, после чего скорректированные доли принимались за значения коэффициента принадлежности к каждому классу. Принадлежность к основным классам (1, 2, 3) определяли по наивысшему значению коэффициента принадлежности классу, смешанный класс (1/2, 2/3, 3/1) присваивали при условии не более 10% разницы коэффициентов принадлежности двум классам, неопределенный класс — в случае близкого значения коэффициентов принадлежности ко всем классам (все значения менее 40%). Оценка алгоритма на тестовой выборке продемонстрировала адекватное предсказание действительных культуральных пассажей исследуемых клеток (рис. 5, д). Начиная с 9-го пассажа увеличивалась представленность клеток в разных классах, что может быть связано с возрастанием морфологической гетерогенности

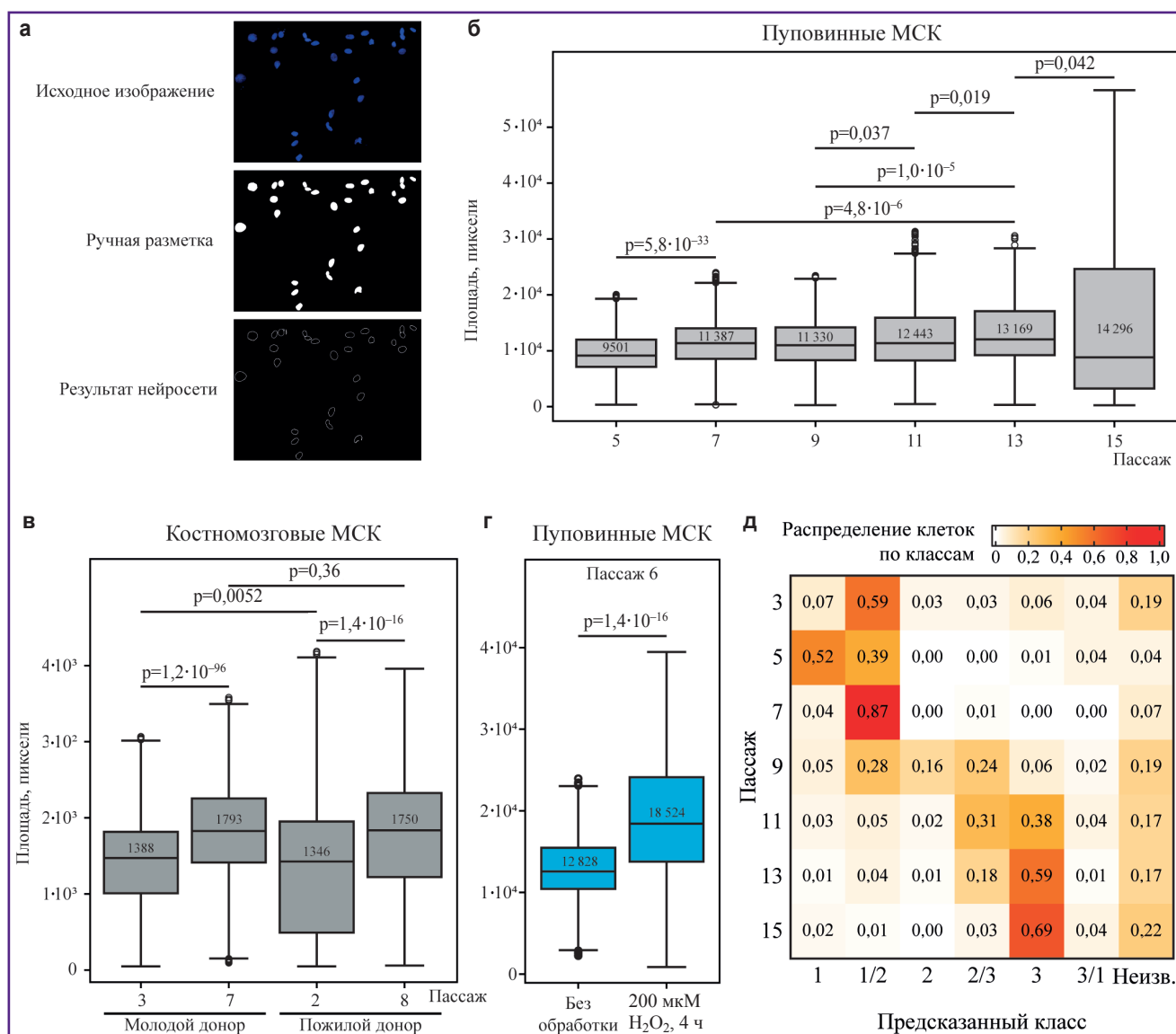


Рис. 5. Исследование препаратов МСК с помощью нейросетевого алгоритма сегментации и классификации изображений

Алгоритм сегментации изображений был обучен на основе окрашенных препаратов МСК (а — верхняя фотография). Для обучения нейросети границы ядер на препаратах были размечены вручную (а — среднее изображение). Обученный алгоритм успешно идентифицировал границы ядер (а — нижнее изображение). Алгоритм сегментации в дальнейшем использовался для оценки размеров клеточных ядер МСК в ходе пассирования или под действием стресса (б, в, г), а также для последующей классификации клеток на возрастные классы (д). Рис. б — сравнение площади ядер на препаратах пуповинных МСК на 5, 7, 9, 11, 13 и 15-м пассажах; в — сравнение площади ядер на препаратах донорских костномозговых МСК на ранних и поздних пассажах культивации; г — сравнение площади ядер на препаратах пуповинных МСК в нормальных условиях и после 4-часовой обработки 200 мкМ раствора перекиси; числами показано среднее значение площади; статистически значимые различия рассчитаны с помощью критерия Манна-Уитни. Рис. д — тепловая карта