

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 3

В части 1 мы подчеркивали (см. также: Хохлов, 1988), что прекращение пролиферации только создает предпосылки для старения на уровне клетки, но непосредственно не вызывает тех изменений, которые приводят к увеличению вероятности смерти организма. Мы придерживаемся того мнения, что клеточное старение является результатом накопления в клетках поврежденных макромолекул, а этот процесс, как и природа самих повреждений, в клетках каждого организма определяется конкретными (вообще говоря, видо- и тканеспецифическими) особенностями метаболизма (зависящими, кстати, и от различных внешних факторов). Поэтому при сравнительно-геронтологических исследованиях важно учитывать основные характеристики, во-первых, внутриклеточных процессов, служащих важнейшими источниками повреждений, ведущих к старению сравниваемых организмов, а во-вторых, систем, определяющих устойчивость клетки к повреждениям. Трудность здесь в том, что как первые, так и вторые достоверно не известны, существуют лишь более или менее обоснованные предположения о роли в клеточном старении тех или иных биохимических реакций, протекающих в живой клетке, причем речь идет (как правило) о реакциях, являющихся либо побочными результатами нормального метаболизма, либо следствием какого-то внешнего, но постоянного (фонового) воздействия. Под тем же, что определяет устойчивость клетки к этим повреждениям, понимают: 1) системы защиты от повреждающих агентов, предотвращающие их взаимодействие с молекулой-мишенью, 2) системы репарации.

Говоря о процессах «возрастной» деградации цианобактерий в предыдущей части обзора (Ушаков и др., 1992б), мы делали основной упор на их феноменологическое сходство с процессами клеточного старения «традиционных» объектов цитогеронтологии — клеток высших животных. Рассмотрим теперь с той же точки зрения процессы — наиболее вероятные источники первичных повреждений, лежащих в основе «возрастной» деградации (в первую очередь «светового старения») цианобактерий.

Сведений о процессах повреждения макромолекул и защитных системах у цианобактерий в литературе немного, и почти все они касаются так называемого фотодинамического действия (ФДД), т. е. окисления жизненно важных молекул под влиянием видимого света кислородом в присутствии пигмента, или облучения (ионизирующей радиацией, ультрафиолетовыми лучами).

ФДД, или сенсibilизированное пигментами фотоокисление, служит причиной массовой гибели цианобактерий в естественных условиях при понижении температуры (Abelovich, Shilo, 1972a) и активируется при их «световом старении» (Гусев, Никитина, 1979). Представляется весьма вероятным, что именно оно — основной механизм «возрастной» деградации цианобактерий на свету. В принципе ФДД — явление об-

щепбиологическое, индуцируемое в лабораторных условиях и в клетках животных (Bhattacharjee et al., 1985), но характерно в первую очередь для фотоавтотрофов. У гетеротрофных организмов оно встречается лишь как патология (Смит, Хэнеуолт, 1972) и, разумеется, никакой роли в старении не играет. Однако ФДД во многом близко к свободно-радикальному повреждению клетки. Последнее же, согласно одной из наиболее распространенных гипотез старения (Harman, 1962, 1981; Обухова, Эмануэль, 1983, 1984; см. также монографии: Комфорт, 1967; Лэмб, 1980), является первичным механизмом накопления повреждений, ведущего к старению любого организма в естественных условиях.

Свободнорадикальная теория старения исходит из того, что в процессе нормального метаболизма в живой клетке закономерно образуются свободные радикалы (главным образом кислородсодержащие), а также перекись водорода, органические перекиси и синглетный кислород. Эти агенты — побочные продукты функционирования ряда оксидоредуктаз, в том числе входящих в цепи электронного транспорта (дыхательную и фотосинтетическую), в систему оксидаз смешанной функции (цитохром *p*-450) и т. д. Другой источник кислородсодержащих свободных радикалов (в первую очередь гидроксильного) — это разные неблагоприятные фоновые воздействия (ультрафиолетовое, ультразвуковое, ионизирующее излучение, действие токсических веществ) (Обухова, Эмануэль, 1983, 1984). В большинстве этих процессов сначала образуются супероксидные радикалы O_2^- , затем, при их диспропорционировании, — перекись водорода. Взаимодействие H_2O_2 с супероксидным радикалом дает гидроксильные радикалы (под действием ионизирующего излучения они образуются, минуя O_2^- , при радиоллизе воды) и синглетный кислород. При взаимодействии последних с компонентами клетки образуются, в частности, органические перекиси. Все эти вещества обладают повышенной химической реакционной способностью и могут окислять самые разные органические соединения. Согласно свободнорадикальной теории старения, в живой клетке это выливается в повреждения органелл и генома (в первую очередь, по-видимому, страдают мембраны в результате перекисного окисления липидов), повреждения же, накапливаясь, вызывают клеточное старение (а затем, через ряд промежуточных стадий, старение всего макроорганизма).

Существование феномена ФДД дает возможность экспериментально вызвать у цианобактерий ускоренное «световое старение», увеличив освещенность (аналогично так называемому радиационному старению (Комфорт, 1967; Потапенко, 1984; Кутлахмедов, 1986) у животных). При этом важно, что процессы ФДД (как и перекисное окисление и другие свободнорадикальные процессы у животных) протекают у цианобактерий, как мы отметили выше, и в естественных условиях (Abe-lovich, Shilo, 1972a).

Феномен сенсibilизированного фотоокисления, или ФДД, обусловлен тем, что молекулы, способные переходить в возбужденное долгоживущее триплетное состояние в результате поглощения кванта света (это всегда молекулы пигментов, у цианобактерий — хлорофилла и фикобилинов), могут затем передать энергию кванта молекулярному кислороду, который переходит в возбужденное синглетное состояние, становится повышенно реакционноспособным и окисляет какие-либо жизненно важные молекулы. Возможны, впрочем, и несколько иные механизмы: образование возбужденного состояния субстрата с последующим окислением нормальным (триплетным) кислородом, окисление молекулы пигмента в возбужденном состоянии с последующим восста-

новлением ее субстратом (и, соответственно, окислением последнего), образование тех или иных комплексов молекулами субстрата, пигмента и кислорода, внутри которых может передаваться необходимая для реакции окисления энергия поглощенного кванта света. По-видимому, осуществляются все эти варианты реакций. Не исключено, что они могут быть разными у разных субстратов (Смит, Хэнеуолт, 1972). В ходе этих реакций могут возникать, в частности, органические перекиси — также сильные окислители.

Таким образом, процессы свободнорадикального повреждения макромолекул в клетке и ФДД сходны в том, что в тех и других принимают участие спонтанные неферментативные реакции окисления. В ходе этих процессов неизбирательно повреждаются жизненно важные компоненты клетки. При этом известно два типа агентов, общих для обоих вариантов окисления: синглетный кислород и органические перекиси. В определенных условиях у клеток разных типов тот или иной из этих процессов может стать основной причиной их старения и гибели (здесь необходимо подчеркнуть, что свободнорадикальные процессы универсальны и в норме имеют место и в клетках цианобактерий параллельно с ФДД). В то же время биологическое действие свободнорадикального окисления и ФДД различается. Так, повреждения, возникающие при ФДД, почти или совсем не репарируются (Смит, Хэнеуолт, 1972), тогда как для свободнорадикальных повреждений это, по-видимому, не так. Выраженность ФДД при введении акридинового оранжевого в культуры *Esherichia coli* двух разных штаммов различается вдвое, а чувствительность этих бактерий к рентгеновским лучам (действующим по свободнорадикальному механизму) — втрое (Смит, Хэнеуолт, 1972).

Можно думать, что наличие у цианобактерий ФДД и особенности последнего представляют интерес для сравнительной геронтологии. Действительно, как упоминалось выше (см. также: Хохлов, 1988; Ушаков и др., 1992а), есть основания полагать, что клеточное старение (как и старение многоклеточного организма) является следствием накопления в клетке случайных повреждений. Процесс накопления повреждений и определяет основные характеристики клеточного старения. При этом и динамика клеточного старения, и динамика снижения жизнеспособности макроорганизма определяются в первую очередь кинетическими характеристиками этого процесса. Сам же механизм возникновения повреждений, т. е. природа повреждающих факторов и особенности их действия, играет второстепенную роль: ясно, что в ходе эволюции вырабатываются системы защиты от обычных (для данного вида), более или менее постоянно действующих повреждающих факторов, так что кинетика накопления повреждений в большей степени определяется общими принципами клеточной организации живого, чем конкретными особенностями каждого данного типа (типов) повреждений. Сопоставив характеристики процессов «стационарного старения» традиционных модельных объектов клеточной геронтологии и «светового старения» цианобактерий, как раз и можно до некоторой степени прояснить относительную значимость для динамики клеточного старения, с одной стороны, общих принципов возникновения повреждений в клетке и защиты от них и с другой — конкретных особенностей каждого механизма повреждений (и, соответственно, защитных механизмов). Более того, поскольку у цианобактерий протекают процессы повреждения двух разных типов, в принципе можно, избирательно воздействуя на тот или другой, изучать влияние типа повреждений на ход клеточного старения у одного и того же объекта.

