

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО НАУКЕ И ТЕХНИКЕ

АКАДЕМИЯ НАУК СССР

ВСЕСОЮЗНЫЙ ИНСТИТУТ НАУЧНОЙ И ТЕХНИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ
(ВИНИТИ)

ИТОГИ НАУКИ И ТЕХНИКИ

СЕРИЯ

ОБЩИЕ ПРОБЛЕМЫ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ

Том 9

ПРОЛИФЕРАЦИЯ И СТАРЕНИЕ

Научный редактор д. м. н., профессор В. Н. Ярыгин

Серия издается с 1984 г.



МОСКВА 1988

Главный редактор информационных изданий ВИНТИ
профессор *П. В. Нестеров*

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

информационных изданий по физико-химической биологии и биотехнологии

Главный редактор — акад. *Р. В. Петров*

Члены редакционной коллегии: акад. *А. А. Баев*,

чл.-корр. АН СССР *А. А. Богданов*, проф. *Э. И. Будовский*,

проф. *Ю. М. Васильев*, к. б. н. *Л. Г. Виноградова*,

чл.-корр. АМН СССР *Ю. А. Владимиров*, чл.-корр. АН СССР *В. Г. Дебабов*,

Л. А. Денисова, чл.-корр. АН СССР *Р. П. Евстигнеева*,

к. б. н. *Г. Т. Жангельдина* (ученый секретарь редколлегии),

чл.-корр. АН СССР *С. Г. Инге-Вечтомов*, чл.-корр. АМН СССР *К. П. Кашкин*,

проф. *Л. Л. Киселев*, проф. *А. А. Клесов* (зам. главного редактора),

акад. *П. Г. Костюк*, акад. *Н. К. Кочетков*, акад. *А. А. Красновский*,

чл.-корр. АН СССР *В. Л. Крегович*, к. б. н. *А. А. Малеша*,

акад. *А. Д. Мирзабеков*, акад. *С. Е. Северин*, проф. *Е. С. Северин*,

акад. *Г. К. Скрябин*, чл.-корр. АН СССР *В. П. Скулачев*,

акад. ВАСХНИЛ СССР *А. А. Созинов*, акад. *А. С. Спирип*, проф. *Р. М. Хаитов*,

акад. *Е. И. Чазов*, чл.-корр. АН СССР *Ю. А. Чизмаджев*,

д. б. н. *В. Р. Шатилов*

ПРЕДИСЛОВИЕ

Вниманию читателя предлагается работа, посвященная вопросу о взаимосвязи изменений размножения клеток с процессом старения, который до настоящего времени, насколько мне известно, в отечественной литературе столь подробно не рассматривался. Фактически в обзоре даны история возникновения и содержание научного направления, названного Леонардом Хейфликом цитогеронтологией.

Мне представляется, что автор, являющийся известным специалистом в данной области, вполне справился со стоявшей перед ним задачей — дать критический, профессиональный анализ главных цитогеронтологических проблем, некоторые из которых для многих из нас представляются уже решенными. Так, с новых позиций предлагается взглянуть на тот же "феномен Хейфлика", этот стержень современной цитогеронтологии. Действительно, так ли уж безупречна модель, на которой более 20 лет работало столько исследователей, интересующихся клеточными механизмами старения? Одновременно, в качестве альтернативы, в работе приводится оригинальная концепция "стационарного старения".

Можно соглашаться или не соглашаться с доводами автора в пользу преимуществ модели "стационарного старения" перед моделью Хейфлика, однако одно несомненно — первая концентрирует интерес исследователей на фундаментальных, физико-химических, механизмах старения и вследствие этого заслуживает самостоятельного внимания.

Нет необходимости в рамках краткого предисловия в последовательном рассмотрении материала отдельных глав. Отмечу только некоторые моменты, представляющие, на мой взгляд, специальный интерес.

В частности, клеточно-кинетическая модель, рассматриваемая в разделе 3, является одной из первых, пригодных для тестирования геропротекторов и геропромоторов. Исследования такого рода в настоящее время становятся особенно актуальными. Известно, что средняя продолжительность жизни людей в развитых странах практически перестала расти и дальнейшее ее увеличение уже невозможно без вмешательства в фундаментальные, молекулярные и клеточные, механизмы старения с помощью различных веществ и факторов, проявляющих свойства геропротекторов. В то же время, в свете известных тенденций изменений биосферы, производства и быта все более осознается необходимость скрупулезного исследования воздей-

ствий на организм человека факторов, которые в качестве одного из своих отдаленных эффектов могут вызывать преждевременное старение организма - геропромоторов. Предлагаемая модель предназначена для интенсификации исследований и такого рода.

Вопрос о "бессмертии" половых клеток еще со времен Вейсмана волнует умы естествоиспытателей. Поэтому с интересом воспринимается материал в разделе 5, специально посвященном этой проблеме. Основываясь на большом количестве экспериментального материала, автор выдвигает любопытную теорию, объясняющую причины такого "бессмертия" клеток зародышевой линии. Справедливости ради замечу, однако, что, некоторые его положения не бесспорны и исходят главным образом из его собственной концепции ограничения пролиферации как основной причины накопления повреждений в клетках при старении.

Наконец, в разделе, касающемся старения простейших, А.Н. Хохлов совершенно правильно отмечает, что основной причиной неясности, несомненно существующей в этом вопросе, является отсутствие подходящего определения данного феномена. Рассматриваемый им материал с очевидностью свидетельствует, что разные исследователи, изучая старение различных видов простейших, вкладывают в этот термин совсем разный смысл. Несомненно, что упорядочение наших представлений о старении одноклеточных позволит значительно продвинуться в исследовании этой проблемы. Небольшой объем настоящей работы не позволил автору в деталях рассмотреть все вопросы, касающиеся ключевой проблемы взаимосвязи клеточной пролиферации и процесса старения. Тем не менее, представленный материал позволит читателю составить целостное представление о состоянии цитогеронтологических исследований и наметить определенные перспективы их развития.

Доктор медицинских наук, профессор

В. Н. Ярыгин

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- УКП - удвоения клеточной популяции
- СХО - сестринские хроматидные обмены
- УФ - ультрафиолетовый
- БДУ - бромдезоксигуанидин
- ЭМП - электромагнитное поле
- ТХУ - трихлоруксусная кислота

ПРОЛИФЕРАЦИЯ И СТАРЕНИЕ

к. б. н. А. Н. Хохлов

ВВЕДЕНИЕ

По-видимому, этот обзор правильной было бы назвать "Клеточная пролиферация и старение". Однако в последнее время в биологической литературе термин "пролиферация" используется практически только для обозначения процесса размножения клеток, что, на наш взгляд, оправдывает его употребление в "чистом" виде. Угасший было интерес к фундаментальной геронтологии сейчас вновь возрос, и это стимулировало появление большого числа книг, посвященных данному вопросу. Однако, как правило, вопросы старения на клеточном уровне рассматриваются в них лишь в одной или нескольких главах. В то же время, количество опубликованного материала на эту тему в последние годы увеличилось необычайно (главным образом, в связи с открытием "феномена Хейфлика", которое привело к созданию науки, названной цитогеронтологией). Исследования механизмов старения в экспериментах на нормальных диплоидных клетках, пассируемых *in vitro*, стимулировали и разработки другого рода, направленные на установление связи между старением целого организма и тем, что мы называем "старением отдельных клеток". Тут хотелось бы подчеркнуть, что последнее выражение совершенно не случайно поставлено в кавычки. Напомним читателю классическое определение, согласно которому старение — это увеличение вероятности смерти организма с возрастом, и хотя сейчас многие пытаются пересмотреть это определение и модифицировать его, нам представляется, что это не имеет никакого отношения к сути вопроса, ибо само явление (чем старше человек или животное, тем выше вероятность его смерти — показатель, оцениваемый только на популяционном уровне) су-

шествует независимо от нас, и если уж мы назвали его старением, то и давайте придерживаться этого термина. Таким образом, при "подстрочном переводе" выражения "клеточное старение" следует написать "увеличение вероятности смерти клетки с возрастом". Естественно, в случае популяции клеток, как и в случае популяции многоклеточных организмов, динамика вероятности смерти может быть оценена только путем изучения выживаемости всей популяции, и говорить о старении отдельной клетки не имеет смысла. И еще одно замечание. Если в случае многоклеточных организмов, как правило, можно четко зафиксировать момент смерти конкретной особи (по крайней мере, промежуток времени, за который она умирает, во много раз меньше продолжительности жизни организма), то для отдельной клетки этот вопрос представляется нам практически неразрешимым. Время "умирания" клетки может быть очень велико (в сравнении с временем всей ее жизни), изменения же тех или иных ее показателей (способность к образованию колоний, окрашивание витальными красителями, интенсивность метаболизма, состояние определенных внутриклеточных структур и т. п.) еще не позволяют сделать вывод о переходе ее в ранг мертвых, хотя именно такие показатели используются, как правило, для оценки жизнеспособности "стареющих" клеток. Поэтому, на наш взгляд, унификация представлений о сути клеточного старения необходима в еще большей степени, чем формирование единого мнения о старении многоклеточных организмов. Пока же эта унификация отсутствует, мы предлагаем называть старением клеток совокупность таких их изменений (на любом уровне) в определенных условиях, которые по направленности совпадают с соответствующими изменениями клеток стареющего многоклеточного организма. Именно в этом смысле термин клеточное старение (уже без кавычек) будет употребляться в настоящем обзоре.

Как уже говорилось, материала, касающегося клеточных механизмов старения, накоплено к настоящему времени очень много, и, естественно, изложить его в такой небольшой работе как эта, невозможно. Поэтому спектр рассматриваемых в ней вопросов значительно сужен и охватывает в основном данные, полученные на культивируемых клетках. Тем не менее, мы постарались упомянуть основные положения, на которых базируется современная цитогеронтология, и дать ссылки на обзоры, затрагивающие проблемы, не рассматриваемые подробно в данной работе. Нам представляется, что она должна

быть полезна как тем, кто впервые захочет познакомиться с цитогеронтологией, так и тем, кто пожелает использовать ее как справочник по работам в данной области.

По поводу же вопросов, не затронутых в настоящем обзоре или изложенных в нем достаточно поверхностно, хотелось бы отослать читателей к соответствующим фундаментальным обзорам и монографиям [22, 30, 39, 41, 94, 131, 132, 156, 157, 159, 181, 188, 202, 204-216, 254, 295, 302, 316, 324, 328, 329, 338, 347, 352, 358].

1. ФЕНОМЕН ХЕЙФЛИКА ("СТАРЕНИЕ IN VITRO")

1.1. Немного истории

Впервые работы геронтологического плана на клеточных культурах были проведены Алексисом Каррелем, работавшим в Рокфеллеровском Институте Медицинских Исследований в самом начале XX века (обзор данных см. [369]). В 1911 году он опубликовал работу с описанием метода культивирования эпителиальных или фибробластоподобных клеток из эксплантатов нормальных и малигнизированных тканей млекопитающих [152]. На следующий год появилась еще одна его статья с описанием модификации метода культивирования, обеспечивавшей более длительное выживание культур (максимальная продолжительность жизни от 20 дней до более чем 3 месяцев). В этой работе он впервые выдвинул положение, согласно которому соматические клетки не стареют *in vitro*, будучи способными к неограниченному размножению ("permanent life") при соответствующих условиях культивирования [150]. В 1913 году Каррель сообщил, что некоторые штаммы клеток куриных эмбрионов ему удалось культивировать в течение более чем 16 месяцев и 190 пассажей, и сослался на предыдущую работу как на доказательство того, что "клетки соединительной ткани можно непрерывно поддерживать *in vitro* в состоянии активной жизнедеятельности" [151].

Используя культуры клеток, Каррель провел целую серию достаточно виртуозных для того времени геронтологических экспериментов. Он показал, что плазма (главный компонент используемой им культуральной среды), полученная от 4-5-месячных кур, обеспечивает гораздо более интенсивный рост фибробластов, чем плазма 4-5-летних птиц (выросты клеток из эксплантата через 3 дня на 46-54 и 31-38 мкм, соот-

ветственно). Основываясь на данных этих опытов, Каррель предположил, что способность плазмы поддерживать рост культур клеток может быть использована как количественный показатель физиологического возраста организма. Тем самым, он ввел первый из так называемых "возрастных индексов", которых к настоящему времени предложено огромное количество.

Кроме того, Каррель культивировал в среде с плазмой взрослых кур ткани куриных эмбрионов, а также молодых и старых птиц. На основании полученных данных он заключил, что "скорость роста всегда находится в обратной зависимости от возраста животного-донора образца ткани" [151].

В одной из своих последних публикаций, посвященных тому явлению, которое мы теперь называем старением *in vitro* [153], Каррель изложил результаты экспериментов, в которых куриные фибробласты одного "штамма", существовавшие в культуре уже в течение 9 лет, пересеивали в несколько параллельных флаконов с плазмой, полученной от кур в возрасте 6 недель, 3 месяца или 9 лет. Во всех случаях наблюдалась обратная корреляция между возрастом донора плазмы и скоростью размножения клеток, а также между возрастом донора плазмы и продолжительностью жизни *in vitro* куриных фибробластов. Дальнейшие эксперименты позволили заключить, что эти результаты являются, по-видимому, следствием увеличения с возрастом концентрации в сыворотке ингибитора клеточного роста, а не уменьшения содержания его стимулятора.

Излагая эти широко известные в кругах цитологов данные, необходимо, конечно, отметить, что они никем не были в последующие годы подтверждены [208]. В то же время выявленный Каррелем феномен удлинения латентного периода (т. е. времени, проходящего до появления первых мигрирующих клеток около культивируемого кусочка ткани - эксплантата) с увеличением возраста донора ткани был много раз подтвержден впоследствии разными исследователями (обзор данных см. [208]).

К сожалению для всех геронтологов, ни Каррель, ни другие исследователи, занимавшиеся этими вопросами позднее, не обратили внимание на противоречие между "неограниченным во времени существованием" фибробластов до начала этих экспериментов и их ограниченной продолжительностью жизни (всегда не более 23 пассажей) непосредственно в настоящих исследованиях. Впоследствии анализ работ Карреля позволил предположить, что "бессмертие" его клеточных штаммов было, по всей видимости, результатом периодического попада-

ния в культуры свежих эмбриональных фибробластов из "эмбрионального экстракта", вводимого в культивационную среду, добавляемую к культурам через каждые 2-3 дня [150] (при исследовании старения эмбриональный экстракт в среде роста отсутствовал [153]). Независимо от вышесказанного, выводы Карреля [150, 151, 153] о "бессмертии" соматических клеток и о том, что старение есть следствие каких-то изменений в плазме (или других внеклеточных компартаментах), на полстолетия затормозили развитие клеточной биологии старения.

Вытекавший из исследований Карреля вывод о том, что культивируемые фибробласты, полученные из сердца куриного эмбриона, способны непрерывно размножаться *in vitro* в течение не менее чем 34 лет, сыграл, по-видимому, решающую роль в формировании в последующем различных геронтологических концепций. Предполагалось, что (если результаты опытов Карреля были корректными) клетки, освобожденные от влияния контролирующих их существование *in vivo* механизмов, способны к неограниченному размножению в культуре и при этом в них не возникает никаких деструктивных изменений. Таким образом, делался вывод о том, что старение организма не есть следствие соответствующей модификации составляющих его клеток, а происходит из-за определенных изменений (деструктивного характера) на уровне, по меньшей мере, тканей и органов. Однако ряд исследований, выполненных в конце 50-х - начале 60-х годов, позволил заключить, что результаты работ Карреля с сотрудниками были, по-видимому, артефактом. Более того, на основании данных этих исследований сформулировали ряд положений, которые привели в конечном счете к возникновению новой науки, названной цитогеронтологией.