распределения клеток по предсказанным классам на препаратах МСК разных пассажей. Алгоритм нейросети распределял клетки по трем классам, среди которых класс 1 соответствовал ранним пассажам, класс 2 — промежуточным пассажам, класс 3 — поздним. Клеткам, которые с равной вероятностью попадали в два класса, присвоено значение 1/2, 2/3 или 3/1. Клеткам, для которых невозможно однозначно определить класс, присвоено значение «Неизвестно» (Неизв.)

клеток, ассоциированной со старением. С возрастом пассажа клеток тестовой выборки планомерно увеличивалась доля клеток, классифициро-

ванных в качестве клеток позднего пассажа, что, по всей вероятности, также отражает динамику накопления состаренных клеток.

Обсуждение

Ключевым признаком клеточного старения является необратимая остановка клеточного цикла, опосредованная активацией ингибиторов циклин-зависимых киназ p16^{INK4a} and p21^{CIP1a} [3]. На исследованных моделях клеточного старения МСК гены, кодирующие белки p16^{INK4a}, p21^{CIP1a}, также продемонстрировали ожидаемую динамику. Кроме того, существенные изменения претерпевают клеточная морфология и архитектура ядра. Значимую роль в изменении структуры ядра и хроматина играет ассоциированное с клеточным старением снижение уровня экспрессии гена *LMNB1* [15, 34], которое наблюдалось во всех исследованных моделях клеточного старения и было наиболее выражено на модели репликативного старения МСК. К специфическим изменениям структуры хроматина также относится формирование так называемых доменов гетерохроматина, ассоциированного со старением (SAHF и SAHD), наряду с деконденсацией пери-/центромерных регионов гетерохроматина (SADS) и глобальной эрозией гетерохроматина [16, 35–37]. Такие изменения вовлечены в регуляцию как генов, необходимых для прогрессии клеточного цикла, так и генов, составляющих так называемый провоспалительный фенотип, ассоциированный со старением [14, 35].

