

ГЕРОНТОЛОГИЯ

УДК 576.35:57.017.6

ЭВОЛЮЦИЯ ТЕРМИНА “CELLULAR SENESENCE” И ЕЕ ВЛИЯНИЕ НА СОСТОЯНИЕ СОВРЕМЕННЫХ ЦИТОГЕРОНТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ**А.Н. Хохлов***(сектор эволюционной цитогеронтологии; e-mail: khokhlov@mail.bio.msu.ru)*

Термин “клеточное старение” (cellular/cell senescence) был введен в обращение Леонардом Хейфликом для описания “возрастных” изменений нормальных эукариотических клеток при старении *in vitro*, т.е. при исчерпании ими митотического потенциала. В “классическом” варианте подразумевалось, что клетки “стареют” с помощью некоторого внутреннего механизма, вследствие чего в них появляются различные макромолекулярные дефекты (в первую очередь — повреждения ДНК). В настоящее же время, как правило, говоря о “клеточном старении”, подразумевают накопление/появление в клетках (чаще всего — трансформированных, которым не свойственно репликативное старение) определенных “биомаркеров старения” под влиянием различных внешних факторов (окислительного стресса, H_2O_2 , митомицина С, этанола, ионизирующей радиации, доксорубина и др.), вызывающих повреждение ДНК. Это явление было названо DDR (DNA Damage Response). Среди упомянутых биомаркеров — активность бета-галактозидазы рН 6,0, экспрессия белков p53 и p21, а также белков-регуляторов воспаления вроде IL-6 или IL-8, активация онкогенов и др. Таким образом, “старение” клеток происходит не само по себе, а вследствие воздействия ДНК-повреждающих агентов. Такой подход, на мой взгляд, хотя и очень важен для определения стратегии борьбы с раком, но уже в который раз уводит нас от изучения реальных механизмов старения организма. Необходимо подчеркнуть, что в используемой в моей лаборатории модели “стационарного старения” мы тоже фиксируем появление определенных биомаркеров старения 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).

Ключевые слова: старение, программа, биомаркеры, пролиферация клеток, клеточное старение, ассоциированная со старением бета-галактозидаза, злокачественная трансформация, повреждения ДНК.

Хотя мы сейчас не так уж часто об этом вспоминаем, но основы цитогеронтологии были заложены еще в конце XIX в. Августом Вейсманом [1, 2]. Что касается самого термина “цитогеронтология”, то он был введен в обращение Леонардом Хейфликом [3, 4] для описания исследований старения *in vitro*, выражающегося в “возрастных” изменениях культивируемых нормальных клеток при исчерпании ими митотического потенциала (собственно, именно этот феномен и был назван впоследствии “феноменом Хейфлика”). Позже цитогеронтологией стали называть любые исследования механизмов старения в экспериментах на культивируемых клетках [5—11].

Надо сказать, что именно А. Вейсман впервые четко противопоставил клетки зародышевого пути, популяция которых в принципе является бессмертной, соматическим клеткам, которые стареют и умирают. Таким образом, краеугольным камнем его взглядов является положение о существовании смертной

сомы и бессмертной “зародышевой плазмы” (Keim-plasma). Впрочем, необходимо подчеркнуть, что Вейсман так и не дал четкого определения, что же это такое — клеточное старение. Возможно, это и явилось причиной тех выводов, которые сделал Алексис Каррель [12, 13], создав в начале XX в. экспериментальные основы цитогеронтологии.

Каррель захотел проверить, действительно ли соматические клетки высших животных, будучи выделенными из организма, не смогут размножаться бесконечно, “состарятся” и умрут. Именно он разработал методику культивирования во флаконах эпителиальных или фибробластоподобных клеток животных, причем эта методика практически в неизменном виде используется до настоящего времени. Однако результаты экспериментов Карреля совсем не укладывались в концепцию смертной сомы. Некоторые штаммы клеток, полученных из куриных эмбрионов, ему удалось культивировать практически

неограниченно долго безо всяких признаков деградации культур. Поэтому в XX в. ученые-геронтологи в течение почти 50 лет полагали, что соматические клетки способны к неограниченному размножению. Лишь поставленные в 50—60-х гг. эксперименты Свима и Паркера [14], а затем и Хейфлика [15—17] позволили установить, что результаты Карреля были, по-видимому, артефактом. Как оказалось, практически все нормальные клетки животных обладают ограниченной способностью к пролиферации, выдерживая в культуре не более 100—120 делений (что соответствует приблизительно 50 удвоениям клеточной популяции).

