

БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

УДК 576.366:576.5:582.232

В. Л. Ушаков, М. В. Гусев, А. Н. Хохлов

ИМЕЕТ ЛИ СМЫСЛ ИЗУЧАТЬ МЕХАНИЗМЫ КЛЕТОЧНОГО СТАРЕНИЯ НА СИНЕ-ЗЕЛЕННЫХ ВОДОРОСЛЯХ? КРИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР. ЧАСТЬ I

Старение макроорганизма во многом определяется возрастными изменениями его клеток. Действительно, помимо самых общих соображений по этому поводу (см. например: Walton, 1982; Хохлов, 1988), можно говорить о накоплении разного рода повреждений и вообще об изменениях в клетках, особенно неделящихся, а также об их гибели с возрастом организма без замены вновь образующимися, в частности в некоторых областях головного мозга высших животных (Ванюшин, Бердышев, 1977). Если, однако, нас интересуют главным образом первичные процессы старения и если мы предполагаем, что по крайней мере некоторые из них происходят на клеточном (или субклеточном) уровне, то для выделения из всех возрастных изменений именно этих первичных процессов необходимо изучать не только, что происходит с клетками *in vivo* с увеличением возраста организма, но и какие изменения будут происходить в них со временем при возможно более полном устранении влияний со стороны всего остального организма. Это позволяют сделать опыты на культуре клеток. *In vitro* можно достичь не только изоляции клеток от остального организма, но и, в принципе, большей, чем в организме, однородности клеточной популяции (поскольку скорость роста клеток разных типов различна, через некоторое время практически вся культура состоит из клеток субпопуляции с максимальной скоростью роста).

Вследствие существующих среди специалистов разногласий по вопросам о том, что считать старением организма, клетки и т. п., необходимо кратко пояснить, какой смысл мы вкладываем в эти термины. Определений старения довольно много, хотя далеко не все из них противоречат друг другу (см. например: Стрелер, 1964; Комфорт, 1967). Когда говорят о старении вообще, обычно имеют в виду одряхление, изнашивание организма с возрастом, снижение его устойчивости к разным неблагоприятным воздействиям, т. е., выражаясь более строго, уменьшение его надежности, или, что то же самое, увеличение с возрастом вероятности смерти. Мы в настоящей статье будем придерживаться именно этого определения. Разумеется, поскольку на практике мы не можем определить вероятность смерти, а в состоянии вычислить только ее оценку — относительную частоту события, выявить феномен старения можно, строго говоря, только на популяционном уровне.

Условимся теперь, что мы будем в настоящем обзоре понимать под клеточным старением. Вообще, понятие смерти (или жизни), а значит, и понятие старения (поскольку последнее мы определяем через первое), применимо только к целому организму, но не к его части, и поэтому к клетке может относиться лишь тогда, когда мы рассматриваем ее как самостоятельный (одноклеточный) организм, а не как часть макроорганизма, и для обнаружения старения как явления в этом случае необходимо изучить временную динамику смертности в популяции клеток. Впрочем, возрастные изменения клеток макроорганизма часто весьма

сходны с изменениями, происходящими в одноклеточных организмах при старении. При этом надежность функционирования организма не может не зависеть от надежности функционирования его частей, поэтому те возрастные изменения клеточных популяций, которые снижают устойчивость макроорганизма и отвечают стрелеровским критериям процессов старения: универсальность, эндогенность, постепенность, разрушительность (Стрелер, 1964), вполне логично было бы назвать клеточным старением.

И еще одно замечание. Если у многоклеточных организмов, как правило, можно четко зафиксировать момент смерти конкретной особи (по крайней мере, промежутков времени, за который она умирает, во много раз меньше продолжительности жизни организма), то для отдельной клетки этот вопрос представляется нам практически неразрешимым. Время «умирания» клетки может быть очень велико (в сравнении со временем всей ее жизни), изменения же тех или иных ее показателей (способность к образованию колоний, окрашивание витальными красителями, интенсивность метаболизма, состояние определенных внутриклеточных структур и т. п.) еще не позволяют сделать вывод о переходе ее в ранг мертвых, хотя именно такие показатели обычно используют для оценки жизнеспособности «стареющих» клеток. Поэтому, на ваш взгляд, унификация представлений о сути клеточного старения необходима в еще большей степени, чем формирование единого мнения о старении многоклеточных организмов. Пока же эта унификация отсутствует, мы предлагаем называть старением клеток совокупность таких их изменений (на любом уровне) в определенных условиях, которые по направленности совпадают с соответствующими изменениями клеток стареющего многоклеточного организма. Именно в этом смысле термин «клеточное старение» будет употребляться в настоящем обзоре.

В связи со сказанным надо заметить, что прямой связи устойчивости организма с устойчивостью отдельных клеток нет: они могут быстро «выходить из строя» и погибать, но если оставшиеся клетки достаточно интенсивно делятся и заменяют погибшие, то клеточная популяция в целом может функционировать с той же степенью надежности, что и без повреждения клеток, поэтому жизнеспособность макроорганизма не изменится. Эта ситуация реально наблюдается в некоторых тканях высших животных. За счет постоянной смены клеток кишечный эпителий старых людей практически не отличается от такового молодых; кроветворная ткань мышей может при последовательных трансплантациях «переживать» донора, т. е. время существования серийно трансплантируемого потомства данных клеток (до прекращения пролиферации) может быть в несколько раз больше продолжительности жизни донора клеток (и вообще видовой продолжительности жизни подопытных животных). В клеточных же популяциях, представленных очень редко делящимися (гепатоциты) или совсем неспособными к делению (нейроны) клетками, связь между надежностью клетки и ткани (организма) более непосредственная, хотя и здесь она несколько стерта за счет все-таки существующей замены гепатоцитов или принятия на себя функций одного утраченного нейрона другими, относительно неповрежденными (за счет избыточности популяции данных клеток).