История этой науки может служить ярким примером того, как иногда сделанное открытие (на фактическом уровне) практически ничего не дает науке, пока не попадает в руки человеку, способному не только зафиксировать некий научный факт, но и сделать на его основе определенные обобщения, которые в конце концов выливаются в новую концепцию.

1.2. Фибробласты

То обстоятельство, что нормальные (диплоидные) клетки человека могут поделиться в культуре лишь ограниченное число раз, стало известно ученым еще в 1957 году, когда Свим и

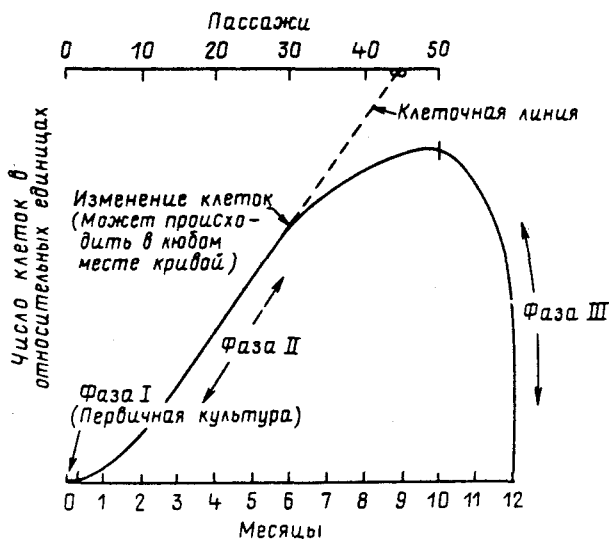


Рис. 1. Графическая интерпретация судьбы клеточных штаммов и феномена трансформации клеток (пояснения в тексте) [208]

Паркер опубликовали свою работу [340]. Однако термин "старение *in vitro*" появился гораздо позже, после того, как Леонард Хейфлик с сотрудниками не только подтвердил наблюдение Свима и Паркера, но и попытался связать факт ограниченного митотического потенциала диплоидных клеток человека в культуре с таким явлением, как старение [203, 217].

В опубликованных на русском языке обзорах и книгах так называемый "феномен Хейфлика" рассматривался неоднократно [10, 17, 18, 63, 67]. В этой связи в настоящем обзоре этот вопрос излагается в достаточно сжатом виде. При этом акцент сделан на том материале, который, на наш взгляд, изложен в указанных работах либо недостаточно полно, либо с искажениями, либо в форме, затрудняющей его восприятие.

Итак, в 1961 году Хейфлик и Мурхед подтвердили сообщение Свима и Паркера об ограниченном пролиферативном потенциале нормальных клеток человека в культуре. При этом Хейфлик всегда подчеркивает (см., например, [208]), что если клетки в экспериментах Свима и Паркера не были охарактеризованы как нормальные, то в работах самого Хейфлика такая характеристика фибробластов являлась одним из центральных вопросов. Согласно выдвигаемому им положению, все клетки, способные к неограниченному размножению *in vitro*, являют-

ся ненормальными по одному или нескольким свойствам и часто близки по характеристикам к раковым клеткам. Хейфлик предложил называть такие культивируемые клетки клеточными линиями в противоположность клеточным штаммам, состоящим из нормальных клеток.

Судьба каждого клеточного штамма, по терминологии Хейфлика, разбивается на три фазы: 1) фаза I (первичная культура) — заканчивается образованием первого сомкнутого монослоя клетками, мигрирующими из тканевого эксплантата. 2) фаза II — характеризуется интенсивным размножением клеток в течение целого ряда последовательных пересевов (как правило, в соотношении 1 : 2, т. е. от пассажа к пассажи происходит удвоение клеточной популяции). Собственно, именно клетки в этой фазе и названы Хейфликом клеточным штаммом. В принципе, в любой момент фазы II клетки (вернее сказать, какая-то их часть) могут измениться (трансформироваться) и дать начало клеточной линии с неограниченным потенциалом удвоений клеточной популяции (УКП). 3) фаза III — характеризуется резким падением пролиферативной активности клеток, интенсивным увеличением в них количества деструктивных изменений и последующей их гибелью. Именно фаза III является, по мнению Хейфлика, проявлением на клеточном уровне процесса старения. В целом ряде лабораторий было показано, что данный феномен не есть следствие определенных условий культивирования или каких-либо методических приемов, используемых при пересевах.

На рис. 1 представлено графическое изображение данного явления в интерпретации самого Хейфлика [208]. Надо заметить, что в отечественной литературе появился ряд публикаций (см. например, [19]), в которых данная схема подвергается яростным нападкам на том основании, что по ней в фазе III количество клеток резко снижается вследствие их гибели. При этом делается ссыла на работу [260], в которой, якобы, фаза III была пролонгирована на 6 и более месяцев и никакой существенной гибели клеток в ней не происходило. Рассмотрим эту работу поподробнее.

Суть ее на самом деле сводится к следующему. Эксперименты проводили на легочных диплоидных фибробластах человека двух штаммов — WI-38 и WI-26. Клетки пассировали по стандартной методике (пересевы в отношении 1 : 4 или 1 : 2 — на ранних и поздних пассажах, соответственно). Когда клетки после пересева 1 : 2 уже не образовывали сомкнутого монослоя или не удваивались в количестве в течение

двух недель, считали, что потенциал УКП исчерпан. Именно на таких "полностью состарившихся" культурах проводили все дальнейшие опыты. Клетки регулярно пересевали с помощью трипсина, отбирая часть суспензии для оценки относительного количества живых клеток с помощью специального красителя, а также для морфологических и радиоавтографических исследований. Все остальные клетки помещали во флаконы с кондиционированной средой (т. е. полученной путем фильтрации среды, в которой некоторое время росли либо "молодые", либо "бессмертные" клетки), причем всегда с достаточно низкой плотностью - $1.3 \cdot 10^4$ или $0.65 \cdot 10^4$ клеток/см²/0,4 мл. Через одну неделю инкубации в термостате 2/3 ростовой среды заменяли на свежую, после чего клетки культивировали еще неделю, а затем проводили следующий пересев по той же схеме. Таким образом, пассировали клетки через каждые две недели. При радиоавтографических исследованиях аликвоты клеточной суспензии помещали в специальные камеры, содержащие 0,4 мл кондиционированной среды, инкубировали их 24 ч, а затем на 6 дней (!) вводили в среду роста меченный тритием тимидин (0,05 мкКи/мл).

Что же обнаружили авторы? В первой серии экспериментов некоторые из "старых" культур, представлявших собой фактически небольшие части штаммов WI-38 или WI-26, действительно удалось поддерживать в жизнеспособном состоянии в течение более чем года. При этом не проявились никакие признаки спонтанной трансформации клеток. Однако возникли самые разнообразные морфологические изменения: увеличение площади, занимаемой цитоплазмой; переход формы клеток от веретенообразной к парусовидной и полигональной; вакуолизация цитоплазмы; накопление дебриса в культуре; модификация морфологии ядра. Правда, такого рода изменения наблюдались не во всех клетках культур. Но что очень важно: вакуолизация цитоплазмы и накопленный во флаконе дебрис, как правило, исчезали после посева культуры с помощью трипсина.

Необходимо также отметить, что один из признаков - измененная морфология клеточного ядра - проявлялся всегда и с хорошей воспроизводимостью: более 10% клеток имели дольчатые (разделенные на лопасти) ядра и/или больше одного ядерного района (этим термином авторы обозначали участки клетки, прокрашивающиеся "ядерным" красителем). Наиболее часто выявлялись два таких района. Все клетки с двумя и более ядерными районами считались многоядерными.

Заклячая обсуждение данных первой серии опытов, авторы подчеркивают, что специальная методика, обеспечивавшая удаление трипсина из среды роста после трипсинизации, использование кондиционированной среды и культивирование клеток при постоянно низкой плотности обеспечивают значительное улучшение выживаемости клеток.

Во второй серии экспериментов, проведенных без всяких отклонений по вышеописанной схеме, авторы выявили следующие закономерности.

Во —первых, они установили, что поддерживаемые, как описано, "старые" культуры способны сохранять жизнеспособность по крайней мере в течение 6 месяцев (речь идет именно о культурах, а не об отдельных составляющих их клетках! Правда, не очень ясно, что подразумевается под жизнеспособностью культуры в целом). Изменения количества клеток в этот период были очень медленными, причем, в случае штамма WI-38 они оказались разнонаправленными (то увеличение, то уменьшение), а в случае штамма WI-26 происходило практически монотонное возрастание суммарного числа клеток (удвоение приблизительно за 6 недель). Однако в силу больших различий между кинетикой роста трех параллельных "старых" культур клеток WI-38 авторы не смогли сделать окончательных выводов о разнице между штаммами WI-38 и WI-26 по этому показателю.

Увеличение числа клеток, наблюдавшееся в некоторых "старых" культурах, было несравнимо менее выраженным, чем в фазе II по Хейфлику, ибо: 1) интенсивность клеточной пролиферации была чрезвычайно мала, хотя клетки и культивировали с плотностью, очень далекой от плотности сомкнутого моно-слоя; 2) клетки морфологически сильно отличались от клеток, составляющих большую часть популяции в фазе II; 3) кинетика включения меченого тимидина также отличалась от таковой для клеток в фазе II.

Подчеркивается, что во всех поставленных опытах относительное количество многоядерных клеток непрерывно возрастало со временем. От 40 до 50% клеток оказались многоядерными после 15-недельной инкубации. В параллельных опытах серийно пассировали культуру клеток WI-38 от 24-го до 67-го УКП по той же схеме (пересевы каждые 2 недели), что и "старые" клетки. Относительное количество многоядерных клеток от 24-го до 54-го УКП не превышало 10%. Затем эта величина возрастала, достигая 21% в поздней фазе

III. Исследуя эмбриональную телячью сыворотку из двух

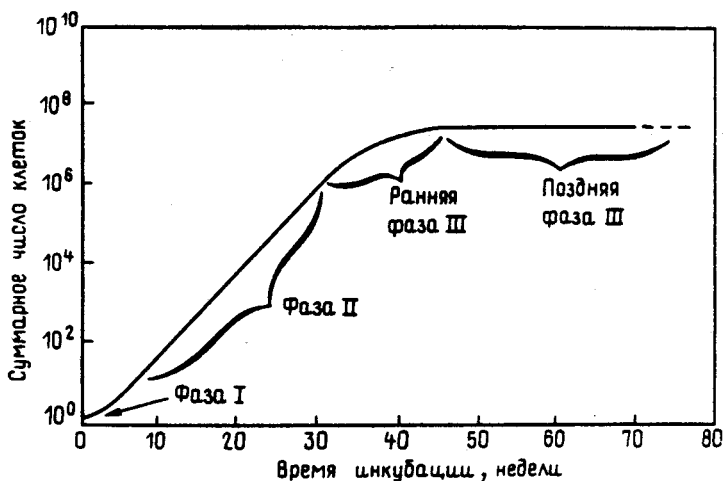


Рис. 2. Графическая интерпретация "истории жизни" культивируемых диплоидных фибробластов человека [260].

различных источников, не обнаружили влияния типа сыворотки на количество многоядерных клеток.

Включение меченого тритием тимидина действительно происходило в некоторые клетки "старых" культур до конца периода наблюдения. При этом число зерен в меченых ядрах значительно превышало величину, которую можно было бы объяснить репаративным синтезом ДНК [187]. Авторы считали, что такие меченые клетки находились в S-фазе клеточного цикла в тот или иной момент периода присутствия радиоактивного тимидина. Метились как одноядерные, так и многоядерные фибробласты. Клетки, у которых метка обнаруживалась в одной части ядерного района, но не наблюдалась в другой, встречались редко. От 60 до 90% клеток не включали метку за 6 дней инкубации культур с радиоактивным тимидином. Кинетика уменьшения со временем числа немеченых клеток в "старых" культурах заметно отличалась от таковой для культур в фазе II. В последнем случае количество немеченых клеток быстро падало в первый день инкубации с меткой, а затем снижалось медленно [259]. В "старых" же культурах этот показатель уменьшался очень медленно на протяжении всего периода мечения, при этом начальный быстрый спад полностью отсутствовал. Авторы не обнаружили корреляции между процентом немеченых клеток (вычисленным с поправкой на идущее размножение клеток) и временем пребывания культуры в поздней фазе III.

На основании полученных результатов Хейфлик несколько модифицировал первоначальную схему "истории жизни" диплоидных фибробластов человека в культуре (см. рис. 1). Этот модифицированный вариант представлен на рис. 2. Видно, что во второй схеме появилось "плато" на кривой, связанное с отсутствием уменьшения числа клеток. Именно эту схему в работе [19] призывали принять как единственную, верно отражающую суть "феномена Хейфлика". Однако ее можно считать приемлемой лишь для тех условий, в которых содержали клетки в рассмотренной работе [260], да и то только в первом приближении. Несомненно, что гибель клеток в поздней фазе III идет - и достаточно интенсивно. Подробнее на этом вопросе мы остановимся в разделах, посвященных феномену "стационарного старения". Только создание специальных "тепличных" условий позволяло небольшому пулу способных к размножению клеток (а то, что он очень невелик, ясно из данных о чрезвычайно низком индексе мечения клеток) компенсировать эту гибель (причем, судя по всему лишь частично). К сожалению из методической части работы трудно понять, каким образом (конкретно!) делались пересевы, как оценивался тот показатель, который авторы назвали "суммарным количеством клеток", в каких случаях культуры выдерживали без пересевов вообще, а в каких - регулярно пересевали и как удалось минимизировать влияние трипсина на пересейные клетки. Так как за две недели, прошедшие между пересевами, число клеток, естественно, увеличивалось незначительно, а плотность клеток при посеве оставалась все время одинаковой, то каждый пересев должен был приводить к значительному уменьшению абсолютного количества фибробластов с учетом как гибели части клеток из-за самой операции посева, так и отбора некоторого их количества для морфологических и радиоавтографических исследований. Фактически уже через несколько пассажей использованные в работе "старые" клетки должны были сойти на нет. Так как этого не произошло, приходится полагать, что высказанные выше соображения в данном случае не подтвердились. Однако причины этого остаются неясными.

Суммируя изложенное, можно сделать следующие выводы:

- 1) действительно, культура фибробластов в фазе III "по Хейфлику" способна еще достаточно долго существовать, если обеспечить соответствующие условия (культивирование в кондиционированной среде, постоянные пересевы с низкой плотностью, сведение к минимуму неблагоприятного действия трип-

сина); 2) даже при таком существовании в клетках непрерывно возникают соответствующие "старческие" изменения (например, морфологические); 3) по-видимому, попытка снятия ограничивающего пролиферацию клеток "блока", возникающего в фазе III, путем специальных методических приемов, использованных Хейфликом с сотрудниками, лишь замедляет старение культуры фибробластов (опять-таки, именно культуры, а не каждой составляющей ее клетки!), но не способно предотвратить его полностью. Вопрос о возможной взаимосвязи явления ограничения пролиферации с клеточным старением будет рассмотрен в последующих разделах.

И еще одно замечание. Как уже было сказано, корректная интерпретация анализируемой работы чрезвычайно затруднена очень плохим, на наш взгляд, изложением материала. Надо сказать, что это относится, к сожалению, практически ко всем работам Хейфлика и служит основным источником разногласий между исследователями, обсуждающими его данные в попытке понять суть явления, называемого старением *in vitro*. В качестве примера можно сослаться на одну из основополагающих работ Хейфлика, опубликованную в 1965 году [20]. В ней, в частности, приведены два рисунка, описывающие изменение количества клеток с пассажами (рис. 3 и 4). На рис. 3 представлены результаты опытов по оценке влияния степени разведения клеток при посеве (т. е. отношения, в котором делается пересев) на время наступления фазы III. Тем самым Хейфлик пытался уточнить, что важнее для наступления этой фазы: количество пересевов или количество пройденных клетками делений. Методика эксперимента описана в статье следующим образом (надо сказать, что сделано это описание почему-то два раза, причем со значительными различиями). Клетки штамма WI-38 на 14-м пассаже (это видно из рисунка, в тексте же сказано, что "размораживали клетки на восьмом пассаже, а затем на пассаже 14" - совершенно непонятно!) разделили на две части, причем одну из полученных "сестринских" культур пересевали и далее 1 : 2, а другую - 1 : 10. При каждом пересеве оценивали число клеток в 4-6 параллелях. Пересевы делали независимо два чело века (как 1 : 2, так и 1 : 10), при этом все клетки культивировали на средах из двух различных источников, дабы исключить возможность бактериального заражения во время длительного (5 месяцев) эксперимента. Остается неясным, как делался подсчет клеток и что, собственно, подсчитывали. На рисунке ось ординат помечена просто как "число клеток".

