

ГЕРОНТОЛОГИЯ

УДК 576.35:57.017.6

**АССОЦИИРОВАННАЯ СО СТАРЕНИЕМ БЕТА-ГАЛАКТОЗИДАЗА —
БИОМАРКЕР СТАРЕНИЯ, ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК
ИЛИ ОГРАНИЧЕНИЯ КЛЕТОЧНОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ?****Г.В. Моргунова, А.В. Колесников, А.А. Клебанов, А.Н. Хохлов**

(сектор эволюционной цитогеронтологии; e-mail: morgunova@mail.bio.msu.ru)

Наиболее популярным биомаркером клеточного старения (БКС) является активность ассоциированной со старением бета-галактозидазы (senescence-associated beta-galactosidase, SA- β -Gal). В настоящее время именно этот БКС чаще всего используется в исследованиях, основанных на представлении (которое мы не разделяем) о клеточном старении как в первую очередь накоплении в клетках (чаще всего в тех, которым не свойственно репликативное старение) определенных БКС под действием различных внешних факторов, вызывающих повреждение ДНК. Однако данные целого ряда работ свидетельствуют о том, что активность SA- β -Gal — не такой уж хороший БКС, так как она часто зависит не столько от возраста (как *in vivo*, так и *in vitro*), сколько от метода исследования, наличия определенных патологий и, что особенно важно, от пролиферативного статуса изучаемых клеток. Судя по всему, именно ограничение клеточной пролиферации (вследствие дифференцировки, контактного торможения, индукции повреждений ДНК, наличия некоторых заболеваний и др.) само по себе является тем фактором, который стимулирует экспрессию SA- β -Gal. Другими словами, SA- β -Gal появляется даже в “молодых” клетках, размножение которых заторможено. Такие данные, на наш взгляд, служат дополнительным доказательством жизнеспособности нашей концепции старения, постулирующей решающую роль ограничения клеточной пролиферации в накоплении с возрастом различных макромолекулярных повреждений (в первую очередь повреждений ДНК) в клетках.

Ключевые слова: ассоциированная со старением бета-галактозидаза, биомаркеры старения, цитогеронтология, “стационарное старение”, клеточное старение, повреждения ДНК, ограничение клеточной пролиферации.

В большинстве случаев, говоря о биомаркерах старения (БС), исследователи имеют в виду маркеры не столько старения, сколько биологического возраста. Иначе говоря, речь идет об определенных параметрах, хорошо коррелирующих с хронологическим возрастом организма, но не со старением, представляющим собой увеличение вероятности смерти со временем. Хотя выраженность седины прекрасно коррелирует с возрастом, она практически никак не связана со смертностью. Причина этого понятна — в геронтологии важны параметры, связанные (желательно причинно-следственно) с фундаментальными молекулярно-клеточными механизмами старения. И эти показатели, как правило, увязываются теперь с тем явлением, которое называется клеточным старением (cellular/cell senescence) — основным понятием в цитогеронтологии.

Сам термин “цитогеронтология” был введен в обращение Леонардом Хейфликом [1] для описания исследований старения *in vitro*, выражающегося в “возрастных” изменениях культивируемых нормальных клеток при исчерпании ими митотического потенциала (“феномен Хейфлика”). Позже цитогеронтологией стали называть любые исследования механизмов старения в экспериментах на культивируемых клетках [2–5].

Было сформулировано множество концепций, пытающихся объяснить суть феномена Хейфлика

