

ОБЗОР

УДК 57.017.67:576.53

Признаки сходства и различия клеточных моделей старения. Обзор предметного поля

Г.В. Моргунова , А.Н. Хохлов 

Сектор эволюционной цитогеронтологии, биологический факультет,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Россия, 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

*e-mail: morgunova@mail.bio.msu.ru

Несмотря на большой интерес ученых к вопросу о том, что является старением клеток, и длительную историю его изучения, в этой области до сих пор существует много противоречий. Они возникают из-за того, что было разработано несколько разных подходов к моделированию старения *in vitro*. В результате возникли даже разные термины — «одряхление» клеток (*cell senescence*) и старение клеток (*cell aging*). У моделей для изучения старения на клеточном уровне есть не только различия, но и общие черты. Более того, в настоящее время становится очевидным, что одни модели дополняют другие. Об этом свидетельствует, в частности, тот факт, что биомаркеры, применяемые в рамках одной модели, оказываются пригодными для использования и в другой (ассоциированная со старением β -галактозидаза, липофусцин и др.). Развитие подходов к изучению клеточного старения происходило неравномерно, и в настоящее время исследования, посвященные этой теме, переживают очередной подъем в связи с перспективностью применения сенолитиков (препаратов, избирательно устраняющих «сенесцентные» клетки) для увеличения продолжительности жизни многоклеточных организмов. В настоящем обзоре рассмотрены плюсы и минусы разных моделей для изучения старения на культивируемых клетках различной природы.

Ключевые слова: старение, клеточные культуры, биомаркеры старения, цитогеронтология, репликативное старение, хронологическое старение

Исследования, посвященные изучению старения клеток, были начаты еще во втором десятилетии XX в. [1]. Несмотря на давнюю историю и большой интерес ученых к этой области до сих пор существует много противоречий в вопросе о том, что является «старением клеток». Основная масса накопленных данных была получена в ходе исследований *in vitro*, акцент в последнее время смещается в сторону экспериментальных работ, посвященных старению клеток *in vivo*. В рамках подхода *in vitro* существует несколько моделей для изучения старения на клеточном уровне. Само понятие «старение клеток» — в зависимости от того, какую мы рассматриваем модель — тоже существует в двух формах: как *cell senescence*, или «одряхление» клеток, и как *cell aging*, или старение клеток в том понимании, в котором оно существует для многоклеточных стареющих организмов — т.е. увеличение вероятности гибели со временем. Хотя разные подходы и модели служат разным целям, они тесно связаны друг с другом.

История изучения старения клеток *in vitro*

Изучение старения клеток *in vitro* является областью цитогеронтологии. Термин «цитогеронтология» появился в ходе экспериментов Леонарда Хейфлика, однако первым обратил внимание на

вопрос о смертности и бессмертии клеток Август Вейсман в конце XIX в. [2, 3]. Вейсман был первым, кто отметил существенное различие между клетками бессмертной зародышевой линии и соматическими клетками, которые стареют и умирают (смертная сома и бессмертная «зародышевая плазма» — Keimplasma) [4].

Экспериментальные основы цитогеронтологии были заложены в начале XX в. Алексисом Каррелем [5, 6]. Он был первым, кто изучил, будут ли соматические клетки, полученные от высших животных, «стареть» и умирать или же они могут размножаться бесконечно. С этой целью Каррель разработал процедуру культивирования эпителиальных или фибробластоподобных клеток в специальных флаконах, которая до сих пор используется в современных лабораториях с небольшими модификациями. Однако результаты его экспериментов не соответствовали концепции «смертной сомы», так как некоторые клеточные штаммы, полученные из куриных эмбрионов, могли поддерживаться почти бесконечно без каких-либо признаков деградации.

После экспериментов Карреля геронтологи почти полвека считали, что соматические клетки способны к неограниченной репликации, пока исследования, проведенные в 1950-х и 1960-х гг.

Свимом и Паркером [7], а также Хейфликом [8, 9] не показали, что полученные Каррелем результаты были, вероятно, артефактом. Оказалось, что почти все нормальные клетки животных обладают ограниченным пролиферативным потенциалом и способны поделиться в культуре не более 100–120 раз (т.е. пройти около 50 удвоений клеточной популяции). Термин «цитогеронтология» был введен Хейфликом для описания научного направления, занимающегося изучением «возрастных» изменений в культурах нормальных клеток по мере истощения ими своего пролиферативного потенциала (максимального числа удвоений клеточной популяции) [10, 11]. Так возникла модель репликативного старения, или «старения по Хейфлику» (рисунок). Однако позже термин стали использовать для любых исследований механизмов старения в экспериментах на клеточных культурах.

Модели для изучения старения *in vitro*

Модель, основанная на лимите Хейфлика, не имеет прямого отношения к механизмам старения [12–14]. Причина ограниченности митотического потенциала заключается в укорочении с каждым делением клетки ее теломер [15, 16]. Долгое время под старением клеток понимали именно репликативное старение. Некоторое время после его открытия была распространена идея о том, что лимит Хейфлика лежит в основе старения организма. Интерес к феномену поддерживало обнаружение некоторых корреляций – например, снижение митотического потенциала фибробластов у пациентов с прогерией, прямая связь этого параметра с продолжительностью жизни вида или его обратная связь с возрастом донора клеток. Однако данный феномен не дает ответа на

