

ФИЗИОЛОГИЯ 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 2

В первой части обзора мы обсудили преимущества изучения клеточного старения на стационарной культуре цианобактерий. Чтобы оценить, насколько адекватность предлагаемой модели подтверждается экспериментально, рассмотрим теперь имеющиеся в литературе сведения о феноменологии «возрастных» изменений в непересеваемых культурах этих организмов.

До сих пор цианобактерии не использовали целенаправленно в качестве модели для изучения клеточного старения, и данные по этому вопросу довольно скудны. Большая часть исследований, в которых изучали те или иные «возрастные» изменения в культурах клеток цианобактерий, выполнены на кафедре физиологии растений и на кафедре клеточной физиологии и иммунологии биологического факультета МГУ, поэтому в дальнейшем мы будем ссылаться главным образом на эти работы. Надо отметить, что и в них, как правило, моделирование клеточного старения в том смысле, в котором мы здесь о нем говорим (Ушаков и др., 1992), не было основной целью исследования, поэтому в приложении к нашим задачам эти данные оказываются несколько фрагментарными.

В оптимальных условиях пересеваемая культура цианобактерий не изменяется со временем (точнее, изменяется циклически, от одного посева к другому). В литературе выделяют различные «возрастные состояния» клеток цианобактерий и говорят о «биологическом возрасте» образца культуры, о «возрастном полиморфизме» клеток цианобактерий (Кондратьева, 1975, 1989), просто о «старых» клетках (Echlin, 1964). Однако все это относится к стадиям жизненного цикла отдельных цианобактерий, который не изменяется со временем в пересеваемой культуре. Клетки проходят три стадии в своем онтогенезе: молодость, зрелость и цитотомию. После цитотомии образуются вновь «молодые» клетки (Горюнова и др., 1980). Этим стадиям соответствуют циклические изменения линейных размеров (Golubić, 1967), но различий между клетками разных поколений не наблюдается. Нас, однако, интересуют не циклические изменения культивируемых клеток в каждом поколении, а такие изменения со временем в клеточной популяции, которые по направленности совпадают с соответствующими изменениями клеток стареющего многоклеточного организма. Как мы уже упоминали в первой части обзора (Ушаков и др., 1992), эти изменения в клетках цианобактерий, очевидно, можно обнаружить только при длительном пребывании их в покоем состоянии. Поэтому для изучения клеточного старения имеет смысл использовать стационарную культуру (модель «стационарного старения»).

У цианобактерий существует и некоторая примитивная дифференцировка, развитая, в частности, у гормогониевых. Их трихомы (нити) состоят из трех основных типов клеток: вегетативных, гетероцист и спор (акинет) (Горюнова и др., 1980). Но только гетероцисты явля-

ются истинно терминально дифференцированными клетками: они выполняют вполне определенную специализированную функцию — фиксацию азота — и не способны к делению (через определенное время существования погибают). Споры же при прорастании делятся, и в их потомстве образуются вегетативные клетки. Последние также делятся, причем они полипотентны: в их потомстве могут быть и новые вегетативные клетки, и споры, и гетероцисты. Такая примитивная «дифференцировка» не обязательна, по крайней мере у гормогониевых: в определенных условиях роста у некоторых цианобактерий этого класса можно предотвратить образование спор и гетероцист (Fogg et al., 1973; Корженевская, Гусев, 1976; Горюнова и др., 1980; Adams, Carr, 1981; Fay et al., 1984). В частности, это относится к штаммам *Anabaena variabilis*, *Anacystis nidulans*, использовавшимся в цитируемых ниже работах. Поэтому, хотя наличие или отсутствие дифференцировки оговаривалось не во всех работах, в отношении по крайней мере некоторых из них можно полагать, что наблюдавшиеся «возрастные» сдвиги тех или иных параметров не были связаны с изменением структуры клеточной популяции вследствие дифференцировки.

Существует два подхода к изучению временных («возрастных») изменений в непересеваемой (т. е. претерпевающей «стационарное старение») культуре цианобактерий. Это исследования на экспериментальных системах, которые можно назвать моделями «светового старения» и «темнового старения». В первом случае изучают изменения в культуре, растущей на свету. Во втором — исследуют культуру, находящуюся в тех же условиях, но без освещения; при этом рост одних форм цианобактерий (облигатных фототрофов) невозможен, других — возможен при добавлении дополнительных источников энергии (обычно глюкозы), но значительно заторможен. Авторы цитируемых работ говорят обычно не о «темновом старении», а о «темновом истощении» или «темновой деструкции» культуры.

Рассмотрим сначала феноменологию процесса, который мы называем «световым старением». Есть все основания полагать, что это явление гораздо ближе к «стационарному старению», изучаемому на клетках других типов, чем «темновое старение». Действительно, в идеальном случае «стационарного старения» должна быть подавлена только пролиферация клеток, в остальном же условия должны быть оптимальными (предполагается, что неделящиеся клетки макроорганизма *in vivo* находятся приблизительно в такой же ситуации). Культивирование цианобактерий на свету, разумеется, «физиологичнее» инкубации в темноте. Как мы увидим ниже, кинетика роста непересеваемой культуры на свету близка к таковой для эукариотических клеток; отмирание клеток в обоих случаях наступает после определенного периода пребывания культуры в стационарной фазе, когда и происходит постепенная утрата их жизнеспособности.

Имеющиеся в нашем распоряжении сведения не позволяют достаточно полно охарактеризовать сходство и различие моделей «светового старения» цианобактерий и «стационарного старения» эукариотических клеток (нормальных или трансформированных клеток животных). В частности, наиболее адекватной ситуации в макроорганизме *in vivo*, «физиологичной», следует, по-видимому, считать модель «стационарного старения», в которой остановка пролиферации наступает в результате контактного торможения (Хохлов, 1988). В опытах, выполненных на стационарной культуре цианобактерий, механизм остановки пролиферации в каждом конкретном случае обычно неизвестен. По предположениям разных авторов, это может быть дефицит углекислого газа

(Abelovich, Shilo, 1972), недостаток света из-за увеличения оптической плотности суспензии клеток (Eley, 1988), самоотравление метаболитами (Ермакова и др., 1977; Гусев, Никитина, 1979).