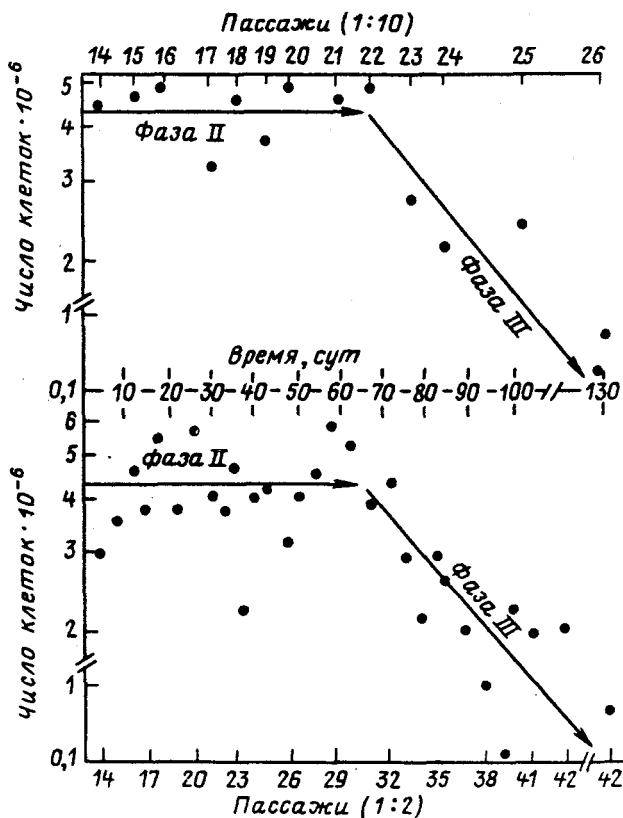


Рис. 3. Количество клеток, определявшееся на каждом пассаже штамма WI-38, для двух типов пересева: в отношении 1 : 10 и в отношении 1 : 2 (при пассировании культуры на флакон такой же площади переносили либо 1/10, либо 1/2 всех клеток) [203]

В тексте сначала сказано, что "при достижении культурой состояния сомкнутого монослоя ее пересевали, производя одновременно подсчет клеток", а затем, что "пересевы 1 : 2 делали по достижении состояния сомкнутого монослоя каждые 3 и 4 дня попеременно в фазе II и через все большие интервалы времени в фазе III. Пересевы 1 : 10 делали по достижении культурой состояния сомкнутого монослоя". Итак, что же подсчитывали? Количество клеток во флаконе в момент пересева? Плотность клеток в этот момент? Суммарное ("накопленное") число клеток? И как фиксировали наступление момента "смыкания" клеточного монослоя? Если по плотности

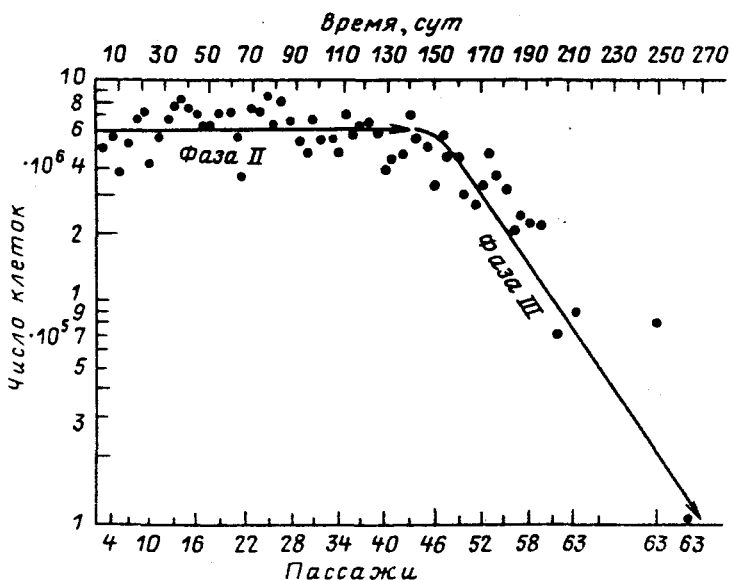


Рис. 4. Количество клеток, определявшееся на каждом пассаже штамма WI-44 [203]

клеток, которая переставала увеличиваться, то при чем тут чередующиеся интервалы в 3 и 4 дня между пересевами? Допустим, что оценивали число клеток на флакон в момент формирования сомкнутого монослоя, определяемый по достижению определенной плотности клеток (этому предположению соответствуют численные значения, отложенные на оси ординат). Тогда неясно, почему так сильно снижается этот показатель на последних пассажах. Или клеточный монослой смыкается на этих пассажах при плотности, в 40 раз меньшей, чем на ранних пассажах? И почему 42-й пассаж отмечен на оси абсцисс два раза (см. рис. 3)?

На основании данных, представленных на рис. 3, Хейфлик сделал вывод о том, что, во-первых, календарное время, необходимое для достижения клетками фазы III ("терминального периода, в котором время, необходимое для удвоения клеточной популяции, прогрессивно увеличивается"), одинаково при обоих способах пересева (1 : 2 и 1 : 10), а во-вторых, время, по прошествии которого практически прекращается пролиферация клеток и начинается их дегенерация, также одинаково в обоих случаях. Далее, на основании данных рис. 3, Хейфлик рассчитал (как - непонятно) количество клеточных поколений (надо полагать - делений) от начала эксперимента до наступления фазы III. Эти величины составили 17 поколений

для пересевов 1 : 2 и 27 - для пересевов 1 : 10. Таким образом, как указывает автор, в первом случае (18 пассажей до наступления фазы III) клетки совершали за один пассаж приблизительно одно деление, а во втором (8 пассажей до фазы III) - приблизительно 3.3 деления, что, по его мнению, очень хорошо согласуется с теоретическими оценками. При этом совершенно непонятно, почему игнорируется то обстоятельство, что в одном случае культура прошла до фазы III 27 клеточных делений, а в другом - только 17, и что количество клеток упало до минимума при пересеве 1 : 2 к 42-му пассажи, а при пересеве 1 : 10 - к 26-му, хотя, казалось бы, эти величины должны отличаться в 3.3 раза (логарифм 10 по основанию 2). Перечень несообразностей такого рода в изложении результатов рассматриваемого эксперимента можно было бы продолжить, но перейдем к следующему рисунку (см. рис. 4) из этой же статьи.

На нем представлены результаты экспериментов, которые были предприняты, дабы, как указывает Хейфлик, уточнить характер кривых, приведенных на рис. 3, проследив судьбу культуры с самых ранних пассажей до конца фазы III. Такая формулировка автоматически приводит нас к выводу, что на рис. 3 место пересечения кривой с осью абсцисс отнюдь не означает завершения фазы III, хотя раньше указывалось, что в том эксперименте фиксировались и прекращение пролиферации клеток, и их дегенерация. Надо сказать, что и минимальное количество клеток (около 10 000) одинаково на обоих рисунках.

Итак, второй эксперимент (см. рис. 4) был проведен на клетках штамма WI-44 по схеме, сходной со схемой первого опыта (см. рис. 3). Правда, при этом клетки подсчитывали от 4-го до 63-го пассажа. По поводу того, как это делалось, остаются те же вопросы, хотя одна фраза ("...большее в среднем количество клеток в фазе II для штамма WI-44 чем для штамма WI-38, связано с использованием больших культивационных флаконов") позволяет предположить, что подсчитывали все-таки число клеток на флакон. Но тогда тем более неясно, почему это число от ранних до поздних пассажей падает в 60 раз. Приходится предположить, что пересевы делались каждые 3-4 дня (так вроде бы и выходит, если посмотреть на верхнюю шкалу "время, сут"), не дожидаясь смыкания клеточного монослоя, хотя это и противоречит изложенной в соответствующем месте методике. Впрочем, все равно непонятно, почему на оси абсцисс 3 раза указан 63-й пассаж.

Тем не менее, основываясь на форме кривой, представленной на рис. 4, Хейфлик делает фундаментальный вывод о том, что "феномен фазы III" определяется механизмами, "работающими" по законам теории инактивации, основанной на признании множества ударных воздействий (multiple-hit) или множества мишеней (multiple-target).

Однако вернемся непосредственно к сути феномена старения *in vitro* диплоидных клеток.

Сам Хейфлик приводит следующие доказательства целесообразности использования его модели для изучения старения на клеточном уровне:

1) Существует обратная связь между возрастом донора клеток и потенциалом УКП. Такая обратная взаимосвязь была продемонстрирована для нормальных клеток человека, полученных из легкого [203], кожи [192, 193, 258, 314, 355], печени [248], артериальной гладкой мышцы [139], а также для Т-лимфоцитов [357].

2) Более 60 показателей увеличиваются и более 50 — уменьшаются при переходе культивируемых фибробластов человека из фазы II в фазу III (табл. 1, 2 и 3). Эти изменения затрагивают содержание и интенсивность синтеза липидов; утилизацию углеводов; содержание, синтез и распад белков; содержание, синтез и обмен РНК и ДНК; синтез ферментов и их активность; характеристики клеточного цикла; морфологию, ультраструктуру и форму клетки; процессы включения различных соединений в клетку и в макромолекулы, а также процессы, обеспечивающие стимуляцию роста клеток различными факторами.* С точки зрения Хейфлика особую

* Таблицы 1, 2 и 3, в которых суммированы данные о показателях, увеличивающихся, уменьшающихся или остающихся неизменными при старении *in vitro*, представляют собой точный перевод соответствующих таблиц, приводимых Хейвликом в одной из своих статей [212]. Нам показалось целесообразным сохранить как форму представления в них материала, так и стиль, свойственный автору. Если один и тот же показатель встречается в двух или трех таблицах, то это просто означает, что в разных проанализированных Хейвликом статьях были получены различные результаты, касающиеся характера изменения данного показателя при старении *in vitro*. Некоторые пункты в таблицах не обеспечивали однозначного толкования, в связи с чем возможна некоторая двойственность в интерпретации переведенных фраз

Таблица 1

Показатели, которые уменьшаются в конце жизни *in vitro*
фаза III) нормальных диплоидных клеток человека [212]

<u>Белки</u>	Скорость репарации ДНК
Интенсивность синтеза коллагена	Уровень индуцированных сестринских хроматидных обменов
Интенсивность синтеза коллагена и коллагенолитическая активность	Активность ДНК-полимеразы
<u>Ферменты</u>	
Скорость ацетилирования гистонов	Разнообразие изоферментного спектра лактатдегидрогеназы
Содержание общего белка и оксипролина	Уровень гликолитических ферментов
Способность к протеолизу	Уровень трансаминаз
Включение метки в гистоны	Уровень щелочной фосфатазы
<u>РНК</u>	Удельная активность лактатдегидрогеназы
Скорость синтеза РНК	Индукцибельность орнитиндекарбоксилазы
Содержание рибосомной РНК	Активность нейтральной протеазы (рН 7.8)
РНК-синтезирующая активность хроматина	Активность пролилгидроксилазы
Матричная активность хроматина	Активность орнитиндекарбоксилазы
Включение меченого уридина в клеточную РНК	Зависимость от аскорбата пролилгидроксилазной системы
Интенсивность синтеза РНК в ядре	Удельная активность и термоллабильность глутаминсинтетазы
Матричная активность выделенных ядер (только в поздней фазе III)	
<u>ДНК</u>	<u>Клеточный цикл</u>
Интенсивность синтеза ДНК	Относительное количество размножающихся клеток
Интенсивность синтеза нуклеиновых кислот	Насыщающая плотность клеточной популяции
Скорость элонгации цепи ДНК	

Максимальное число удвоений клеточной популяции как функция возраста донора

Интенсивность включения меченого тимидина

Синхронность делений, постоянство времени между делениями, подвижность

Ростовой потенциал

Процент колоний с размером выше некоторого установленного

Выживаемость клеток, уменьшаемая одной фракцией конденсата сигаретного дыма

Морфология

Пропорция митохондрий с полными поперечными кристами

Густота и регулярность расположения специализированных структур для межклеточных контактов

Количество частиц на Р-стороне мембраны препарата, полученного методом замораживания-скальвания

Количество митохондрий и гранулярного эндоплазматического ретикулума

Синтез, включение и стимуляция

Интенсивность синтеза мукополисахаридов

Интенсивность функционирования пентозофосфатного шунта

Уровень с АМР (молярные величины)

Стимуляция роста клеток путресцином

Включение радиоактивных уридина, тимидина, белкового гидролизата, ацетата, олеиновой кислоты

Интенсивность синтеза гликозаминогликанов

Продукция интерферона

Количество клеток, реагирующих на митогенную стимуляцию (смена среды роста)

Способность к синтезу белков и аминокислот

Несистематизированные показатели

Количество НЛА-разновидностей для клонируемых клеток

Адгезия к полимеризованному фибрику и влияние сокращения фибрина

Электрофоретическая подвижность (суммарный отрицательный заряд на клеточной поверхности)

Продолжительность жизни после хронического действия повышенного парциального давления кислорода

Скорость реверсии температурочувствительности мутанта G вируса герпеса

Показатели, которые увеличиваются в конце жизни in vitro (фаза III) нормальных диплоидных клеток человека [212]

<u>Липиды</u>	Стимулирующее действие полиорнитина на поглощение клеткой белков
Содержание липидов	Относительное количество быстро распадающихся белков
Интенсивность синтеза липидов	Выход аминокислот из клетки
Потребность в делипидированном сывороточном белке для стимуляции синтеза липидов	Уровень ошибок при включении метионина в гистон H1
<u>Углеводы</u>	Количество метиониновых остатков
Утилизация глюкозы	Сложность H1-полипептидных цепей
Содержание гликогена	<u>РНК</u>
<u>Белки и аминокислоты</u>	Содержание РНК
Содержание белка	Интенсивность обмена РНК
Количество белков с повышенной чувствительностью к протеолитическим ферментам (только на самых последних пассажах)	Соотношение РНК и гистонов в хроматине
Количество белкового компонента Р8	<u>Ферменты</u>
Скорость распада белков при действии на клетки аналога аминокислоты	Количество лизосом и уровень лизосомных ферментов
Интенсивность включения в клетку альбумина	Термоллабильность и активность глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы и фосфоглюконат-дегидрогеназы (декарбоксилирующей)

Активность "хроматиновых" ферментов (РНКазы, ДНКазы, протеазы, нуклеозидтрифосфатазы, NAD⁺-пирофосфорилазы)

Активность 5'-мононуклеотидазы

Активность эстеразы

Интенсивность "полосы 3" кислой фосфатазы

Уровень кислой фосфатазы

Активность β -D-глюкуро-нидазы

Активность связанной с мембраной АТФазы

Активность протеазы (рН 3.4) (на средних пассажах - уменьшение)