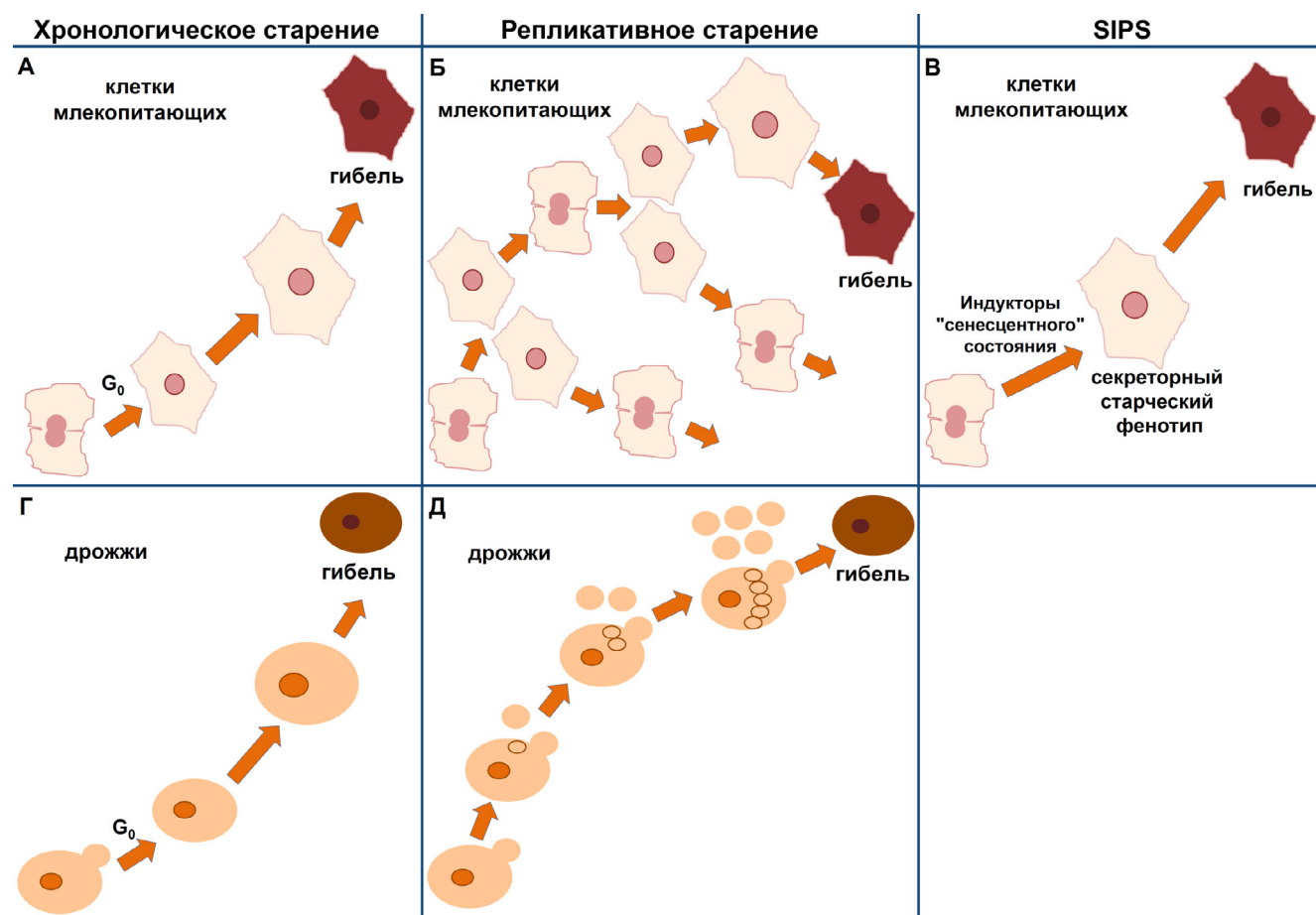


Рисунок. Основные модели старения клеток. **А** – «стационарное», или хронологическое, старение клеток млекопитающих, включая человека. Клетки гибнут через некоторое время после остановки пролиферации, происходящей из-за метаболических перестроек и/или контактного торможения (quiescence). Клеточное старение – в значении cell aging, т.к. со временем увеличивается вероятность гибели клеток в культуре. **Б** – репликативное старение клеток млекопитающих (в том числе – человека), или старение, основанное на феномене Хейфлика. Клетки претерпевают изменения с каждым пассажем – удвоением клеточной популяции. Достигая лимита Хейфлика (терминального укорочения теломер), они перестают делиться и через некоторое время гибнут. **В** – стресс-индуцированное преждевременное старение (stress-induced premature senescence, SIPS). На клетки воздействуют факторами, индуцирующими «сенесцентное» состояние, клетки приобретают секреторный старческий фенотип. «Сенесцентные» клетки не могут делиться, накапливают биомаркеры старения и гибнут через некоторое время. Для **Б** и **В** клеточное старение – в значении cell senescence, т.к. клетки на поздних пассажах или под воздействием повреждающих факторов становятся «сенесцентными». Однако это не отменяет того, что вероятность их гибели может увеличиваться со временем. **Г** – хронологическое старение дрожжей. Клетки дрожжей перестают делиться в стационарной фазе роста, со временем приобретают возрастные изменения и гибнут. **Д** – репликативное старение дрожжей. «Молодые» клетки отпочковываются от материнской клетки дрожжей, при этом поврежденные органеллы и молекулы остаются в материнской клетке.

вопрос о том, почему мы стареем, так как клетки в организме, как правило, не исчерпывают полностью свой митотический потенциал — даже у пожилых людей [13, 17]. Кроме того, данная модель никак не объясняет старение постмитотических и специализированных клеток, а также стволовых клеток, имеющих активную теломеразу. Не исключено, что если бы продолжительность жизни человека была увеличена в несколько раз, некоторые клеточные популяции в конечном итоге исчерпывали бы свой митотический потенциал (тем самым достигая лимита Хейфлика), что могло бы привести ко «второй волне» старения. Некоторые исследователи все же придерживаются мнения о том, что укорочение теломер в клетках является важным фактором старения и долголетия. В частности, существует определенный репликативный «мозаицизм» клеток, наблюдаемый в высокоорганизованном многоклеточном организме [18].