Возможно, однако, что в определенных условиях остановку пролиферации вызывает и контактное торможение. Действительно, этот механизм регуляции роста описан (Конев, Мажуль, 1977) как у эукариотических клеток (дрожжей, клеток млекопитающих), так и у прокариот (бактерий). Компоненты же среды (по крайней мере, в некоторых работах) не исчерпываются вплоть до отмирания культуры цианобактерий (Гусев и др., 1964). Предположение об отравлении метаболитами не согласуется с тем, что устойчивость клеток цианобактерий к разного рода повреждающим факторам максимальна в фазе замедления роста (Гусев, Никитина, 1979), когда, если исходить из предположения о самоотравлении как причине замедления пролиферации, следовало бы ожидать увеличения вероятности гибели клеток от любых причин.

Необходимо отметить также, что с точки зрения концепции, положенной в основу модели «стационарного старения» (Хохлов и др., 1983; Хохлов, 1988), процессы накопления повреждений в клетках, пролиферация которых прекратилась по самым разным причинам, должны иметь много общего, поскольку условия для накопления повреждений создает прекращение пролиферации как таковое.

Сведений о «световом старении» в литературе, посвященной цианобактериям, крайне мало. Наиболее полно описан феномен (с кривыми роста) у культур нитчатой цианобактерии *Anabaena variabilis* (Ермакова и др., 1977) и одноклеточной — *Anacystis nidulans* (Никитина, Гусев, 1976; Гусев, Никитина, 1979); имеются данные об изменении пигментного комплекса на протяжении жизни непересеваемой культуры — для *A. nidulans* (Воробьева и др., 1975). Для других же видов цианобактерий сведения достаточно фрагментарны. При этом в наиболее, по-видимому, ранней работе, где была снята полная кривая роста (включающая фазу отмирания клеток) (Ермакова и др., 1977), временные характеристики жизни культуры *A. variabilis*, посеянной с плотностью около 6% от насыщающей (в литературе по культивированию клеток насыщающей плотностью называется максимально возможное при данных условиях роста количество клеток в единице объема суспензии или, в случае роста клеток в монослое, — на единице поверхности; при такой плотности количество клеток перестает увеличиваться) и растущей в среде Кратца — Майерса при температуре 28° и освещенности 2000 лк, оказались следующими: 10—12 сут — середина логарифмической фазы роста, 20—30 — замедление роста, 30—60 — стационарная фаза, 60—120 — постепенное отмирание культуры (уменьшение числа клеток), после 120 сут — лизис клеток. Кривая роста в общем сходна по форме с кривыми, характерными для всех других стационарных культур (про- и эукариотических клеток). Описывая здесь «световое старение», мы используем главным образом данные из этой работы. Вообще же характер кривой роста культуры в значительной степени зависит от условий роста (толщины слоя суспензии, интенсивности перемешивания, условий газообмена с атмосферой и т. д.) и штамма цианобактерии. Описана, например, кривая роста *A. variabilis* при тех же температуре и освещенности (30°, 2000 лк) с плотностью посева около $3 \cdot 10^6$ кл/мл суспензии, где рост прекращался уже на 10—12-е сутки роста при плотности около $3 \cdot 10^7$ кл/мл (Гусев и др., 1982).

В экспериментах К. А. Никитиной и М. В. Гусева (1976) культура *A. nidulans*, посеянная с плотностью примерно $6-7 \cdot 10^6$ кл/мл и растущая при температуре $35-37^\circ$ и освещенности 2000—2200 лк в 100 мл среды (в 250-миллилитровых колбах), находилась в фазе интенсивного роста в течение первых 5—8 сут. Затем рост замедлялся, но логарифмическая фаза продолжалась до 25-х суток. Стационарная фаза длилась до 40—60-х суток, позже наступала фаза отмирания.

С «возрастом» культуры снижается потенциальная пролиферативная активность клеток, оцениваемая по эффективности клонирования при пересеве с малой плотностью на свежую агаризованную среду (под потенциальной величиной какого-либо показателя пролиферативной активности будем понимать ту величину, которой он достигает при создании оптимальных для роста клеток условий).

Способность клеток к пролиферации (измеряемую самыми разными методами) авторы цитируемых здесь работ обычно называют «жизнеспособностью». В биологии же слово «жизнеспособность», как правило, понимается буквально, т. е. как «способность жить», вероятность того, что организм (клетка) не погибнет при некоторых заданных условиях в течение определенного промежутка времени. Неспособность, например, нейронов или других постмитотических клеток к пролиферации не означает, что они нежизнеспособны (Хохлов, 1988). Поэтому слово «жизнеспособность» в тех случаях, когда авторы цитируемой работы подразумевают под ним способность к делению, мы будем ставить в кавычки.

Уменьшение этого параметра в культуре *A. variabilis* в цитированной работе Л. Р. Ермаковой с соавторами (1977) начинается примерно с наступлением стационарной фазы роста: на 30-е сутки эффективность клонирования составляет около 100%, а к 60-м падает уже до 48; после этого уменьшение эффективности клонирования замедляется. В общих чертах «жизнеспособность» клеток цианобактерии уменьшается в соответствии с той же закономерностью, что и потенциальная пролиферативная активность клеток в пересеваемой культуре прокариотического организма *Acholeplasma laidlawii* (Капитанов и др., 1985), а также эукариотических клеток при их старении *in vitro* «по Хейфлику» (Karatza, Shall, 1984). При старении *in vivo* эффективность клонирования также снижается (Martin et al., 1983; Adolphe et al., 1983), хотя зависимость этого показателя от возраста животного, по-видимому, линейная (Martin et al., 1983). Кроме того, кинетика изменения этого параметра с «возрастом» культуры *A. variabilis* сходна с кинетикой возрастного снижения численности когорты макроорганизмов.