Уровень N-ацетил- β -глюкозаминидазы

Уровень 5-нуклеотидазы

Уровень цитохром с-оксидазы

Активность тирозинаминотрансферазы

Кислые гидролазы

Уровень α -D-маннозидазы

Уровень N-ацетил- β -D-галактозаминидазы

24

Уровень N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы

Уровень β -L-фукозидазы

Уровень β -D-галактозидазы

Активность γ -глутамил-трансферазы

Активность моноаминоксидазы

Морфология

Размеры и объем клетки

Количество и размеры лизосом

Количество остаточных телец

Число цитоплазматических микрофибрилл

Количество эндоплазматического ретикулума (шероховатого и гладкого)

Интенсивность корпускулярной внутриклеточной флуоресценции

Размеры ядра в медленно делящихся и совсем не делящихся клетках

Средняя площадь, занимаемая ядром, в клетках доноров в возрасте 8, 40 и 84 года

Размеры клеток в фазах G₁ и G₂+M клеточного цикла

Количество частиц на Е - стороне мембраны препарата, полученного методом замораживания-скальвания

Количество микроворсинок на клеточной поверхности, степень конденсации хроматина и количество плотных телец

Количество клеток с длинными, тонкими, плотными митохондриями и с образованиями причудливой формы, а также клеток, в которых наблюдается дегенерация филаментов

Количество везикул в клетке и количество складок на краях внутриклеточных образований

Относительное число клеток с одним большим ядрышком в ядре

Средние величины площади ядра и его сухой массы

Клеточный цикл

Время удвоения численности клеточной популяции

Гетерогенность клеточной популяции по продолжительности митотического цикла

Количество медленно делящихся и совсем не делящихся клеток

Продолжительность митотического цикла

Выживаемость клеток в присутствии некоторых фракций конденсата сигаретного дыма

Несистематизированные показатели

Содержание сАМР на мг белка

Устойчивость к облучению в сублетальных дозах

Время реакции на митогенную стимуляцию (смена среды роста)

Скорость реверсии температурочувствительного мутанта Е вируса герпеса

Интенсивность репарации ДНК в клетках, переведенных в стационарную фазу снижением концентрации сыворотки в среде

Скорость транспорта уридина

Содержание сАМР

Показатели, которые не меняются в конце жизни *in vitro* (фаза III) нормальных диплоидных клеток человека [212]

<u>ДНК и РНК</u>	
Уровень растворимой РНКазы, растворимой ДНКазы, растворимой серил-тРНК-синтазы, растворимой и связанной с хроматином ДНК-полимеразы	Уровень глутаматдегидрогеназы
Средняя температура денатурации ДНК и хроматина	Уровень щелочной фосфатазы
Отношение "гистоны/ДНК"	Активность супероксиддисмутазы
Скорость воссоединения нитей ДНК и способность к репаративной репликации	Термолабильность глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы
Матричная активность хроматина	Активность каталазы
Интенсивность синтеза РНК в нуклеоплазме	Активность лизингидроксилазы
Термолабильность ДНК, РНК и белков-предшественников, оцениваемая по относительным профилям (небольшое увеличение на последних пассажах)	Уровень ферментов "γ-глутамилового цикла"
Уровень внепланового синтеза ДНК в культурах, находящихся в состоянии сомкнутого монослоя	Удельная активность и термолабильность глюкозофосфатизомеразы
	Интенсивность возникновения модификаций глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы
	Уровень N-ацетил-α-D-галактозаминидазы
	Уровень N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы-β-D-глюкозидазы
	Уровень сульфит-цитохром с-редуктазы
	<u>Клеточный цикл</u>
<u>Ферменты</u>	Длительность S-фазы клеточного цикла
Уровень дыхательных ферментов	

Длительность цикла для клеток, отобранных в митозе

Кариология

Диплоидность (некоторые изменения только в самом конце фазы III)

Количество преждевременно конденсированных хромосом

Относительное количество полиплоидных клеток, образующихся под действием колхицина

Синтез и деградация

Интенсивность гликолиза

Количество синтезированных с ошибками или подвергшихся посттрансляционной модификации белков

Интенсивность превращения глутамата в пролин или оксипролин

Ингибирование гидроксирования гидралазином

Увеличение V_{max} транспорта уридина при стимуляции роста клеток сывороткой

Способность деградировать нормальные или содержащие аналоги аминокислот белки

Циклические AMP и GMP

Концентрация cAMP

Активность cAMP-cAMP-фосфодиэстеразы

Степень уменьшения K_m cAMP-фосфодиэстеразы при стимуляции роста клеток сывороткой

Уровни cAMP и cGMP

Вирусология

Чувствительность к вирусам

Титр полиовируса и вируса герпеса, скорость мутирования и химия белков

Антивирусный(ые) ген(ы) хромосомы 21

Скорость реверсии температурочувствительного мутанта D вируса герпеса

Интенсивность синтеза РНК вируса везикулярного стоматита

Чувствительность к интерферону

Морфология

Число митохондрий

Число внутримембранных частиц

Несистематизированные показатели

Необратимые абсорбция и включение чужеродных макромолекул

Текущая мембран

Содержание фосфолипидов и нейтральных жиров	Выживаемость клеток при околонулевых температурах (17 лет)
Влияние никотина	Дыхание
Влияние канцерогенных полициклических углеводов	Количество HLA -разновидностей (массовые культуры)

важность имеет то обстоятельство, что многие из этих изменений, происходящих *in vitro* перед фазой III и во время нее, сходны с изменениями, происходящими *in vivo* - в организме человека и животных при их старении. В этой связи он подчеркивает, что ограниченная способность культивируемых нормальных клеток к пролиферации не может быть сама по себе так важна для понимания сути старения *in vivo*, как весь набор биохимических, физиологических и морфологических изменений, которые ему предшествуют [208, 210, 211, 213, 214]. Хейфлик также отмечает, что отрицание состоятельности его модели на том основании, что фибробласты не являются функционально значимыми клетками, не может быть принято, ибо данный список (см. табл. 1 и 2) как раз и включает 110 функциональных, по его мнению, свойств, несомненно меняющихся при старении фибробластов в культуре. Одно из них, продукция коллагена, является специализированной физиологической функцией данных клеток.

3) В дополнение к известным экспериментам *in vitro* проведены и соответствующие исследования *in vivo*, заключающиеся в серийной трансплантации нормальных клеток. При этом были получены сходные результаты. Таким образом, нормальные клетки обладают ограниченной репликативной способностью и в тех, и в других условиях. Эти полученные *in vivo* результаты позволяют, по мнению Хейфлика, отвергнуть предположение о возможности создания условий культивирования, при которых пролиферативный потенциал нормальных клеток станет неограниченным. Даже при трансплантации нормальных клеток *in vivo*, когда условия для их существования можно считать идеальными, фаза III со всеми ее сопровождающимися признаками все равно наступает [208, 211].

4) Все больше накапливается данных, позволяющих предположить наличие положительной корреляции между продолжительностью жизни вида (под которой, как правило, понимается максимальная продолжительность жизни) и потенциалом УКП

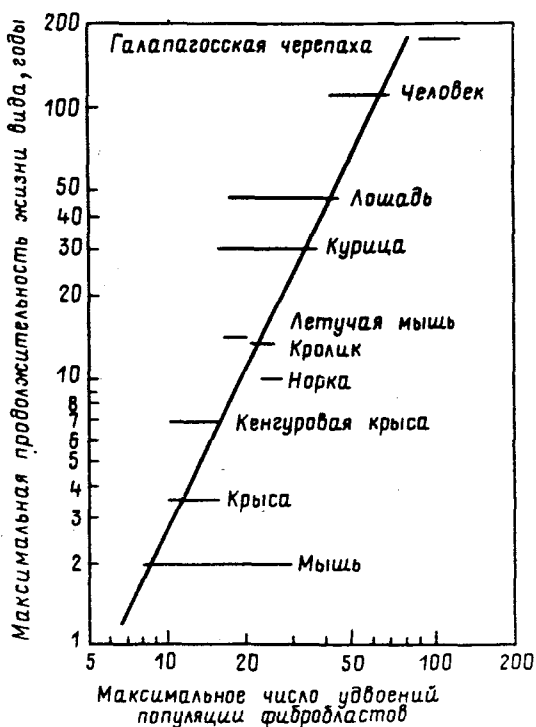


Рис. 5. Потенциал удвоений клеточной популяции для культивируемых нормальных фибробластов, полученных от животных 10 различных видов, в первом приближении пропорционален максимальной продолжительности жизни вида [216]

для клеток, полученных от животных этого вида. На рис. 5 приведены данные о потенциале УКП для культивируемых нормальных фибробластов животных 10 видов, различающихся по продолжительности жизни [211, 300].

5) Латентный период, то есть время, необходимое для миграции клетки на определенное расстояние из культивируемого тканевого эксплантата, увеличивается с увеличением возраста донора [208].

6) Потенциал УКП для культивируемых нормальных фибробластов человека значительно уменьшается, если клетки получают от больных с прогерией, синдромом Вернера и с синдромом Кокейна (сравнение с клетками от здоровых доноров того же возраста). Все эти заболевания сопровождаются преждевременным старением организма [208].

Таблица 4

Сравнение количества пассажиров, которое проходят штаммы нормальных диплоидных клеток человека (эмбриональных и постнатальных) до вступления фазы III* [208].

Эмбриональные легочные		Постнатальные легочные		
Штамм	Номер пассажи (УКП), на котором наступила фаза III	Штамм	Номер пассажи (УКП), на котором наступила фаза III	Возраст до-но-ра
WI -1	51	WI -1000	29	87
WI -3	35	WI -1001	18	80
WI -11	57	WI -1002	21	69
WI -16	44	WI -1003	24	67
WI -18	53	WI -1004	22	61
WI -19	50	WI -1005	16	58
WI -23	55	WI -1006	14	58
WI -24	39	WI -1007	20	26
WI -25	41			
WI -26	50			
WI -27	41			
WI -38	48			
WI -44	63			
Среднее	48		Среднее	20
Разброс	35-63		Разброс	14-29

* Все штаммы пересевали в отношении 1 : 2. Эмбриональные клетки получали из материала медицинских аборт (3-4 мес. беременности). Как эмбриональные, так и постнатальные штаммы получены из тканей и мужчин, и женщин

7) Многие теории старения постулируют в качестве его причины уменьшение с возрастом эффективности функционирования систем репарации ДНК. В связи с этим Хейфлик делает акцент на фактах, свидетельствующих, во-первых, о прямой зависимости между продолжительностью жизни вида и способностью его кожных фибробластов репарировать индуцированные УФ-излучением повреждения ДНК [201], а во-вторых, о снижении интенсивности внепланового синтеза ДНК в культивируемых клетках человека, вступивших в фазу III [207].

Что касается влияния возраста донора на свойства его культивируемых клеток, то первые данные, полученные самим Хейфликом, свидетельствовали лишь о различиях между эмбриональными и постнатальными (т. е. от взрослых людей) легочными фибробластами по потенциалу УКП (табл. 4). Было установлено, что если эмбриональные клетки проходят в культуре в среднем 48 УКП (исследовано 13 штаммов, разброс — от 35 до 63 УКП), то постнатальные (возраст доноров — 26–87 лет) — в среднем 20 УКП (8 штаммов, разброс — от 14 до 29 пассажей). Проведенный нами статистический анализ данных табл. 4 показал, что данное различие между эмбриональными и "взрослыми" фибробластами очень высоко достоверно ($p = 3.2 \cdot 10^{-6}$).

Для кожных фибробластов человека обратная зависимость потенциала УКП от возраста донора наиболее отчетливо была продемонстрирована в работе [258], авторы которой, исследовав клетки около 100 людей в возрасте от 0 (новорожденные) до 90 лет, показали, что потенциал УКП снижается приблизительно на 0.2 УКП в год (коэффициент корреляции равен — 0.5; регрессия значима, $p < 0.01$). Графически эта зависимость представлена на рис. 6.

Необходимо иметь в виду, что потенциал УКП в значительной степени зависит от типа ткани, из которой получены клетки [258], и, кроме того, сильно варьирует от донора к донору [21, 90, 258]. Правда, в двух последних работах исследовали не непосредственно потенциал УКП кожных фибробластов человека, а косвенный его показатель — эффективность клонирования, основываясь на том факте, что относительное количество в популяции клеток, способных образовывать колонии из 16 и более клеток, хорошо коррелирует с потенциалом УКП [323]. Авторы выявили высокую воспроизводимость показателя эффективности клонирования для каждого отдельного штамма фибробластов. Кроме того, они показали, что хромосомный дисбаланс (трисомия по 7-й, 9-й и

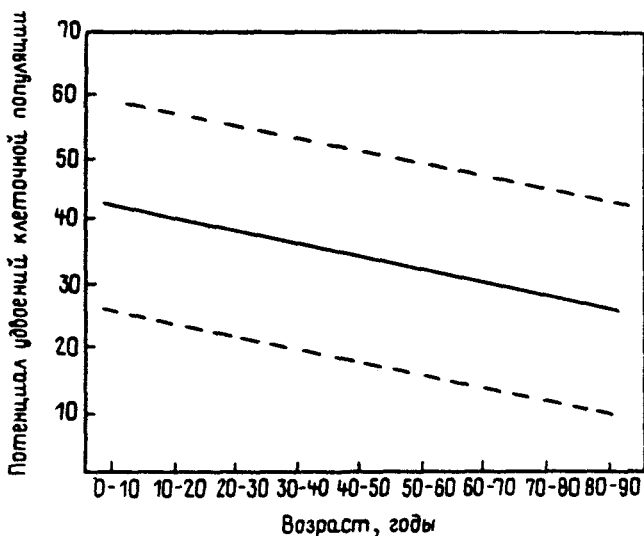


Рис. 6. Зависимость потенциала удвоений клеточной популяции для кожных фибробластов человека от возраста донора. Пунктирными линиями показан 95%-ный доверительный интервал [258]

14-й хромосомам, моносомия по 21-й хромосоме, триплоидный набор хромосом; все данные объединены в одну группу) в случае эмбриональных фибробластов вызывает снижение эффективности клонирования клеток. В случае постнатальных (т.е. полученных от взрослых людей) штаммов хромосомный дисбаланс (синдром Дауна, синдром Тернера, синдром поли-Х; все данные объединены в одну группу) не влиял на эффективность клонирования. На наш взгляд, для корректного вывода о различии во влиянии хромосомного дисбаланса на пролиферативный потенциал фибробластов человека необходимо было исследовать эмбриональные клетки с теми же хромосомными нарушениями, что и у постнатальных (особенно с учетом того обстоятельства, что, как отмечается в статье, те хромосомные нарушения, которые были у эмбриональных клеток, не встречаются у постнатальных вследствие прекращения в случае таких нарушений развития организма в эмбриональном периоде). В работах [21, 90] не было указано, достоверно ли различаются между собой по эффективности клонирования диплоидные эмбриональные и постнатальные клетки. Мы, используя данные, приведенные в статье [21], (рис. 7), провели соответствующие расчеты и обнаружили, что между эмбриональными и

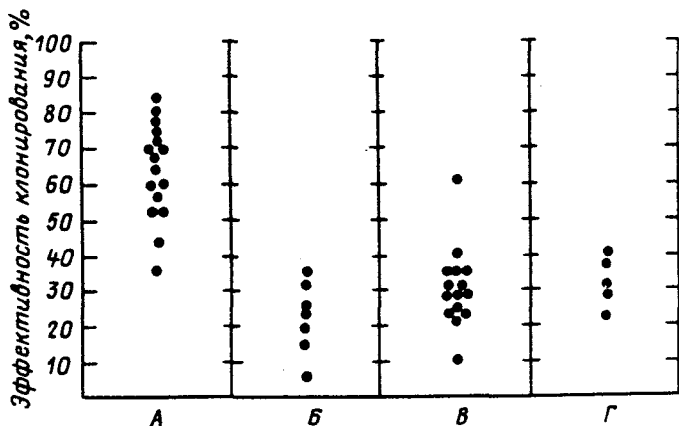


Рис. 7. Эффективность клонирования кожных фибробластов человека в норме и при наследственной патологии. А - эмбриональные диплоидные штаммы, Б - эмбриональные анеуплоидные штаммы, В - постнатальные диплоидные штаммы, Г - постнатальные анеуплоидные штаммы [21]

постнатальными штаммами диплоидных клеток существует высоко достоверное различие по эффективности клонирования (а, значит, если предположение о связи этого показателя с пролиферативным потенциалом штамма верно, и по потенциалу УКП): уровень значимости составляет приблизительно $2 \cdot 10^{-6}$. Однако различия между эмбриональными и постнатальными анеуплоидными клетками оказались недостоверными (уровень значимости различий - приблизительно 0,10). Причины этого феномена остаются неясными. С одной стороны, получается, что для диплоидных фибробластов потенциал УКП действительно сильно зависит от возраста донора клеток. С другой стороны - в случае анеуплоидных фибробластов такой зависимости Гринберг и Терехов не выявили, что, на наш взгляд опять-таки может быть связано с разным типом нарушений хромосомного набора у эмбриональных и "взрослых" клеток, исследованных в работе. Не очень ясен в этой связи вывод авторов о том, что "хромосомный дисбаланс сам по себе если и влияет на пролиферацию, то незначительно, однако его эффект может накладываться на имеющуюся в популяции изменчивость этого показателя, приводя к сдвигу распределения в сторону более низких значений". Во-первых, как нам кажется, сдвиг распределения и означает изменение эффективности кло-

нирования, фиксируемое на уровне клеточной популяции. И во-вторых, остается неясным, почему хромосомный дисбаланс, повлияв на одни клетки, не оказал влияния на другие (или повлиял на них в другой степени), что привело к исчезновению "возрастных" различий по эффективности клонирования между эмбриональными и постнатальными фибробластами.