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” [18], определяющего ограниченную способность нормальных клеток к размножению и то, что еще Хейfliком было названо термином “клеточное старение” (*cellular senescence*), который на протяжении многих лет фактически использовался для обозначения феномена его имени (см. выше). Необходимо подчеркнуть, что между клеточным старением и старением многоклеточного организма нет прямых причинно-следственных связей [6—8, 10, 19—22]. Вся доказательная база геронтологической ценности этого феномена основывается лишь на целом ряде **корреляций** типа пониженного пролиферативного потенциала фибробластов, полученных от пациентов с прогерией, прямой связи этого показателя с видовой продолжительностью жизни или обратной — с возрастом донора клеток и т.п.

Главное, на что делался упор при обосновании целесообразности исследований механизмов старения на модели Хейфлика, 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. Иными словами, при старении *in vitro* в клетках либо что-то накапливается, либо что-то исчезает точно так же, как при старении *in vivo*. Таким образом, и в этом случае речь идет о **корреляции** — на этот раз о корреляции изменений определенных биомаркеров старения.

Несмотря на “коррелятивность” модели Хейфлика, она получила широкое распространение, и с ее помощью были получены многочисленные данные, позволившие прояснить многие аспекты функционирования живых организмов. В частности, это касается механизмов развития, а также злокачественной трансформации. Однако, как ни печально, изучение старения *in vitro* практически никак не помогло геронтологам в понимании фундаментальных механизмов старения и долголетия. Более того, как мне кажется, произошедшая в последние годы трансформация термина “клеточное старение” (*cellular se-*

nescence) даже нанесла серьезный вред современной экспериментальной геронтологии.

Изначально считалось, что клеточное старение происходит “само по себе”, т.е. его механизм является внутренним, а все последующие изменения в клетках — лишь **следствие** этого процесса. Собственно, именно так и функционирует открытый А.М. Оловниковым механизм укорочения теломер при каждом клеточном делении [18]. В 80-х гг. XX в. мной была сформулирована концепция старения [22], согласно которой именно происходящее при развитии организма ограничение клеточной пролиферации (вследствие образования популяций высокодифференцированных постмитотических или очень медленно размножающихся клеток) является причиной возрастного накопления в клетках различных макромолекулярных дефектов (главным образом повреждений ДНК). Эта концепция позволяла легко объяснить “возрастные” изменения клеток при старении *in vitro* тем, что на поздних пассажах размножение клеток замедляется, возникающие спонтанные повреждения ДНК перестают в должной степени “разбавляться” с помощью появления новых клеток, и мы наблюдаем их накопление в расчете на всю клеточную популяцию. Последнее обстоятельство очень важно, ибо некоторые клетки полностью сохраняют свою способность делиться, однако их доля с пассажами непрерывно уменьшается, так что “старение” клеток фиксируется именно на уровне всей клеточной **популяции**. Собственно, разработанная нами модель “стационарного старения” [21—26] и была основана на 100%-м подавлении размножения культивируемых клеток с помощью контактного торможения либо какого-нибудь другого физиологического способа ограничения пролиферации, что в результате приводило к накоплению в клетках “возрастных” повреждений. И в этом случае мы сначала заставляли клетки “стареть”, а лишь потом фиксировали появление в них тех или иных биомаркеров старения *in vivo* (например, разрывов ДНК). Таким образом, при “классическом” подходе подразумевалось, что клетки “стареют” с помощью некоторого внутреннего механизма, вследствие чего в них появляются различные макромолекулярные дефекты (в первую очередь — повреждения ДНК).

Однако в последние годы в термин “клеточное старение” (*cellular senescence* или *cell senescence*) все чаще и чаще вкладывается совсем другой смысл. В июле 2013 г. в Кембридже должна состояться международная конференция “Клеточное старение, рак и старение” (*Cell Senescence in Cancer and Ageing*), на которой планируют собраться многие признанные авторитеты в этой области. Непосредственно на первой странице интернет-сайта конференции организаторы поместили определение клеточного старения, которое (с учетом, естественно, и соответствующих публикаций участников конференции, а также их коллег — см., например, [27]) звучит следующим образом: «Клеточным старением называется устой-

чивая остановка пролиферации, вызванная различными молекулярными триггерами, включающими активацию онкогенов, а также избыточное количество клеточных делений. Кроме того, “сенесцентные” клетки характеризуются секрецией целого ряда стромальных регуляторов и регуляторов воспаления (так называемым “ассоциированным со старением секреторным фенотипом”), влияющих на функционирование соседних клеток, включая иммунокомпетентные. Целый ряд убедительных фактов свидетельствует о том, что клеточное старение представляет собой эффективный механизм подавления опухолевого роста. В то же время клеточное старение, возможно, вносит свой вклад в старение тканей и всего организма».