Поэтому следует подчеркнуть, что, говоря о возрастных изменениях клеток и о клеточном старении, мы имеем в виду усредненные изменения (оцениваемые, как правило, — в силу особенностей используемых методов — для всей изучаемой клеточной популяции). В любой клеточной популяции старого организма могут присутствовать клетки, не

несущие никаких возрастных повреждений, но вероятность наличия таких клеток уменьшается с возрастом организма. Повреждения накапливаются в клеточной популяции в целом, в «усредненной» клетке. Это замечание относится и к клеточным культурам, используемым в качестве моделей для изучения клеточного старения.

Итак, учитывая, что прежде всего нас интересуют изменения клеток при старении многоклеточного организма, мы будем называть клеточным старением изменения в клеточной популяции со временем, аналогичные таковым *in vivo* при старении организма, в то же время имея в виду, что клетки, рассматриваемые как организмы, также в принципе подвержены старению, но клеточная популяция как популяция организмов — это особая, самостоятельная система, о которой следует говорить отдельно.

Мы позволили себе здесь остановиться на терминологических вопросах для того, чтобы в условиях имеющейся в геронтологической литературе путаницы в терминах четко определить предмет настоящего обзора, пояснить, что именно мы здесь будем подразумевать под клеточным старением.

Вернемся теперь к изучению клеточного старения на культурах клеток, выделенных из макроорганизма. Существующие *in vivo* ситуации отражены и в выборе моделей, в качестве которых используются популяции как делящихся, так и неделящихся клеток.

Первая из этих моделей основана на так называемом «феномене Хейфлика», открытом Свимом и Паркером (Swim, Parker, 1957), а затем подробно изученном и использованном для исследования клеточного старения Леонардом Хейфликом (Hayflick, Moorhead, 1961; Hayflick, 1965). Феномен состоит в том, что культура нормальных диплоидных клеток млекопитающих может претерпеть в ходе своего роста даже в оптимальных условиях лишь вполне определенное, характерное для видовой и тканевой принадлежности клеток число удвоений клеточной популяции, после чего клетки становятся неспособными к делению и начинается деградация культуры. Эта модель достаточно полно охарактеризована ее автором в многочисленных работах (Hayflick, 1965, 1977, 1980 a, b, c). Мы лишь еще раз подчеркнем, что клеточное старение в данной модели регистрируется опять-таки на уровне клеточной популяции (некоторые клетки могут оставаться «молодыми» даже на последних пассажах, просто количество таких «молодых» клеток становится чрезвычайно мало) и что существенная характеристика модели — это уменьшение пролиферативной активности в ряду клеточных генераций. Важнейшим же доводом в пользу адекватности данной модели ее автор считает тот факт, что целый ряд цитофизиологических, структурных и биохимических изменений при «старении» культуры клеток идентичен таковому при старении *in vivo*, хотя полной аналогии нет (Schneider, Mitsui, 1976).

Другая возможная (и практически используемая) модель для изучения клеточного старения — так называемая модель «стационарного старения», подробно рассмотренная в ранее опубликованном обзоре (Хохлов, 1988). Эта модель основана на концепции взаимосвязи клеточного старения с пролиферативной активностью клеток (Walton, 1982; Хохлов, 1983, 1988), на которой мы здесь остановимся лишь кратко.

Во всех клетках в течение жизни накапливаются какие-то повреждения (распространено мнение, согласно которому основная роль в клеточном старении принадлежит повреждениям ДНК генома (Gensler, Bernstein, 1981), однако на конкретных механизмах повреждений на

молекулярном уровне мы сейчас не останавливаемся). Это происходит потому, что системы защиты от повреждающих воздействий (Кольтовер, 1983), как и системы репарации (Виленик, Хохлов, 1976), несовершенны, т. е. не могут предотвратить или устранить все повреждения. Определенная доля повреждающих факторов в связи с этим «ускользает» от защитных систем, а часть повреждений — от систем репарации (даже при отсутствии повреждений, для которых нет соответствующего механизма репарации).

Поэтому для предотвращения клеточного старения в клеточной популяции должны заменяться сами клетки. Если эта замена происходит достаточно быстро, чтобы относительное количество клеток, несущих повреждения, не возрастало, популяция будет оставаться неизменной и клеточного старения (на уровне всей клеточной популяции!) происходить не будет. Это свойственно, например, линиям трансформированных клеток, которые остаются неизменными в течение периода, во много раз превышающего время существования макроорганизма — донора клеток, а также штаммам некоторых одноклеточных (как прокариот, так и эукариот, например бактерий, микоплазм, некоторых простейших), способных (в благоприятных для роста условиях) сколь угодно долго существовать, не претерпевая полового процесса. Известным примером служит примитивное многоклеточное животное — пресноводная гидра, которое может в оптимальных для роста и замены клеток условиях жить неограниченно долго (Бриан, 1968).

При субоптимальной скорости смены клеточных поколений в клеточной популяции (ткани) будут, хотя и медленно, накапливаться повреждения, и клеточное старение будет иметь место, хотя скорость его может быть очень небольшой. Примерами здесь могут служить упоминавшиеся популяции эпителиальных (незрелых) и кроветворных клеток млекопитающих. В постмитотических клетках накопление повреждений происходит еще быстрее, и скорость их «старения» сравнима со скоростью старения макроорганизма (по некоторым гипотезам, прямо ее определяет) (Gensler, Bernstein, 1981). Отсутствие или недостаточная скорость замены поврежденных или погибших клеток могут *per se* быть причиной старения макроорганизма. Однако, согласно нашим представлениям, замедление клеточной пролиферации лишь создает условия для накопления в клетках повреждений, которые в свою очередь приводят к старению.