На наш взгляд, вопрос о влиянии изменений кариотипа на пролиферативные свойства культивируемых клеток до сих пор остается неясным. В своей работе, опубликованной еще в 1977 году [208], Хейфлик даже выделил специальную главу, которую так и назвал: "Известны ли клетки с нормальным кариотипом, которые не стареют *in vitro*?". В этой главе он попытался проанализировать все известные к тому времени сообщения о нормальных клетках, обладающих неограниченным потенциалом УКП в культуре. Вывод автора однозначен: если клетки кариотипически нормальны, они обязательно должны обладать ограниченным митотическим потенциалом. Естественно, что Хейfliка нельзя в подобном вопросе считать лицом объективным: в каждой публикации, посвященной "бессмертной" нормальной клеточной культуре, он пытается выявить методические огрехи, ибо такого рода открытия бросают тень на его собственную модель. Мы говорим это не в упрек Хейfliку по-видимому, такова стратегия любого ученого, пытающегося отстоять свою научную платформу. Однако авторитет Хейfliка в области исследований "старения" клеточных культур сыграл в данном случае свою роль: высказываемая в его статьях точка зрения, согласно которой все клеточные штаммы (или линии?), способные к неограниченному размножению, обладают аберрантным кариотипом, получила достаточно широкое распространение и принимается сейчас большинством ученых.

В той работе 1977 года [208] Хейfliк уделил особое внимание данным, касающимся потенциала УКП культивируемых гемопластических клеток. Именно для такого типа клеток наиболее часты сообщения о "бессмертии" культур, сочетающемся с нормальным кариотипом. Вернее сказать, речь шла обычно о достаточно низком проценте в популяции клеток с аберрантным кариотипом. Например, в работе [268], которую цитирует Хейfliк, авторы признали исследуемую линию гемопластических клеток нормальной на том основании, что количество клеток с нарушенным хромосомным набором не превышало на всех пассажах 15%. Именно это обстоятельство позволило Хейfliку заключить, что данная линия не могла считаться нормальной, ибо не отвечала соответствующим требова-

ниям, предъявляемым к диплоидным клеткам человека [154, 155, 269]. Остается неясным, чем же определяется четкая граница в уровне анеуплоидных клеток между нормальными и ненормальными штаммами (линиями).

Впрочем, не найдя дефектов в качестве кариологического анализа клеток, выполненного некоторыми авторами, выявившими неограниченное размножение в культуре кариотипически нормальных клеток (например, [245]), Хейфлик предложил [208], во-первых, считать нормальным только штамм, в котором не менее 95% диплоидных клеток (в вышеуказанной работе, выполненной на клетках крысы, этот показатель опять-таки составил около 85%), и во-вторых, сделать обязательной для заключения о нормальности клеток проверку их на злокачественность путем подсадки животным с подавленной системой иммунитета.

Даже если согласиться с соображениями Хейfliка об обязательной "ненормальности" клеток с неограниченным митотическим потенциалом, то останется неясным, почему обратный вывод абсолютно точно не работает: клетки всех больных с хромосомными нарушениями способны только к ограниченному числу делений в культуре. Получается, что, становясь "бессмертными", клетки в обязательном порядке должны становиться и кариотипически ненормальными (именно в смысле отклонения от "стандартного" кариотипа — 44 аутосомы и две половые хромосомы в случае человека), однако приобретение клетками аномального хромосомного набора отнюдь не делает их "бессмертными". Несомненно, что этот вопрос нуждается в дальнейших исследованиях.

Кроме пролиферативного потенциала в сравнительном аспекте были изучены и многие другие показатели культивируемых клеток доноров разного возраста. В табл. 5 приведен составленный Хейfliком в 1980 году перечень свойств культивируемых клеток взрослых людей, которые отличают их от таких же клеток, полученных от эмбрионов или новорожденных. Обращает на себя внимание тот факт, что большая часть приведенных в таблице показателей тем или иным образом связана опять-таки с пролиферативными способностями клеток, их размножением.

Большой вклад в исследование различий между культивируемыми клетками людей разного возраста внесли работы, выполненные в Национальном институте Старения США под руководством Э.Л. Шнайдера. По мнению Шнайдера, изучение клеточного старения путем оценки различных параметров у кле-

Свойства культивируемых клеток взрослых людей, которые отличают их от таких же клеток, полученных от эмбрионов или новорожденных [213]

Уменьшенный потенциал УКП

Более легкая индукция антивирусного (ых) гена (ов) хромосомы 21

Обмен ацильных групп и высвобождение меченого изотопа (эмбриональные клетки сохраняют фосфолипидные ацильные группы)

Замедленное уменьшение относительного количества меченных ^3H -тимидином клеток

Увеличенное количество инсулина, связывающегося со специфическими рецепторными участками

Более интенсивная реакция на гидрокортизон, выражающаяся в увеличении скорости роста

Уменьшенная скорость миграции фибробластов

Уменьшенная насыщающая плотность клеток (количество клеток на единицу площади в состоянии сомкнутого монослоя)

Уменьшенная скорость размножения клеточной популяции

Увеличенная активность аденозиндеаминазы

Увеличенный латентный период для миграции клеток из эксплантатов

Меньшее число клеток, синтезирующих ДНК (в расчете на сутки), на ранних пассажах и увеличенное время, необходимое для достижения насыщающей плотности

ток ранних и поздних пассажей может считаться целесообразным только в случае обязательного проведения параллельных исследований на клеточных культурах (на ранних пассажах, когда модификацией клеток в процессе их старения *in vitro* можно пренебречь), полученных от доноров разного возраста [310]. Если изменения, наблюдаемые при увеличении числа

УКП, пройденных клетками, наблюдаются и с увеличением возраста донора, то они с большой вероятностью имеют отношение к "истинному" (*in vivo*) старению. И наконец, в обязательном порядке эти данные, как полагает Шнайдер, должны согласовываться с результатами экспериментов, в которых старение исследуется *in vivo* на животных [295].

Идеальным способом изучения культивируемых клеток доноров разного возраста явились бы, конечно, лонгитудинальные исследования, в которых кожные биопсии регулярно берутся у одних и тех же индивидуумов по мере увеличения их возраста. К сожалению, такого рода исследования потребовали бы работы 2-3 поколений ученых. Надо сказать, что в рамках Балтиморского Лонгитудинального Исследования Старения, проводимого Геронтологическим Исследовательским Центром Национального Института Старения США, такие работы ведутся. Большая группа людей состоит на учете в этом институте, и каждые 18 месяцев они являются туда для комплексного обследования, включающего, в том числе, и получение кожной биопсии. Однако к настоящему времени срок этого грандиозного по замыслу эксперимента еще не очень велик, поэтому все данные Шнайдера с сотрудниками, касающиеся влияния возраста донора клеток на их свойства, получены в поперечных исследованиях [295].

Первое, что было выявлено в этих экспериментах - это влияние возраста донора на кинетику роста его культивируемых кожных фибробластов в пределах одного пассажа. На рис. 8 приведены результаты одного из таких экспериментов. Видно,

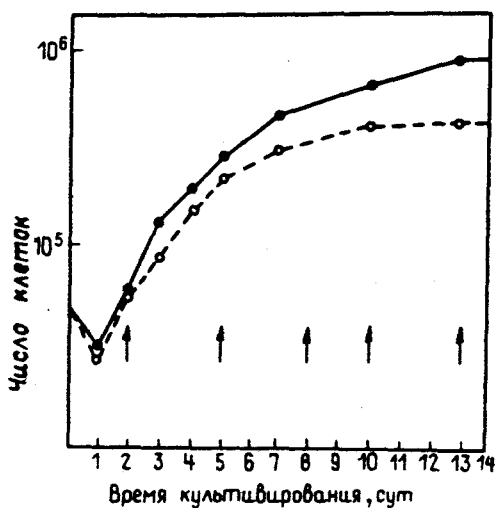


Рис. 8. Кривые роста клеточной популяции для культивируемых кожных фибробластов, полученных от молодого (28-летнего, ●-●-●) и старого (89-летнего, ○-○-○) доноров. Стрелками показаны смены ростовой среды [314]

что культура клеток старого (89 лет) человека не только медленнее размножается, чем культура фибробластов молодого (28 лет) донора, но и достигает меньшей насыщающей плотности (уровень "плато" на кривой).

Было также установлено, что доля быстро размножающихся клеток в культуре (оцениваемая с помощью инкубации культуры с меченым тритием тимидином и дальнейшего подсчета количества меченых ядер с помощью радиоавтографии) достоверно меньше для фибробластов доноров старшей возрастной группы.

Шнайдер с сотрудниками [323] провели также исследования способности клеток к образованию колоний. В их экспериментах около 60% фибробластов молодого (33 года) донора образовывали колонии, состоящие из 256 и более клеток (8 и более УКП). В случае же фибробластов старого (80 лет) донора эта величина составила лишь 2% (рис. 9). Исследовав 17 культур клеток людей разного возраста, Шнайдер с сотрудниками пришли к выводу о высоко достоверных различиях по колониеобразующей способности между фибробластами молодых и старых доноров [295].

Проверяя концепцию Оргела [286], согласно которой с возрастом происходит непрерывное накопление ошибок на уровне транскрипции и трансляции, пока "катастрофа ошибок" не приведет к смерти клетки, Шнайдер с сотрудниками постарались выяснить, нет ли в старых клетках ухудшения синтеза макро-

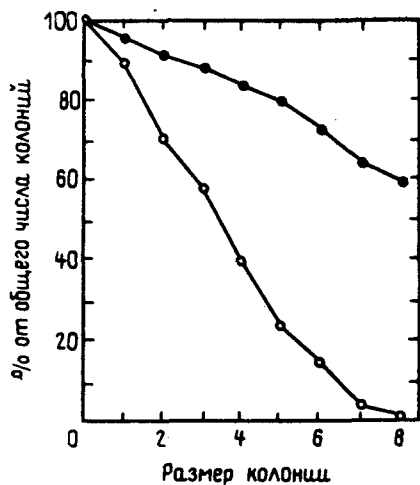


Рис. 9. Относительное количество (в процентах) колоний, способных достичь размера не меньше данного. Размер колоний выражен в виде \log_2 числа клеток в колонии. Кожные фибробласты, полученные от молодого (33-летнего, ●—●—●) и старого (80-летнего, ○—○—○) доноров, подвергли клонированию на 10-м УКП *in vitro* [295]

молекул. Предполагалось, что при заражении вирусом дефектные по макромолекулярному синтезу клетки будут производить меньше инфекционно активных вирусных частиц. Однако оказалось, что зараженные вирусом везикулярного стоматита кожные фибробласты старых людей производят даже несколько больше (хотя и недостоверно) инфекционно активных вирусов, чем клетки молодых доноров [160]. Это позволило авторам заключить, что при увеличении возраста донора клеток интенсивность и/или "качество" синтеза макромолекул по крайней мере не уменьшаются. Исследование содержания в фибробластах РНК и белка также не выявило достоверного влияния на эти показатели возраста донора клеток [314].

Использование разработанного в 70-х годах метода дифференциальной окраски сестринских хроматид с помощью бромдезоксисуридина (БДУ) [38, 246, 311] позволило группе исследователей под руководством все того же Э.Л. Шнайдера изучить уровень сестринских хроматидных обменов (СХО) в культивируемых фибробластах старых и молодых людей. Этот показатель, как считалось, является хорошим индикатором количества повреждений ДНК в клетке. Оказалось, что спонтанный уровень СХО в "молодых" и "старых" клетках практически одинаков. Однако уровень СХО, индуцированных митомицином С, был достоверно снижен в клетках старых людей [243, 313, 315]. На основании этих результатов авторы сделали вывод о том, что реакция культивируемых клеток на повреждение ДНК изменяется с увеличением возраста их донора.

Данные экспериментов, проведенных этой группой исследователей на диплоидных кожных фибробластах, полученных от молодых и старых людей, суммированы в табл. 6 [295]. Видно, что все показатели, связанные с пролиферативной активностью клеток, достоверно изменяются с увеличением возраста донора. Авторы подчеркивают, что в проведенных исследованиях очень важны как стандартизация процедур взятия биопсии и культивирования клеток, так и отбор для исследования только негоспитализированных доноров, ибо целый ряд заболеваний может влиять на клеточную пролиферацию. Кроме того, отмечается, что возраст исследованных старых людей составлял 65 и более лет, т. е. данная популяция состояла из достаточно жизнеспособных индивидов, переживших многих из своих сверстников. Это почти наверняка должно было привести к недооценке степени изменений клеток *in vivo*, обнаруживаемой в опытах *in vitro*.

Таблица 6

Результаты некоторых исследований, выполненных на культурах кожных фибробластов, полученных от молодых и старых людей (число в скобках представляет собой количество исследованных клеточных культур; указаны средние \pm ошибка среднего) [295]

Возрастная группа	Молодые (20-35 лет)	Старые (65 и более лет)
Время УКП (ч)	20,8 \pm 0,8	24,3 \pm 0,9
% делящихся клеток *	87,7 \pm 1,6 (7)	79,6 \pm 2,5 (7)
Плотность клеток в состоянии сомкнутого монослоя ($\cdot 10^4$ кл/см ²)	7,31 \pm 0,42 (18)	5,06 \pm 0,52 (18)
% клеток, способных образовывать колонии из 16 и более клеток **	69,0 \pm 3,3 (9)	48,0 \pm 4,4 (8)
Уровень индуцированных СХО на клетку ***	69,9 \pm 1,6 (7)	56,1 \pm 1,4 (6)
Количество бляшкообразующих вирусных единиц на клетку ****	83,7 \pm 37,6 (9)	223,2 \pm 61,0 (9)

* Определяли путем инкубации клеток в течение 24 ч с меченым тритием тимидином и последующей оценки количества меченых ядер с помощью радиоавтографии

** Через две недели после посева с низкой плотностью

*** Клеточные культуры инкубировали в течение 48 ч с 7,5 мг митомицина С на мл среды роста

**** В клеточные культуры вносили (с низкой множественностью заражения) вирус везикулярного стоматита и через 24 ч оценивали в среде количество бляшкообразующих вирусных частиц (метод см. [160].)