Одним из факторов, определяющих структуру хроматина, является ядерный архитектурный белок HMGB2, экспрессия которого снижается в ходе клеточного старения, что, в частности, рассматривается в качестве раннего маркера клеточного старения [14, 38]. Снижение уровня экспрессии гена *HMGB2* также было обнаружено при хронологическом, стресс-индуцированном и репликативном старении МСК. Интересно отметить, что на модели онкоген-индуцированного клеточного старения было показано, что *HMGB2* предотвращает распространение гетерохроматина в геномных районах, содержащих гены, формирующие так называемый провоспалительный фенотип, ассоциированный со старением, влияя таким образом на поддержание их экспрессии [14]. Подобный эффект не был подтвержден на модели репликативного старения. Вместе с тем формирование более перmissive состояния хроматина в ходе старения, обусловленное нарушениями системы поддержания факультативного и конститутивного гетерохроматина; перестройка пространственной топологии ядра; активация внутриклеточных провоспалительных сигнальных путей в ответ на повреждение ДНК (cGAS-STING) являются ключевыми факторами, определяющими формирование SASP [15, 37, 39].

Понятие секреторного фенотипа, ассоциированного со старением, объединяет комплекс провоспалительных цитокинов, факторов роста и металлопротеиназ [40]. К основным факторам, формирующим SASP, причисляют TNF α , MCP-1, MCP-2, SERPINE1/PAI-1, GM-CSF, GRO α , β , γ , IGFBP-7, интерлейкины

IL-1 α , IL-6, IL-7, IL-8, хемокин MIP1 α , а также матриксные металлопротеиназы MMP-1, MMP-10 и MMP-3 [41]. Вместе с тем важно отметить, что в зависимости от причины клеточного старения и клеточного типа значительно меняется состав SASP [18]. Интересно, что при сравнении МСК доноров разного возраста не было обнаружено существенной динамики экспрессии генов, кодирующих отдельные интерлейкины. При этом в ходе культивации и при стресс-индуцированном старении активировались провоспалительные факторы SASP, такие как IL-6, CXCL8, IL-1 β . Отчасти это наблюдение идет вразрез с показанным ранее увеличением активности таких факторов SASP в МСК более возрастных доноров [42]. Следует, однако, отметить, что в указанной работе убедительная разница в экспрессии была продемонстрирована только для IL-6. Кроме того, проведенный нами анализ опубликованных транскриптомов образцов КМ-МСК (n=37) не выявил достоверной корреляции экспрессии исследованных генов, кодирующих отдельные компоненты SASP, с возрастом. Все вместе это может свидетельствовать о гетерогенности и значительном вкладе донор-специфичных эффектов, затрудняющих анализ возраст-зависимых изменений генной экспрессии. Это также подтверждается достигнутыми параметрами регрессионной модели для предсказания хронологического возраста имеющей достаточно высокое значение средней абсолютной ошибки ($R^2=0,755$; MAE=9,858 года).

Необходимо отметить, что описанные ранее предиктивные модели для оценки возраста на основе транскриптомных данных демонстрируют близкую эффективность [20, 43, 44]. Более точные подобные алгоритмы, как правило, показывают максимальную производительность на узких возрастных когортах. Кроме того, в ходе разработки авторы исключали множество доступных образцов для анализа, поскольку их добавление существенно ухудшало качество модели [45]. Таким образом, оценка динамики экспрессии генов в большей степени может быть использована для анализа клеточного старения *in vitro*. В таком случае, как правило, исследуется ограниченное количество клеточных линий в достаточно стандартизованных условиях культивирования, что, по всей вероятности, позволяет снизить вариативность профилей экспрессии генов, присущую первичным донорским клеточным культурам и образцам. Аналогичным образом, согласно полученным нами данным, оценка длины теломер МСК, по меньшей мере на небольших выборках, также в большей степени применима для оценки репликативного клеточного старения *in vitro*.

Методы цитологического анализа широко применяются для исследования клеточного старения. Старение клеток сопровождается характерными морфологическими изменениями, такими как уплотнение, увеличение в размерах клетки и ядра, а также проявление характерных белковых маркеров,