Еще одним существенным недостатком модели Хейфлика является то, что в исследованиях довольно трудно правильно проводить повторные эксперименты с одним и тем же клеточным штаммом, потому что клетки непрерывно меняются от пассажа к пассажу. Однако модель репликативного старения применима не только к нормальным клеткам млекопитающих, но в несколько модифицированном виде — и к дрожжам (рисунок). В основе репликативного старения дрожжей лежит не лимит Хейфлика, а феномен ограниченного количества дочерних клеток, которое может дать одна материнская [19]. В отличие от ситуации с культивируемыми клетками человека и животных, у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* дочерняя клетка (она обычно гораздо меньше материнской) образуется в результате асимметричного почкования. При этом материнская клетка теряет способность к такому почкованию через определенное количество делений, после чего претерпевает деградацию и гибель, а дочерние «рождаются молодыми». Этот процесс похож на старение пула стволовых клеток у высших организмов [20]. Однако репликативное старение не выявляется у некоторых видов дрожжей, например, у *Schizosaccharomyces pombe* [21].

Клетки, «состарившиеся» в соответствии с феноменом Хейфлика, в англоязычной литературе называют senescent cells. В настоящее время на данной модели продолжают работать многочисленные лаборатории, однако исследователи теперь часто используют модифицированный вариант репликативного старения — стресс-индуцированное преждевременное старение (stress-induced premature senescence, SIPS). В экспериментах с SIPS клетки специально приводят к «сенесцентному» состоянию, повреждая их путем воздействия химических или физических факторов (ионизирующее излучение, окислительный стресс, митомицин C, доксорубин, этанол, и т.д.), чтобы они не могли де-

литься [22–27]. Вследствие такого воздействия клетки приобретают «старческий» секреторный фенотип (senescence-associated secretory phenotype, SASP), в них повреждаются молекулы и органеллы, нарушается метаболизм [27]. SIPS — это вариант клеточного старения (в этом случае также в значении cell senescence; рисунок), который характеризуется стабильной остановкой пролиферации, инициируемой различными молекулярными триггерами [27–30]. Этот подход позволяет сэкономить время, так как «старение» действительно происходит преждевременно, в отличие от классического варианта модели Хейфлика, при котором клетки состариваются в течение многих месяцев. Кроме того, модель SIPS применима не только для нормальных, но и для раковых клеток (в отличие от модели репликативного старения). В то же время, у нее есть ряд существенных минусов. Во-первых, индуцирующие старение воздействия являются совершенно не физиологичными. Примером фактора, вызывающего SIPS, можно считать химиотерапию, индуцирующую повреждения в клетках опухолей. Во-вторых, модель основана на концепции, согласно которой повреждения ограничивают пролиферацию клеток, после чего она прекращается. Однако нельзя сказать, что установленная последовательность событий обязательно верна. В частности, обычно *in vivo* наблюдается обратная ситуация — клетки организма перестают делиться по естественным причинам (например, вследствие терминальной дифференцировки), а уже из-за этого клеточная популяция накапливает ошибки и повреждения, которые ведут, в конечном счете, к ее старению и гибели. Так происходит, например, с постмитотическими высокодифференцированными клетками организма — нейронами и кардиомиоцитами [31, 32]. Если же клеточная популяция может обновляться за счет размножения составляющих ее клеток, то ошибки и повреждения в ней не накапливаются, т.к. разбавляются при появлении новых клеток. Клетки с повреждениями удаляются из популяции, при этом сама популяция остается «молодой». Примерами подобных популяций могут быть не только пересеваемые линии трансформированных клеток, но и организмы вроде пресноводной гидры [33, 34]. Если же организм или ткань состоят из клеток, которые не могут делиться, так как выполняют определенные функции, и являются терминально дифференцированными, то через определенное время неизбежно происходит гибель такого организма или ткани. Примером могут служить нематоды, постмитотические ткани и специализированные клетки крови млекопитающих, большая часть тканей имаго насекомых с метаморфозом.

По мнению сторонников модели SIPS, «сенильные» клетки выделяют регуляторы воспаления, которые влияют на поведение соседних клеток и способствуют старению тканей и органов

организма [35]. С моделью SIPS связано понятие «ответ на повреждения ДНК» (DNA damage response, DDR). Считается, что индукции SIPS способствуют повреждения ДНК, которые возникают под воздействием различных внешних факторов и становятся причиной остановки пролиферации. Надо отметить, что в этом случае мы сталкиваемся с той же проблемой, с которой исследователи встречаются при выборе контрольных животных [36]. Если и контрольная, и экспериментальная группы подвержены влиянию, например, перекиси водорода или доксирубицина, то интактного контроля нет. Таким образом, соединение, которое смягчит негативное воздействие перекиси, улучшит также и состояние экспериментальных клеточных культур, но это не сделает его геропротектором.

Другая модельная система — «стационарное», или хронологическое, старение культур клеток (рисунок) — основана на идее ограничения пролиферации как основного пускового механизма старения [37–40]. В рамках хронологического/«стационарного» старения ограничение пролиферации возникает, когда культура клеток или суспензия микроорганизмов переходят в стационарную фазу роста, т.е. перестают размножаться (quiescence). После пребывания в течение некоторого времени в стационарной фазе роста клетки начинают гибнуть из-за накопления нарушений в физиологической работе внутриклеточных систем и повреждений органелл и макромолекул. Способствует развитию «старения» ограничение пролиферации, которое не нужно вызывать путем воздействия повреждающих химических или физических факторов. Модельная система является универсальной и может быть применима к клеткам самого разного происхождения, включая простейших, бактерии, грибы, водоросли и т.п. [40].