При «световом старении» также уменьшаются как скорость роста, так и, по-видимому (плато на этих кривых роста не «прорисовано»), насыщающая плотность клеток, пересейанных в свежую среду. В культуре *A. nidulans*, росшей при $35-37^\circ$ и 2000—2200 лк (Никитина, Гусев, 1976), эти показатели потенциальной пролиферативной активности достигают максимума примерно на 5-е сутки (когда, как указывают авторы, скорость роста культуры максимальна), их величины падают в несколько раз уже к 10-м суткам, мало изменяясь вплоть до начала стационарной фазы (30-е сутки). К концу фазы (40—60-е сутки) величины этих показателей вновь значительно (почти до нуля) уменьшаются. Эти изменения также весьма сходны с изменениями, наблюдаемыми при «стационарном старении» культур эукариотических клеток (Хохлов и др., 1987) и при старении *in vivo* (Schneider, Smith, 1981).

Хотелось бы отметить еще одну черту сходства «стационарного старения» цианобактерий и эукариотических клеток. Как уже сказано выше, известно, что устойчивость культивируемых фибробластоподобных клеток к разного рода повреждающим воздействиям максимальна в начале стационарной фазы роста (Twentymay, Bleehen, 1975; Макарова и др., 1983; Хохлов и др., 1987). Клетки цианобактерий примерно тогда же, т. е. в конце логарифмической фазы роста, наиболее устойчивы к неблагоприятному влиянию темноты и к ингибирующему пролиферацию действию избыточного количества неорганического фосфата (Никитина, Гусев, 1976). Устойчивость клеточной стенки к действию лизоцима падает в начале логарифмической фазы роста, а затем увеличивается вплоть до начала стационарной фазы (Гусев и др., 1970).

Остальные изменения цианобактерий при «световом старении» более специфичны, поскольку теснее связаны с особенностями их обмена (прежде всего как фототрофов). Так, с начала логарифмической фазы (Гусев, Никитина, 1979) или с ее середины (Ермакова и др., 1977) снижается (примерно экспоненциально) скорость выделения клетками кислорода. Одновременно уменьшается и скорость фиксации углекислого газа. Поскольку параллельно интенсивности выделения кислорода падает способность клеток восстанавливать феррицианид, считают (Гусев, Никитина, 1979), что в ходе экспоненциальной фазы уменьшается активность фотосистемы II. При этом, видимо, возрастает активность фотосистемы I, что находит отражение в увеличении общей дегидрогеназной активности клеток, оцениваемой с помощью теста на восстановление 2,3,5-трифенилтетразолийхлорида (ТТХ). Она начинает уменьшаться примерно с начала стационарной фазы. Предполагается, что в ходе ранней логарифмической фазы роста клетки накапливают эндогенные запасные питательные вещества, которые и расходуют затем в процессе фотогетеротрофного метаболизма (с использованием фотосистемы I) (Гусев, Никитина, 1979).

Эти метаболические изменения, очевидно, связаны с изменениями фотосинтетического аппарата клетки. Действительно, к середине стационарной фазы роста достигает максимума и начинает снижаться количество фикоцианина в клетках *A. nidulans*, скорость этого снижения увеличивается с наступлением стационарной фазы, когда начинает уменьшаться также и содержание хлорофилла (до этого практически постоянное) (Никитина, Гусев, 1976).

С замедлением роста в культуре *A. variabilis* (Ермакова и др., 1977) отмечается расхождение тилакоидных мембран, примерно на 20—30-е сутки роста обнаруживаются внутритилакоидные вакуоли. Эти изменения становятся более заметными в ходе стационарной фазы, и к 60-м суткам роста фотосинтетические мембраны уже значительно изменены, клетки содержат большое количество включений, концентрация хлорофилла и фикоцианина в них падает почти до нуля (так что увеличивается относительное количество каротиноидов, и клетки приобретают желтоватую окраску). Изменения фотосинтетического аппарата непосредственно связаны с изменением характеристик роста культуры. До определенного момента эти изменения, очевидно, обратимы. Так, измененные спектры поглощения и флуоресценции пигментов в «старой» культуре *A. nidulans* при пересеве с меньшей плотностью в свежую среду перестают отличаться от спектров, характерных для «молодой» культуры (Воробьева и др., 1975).

В культуре *A. nidulans* (Никитина, Гусев, 1976), начиная не позднее чем с середины логарифмической фазы роста, уменьшается, примерно экспоненциально, скорость поглощения кислорода, индуцируе-

мого метилвиологеном. Полагают, что это может быть связано с уменьшением концентрации в клетке какого-то специфического эндогенного донора электронов.

В конце стационарной фазы роста (около 60-х суток или несколько позже) в клетках *A. variabilis*, растущих при 28° и 2000 лк (Ермакова и др., 1977), уже не удается обнаружить практически никакой метаболической активности, фотосинтетический аппарат в значительной степени разрушен, численность клеток (при прямом подсчете под микроскопом) снижена, однако вплоть до 120-х суток роста сохраняются отдельные клетки, способные делиться и давать новые клоны при пересеве на свежую среду. Позже живых клеток в культуре, по-видимому, не остается, но еще в течение какого-то времени можно видеть морфологически целые цианобактерии, поскольку при температуре и освещенности, оптимальных для роста, клеточная стенка не лизируется в течение довольно долгого времени после фактической гибели клетки (Ермакова и др., 1977). Это усложняет интерпретацию кинетики отмирания клеток в стационарной культуре, усугубляя трудности, связанные с невозможностью определить момент гибели отдельной клетки (Хохлов, 1988).

То, что мы назвали «темновым старением» (т. е. темновая деструкция) цианобактерий, ранее проанализировано с позиций концепции «стационарного старения» (Хохлов, 1988). Поэтому здесь мы позволим себе рассмотреть лишь наиболее существенные (с интересующей нас точки зрения) его черты, в основном в плане сравнения с процессами, происходящими при «световом старении». Наиболее существенная особенность, которая отличает «темновое старение» от «светового старения», состоит в том, что в первом случае клетки заведомо лишены своего главного источника энергии — света, поэтому, естественно, в первую очередь нас будет интересовать «темновое старение» облигатных фототрофов, таких, например, как *A. variabilis*.