и связать его со старением *in vivo*. Однако впоследствии все они были отвергнуты в результате открытия теломерного “счетчика” [6], определяющего то, что еще Хейфликом было названо термином “клеточное старение”. Главное, на чем делался упор при обосновании целесообразности исследований механизмов старения на этой модели, это то, что при увеличении количества удвоений клеточной популяции в культивируемых нормальных клетках происходят различные изменения на самых разных уровнях, сходные с таковыми в клетках стареющего организма. Таким образом, и в этом случае речь идет о корреляции — на этот раз о корреляции изменений определенных БС. Несмотря на “коррелятивность” модели Хейфлика, она получила широкое распространение и с ее помощью были получены многочисленные данные, позволившие прояснить многие аспекты функционирования живых организмов. Однако изучение старения *in vitro* практически никак не помогло геронтологам в понимании фундаментальных механизмов старения и долголетия. Более того, как нам кажется, произошедшая в последние годы трансформация термина “клеточное старение” даже нанесла серьезный вред современной экспериментальной геронтологии. Сейчас очень часто под “клеточным старением” в первую очередь понимается накопление/появление в клетках (чаще всего — трансформированных, которым

не свойственно репликативное старение) определенных “БС” (именно так, в кавычках, ибо в данном случае ни о каком реальном старении речь не идет) под влиянием различных внешних факторов, вызывающих повреждение ДНК. Это явление было названо DDR (DNA Damage Response — реакция на повреждения ДНК). “Старение” клеток в рамках данного определения происходит не само по себе, а вследствие воздействия ДНК-повреждающих агентов. Его еще называют “стресс-индуцированным старением” [7]. Такой подход, на наш взгляд, хотя и важен для определения стратегии борьбы с раком, но уже в который раз уводит нас от изучения реальных механизмов старения организма. Сходное мнение было недавно выражено и известным геронтологом Д. Харманом [8].

Необходимо подчеркнуть, что в используемой нами модели “стационарного старения” [9–11] мы тоже фиксируем появление определенных БС в культивируемых клетках, однако в этом случае они возникают из-за ограничения их пролиферации с помощью контактного торможения, т.е. вполне физиологического воздействия, которое само по себе не вызывает никаких повреждений в клетках (ситуация очень похожа на ту, что мы наблюдаем в многоклеточном организме).

Наиболее популярным из упомянутых биомаркеров клеточного старения является активность ассоциированной со старением бета-галактозидазы (бета-галактозидаза pH 6.0; senescence-associated beta-galactosidase, SA- β -Gal). Фермент β -галактозидаза, лизосомная гидролаза, высвобождает концевую бета-галактозу из содержащих ее соединений (лактозы, кератинсульфатов, сфинголипидов и др.). Она является участником некоторых “минорных” метаболических реакций и присутствует практически во всех тканях. Фермент проявляет свою максимальную активность при pH 4.0, но различия по этому показателю между “старыми” и “молодыми” клетками с помощью определенных биохимических методов могут быть лучше всего выявлены при pH 6.0. Целесообразность использования активности SA- β -Gal в качестве БС была впервые постулирована в 1995 г. в работе Димри с соавт. [12], продемонстрировавших, что интенсивность экспрессии этого фермента возрастает при старении как *in vitro*, так и *in vivo*.

В последующие годы данный БС широко использовался в цитогеронтологических экспериментах для оценки “возраста” клеток, а в настоящее время является наиболее распространенным в работах (см., например, [13, 14]), основанных на не устраивающем нас определении клеточного старения. Однако параллельно стали появляться публикации, подчеркивавшие, что активность SA- β -Gal в клетках — не такой уж хороший БС, ибо во многих случаях он зависит не столько от возраста (как *in vivo*, так и *in vitro*), сколько от метода исследова-

ния и/или наличия определенных патологий, а также, что представляется нам наиболее важным, от пролиферативного статуса изучаемых клеток [15–18]. Складывается впечатление, что ограничение пролиферации клеток по той или иной причине (дифференцировка, контактное торможение, DDR, некоторые болезни) и является тем фактором, который вызывает стимуляцию экспрессии SA- β -Gal. Иными словами, даже в “молодых” клетках появляется SA- β -Gal, если им не давать размножаться. Не так давно мы показали [19], что в находящейся в стационарной фазе роста культуре трансформированных клеток китайского хомячка растет со временем доля клеток, в которых методом Димри с соавт. определяется SA- β -Gal. Данные такого рода, на наш взгляд, служат дополнительным доказательством жизнеспособности развиваемой нами концепции старения, постулирующей решающую роль ограничения пролиферации клеток в накоплении в них различных макромолекулярных дефектов (наиболее важные из них — повреждения ДНК), приводящих, в свою очередь, к ухудшению функционирования органов и тканей и дальнейшему увеличению вероятности смерти макроорганизмов [9, 11, 20].