среди которых классическим маркером клеточного старения считается цитохимическая оценка активности β -галактозидазы, ассоциированной со старением [3, 46]. В представленной работе активность β -галактозидазы использовалась для качественной оценки процессов клеточного старения *in vitro* как при репликативном, так и при стресс-индуцированном старении. Вместе с тем применение этого маркера для оценки функционального состояния клеток, полученных от доноров разного возраста, требует стандартизации ряда условий. Во-первых, следует осуществлять контроль эффективности работы лота используемых реагентов, поскольку сдвиг pH применяемых реагентов может значительно исказить результаты. С учетом необходимости анализа свежеприготовленных препаратов это не всегда выполнимо в серийных экспериментах, проводимых в условиях научной лаборатории. Кроме того, клеточные препараты должны демонстрировать близкую клеточную плотность, поскольку повышенная конфлюентность способна приводить к искаженным результатам [47]. Интерпретация полученных результатов на ранних стадиях клеточного старения может быть затруднена отсутствием некоего фиксированного порогового значения активности β -галактозидазы, что в свою очередь затрудняет отнесение клеток к позитивным или негативным по этому маркеру. Все вместе это ограничивает использование данного маркера для исследования клеточных препаратов, полученных от доноров различного возраста.

В качестве альтернативы можно рассматривать подходы к оценке клеточного старения, основанные на анализе представленности нескольких белковых маркеров, ассоциированных, например, с пролиферацией, апоптозом и повреждением ДНК [17]. Вместе с тем применимость подобных подходов в очередной раз ограничивается сложностью подбора оптимальных маркеров. Так, например, экспрессия широко используемого в качестве маркера пролиферации белка Ki-67 зависит от стадии клеточного цикла, а вариант гистона γ H2Ax — маркер повреждения ДНК — обнаруживается на более поздних стадиях клеточного старения [17, 48].

С развитием методов машинного обучения была предложена концепция, согласно которой процессивный анализ клеточной морфологии может служить интегральной метрикой клеточного старения [21, 49, 50]. Для оценки применимости подобного подхода мы подготовили сегментационную нейросетевую модель для автоматизированной оценки параметров ядерной морфологии. При анализе КМ-МСК от доноров разного возраста на ранних пассажах диапазон размеров ядер был шире в клеточных препаратах доноров старшей возрастной группы. Размер ядер плавно увеличивался в ходе культивации МСК, при этом на более поздних пассажах размер ядер КМ-МСК доноров разных возрастов не демонстрировал достоверных отличий между возрастными группами.

Наиболее резкое изменение ядерной морфологии наблюдалось при стресс-индуцированном клеточном старении. Подготовленная модель также позволяет достаточно эффективно классифицировать пассаж отдельных клеток в качестве суррогатной метрики стадии клеточного старения для препаратов пуповинных МСК. В связи с этим можно предположить возможность ее аналогичного использования и для оценки функционального состояния препаратов КМ-МСК доноров, при условии наличия достаточного количества данных для формирования обучающей выборки. Кроме того, представляет интерес применение подобных моделей для оценки эффектов, направленных на снижение проявлений клеточного старения, таких как, например, реювенация частичным репрограммированием [51, 52].

Заключение

В ходе работы были изучены отдельные аспекты фенотипических проявлений различных типов клеточного старения у МСК. На уровне исследования отдельных генов, динамика экспрессии которых ассоциирована со старением, показано, что изменение уровня экспрессии *CDKN1A*, *LMNB1*, *HMGB2* и *SERPINE1/PAI1* наблюдается во всех рассмотренных моделях клеточного старения. Вместе с тем анализ транскриптомных данных продемонстрировал существенную донор-зависимую гетерогенность профилей экспрессии генов, которая затрудняет построение эффективных предиктивных моделей для оценки хронологического возраста и протяженности культивирования клеточных препаратов. Альтернативной предиктивной метрикой клеточного старения, по меньшей мере в случае репликативного старения, может служить изменение морфологии ядра, анализ динамики которой нейросетевыми моделями позволяет оценить протяженность культивирования *in vitro*. Комбинация таких подходов с другими перспективными метриками оценки старения, такими как алгоритмы эпигенетических часов, позволяет надеяться на разработку функциональных алгоритмов оценки феномена клеточного старения.

Финансирование. Исследование проведено при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках научного проекта №22-74-10123.

Конфликт интересов отсутствует.