Если придерживаться этой гипотезы, наиболее адекватной (и позволяющей изучить механизмы старения макроорганизма) моделью для изучения клеточного старения будет непересеваемая культура клеток, в которой по мере замедления пролиферации и в ходе последующего пребывания клеток в стационарной фазе роста должны накапливаться повреждения, аналогично тому, как это происходит в макроорганизме. Необходимо пояснить, что культура может переходить в стационарную фазу как за счет контактного торможения, так и при удалении из среды тех или иных питательных веществ или ростовых факторов (Епифанова и др., 1983). В настоящее время неясно, в каком из случаев модель будет более адекватна ситуации *in vivo*.

Целый ряд данных свидетельствует о том, что в стационарных культурах действительно идет накопление повреждений, сходное с таковым при старении «по Хейфлику» или *in vivo* (Хохлов, 1988). Следует отметить, что в этом случае с увеличением «возраста» культуры также снижается потенциальная (т. е. наблюдаемая при пересеве в стимулирующие рост условия) пролиферативная активность клеток (Хохлов и др., 1987).

Все сказанное о несовершенстве защиты от повреждений, а также о накоплении повреждений в клетках как причине клеточного старения у многоклеточных организмов можно с тем же успехом отнести к любой клеточной популяции, в том числе к культуре одноклеточных организмов (как прокариот, так и эукариот). Принципиально строение клетки и устройство репаративных систем у них такое же, как у высших эукариот, и они также могут выживать (но как вид или популяция, а не как особь) с помощью достаточно быстрой замены клеток (т. е. в данном случае индивидуальных организмов) или (что мы здесь не рассматриваем) с помощью полового процесса (подробно об этом см.: Хохлов, 1988). Следовательно, вполне можно изучать клеточное старение и на культурах одноклеточных организмов.

Более того, такая модель имеет и определенные преимущества. Действительно, в клетках, выделенных из многоклеточного организма, многие процессы остаются направленными на выполнение их «многоклеточных» функций (так, фибробласты в культуре синтезируют и выделяют в среду коллаген). Эти клетки уже приспособлены к жизни в организме, поэтому в культуре у них проявляются многие черты, усложняющие картину их роста и возрастных изменений «в чистом виде». Естественно, в культуре одноклеточных организмов такого «шума» гораздо меньше. Как справедливо отмечает Ауфдерхайде (Aufderheide, 1984), исследования на культуре одноклеточных — это фактически исследования *in vivo*, а не *in vitro*.

Правда, если нас интересует именно старение многоклеточных, возникает трудность экстраполяции данных на таксономически весьма удаленные организмы. Но если считать старение общебиологическим феноменом с едиными в принципе механизмами у всех живых существ, то этот недостаток оборачивается преимуществом: сравнение одного и того же процесса у таксономически удаленных групп позволят выявить существенные черты именно самого процесса. Не касаясь в настоящей работе этого принципиального вопроса, отметим следующий довод в пользу изучения старения на одноклеточных: описанные к настоящему времени процессы, происходящие при старении культур одноклеточных, если даже не гомологичны, то по крайней мере аналогичны происходящим при клеточном старении многоклеточных (Хохлов, 1988).

Для одноклеточных организмов описаны варианты старения, соответствующие как старению «по Хейфлику», так и «стационарному старению» эукариотических клеток (Smith-Sonneborn, 1985). Со старением «по Хейфлику» сходны изменения одноклеточных организмов с увеличением возраста клона. Наиболее подробно изучено это, так называемое клональное, старение у инфузорий (Smith-Sonneborn, 1981, 1985). Показано, что в отсутствие полового процесса (в том числе и аутогамии) продолжительность жизни клона (потомки одной парамедии) ограничена определенным числом клеточных делений. При этом в ряду поколений уменьшается устойчивость клеток к разным внешним воздействиям, как и при старении «по Хейфлику» клеток многоклеточных. К концу жизни клона уменьшается и жизнеспособность потомства в случае оплодотворения (процесс, аналогичный снижению жизнеспособности оплодотворенных яйцеклеток при старении многоклеточных). Описано также старение клона прокариотических организмов — бактерии *Escherichia coli*, которое Генслер и Бернштейн (Gensler, Bernstein, 1981) считают аналогом клонального старения инфузорий.

Хотя данных о «стационарном старении» у одноклеточных в литературе немного, можно указать на ряд работ, посвященных изучению этого процесса в культурах прокариотических клеток. В частности, изу-

чены «возрастные» изменения клеток микоплазмы *Acholeplasma laidlawii* в стационарной культуре (Капитанов, 1986; Капитанов и др., 1985, 1986). При достижении культурой определенной плотности клетки перестают размножаться, и в них происходят некоторые изменения, аналогичные таковым при клеточном старении многоклеточных (уменьшение эффективности клонирования приблизительно «по Гомпертцу», накопление повреждений в ДНК). Надо отметить, что сведений о репликативном старении и половом процессе микоплазмы нет, поэтому моделирование клеточного старения с использованием культуры микоплазмы фактически проводится всегда в рамках модели «стационарного старения», если даже авторы не употребляют этот термин.

Изменения радиочувствительности со временем, которые претерпевают клетки. *E. coli* и *Mycoplasma radiodurans* в стационарной фазе роста (т. е. в процессе «стационарного старения»), сходны с возрастными изменениями клеток многоклеточных животных *in vivo* (Виленик, 1970). Описаны и изменения эффективности клонирования при «стационарном старении» штамма бактерий (Chou, Tan, 1990).