Указывается также на то обстоятельство, что наибольший интерес выявленные возрастные изменения пролиферативных характеристик клеток имеют в плане переноса данных на иммунную систему, ибо для остальных систем организма, по-видимому, такие изменения не могут играть существенной роли [295].

Механизмы старения клеток в культуре "по Хейфлику" до сегодняшнего времени остаются неясными. Собственно, речь в данном случае идет о природе и локализации "счетчика", оценивающего количество пройденных клеткой делений и дающего сигнал к проявлению признаков фазы III. Как отмечает сам Хейфлик в одной из своих проблемно-теоретических работ [216], все теории, касающиеся механизмов "феномена фазы III", то есть истощения митотической активности нормальных клеток при их длительном пассировании *in vitro*, можно разбить на две большие группы. В первую группу попадают концепции, согласно которым старение *in vitro* генетически запрограммировано и происходит вследствие:

- 1) активной экспрессии специфических "генов старения";
- 2) активной репрессии "генов долголетия";
- 3) пассивного (стохастического) нарушения точности процессов передачи генетической информации.

Согласно положениям теорий этой группы, фундаментальная причина старения клеток в культуре должна с высокой вероятностью крыться в ядре, а не в цитоплазме.

Ко второй группе, по классификации Хейфлика, относятся теории, постулирующие в качестве причины старения клеток *in vitro* непрерывное накопление со временем повреждений клеточных органелл или ошибок в цитоплазматических макромолекулах, содержащих генетическую информацию. Таким образом, согласно этим концепциям, изменения цитоплазматических факторов являются решающими в определении "феномена фазы III".

Некоторую ясность в этот вопрос удалось внести исследованиями соматических клеточных гибридов (подробный обзор методов, а также данных, полученных этими методами и касающихся механизмов клеточного старения, см. [41, 42]). Этот подход позволяет получать три основных типа клеток [295]:

- 1) гетерокарионы, образуемые слиянием целых клеток (ядра остаются раздельными);
- 2) синкарионы - клетки со слитыми ядрами;
- 3) клетки, образованные слиянием цитопластов (клеток без

ядер) с карิโอпластами (ядер с тонкой оболочкой из цитоплазмы).

Впервые старение в культуре нормальных диплоидных фибробластов человека такими методами изучал Литлфилд [251]. Он сливал "молодые" (то есть взятые на ранних пассажах) и "старые" (взятые на поздних пассажах), а также "старые" и "старые" клетки в надежде получить эффект комплементации и увеличить потенциал УКП. Однако добиться этого Литлфилду не удалось, вследствие чего он заключил, что "старческий" фенотип ведет себя как доминантный во всех исследованных комбинациях, использованных для получения гибридных колоний.

Позже другие исследователи [222] сливали "молодые" фибробласты человека из разных штаммов, несколько различающихся по потенциалу УКП. У гибридов потенциал УКП оказался промежуточным между этими показателями для "родительских" клеток. В связи с этим авторы сделали вывод, что интенсивность старения *in vitro* наследуется кодоминантно.

К сходным выводам пришли и авторы работ [283] и [293], исследуя гетерокарионы "старых" и "молодых" диплоидных фибробластов человека. Хейфлик, однако, анализируя эти данные, отмечает [216], что клетки одного из четырех точных штаммов, использованных в работе [283], обладали кариотипом 47, XXУ и в связи с этим не могли корректно считаться нормальными диплоидными. Надо заметить, что в указанных исследованиях не оценивали потенциал УКП для изучаемых клеток. Вместо этого анализировали включение ³H-тимидина в ди- и поликарионы. Как и в предыдущих работах, "старческий" фенотип оказался доминантным. Гибриды между "старыми" и "молодыми" клетками вели себя так, как будто бы они были "старыми", и не включали меченый тимидин. Надо сказать, что результаты всех этих исследований не противоречат теориям ни первой, ни второй групп [216].

Лишь в работах [370 - 372] авторам удалось дать более определенный ответ на вопрос о том, где в нормальных диплоидных культивируемых клетках локализован "счетчик", определяющий наступление фазы III. В опытах по слиянию полученных с помощью цитохалазина В цитопластов "молодых" или "старых" диплоидных фибробластов человека с "молодыми" или "старыми" целыми клетками, обладающими инактивированной цитоплазматическим ядом цитоплазмой, было установлено, что, по-видимому, именно ядро определяет поведение клетки как "старой". Таким образом, эти данные свидетельствовали в пользу первой группы теорий старения "по Хейфлику".

Дальнейшие исследования, проведенные под руководством Хейфлика [274] и выполненные на клетках, реконструированных из цитопластов "старых" и "молодых" клеток, подтвердили доминантность "старого" ядра. Однако в данной работе было также установлено, что цитопласты, полученные из "старых" клеток, содержат некие факторы, которые влияют на потенциал УКП, свойственный "молодым" ядрам. Это позволило Хейфлику сделать вывод о том, что старение диплоидных фибробластов человека *in vitro* может являться следствием нескольких отдельных явлений, хотя основная роль в определении этого процесса принадлежит все-таки ядру [216].

В связи с вышесказанным, интересно было, конечно, изучить возможность "омоложения" нормальных диплоидных фибробластов путем их слияния с клетками "бессмертных" (то есть обладающих неограниченным потенциалом УКП) линий. И целый ряд таких исследований был предпринят [273, 275, 279, 282, 293, 337]. Оказалось, что слияние такого рода "полностью трансформированных" клеток с нормальными клетками, находящимися в - фазе III, по-видимому, восстанавливает у последних способность к индукции синтеза ДНК на "старом" геноме [282, 293].

На основании экспериментов по реконструкции клеток были сделаны выводы, что как ядро, так и цитоплазма трансформированной клетки способны инициировать синтез ДНК в "старых" клетках человека. Впрочем, инициация синтеза ДНК еще не означает инициации пролиферации клеток. Это было, в частности, продемонстрировано в опытах по введению ядер куриных эритроцитов в цитопласты "бессмертных" L-клеток. В полученных реконструированных клетках наблюдались реактивация и инициация синтеза ДНК, однако они не были способны к делению [250]. По-видимому, пролиферация гибридов, полученных в результате слияния нормальных "старых" и трансформированных клеток (или их частей), все-таки возможна [273, 275], но только для очень небольшого их количества (2% или даже меньше) [149, 273].

Если же клетки, трансформированные "не полностью" (то есть обладающие неограниченным потенциалом УКП, но не вызывающие образование опухоли при прививке экспериментальным животным), сливаются с нормальными клетками в фазе III, "старое" ядро оказывается доминантным и синтез ДНК подавляется в "бессмертных" клетках. Например, в гетерокарионах, полученных из клеток глиобластомы человека или химически тран-

сформированных почечных клеток кролика и "старых" диплоидных клеток человека, "старое" ядро ингибирует вступление трансформированного ядра в S-фазу клеточного цикла [337].

Рефф и Шнайдер [295] предлагают следующие возможные объяснения этого феномена:

1) "старые" диплоидные клетки человека продуцируют ингибитор синтеза ДНК;

2) химически трансформированные клетки утрачивают этот ингибитор;

3) клетки, трансформированные вирусом SV-40 или аденовирусом (именно эти клетки при их слиянии со "старыми" диплоидными клетками человека способны инициировать синтез ДНК в последних [282]), приобретают некоторую опосредованную вирусом способность преодолевать действие этого ингибитора.

В связи с тем, о чем будет сказано в разделах, посвященных феномену "стационарного старения", интересно также отметить, что покоящиеся диплоидные клетки человека ранних пассажей (переведенные в это состояние путем устранения сыворотки из среды роста) так же, как и "старые" клетки (то есть клетки поздних пассажей), подавляют в гетерокарионах с трансформированными клетками синтез ДНК в ядрах последних [292, 336].

В течение многих лет не удавались попытки получить жизнеспособные синкарионы между "старыми" и "молодыми" диплоидными клетками человека [251]. Синкарионы же между "старыми" диплоидными клетками человека и клетками HeLa удалось создать, и они оказались "бессмертными" [335], что согласуется с результатами, полученными на гетерокарионах.

Фибробласты (или, вернее, фибробластоподобные клетки — по поводу их происхождения пока нет единого мнения, и фибробластами их называют, основываясь главным образом на морфологических признаках) не являются идеальными для исследования процесса старения. Они, как полагают некоторые авторы (см., например, [295]), дифференцированы не в очень высокой степени, у них мало специфических функций и специфических синтезируемых продуктов, а их происхождение *in vivo* трудно проследить. В связи с этим во многих лабораториях предпринимались попытки получения штаммов нормальных диплоидных дифференцированных клеток со специфическими функциями, что должно было облегчить сравнительные исследова-

ния клеток *in vivo* и *in vitro*. Ниже будет рассмотрено несколько типов такого рода культивируемых клеток, на которых проводились исследования механизмов клеточного старения.

1.3. Кератиноциты

Эпидермальные кератиноциты, полученные из кожных биоптатов, удается успешно культивировать *in vitro* на протяжении длительного времени [296]. Более того, они сохраняют в культуре свои свойства, приобретенные в процессе дифференцировки, например, кератинизированную оболочку и загнутые края, напоминающие дерматоглифы [198, 339]. Их удобно использовать для сравнительных исследований клеток *in vivo* и *in vitro*, так как кератиноциты легко идентифицировать *in vivo* и они сохраняют многие свои свойства *in vitro* [295].

В первой работе, выполненной на этой клеточной системе [296], авторы сравнили размножение в культуре семи штаммов кератиноцитов человека, полученных от новорожденных, и трех штаммов от доноров в возрасте 3, 12 и 34 года. Клетки новорожденных проходили в культуре, как было рассчитано, от 25 до 51 деления и выдерживали от 3 до 6 пассажей, в то время как для "взрослых" культур эти величины составили, соответственно, 20-27 делений и 2-3 пассажа (условия культивирования были идентичными). Эффективность клонирования (рассчитываемая как количество макроскопических колоний на 100 посеянных клеток) для кератиноцитов новорожденных достигала 15.7% и, как правило, превышала 2%. Для кератиноцитов же взрослых людей и подростков наивысшая величина этого показателя составила 0.7% (в случае клеток 12-летнего донора). За все время культивирования количество кератиноцитов новорожденных возрастало в среднем в 5737 раз (более чем в 10 000 раз для клеток двух доноров), а количество клеток взрослых людей - в среднем в 333 раза (для одного из доноров - в 2.6 раза). Эти данные позволили сделать заключение о том, что возраст донора влияет на продолжительность жизни *in vitro* кератиноцитов человека и их пролиферативную активность и что количественно это влияние сравнимо с таковым для кожных фибробластов [184].

В той же лаборатории было показано [197], что продолжительность жизни кератиноцитов *in vitro* зависит от наличия в среде роста определенных факторов, которые, как известно, способны ускорять рост клеточных культур: гидрокортизона, фактора роста эпидермиса и холерного токсина.

Выявленное действие гидрокортизона было слабо выраженным и наблюдалось только в случае "старых" (не в первичной культуре) клеток как более длительное образование колоний, состоящих из маленьких активно размножающихся базальных кератиноцитов (в культурах, растущих в отсутствие гормона, такие колонии быстро исчезали) [197, 296].

Стимулирующее действие фактора роста эпидермиса обнаруживалось раньше - в то время, когда колонии состояли из 50-200 клеток (приблизительно 6-8 делений) - и проявлялось как замедление "расслоения" колоний на классы, увеличение периода интенсивного размножения клеток в серийно пассируемых культурах и возрастание эффективности клонирования на поздних пассажах [197, 297]. Такое воздействие увеличивало рассчитываемую "пролиферативную" продолжительность жизни кератиноцитов новорожденных приблизительно с 50 до 150 клеточных генераций [297] и было особенно выражено на поздних пассажах, когда клетки, выращиваемые без фактора роста эпидермиса, приобретали "старческие" характеристики.

Холерный токсин - наиболее эффективный из агентов, вызывающих увеличение содержания внутри клетки аденозинмонофосфата [196], - оказывал самое сильное действие на скорость роста и продолжительность жизни культур [197]. Его влияние на рост кератиноцитов можно было обнаружить уже в первую неделю культивирования по уменьшению рассчитываемого времени УКП, заметному возрастанию эффективности клонирования (возможно, за счет сохранения небольших "абортивных", колоний) и увеличению рассчитываемых величин максимального количества клеточных генераций *in vitro* и максимального числа пассажей [196, 197]. Эти эффекты в большей степени были выражены в культурах кератиноцитов взрослых доноров (при их сравнении с культурами клеток новорожденных) и культурах на поздних пассажах (при их сравнении с клетками на ранних пассажах) [197].

Культуры кератиноцитов были также использованы Барбарой Джилхрест для оценки *in vitro* физиологического возраста организма [182, 184]. Кератиноциты получали из двух параллельных биоптатов кожи плеча (с подвергаемого действию солнца и "затененного" участков). Клетки культивировали в одинаковых условиях в системе Рейнвальда-Грина и пассировали до наступления фазы III по Хейфлику. Во всех случаях максимальное число клеточных генераций *in vitro* было меньше у культур, полученных из кусочков кожи, подвергав-

шейся действию солнечных лучей. При этом различие между двумя культурами по "пролиферативной" продолжительности жизни линейно возрастало с увеличением возраста донора и положительно коррелировало с выраженностью индуцированного интенсивным воздействием солнечных лучей "преждевременного старения" кожи [182].

Сходное уменьшение под воздействием хронического солнечного излучения продолжительности жизни культуры фибробластов, полученных из тех же кожных биоптатов, из которых получали кератиноциты [183], послужило, по мнению автора этих работ, еще одним доказательством сопоставимости результатов экспериментов по изучению старения *in vitro* фибробластов и кератиноцитов. Абсолютные значения максимального количества делений кератиноцитов, полученные Джилхрест, были сравнимы с этими величинами в работе [296], хотя четкой зависимости между возрастом донора клеток и продолжительностью "пролиферативной" жизни культуры она не выявила.

Сходные данные были получены и на кератиноцитах из кусочков кожи лица, подвергающихся (перед ушами) и не подвергающихся (за ушами) действию солнечного света [184].

До настоящего времени нет данных о зависимости гистологических характеристик культивируемых кератиноцитов от возраста донора клеток [184]. Возможно, исследования таких показателей и не дадут никакой ценной информации, ибо *in vivo* кератиноциты эпидермиса претерпевают при старении организма лишь незначительные ультраструктурные изменения [247]. Правда, есть сведения о некоторых морфологических различиях между колониями кератиноцитов, полученных от новорожденных и взрослых людей [184].

При старении кератиноцитов *in vitro*, т. е. при увеличении количества пройденных в культуре пассажей клетками доноров любого возраста, появляются "неправильные" колонии, состоящие главным образом из больших кератиноцитов (на ранних пассажах колонии почти правильной округлой формы и состоят целиком из маленьких клеток) [197]. На поздних пассажах наличие маленьких колоний отражает, по-видимому, интенсификацию процесса так называемой "стратификации" ("расслоения" популяции колоний на классы по размерам и форме). Большие колонии содержат от 5 до 7 слоев клеток в центре (на любых пассажах) [184]. На ультраструктурном уровне колонии кератиноцитов, "состарившиеся" в культуре, характеризуются увеличенными межклеточными пространствами, мень-

шим количеством десмосом и большим количеством внутриклеточных вакуолей [184]. Причинно-следственные отношения между этими изменениями и старением кератиноцитов пока неизвестны.