К сожалению, нам не удалось обнаружить данных об общей интенсивности реакций ФДД в клетках цианобактерий в тех или иных условиях. По-видимому, она возрастает при увеличении освещенности (в частности, после длительной темновой инкубации). Возможно, то же происходит на последних стадиях «светового старения». Но в настоящее время трудно точно оценить роль ФДД в «возрастной» деградации клеток.

Сказанное выше относилось к особенностям вероятных механизмов возникновения эндогенных повреждений у цианобактерий. Если теперь перейти к особенностям защитных систем, то из самых общих соображений вытекают два положения. Во-первых, у цианобактерий должна существовать система антиоксидантной защиты, аналогичная таковой у животных (включающая в себя супероксиддисмутазу, каталазу, глутатионредуктазу и антиоксиданты — «ловушки» свободных радикалов). Действительно, клетки цианобактерий синтезируют супероксиддисмутазу и каталазу (Кондратьева и др., 1989). Во-вторых, супероксиддисмутазы и каталазы, предназначенные в антиоксидантной системе для устранения супероксиданион-радикала и затем образующейся при этом перекиси водорода, не могут защищать от ФДД. Тогда, очевидно, для защиты от окислительного повреждения клетка должна обладать большим потенциалом таких восстановителей, как, например, восстановленный глутатион, которые «улавливают» не только кислородсодержащие радикалы, но и любые другие окислительные агенты. Не исключено, что роль такого антиокислительного агента у цианобактерий играет фикоцианин (один из фикобилинов). По данным опытов на экстрактах клеток цианобактерий (Abelovich, Shilo, 1972b), фикоцианин разрушается на свету, причем этот процесс опосредован образованием перекисей. Восстановленный глутатион защищает фикоцианин от разрушения: его добавление (в концентрации 10^{-2} М) предотвращает фотоокисление фикоцианина. Основываясь на этом, а также на том факте, что у цианобактерий отсутствуют пероксидаза и каталаза¹, имеющиеся у других фототрофных организмов, авторы рассматриваемой работы предположили, что фикоцианин частично берет на себя их функцию — защиту клетки от повреждающего действия перекисей. Кроме того, он по-видимому, непосредственно защищает клетки от ФДД и быстрая гибель цианобактерий в определенных условиях (например, при нехватке CO_2) обусловлена именно разрушением и (или) нарушением синтеза этого пигмента.

Есть данные о том, что вообще фикобилины (именно они первично поглощают свет, передавая затем энергию на другие пигменты), в частности, защищают от ФДД хлорофилл (Гусев, Никитина, 1979). Проверить это предположение, очевидно, можно было бы, введя дополнительно в клетку фикобилины (или сходные с ними вещества). Их защитное действие при ФДД должно быть аналогичным действию антиоксидантов — «ловушек» свободных радикалов при перекисном окислении.

Как мы уже отмечали, помимо реакций ФДД, в клетках цианобактерий постоянно и закономерно образуются анион-радикалы кислорода (O_2^-) в цепи фотосинтетического транспорта электронов, а также в цепи окислительного фосфорилирования и в ряде других окислительно-восстановительных ферментативных процессов. К сожалению, нам не известны работы, в которых этот процесс у цианобактерий был

¹ Позднее было показано, что каталаза у цианобактерий все-таки есть (Кондратьева и др., 1989).

бы охарактеризован количественно. Оценка образования $O_2^{\cdot -}$, его поглощения системой антиоксидантной защиты и роли в процессе старения в клетках животных дана в серии работ В. К. Кольтовера (1981, 1983, 1987).

Поскольку организмы, не обладающие системой фотосинтеза, тем самым лишены одного из важнейших источников свободных радикалов, вообще говоря, следует ожидать, что у фотоавтотрофов интенсивность свободнорадикальных процессов выше, чем у гетеротрофов. Значит, и соответствующие защитные системы (первичная защита от повреждений и (или) репарация) должны быть у них более мощными. Это предполагает более высокую устойчивость фотоавтотрофов, в частности цианобактерий, к абсолютному увеличению интенсивности возникновения свободных радикалов. Правда, при оценке интенсивности свободнорадикальных процессов в норме необходимо учитывать многие факторы, например, характерную для организмов каждого данного таксона интенсивность метаболизма. Показателем же такой устойчивости может служить, например, радиорезистентность, поскольку биологическое действие ионизирующей радиации (по крайней мере рентгеновских и γ -лучей) тоже опосредовано образованием свободных радикалов. Действительно, растения более радиорезистентны, чем животные (правда, не более, чем дрожжи или простейшие) (Ярмоненко, 1977). Цианобактерии же, как уже отмечалось в первой части обзора (Ушаков и др., 1992а), по всей видимости, вообще наиболее радиорезистентные организмы. Их радиостойчивость на несколько порядков превышает радиостойчивость клеток высших растений; известны виды, DL_{50} которых достигает нескольких миллионов рад (Kraus, 1969; Гродзинский, 1977, 1989). При этом надо подчеркнуть, что высокая радиорезистентность некоторых растений определяется устойчивостью их генома и является следствием происшедшей в ходе эволюции полиплоидизации, что подтверждается сравнением этого показателя у растений близких видов, различающихся по степени плоидности (Гродзинский, 1983); весь же геном цианобактерий, как прокариот, состоит из одной молекулы ДНК. Поэтому у них тем более должны быть лучше развиты другие системы, повышающие устойчивость генома, например система репарации ДНК.

Говоря об устойчивости цианобактерий к свободнорадикальным повреждениям, следует отметить, что для них характерно отсутствие разграничения фотосинтетической и дыхательной цепей переноса электронов; в этих процессах участвуют одни и те же ферменты, расположенные на тилакоидных мембранах. При этом процессы дыхания, фотосинтеза и азотфиксации по-разному взаимодействуют в клетках цианобактерий разных видов (Scherer et al., 1987). Видимо, обладая такой особенностью, цианобактерии подвержены не только несколько иному, чем у других организмов, но и в большей степени варьирующему (количественно и качественно) внутри типа повреждающему действию побочных реакций, связанных с этими процессами. Эта вариабельность должна отражаться и на особенностях систем защиты и репарации. Однако для описания спектра таких реакций в настоящее время явно недостаточно данных.

Кроме этого, большую роль в особенностях рассматриваемых процессов повреждения и защиты в клетке играют, независимо от типа метаболизма, условия обитания конкретного организма и адаптивные признаки, определяющие приспособленность к ним. Действительно, устойчивость, в среднем очень высокая, цианобактерий разных видов

к облучению (ионизирующей радиацией или ультрафиолетовым светом) «определяется не столько систематическим положением вида, сколько характером экологических условий, в которых он распространен» (Гродзинский, 1983). Тем не менее, хотя межвидовые различия цианобактерий по радиустойчивости очень велики, все они превосходят по этому признаку наиболее радиустойчивый вид бактерий (самых близких к ним организмов) — *Micrococcus radiodurans*.

Таким образом, в настоящее время о конкретных механизмах клеточного («стационарного») старения цианобактерий известно гораздо меньше, чем о механизме клеточного старения «обычных» цитогеронтологических объектов (т. е. клеток высших животных). Вероятно, важную роль в нем играют как свободнорадикальные механизмы, так и процессы неферментативного окисления, связанные с ФДД и не опосредованные образованием кислородных радикалов. Видимо, эти процессы вызывают повреждения, отличные от индуцированных ионизирующим излучением. В пользу этого свидетельствует, в частности, сочетание высокой радиустойчивости цианобактерий с высокой чувствительностью к кислороду.