Литература/References

1. Margiana R., Markov A., Zekiy A.O., Hamza M.U., Al-Dabbagh K.A., Al-Zubaidi S.H., Hameed N.M., Ahmad I., Sivaraman R., Kzar H.H., Al-Gazally M.E., Mustafa Y.F., Siahmansouri H. Clinical application of mesenchymal stem cell in regenerative medicine: a narrative review. *Stem Cell Res Ther* 2022; 13(1): 366, <https://doi.org/10.1186/s13287-022-03054-0>.

2. Galderisi U., Peluso G., Di Bernardo G. Clinical trials based on mesenchymal stromal cells are exponentially increasing: where are we in recent years? *Stem Cell Rev Rep* 2022; 18(1): 23–36, <https://doi.org/10.1007/s12015-021-10231-w>.
3. Campisi J., d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(9): 729–740, <https://doi.org/10.1038/nrm2233>.
4. Zha K., Li X., Yang Z., Tian G., Sun Z., Sui X., Dai Y., Liu S., Guo Q. Heterogeneity of mesenchymal stem cells in cartilage regeneration: from characterization to application. *NPJ Regen Med* 2021; 6(1): 14, <https://doi.org/10.1038/s41536-021-00122-6>.
5. Alm J.J., Qian H., Le Blanc K. Chapter 13 — Clinical grade production of mesenchymal stromal cells. In: *Tissue engineering*. Elsevier; 2014; p. 427–469, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420145-3.00013-4>.
6. Xiang S., Gao W., Peng H., Liu A., Ao Q., Yang M., Yu Y., Liu Y., Rong R. Standards of clinical-grade mesenchymal stromal cell preparation and quality control (2020 China version). *J Neurorestoratol* 2020; 8(4): 197–216, <https://doi.org/10.26599/JNR.2020.9040021>.
7. López-Otín C., Blasco M.A., Partridge L., Serrano M., Kroemer G. Hallmarks of aging: an expanding universe. *Cell* 2023; 186(2): 243–278, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.11.001>.
8. Kuilman T., Michaloglou C., Mooi W.J., Peeper D.S. The essence of senescence. *Genes Dev* 2010; 24(22): 2463–2479, <https://doi.org/10.1101/gad.1971610>.
9. Pazolli E., Alspach E., Milczarek A., Prior J., Piwnicka-Worms D., Stewart S.A. Chromatin remodeling underlies the senescence-associated secretory phenotype of tumor stromal fibroblasts that supports cancer progression. *Cancer Res* 2012; 72(9): 2251–2261, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3386>.
10. Mikula-Pietrasik J., Niklas A., Uruski P., Tykarski A., Książek K. Mechanisms and significance of therapy-induced and spontaneous senescence of cancer cells. *Cell Mol Life Sci* 2020; 77(2): 213–229, <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03261-8>.
11. Kumari R., Jat P. Mechanisms of cellular senescence: cell cycle arrest and senescence associated secretory phenotype. *Front Cell Dev Biol* 2021; 9: 645593, <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.645593>.
12. González-Gualda E., Baker A.G., Fruk L., Muñoz-Espín D. A guide to assessing cellular senescence in vitro and in vivo. *FEBS J* 2021; 288(1): 56–80, <https://doi.org/10.1111/febs.15570>.
13. Carnero A. Markers of cellular senescence. *Methods Mol Biol* 2013; 965: 63–81, https://doi.org/10.1007/978-1-62703-239-1_4.
14. Aird K.M., Iwasaki O., Kossenkov A.V., Tanizawa H., Fatkhutdinov N., Bitler B.G., Le L., Alicea G., Yang T.L., Johnson F.B., Noma K.I., Zhang R. HMGB2 orchestrates the chromatin landscape of senescence-associated secretory phenotype gene loci. *J Cell Biol* 2016; 215(3): 325–334, <https://doi.org/10.1083/jcb.201608026>.
15. Shah P.P., Donahue G., Otte G.L., Capell B.C., Nelson D.M., Cao K., Aggarwala V., Cruickshanks H.A., Rai T.S., McBryan T., Gregory B.D., Adams P.D., Berger S.L. Lamin B1 depletion in senescent cells triggers large-scale changes in gene expression and the chromatin landscape. *Genes Dev* 2013; 27(16): 1787–1799, <https://doi.org/10.1101/gad.223834.113>.
16. Criscione S.W., Teo Y.V., Neretti N. The chromatin landscape of cellular senescence. *Trends Genet* 2016; 32(11): 751–761, <https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.09.005>.
17. Galvis D., Walsh D., Harries L.W., Latorre E., Rankin J. A dynamical systems model for the measurement of cellular senescence. *J R Soc Interface* 2019; 16(159): 20190311, <https://doi.org/10.1098/rsif.2019.0311>.
18. Coppé J.P., Desprez P.Y., Krtolica A., Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol* 2010; 5: 99–118, <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808-102144>.
19. Simpson D.J., Chandra T. Epigenetic age prediction. *Aging Cell* 2021; 20(9): e13452, <https://doi.org/10.1111/acel.13452>.
20. Mamoshina P., Volosnikova M., Ozerov I.V., Putin E., Skibina E., Cortese F., Zhavoronkov A. Machine learning on human muscle transcriptomic data for biomarker discovery and tissue-specific drug target identification. *Front Genet* 2018; 9: 242, <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00242>.
21. Heckenbach I., Mkrtchyan G.V., Ezra M.B., Bakula D., Madsen J.S., Nielsen M.H., Oró D., Osborne B., Covarrubias A.J., Idda M.L., Gorospe M., Mortensen L., Verdin E., Westendorp R., Scheibye-Knudsen M. Nuclear morphology is a deep learning biomarker of cellular senescence. *Nat Aging* 2022; 2(8): 742–755, <https://doi.org/10.1038/s43587-022-00263-3>.
22. Debacq-Chainiaux F., Erusalimsky J.D., Campisi J., Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc* 2009; 4(12): 1798–1806, <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.191>.
23. Andrzejewska A., Catar R., Schoon J., Qazi T.H., Sass F.A., Jacobi D., Blankenstein A., Reinke S., Krüger D., Streitz M., Schlickeiser S., Richter S., Souidi N., Beez C., Kamhieh-Milz J., Krüger U., Zemojtel T., Jürchott K., Strunk D., Reinke P., Duda G., Moll G., Geissler S. Multi-parameter analysis of biobanked human bone marrow stromal cells shows little influence for donor age and mild comorbidities on phenotypic and functional properties. *Front Immunol* 2019; 10: 2474, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02474>.
24. Ayhan S., Nemutlu E., Uçkan Çetinkaya D., Kır S., Özgül R.K. Characterization of human bone marrow niches with metabolome and transcriptome profiling. *J Cell Sci* 2021; 134(6): jcs250720, <https://doi.org/10.1242/jcs.250720>.
25. Li H., Handsaker B., Wysoker A., Fennell T., Ruan J., Homer N., Marth G., Abecasis G., Durbin R; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The sequence alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 2009; 25(16): 2078–2079, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>.
26. Dobin A., Davis C.A., Schlesinger F., Drenkow J., Zaleski C., Jha S., Batut P., Chaisson M., Gingeras T.R. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 2013; 29(1): 15–21, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>.
27. Liao Y., Smyth G.K., Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to