Вероятно, первое исследование, в котором кинетику темновой деструкции цианобактерий изучали достаточно подробно, с регистрацией одновременно большого числа параметров, выполнено на культуре *A. variabilis* (Корженевская, 1975; Корженевская, Гусев, 1976). «Возрастные» изменения потенциальных (оцениваемых после пересева в свежую среду) параметров роста в ходе темновой инкубации изучены также в более ранней работе (Корженевская, Гусев, 1973). Культуру цианобактерий содержали в этих экспериментах (как и в других, описанных в цитируемых работах по «темновому истощению») при рН 7,4 в 0,05 М фосфатном буфере (в среде роста концентрация фосфата на два порядка меньше). Температуру инкубации поддерживали равной 28°. В этих условиях содержание клеток в культуре сохраняется практически постоянным до 60-х суток роста (аналог стационарной фазы), но уже к «возрасту» 90 сут падает до 8% от исходного и затем постепенно уменьшается вплоть до 6—8-месячного «возраста» культуры. Таким образом, неделяющиеся клетки дольше не разрушаются, чем при «световом старении» в стандартной среде (Кратца — Майерса), а скорость последующего процесса исчезновения клеток, как видимых под микроскопом структурных единиц, оказывается выше. Имеющиеся сообщения не позволяют сказать, в какой степени эти различия вызваны наличием или отсутствием света, а в какой различием в составе среды, поскольку известно, что фосфатный буфер специфически (очевидно, безотносительно к поддержанию рН среды) увеличивает время жизни цианобактерий в темноте (Гусев, Никитина, 1974). На свету он останавливает рост и вызывает лизис клеток (Гусев, Никитина, 1979).

Следует отметить, что в этой работе в ходе «темнового старения» биомасса культуры, т. е. суммарная сухая масса всех целых (или разрушенных в незначительной степени) клеток, уменьшается с момента помещения в темноту примерно по экспоненте. Можно предположить, что это служит отражением расходования запасных питательных веществ, а затем и разрушения клеток.

Эффективность клонирования *A. variabilis* при высеве (на свету) на агаризованную среду («жизнеспособность») примерно к 20-м суткам пребывания в темноте снижается со 100 до 80%, а затем падает более резко, составляя лишь 2% к месячному «возрасту» культуры. К 60-м суткам пребывания в темноте этот показатель пролиферативной способности клеток уменьшается до нуля. В экспериментах же Т. Г. Корженевской и М. В. Гусева (1973) наиболее резкое снижение эффективности клонирования (примерно с 85 до 5%) наблюдалось в период с 18-х по 25-е сутки темновой инкубации. Кинетика уменьшения эффективности клонирования, насколько о ней можно судить по имеющимся данным (снятие кинетической кривой не входило в задачу авторов этих работ), сходна, таким образом, с «гомпертцевской» («плечо» с последующим достаточно крутым спадом вначале и медленным снижением величины параметра в конце). Однако уменьшение «жизнеспособности» происходит гораздо быстрее, чем на свету, где на снижение этого параметра с 80 до 2% требуется примерно в 3 раза больше времени (около месяца). Т. Г. Корженевская (1975) высказала предположение, согласно которому значительное уменьшение эффективности клонирования, оцениваемой после высева клеток на свету, в период приблизительно с 20-х по 30-е сутки темновой инкубации обусловлено резким снижением в это время устойчивости большинства клеток к фотоокислению.

Кинетика пролиферации в свежей среде на свету клеток, сохранивших способность к размножению (Корженевская, Гусев, 1973), также изменяется при «темновом старении», хотя и не столь резко, как эффективность клонирования. «Возрастные» изменения, выявляемые при высеве *A. variabilis* в свежую среду (Корженевская, Гусев, 1973), в общем аналогичны таковым при «световом старении» *A. nidulans* (Никитина, Гусев, 1976). Потенциальная скорость роста (о насыщающей плотности судить трудно, так как кривые сняты только до 7-х суток роста, когда большинство изучаемых культур находилось еще в логарифмической фазе) заметно уменьшается к 14-м суткам существования в темноте, снижаясь к 30-м суткам почти вдвое в аэробных условиях (затем скорость роста, оцениваемая после пересева, уменьшается медленнее). В анаэробных условиях до 14—20-х суток инкубации в темноте потенциальная (оцениваемая по кинетике размножения на свету после пересева) скорость роста клеток изменяется с «возрастом» примерно так же, но ее уменьшение к 32-м суткам уже гораздо значительнее, чем в аэробных условиях, а после 50 сут пребывания в темноте клетки практически теряют способность к делению (Корженевская, Гусев, 1973).

Изменения метаболизма в процессе «темнового старения» также имеют определенные черты сходства с его изменениями в ходе «светового старения». Так, при инкубации клеток в темноте снижается скорость фотосинтетического выделения ими кислорода после переноса на свет. Как и при «световом старении», это уменьшение близко к экспоненциальному, но скорость его гораздо выше: уже в течение первых суток величина этого параметра падает более чем вдвое, а к 14-м суткам клетки практически полностью теряют способность выделять кис-

лород (Корженевская, Гусев, 1973). Таким образом, наиболее резкое и значительное падение способности клеток к фотосинтетическому выделению кислорода происходит, как и в условиях роста на свету, еще до начала их гибели и уменьшения потенциальной (оцениваемой после пересева) пролиферативной активности.