И, наконец, Барбара Джилкхрест исследовала влияние факторов роста на пролиферацию кератиноцитов новорожденных и взрослых доноров [184]. Кератиноциты выращивали в бессывороточной среде с гормональными добавками, а также с факторами роста кератиноцитов или эпидермиса. Для клеток новорожденных выявили значительное возрастание (более чем в 200 раз) количества кератиноцитов и размеров колоний (оценка через 7 дней после посева) при увеличении концентрации грубого препарата фактора роста кератиноцитов от 0 до 450 мкг/мл либо смеси фактора роста эпидермиса и фактора роста кератиноцитов от 0/0 до (40 нг/мл)/(600 мкг/мл). В случае клеток взрослых людей при сходном увеличении концентрации факторов роста наблюдалось лишь 75-кратное возрастание указанных показателей. По мнению автора работы, эти результаты свидетельствуют в пользу гипотезы, согласно которой снижение с возрастом донора интенсивности пролиферации культивируемых кератиноцитов может быть следствием ухудшения их способности реагировать на митогенную стимуляцию.

1.4. Эпителиальные клетки хрусталика

Эпителий хрусталика является очень привлекательным объектом для исследования старения, ибо он состоит из клеток с различной продолжительностью существования *in vivo* и с различным митотическим потенциалом. Как и культивируемые фибробласты человека, культивируемые клетки эпителия хрусталика обладают ограниченным потенциалом УКП [342]. Интересным является то обстоятельство, что такие клетки, полученные от взрослых индивидуумов, по-видимому, дедифференцируются в культуре на ранних пассажах, становясь похожими на клетки, выделенные из хрусталика плода человека. Однако впоследствии (по прошествии некоторого числа пассажей) клетки претерпевают изменения, которые делают их вновь "взрослыми" [288].

Согласно мнению ученого из ФРГ Г. Ринка [298], исследование *in vitro* эпителиальных клеток хрусталика представляет особый интерес по двум причинам:

1) результаты можно сравнивать с данными, полученными на культивируемых фибробластоподобных клетках;

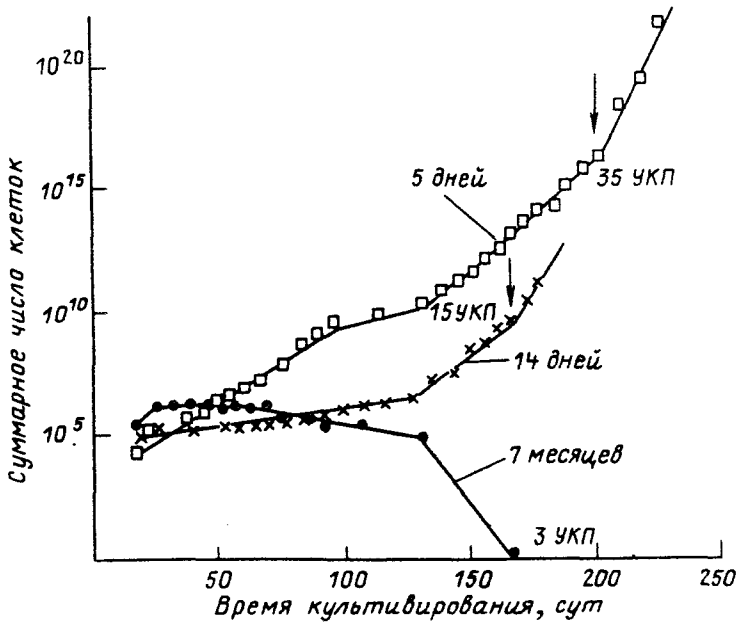


Рис. 10. Влияние возраста донора на характер размножения эпителиальных клеток хрусталика крысы. Стрелкой указан момент трансформации культуры в анеуплоидную линию. Возраст животных: □ - 5 сут; × - 14 сут; ● - 7 мес [298]

2) старение эпителиальных клеток хрусталика *in situ* может играть непосредственную роль в клинических проявлениях помутнения хрусталика в пожилом возрасте.

Было установлено [298], что максимальное число УПК в культуре для диплоидных эпителиальных клеток хрусталика связано с максимальной продолжительностью жизни вида (табл. 7).

Кроме того, была выявлена обратная зависимость потенциала УКП и возраста донора. Эти данные представлены на рис. 10. Видно, что клетки, полученные от 5-дневных крыс (использовали инбредных животных линии Спрэг-Доули) проходят 35 УКП до трансформации в анеуплоидную линию [299]. Клетки 14-дневных животных выдерживают до трансформации 15 УКП, а клетки 7-месячных доноров проходят только 3 УКП, после чего вступают в фазу III по Хейфлику и погибают при попытке дальнейших пересевов.

5831

Таблица 7

Продолжительность жизни *in vitro* диплоидных эпителиальных клеток хрусталика животных различных видов [298]

Вид	Возраст донора	Продолжительность жизни клеток
Мышь	4-6 дней	12-16 УКП *
Крыса	4-6 дней	32-36 УКП *
Крыса (car ⁺)	4-6 дней	3-5 УКП
Свинья	0.7 года	36-42 УКП
Корова	0.5 года	64-70 УКП*

* Трансформация в анеуплоидную линию

Таблица 8

Способность эпителиальных клеток хрусталика коровы и крысы к эксцизионной репарации индуцированных УФ-излучением повреждений ДНК на разных пассажах *in vitro* [298]

Вид	Количество пройденных УКП	Интенсивность внеплазменного синтеза ДНК (количество зерен серебра на ядро *.)
Корова	10,23	40-45
Крыса	5, 10, 15	16-20
Крыса (car ⁺)	1, 3, 5	18-22

* 6 ч после облучения УФ-лучами (400 эрг/мм²)

Исследуя интенсивность репарации ДНК в культивируемых эпителиальных клетках хрусталика, Ринк получил результаты, представленные в табл. 8 и 9.

С помощью радиоавтографической оценки количества зерен в ядрах клеток, не находящихся в S-фазе, было выявлено от-

Зависимость репарации индуцированных рентгеновским излучением разрывов ДНК в эпителиальных клетках хрусталика коровы от возраста донора клеток [298]

Возраст донора	Количество пройденных УКП	Репарация, %*
4 года	6	90
7 лет	3	85
16 лет	3	75

* 2 ч после облучения (10 Гр)

существование различий в интенсивности индуцированного УФ-излучением внепланового синтеза ДНК между клетками ранних и поздних пассажей. Однако такие различия были обнаружены при сравнении клеток крысы и коровы (см. табл. 8). Интересно отметить, что клетки крыс линии cat^+ с предрасположенностью к катаракте не отличались по этому показателю от клеток нормальных крыс. Это дало автору право сделать вывод о том, что мутация cat^+ не связана с дефектом в системе эксцизионной репарации индуцированных УФ-излучением повреждений ДНК.

При изучении репарации повреждений ДНК, индуцированных рентгеновским излучением, Ринк также не обнаружил влияния количества пройденных УКП на данный показатель. Однако с увеличением возраста донора способность клеток к репарации таких повреждений, как оказалось, снижается (см. табл. 9).

Суммируя данные, изложенные в его обзорно-экспериментальной статье, посвященной старению *in vitro* эпителиальных клеток хрусталика [298], Ринк делает следующие выводы.

- 1) Пролиферативный потенциал эпителиальных клеток хрусталика ограничен.
- 2) Потенциал УКП уменьшается с увеличением возраста донора.
- 3) Эпителиальные клетки хрусталика, полученные от долгоживущих видов, обладают большим потенциалом УКП, чем такие же клетки, полученные от короткоживущих видов.

4) Эпителиальные клетки хрусталика крыс-мутантов линии cat^+ (с помутнением хрусталика сразу после рождения) способны пройти в культуре только 3-5 УКП (клетки нормальных крыс - 32-36 УКП).

5) С увеличением числа пройденных клетками *in vitro* пассажей не происходит изменения их способности ни к эксцизионной репарации индуцированных УФ-излучением повреждений ДНК, ни к "починке" разрывов ДНК, вызванных рентгеновским излучением.

6) Способность клеток к репарации индуцированных рентгеновскими лучами разрывов ДНК уменьшается с увеличением возраста донора.

7) Спектр водорастворимых белков, оцениваемый с помощью иммуноэлектрофореза, изменяется при старении *in vitro* эпителиальных клеток хрусталика крысы; в частности, полностью исчезает белок полосы "рН 5.7". Исчезновение этого белка происходит и в целом хрусталике при старении крысы [146].

8) В течение нескольких первых пассажей *in vitro* эпителиальные клетки хрусталика перестают синтезировать кристаллины, однако при переведении культуры в стационарную фазу роста (понижение концентрации эмбриональной телячьей сыворотки в среде до 0.5%) синтез кристаллинов возобновляется.

9) Клетки, достигшие фазы III по Хейфлику, полностью теряют способность к синтезу кристаллинов.

1.5. Клетки пигментного эпителия сетчатки

Существует мнение [175], согласно которому клетки пигментного эпителия сетчатки представляют интерес для геронтологических исследований по следующим причинам:

1) Эти клетки прекращают делиться после завершения эмбрионального развития *in vivo*.

2) Они содержат пигментные гранулы (количество которых зависит от возраста) двух типов: а) состоящие из меланина, синтезирующегося в процессе эмбрионального развития [147, 169, 348, 349] и обычно обнаруживающегося внутри апикальных отростков клеток (или около этих отростков), где он функционирует как поглотитель света, проникающего через сетчатку; б) состоящие из липофусцина - продукта деградации главным образом фагоцитируемых клеточных обломков, накапливающегося с возрастом [169, 170, 241].

3) Известно, что клетки пигментного эпителия претерпевают плейоморфные изменения в процессе роста и старения организма [176, 348, 349], а возникающие нередко в старости друзоподобные включения в глазу вызывают еще большее отделение таких стареющих клеток от хориокапилляров [171].

В связи с важностью каждой части сетчатки для обеспечения нормального зрения получение биопсийного материала у человека для исследования на клеточном уровне механизмов старения этой ткани очень затруднено. Именно поэтому особенно важны для выяснения механизмов старения человека исследования выживаемости полученных посмертно клеток пигментного эпителия сетчатки человека, а также разработка условий, обеспечивающих длительное их культивирование.

Флуд с соавторами [175] исследовали культивируемые клетки пигментного эпителия, полученные через 24–40 ч после наступления смерти из глаз людей в возрасте от 7 дней до 100 лет. Электронная микроскопия этих клеток в первичной культуре показала, что они сохраняют большую часть свойств, присущих им *in vivo*. Было установлено, что как длительность лаг-периода (время до начала размножения клеток в культуре), так и относительное число способных делиться клеток зависят от возраста донора. В каждой жизнеспособной культуре часть клеток вообще не вступала на путь размножения. Такие клетки оставались сильно пигментированными. Те же, которые начинали делиться, быстро утрачивали пигменты и становились прозрачными. Зависимость времени, необходимого культуре для достижения состояния сомкнутого монослоя и определяемого в основном длительностью лаг-периода, от хронологического возраста донора представлена на рис. 11. Продолжительность лаг-фазы составляла от 3 до 21 дня после посева полученной из сетчатки клеточной суспензии в чашки Петри. После этого начального лаг-периода клетки начинали быстро размножаться и достигали состояния сомкнутого монослоя. В стационарной фазе клетки округлялись и откреплялись от поверхности роста. Клетки некоторых культур (особенно полученные из сетчатки самых старых доноров) так и не начинали размножаться.

Для количественной оценки доли клеток, способных делиться и участвующих в формировании сомкнутого монослоя, Флуд с соавторами проанализировали количество пигментированных клеток в культурах до начала деления и после образования монослоя [174]. Культуры получали от доноров в возрасте

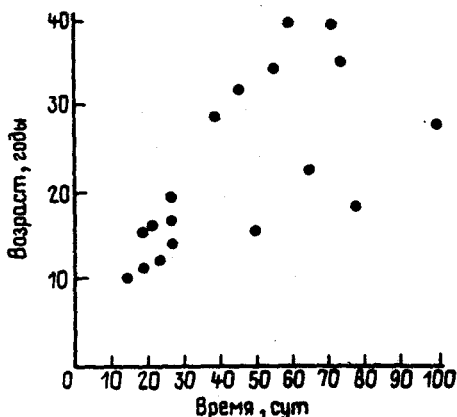


Рис. 11. Взаимосвязь хронологического возраста донора и времени, необходимого клеткам пигментного эпителия сетчатки человека в первичной культуре для достижения состояния сомкнутого монослоя (200 кл/мм^2) [175].

Таблица 10

Уменьшение относительного количества пигментированных клеток эпителия сетчатки человека от начала их размножения в культуре до достижения состояния сомкнутого монослоя [175]

Возраст донора, годы	Количество проанализированных областей	Уменьшение количества клеток, % (\pm ошибка среднего)
20-100	40	$28,1 \pm 3,8$
>50	18	$19,6 \pm 3,7$
< 30	22	$34,9 \pm 5,9$

от 20 до 100 лет. Подсчитывая 40 неперекрывающихся областей в культурах клеток пигментного эпителия 12 доноров, установили, что в среднем количество пигментированных клеток уменьшается на 28% (табл. 10). При этом для клеток доноров в возрасте более 50 лет эта величина составила 20%, а для клеток людей в возрасте менее 30 лет - 35%.

Предположив, что возможной причиной снижения величины пролиферативного пула для культур старых доноров является увеличенное в среднем количество липофусцина в клетках, Флуд с соавторами провели сравнительные исследования культивируемых клеток пигментного эпителия, полученных из раз-

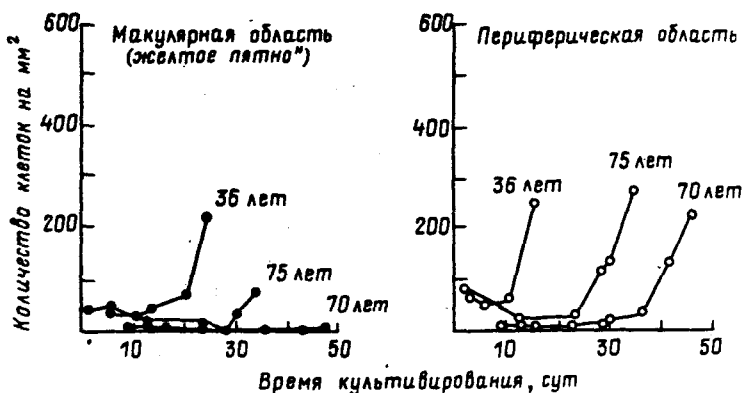


Рис. 12. Кривые роста культивируемых клеток пигментного эпителия сетчатки человека, полученных из макулярной или периферической областей сетчатки 3 доноров. Около каждой кривой указан возраст донора клеток [175]



Рис. 13. Кривые роста культивируемых клеток пигментного эпителия сетчатки человека от одних и тех же доноров в пересейных (а) и первичных (б) культурах. Первые получали путем посева клеток первичных культур, находящихся в состоянии сомкнутого монослоя. Около каждой кривой указан возраст донора клеток [175].

ных зон сетчатки глаза одного и того же донора [175]. Клетки макулярной области, как известно [368], содержат больше липофусцина, чем клетки периферической зоны. В случае всех трех исследованных пар глаз доноров разного возраста было установлено, что клетки периферической зоны вступают в деление раньше, чем клетки макулярной зоны (рис. 12). Интересно заметить, что клетки макулярной области, полученные от 70-летнего донора, так и не начали размножаться на протяжении 45 дней наблюдения. Лаг-период для культур клеток, уже освободившихся от липофусцина вследствие размножения, как оказалось, перестает зависеть от хронологического возраста донора. На рис. 13 представлены кривые роста клеток (от одних и тех же доноров) в первичной культуре и после пересева. Видно отсутствие зависящей от возраста донора лаг-фазы в случае пересейанных клеток.

Исследуя с помощью двумерного электрофореза белковый спектр клеток пигментного эпителия сетчатки человека из первичной и пересейанной культуры, не обнаружили между ними различий [175].

Предполагается [175], что липофусцин в клетках пигментного эпителия сетчатки играет роль своеобразных "часов", определяющих старение этих клеток. "Разбавление" этого пигмента до практически неопределяемых концентраций в результате размножения переведенных в культуральные условия клеток обеспечивает их "омоложение".