Сторонники модели хронологического/«стационарного» старения считают, что старение клеток (уже в значении cell aging) — это накопление повреждений и негативных изменений, сходных с повреждениями и изменениями, накапливающимися в клетках стареющего организма и приводящими к увеличению вероятности их смерти со временем. Чтобы примирить две разные концепции старения клеток, исследователи часто говорят о том, что с помощью репликативного старения и SIPS можно моделировать возрастные изменения делящихся, а с помощью хронологического — постмитотических клеток организма [39]. Однако все далеко не так просто: в частности, есть основания полагать, что постмитотические клетки также приобретают старческий секреторный фенотип [41, 42]. Основанием для такого предположения могут служить результаты исследований сенотерапии — использования сенолитиков (веществ, избирательно убивающих «сенесцентные» клетки в организме). Применение сенотерапии

у мышей способствует улучшению выносливости мышц, которые, как известно, состоят преимущественно из терминально дифференцированных миоцитов [43, 44]. На самом же деле из-за разных представлений о старении и о смысле понятий «senescence» и «aging» часто возникает путаница. Например, исследователи, работающие с SIPS, считают, как правило, что аутофагия оказывает негативное влияние на клетку, так как она может способствовать ее старению в значении senescence [45]. В то же время сторонники хронологического старения полагают, что аутофагия спасает клетки, помогает им выживать и обновлять внутриклеточный материал [46, 47]. Интерпретация роли аутофагии в рамках модели SIPS требует уточнения. Сенесцентное («senescent») состояние можно считать терминальной стадией, в то время как старение в значении «aging» — это более растянутый во времени процесс. Когда клетки достигают сенесцентного состояния, аутофагия может только спровоцировать гибель клетки.

Наибольшее распространение модель хронологического/«стационарного» старения получила в экспериментах на дрожжах (рисунок), для которых на сегодняшний день получено значительное количество экспериментальных данных, позволивших лучше понять механизмы старения на клеточном уровне [39, 48]. В частности, эксперименты с дрожжами *S. cerevisiae* показали, что рапамицин, хорошо известный ингибитор TOR (target of rapamycin), в малых дозах, достаточных для замедления пролиферации дрожжевых клеток, но не полностью блокирующих этот процесс, увеличивает продолжительность жизни культуры в модели хронологического старения [47, 49]. Позже было показано, что это соединение также увеличивает продолжительность жизни экспериментальных животных — мышей [50] и плодовых мушек [51].

Как и любая модель, модель хронологического старения имеет свои недостатки. Безусловно, клетки в культуре далеки в физиологическом плане от постмитотических клеток в организме — они не имеют специализации и не выполняют функций, а причиной остановки их пролиферации, как правило, являются контактное торможение и метаболические перестройки, а не терминальная дифференцировка (впрочем, модели старения, в которых индуцируется дифференцировка клеток, тоже существуют [52]). Тем не менее, результаты многочисленных исследований позволяют обнаружить сходство между возрастными нарушениями в клетках организма и в клетках, претерпевших хронологическое/«стационарное» старение [47, 49, 53].

О проблемах с использованием нормальных клеток, обладающих ограниченным пролиферативным потенциалом, в экспериментах в рамках модели «стационарного» старения, мы уже неод-

нократно писали ранее [36, 54], подчеркивая, что оптимально, по всей видимости, выбирать для таких исследований иммортализованные клетки человека.

Критерии клеточного старения

С помощью клеточных моделей можно относительно быстро тестировать потенциальные геропротекторы (соединения, замедляющие старение). Однако необходимо установить критерии, по которым можно оценить, замедляет или ускоряет изучаемое биологически активное соединение или физический фактор старение культуры клеток. При изучении репликативного старения и SIPS, как правило, исследователи пользуются биомаркерами «возраста» *in vitro*, поэтому геропротекторные свойства они оценивают по появлению/накоплению этих маркеров [55]. Важно отметить, что рекомендуется использовать не один маркер, а несколько разных в совокупности [27, 56].

Наиболее надежным способом обнаружения у изучаемого соединения геропротекторных свойств в экспериментах с животными является построение кривых выживания [57]. По изменению формы этих кривых можно сделать выводы о том, как влияет соединение на характер старения популяции. Подобный подход можно использовать и в экспериментах на клеточных культурах [58, 59]. И, конечно же, применяют его преимущественно в рамках модели хронологического/«стационарного» старения.

Полученные в ходе экспериментов с клеточными культурами результаты всегда необходимо сопоставлять с результатами экспериментов, проведенных на животных. Факторы, благоприятно влияющие на отдельные клетки, не обязательно будут полезным для целого организма, и в то же время соединения, вызывающие гибель клеток в культуре, могут оказать положительное влияние на организм. Многое зависит от природы используемых клеток, также немаловажен и тот факт, что исследуемые *in vitro* клетки не подвержены воздействию регуляторных систем организма — нервной, эндокринной и иммунной. Кроме того, как уже упоминалось, клетки в культуре почти не выполняют никаких функций, в то время как в организме каждая клетка «служит» определенным целям, что сказывается на ее состоянии. В связи с этим интерпретация результатов цитогеронтологических экспериментов, как и любых экспериментов на клеточных культурах, требует от исследователя осторожности и, что принципиально, четкого определения понятия «старение».

Согласно классическому определению, старение — это сложный комплекс негативных возрастных изменений в организме, которые ведут к увеличению вероятности его смерти со временем (увеличению силы смертности) [57]. Что касается хронологического/«стационарного» старения, то

обычное для таких экспериментов снятие кривых выживания культур клеток подразумевает, что старение происходит в соответствии с данным определением. Наличие же этой зависимости в рамках модели репликативного старения или SIPS не так очевидно, потому что в работах, посвященных этим моделям, не снимаются кривые выживания. Впрочем, с прохождением пассажей клетки приближают момент своей гибели, а вероятность гибели увеличивается со временем и для клеток, подверженных воздействию того или иного фактора. Косвенно об этом можно судить по тому, что с каждым пассажем способность клеток давать колонии уменьшается [60].

Биомаркеры старения

Список самых популярных биомаркеров старения включает активность ассоциированной со старением β -галактозидазы (senescence-associated β -galactosidase, SA- β -gal), экспрессию белков p53 и p21, а также регуляторов воспаления, таких как IL-6 или IL-8, активацию белков, стимулирующих репарацию ДНК, и т.д. [26]. Их используют в работах с репликативной моделью старения и моделью SIPS.