Интересно также заметить, что в соответствующих экспериментах, посвященных сравнению влияния на трансформированные клетки китайского хомячка их “стационарного” или “стресс-индуцированного” (воздействие 4%-м этанолом по 2 ч в день в течение 5 сут) старения, мы обнаружили, что в 14-суточной “стационарно старой” культуре процент клеток, окрашивающихся на SA- β -Gal по методу Димри с соавт., гораздо выше, чем в “молодой” (7-суточной) контрольной культуре, но сопоставим с этим показателем для 7-суточных клеток, подвергнутых влиянию этанола.

Хотелось бы напоследок также упомянуть работу [21], в которой было продемонстрировано, что и при “стресс-индуцированном преждевременном старении”, и при репликативном старении “по Хейфлику” SA- β -Gal не накапливается, если нарушена экспрессия гена *GLB1*, который кодирует лизосомную бета-галактозидазу.

Можно полагать, что остановка старения (если она возможна) не обязательно приведет к изменению возрастной динамики тех БС, которые непосредственно связаны с пролиферативным статусом клеток, образующих органы и ткани организма [9]. По крайней мере, это должно касаться тех БС, которые не вовлечены в механизмы увеличения вероятности смерти с возрастом. Если же какие-то БС являются “сущностными” [5], т.е. без влияния на них нельзя замедлить процесс старения, то постулируемый механизм отмены старения должен позволить объяснить, каким образом такие БС будут постоянно удаляться из постмитотических или очень медленно размножающихся клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hayflick L. Progress in cytoogerontology // Mech. Ageing Dev. 1979. Vol. 9. N 5–6. P. 393–408.
2. Хохлов А.Н. Итоги и перспективы цитогеронтологических исследований на современном этапе // Цитология. 2002. Т. 44. № 12. С. 1143–1148.
3. 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.
4. Alinkina E.S., Vorobyova A.K., Misharina T.A., Fatkullina L.D., Burlakova E.B., Khokhlov A.N. Cytoogerontological studies of biological activity of oregano essential oil // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2012. Vol. 67. N 2. P. 52–57.
5. Khokhlov A.N. Cytoogerontology at the beginning of the third millennium: from “correlative” to “gist” models // Russ. J. Dev. Biol. 2003. Vol. 34. N 5. P. 321–326.
6. 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.
7. Toussaint O., Dumont P., Remacle J., Dierick J.F., Pascal T., Fripriat C., Magalhaes J.P., Zdanov S., Chainiaux F. Stress-induced premature senescence or stress-induced senescence-like phenotype: one *in vivo* reality, two possible definitions? // The Scientific World JOURNAL. 2002. Vol. 2. P. 230–247.
8. Harman D. About “Origin and evolution of the free radical theory of aging: a brief personal history, 1954–2009” // Biogerontology. 2009. Vol. 10. N 6. P. 783.
9. 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.
10. Vilenchik M.M., Khokhlov A.N., Grinberg K.N. Study of spontaneous DNA lesions and DNA repair in human diploid fibroblasts aged *in vitro* and *in vivo* // Studia biophysica. 1981. Vol. 85. N 1. P. 53–54.
11. Khokhlov A.N. Does aging need its own program, or is the program of development quite sufficient for it? Stationary cell cultures as a tool to search for anti-aging factors // Curr. Aging Sci. 2013. Vol. 6. N 1. P. 14–20.
12. Dimri G.P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E.E., Linskens M., 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. USA. 1995. Vol. 92. N 20. P. 9363–9367.
13. Debacq-Chainiaux F., Pascal T., Boilan E., Bastin C., Bauwens E., Toussaint O. Screening of senescence-associated genes with specific DNA array reveals the role of IGFBP-3 in premature senescence of human diploid fibroblasts // Free Radic. Biol. Med. 2008. Vol. 44. N 10. P. 1817–1832.
14. 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.
15. Choi J., Shendrik I., Peacocke M., Peehl D., Buttyan R., Ikeguchi E.F., Katz A.E., Benson M.C. Expression of senescence-associated beta-galactosidase in enlarged prostates from men with benign prostatic hyperplasia // Urology. 2000. Vol. 56. N 1. P. 160–166.
16. Cristofalo V.J. SA beta Gal staining: biomarker or delusion // Exp. Gerontol. 2005. Vol. 40. N 10. P. 836–838.
17. Yegorov Y.E., Akimov S.S., Hass R., Zelenin A.V., Prudovsky I.A. Endogenous beta-galactosidase activity in continuously nonproliferating cells // Exp. Cell Res. 1998. Vol. 243. N 1. P. 207–211.
18. Severino J., Allen R.G., Balin S., Balin A., Cristofalo V.J. Is beta-galactosidase staining a marker of senescence *in vitro* and *in vivo*? // Exp. Cell Res. 2000. Vol. 257. N 1. P. 162–171.
19. Vladimirova I.V., Shilovsky G.A., Khokhlov A.N., Shram S.I. “Age-related” changes of the poly(ADP-ribosyl)ation system in cultured Chinese hamster cells // Visualizing of senescent cells *in vitro* and *in vivo*. Programme and abstracts (Warsaw, Poland, 15–16 December 2012). Warsaw, Poland, 2012. P. 108–109.
20. Khokhlov A.N. From Carrel to Hayflick and back, or what we got from the 100-year cytoogerontological studies // Biophysics. 2010. Vol. 55. N 5. P. 859–864.
21. Lee B.Y., Han J.A., Im J.S., Morrone A., Johung K., Goodwin E.C., Kleijer W.J., DiMaio D., Hwang E.S. Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase // Aging Cell. 2006. Vol. 5. N 2. P. 187–195.