Таким образом, под “клеточным старением” в первую очередь понимается накопление/появление в клетках (чаще всего — трансформированных, которым не свойственно репликативное старение) определенных “биомаркеров старения” (именно так, в кавычках, ибо в данном случае ни о каком реальном старении речь не идет) под влиянием различных внешних факторов (окислительного стресса, H_2O_2 , митомидин С, этанола, ионизирующей радиации, доксорубицина и др.), вызывающих повреждение ДНК. Это явление было названо DDR (DNA Damage Response — реакция на повреждения ДНК). Среди упомянутых биомаркеров старения — активность бета-галактозидазы pH 6.0, экспрессия белков p53 и p21, а также белков-регуляторов воспаления вроде IL-6 или IL-8, активация онкогенов и др. Таким образом, “старение” клеток в рамках данного определения происходит не само по себе, а **вследствие** воздействия ДНК-повреждающих агентов. Такой подход, на мой взгляд, хотя и очень 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 в его коротком комментарии, опубликованном в журнале “Biogerontology” [28].

Необходимо подчеркнуть, что в используемой нами модели “стационарного старения” [21, 22, 24, 25] мы тоже фиксируем появление определенных биомаркеров старения 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 бета-галактозидазы pH 6.0 (ассоциированная со старением

бета-галактозидаза, senescence-associated beta-galactosidase, SA- β -Gal). Фермент β -галактозидаза, лизосомная гидролаза, обычно проявляет свою активность при pH 4.0, но в “сенесцентных” клетках эта активность может быть, с помощью определенных биохимических методов, обнаружена при pH 6.0. Целесообразность использования активности SA- β -Gal в качестве биомаркера старения была впервые постулирована в 1995 г. в работе Димри с соавт. [29], продемонстрировавших, что интенсивность экспрессии этого фермента возрастает при старении как *in vitro*, так и *in vivo*. В последующие годы данный биомаркер широко использовался в цитогеронтологических экспериментах для оценки “возраста” клеток, а в настоящее время является наиболее распространенным в работах (см., например, [30, 31]), основанных на не устраивающем меня определении клеточного старения. Однако параллельно стали появляться публикации, подчеркивавшие, что активность SA- β -Gal в клетках — не такой уж хороший биомаркер старения, ибо во многих случаях он зависит не столько от возраста (как *in vivo*, так и *in vitro*), сколько от метода исследования и/или наличия определенных патологий, а также, что представляется мне наиболее важным, от пролиферативного статуса изучаемых клеток [32–38]. 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. Совсем недавно мы, используя нашу упомянутую выше модель “стационарного старения”, показали [39], 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. Помимо прочего этот процесс сопровождается, с одной стороны, увеличением в клетках содержания поли(ADP-рибозы), а с другой — снижением их способности синтезировать поли(ADP-рибозу) в ответ на повреждение ДНК под воздействием H_2O_2 .

Данные такого рода, на мой взгляд, служат дополнительным доказательством жизнеспособности упомянутой выше 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 [19, 21, 22].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Weismann A. Die Kontinuitat des Keimplasmas als Grundlage einer Theorie der Vererbung. Jena: G. Fisher Verlag, 1885.