Возможность использования активности SA- β -gal в качестве биомаркера старения была впервые описана Димри с соавт. в 1995 г. [61], показавшими, что экспрессия этого фермента увеличивается с возрастом как *in vitro*, так и *in vivo*. Несмотря на популярность этого биомаркера старения на рубеже 2000-х гг., надо заметить, что проявление активности SA- β -gal, как неоднократно было показано, во многих случаях зависит не столько от возраста (как *in vivo*, так и *in vitro*), сколько от метода исследования и/или наличия определенных патологий, а также, что наиболее важно, от пролиферативного статуса клеток [62]. Вероятно, ограничение клеточной пролиферации по любой причине (дифференцировка, контактное торможение, повреждающие ДНК соединения, некоторые заболевания и т.д.) становится фактором, вызывающим стимуляцию экспрессии SA- β -gal. Таким образом, SA- β -gal появляется не только в «сенесцентных» клетках, но и в «молодых» клетках организма при развитии патологий, а также при хронологическом старении.

Другим популярным биомаркером старения, введенным в экспериментальную практику значительно раньше SA- β -gal, является липофусцин. Исследования *in vitro* и *in vivo* с выявлением внутриклеточных гранул, нерастворимых в растворителях жиров, но окрашивающихся, тем не менее, реактивами на липиды в оранжевый и коричневый цвета, активно проводились в середине XX в. Обнаруживали подобные гранулы в клетках самых разных органов, но их выявление в нейронах почти сразу связали с проявлением старческих изменений в центральной нервной системе [63].

В результате исследования с использованием липофусцина стали популярными среди геронтологов. Этот показатель популярен и сейчас — по публикациям можно видеть, что экспериментаторы снова вернулись к использованию этого маркера в цитогеронтологических экспериментах [64, 65], так как обнаружили некоторые преимущества метода определения липофусцина перед методом оценки активности SA- β -gal.

Липофусцином исходно называли продукты окисления ненасыщенных жирных кислот, образующиеся при нарушении их метаболизма. Однако в состав липофусцина входят не только липиды (хотя на 70–80% гранулы состоят из них), но также белки и металлы. В составе пигментных гранул обнаруживают и ферменты — например, кислую фосфатазу, что свидетельствует, наряду со сходным внешним видом, об их родстве с лизосомами. По сути, эти гранулы начинают формироваться именно в лизосомах, которые не могут их разрушить, в конечном итоге липофусцин полностью лишает органеллы возможности нормально функционировать. В экспериментах *in vitro* можно добиться образования липофусцина — например, с помощью методов, применяемых в модели SIPS [64, 66]. Что касается организма, то наибольший интерес представляет накопление этого «пигмента изнашивания» в постмитотических клетках — нейронах и кардиомиоцитах, так как оно действительно коррелирует с возрастом. Активно функционирующий нейрон за десятилетия работы заполняется пигментами такого типа, что свидетельствует о постепенном нарушении метаболизма.

Хотелось бы отметить, что накопление липофусцина и проявление активности SA- β -gal имеют общую причину, так как оба эти маркера отражают проблемы, связанные с работой лизосом. До сих пор не установлено, что является первичным — повреждение ДНК в ядре или нарушение протеолиза в цитоплазме [67], поэтому исследования с использованием этих биомаркеров действительно могут помочь в понимании фундаментальных процессов старения. Биомаркеры «сенесцентного» состояния и хронологического старения будут, вероятно, во многих случаях совпадать (различаться будет только их выраженность). Например, биомаркеры «сенесцентного» состояния появляются в постмитотических клетках [41, 42]. Старение культуры, по-видимому, начинается тогда, когда составляющие ее клетки перестают делиться и обновляться, однако «сенесцентный» фенотип они приобретают только на поздних стадиях старения.

Еще одним биомаркером старения можно считать увеличение объема цитоплазмы [68]. Как известно, существует связь между остановкой пролиферации и увеличением объема клетки [69]. Согласно одному из предположений, это может происходить из-за постоянной замены старой

культуральной среды на новую, содержащую большое количество ростовых факторов из сыворотки, способствующих гипертрофии клеток [70]. Однако нам кажется, что такое увеличение объема цитоплазмы может происходить из-за потребности клетки в разбавлении испорченных органелл и дефектных молекул с помощью производства новых органелл и молекул. Если в клетке, как упоминалось выше, нарушены системы протеолиза, то избавляться от неправильно работающих органелл и макромолекул ей сложно, поэтому доступным выходом становится образование новых компонентов клетки. Такое разбавление может быть только временной мерой, кардинальным образом исправить ситуацию оно не помогает.

С увеличением объема цитоплазмы связаны и метаболические перестройки. Возможно, «сенесцентные» клетки, переставшие пролиферировать, используют гликолиз и глутаминолиз для наращивания объема цитоплазмы [70] через активацию комплекса mTOR. «Сенесцентные» клетки действительно характеризуются активацией mTOR, которая не исчезает даже при сывороточном или аминокислотном голодании [71]. Это, кстати, снова роднит два разных подхода к изучению клеточного старения, ведь активация mTOR характерна для хронологического старения.

Наконец, важной темой в клеточной геронтологии являются перспективы сенотерапии с использованием сенолитиков. Благодаря развитию этого направления заметно увеличилось число исследований и публикаций, связанных с изучением SIPS. С помощью очистки организма от «сенесцентных» клеток удается продлить среднюю, медианную и максимальную продолжительность жизни у мышей, а также улучшить некоторые из их возрастных показателей [72–74]. Так как принцип определения препарата как сенолитика базируется на проявлении биомаркеров старения, ориентируясь на которые, можно осуществлять поиск способов для избирательной индукции гибели клеток, необходимо иметь в виду, что эти маркеры могут свидетельствовать не только о «сенесцентном» состоянии, но и о старении клеток. Процесс старения постепенно захватывает все большее число клеток в популяции, но только на поздних стадиях развивается SASP. Требуется большое число исследований, которые помогли бы установить, как и когда необходимо запускать процесс гибели клеток. Необходимо понять, что лучше — действовать сенолитиками на клетки, которые уже приобрели SASP, или на клетки, которые только начали стареть.