В заключение нашего обзора нам хотелось бы остановиться на некоторых вопросах, связанных с регуляцией клеточного деления в популяциях цианобактерий. Эти вопросы представляются нам чрезвычайно важными с точки зрения сравнения культуры цианобактерий как модели для изучения клеточного старения с традиционно используемыми модельными системами.

Во второй части работы (Ушаков и др., 1992б) мы обсудили существенное сходство процессов «возрастных» изменений в пересееваемых культурах цианобактерий (особенно при «световом старении») и (в рамках модели «стационарного старения») эукариотических клеток. В связи со сравнительным анализом этих процессов мы подчеркнули весьма вероятную тесную взаимосвязь клеточного старения с пролиферативной активностью (см. обзор: Хохлов, 1988). В частности, как «стационарное старение» культивируемых клеток животных, так и «световое старение» цианобактерий в рассматриваемых нами экспериментальных системах развиваются в ответ на ограничение пролиферации. Оно в свою очередь является, как правило, следствием ограничения пространства, необходимого для роста клеток: плотность клеточной популяции при ее росте постоянно увеличивается и контактное торможение приводит в конце концов к полной остановке роста. Если это ограничение снять (обычно это делают путем периодических пересевов с плотностью клеточной популяции, в несколько раз меньше насыщающей), то пролиферация клеток будет периодически возобновляться и параллельно с этим будут изменяться многие цитологические и биохимические характеристики. Таким образом, само по себе ограничение пролиферации в рассмотренных нами в части 2 обзора моделях, где клетки «стареют» в стационарной фазе роста, экзогенно.

В связи с этим представляется интересным сравнение и эндогенных механизмов, регулирующих численность клеточной популяции, а также кинетику ее роста, у цианобактерий, с одной стороны, и у эукариотических клеток, полученных из многоклеточного организма, — с другой. Для этого есть смысл рассмотреть поведение клеток в пересееваемых культурах, где упомянутое экзогенное ограничение роста если и не отсутствует совсем, то по крайней мере периодически устраняется. В экспериментах с пересееваемыми культурами клетки обычно растут в культуральном сосуде (иногда при периодической замене среды роста на свежую) до тех пор, пока плотность клеточной популяции не достиг-

нет максимально возможного в данных условиях значения (это и есть так называемая насыщающая плотность) и рост не остановится. Тогда отбирают определенную часть клеточной популяции (в опытах на культурах клеток высших животных берут, как правило, от 1/10 до 1/2 всех клеток) и помещают их в такой же (или тот же) сосуд, а остальные клетки отбрасывают. Клеточная пролиферация возобновляется, и культура вновь входит в логарифмическую стадию роста. По достижении насыщающей плотности процедуру повторяют, снова устраняя экзогенное ограничение размножения клеток.

К сожалению, для непосредственного сравнения самих механизмов, определяющих закономерности роста цианобактерий и эукариотических клеток, данных в настоящее время недостаточно. Существует, однако, ряд гипотез, хотя бы в общих чертах объясняющих особенности кинетики роста *in vitro* диплоидных клеток многоклеточных животных (Good, Smith, 1974; Kirkwood, Holliday, 1975; Good, 1977; Smith, Lumpkin, 1980; Jones et al., 1982; Miquel, Fleming, 1984) и связывающих эти особенности с характером изменений относительного количества делящихся и неделящихся клеток в популяции. По крайней мере одна аналогичная (с некоторыми оговорками, о которых речь пойдет ниже) гипотеза разработана и для культур цианобактерий (Федоров, 1962а). Большая часть гипотез, о которых идет речь, оформлена в виде математических моделей, описывающих кинетику роста клеточной популяции, а их основные положения — в виде соответствующих исходных допущений этих моделей.

Поскольку мы не имеем возможности детально рассмотреть здесь все эти гипотезы, остановимся только на двух: модели, разработанной для цианобактерий (Федоров, 1962а, б) и так называемой теории коммитирования (Kirkwood, Holliday, 1975; Holliday et al., 1977, 1981), описывающей рост культуры фибробластов (точнее «фибробластоподобных клеток») млекопитающих. Ни одна из существующих гипотез не объясняет полностью все наблюдаемые закономерности роста клеточной популяции, но из всех моделей, предложенных для эукариотических клеток, именно модель Керквуда и Холидея представляется нам наиболее подходящей в данном случае, поскольку, как мы постараемся показать ниже, с математической точки зрения модель В. Д. Федорова для цианобактерий может быть сведена к ней как частный случай (здесь необходимо подчеркнуть, что обе модели были разработаны независимо одна от другой, причем модель В. Д. Федорова более ранняя). По нашему мнению, модель Керквуда и Холидея, кроме того, наиболее детально разработана и в наибольшей степени согласуется с экспериментальными данными, хотя имеются и некоторые доводы против ее адекватности (Cristofalo, Sharf, 1973; Harley, Goldstein, 1980).

Теория коммитирования была предложена Керквудом и Холидеем (Kirkwood, Holliday, 1975) для объяснения упоминавшегося нами в части 1 обзора «феномена Хейфлика» и связанного с ним явления, называемого старением *in vitro*. Напомним вкратце, в чем состоит сущность феномена Хейфлика. Культуры клеток многоклеточных животных, даже если их пересевать с малой плотностью каждый раз по достижении состояния сомкнутого монослоя, не способны расти бесконечно. После определенного числа пересевов скорость роста этих культур начинает снижаться, главным образом или целиком (по мнению разных авторов) за счет уменьшения в популяции доли делящихся клеток. Наконец, после очередного посева популяция теряет способность удваивать свою численность за некоторый контрольный срок (например, 2 неде-

ли). Эта неспособность клеточной популяции удвоиться в течение, вообще говоря, произвольно выбранного срока служит критерием прекращения роста, или «пролиферативной гибели» культуры. Другими словами, пересеваемые культуры клеток этого типа имеют (если пользоваться принятым критерием) предел «пролиферативной продолжительности жизни». Наличие такого предела и называется феноменом Хейфлика. Величина предела числа удвоений популяции видо- и тканеспецифична (в основном эксперименты проводятся на фибробластах грызунов и человека).

Именно Леонард Хейфлик ввел понятие «старение *in vitro*», подразумевая под ним весь комплекс структурных, цитофизиологических, биохимических и других изменений, происходящих со временем в пересеваемой клеточной культуре, в том числе снижение пролиферативной активности клеток². Аналогичны старению *in vitro* клональное старение инфузорий (Smith-Sonneborn, 1985; Хохлов, 1988) и возрастная деградация клонов бактерий, наблюдавшаяся в модельной системе в опытах Р. Катлера (Cutler, 1972), где культура *E. coli* была закреплена на мембране, через которую пропускали питательную среду (после деления одна из дочерних клеток всегда оставалась прикрепленной, а другая переходила в элюат, так что плотность популяции не увеличивалась). Среди исследователей в настоящее время нет единого мнения о том, действительно ли в конце «пролиферативной продолжительности жизни» начинается истинное (а не только «пролиферативное») отмирание клеток и культура в целом погибает (Хохлов, 1988) или же в ней в течение теоретически неограниченного времени может сохраняться значительный процент жизнеспособных клеток (часть из которых, возможно, способна к делению), так что вся клеточная популяция будет существовать бесконечно (Гаврилов, Гаврилова, 1991), причем отдельные клетки, вероятно, будут делиться (численность популяции может и не расти, если непрерывная пролиферация уравновешивается гибелью клеток). Мы не будем углубляться в дискуссию по этому вопросу, так как сейчас для нас важен только тот факт, что в пересеваемой культуре нормальных диплоидных клеток многоклеточных животных с «возрастом» (т. е. при старении *in vitro*) необратимо уменьшается средняя пролиферативная активность.

Мы не случайно употребили слово «нормальных». Дело в том, что те же самые клетки, претерпев спонтанно или под действием какого-то агента (вируса, химического фактора) так называемую трансформацию — пока еще не до конца изученное изменение механизмов регуляции деления, вероятно, связанное с активацией транскрипции некоторых участков генома (Mascieira-Coelho, 1980) и сохраняющееся в ряду клеточных поколений, — приобретают в числе других свойств способность к неограниченному размножению³. Другими словами, популяцию трансформированных клеток при периодических пересевах и поддержании оптимального состава среды можно пассировать практически неограниченное время (целый ряд линий трансформированных клеток существует в течение нескольких десятков лет без каких-либо изменений). Приобретение способности к неограниченному росту теми клетками, которые в норме этой способностью не обладают, часто называют

² До этого считалось, на основании данных опытов А. Карреля (Carrel, 1913), что при оптимальных условиях роста и периодических пересевах культура клеток высших животных может расти в принципе вечно, никак не изменяясь от пассажа к пассажу.