2. Weismann A. Das Keimplasma. Eine Theorie der Vererbung. Jena: G. Fisher Verlag, 1892.

3. Hayflick L. Progress in cytoogerontology // Mech. Ageing Dev. 1979. Vol. 9. N 5–6. P. 393–408.
4. Hayflick L. How and why we age. New York: Ballantine Books, 1996. 400 p.
5. Kirkwood T.B., Cremer T. Cytoogerontology since 1881: a reappraisal of August Weismann and a review of modern progress // Hum. Genet. 1982. Vol. 60. N 2. P. 101–121.
6. Хохлов А.Н. Итоги и перспективы цитогеронтологических исследований на современном этапе // Цитология. 2002. Т. 44. № 12. С. 1143–1148.
7. Хохлов А.Н. Геронтологические исследования на клеточных культурах: от организма к клетке и обратно // Проблемы старения и долголетия. 2008. Т. 17. № 4. С. 451–456.
8. Хохлов А.Н. Тестирование геропротекторов в экспериментах на клеточных культурах: за и против // Проблемы старения и долголетия. 2009. Т. 18. № 1. С. 32–36.
9. Khokhlov A.N. The cell kinetics model for determination of organism biological age and for geroprotectors or geropromoters studies // Biomarkers of aging: expression and regulation. Proceeding / Eds. F. Licastro, C.M. Caldarera. Bologna: CLUEB, 1992. P. 209–216.
10. 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.
11. 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.
12. Carrel A. Artificial activation of the growth in vitro of connective tissue // J. Exp. Med. 1912. Vol. 17. N 1. P. 14–19.
13. Carrel A. Contributions to the study of the mechanism of the growth of connective tissue // J. Exp. Med. 1913. Vol. 18. N 3. P. 287–289.
14. Swim H.E., Parker R.F. Culture characteristics of human fibroblasts propagated serially // Amer. J. Hyg. 1957. Vol. 66. N 2. P. 235–243.
15. Hayflick L., Moorhead P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains // Exp. Cell Res. 1961. Vol. 25. N 3. P. 585–621.
16. Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains // Exp. Cell Res. 1965. Vol. 37. N 3. P. 614–636.
17. Rattan S.I.S. “Just a fellow who did his job...”, an interview with Leonard Hayflick // Biogerontology. 2000. Vol. 1. N 1. P. 79–87.
18. Оловников А.М. Принцип маргинотомии в матричном синтезе полинуклеотидов // Докл. АН СССР. 1971. Т. 201. № 6. С. 1496–1499.
19. 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.
20. Khokhlov A.N. Does aging need an own program or the existing development program is more than enough? // Russ. J. Gen. Chem. 2010. Vol. 80. N 7. P. 1507–1513.
21. 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.
22. Хохлов А.Н. Пролиферация и старение // Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР. Сер. Общие проблемы физико-химической биологии. Т. 9. М.: ВИНТИ, 1988. 176 с.
23. 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.
24. Khokhlov A.N. Stationary cell cultures as a tool for gerontological studies // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1992. Vol. 663. P. 475–476.
25. Khokhlov A.N. Cell proliferation restriction: is it the primary cause of aging? // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1998. Vol. 854. P. 519.
26. Akimov S.S., Khokhlov A.N. Study of “stationary phase aging” of cultured cells under various types of proliferation restriction // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1998. Vol. 854. P. 520.
27. Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer // Annu. Rev. Physiol. 2013. Vol. 75. P. 685–705.
28. 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.
29. 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.
30. Lawless C., Wang C., Jurk D., Merz A., von Zglinicki T., Passos J.F. Quantitative assessment of markers for cell senescence // Exp. Gerontol. 2010. Vol. 45. N 10. P. 772–778.
31. 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.
32. 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.
33. Krishna D.R., Sperker B., Fritz P., Klotz U. Does pH 6 beta-galactosidase activity indicate cell senescence? // Mech. Ageing Dev. 1999. Vol. 109. N 2. P. 113–123.
34. 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.
35. 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.
36. Untergasser G., Gander R., Rumpold H., Heinrich E., Plas E., Berger P. TGF-beta cytokines increase senescence-associated beta-galactosidase activity in human prostate basal cells by supporting differentiation processes, but not cellular senescence // Exp. Gerontol. 2003. Vol. 38. N 10. P. 1179–1188.
37. Kang H.T., Lee C.J., Seo E.J., Bahn Y.J., Kim H.J., Hwang E.S. Transition to an irreversible state of senescence in HeLa cells arrested by repression of HPV E6 and E7 genes // Mech. Ageing Dev. 2004. Vol. 125. N 1. P. 31–40.
38. Cristofalo V.J. SA beta Gal staining: biomarker or delusion // Exp. Gerontol. 2005. Vol. 40. N 10. P. 836–838.
39. 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.

EVOLUTION OF THE TERM “CELLULAR SENESCENCE” AND IMPACT OF THIS EVOLUTION ON THE CURRENT CYTOGERONTOLOGICAL RESEARCH

A.N. Khokhlov

The term “cellular senescence” (“cell senescence”) was put into circulation by Leonard Hayflick to describe the “age-related” changes in normal eukaryotic cells during aging in vitro, i.e., the exhaustion of their mitotic potential. In the “classic” version it was implied that the cells “grow old” with the help of some internal mechanism that leads to accumulation of various intracellular macromolecular defects (primarily — DNA damage). At present, as a rule, speaking of “cellular senescence” means accumulation/appearance in the cells (most often — transformed cells which do not demonstrate replicative senescence) of certain “biomarkers of aging” under the influence of various external factors (oxidative stress, H₂O₂, mitomycin C, ethanol, ionizing radiation, doxorubicin, etc.) that cause DNA damage. This phenomenon has been called DDR (DNA Damage Response). Among these biomarkers — senescence-associated beta-galactosidase activity, expression of p53 and p21 proteins, as well as of proteins involved in the regulation of inflammation like IL-6 or IL-8, activation of oncogenes, etc. Thus, “aging/senescence” of the cells does not occur by itself, but because of the impact of DNA-damaging agents. This approach, in my opinion, although is very important to define a strategy to fight cancer, but, yet again, takes us away from the study of the real mechanisms of aging. It should be emphasized that within the scope of “stationary phase aging” model developed in my lab, we also register the occurrence of certain biomarkers of aging in cultured cells, but in this case they arise due to the restriction of their proliferation by contact inhibition — a rather physiological impact, which in itself does not cause any damage to the cells (the situation is very similar to what we see in a whole multicellular organism).

Key words: *aging, program, biomarkers, cell proliferation, cellular senescence, senescence-associated beta-galactosidase, malignant transformation, DNA damage.*

Сведения об авторе

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