Быстро уменьшается скорость и других метаболических процессов, хотя некоторое время в темноте даже у облигатных фототрофов сохраняется способность к биосинтезу и, например у *A. variabilis* и *A. nidulans*, продолжается фиксация CO_2 , а у *Anabaena cylindrica* — фиксация азота (обзор: Гусев, Корженевская, 1977). Так, скорость поглощения кислорода клетками *A. variabilis* резко (более чем вдвое) падает в течение первых суток пребывания в темноте (затем уменьшение происходит медленнее, и способность к поглощению кислорода обнаруживается еще в течение месяца); приблизительно той же кинетике подчиняется уменьшение НАДФН-оксидазной активности клеток (но активность падает почти до нуля в течение недели) (Гусев, Никитина, 1979). Происходит нарушение обмена АТФ, причем «уменьшение количества АТФ в клетках при длительной инкубации в темноте, вероятно, связано не с тратой, а с разрушением ее молекул, так как оно соответствует скорости деградации клеток» и не сопровождается накоплением АДФ (Гусев, Никитина, 1979). При пребывании клеток в темноте вначале медленно (а через 2 недели — очень быстро) снижается также максимальная (фиксируемая при перенесении на свет) дегидрогеназная активность (о величине которой судят по скорости восстановления ТТХ). Кинетика ее изменения почти совпадает с кинетикой изменения эффективности клонирования, и к 30-м суткам пребывания в темноте активность падает до нуля (Корженевская, 1975). Интересно, что, как мы отметили выше, при «световом старении» падение дегидрогеназной активности клеток начинается примерно с начала стационарной фазы роста, т. е., как и при «темновом старении», с момента резкого уменьшения «выживаемости» (эффективности клонирования).

Количество пигментов фотосинтетического аппарата клетки при «темновом старении» изменяется очень незначительно на протяжении довольно долгого времени, по крайней мере 50 сут; при этом в несколько большей степени уменьшается количество каротиноидов, тогда как при «световом старении» в первую очередь разрушаются фикобилины и хлорофилл (см. выше). При этом, однако, происходит структурное разобщение молекул фикобилинов («антенны», улавливающей солнечную энергию) и хлорофилла, в первые 7 сут легко обратимое (при перенесении культуры на свет); затем начинается частичная деструкция активных центров молекул фикобилинов. При этом изменения затрагивают в первую очередь фотосистему I (Ефимцев и др., 1977), тогда как при «световом старении» именно она сохраняется дольше. Изменения фотосинтетического аппарата морфологически проявляются в расхождении, набухании мембран тилакоидов (Баулина, Гусев, 1978; Баулина, 1979). Все эти изменения, однако, остаются обратимыми по крайней мере до 3—5-й недели темновой инкубации. При переносе культуры на свет восстанавливаются как нормальное строение, так и функции фотосинтетического аппарата. В некоторых клетках при переносе на свет уже в этот период наступает деструкция фотосинтетических мембран. После 1,5 мес существования клеток в темноте изменения фотосинтетического аппарата становятся необратимыми в большинстве клеток, и под действием света (оптимальной для неповрежденных клеток интенсивности) в них происходит полное разрушение фотосинтетических мембран, достигших к этому времени в темноте

максимальной степени набухания (Баулина, 1979), причем цитоплазматическая мембрана не разрушается и клетка (очевидно, мертвая) сохраняется как структурная единица. Этот процесс происходит гораздо быстрее, чем гибель культур (с лизисом клеток), остающихся в темноте и погибающих в конце концов от истощения. Следует отметить, что такая реакция клеток на освещение формируется примерно тогда же, когда эффективность клонирования клеток цианобактерий (их способность к делению) падает практически до нуля (поэтому можно предположить, что в данном случае «жизнеспособность» действительно коррелирует с устойчивостью клеток, с вероятностью того, что они в условиях, оптимальных для нормального роста, не погибнут). Таким образом, в ходе «темнового старения» наступает некоторый критический момент, после которого свет уже не стимулирует клетки к фотосинтезу, восстановлению нормальной жизнедеятельности и пролиферации, а лишь ускоряет их гибель; наступает «инверсия» реакции клеток на освещение.

Происходит это после того, как достигнута определенная степень разобщения в системе электронного транспорта (Баулина, 1979). Отсюда следует, что к этому моменту создаются условия для относительно длительного существования возбужденного состояния молекул пигментов и, следовательно, в присутствии молекулярного кислорода, для фотодинамического эффекта (фотоокисления). Поглощенная клеткой световая энергия расходуется в этом случае в каскаде реакций неферментативного окисления любых случайных субстратов, в том числе жизненно важных компонентов клетки, и вероятность фотодеструкции клетки многократно увеличивается. Это согласуется с высказанным ранее предположением о том, что при пребывании в темноте в какой-то момент нарушаются механизмы защиты клеток цианобактерии от фотоокисления, благодаря чему они и гибнут при переносе на свет (Корженевская, 1975). При «световом старении» не происходит «инверсии» реакции клеток на свет. Однако морфологические изменения тилакоидных мембран все равно наблюдаются (они начинаются в фазу замедления роста). Правда, в этом случае к моменту потери клетками «жизнеспособности», т. е. способности к пролиферации, происходит везикуляция фотосинтетических мембран, связанная, по-видимому, со значительным разрушением хлорофилла и фикобилинов, тогда как при «темновом старении» к моменту потери «жизнеспособности» разрушается лишь небольшое количество пигментов. Везикуляция тилакоидов с последующим разрушением мембран (и «фотодинамическим» лизисом клеток) наблюдается также при повышенной (сверх оптимальной) освещенности (Баулина, 1979) и вообще в разных неблагоприятных условиях (Гусев, Никитина, 1979). Интересно, что аналогичная везикуляция мембран тилакоидов наблюдается в клетках цианобактерий, образовавшихся на свету из тех «темновых» клеток, которые оказались устойчивыми к длительному воздействию темноты и к последующей фотодеструкции (Баулина, 1979).

Наконец, остановимся на наиболее специфичном именно для «темнового старения» процессе — собственно истощении, расходовании питательных веществ и структурных компонентов клетки. Процесс этот отражается прежде всего в уменьшении сухой биомассы, т. е. общей массы всех собранных и высушенных клеток из данного культурального сосуда, которое начинается с момента помещения в темноту. Скорость этого уменьшения непрерывно падает. Количество же клеток еще долго остается неизменным (Корженевская, 1975). Одновременно расходуется запасной полисахарид (почти полностью к 60-м суткам

пребывания клеток в темноте, т. е. к моменту утраты ими способности к делению и начала их массовой гибели). При этом разрушается значительная часть РНК (с увеличением количества свободных нуклеотидов в среде). Содержание же структурных полисахаридов, липидов, ДНК изменяется в меньшей степени (Корженевская, 1975; Корженевская, Гусев, 1976).