³ Нужно подчеркнуть, что трансформация — необходимое (но не достаточное) условие малигнизации.

«иммортализацией» (Macieira-Coelho, 1980). Классификация клеток по их способности к пролиферации и обсуждение возможных механизмов ее изменения приведены в обзоре (Zelenin, Prudovsky, 1989). Не ограничен пролиферативный потенциал у некоторых простейших (Токин, 1982; Smith-Sonneborn, 1985). Как мы уже отметили выше, у бактерий (*E. coli*) описано явление «возрастной» деградации вегетативно размножающихся штаммов (Cutler, 1972), но оно наблюдалось в искусственных условиях. По-видимому, у большинства прокариот предел «пролиферативной продолжительности жизни» в норме отсутствует, и, во всяком случае, нам не известны данные о наличии предела числа удвоенных клеточной популяции у цианобактерий.

Теперь мы кратко изложим суть теории коммитирования (от английского глагола commit — задействовать). Коммитированием к старению (commitment to senescence), или просто коммитированием (commitment) авторы теории Керквуд и Холидей называют переход клетки в такое гипотетическое состояние, в котором она может дать начало только клону, все клетки которого одновременно прекратят делиться через строго определенное число генераций (обозначаемое символом M), так называемый инкубационный период. Предполагается, что коммитирование происходит спонтанно, неизбирательно, изначально же все клетки в популяции имеют бесконечный (потенциально!) пролиферативный потенциал. Претерпевшая коммитирование клетка, как и ее потомки в любом поколении, называется коммитированной (committed). Мы для простоты изложения условимся называть клон, образовавшийся из коммитированной клетки первого поколения (т. е. получившейся при делении некоммитированной материнской клетки), коммитированным клоном.

Авторы делают допущение, что при делении любой некоммитированной клетки может образоваться с некоторой постоянной вероятностью коммитированная клетка (коммитирование происходит в момент ее возникновения). Строго говоря, вероятностью коммитирования (P) они называют вероятность оказаться коммитированной для каждой из дочерних клеток, образовавшихся при делении некоммитированной клетки. Коммитированная клетка первого поколения (клетки этого класса обозначаются C_0), делится уже обязательно с образованием двух коммитированных клеток, принадлежащих ко второму поколению (второй генерации), или клеток следующего класса (C_1); они в свою очередь — с образованием клеток класса C_2 и т. д. Наконец, при делении клеток, составляющих $(M-1)$ -ю генерацию, образуются «мертвые», т. е. неделяющиеся, клетки (в данной модели рассматривается не собственно гибель, а только потеря способности к пролиферации, «пролиферативная гибель»).

В теории коммитирования изначально предполагалось, что промежутков времени между делениями одинаков для всех клонов в популяции, коммитированных и некоммитированных. В одной же из последующих работ (Holliday et al., 1977) авторы отмечают, что и некоторое замедление скорости пролиферации на протяжении существования клона коммитированных клеток мало влияет на предсказания, вытекающие из модели. Имея это в виду, мы приводим ниже основные выкладки модели так, как они даны в исходной работе (Kirkwood, Holliday, 1975), т. е. без учета возможных изменений со временем длительности клеточного цикла.

Керквуд и Холидей предположили, что исходно (в некоторый начальный момент t_0 , от которого ведется отсчет времени) популяция состоит из некоммитированных клеток. Авторы не оговаривают, чем оп-

ределяется этот момент, до которого клетки не претерпевают коммитирования, но неявно предполагается, что он закономерно наступает на более или менее строго определенном этапе жизни клеточной популяции (анализ экспериментальных данных привел авторов модели к выводу о том, что в изученных ими случаях диплоидные фибробластоподобные клетки проходили момент t_0 еще *in vivo*, во время эмбриональной стадии развития макроорганизма). Полагается, что в это время популяция уже достаточно велика для того, чтобы можно было пренебречь случайными колебаниями относительного количества клеток, переходящих в коммитированное состояние за время, равное длительности клеточного цикла. По оценкам авторов, ее численность (N_0) должна составлять $10^5 - 10^7$ клеток. Тогда после первого же клеточного деления в популяции появляется $2N_0 \cdot P$ коммитированных клеток. Сначала (до исчерпания первыми коммитированными клонами потенциала делений) «мертвые» клетки в культуре отсутствуют, скорость роста максимальна, а число удвоений клеточной популяции совпадает с числом пройденных генераций. Эту фазу роста назвали стадией 1. Число «живых» (т. е. пролиферирующих) клеток (N_1) в популяции в это время определяется формулой

$$N_1 = 2^k \cdot N_0, \quad (1)$$

где k — число генераций, пройденных любым из клеточных клонов от t_0 до данного момента времени⁴.

Затем, после M -го удвоения популяции, когда клоны, происходящие из клеток, претерпевших коммитирование при первом (считая с момента t_0), делении, исчерпают свой пролиферативный потенциал, в культуре появляются «мертвые» (неделящиеся) клетки. На этой стадии (стадия 2 по терминологии авторов модели) общая скорость роста популяции уменьшается (рис. 1): поскольку часть клеток уже не делится, то для удвоения популяции клетки, сохранившие способность к пролиферации, должны поделиться большее число раз. Число «мертвых», или неделящихся, клеток (N_d) растет со временем, составляя

$$N_d = 2^{M+1} \cdot N_0 \cdot P \sum_{j=0}^{s-1} [2(1-P)]^j, \quad (2)$$

где s — число клеточных делений (для продолжающих делиться клонов), прошедших после первых M удвоений популяции. Число «живых», т. е. делящихся, клеток при этом может быть рассчитано по формуле

$$N_l = 2^{M+s} \cdot (1-P)^s \cdot N_0. \quad (3)$$

При вероятности коммитирования $P \geq 0,5$ относительное количество «мертвых» клеток будет постепенно возрастать и популяция «вымрет». При $P < 0,5$ в популяции установится постоянное распределение клеток по классам (некоммитированные, C_0, C_1, \dots, C_{M-1} , «мертвые») и популяция будет «бессмертной», с постоянной скоростью роста, тем большей, чем меньше значение P (рис. 1). Действительно, при делении одной некоммитированной клетки образуется в среднем $2(1-P)$ некоммитированных клеток (и $2P$ коммитированных). Спустя время, необхо-

⁴ Здесь и далее мы, в основном стараемся придерживаться обозначений авторов цитируемых работ, все же для удобства изложения иногда их изменяем.

димое для k циклов клеточного деления, число некоммутированных клеток (N_u) в популяции будет составлять

$$N_u = [2(1-P)]^k \cdot N_0. \quad (4)$$

Если $P < 0,5$, то $2(1-P) < 1$, и $N_u > N_0 > 0$ при любом положительном k , т. е. в популяции всегда будет оставаться какое-то количество некоммутированных клеток и она никогда не «вымрет». Напротив, при $P > 0,5$ абсолютное количество некоммутированных клеток будет постоянно уменьшаться (в среднем в $1/[2(1-P)]$ раз за время, равное длительности клеточного цикла). Поскольку количество клеток — вели-

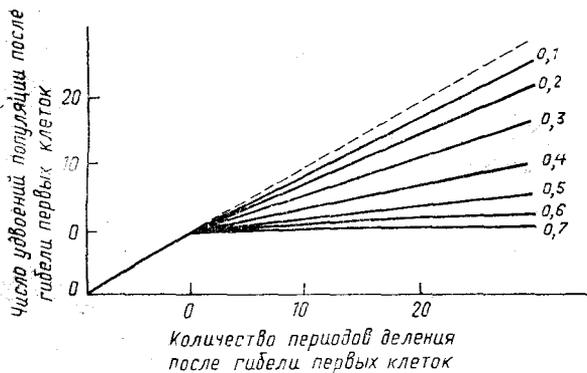


Рис. 1. Предсказываемый теорией коммитирования переход от стадии 1 к стадии 2 для ряда значений вероятности коммитирования P (указаны справа от кривых) (Kirkwood, Holliday, 1975)

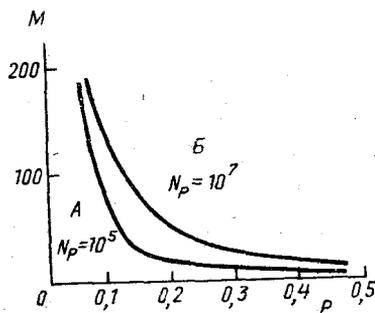


Рис. 2. Линии, разделяющие области пар значений инкубационного периода (M) и вероятности коммитирования (P), соответствующие клеточным популяциям с неограниченным (А) и ограниченным (Б) ростом, для двух различных значений численности популяции (N_p) (Kirkwood, Holliday, 1975)

чина дискретная, со временем некоммутированных клеток в популяции не остается совсем. После этого начинается стадия 3, или стадия «отмирания», когда составляющие популяцию коммитированные клетки постепенно переходят в ранг неделящихся и наступает «пролиферативная смерть». Мы, как уже отмечали выше, придерживаемся той точки зрения, что после «пролиферативной смерти» происходит действительная гибель клеточной популяции (Хохлов, 1988; Ушаков и др., 1992а), но авторы модели не затрагивают вопроса о судьбе клеточной популяции после «пролиферативной гибели».