Нам представляется важным упомянуть также о том, что идея использования культур одноклеточных в модели «стационарного старения» тесно связана с некоторыми ранними представлениями о механизмах старения, согласно которым его появление в ходе филогенеза многоклеточных явилось результатом приобретения строго ограниченных размеров тела, возникновения механизмов, ограничивающих рост, а значит, и скорость клеточной пролиферации (см. обзор: Комфорт, 1967). Действительно, в природе популяции размножающихся вегетативно одноклеточных организмов (но не сами эти организмы) могут не претерпевать старения и существовать неограниченно долго, если достаточны скорости поступления питательных веществ и удаления метаболитов и если за счет расселения или гибели части клеток от случайных причин плотность популяции не достигает критических величин, при которых вступают в действие описанные и для одноклеточных (Конев, Мажуль, 1977) механизмы контактного торможения пролиферации. Если, однако, искусственно создать условия, в которых такие клетки получают необходимые им питательные вещества, но ограничены в своем размножении фиксированным жизненным пространством, пролиферация прекращается (по достижении определенной плотности клеток) и в клеточной популяции развивается процесс клеточного старения. Подчеркнем, что замедление замены клеток достигается здесь в условиях, оптимальных для их метаболизма. Интересно отметить, что и в макроорганизме признаки старения проявляются только по достижении определенного возраста, что возможно лишь в относительно благоприятных условиях существования.

Сказанное выше о моделировании клеточного старения на микоплазме и бактериях подводит нас к вопросу об изучении клеточного старения на прокариотах вообще. Их при принципиально том же, что и у эукариот, клеточном строении отличает значительная простота организации: нет оформленных клеточных органелл и кластеризации клетки, отсутствует ядро и упрощена структура генома, который расположен в одной «хромосоме», содержащей только один репликон. Если говорить о моделировании какого бы то ни было процесса, то всегда предпочтительнее более просто организованная модель. Здесь, правда, можно возразить, что, хотя прокариотические клетки лишены многих частных черт, дающих определенный «шум» при использовании более сложных эукариотических клеток, у них есть свои характерные особенности, из-за которых возникает риск углубиться вместо сути изучаемого

процесса в эти самые особенности. Но, как отмечалось выше, у этого вопроса есть и другая сторона. Именно филогенетическая удаленность клеток прокариот от обычно используемых в такого рода исследованиях клеток высших животных может в данном случае оказаться полезной.

Этому аспекту выбора модели клеточного старения до сих пор уделялось меньше внимания. Механизмы старения, вообще говоря, эволюционируют. Для них это характерно в меньшей степени, чем для большинства процессов в организме, так как механизмы старения, как правило, не могут подвергаться прямому действию естественного отбора: в природных популяциях особь обычно погибает до проявления первых возрастных изменений, обусловленных старением (Kirkwood, 1988); тем не менее, поскольку механизмы старения, очевидно, следствие многих других процессов, вторично, вместе с этими последними, они изменяются, усложняются, так что чем «старше» филогенетически организм, тем труднее отделить закономерные, необходимые черты процесса его старения от случайных. В то же время для понимания старения важно изучить эволюционное изменение самих его механизмов. Именно поэтому сравнение механизмов, определяющих клеточное старение, у организмов, эволюция которых шла различными путями, может оказаться весьма полезным.

Еще раз подчеркнем, что мы не рассматриваем вопрос о том, существует ли истинное старение у одноклеточных организмов и что считать таковым. Мы говорим лишь о тех процессах повреждения, которые (при определенных условиях) протекают в культуре одноклеточных и аналогичны процессам, происходящим при старении макроорганизма в его клетках (и предположительно являющимся там механизмами старения). Поскольку эти процессы обусловлены, разумеется, некоторыми наследственно закрепленными свойствами клеток, то в той мере, в какой сходство в данном случае позволяет предполагать гомологию, мы и считаем возможным говорить об эволюции этих свойств клеток и, следовательно, определяемых ими механизмов клеточного старения.

Все сказанное о прокариотах относится и к такому их типу, как цианобактерии (сине-зеленые водоросли). Это типичные прокариоты, причем как тип — одни из наиболее примитивных организмов на Земле (что дает дополнительные преимущества с точки зрения изучения эволюции клеточного старения). Полагают, что именно у них впервые возникло фотоавтотрофное питание с использованием воды в качестве донора водорода и выделением кислорода (как у высших растений), и изначально они создали кислородосодержащую атмосферу современного типа (Fogg et al., 1973; Гусев, Никитина, 1979). Таким образом, и по типу питания они наравне с другими фототрофами значительно удалены от многоклеточных животных. Чистые культуры цианобактерий выращивают на синтетических минеральных средах (так, например, в среде Кратца и Майерса единственный органический компонент — цитрат), условия их роста легко контролируются. Кроме этого, цианобактерии в отличие от большинства других прокариот довольно крупны, и культуру их можно наблюдать (и вести подсчет клеток) в световом микроскопе. Цианобактерии достаточно хорошо изучены и подробно описаны, хотя для исследования клеточного старения почти не использовались.

Прежде чем более подробно остановиться на тех особенностях цианобактерий, которые дают преимущества для изучения клеточного старения на их культурах, необходимо подчеркнуть, что и у цианобактерий (как у микоплазмы) не выявлено никаких аналогов клонального

(репликативного) старения. Поэтому использовать их в интересующем нас аспекте можно только в рамках модели «стационарного старения».

Таким образом, поскольку следует ожидать, что в стационарной культуре цианобактерий происходят те же процессы, что и в такой же культуре других изученных в этом отношении клеток, сходные с возрастными изменениями клеток многоклеточного организма, особенно не делящихся, *in vivo*, непересеваемая культура этих организмов может, по-видимому, стать перспективной моделью для изучения общих механизмов клеточного старения.

Рассмотрим кратко с этой точки зрения некоторые особенности биологии цианобактерий.

Цианобактерии как типичные прокариоты не имеют ни ядра, ни характерных для эукариот цитоплазматических органелл. В то же время, будучи фототрофами, они обладают системой фотосинтетических (тилакоидных) мембран, на которых расположены пигменты системы фотосинтеза. Однако замкнутых мембранных органелл в их клетках нет и компарментализация цитоплазмы отсутствует. Клетки цианобактерий окружены клеточной стенкой, по строению которой они близки к грамотрицательным бактериям (Fogg et al., 1973). Существуют не только собственно одноклеточные, но и нитчатые и колониальные формы цианобактерий (на этой особенности мы остановимся ниже).