Это, видимо, свидетельствует о том, что клетки продолжают существовать как структурные единицы, но в них не идут или почти не идут биосинтетические процессы, они расходуют питательные вещества, истощаются. Действительно, показана почти полная потеря способности клеток синтезировать белок и нуклеиновые кислоты к концу 3-й недели темновой инкубации.

Затем наступает период разрушения клеток, которое происходит по-разному в разных условиях «темнового» культивирования. Если клетки инкубируют в обычной среде роста (например, в среде Кратца — Майерса), то в первую очередь происходит разрушение гидролазами клеточной стенки и цитоплазматической мембраны с сохранением внутриклеточных мембранных структур (хотя и значительно измененных). В результате образуются сферические частицы — сферомембраны, состоящие из остатков мембранных внутриклеточных структур (Гусев, Никитина, 1979). При содержании же клеток в фосфатном буфере (Корженевская, 1975) разрушаются в первую очередь тилакоидные мембраны, а цитолемма сохраняется достаточно долго.

Необходимо заметить, что в процессе лизиса клеток, завершающего «световое старение», также в первую очередь лизируются внутриклеточные мембраны (с сохранением практически целой клеточной стенки), поэтому опять-таки образуются не сферомембраны, а «тени» клеток. Однако этот процесс несколько отличается от происходящего при «темновом старении» в экспериментах Т. Г. Корженевской. Как показано в работе О. И. Баулиной (1979), в наибольшей степени заметны эти отличия при сравнении динамики ультраструктурных изменений мембран тилакоидов в ходе деструкции клеток *A. variabilis* в темноте и на ярком (9 000—10 000 лк) свете.

Рассматривая кинетику процесса «темнового старения» цианобактерий, можно видеть, что массовой гибели клеток предшествует утрата ими способности к пролиферации, а еще раньше происходит расходование запасных питательных веществ и (вероятно, в меньшей степени) жизненно важных структурных компонентов. При добавлении в среду роста экзогенных питательных веществ (глюкозы, некоторых аминокислот) клетки дольше сохраняются интактными. Это позволяет предположить, что многие (если не все) процессы «темнового старения» обусловлены просто истощением, отсутствием возможности поддерживать энергетический обмен и заменять утраченные биомолекулы.

Вполне вероятно, что накопления повреждений в клетках, которое происходит при «нормальном» старении многоклеточного организма и при старении *in vitro* («по Хейфлику»), здесь нет — вплоть до момента, когда все резервы питательных веществ исчерпаны и клетки начинают просто разрушаться из-за невозможности естественной замены компонентов. Но поскольку в этом случае все-таки протекает процесс, аналогичный происходящему вследствие накопления повреждений, — постепенная утрата функциональных элементов клетки, — можно ожидать, что кинетика гибели клеток будет в этом случае подчиняться тем же закономерностям, что и в стационарных культурах, в которых пролиферация клеток прекратилась по другим причинам. Однако конкретные молекулярные механизмы этой гибели должны быть совсем иными:

при «стационарном старении» (как и при старении *in vivo*) накопление повреждений происходит и при достаточном количестве «строительного материала» для осуществления репарации, а при истощении — именно из-за его дефицита. Было бы интересно сравнить с этой точки зрения обе модели «старения» цианобактерий («световое» и «темновое») со «стационарным старением», а также старением *in vivo* и *in vitro* («по Хейфлику») эукариотических клеток. К сожалению, мы не располагаем достаточными данными по цианобактериям для такого анализа.

Имея в виду модель «стационарного старения», следует, очевидно, несколько подробнее остановиться на сравнении кинетики процессов, происходящих в ходе «светового старения» и «темнового старения» цианобактерий (разумеется, считая при этом началом «светового старения» вступление в стационарную фазу, поскольку при «темновом старении» клетки изначально находятся в некоем аналоге стационарной фазы роста).

Кинетика изменения количества клеток в обоих случаях близка: за некоторой длины «плечом» следует спад, как это имеет место на кривой гибели организмов в популяции. Однако при «световом старении» этот спад достаточно пологий, а сам переход от стационарной фазы к стадии отмирания клеток нерезкий, стертый. В случае же «темнового старения» уменьшение количества клеток гораздо более резкое, на кривой зависимости количества клеток от «возраста» достаточно крутой перегиб. При этом, однако, массовая гибель клеток в темноте начинается лишь через 2 мес темновой инкубации, тогда как стационарная фаза при «световом старении» длится не более месяца.

Способность клеток к пролиферации при пересеве на свежую среду в обоих случаях начинает снижаться раньше и уменьшается быстрее, чем количество клеток. При «световом старении», однако, изменение эффективности клонирования происходит гораздо медленнее, чем при «темновом старении». В то же время начало быстрого снижения эффективности клонирования в обоих случаях приходится примерно на 30-е сутки культивирования, когда «темновые» клетки уже 30 сут находятся фактически в условиях стационарной фазы, а «световые» — только вступают в нее. При «темновом старении» клетки полностью утрачивают способность к пролиферации уже к наступлению стадии отмирания клеток, тогда как при «световом старении» в конце стационарной фазы эффективность клонирования составляет еще более 40%. Интересно, что при «темновом старении», несмотря на более быстрое уменьшение эффективности клонирования (т. е. доли клеток, способных к делению), кинетика роста субпопуляции клеток, сохранивших способность к делению, оцениваемая после их высева в свежую среду на свету, изменяется не быстрее, чем при «световом старении». Как мы отмечали, скорость роста цианобактерий значительно снижена уже к 30-м суткам роста на свету, т. е. к началу стационарной фазы, и к 40—50-м суткам (когда еще нет массовой гибели клеток) скорость роста пересейанных клеток падает почти до нуля (Никитина, Гусев, 1976). При «темновом старении» клеток в аэробных условиях значительное снижение скорости роста наблюдается также к 20—30-м суткам, но и к 50-м суткам темновой инкубации культура *A. variabilis* способна удвоить свою численность за несколько суток роста при переносе на свет.