Все эти рассуждения верны для абстрактной клеточной популяции в целом. На деле же обычно при каждом из последовательных пересевов сохраняют лишь часть клеток (строго определенную, например $1/2$, $1/4$ или $1/10$), которую переносят в такой же культуральный сосуд, где они размножаются, вновь достигая насыщающей плотности, и затем опять подвергаются пересеву. Поэтому численность реальной популяции никогда не превышает некоторого предела.

Согласно допущению теории коммитирования, в это число входят и «мертвые» клетки, которые не исчезают из популяции при пересеве, а пассивно переносятся и прикрепляются к субстрату роста в новом культуральном сосуде (авторы теории коммитирования ведут речь главным образом о культуре фибробластоподобных клеток, которая на-

чинает рост только после прикрепления клеток к субстрату). Однако если предположить, что неделяющиеся клетки теряются из популяции, предсказания модели практически не изменятся (Kirkwood, Holliday, 1975).

При этом в теоретически «бессмертной» популяции (т. е. при $P < 0,5$) относительное количество коммитированных клеток сначала увеличивается со временем. Действительно, процесс коммитирования необратим. При делении некоммутированной клетки образуется в среднем не две новые некоммутированные клетки, а лишь $2(1-P)$, так как некоторые из образующихся клеток оказываются коммитированными. В сочетании с тем, что при делении каждой коммитированной клетки образуются две новые коммитированные клетки, это дает последним преимущество над некоммутированными. Правда, коммитированные клетки класса C_{M-1} дают при делении уже не способные к делению клетки, но сдерживающее влияние этой остановки пролиферации на рост общего числа коммитированных клеток тем меньше, чем больше значение M , т. е. чем большее число раз может удвоиться коммитированный клон до того, как в нем прекратится клеточное деление. В дальнейшем относительные количества коммитированных и некоммутированных клеток стабилизируются: как показывает анализ формул (2) — (4), после определенного числа клеточных удвоений, а именно когда $[2(1-P)]^s \gg 1$, доля некоммутированных, как и доля «живых» (коммутированных + некоммутированных), клеток в популяции практически перестает изменяться с «возрастом».

При достаточно большом (более 30—40) M относительное количество некоммутированных клеток в абстрактной общей популяции (включающей в себя все потомство исходных клеток, которое могло бы существовать в отсутствие потери большей части популяции при пересевах) может установиться на очень низком уровне, хотя их абсолютная численность не только не убывает, но даже возрастает, и теоретически клеточная популяция не должна была бы «вымереть». Если при этом абсолютное количество клеток, отбираемых для очередного посева (N_p), достаточно мало, то некоммутированные клетки могут вообще потеряться (т. е. в оставленную для дальнейшего роста часть клеточной популяции не попадет ни одна некоммутированная клетка). Не позднее чем через M клеточных делений после этого популяция перестанет расти, т. е. «вымерет» независимо от значения P .

При фиксированном N_p судьба популяции будет определяться произведением значений M и P (рис. 2). Если значение хотя бы одной из этих величин близко к нулю, то популяция растет неограниченно. Если же значения и M и P велики, то доля в ней некоммутированных клеток после определенного числа удвоений популяции становится столь малой, что в ходе нескольких последовательных пересевов они будут (случайным образом) потеряны с вероятностью, близкой к единице. На рис. 2 точки, задаваемые малыми значениями M и P и находящиеся левее и ниже кривой, соответствуют клеточным культурам с неограниченным ростом, т. е. «бессмертным», а находящиеся правее и выше — культурами с ограниченным митотическим потенциалом. Вероятность того, что некоммутированные клетки будут потеряны, как уже было сказано, зависит и от значения N_p , т. е. от числа клеток, отбираемых для посева в конце каждого пассажа, поэтому увеличение N_p сдвигает кривую, служащую границей между областями «бессмертных» и «стареющих» клеточных популяций, вправо и вверх⁵.

⁵ Следует подчеркнуть, что эта зависимость определена только для $P < 0,5$ (Kirk-

Таким образом, согласно теории коммитирования, нет принципиальной разницы между механизмами, определяющими кинетику пролиферации у «стареющих» и «бессмертных» клеток; более того, изменение N_p может, вообще говоря, превратить «бессмертную» культуру в «стареющую» и наоборот. Авторы полагают, что трансформация клеточного клона сводится, в терминах модели, к уменьшению M и (или) P (Holliday et al., 1981), что и «сдвигает» влево и вниз (рис. 2) данный клон.

Многие экспериментальные данные подтверждают адекватность модели коммитирования. Так, на кривых роста пересеваемых культур действительно обнаруживают «перелом» — более или менее резкое изменение скорости роста, соответствующее в данной модели переходу от стадии 1 к стадии 2 (Holliday et al., 1977, 1981). Результаты опытов, выполненных на пересеваемой культуре фибробластов легкого эмбриона человека (штамм MG-4), по определению интенсивности пролиферации с помощью оценки включения в клетки меченого тимидина — предшественника ДНК (Holliday et al., 1977) — также согласуются с предсказаниями модели. В этих экспериментах до стадии 2 (по терминологии Керквуда и Холидея) доля неделящихся клеток составляла 5%, затем довольно резко выходила на уровень 20%, на котором и оставалась почти до прекращения роста культуры, иногда до предпоследнего пассажа (согласно модели, это период, когда распределение клеток по классам стабилизируется и количество неделящихся клеток начинает увеличиваться пропорционально общему числу клеток в популяции). Впрочем, Холидей с сотрудниками отмечают (Holliday et al., 1977), что в литературе есть и противоречащие гипотезе сведения о плавном уменьшении индекса мечения ДНК на протяжении всей «пролиферативной продолжительности жизни» культуры фибробластов (Cristofalo, Sharf, 1973).

Если верна теория коммитирования, то, однократно резко уменьшив размер клеточной популяции (пропустив ее через «бутылочное горлышко») на той стадии роста, когда некомитированных клеток уже мало, но еще не настолько, чтобы они обязательно потерялись при пересеве, мы должны получить значительные случайные колебания доли некомитированных клеток в отобранных субпопуляциях и, следовательно, обнаружить существенный разброс по их пролиферативной продолжительности жизни при последующем стандартном пассировании. Эксперименты такого рода также были проведены (Holliday et al., 1981). Их результаты согласуются с теорией коммитирования: распределение по «пролиферативной продолжительности жизни» субкультур, полученных в результате пропуска через «бутылочное горлышко» культуры диплоидных фибробластов человека штамма MRC-5, достоверно отличается от распределения контрольных субкультур: его дисперсия значительно увеличена, причем появляются субкультуры с продолжительностью жизни как меньше минимальной, так и больше максимальной, наблюдаемых в контроле.

Получены оценки параметров модели. Как оказалось, для фибробластов штамма MRC-5 вычисленное значение M находится в пределах 50—60 (с учетом того, что часть «пролиферативной продолжительности жизни» приходится на период *in vivo*), а P — в пределах 0,2—0,3 (т. е. в идеальном случае, в отсутствие потери большей части клеточной популяции при пересевах, культура должна была бы быть «бес-

wood, Holliday, 1975). При $P > 0,5$ «пролиферативная гибель» наступает обязательно, независимо от значений M и N_p .

смертной»). Как показали расчеты, в этой культуре уже на 8-м пассаже доля некоммитированных клеток меньше 0,01%.