Цианобактерии (несмотря на большое разнообразие их форм), как следует из палеонтологических данных, — организмы весьма примитивные, сформировавшиеся как тип еще в прекембрии (Fogg et al., 1973). Для многих их видов характерна реликтовость, архаичность, обусловленная, как предполагают (Шестаков, 1974), высокой генетической стабильностью цианобактерий, низкой частотой возникающих у них спонтанных мутаций и, соответственно, относительно малой скоростью эволюции этих организмов. Поэтому если старение — действительно феномен общебиологический, т. е. предпосылки его определяются общими, исходными чертами живых организмов, то у цианобактерий можно рассчитывать обнаружить его механизмы в первичном (филогенетически) виде. Поэтому особенно интересно будет сравнить клеточное старение в их культурах и в культурах клеток филогенетически молодых высших животных (на которых главным образом изучали до сих пор механизмы старения). Специфические же черты цианобактерий как представителей альтернативного пути эволюции в еще большей степени удаляют их от клеток животных. Поэтому весьма велика вероятность того, что те черты сходства, которые удастся обнаружить у цианобактерий и животных, — черты общебиологические.

Как уже сказано, характерная особенность цианобактерий — это наличие среди них как собственно одноклеточных, так и нитчатых или колониальных форм (Fogg et al., 1973). У нитчатых и колониальных цианобактерий описана дифференцировка клеток (Fogg et al., 1973; Гусев, Никитина, 1979). Впрочем, по крайней мере у некоторых нитчатых форм лишь образование гетероцист можно считать истинной терминальной дифференцировкой в том смысле, в каком этот термин применяется к эукариотическим клеткам. Действительно, все остальные клетки способны к делению и полипотентны (Кондратьева, 1989), число и расположение дифференцированных клеток (в том числе гетероцист) в нити жестко не задано (Fogg et al., 1973), у ряда гормогониевых в определенных условиях роста такие клетки вообще не образуются (Корженевская, Гусев, 1976). Поэтому, как мы полагаем, «многоклеточность» цианобактерий не есть истинная многоклеточность; это

многоклеточность примитивная, зачаточная и должна рассматриваться скорее как колониальность.

При изучении старения такая «многоклеточность» дает свои преимущества. Действительно, клеточное старение многоклеточных и одноклеточных рассматривается параллельно, но результаты обычно трудно сопоставить из-за больших различий, не связанных с многоклеточностью и одноклеточностью как таковыми, а обусловленных просто таксономической удаленностью организмов друг от друга. В данном же случае (хотя, повторим, речь идет скорее не об истинной многоклеточности, а об организме колониальном) можно сопоставить результаты, полученные на таксономически близких организмах, состоящих из одной или нескольких сходных по строению и функциям клеток. Это уникальная группа организмов, использование которой позволяет совместить в одной модели прокариотический тип организации и, пусть примитивную, многоклеточность.

Идентичность же (в ряде случаев) клеток внутри нити представляет собой еще один важный для изучения клеточного старения аспект. Нитчатые формы цианобактерий, в силу отмеченных выше особенностей, могут в некоторых отношениях выступать не только как единые организмы, но и как организмы, состоящие из некоторого количества идентичных элементов. Они, таким образом, служат реальным воплощением часто встречающейся в литературе абстрактной модели, рассматривающей весь организм либо его «критическую ткань» как совокупность некоторого конечного количества идентичных элементов, «которые соединены параллельно в смысле теории надежности» (Гаврилов и др., 1978). Поэтому эксперименты на цианобактериях позволяют более строго проверить выводы, полученные с помощью таких абстрактных моделей, и при сравнении с результатами опытов на других объектах оценить правомерность допущенной модели.

Большую важность имеет также фототрофный (особенно фотоавтотрофный) тип питания цианобактерий. Уже достаточно давно исследователи обратили внимание на преимущества фотоавтотрофных организмов как модельных объектов для изучения эндогенных, внутренних, процессов в клетках, поскольку такой образ жизни обеспечивает организму максимально возможную независимость от внешней среды (Stanier, 1973). Авторы уже первых работ, рассматривавших цианобактерии как объект для изучения клеточных механизмов старения, подчеркивали важность этого свойства (Никитина, Гусев, 1976). Действительно, в том случае, когда культура клеток требует для своего роста определенного набора органических веществ (например, пищевых факторов и/или факторов роста), это увеличивает число нуждающихся в учете средовых параметров и затрудняет стандартизацию условий. Среды, в которых обычно выращивают цианобактерии, — простые минеральные среды — этих недостатков лишены. Отсутствие потребности в экзогенных ростовых факторах снимает многие трудности в интерпретации результатов, полученных на модели «стационарного старения» цианобактерий.

Многочисленные сведения подтверждают относительно высокую независимость характеристик, в том числе ростовых, культуры цианобактерий от условий среды. Так, Фогг с соавторами (Fogg et al., 1973) отмечают, что, хотя универсальную среду, которая была бы оптимальной для всех цианобактерий, создать вряд ли возможно, многие из них очень хорошо переносят значительные изменения в составе среды. Если разработана среда, оптимальная для роста данного штамма цианобактерий, часто оказывается, что на характеристики роста мало влияет

значительное изменение концентрации ряда компонентов (Федоров, Максимов, 1969). При росте культуры среда, по-видимому, не истощается вплоть до отмирания культуры (Гусев и др., 1964), которое наступает, как полагают, по другим причинам. Правда, цианобактерии очень чувствительны к концентрации в среде кислорода — своего основного метаболита — и к освещению (Гусев, Никитина, 1979). С другой стороны, многие цианобактерии можно, добавив в среду роста некоторые органические вещества (глюкоза, аминокислоты, ацетат, этанол), перевести с характерного для них фотоавто- на фотогетеротрофный тип питания (точнее, на смешанный авто- и гетеротрофный), при этом интенсивность роста культуры увеличивается (Гусев, 1962; Шапошников, Гусев, 1964; Гусев, Никитина, 1979). Следовательно, культура цианобактерий сочетает в себе относительную нечувствительность к составу среды и возможность легко управлять интенсивностью роста, метаболизма и типом обмена.