Заключение

История вопроса о том, стареют ли отдельные клетки, начинается с экспериментов Алексиса Карреля, продолжается в исследованиях Леонарда Хейфлика и далека от завершения на сегодняшний день. Несмотря на большой интерес к этой

области, до сих пор существует много разногласий по поводу того, что является «старением клеток». Созданные модели не являются идеальными, но они помогли многое понять. Наиболее перспективными в ближайшее время будут исследования *in vivo*, их требуется как можно больше для понимания процессов, происходящих в клеточных популяциях и отдельных клетках организма [70, 75]. Деградация клеток в организме может происходить как из-за внутренних нарушений, так и из-за

негативного воздействия микроокружения. Впрочем, клеточные модели все еще могут быть полезными для проверки некоторых гипотез.

Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ, ч. 2 (фундаментальные научные исследования, № 121032300215-6) без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Khokhlov A.N.* From Carrel to Hayflick and back, or what we got from the 100-year cytogerontological studies // *Biophysics*. 2010. Vol. 55. N 5. P. 859–864.
2. *Medvedev Z.A.* On the immortality of the germ line: genetic and biochemical mechanisms. A review // *Mech. Ageing Dev.* 1981. Vol. 17. N 4. P. 331–359.
3. *Kirkwood T.B., Cremer T.* Cytogerontology since 1881: a reappraisal of August Weismann and a review of modern progress // *Hum. Genet.* 1982. Vol. 60. N 2. P. 101–121.
4. *Weismann A.* Das keimplasma. Eine theorie der vererbung. Jena: G. Fisher, 1892. 628 pp.
5. *Carrel A.* Artificial activation of the growth *in vitro* of connective tissue // *J. Exp. Med.* 1912. Vol. 17. N 1. P. 14–19.
6. *Carrel A.* Contributions to the study of the mechanism of the growth of connective tissue // *J. Exp. Med.* 1913. Vol. 18. N 3. P. 287–298.
7. *Swim H.E., Parker R.F.* Culture characteristics of human fibroblasts propagated serially // *Am. J. Hyg.* 1957. Vol. 66. N 2. P. 235–234.
8. *Hayflick L., Moorhead P.S.* The serial cultivation of human diploid cell strains // *Exp. Cell Res.* 1961. Vol. 25. N 3. P. 585–621.
9. *Hayflick L.* The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains // *Exp. Cell Res.* 1965. Vol. 37. N 3. P. 614–636.
10. *Hayflick L.* Aging under glass // *Mutat. Res., DNAging: Genet. Instab. Aging*, 1991. Vol. 256. N 2–6. P. 69–80.
11. *Hayflick L.* Entropy explains aging, genetic determinism explains longevity, and undefined terminology explains misunderstanding both // *PLoS Genet.* 2007. Vol. 3. N 12: e220.
12. *Hayflick L.* How and why we age. N.Y.: Ballantine Books, 1996. 377 pp.
13. *Olovnikov A.M.* Hypothesis: lifespan is regulated by chromomere DNA of the hypothalamus // *J. Alzheimer's Dis.* 2007. Vol. 11. N 2. P. 241–252.
14. *Macieira-Coelho A.* Cell division and aging of the organism // *Biogerontology*. 2011. Vol. 12. N 6. P. 503–515.
15. *Olovnikov A.M.* A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon // *J. Theor. Biol.* 1973. Vol. 41. N 1. P. 181–190.
16. *Greider C.W., Blackburn E.H.* Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts // *Cell*. 1985. Vol. 43. N 2. P. 405–413.
17. *Cristofalo V.J., Allen R.G., Pignolo R.J., Martin B.G., Beck J.C.* Relationship between donor age and the replicative lifespan of human cells in culture: A reevaluation // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998. Vol. 95. N 18. P. 10614–10619.
18. *Mikhelson V.M.* Replicative mosaicism might explain the seeming contradictions in the telomere theory of aging // *Mech. Ageing. Dev.* 2001. Vol. 122. N 13. P. 1361–1365.
19. *Khokhlov A.N.* Which aging in yeast is “true”? // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2016. Vol. 71. N 1. P. 11–13.
20. *Laun P., Bruschi C.V., Dickinson J.R., Rinnerthaler M., Heeren G., Schwimbersky R., Rid R., Breitenbach M.* Yeast mother cell-specific ageing, genetic (in)stability, and the somatic mutation theory of ageing // *Nucleic Acids Res.* 2007. Vol. 35. N 22. P. 7514–7526.
21. *Roux A.E., Quissac A., Chartrand P., Ferbeyre G., Rokeach L.A.* Regulation of chronological aging in *Schizosaccharomyces pombe* by the protein kinases Pka1 and Sck2 // *Aging Cell*. 2006. Vol. 5. N 4. P. 345–357.
22. *von Zglinicki T., Saretzki G., Döcke W., Lotze C.* Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? // *Exp. Cell Res.* 1995. Vol. 220. N 1. P. 186–193.
23. *Toussaint O., Dumont P., Dierick J.F., Pascal T., Fripiat C., Chainiaux F., Sluse F., Eliaers F., Remacle J.* Stress-induced premature senescence. Essence of life, evolution, stress, and aging // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2000. Vol. 908. P. 85–98.
24. *Sikora E., Arendt T., Bennett M., Narita M.* Impact of cellular senescence signature on ageing research // *Ageing Res. Rev.* 2011. Vol. 10. N 1. P. 146–152.
25. *Campisi J.* Cellular senescence: putting the paradoxes in perspective // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2011. Vol. 21. N 1. P. 107–112.
26. *de Jesus B.B., Blasco M.A.* Assessing cell and organ senescence biomarkers // *Circ. Res.* 2012. Vol. 111. N 1. P. 97–109.
27. *Gorgoulis V., Adams P.D., Alimonti A., et al.* Cellular senescence: defining a path forward // *Cell*. 2019. Vol. 179. N 4. P. 813–827.
28. *Jeyapalan J.C., Sedivy J.M.* Cellular senescence and organismal aging // *Mech. Ageing Dev.* 2008. Vol. 129. N 7–8. P. 467–474.
29. *Kuilman T., Michaloglou C., Mooi W.J., Peeper D.S.* The essence of senescence // *Genes Dev.* 2010. Vol. 24. N 22. P. 2463–2479.
30. *Giaimo S., D'Adda di Fagagna F.* Is cellular senescence an example of antagonistic pleiotropy? // *Aging Cell*. 2012. Vol. 11. N 3. P. 378–383.
31. *Cuervo A.M., Bergamini E., Brunk U.T., Dröge W., Ffrench M., Terman A.* Autophagy and aging: the importance of maintaining “clean” cells // *Autophagy*. 2005. Vol. 1. N 3. P. 131–140.
32. *Morgunova G.V., Shilovsky G.A., Khokhlov A.N.* Effect of caloric restriction on aging: Fixing the problems of