Модель предсказывает, что и в «бессмертных» клеточных линиях количество некоммитированных клеток должно быть невелико. Следовательно, многие индивидуальные клоны, выделенные из таких линий, должны обладать ограниченной пролиферативной продолжительностью жизни. Опыты показали, что именно так обстоит дело с «бессмертными» клетками *HeLa* (Martinez et al., 1978).

В то же время нельзя не отметить, что теория коммитирования является именно моделью, в значительной степени абстрактной, и реальный смысл многих допущений не совсем ясен. Как мы уже говорили, в теории неявно предполагается, что процесс коммитирования начинается не с первого деления зиготы, а на некоторой определенной стадии развития данной клеточной популяции *in vivo*, и вопрос о том, чем определяется момент начала этого процесса (t_0), оказывается за рамками модели. Неясной остается и сама сущность коммитирования. Авторы теории предполагают, что это может быть результатом: 1) накопления каких-то повреждений, происходящего по типу «катастрофы ошибок», т. е. в соответствии с кинетикой автокаталитического процесса, лавинообразно; 2) запрограммированного процесса, аналогичного дифференцировке клеток (в момент коммитирования включаются какие-то «часы», отсчитывающие число делений); 3) механического накопления некоторых дефектов в цитоплазме (например, аномальных митохондрий, делящихся быстрее нормальных). При этом они считают первую возможность более реальной для старения *in vitro*; однако конкретные молекулярные механизмы коммитирования, как и механизмы, устанавливающие жестко определенный потенциал делений коммитированных клеток, остаются невыясненными. Некоторые доводы против теории Керквуда и Холидея приводят Харли и Гольдштейн (Harley, Goldstein, 1980). Так, в их экспериментах культура диплоидных фибробластов человека (штамм *MRC-5*) на средних пассажах содержала гораздо меньше неделяющихся клеток, чем следовало ожидать исходя из теории коммитирования и приводимых ее авторами значений параметров модели. Кроме того, по оценкам Харли и Гольдштейна, если наличие предела числа удвоений клеточной популяции при $P < 0,5$ (как это имеет место, по оценкам авторов теории коммитирования, у диплоидных фибробластов человека) является следствием стохастического процесса «разбавления» некоммитированных клеток, то среди более чем 1000 культур фибробластов человека, изученных в разных лабораториях, с высокой долей вероятности хотя бы одна должна была оказаться практически «бессмертной». Однако до сих пор нет сообщений о «бессмертных» линиях нормальных диплоидных фибробластов человека, не трансформированных искусственно (хотя, например, в культурах клеток мышей происходит так называемая спонтанная трансформация, т. е. приобретение способности к неограниченному росту без видимых внешних причин). Работа Холидея с сотрудниками (Holliday et al., 1981) содержит, в частности, возражения на эти замечания. Однако объем настоящей статьи не позволяет нам остановиться подробнее на критическом разборе теории коммитирования (которая, как всякая модель, разумеется, не отражает полностью реального положения вещей). Повторим лишь, что она позволяет объяснить многие наблюдаемые особенности кинетики роста культур клеток и в этом смысле адекватна процессам в реальной клеточной популяции.

Модель, описывающая закономерности отмирания цианобактерий, разработана В. Д. Федоровым (Федоров, 1962а) для объяснения изме-

нений относительного количества «живых» (по принятому автором критерию) клеток, наблюдаемых в свежепересеянной культуре на протяжении логарифмической фазы роста.

Напомним, что в части 1 обзора мы уже отмечали трудности, связанные с установлением: жива клетка или мертва. В ходе экспериментов (Гусев, Федоров, 1962; Федоров, 1962а), результаты которых послужили основой для создания В. Д. Федоровым своей модели, об этом судили по способности клетки восстанавливать хлорид трифенилтетразолия (ТТХ) в формазан (Jámbog, 1960, цит. по: Гусев, Федоров, 1962). Считается, что эта способность отражает общую дегидрогеназную активность, или общий восстановительный потенциал клетки. Если этот потенциал равен нулю, то в клетке, очевидно, не происходит нормального процесса дыхания (при котором восстановительный потенциал создается) и невозможен биосинтез (где он используется).

Экспериментально было установлено следующее. В свежепересеянной с малой плотностью культуре цианобактерий (*Anabaena variabilis* или *Amorphonostoc punctiforme*) наблюдаются массовая гибель и аутолиз клеток. Затем начинается рост культуры, причем относительное количество «живых» (восстанавливающих ТТХ) клеток снижается с постоянно уменьшающейся скоростью, асимптотически приближаясь к некоторой постоянной величине. Так происходит до тех пор, пока рост клеток не начнет замедляться за счет внешних (по отношению к клетке, а не к культуре в целом) факторов: контактного торможения или нехватки света в суспензии с увеличившейся плотностью. В это время доля «мертвых» (не восстанавливающих ТТХ) клеток начинает возрастать со все увеличивающейся скоростью. Модель же исходит из предположения о постоянной скорости размножения клеток и, повторим, рассматривает поведение культуры только в ходе логарифмической фазы роста. Фактически речь идет об уменьшении доли клеток, восстанавливающих ТТХ в формазан, на протяжении того периода роста культуры, когда отсутствуют внешние препятствия делению клеток.

Методика использования ТТХ для анализа жизнеспособности клеток *A. variabilis* и *A. punctiforme* разработана Г. М. Ивановой и Т. А. Михайловской (1962), которые так обосновывают его применение: «Вслед за Ключевым мы считаем наиболее существенным признаком живого состояния наличие в частях клетки непрерывного и направленного движения электронов, связанного с энергетическим распадом субстратов... и построением клеточного вещества... Иными словами, если клетка не дышит и не строит, мы подозреваем, что она мертва». Способность клетки восстанавливать ТТХ и говорит о наличии упомянутого направленного движения электронов. Несмотря на безусловную логичность доводов, этот критерий жизнеспособности не кажется нам полностью адекватным. Действительно, в опытах Т. Г. Корженевской (1975) в процессе деструкции клеток *A. variabilis* при длительной темновой инкубации общая дегидрогеназная активность, уменьшаясь, достигала нуля в то время, когда небольшая часть клеток была еще не только жизнеспособна, но и способна к возобновлению роста при помещении в оптимальные условия. Так что неспособность клеток в культуре восстанавливать ТТХ не свидетельствует о том, что все они мертвы.

В то же время известно, что как при «темновом старении» (Корженевская, 1975), так и при «световом старении» (Гусев, Никитина, 1979) резкому падению способности клеток к делению (о которой судят либо по эффективности клонирования, либо по параметрам кинетики роста при помещении на свет и которая в цитируемых работах назы-

вается жизнеспособностью) предшествует столь же резкое уменьшение интенсивности восстановления клетками ТТХ. Так, при «темновом старении» за несколько суток до того как общая дегидрогеназная активность (измеренная после световой преинкубации) упадет до нуля, «жизнеспособность» составляет 80%, а уже через несколько суток после исчезновения способности к восстановлению ТТХ — лишь 2%, хотя кинетика изменения этих величин различна (Корженевская, 1975). При «световом старении» также, несмотря на видимое отсутствие взаимосвязи «жизнеспособности» и скорости реакции восстановления ТТХ на начальных стадиях культивирования (интенсивность роста при пересеве начинает уменьшаться уже в ранней логарифмической фазе, а скорость восстановления ТТХ в это время растет), следующее затем «падение интенсивности этой реакции в середине стационарной фазы (30—60 сут) связано с потерей жизнеспособности большей частью клеток» (Гусев, Никитина, 1979). Если процесс «светового старения» замедлить, понизив температуру среды, то способность клеток к росту при переносе их в оптимальные условия сохраняется дольше, причем «она связана с... высоким уровнем светового восстановления ТТХ и снижается после его убывания» (Гусев, Никитина, 1979). Согласуются с этим также результаты, полученные Т. П. Юриной (1984) при изучении деградации клеток высших растений в непересеваемой культуре: автор обращает внимание на соответствие уменьшения суммарной дегидрогеназной активности и способности к клеточному делению. Таким образом, с одной стороны, потерю данной клеткой способности к восстановлению ТТХ нельзя считать критерием ее гибели, но с другой стороны, резкое падение (до нуля) общей дегидрогеназной активности отражает начало необратимых процессов «возрастной» деградации. Одно из первых проявлений этих процессов — исчезновение способности к делению почти у всех клеток. Кинетику уменьшения доли клеток, восстанавливающих ТТХ, в экспериментах В. Д. Федорова и М. В. Гусева нельзя отождествлять с кинетикой уменьшения доли клеток, способных к делению, однако модель В. Д. Федорова математически описывает некоторый процесс, ближайшим результатом которого оказывается именно потеря способности клеток к делению, а более отдаленным — гибель клеток. С этой точки зрения интересно сравнение основных, принципиальных закономерностей этого процесса с закономерностями уменьшения доли делящихся клеток человека в культуре и коммитирования, предположительно лежащего в его основе.