Определенные трудности в интерпретации результатов, полученных на стационарной культуре цианобактерий, представляет тот факт, что причины остановки роста и вступления непересеваемой культуры в стационарную фазу в данном случае достоверно не известны (этот вопрос дискутируется в литературе), тогда как считается, что у «обычных» модельных объектов (клеток многоклеточных эукариот) эта причина — контактное торможение роста. Поскольку контактное торможение описано у самых различных клеток, в том числе прокариотических (Конев, Мажуль, 1977), можно полагать, что оно имеет место и у цианобактерий, но, очевидно, вопрос о том, в какой мере это явление служит механизмом остановки роста их популяции, требует отдельного изучения.

Другая полезная в плане изучения клеточного старения особенность цианобактерий — это своеобразие их чувствительности к различным повреждающим факторам. Распространена точка зрения, согласно которой первичные повреждения клеток, накопление которых лежит в основе старения, — это неферментативное окисление по свободнорадикальному механизму (так называемая свободнорадикальная гипотеза Хармана (Harman, 1981)). Важнейшим же субстратом повреждений скорее всего является ДНК генома клетки (Gensler, Bernstein, 1981). В связи с этим представляют интерес характеристики чувствительности цианобактерий к кислороду, ионизирующему излучению, ультрафиолетовому свету и химическим мутагенам. Показано, что к кислороду атмосферы (повреждающее действие которого, как известно, опосредовано теми же свободнорадикальными механизмами, что и действие ионизирующей радиации) цианобактерии очень чувствительны: их рост задерживается, и они быстро погибают на свету в отсутствие свободного газообмена, когда выделяемый клетками молекулярный кислород накапливается в среде (Гусев, 1962). Здесь, однако, помимо «обычных» (встречающихся у гетеротрофов) механизмов окисления, имеет место и так называемое фотодинамическое действие (Гусев, Никитина, 1979), которое тоже включает в себя свободнорадикальные механизмы и является побочной реакцией взаимодействия света с хлорофиллом и другими пигментами, переходящими в возбужденное состояние при поглощении энергии видимого света (Смит, Хэнеуолт, 1972). Чувствительность же цианобактерий как типа в среднем к ионизирующей радиации, действие которой не связано с фотоокислением, очень невелика (хотя существуют значительные межвидовые различия). Имеются сообщения о выживании цианобактерий в местах испытания ядерного оружия (Kraus, 1969) и в первичном контуре ядерного реактора (Hortobagii, Vigassy, 1967). Анализ кривых дозовой зависи-

мости цианобактерий при γ -облучении позволил сделать вывод о том, что цианобактерии, — вероятно, наиболее радиоустойчивые из известных организмов (Klaus, 1969). Наличие большого плеча на кривой зависимости выживания от дозы облучения указывает на связь такой высокой радиоустойчивости с большой репаративной способностью, но Д. М. Гродзинский (1983), комментируя это, отмечает, что «рекордная устойчивость сине-зеленых водорослей может достигаться каким-либо иным путем, а не только наличием мощных систем репарации ДНК». С. В. Шестаков с соавторами (Шестаков и др., 1971; Шестаков, 1974) отмечают необычно высокую устойчивость *Anacystis nidulans* и *Synechocystis aquatilis* (при сравнении с бактериями) к мутагенному и летальному действию ультрафиолетовых и рентгеновских лучей. Так же низка и чувствительность к действию ряда алкилирующих агентов (диэтилсульфату, метилметансульфонату), аналогам азотистых оснований, входящих в состав ДНК. Однако выраженное токсическое (летальное) и мутагенное действие на цианобактерии оказывали нитрозоалкилмочевины, нитрозогуанидин, гидроксиламин (Шестаков и др., 1971; Шестаков, 1974).

К настоящему времени в геронтологической литературе уже сформулирован ряд более или менее обоснованных предположений о тех конкретных повреждениях, накопление которых в клетке лежит в основе «нормального» старения организма (и клеточного старения). Это, например, дефекты ДНК, свободнорадикальные повреждения мембран, нарушения синтеза макромолекул и т. д. (Ванюшин, Бердышев, 1977; Gensler, Bernstein, 1981; Никитин, Бердышев, 1982). В то же время названные выше агенты вызывают в клетках, по-видимому, те же повреждения (Комфорт, 1967; Miquel et al., 1975; Gensler, Bernstein, 1981; Потапенко, 1984; Кутлахмедов, 1986). Известно также, что эти агенты ускоряют в культурах клеток «возрастные» изменения способности к пролиферации, характерные для клеточного старения (Macieira-Coelho et al., 1972, 1977; Ban et al., 1980; Honda, Matsuo, 1983; Хохлов и др., 1985). Поэтому с точки зрения сравнительного изучения клеточного старения важным представляется тот факт, что спектр чувствительности цианобактерий к этим повреждающим воздействиям отличается как от спектра чувствительности к этим агентам ближайших к цианобактериям прокариот, так и от спектра чувствительности эукариот. Поскольку интенсивность этих воздействий поддается искусственному изменению в эксперименте, что и используется при изучении клеточных механизмов старения, то для изучения этих механизмов, очевидно, было бы полезно сравнить действие геропротекторов и геропромоторов (факторов, замедляющих и, соответственно, ускоряющих старение *in vivo*) на клеточное старение у цианобактерий и у эукариот.