Поступила в редакцию
10.06.15

SENESCENCE-ASSOCIATED BETA-GALACTOSIDASE — A BIOMARKER OF AGING, DNA DAMAGE, OR CELL PROLIFERATION RESTRICTION?

G.V. Morgunova, A.V. Kolesnikov, A.A. Klebanov, A.N. Khokhlov

The most popular biomarker of cellular senescence (BCS) is the activity of senescence-associated beta-galactosidase (SA- β -Gal). Today, this is the prevailing BCS in the studies based on a definition of cell senescence (which we do not accept) understood primarily as accumulation in the cells (most often — not prone to replicative senescence) of certain BCS under the impact of various external factors causing DNA damage. However, some papers provide evidence that SA- β -Gal activity in the cells is not so good a BCS, because it often depends not so much on age (*in vitro* or *in vivo*) as on the method of research, the presence of certain pathologies, and, what is most important, on the proliferative status of the cells studied. It appears that restriction of cell proliferation under certain conditions (due to differentiation, contact inhibition, DNA damage, some diseases, etc.) is itself the factor that stimulates SA- β -Gal expression. In other words, SA- β -Gal appears even in “young” cells if their proliferation is suppressed. Such data, in our opinion, appear to provide additional evidence for the validity of our concept of aging that postulates the leading role of cell proliferation restriction in the age-related accumulation of various macromolecular defects (primarily DNA damage) in the cells.

Key words: senescence-associated beta-galactosidase, biomarkers of aging, cytoogerontology, “stationary phase aging”, cell senescence, DNA damage, cell proliferation restriction.

Сведения об авторах

Моргунова Галина Васильевна — аспирант сектора эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-15-90; e-mail: morgunova@mail.bio.msu.ru

Колесников Александр Васильевич — инженер сектора эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-15-90; e-mail: kolesnikov@mail.bio.msu.ru

Клебанов Александр Александрович — науч. сотр. сектора эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-15-90; e-mail: klebanov@mail.bio.msu.ru

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