Имея это в виду, мы и перейдем теперь к анализу модели В. Д. Федорова и сравнению ее с моделью Т. Б. Л. Керквуда и Р. Холидея.

Основное допущение модели состоит в том, что в каждой клеточной генерации растущей культуры отмирает приблизительно постоянная доля клеток (β). Согласно второму допущению, длительность клеточного цикла также постоянна. Тогда через промежуток времени, необходимый для k циклов клеточного деления, число «живых» клеток ($N_{ж}$) в культуре составит

$$N_{ж} = N_0 \cdot 2^k (1 - \beta)^{k+1}, \quad (5)$$

где N_0 — численность клеточной популяции в начальный момент времени. Число же «мертвых» клеток ($N_{м}$) в этот момент можно представить как

$$N_{м} = \frac{N_0 \beta}{1 - \beta} \cdot \{ [2(1 - \beta)]^{k+1} - 1 \}. \quad (6)$$

Если теперь принять, что $(1-\beta=\alpha$ и $\beta/1-2\beta=\gamma$, то для доли «мертвых» клеток (δ) можно записать следующее выражение:

$$\delta = \frac{N_M}{N_M + N_{Ж}} = \frac{\gamma [(2\alpha)^{k+1} - 1]}{2^k \alpha^{k+1} + \gamma [(2\alpha)^{k+1} - 1]} \quad (7)$$

В пределе, при увеличении k , это выражение стремится к величине $2\gamma/1+2\gamma=2\beta$, т. е., как это и наблюдается в действительности, доля «мертвых» клеток приближается к некоторому конечному пределу. По определению, δ не может превышать 1, т. е. $\beta \leq 0,5$. Эта модель адекватно описывает изменения относительного количества «живых» и «мертвых» клеток в культуре цианобактерий в процессе логарифмического роста.

Легко заметить, что исходные допущения модели коммитирования и модели В. Д. Федорова идентичны (если отождествить выражения «мертвая клетка» в обеих гипотезах), с той только разницей, что во второй отсутствует «инкубационный период» коммитированного клона, другими словами, значение M полагается равным нулю.

Действительно, положим, в формулах (2) и (3) $M=0$. Тогда они преобразуются соответственно в

$$N_d = 2N_0 P \sum_{j=0}^{s-1} [2(1-P)]^j = \frac{2N_0 P}{1-2P} \{ [2(1-P)]^s - 1 \} \quad (8)$$

и

$$N_i = 2^s (1-P)^s N_0 \quad (9)$$

Эти формулы (с поправкой на обозначения) почти идентичны формулам (6) и (5) соответственно в модели В. Д. Федорова. Отличия заключаются в том, что показатель степени при множителях $[2(1-P)]$ в (8) и $(1-P)$ в (9) на единицу меньше, чем при соответствующих множителях в формулах (6) и (5), и в том, что числитель в формуле (8) домножен на дополнительную константу 2. Эти различия возникли только из-за того, что в модели коммитирования и в модели В. Д. Федорова «отсчет времени» начинается соответственно со второго и с первого поколения: в первой модели процесс коммитирования «запускается» при делении тех клеток, которые существуют в момент t_0 и коммитированными становятся не они сами, а образующиеся дочерние клетки, во второй же модели «отмирание» начинается уже в том поколении, которое существует в начальный момент времени. Эти различия несущественны: если в любой из моделей сместить «точку отсчета», это не изменит ни сути модели, ни выводов о поведении культуры. Поэтому модель В. Д. Федорова можно рассматривать как частный случай модели Керквуда и Холидея при $M=0$.

Итак, мы видим, что, во-первых, поведение как подверженных старению *in vitro*, так и «бессмертных» культур животных клеток можно объяснить на основе одной и той же модели (теории коммитирования), исходя из одних и тех же допущений о регуляции их роста. При этом принципиальные различия между клетками этих двух типов отсутствуют. Во-вторых, модель, описывающая другой, но тоже «возрастной» и приводящий к пролиферативной (а затем и к истинной) гибели клеточной популяции процесс в культуре цианобактерий, сводится к той же теории коммитирования и опирается на принципиально сходные допущения. Можно предположить, что это отражает какие-то общие существенные закономерности регуляции пролиферации клеток многоклеточных и цианобактерий (разумеется, настолько, насколько адекватны

рассмотренные модели), причем эти закономерности связаны с теми механизмами, которые (у нормальных диплоидных клеток животных) определяют старение *in vitro*.

В части 2 обзора мы говорили о сходстве «светового старения» (и в меньшей степени — «темнового старения») культур цианобактерий со «стационарным старением» популяций клеток эукариот. Рассмотренное выше сходство (по крайней мере на данном уровне обобщения) механизмов замедления пролиферации в популяции цианобактерий и в стареющей *in vitro* культуре клеток высших животных еще более сближает принципы их использования в экспериментальных моделях клеточного старения. Поэтому, говоря о сходстве старения *in vitro* со «стационарным старением» и со старением *in vivo*, можно предположить, что в той же степени с ними сходно и «световое старение» цианобактерий. Если это верно, то, по-видимому, наличие в норме старения на клеточном уровне у одних организмов и отсутствие его у других (в данном случае — у многоклеточных эукариот и у цианобактерий соответственно) не связано с принципиальными различиями на клеточном уровне организации. Оно в тех или иных условиях проявляется у клеток любого типа. Как правило, клетки многоклеточных организмов находятся в таких условиях *in vivo*, в норме, а клетки большинства одноклеточных (особенно прокариот) попадают в них только в непересеваемой культуре. Это может служить теоретической основой как моделирования клеточного старения на культурах цианобактерий, так и сравнительно-геронтологических исследований вообще⁶.

Наконец, как сказано выше, у цианобактерий существует такой (предположительно определяющий «световое старение») механизм индукции поврежденных макромолекул — ФДД, который отсутствует в клетках животных. Кроме этого, особенности метаболизма цианобактерий вместе с их необычно высокой устойчивостью к свободнорадикальным повреждениям позволяют предположить определенные особенности протекающих в них свободнорадикальных процессов (по-видимому, являющихся универсальным «индуктором» старения) и соответствующих защитных механизмов. Все это увеличивает возможности как для искусственного варьирования в эксперименте динамики клеточного старения, так и для сравнительного его изучения и тем самым облегчает выяснение наиболее общих механизмов этого процесса.

Таким образом, критический обзор данных по «возрастной» деградации клеток цианобактерий, регуляции их пролиферации, особенностям чувствительности к разным экзогенным факторам и вероятным механизмам «возрастной деградации» позволяет нам положительно ответить на вопрос, вынесенный в заглавие работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гаврилов Л. А., Гаврилова Н. С. 1991. Биология продолжительности жизни. М. Гродзинский Д. М. 1977. Системы надежности растительных организмов//Системы надежности клетки. Киев. С. 17—29. Гродзинский Д. М. 1983. Надежность растительных систем. Киев. Гродзинский Д. М. 1989. Радиобиология растений. Киев. Гусев М. В., Никитина К. А. 1979. Цианобактерии (физиология и метаболизм). М. Гусев М. В., Федоров В. Д. 1962. Изучение состояния морфологически дифференцированных клеток в развивающихся культурах сине-зеленых водорослей с помощью трифенил-тетразолий-хлорида//Микробиология. 31, № 3. 478—481. Иванова Г. М., Михайловская Т. А. 1962. Определение живых и мертвых клеток в культурах сине-зеленых водорослей *Anabaena variabilis* и *Amorphanostoc punctiforme* с помощью трифенил-тетразолий-хлорида (ТТХ)//Бюл. МОИП. Отд. биол. 67, № 3. 151. Комфорт А. 1967. Биология старения. М. Кольцов В. К.

⁶ Преимущества такого подхода к изучению механизмов клеточного старения мы подробно рассмотрели в части 1 обзора.