- genomic features. *Bioinformatics* 2014; 30(7): 923–930, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656>.
28. Zhang Y., Parmigiani G., Johnson W.E. ComBat-seq: batch effect adjustment for RNA-seq count data. *NAR Genomics and Bioinformatics* 2020; 2(3), <https://doi.org/10.1093/nargab/lqaa078>.
29. Robinson M.D., McCarthy D.J., Smyth G.K. edgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 2010; 26(1): 139–140, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>.
30. Pedregosa F., Varoquaux G., Gramfort A., Michel V., Thirion B., Grisel O., Blondel M., Prettenhofer P., Weiss R., Dubourg V., Vanderplas J., Passos A., Cournapeau D., Brucher M., Perrot M., Duchesnay E. Scikit-learn: machine learning in Python. *Journal of Machine Learning Research* 2011; 12: 2825–2830.
31. Kirillov A., Mintun E., Ravi N., Mao H., Rolland C., Gustafson L., Xiao T., Whitehead S., Berg A.C., Lo W.-Y., Dollár P., Girshick R. Segment anything. In: *2023 IEEE/CVF International Conference on Computer Vision (ICCV)*. 2023, <https://doi.org/10.1109/iccv51070.2023.00371>.
32. Chen L.C., Zhu Y., Papandreou G., Schroff F., Adam H. Encoder-decoder with atrous separable convolution for semantic image segmentation. In: Ferrari V., Hebert M., Sminchisescu C., Weiss Y. (editors). *Computer Vision — ECCV 2018. ECCV 2018. Lecture Notes in Computer Science, vol. 11211*. Springer, Cham; 2018, https://doi.org/10.1007/978-3-030-01234-2_49.
33. Tan M., Le Q. EfficientNet: rethinking model scaling for convolutional neural networks. In: *Le Proceedings of the 36th International Conference on Machine Learning, PMLR* 2019; 97: 6105–6114.
34. Freund A., Laberge R.M., Demaria M., Campisi J. Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Mol Biol Cell* 2012; 23(11): 2066–2075, <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-10-0884>.
35. Narita M., Núñez S., Heard E., Narita M., Lin A.W., Hearn S.A., Spector D.L., Hannon G.J., Lowe S.W. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 2003; 113(6): 703–716, [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00401-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00401-x).
36. Sati S., Bonev B., Szabo Q., Jost D., Bensadoun P., Serra F., Loubiere V., Papadopoulos G.L., Rivera-Mulia J.C., Fritsch L., Bouret P., Castillo D., Gelpi J.L., Orozco M., Vaillant C., Pellestor F., Bantignies F., Marti-Renom M.A., Gilbert D.M., Lemaitre J.M., Cavalli G. 4D genome rewiring during oncogene-induced and replicative senescence. *Mol Cell* 2020; 78(3): 522–538.e9, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.03.007>.
37. Dasgupta N., Arnold R., Equey A., Gandhi A., Adams P.D. The role of the dynamic epigenetic landscape in senescence: orchestrating SASP expression. *NPJ Aging* 2024; 10(1): 48, <https://doi.org/10.1038/s41514-024-00172-2>.
38. Zirkel A., Nikolic M., Sofiadis K., Malm J.P., Brackley C.A., Gothe H., Drechsel O., Becker C., Altmüller J., Josipovic N., Georgomanolis T., Brant L., Franzen J., Koker M., Gusmao E.G., Costa I.G., Ullrich R.T., Wagner W., Roukos V., Nürnberg P., Marenduzzo D., Rippe K., Papantonis A. HMG2 loss upon senescence entry disrupts genomic organization and induces CTCF clustering across cell types. *Mol Cell* 2018; 70(4): 730–744.e6, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.03.030>.