Таким образом, рассмотрев существующие модели клеточного старения и особенности биологии и культивирования цианобактерий, мы считаем возможным предположить, что благодаря особенностям своего филогенетического положения, фототрофному типу питания, наличию таксономически близких одноклеточных и колониальных форм, особенностям чувствительности к условиям культивирования и к повреждающим внешним воздействиям цианобактерии могут оказаться подходящим объектом для использования их культур в модели «стационарного старения». При этом цианобактерии имеют, по-видимому, определенные преимущества перед другими используемыми в рамках данной модели объектами. В следующей части обзора будут рассмотрены с этой точки зрения имеющиеся в литературе сведения об изменениях непересеваемых культур цианобактерий со временем.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бриан П. 1968. Бластогенез и гаметогенез // Происхождение и развитие половых клеток в онтогенезе позвоночных и некоторых групп беспозвоночных. Л. С. 17—74.
- Ванюшин Б. Ф., Бердышев Г. Д. 1977. Молекулярно-генетические механизмы старения. М. Виленчик М. М. 1970. Изменение чувствительности бактериальных клеток к ультрафиолетовому и γ -излучению в процессе их старения // Радиобиология. 10. № 3. 450—452.
- Виленчик М. М., Хохлов А. Г. 1976. О механизмах регуляции системы репарации ДНК в клетках // Влияние радиации на регуляторные процессы в клетке. Тез. докл. Всесоюз. симп. (Пушино, 25—28 мая 1976 г.). Пушино. С. 58—59.
- Гаврилов Л. А., Гаврилова Н. С., Ягужинский Л. С. 1978. Основные закономерности старения и гибели животных с точки зрения теории надежности // Журн. общ. биол. 39. № 5. 734—742.
- Гродзинский Д. М. 1983. Надежность растительных систем. Киев. Гусев М. В. 1962. К вопросу о получении максимальных урожаев сине-зеленой водоросли *Anabaena variabilis* в лабораторных культурах // Бюл. МОИП. Отд. биол. 67. № 3. 150.
- Гусев М. В., Никитина К. А. 1979. Цианобактерии (физиология и метаболизм). М. Гусев М. В., Телитченко М. М., Федоров В. Д. 1964. Принципы выделения, очистки и культивирования сине-зеленых водорослей // Биология сине-зеленых водорослей. М. С. 55—65.
- Епифанова О. И., Терских В. В., Полуновский В. А. 1983. Покоящиеся клетки. Свойства и функции в организме. М. Капитанов А. Б. 1986. Микоплазма как объект для изучения клеточного старения // Надежность и элементарные события процессов старения биологических объектов. Киев. С. 167—176.
- Капитанов А. Б., Аксенов М. Ю., Иванова В. Ф., Ладыгина В. Г., Муханкин А. И. 1986. Старение культуры клеток микоплазмы // Разл. аспекты анал. биол. систем. Докл. МОИП. Общ. биол. М. С. 70—72.
- Капитанов А. Б., Аксенов М. Ю., Татищев О. С., Кольтовер В. К. 1985. Культура клеток *Acholeplasma laidlawii* как объект для изучения возрастных изменений биологических мембран // Докл. АН СССР. 281. № 1. 186—189.
- Кольтовер В. К. 1983. Теория надежности, суперокисные радикалы и старение // Усп. совр. биологии. 96. № 1. 85—100.
- Комфорт А. 1967. Биология старения. М. Кондратьева Н. В. 1989. Морфология популяций прокариотических водорослей. Киев. Конев С. В., Мажуль В. М. 1977. Межклеточные контакты. Минск. Корженевская Т. Г., Гусев М. В. 1976. Метаболизм и деструкция сине-зеленых водорослей *Anabaena variabilis* в темноте // Микробиология. 45. № 5. 795—799.
- Кутлахмедов Ю. А. 1986. Сходство и различие радиационного поражения и процессов старения клеточных систем // Надежность и элементарные события процессов старения биологических объектов. Киев. С. 52—61.
- Никитин В. Н., Бердышев Г. Д. 1982. Возрастные изменения структуры генетического аппарата клеток // Биология старения. Л. С. 175—194.
- Никитина К. А., Гусев М. В. 1976. Некоторые особенности различных стадий развития сине-зеленых водорослей *Anacystis nidulans* (*Synechococcus*) // Микробиология. 45. № 3. 490—496.
- Потапенко А. И. 1984. Радиационно индуцированное укорочение продолжительности жизни и естественное старение *Drosophila melanogaster*: Автореф. канд. дисс. Пушино. Смит К., Хэнеуолт Ф. 1972. Молекулярная фотобиология. Процессы инактивации и восстановления. М. Стрелер Б. 1964. Время, клетки и старение. М. Федоров В. Д., Максимов В. Н. 1969. Выбор оптимального состава среды для сине-зеленой водоросли *Anacystis nidulans* с помощью методов математического планирования экспериментов // Биология сине-зеленых водорослей. II. М. С. 46—65.
- Хохлов А. Н. 1983. Ограничение пролиферации как возможная причина накопления повреждений при старении // Исслед. первич. механизмов старения биол. систем. Докл. МОИП. Общ. биол. М. С. 60—63.
- Хохлов А. Н. 1988. Пролиферация и старение. Общие проблемы физико-химической биологии // Итоги науки и техники. Т. 9. М. Хохлов А. Н., Головина М. Э., Чиркова Е. Ю., Наджарян Т. Л., 1985. Анализ некоторых кинетических закономерностей роста культивируемых клеток. II. Действие ионизирующей радиации, алкилирующего агента, низкочастотного электромагнитного поля // Цитология. 27. № 9. 1070—1075.
- Хохлов А. Н., Головина М. Э., Чиркова Е. Ю., Наджарян Т. Л. 1987. Анализ некоторых кинетических закономерностей роста культивируемых клеток. III. Влияние плотности посева, геропротектора-антиоксиданта, «стационарного старения» // Цитология. 29. № 3. 353—357.
- Шапошников В. Н., Гусев М. В. 1964. Роль кислорода в жизнедеятельности некоторых сине-зеленых водорослей // Биология сине-зеленых водорослей. М. С. 119—140.
- Шестаков С. В. 1974. Мутационная изменчивость сине-зеленых водорослей // Актуальные проблемы биологии сине-зеленых водорослей. М. С. 18—37.
- Шестаков С. В., Божукова Е. Е., Жевнер В. Д. 1971. Действие некоторых химических мутагенов на сине-зеленую водоросль *Anacystis nidulans* // Теория химического мутагенеза. М. С. 75—81.
- Aufderheide K. J. 1984. Cellular aging: an overview // Cellular ageing. Basel. P. 2—8.
- Van S., Nikaido O., Sugahara T. 1980. Acute and late effects of a single exposure of ionizing radiation on cultured human diploid cell populations // Rad. Res. 81, N 1. 120—130.
- Chou F. I., Tan S. T. 1990. Manganese (II) induces cell