- nutrient sensing in postmitotic cells? // *Biochemistry (Mosc.)*. 2021. Vol. 86. N 10. P. 1352–1367.
33. Martínez D.E., Bridge D. Hydra, the everlasting embryo, confronts aging // *Int. J. Dev. Biol.* 2012. Vol. 56. N 6–8. P. 479–487.
34. Khokhlov A.N. On the immortal hydra. Again // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2014. Vol. 69. N 4. P. 153–157.
35. Lopes-Paciencia S., Saint-Germain E., Rowell M.C., Ruiz A.F., Kalegari P., Ferbeyre G. The senescence-associated secretory phenotype and its regulation // *Cytokine*. 2019. Vol. 117. P. 15–22.
36. Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Morgunova G.V. On choosing control objects in experimental gerontological research // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2018. Vol. 73. N 2. P. 59–62.
37. Nyström T. Aging in bacteria // *Curr. Opin. Microbiol.* 2002. Vol. 5. N 6. P. 596–601.
38. Leontieva O.V., Blagosklonny M.V. Yeast-like chronological senescence in mammalian cells: phenomenon, mechanism and pharmacological suppression // *Aging (Albany N.Y.)*. 2011. Vol. 3. N 11. P. 1078–1091.
39. 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.
40. Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Karmushakov A.F., Shilovsky G.A., Nasonov M.M., Morgunova G.V. Testing of geroprotectors in experiments on cell cultures: choosing the correct model system // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2014. Vol. 69. N 1. P. 10–14.
41. Anderson R., Lagnado A., Maggiorani D., et al. Length-independent telomere damage drives post-mitotic cardiomyocyte senescence // *The EMBO J.* 2019. Vol. 38. N 5: e100492.
42. von Zglinicki T., Wan T., Miwa S. Senescence in post-mitotic cells: a driver of aging? // *Antioxid. Redox Signal.* 2021. Vol. 34. N 4. P. 308–323.
43. Baker D.J., Wijshake T., Tchkonja T., LeBrasseur N.K., Childs B.G., Van De Sluis B., Kirkland J.L., Van Deursen J.M. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders // *Nature*. 2011. Vol. 479. N 7372. P. 232–236.
44. Zhu Y.I., Tchkonja T., Pirtskhalava T., et al. The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs // *Aging Cell*. 2015. Vol. 14. N 4. P. 644–658.
45. Young A.R., Narita M., Ferreira M., Kirschner K., Sadaie M., Darot J.F., Tavaré S., Arakawa S., Shimizu S., Watt F.M., Narita M. Autophagy mediates the mitotic senescence transition // *Genes Dev.* 2009. Vol. 23. N 7. P. 798–803.
46. Kaerberlein M., Burtner C.R., Kennedy B.K. Recent developments in yeast aging // *PLOS Genet.* 2007. Vol. 3. N 5: e84.
47. Alvers A.L., Wood M.S., Hu D., Kaywell A.C., Dunn W.A. Jr., Aris J.P. Autophagy is required for extension of yeast chronological life span by rapamycin // *Autophagy*. 2009. Vol. 5. N 6. P. 847–849.
48. Werner-Washburne M., Braun E., Johnston G.C., Singer R.A. Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1993. Vol. 57. N 2. P. 383–401.
49. Powers R.W., Kaerberlein M., Caldwell S.D., Kennedy B.K., Fields S. Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling // *Genes Dev.* 2006. Vol. 20. N 2. P. 174–184.
50. Miller R.A., Harrison D.E., Astle C.M., Fernandez E., Flurkey K., Han M., Javors M.A., Li X., Nadon N.L., Nelson J.F., Pletcher S. Rapamycin-mediated lifespan increase in mice is dose and sex dependent and metabolically distinct from dietary restriction // *Aging Cell*. 2014. Vol. 13. N 3. P. 468–477.
51. Bjedov I., Toivonen J.M., Kerr F., Slack C., Jacobson J., Foley A., Partridge L. Mechanisms of life span extension by rapamycin in the fruit fly *Drosophila melanogaster* // *Cell Metab.* 2010. Vol. 11. N 1. P. 35–46.
52. Zoico E., Rizzatti V., Policastro G., Tebon M., Darra E., Rossi A.P., Mazzali G., Fantin F., Zamboni M. In vitro model of chronological aging of adipocytes: interrelationships with hypoxia and oxidation // *Exp. Gerontol.* 2019. Vol. 121. P. 81–90.
53. 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.
54. Khokhlov A.N. Cell kinetic approaches to the search for anti-aging drugs: Thirty years after // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2018. Vol. 73. N 4. P. 185–190.
55. Khokhlov A.N. What will happen to molecular and cellular biomarkers of aging in case its program is canceled (provided such a program does exist)? // *Adv. Gerontol.* 2014. Vol. 4. N 2. P. 150–154.
56. Wiley C.D., Flynn J.M., Morrissey C., Lebofsky R., Shuga J., Dong X., Unger M.A., Vijj J., Melov S., Campisi J. Analysis of individual cells identifies cell-to-cell variability following induction of cellular senescence // *Aging Cell*. 2017. Vol. 16. N 5. P. 1043–1050.
57. Comfort A. Ageing: The biology of senescence. London: Routledge & Kegan Paul, 1964. 365 pp.
58. 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.
59. 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. N 5: eaaw2069.
60. Maier A.B., Maier I.L., van Heemst D., Westendorp R.G.J. Colony formation and colony size do not reflect the onset of replicative senescence in human fibroblasts // *J. Gerontol., Ser. A*. 2008. Vol. 63. N 7. P. 655–659.
61. Dimri G.P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E.E., Linskens M.A., Rubelj I., Pereira-Smith O., Peacocke M., Campisi J. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995. Vol. 92. N 20. P. 9363–9367.
62. Morgunova G.V., Kolesnikov A.V., Klebanov A.A., Khokhlov A.N. Senescence-associated β -galactosidase—A biomarker of aging, DNA damage, or cell proliferation restriction? // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2015. Vol. 70. N 4. P. 165–167.
63. Samorajski T., Ordj J.M., Keefe J.R. The fine structure of lipofuscin age pigment in the nervous system of aged mice // *J. Cell Biol.* 1965. Vol. 26. N 3. P. 779–795.
64. Georgakopoulou E.A., Tsimaratou K., Evangelou K., Fernandez M.P., Zoumpouris V., Trougakos I.P., Kleitas D., Bartek J., Serrano M., Gorgoulis V.G. Specific lipofuscin staining as a novel biomarker to detect replicative and stress-induced senescence. A method applicable in cryo-preserved and archival tissues // *Aging (Albany N.Y.)*. 2013. Vol. 5. N 1. P. 37–50.
65. Salmonowicz H., Passos J.F. Detecting senescence: a new method for an old pigment // *Aging Cell*. 2017. Vol. 16. N 3. P. 432–434.