39. Miller K.N., Dasgupta N., Liu T., Adams P.D., Vizioli M.G. Cytoplasmic chromatin fragments-from mechanisms to therapeutic potential. *Elife* 2021; 10: e63728, <https://doi.org/10.7554/eLife.63728>.
40. Coppé J.P., Patil C.K., Rodier F., Sun Y., Muñoz D.P., Goldstein J., Nelson P.S., Desprez P.Y., Campisi J. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol* 2008; 6(12): 2853–2868, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060301>.
41. Freund A., Orjalo A.V., Desprez P.Y., Campisi J. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med* 2010; 16(5): 238–246, <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.03.003>.
42. Gnani D., Crippa S., Della Volpe L., Rossella V., Conti A., Lettera E., Ravis S., Ometti M., Frascini G., Bernardo M.E., Di Micco R. An early-senescence state in aged mesenchymal stromal cells contributes to hematopoietic stem and progenitor cell clonogenic impairment through the activation of a pro-inflammatory program. *Aging Cell* 2019; 18(3): e12933, <https://doi.org/10.1111/acer.12933>.
43. Peters M.J., Joehanes R., Pilling L.C., Schurmann C., Conneely K.N., Powell J., Reinmaa E., Sutphin G.L., Zhenakova A., Schramm K., Wilson Y.A., Kobes S., Tukiainen T.; NABEC/UKBEC Consortium; Ramos Y.F., Göring H.H., Fornage M., Liu Y., Gharib S.A., Stranger B.E., De Jager P.L., Aviv A., Levy D., Murabito J.M., Munson P.J., Huan T., Hofman A., Uitterlinden A.G., Rivadeneira F., van Rooij J., Stolk L., Broer L., Verbiest M.M., Jhamai M., Arp P., Metspalu A., Tserel L., Milani L., Samani N.J., Peterson P., Kasela S., Codd V., Peters A., Ward-Caviness C.K., Herder C., Waldenberger M., Roden M., Singmann P., Zeilinger S., Illig T., Homuth G., Grabe H.J., Völzke H., Steil L., Kocher T., Murray A., Melzer D., Yaghootkar H., Bandinelli S., Moses E.K., Kent J.W., Curran J.E., Johnson M.P., Williams-Blangero S., Westra H.J., McRae A.F., Smith J.A., Kardia S.L., Hovatta I., Perola M., Ripatti S., Salomaa V., Henders A.K., Martin N.G., Smith A.K., Mehta D., Binder E.B., Nylocks K.M., Kennedy E.M., Klengel T., Ding J., Suchy-Dicey A.M., Enquobahrie D.A., Brody J., Rotter J.I., Chen Y.D., Houwing-Duistermaat J., Kloppenburg M., Slagboom P.E., Helmer Q., den Hollander W., Bean S., Raj T., Bakhshi N., Wang Q.P., Oyston L.J., Psaty B.M., Tracy R.P., Montgomery G.W., Turner S.T., Blangero J., Meulenberg I., Ressler K.J., Yang J., Franke L., Kettunen J., Visscher P.M., Neely G.G., Korstanje R., Hanson R.L., Prokisch H., Ferrucci L., Esko T., Teumer A., van Meurs J.B., Johnson A.D. The transcriptional landscape of age in human peripheral blood. *Nat Commun* 2015; 6: 8570, <https://doi.org/10.1038/ncomms9570>.
44. Fleischer J.G., Schulte R., Tsai H.H., Tyagi S., Ibarra A., Shokhirev M.N., Huang L., Hetzer M.W., Navlakha S. Predicting age from the transcriptome of human dermal fibroblasts. *Genome Biol* 2018; 19(1): 221, <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1599-6>.
45. Shokhirev M.N., Johnson A.A. Modeling the human aging transcriptome across tissues, health status, and sex. *Aging Cell* 2021; 20(1): e13280, <https://doi.org/10.1111/acer.13280>.