division and increases in superoxide dismutase and catalase activities in an aging deino-
coccal culture // J. Bacteriol. 172, N 4. 2029—2935. Fogg G. E., Stewart W. D. P.,
Fay P., Walsby A. E. 1973. The blue-green algae. London; New York. Gens-
ler H. L., Bernstein H. 1981. DNA damage as the primary cause of aging // Quart.
Rev. Biol. 56, N 3. 279—303. Harman D. 1981. The aging process // Proc. Nat. Acad.
Sci. USA. 78, N 11. 7124—7128. Hayflick L. 1965. The limited in vitro lifetime of
human diploid cell strains // Exp. Cell Res. 37, N 3. 614—636. Hayflick L. 1977. The
cellular basis for biological aging // Handbook of the biology of aging. New York.
P. 159—186. Hayflick L. 1980a. Origins of aging // Env. Physiol.: Aging, Heat and
Altitude. Proc. Life, and Altitude Conf., Las Vegas, Nev., May 15—17, 1979. New York
et al. P. 399—414. Hayflick L. 1980b. Cell aging // Annual review of gerontology and
geriatrics. Vol. 1. New York et al. P. 26—67. Hayflick L. 1980c. Recent advances in
the cell biology of aging // Mech. Ageing and Dev. 14, N 1—2. 59—79. Hayflick L.,
Moorhead P. S. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains // Exp. Cell
Res. 25, N 3. 585—621. Honda S., Matsuo M. 1983. Shortening of the in vitro
lifespan on human diploid fibroblasts exposed to hyperbaric oxygen // Exp. Gerontol. 18,
N 5. 339—345. Hortobagii T., Vigassy J. 1967. Microorganisms in the water
circuits exposed to radiation of the nuclear reactor Budapest—Csilleberc // Acta Biol.
Acad. Sci. Hung. 18, N 2. 151—160. Kirkwood T. B. L. 1988. The nature and causes
of ageing // Ciba Found. Symp. 134. 193—207. Kraus M. P. 1969. Resistance of blue-
green algae to ^{60}Co gamma radiation // Env. Exp. Bot. 9, N 6. 481—489. Macieira-
Coelho A., Diatloff C., Billardon C., Bourgeois C. A., Malaise E.
1977. Effect of low dose rate ionizing radiation on division potential of cells in vitro.
3. Human lung fibroblasts // Exp. Cell Res. 104, N 1. 215—221. Macieira-Coel-
ho A., Lima L., Malaise E. 1972. Acceleration of aging in vitro by ionizing radia-
tion // Z. Alternsforsch. 27, N 43. Miquel J., Lundgren P. R., Bensch K. G.
1975. Effects of oxygen-nitrogen (1:1) at 760 torr on the life span and fine structure
of *Drosophila melanogaster* // Mech. Ageing Dev. 4, N 1. 41—57. Schneider E. L.,
Mitsui Y. 1976. The relationship between in vitro cellular ageing and in vivo human
age // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 73, N 10. 3584—3588. Smith-Sonneborn J.
1981. Genetics and aging in Protozoa // International review of cytology. Vol. 73. New
York et al. P. 319—354. Smith-Sonneborn J. 1985. Aging in Protozoa // Review
of Biological Research in Aging. Vol. 2. New York. P. 13—27. Stanier R. Y. 1973.
Autotrophy and heterotrophy in unicellular blue-green algae // The biology of blue-green
algae (Botanical monographs. Vol. 9). Berkeley; Los Angeles. P. 501—518. Swim H. E.,
Parker R. F. 1957. Culture characteristics of human fibroblasts propagated serially //
Amer. J. Hyg. 66, N 1. 235—243. Walton J. 1982. The role of limited cell replicative
capacity in pathological age change. A review // Mech. Ageing and Dev. 19, N 3.
217—244.

V. L. Ushakov, M. V. Gusev, A. N. Khokhlov

IS IT WORTH TO STUDY MECHANISMS OF THE CELLULAR AGEING IN EXPERIMENTS WITH THE BLUE-GREEN ALGAE? A CRITICAL REVIEW.

PART 1

After short discussion of the definition of the «ageing» term the one for the
«cellular ageing» with special emphasis on the models for studying the process in
Metazoa is proposed. The in vitro models currently used in cellular ageing researches
are briefly reviewed and the advantages of using prokaryotic organisms and in particu-
lar, cyanobacteria (the blue-green algae) in the kind of research are critically analysed.
Besides of general advantages of unicellular and prokaryotic organism models (absence
of specialized, «metazoan», cellular functions, lack of problems with the extrapolation
of in vitro results on in vivo situations, the possibility to use simple synthetic growth
media with completely controlled composition, great phylogenetic distances from mac-
roorganism cells commonly used in cellular ageing research (what is valuable in terms
of comparative gerontology) and simplicity of organization) these are the following
ones: the greatest primitivity, the probability to induce «pure» autotrophy or hetero-
trophy in the same organism, relative independence of growth characteristics on culture
conditions, presence of close taxonomically related unicellular and pseudo-multicellular
forms and the «unusual» spectrum of sensitivity to various external factors. The close
relationship between cellular ageing and proliferation activity with the special reference
to the «stationary phase ageing» model is emphasized.