66. Sitte N., Merker K., Grune T., von Zglinicki T. Lipofuscin accumulation in proliferating fibroblasts *in vitro*: an indicator of oxidative stress // *Exp. Gerontol.* 2001. Vol. 36. N 3. P. 475–486.
67. López-Otín C., Blasco M.A., Partridge L., Serrano M., Kroemer G. The hallmarks of aging // *Cell.* 2013. Vol. 153. N 6. P. 1194–1217.
68. Neurohr G.E., Terry R.L., Lengefeld J., Bonney M., Brittingham G.P., Moretto F., Miettinen T.P., Vaites L.P., Soares L.M., Paulo J.A., Harper J.W. Excessive cell growth causes cytoplasm dilution and contributes to senescence // *Cell.* 2019. Vol. 176. N 5. P. 1083–1097.
69. Ginzberg M.B., Kafri R., Kirschner M. On being the right (cell) size // *Science.* 2015. Vol. 348. N 6236. P. 1245075.
70. Ogrodnik M. Cellular aging beyond cellular senescence: Markers of senescence prior to cell cycle arrest *in vitro* and *in vivo* // *Aging Cell.* 2021. Vol. 20. N 4. P. e13338.
71. Carroll B., Nelson G., Rabanal-Ruiz Y., Kucheryavenko O., Dunhill-Turner N.A., Chesterman C.C., Zahari Q., Zhang T., Conduit S.E., Mitchell C.A., Maddocks O.D. Persistent mTORC1 signaling in cell senescence results from defects in amino acid and growth factor sensing // *J. Cell Biol.* 2017. Vol. 216. N 7. P. 1949–1957.
72. Baker D.J., Childs B.G., Durik M., Wijers M.E., Sieben C.J., Zhong J., Saltness R.A., Jeganathan K.B., Verzosa G.C., Pezeshki A., Khazaie K., Miller J.D., van Deursen J.M. Naturally occurring p16^{Ink4a}-positive cells shorten healthy lifespan // *Nature.* 2016. Vol. 530. N 7589. P. 184–189.
73. Yousefzadeh M.J., Zhu Y.I., McGowan S.J., et al. Fisetin is a senotherapeutic that extends health and lifespan // *EBioMedicine.* 2018. Vol. 36. P. 18–28.
74. Xu Q., Fu Q., Li Z., Liu H., Wang Y., Lin X., He R., Zhang X., Ju Z., Campisi J., Kirkland J.L. The flavonoid procyanidin C1 has senotherapeutic activity and increases lifespan in mice // *Nat. Metab.* 2021. Vol. 3. N 12. P. 1706–1726.
75. Tang H., Geng A., Zhang T., Wang C., Jiang Y., Mao Z. Single senescent cell sequencing reveals heterogeneity in senescent cells induced by telomere erosion // *Protein Cell.* 2019. Vol. 10. N 5. P. 370–375.

Поступила в редакцию 19.05.2022

После доработки 27.06.2022

Принята в печать 04.07.2022

REVIEW

Signs of similarities and differences in cellular models of aging. A scoping review

G.V. Morgunova ^{*} , A.N. Khokhlov 

*Evolutionary Cytoogerontology Sector, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,
1–12 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia*

**e-mail: morgunova@mail.bio.msu.ru*

Despite the great interest of scientists in the question of what cell aging is, and the long history of its study, there are still many contradictions in this area. They arise because several different approaches have been developed to model aging *in vitro*. As a result, even different terms arose – *cell senescence* and *cell aging*. There are not only differences between models for studying aging at the cellular level, they also have common features. Moreover, it is now becoming apparent that some models complement others. This is evidenced, in particular, by the fact that biomarkers used in one model are suitable for use in another (aging-associated β -galactosidase, lipofuscin, etc.). The development of approaches to the study of cellular aging has been uneven, and at present, research on this topic is experiencing another rise due to the prospects for the use of senolytics (drugs that selectively eliminate “senescent” cells) to increase the lifespan of multicellular organisms. This review considers the pros and cons of various models for studying aging on cultured cells of various nature.

Keywords: *aging, cell cultures, biomarkers of aging, cytoogerontology, replicative senescence, chronological aging*

Funding: This work was performed under the state assignment of Moscow State University, project number 121032300215-6.

Сведения об авторах

Моргунова Галина Васильевна — канд. биол. наук, вед. 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>

Хохлов Александр Николаевич — докт. биол. наук, зав. сектором эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-15-90; e-mail: khokhlov@mail.bio.msu.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7454-7023>