Длительное сохранение способности клеток к пролиферации при «темновом старении» в цитируемых работах, как мы отмечали, может быть связано не только с отсутствием света, но и со специфическим действием фосфатного буфера, способствующего длительному поддер-

жанию клеточного гомеостаза в ходе темновой инкубации. Кроме того, можно предположить, что в сохранении жизнеспособности в темноте определенную роль играет отсутствие фотодинамического повреждения. С другой стороны, в «темновых» клетках идут процессы разобщения компонентов фотосинтетического аппарата, которые в конце концов приводят к «инверсии» реакции клеток на свет (Корженевская, 1975). Вероятно, именно с этими особенностями «темнового старения» можно связать, во-первых, быстрое падение эффективности клонирования, а во-вторых, длительное сохранение в культуре небольшого количества интактных клеток (по-видимому, это те клетки, в которых почему-либо «инверсия» еще не произошла).

Скорость выделения кислорода (при помещении на свет) в случае «темнового старения» падает гораздо быстрее, чем при «световом старении», что также согласуется с предположением о разобщении в системе фотосинтеза при темновой инкубации. Как и при росте на свету (начиная со стационарной фазы), при «темновом старении» снижается общая дегидрогеназная активность клеток (Корженевская, 1975). Скорость поглощения кислорода в обоих случаях уменьшается с «возрастом» культуры, но при «темновом старении», достигнув низкого уровня, она долго еще (до 30—35-х суток инкубации) не падает до нуля, оставаясь приблизительно постоянной. Возможно, это связано отчасти с протеканием реакций неферментативного окисления, которые принимают участие в деградации клеток (Гусев, Никитина, 1979). О различиях механизмов разрушения ферментов и лизиса клеток при двух типах процессов «старения» цианобактерий мы уже упоминали, когда описывали феномен «темнового старения».

Таким образом, сравнение процессов «светового старения» и «темнового старения» показывает, что изменения потенциальной способности клеток к росту и некоторые нарушения метаболизма в ходе этих двух процессов в самых общих чертах сходны. В то же время есть существенные различия как в кинетике уменьшения количества клеток и утраты ими способности к пролиферации, так и в кинетике изменений метаболизма. Процессы, происходящие при «световом старении», в общем сходны с таковыми при «стационарном старении» эукариотических клеток, тогда как в «темновом старении» очень много черт, характерных для двух вполне специфических процессов: 1) истощения и 2) сенсбилизации клеток к действию света, «инверсии» реакции на свет. Это вполне согласуется со сделанным выше предположением о том, что и механизмы гибели клеток в этих случаях различны.

Что же касается специфического увеличения подверженности фотоокислению при «темновом старении», то, с одной стороны, его можно рассматривать как уменьшение специфической устойчивости именно к определенному повреждающему фактору — кислороду. С другой стороны, в настоящее время многие исследователи склоняются к тому мнению, что главным процессом, в ходе которого возникают повреждения, служащие основой механизма нормального старения — это неферментативное свободнорадикальное окисление жизненно важных биомолекул, в котором важнейшую роль играют кислородсодержащие свободные радикалы и синглетный кислород. Тогда этот процесс аналогичен фотодинамическому действию кислорода на фотосинтезирующие клетки. Полагают (Гусев, Никитина, 1979), что фотоокисление — основной механизм «светового старения» стационарной культуры цианобактерий. В таком случае можно считать, что при разобщении в системе фотосинтеза ускоряются именно те процессы, которые лежат в основе механизмов клеточного старения. Если «инверсия» реакции

клеток на свет — процесс многостадийный, и если при этом лишь увеличивается частота тех событий, которые на свету приводят к накоплению в клетках повреждений, то «световое старение» клеток, находившихся в течение некоторого времени в темноте, можно рассматривать как ускоренное «световое старение», т. е. как вариант модели «стационарного старения» цианобактерий. Однако процессы, происходящие в такой экспериментальной системе, в частности механизмы «инверсии», еще недостаточно изучены для того, чтобы можно было сделать вывод о возможности использования такой модели.

Итак, из всего сказанного можно сделать следующие выводы. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что во многом изменения клеток в процессе «светового старения» (в гораздо меньшей степени — в ходе «темнового старения») непересеваемой культуры цианобактерий аналогичны «возрастным» изменениям, происходящим в непересеваемой культуре других прокариотических и эукариотических клеток (модель «стационарного старения»). Кроме этого, они аналогичны изменениям клеток макроорганизма при его старении. Вместе с тем необходимо еще раз подчеркнуть, что, во-первых, данные эти неполны, так как на культуре цианобактерий изучены далеко не все процессы, описанные для старения *in vivo* и для «стационарного старения», а во-вторых, в клетках цианобактерий происходит довольно много специфических именно для них «возрастных» изменений. Однако, по нашему мнению, обнаруженного сходства достаточно для того, чтобы, учитывая преимущества цианобактерий как модельного объекта геронтологических исследований, изложенные в первой части обзора, изучать механизмы клеточного старения на непересеваемой культуре цианобактерий.