46. Dimri G.P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E.E., Linskens M., Rubelj I., Pereira-Smith O. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(20): 9363–9367, <https://doi.org/10.1073/pnas.92.20.9363>.
47. Nadeau S., Cheng A., Colmegna I., Rodier F. Quantifying senescence-associated phenotypes in primary multipotent mesenchymal stromal cell cultures. *Methods Mol Biol* 2019; 2045: 93–105, https://doi.org/10.1007/7651_2019_217.
48. Bruno S., Darzynkiewicz Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif* 1992; 25(1): 31–40, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1992.tb01435.x>.
49. Kusumoto D., Seki T., Sawada H., Kunitomi A., Katsuki T., Kimura M., Ito S., Komuro J., Hashimoto H., Fukuda K., Yuasa S. Anti-senescent drug screening by deep learning-based morphology senescence scoring. *Nat Commun* 2021; 12(1): 257, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20213-0>.
50. Weber L., Lee B.S., Imboden S., Hsieh C.J., Lin N.Y.C. Phenotyping senescent mesenchymal stromal cells using AI image translation. *Curr Res Biotechnol* 2023; 5: 100120, <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2023.100120>.
51. Olova N., Simpson D.J., Marioni R.E., Chandra T. Partial reprogramming induces a steady decline in epigenetic age before loss of somatic identity. *Aging Cell* 2019; 18(1): e12877, <https://doi.org/10.1111/acer.12877>.
52. Singh P.B., Laktionov P.P., Newman A.G. Deconstructing age reprogramming. *Journal of Biosciences* 2019; 44(4), <https://doi.org/10.1007/s12038-019-9923-1>.