1981. Надежность ферментной защиты клетки от супероксидных радикалов и старение//Докл. АН СССР. 256, № 1. 199—202. Кольтовер В. К. 1983. Теория надежности, супероксидные радикалы и старение//Усп. совр. биологии. 96, № 1. 85—100. Кольтовер В. К. 1987. Надежность и процессы старения субклеточных структур//Надежность и старение биологических систем/Гродзинский Д. М., Войтенко В. П., Кутлахмедов Ю. А., Кольтовер В. К. Киев. С. 76—125. Кондратьева Н. В., Максимова И. В., Самуилов В. Д. 1989. Фототрофные микроорганизмы. М. Корженевская Т. Г. 1975. Выживание и деструкция в темноте облигатно фототрофной сине-зеленой водоросли *Anabaena variabilis*: Автореф. канд. дис. М. Кутлахмедов Ю. А. 1986. Сходство и различие радиационного поражения и процессов старения многоклеточных систем//Надежность и элементарные события процессов старения биологических объектов. Киев. С. 52—61. Лэмб М. 1980. Биология старения. М. Обухова Л. К., Эмануэль Н. М. 1983. Роль свободнорадикальных реакций окисления в молекулярных механизмах старения живых организмов//Усп. химии. 52, № 3. 353—372. Обухова Л. К., Эмануэль Н. М. 1984. Молекулярные механизмы замедления старения антиоксидантами. Биологические проблемы старения//Итоги науки и техники, ВИНТИ АН СССР. Сер. Общие проблемы биологии. Т. 4. М. С. 44—80. Поттапенко А. И. 1984. Радиационно-индуцированное укорочение продолжительности жизни и естественное старение *Drosophila melanogaster*: Автореф. канд. дис. Пушино. Смит К., Хэнеуолт Ф. 1972. Молекулярная фотобиология. Процессы инактивации и восстановления. М. Токин Б. П. 1982. Старение и смерть одноклеточных//Биология старения. Л. С. 61—73. Ушаков В. Л., Гусев М. В., Хохлов А. Н. 1992а. Имеет ли смысл изучать механизмы клеточного старения на сине-зеленых водорослях? Критический обзор. Часть 1//Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биол. № 1. 3—15. Ушаков В. Л., Гусев М. В., Хохлов А. Н. 1992б. Имеет ли смысл изучать механизмы клеточного старения на сине-зеленых водорослях? Критический обзор. Часть 2//Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биол. № 2. 3—16. Федоров В. Д. 1962а. О закономерности отмирания клеток в размножающихся культурах сине-зеленых водорослей *Anabaena variabilis* и *Amorphostoc punctiforme*//Докл. АН СССР. 144, № 6. 1380—1383. Федоров В. Д. 1962б. К вопросу о закономерностях отмирания клеток в размножающихся культурах сине-зеленых водорослей//Бюл. МОИП. Отд. биол. 67, № 3. 149—150. Хохлов А. Н. 1988. Пролиферация и старение//Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР. Сер. Общие проблемы физико-химической биологии. Т. 9. М. Юрина Т. П. 1984. Изучение деструктивных процессов в суспензионных культурах клеток диоскореи и табака: Автореф. канд. дис. М. Ярмоненко С. П. 1977. Радиобиология человека и животных. М. Abelovich A., Shilo M. 1972a. Photooxidative death in blue-green algae//J. Bacteriol. 111, N 3. 682—689. Abelovich A., Shilo M. 1972b. Photooxidative reactions of *c*-phycocyanin//Biochim. Biophys. Acta. 283, N 3. 483—491. Bhattacharjee S.-B., Ganguly T., Bhauumik G. 1985. The photodynamic effects on V-79 Chinese hamster cells//Photochem. and Photobiol. 41, N 2. 153—158. Carrel A. 1913. Contributions to the study of the mechanism of the growth of connective tissue//J. Exp. Med. 18, N 3. 287—299. Cristofalo V. J., Sharf B. B. 1973. Cellular senescence and DNA synthesis. Thymidine incorporation as a measure of population age in human diploid cells//Exp. Cell Res. 76, N 2. 419—427. Cutler R. G. 1972. Transcription of reiterated DNA sequence classes throughout the lifespan of the mouse//Adv. Gerontol. Res. 4. 219—321. Good P. I. 1977. A stochastic model for in vitro aging. 2. A theory of marginotomy//J. Theor. Biol. 64, N 2. 261—275. Good P. I., Smith J. R. 1974. Age distribution of human diploid fibroblasts. A stochastic model for in vitro aging//Biophys. J. 14, N 11. 811—823. Harley C. B., Goldstein S. 1980. Retesting the commitment theory of cellular aging//Science. 207, N 4427. 191—193. Harman D. 1962. Role of free radicals in mutation, cancer, aging and maintenance of life//Rad. Res. 16, N 5. 753. Harman D. 1981. The aging process//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Biol. Sci. 78, N 11. 7124—7128. Holliday R., Huscchtscha L. I., Tarrant G. M., Kirkwood T. B. L. 1977. Testing commitment theory of cellular aging//Science. 198, N 4315. 366—372. Holliday R., Huscchtscha L. I., Kirkwood T. B. L. 1981. Cellular aging: Further evidence for the commitment theory//Science. 213, N 4515. 1505—1508. Jámboor B. 1960. Tetrazoliumsalsze in der Biologie. Jena. Jones R. B., Lumpkin C. K., Smith J. R. 1982. A stochastic model for cellular senescence. Part I. Theoretical consideration//J. Theor. Biol. 86, N 3. 581—592. Kirkwood T. B. L., Holliday R. 1975. Commitment to senescence: A model for the finite and infinite growth of diploid and transformed human fibroblasts in culture//J. Theor. Biol. 53, N 2. 481—496. Kraus M. P. 1969. Resistance of blue-green algae to ⁶⁰Co gamma radiation//Env. Exp. Bot. 9, N 6. 481—489. Macieira-Coelho A. 1980. Implications of the reorganization of the cell genome for aging or immortalization of dividing cells in vitro//Gerontology. 26, N 5. 276—282. Martinez A. O., Norwood T. H., Prothero J. W., Martin G. M. 1978. Evidence of clonal attenuation of growth potential in HeLa cells//In Vitro. 14, N 12. 996—1002. Miquel J., Fleming J. E. 1984. A two-step hypothesis on the mechanisms of in vitro cell aging: Cell differentiation followed by intrinsic mitochondrial

mutagenesis//Exp. Gerontol. 19, N 1. 31—36. Scherer S., Almon H., Böger P. 1987. Bioenergetik der Blaualgen: Interaktion von Photosynthese, Respiration und Stickstoff-Fixierung//Biol. Rdsch. 25, N 3. 155—165. Smith J. R., Lumpkin C. K. 1980. Loss of gene repression activity. A theory of cellular senescence//Mech. Ageing Dev. 13, N 4. 387—392. Smith-Sonneborn J. 1985. Aging in Protozoa//Review of biological research in aging. Vol. 2. New York. P. 13—27. Zelenin A. V., Prudovsky I. A. 1989. Regulation of DNA synthesis investigated in heterokaryons of dividing and nondividing cells//Int. Rev. Cytol. 117. 179—214.

Поступила в редакцию
09.06.92

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 3**

Basing on the assumption of damage accumulation as the primary cause of cell ageing the mechanisms of such damage and corresponding defense systems in cyanobacteria (blue-green algae) are analysed in terms of comparison with those in mammalian cells currently used in cytogerontology. It is rather possible that the principal mechanism of macromolecular damage during «light ageing» of cyanobacteria is photooxidation in contrast to free radical damage as the putative mechanism of «stationary phase ageing» as well as in vivo ageing of mammalian cells. Nevertheless free radical processes also take place in cyanobacteria and play their own role in primary cell damage. As a result, there exist some peculiarities of cyanobacteria defense systems. Since authors believe that it is cell proliferation slowing down that induces the damage accumulation and cell ageing, two available in literature mathematical models describing the general slowing down of cell proliferation due to intrinsic mechanisms for eucaryotic (human diploid) and cyanobacteria cells in culture are compared. The basic assumptions of the models and the growth kinetics regularities predicted by them appear to be close enough. Thus it is assumed that the mechanisms responsible for the slowing down of cell proliferation and therefore cellular senescence in mammalian cells and in cyanobacteria are very similar. All items discussed in the part 3 review allowed to consider cyanobacteria culture as very useful tool for comparative and evolutionary cytogerontology studies.