При этом, как было показано выше, модель «светового старения» лучше соответствует требованиям экспериментальной геронтологии, чем модель «темнового старения».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Баулина О. И. 1979. Светозависимые изменения ультраструктуры сине-зеленых водорослей: Автореф. канд. дис. М. Баулина О. И., Гусев М. В. 1978. Динамика ультраструктурных изменений облигатно фототрофной водоросли *Anabaena variabilis* в период сохранения ею жизнеспособности в темноте // Физиол. раст. 25, № 6. 1168—1171. Воробьева Л. М., Красновский А. А., Каюпова Г. А. 1975. Световые превращения пигментного комплекса *Anacystis nidulans* // Физиол. раст. 22, № 1. 16—26. Горюнова С. В., Герасименко Л. М., Пущева М. А. 1980. Роль нуклеотидпептидов в клеточном делении водорослей. М. Гусев М. В., Корженевская Т. Г. 1977. Темновой метаболизм облигатных фототрофов // Усп. совр. биол. 84, № 1 (4). 66—80. Гусев М. В., Линькова М. А., Коронелли Т. В. 1982. Влияние нефтяных углеводородов на жизнеспособность цианобактерий в ассоциации с нефтеокисляющими бактериями // Микробиология. 51, № 6. 932—936. Гусев М. В., Никитина К. А. 1974. Изучение темнового отмирания сине-зеленых водорослей // Микробиология. 43, № 2. 333—337. Гусев М. В., Никитина К. А. 1979. Цианобактерии (физиология и метаболизм). М. Гусев М. В., Никитина К. А., Корженевская Т. Г. 1970. Метаболически активные сферопласты сине-зеленых водорослей // Микробиология. 39, № 5. 862—868. 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. Ермакова Л. Р., Никитина К. А., Гусев М. В. 1977. Возрастные изменения ультраструктуры клеток *Anabaena variabilis* // Микробиология. 46, № 2. 324—328. Ефимцев Е. И., Бойченко В. А., Гусев М. В., Никитина К. А., Литвин Ф. Ф. 1977. Исследование изменений фотосинтетических характеристик сине-зеленых водорослей в зависимости от длительности темновой инкубации // Физиол. раст. 24, № 1. 23/29. 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. Кондратьева Н. В. 1975. Морфогенез и основные пути эволюции гор-

могониевых водорослей. Киев. Кондратьева Н. В. 1989. Морфология популяций прокариотических водорослей. Киев. Конев С. В., Мажуль В. М. 1977. Межклеточные контакты. Минск. Корженевская Т. Г. 1975. Выживание и деструкция в темноте облигатно фототрофной сине-зеленой водоросли *Anabaena variabilis*: Автореф. канд. дис. М. Корженевская Т. Г., Гусев М. В. 1973. Некоторые характеристики поведения сине-зеленой водоросли *Anabaena variabilis* в условиях темноты // Микробиология. 42, № 6. 963—968. Корженевская Т. Г., Гусев М. В. 1976. Метаболизм и деструкция сине-зеленой водоросли *Anabaena variabilis* в темноте // Микробиология. 45, № 5. 795—799. Макарова Г. Ф., Епифанова О. И., Логинов Б. В. 1983. Реакция культуры клеток китайского хомьяка на цитотоксическое действие ммурана в ранней и поздней стационарной фазе роста // Цитология. 25, № 1. 39—46. Никитина К. А., Гусев М. В. 1976. Некоторые особенности различных стадий развития сине-зеленой водоросли *Anacystis nidulans* (*Synechococcus*) // Микробиология. 45, № 3. 490—496. Ушаков В. Л., Гусев М. В., Хохлов А. Н. 1992. Имеет ли смысл изучать механизмы клеточного старения на сине-зеленых водорослях? Критический обзор. Часть 1 // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология. № 1. 3—15. Хохлов А. Н. 1988. Пролиферация и старение. Общие проблемы физико-химической биологии. Т. 9. Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР. М. 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. Хохлов А. Н., Чиркова Е. Ю., Ушаков В. Л. 1983. Использование стационарных культур для изучения механизмов клеточного старения // 1-й съезд Белорусского о-ва геронтологов и гериатров. Тез. докл. Минск. С. 188—189. Abelovich A., Shilo M. 1972. Photooxidative death in blue-green algae // J. Bacteriol. 111, N 3. 682—689. Adams D. G., Carr N. G. 1981. Heterocyst differentiation and cell division in the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*: effect of high light intensity // J. Cell Sci. 49. 341—352. Adolphe M., Ronot X., Jaffray P., Fontagne J., Lechat P. 1983. Effects of donor's age on growth kinetics of rabbit articular chondrocytes in culture // Mech. Ageing and Dev. 23, N 2, 191—198. Echlin A. 1964. The fine structure of the blue-green alga *Anacystis montana* f. *minor* grown in continuous illumination // Protoplasma. 58, N 3. 439—455. Eley J. H. 1988. The use of HEPES as a buffer for the growth of the cyanobacterium *Anacystis nidulans* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 28, N 3. 297—300. Fay P., Lynn J. A., Majer S. C. 1984. Akinete development in the planctonic blue-green alga *Anabaena circinalis* // Brit. Phycol. J. 19, N 2. 163—173. Fogg G. E., Stewart W. D. P., Fay P., Walsby A. E. 1973. The blue-green algae. London; New York. Golubić S. 1967. Zwei wichtige Merkmale zur Abgrenzung der Blaualgengattungen // Schweiz. Z. Hydrol. 29, N 1. 176—184. Karatza C., Shall S. 1984. The reproductive potential of normal mouse embryo fibroblasts during culture in vitro // J. Cell Sci. 66. 401—409. Martin G. M., Ogburn C. E., Wight T. N. 1983. Comparative rates of decline in the primary cloning efficiencies of smooth muscle cells from the aging thoracic aorta of 2 murine species of contrasting maximum life-span potentials // Amer. J. Pathol. 110, N 2. 236—245. Schneider E. L., Smith J. R. 1981. The relationship of in vitro studies to in vivo human aging // International Review of Cytology. Vol. 69. New York et al., P. 261—270. Twentymann P. R., Bleehen N. M. 1975. Changes in sensitivity to radiation and to bleomycin occurring during the life history of monolayer cultures of a mouse tumor cell line // Brit. J. Cancer. 31, N 1. 68—74.

Поступила в редакцию
09.07.91

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 2

The literature data concerning «age-dependent» changes in cultured cyanobacteria are reviewed. They are currently studied in two basic experimental systems: 1) the cultures grown without subcultivation under optimal light intensity (with classical S-shape growth curve); 2) those incubated in darkness (cell do not divide at all). We refer to processes occurring in such conditions as «light ageing» and «dark ageing», correspondingly. The alterations of the potential (i. e., revealed in optimal conditions) proliferation capacity and partially of physiology of the «light ageing» cells strongly resemble those occurring during cellular ageing of eukaryotic Methazoan cells both in vitro and in vivo. We conclude that «light» stationary cultures of cyanobacteria seem to be an adequate model for studying the evolutionary aspects of cell ageing.