1.6. Глиальные клетки и нейроны

Хотя еще в 60-х годах были сообщения о том, что глиальные клетки человека обладают ограниченным потенциалом УКП *in vitro* [290], более поздние исследования позволили предположить, что изученные мало дифференцированные клетки представляли собой фибробласты, а не клетки глии. Первичные культуры нейронов, полученные из мозга эмбрионов или новорожденных, состоят из дифференцированных клеток, обладающих большинством свойств нейронов *in vivo*. Эти клетки либо совсем не размножаются в культуре, либо делятся лишь несколько раз [172]. Несколько лет назад из мозга новорожденных крыс удалось получить первичные культуры "истинных" глиальных клеток (астроцитов и олигодендроглии) и охарактеризовать их свойства [262]. Впрочем, серьезные исследования старения клеток на таких культурах пока не проводились.

1.7. Эндотелиальные клетки

Клетки сосудистого эндотелия в настоящее время успешно культивируются во многих лабораториях, занимающихся, в частности, изучением механизмов возникновения атеросклероза. Эти клетки (по крайней мере, те из них, которые получены от эмбрионов коровы) обладают ограниченным потенциалом УКП *in vitro*, и характеристики их "старения" в культуре сходны с таковыми для фибробластов человека — с пассажами снижается скорость размножения клеток и возрастает их объем [270]. Однако, в отличие от фибробластов, они сохраняют целый ряд специфических функций, например, способность к экспрессии антигена к фактору VIII, на протяжении всей их жизни *in vitro*. Ценность этих клеток для изучения механизмов старения определяется, по всей видимости, именно их ролью в процессах атерогенеза, т. е. развития целого спектра сердечно-сосудистых болезней, от которых в настоящее время умирает больше всего людей.

1.8. Гладкомышечные клетки

Большую роль в атерогенезе играют и клетки еще одного типа — артериальные гладкомышечные [304, 305]. Этим клеткам свойствен ограниченный потенциал УКП в культуре, который обратно пропорционален возрасту донора [139]. Исследования *in vitro* позволили установить, что с увеличением возраста донора клеток уменьшается эффективность деградации ими липопротеидов низкой плотности [140]. Так как эти липопротеиды играют решающую роль в транспорте холестерина, исследования такого рода могут пролить свет на механизмы увеличения частоты атеросклероза в пожилом возрасте [295].

2. "СТАЦИОНАРНОЕ СТАРЕНИЕ"

2.1. Общие положения

Любая выдвигаемая теория старения должна, по-видимому, давать ответ на следующие вопросы:

1) Почему наряду со стареющими организмами существуют и нестареющие (пресноводная гидра, некоторые виды рыб и др.)?

2) Почему у разных видов разная продолжительность жизни?

3) Почему раковые клетки "бессмертны", то есть обладают неограниченным митотическим потенциалом (потенциалом УКП) в отличие от нормальных клеток? (На этот вопрос можно не отвечать, если не признавать связь "феномена Хейфлика" с процессом старения).

4) Каким образом "ускользает" от старения зародышевая линия, то есть совокупность половых клеток, обеспечивающая передачу генетической информации в практически бесконечном ряду поколений?

На наш взгляд, позволяет ответить на все эти вопросы теория, в основе которой лежит признание ведущей роли ограничения пролиферации в накоплении с возрастом в организме дефектов на самых разных уровнях, начиная с молекулярного, и в развитии процесса старения [20, 97, 98, 180, 358].

Согласно этой теории, пусковым механизмом старения, а вернее, накопления в клетках различного рода повреждений, его вызывающих, является уменьшение средней скорости пролиферации клеток организма или клеточной популяции ниже некоторого критического уровня; у нестареющих же организмов и клеточных популяций средняя скорость пролиферации клеток достаточно велика, что и обеспечивает им (организму или клеточной популяции, но не отдельной клетке!) "бессмертие".

То, что при старении в клетках высших организмов накапливаются различные молекулярно-генетические изменения, было продемонстрировано в целом ряде работ, появившихся в последние годы (см., например, обзоры [15, 70]). Существует распространенное мнение, согласно которому такие изменения (главным образом, повреждения ДНК) могут играть ключевую роль в процессе старения.

Исследования, в которых получают результаты такого рода, проводятся, как правило, следующим образом. У животных нескольких возрастных групп берутся образцы той или иной ткани и подвергаются соответствующему анализу, позволяющему оценить либо структуру и состав хроматина, а также некоторые его функциональные показатели, либо состояние ДНК исследуемых клеток (число односторонних разрывов, щелочелавильных участков, окисленных или метилированных оснований, апуриновых сайтов, сшивок ДНК-ДНК и ДНК-белок и т. д.). В случае исследования культивируемых клеток, "стареющих" *in vitro* "по Хейфлику", такому исследованию подвергаются клеточные популяции (подчеркиваем - клеточные популяции, а не отдель-

ные клетки) из культур на разных пассажах. Таким образом, в обоих случаях полученные результаты отражают состояние хроматина некоторой "усредненной" клетки исследованной клеточной популяции. Если удастся показать, что, например, молекулярная масса ДНК по мере увеличения возраста донора снижается, делается вывод о закономерной возрастной деградации ДНК. Интерпретация этого вывода, как правило, однозначна: прочитавший статью заключает, что во всех клетках изученной ткани при старении происходит накопление тех или иных дефектов ДНК, проявляющихся в уменьшении ее молекулярной массы в случае использования соответствующего метода исследования (при дальнейших рассуждениях мы ограничимся рассмотрением именно изменений ДНК при старении, хотя практически все нижесказанное можно отнести к любым молекулярно-генетическим возрастным изменениям).

Что касается постмитотических клеток, то применительно к ним этот вывод в принципе может быть сделан (хотя и то не наверняка). В непрерывно же делящихся клетках такой процесс представляется маловероятным, ибо значительная часть повреждений ДНК, накопление которых происходит при старении, не может непрерывно передаваться от материнской клетки к дочерней. К таким повреждениям, например, относятся одонитевые разрывы и апуриновые сайты ДНК, увеличение количества которых с возрастом было продемонстрировано целым рядом исследователей (см., например, [102, 350]).

Тем не менее, многие работы, посвященные изучению возможных возрастных изменений ДНК, были выполнены на тканях, пролиферативная активность которых достаточно велика. Диплоидные клетки культур, "стареющих" *in vitro*, все время поддерживаются в пролиферирующем состоянии путем непрерывных пересевов; даже на последних пассажах индекс включения меченого тимидина (характеризующий пролиферативную активность клеточной популяции) у них довольно высок. Однако и в экспериментах на таких культурах была обнаружена "возрастная" деградация ДНК [162, 230].

Каковы же механизмы накопления в стареющих организмах и клеточных культурах дефектов ДНК? Нам представляется правдоподобной следующая последовательность событий. Скорость спонтанного повреждения ДНК достаточно велика. Это и депуринизация, вызываемая тепловым движением молекул, и свободнорадикальные повреждения, и окисление оснований. В частности, только процесс депуринизации ДНК при физиологи-

ческой температуре приводит к возникновению приблизительно 10^5 повреждений в сутки на геном человека [13, 249]. Большая часть таких повреждений устраняется системами репарации, однако некоторые из них "ускользают" от этих систем вследствие тех или иных причин, например, из-за недоступности суперспирализованных и экранированных белками участков ДНК для репарирующих ферментов [14]. Таким образом, в ДНК любой клетки в течение некоторого определенного периода времени с некоторой вероятностью возникает хотя бы один нерепарируемый дефект. Если клеточная популяция целиком состоит из неделиющихся клеток, то по прошествии некоторого времени каждая клетка этой популяции будет иметь хотя бы одно повреждение в своей ДНК. Среднее же число дефектов на клетку будет монотонно возрастать. В терминах молекулярно-генетической теории старения это и будет означать, что данная клеточная популяция подвержена старению (мы опять-таки подчеркиваем - клеточная популяция, а не составляющие ее клетки!). Если же хотя бы часть клеток в рассматриваемой популяции делится, то ситуация будет зависеть от соотношения двух показателей: средней скорости деления клетки (в расчете на всю популяцию) и скорости возникновения спонтанных дефектов ДНК. Если первый показатель достаточно высок, то появление новых неповрежденных клеток будет идти гораздо быстрее, чем накопление в популяции клеток с повреждениями ДНК (напомним, что размножение клеток с рассматриваемыми дефектами ДНК мы считаем невозможным). Если же первый показатель ниже некоего "барьера", соответствующего состоянию равновесия (когда относительное содержание повреждений ДНК в популяции остается постоянным), мы наблюдаем увеличение со временем среднего числа повреждений на клетку (хотя и более медленное, чем в популяции, состоящей целиком из неделиющихся клеток).

Необходимо также отметить, что накапливаться могут не только нерепарируемые повреждения ДНК. В принципе, даже в клеточной популяции, в которой системы репарации устраняют все индуцированные дефекты ДНК, в каждый данный момент времени существует некоторое их количество, фиксируемое, как на моментальном снимке, при молекулярно-биологическом исследовании. При этом с возрастом, по мере снижения эффективности функционирования репарирующих систем [15], число таких фиксируемых в данный момент повреждений будет увеличиваться. Ясно, что и в этом случае принципиально картина

не меняется: чем выше средняя скорость деления клеток, тем меньше мы обнаружим в популяции повреждений ДНК.

Если все вышеизложенное верно, то должно быть верно и следующее положение: чем выше пролиферативная активность клеточной популяции, тем меньше скорость накопления в ней повреждений ДНК и, соответственно, скорость ее старения. Это положение можно отнести и к тканям организма, с той, правда, оговоркой, что скорость накопления спонтанных повреждений ДНК в одной клетке принимается одинаковой для тканей всех типов.

Анализ соответствующих данных позволяет заключить, что тканям, состоящим из постмитотических клеток, действительно, свойственна максимальная скорость старения. Возможно, именно поэтому такие клетки (например, нейроны) некоторые авторы склонны считать "узким местом" процесса старения [181].

При формировании взрослого организма из зиготы средняя скорость деления клеток непрерывно снижается вследствие появления популяций дифференцированных клеток, функции которых несовместимы с высокой (или вообще какой-либо в случае, например, нейронов) пролиферативной активностью. Это и приводит к "запуску" процесса накопления повреждений ДНК, то есть к "запуску" старения. Таким образом, старение начинается с того момента, когда преодолевается "барьер равновесия", о котором говорилось выше.

Данная концепция позволяет, на наш взгляд, объяснить причины межвидовых различий в продолжительности жизни. Действительно, как правило, дольше живут те животные, у которых больше размеры тела и, соответственно, длиннее период развития. Поэтому у них дольше длится период интенсивной пролиферации клеток организма и дольше не достигается "барьер", за которым в клеточных популяциях начинают накапливаться молекулярно-генетические повреждения. Необходимо, впрочем, подчеркнуть, что этот "барьер", как уже говорилось, определяется не только пролиферативной активностью клеток, но и интенсивностью накопления в них повреждений. Поэтому при равных размерах тела и длительности развития различия в продолжительности жизни могут определяться разницей, например, в способности клеток к репарации ДНК, сложившейся в процессе эволюции.

Что же касается клеточных культур, "стареющих" *in vitro*, то в этом случае такой "барьер" клетки переходят только на самых последних пассажах. Поэтому и деградация ДНК обнаруживается только непосредственно перед "пролиферативной

гибелью" культуры, когда процесс "старения" вступает в свою терминальную стадию [95]. Именно ограничение пролиферации на последних пассажах приводит к "истинному" старению клеток, выражающемуся в накоплении в них различных дефектов, в том числе и молекулярно-генетических.

Мы полагаем, что феномен "старения" клеточных культур "по Хейфлику" является всего лишь выражением неспособности клеток к неограниченному делению, которая никогда не проявляется в организме. Кстати, как уже отмечалось, и сам Хейфлик в последних своих работах высказывает сходные соображения (см. например, [209]). Нужно заметить, что исчерпание клетками своего пролиферативного потенциала при "старении" *in vitro* не имеет ничего общего с запрограммированным подавлением пролиферативной активности дифференцированных клеток в организме.

Что же касается обнаруженной нами разницы в молекулярном весе ДНК культивируемых диплоидных фибробластов людей разного возраста [101, 102, 353], то она может быть объяснена следующим образом. В "наследство" от донора клетки получают определенную пролиферативную активность, которую они сохраняют в течение значительного числа пассажей *in vitro*. Чем старше донор, тем пролиферативная активность его клеток ниже и тем, соответственно, больше дефектов ДНК обнаруживается в данный момент времени в клеточной популяции. В то же время при пассировании *in vitro* этот показатель не меняется до самых последних пассажей, когда пролиферативная активность начинает существенно снижаться.

Из всего сказанного вытекает два очень важных вывода. Первый касается проблемы "бессмертных" клеточных линий, то есть линий клеток с неограниченным потенциалом УКП. В таких клетках молекулярная масса ДНК выше, чем в нормальных фибробластах, способных "стареть" *in vitro* [101]. В литературе уже высказывалась идея [226], согласно которой такие "бессмертные" клетки отличаются от нормальных всего лишь тем, что обладают большей скоростью размножения. По-видимому, отсутствие как программы ограничения количества делений (проявляющейся при "старении" *in vitro*), так и способности к терминальной дифференцировке (реализующейся для большинства клеток *in vivo*) и приводит к тому, что такие клеточные линии никогда не переходят "барьер", после которого начинается накопление молекулярно-генетических дефектов и происходит "запуск" процесса старения.

Второй вывод касается стационарных клеточных культур и заключается в том, что подавление пролиферации культивируемых клеток должно приводить к резкому ускорению процесса накопления в клеточной популяции дефектов и, как следствие, к ускоренному "старению" всей культуры [20, 97, 98, 180]. Практически все клеточные культуры могут быть переведены в стационарную фазу роста, в которой клетки не делятся. При этом переход культуры в такое состояние может вызываться разными способами: за счет контактного торможения, снижения концентрации сыворотки в среде, удаления из среды определенных аминокислот и т. д. [39]. До сих пор остается неясным, какой из этих способов является наиболее физиологичным. Чем больше пролиферативная активность клеток, тем более жесткими должны быть условия для перевода культуры в стационарную фазу роста.

Мысль о том, что в находящихся в стационарной фазе роста культивируемых клетках должны накапливаться повреждения, сходные с повреждениями клеток стареющего организма, высказывалась в целом ряде публикаций [16, 20, 97, 98, 111, 161]. Процесс накопления таких повреждений в культивируемых клетках с увеличением времени после посева (то есть при снижении скорости пролиферации клеток и в процессе дальнейшего их пребывания в стационарной фазе) мы назвали "стационарным старением" [111].

В последующих разделах будут рассмотрены данные, полученные при изучении "стационарного старения" различных культивируемых клеток.

2.2. Клетки животных

2.2.1. Щелочеллабильные участки и одностранные разрывы ДНК

Эксперименты по изучению количества щелочеллабильных участков и одностранных разрывов ДНК на разных стадиях "стационарного старения" были проведены [97, 110] на эмбриональных диплоидных фибробластах человека штамма ИМГ-814 (полученных в Институте медицинской генетики АМН СССР), прошедших 27 УКП, а также на трансформированных клетках китайского хомячка линии B11dii-FAF28 (клин 237_{2a}). Клетки выращивали во флаконах Каррелли на среде Игла с глутамином, содержавшей 10% (для клеток китайского хомячка) или 20% (для диплоидных фибробластов человека) сыворотки крупного рогатого скота. Клетки при

пересеве снимали со стекла с помощью трипсина, после чего их суспендировали и пересевали в отношении 1 : 5 (клетки китайского хомячка) или 1 : 2 (диплоидные фибробласты человека).

В случае клеток китайского хомячка при пересеве в среду вводили ^3H -тимидин (удельная радиоактивность 23,6 Ки/ммоль) до конечной концентрации 0,3 мКи/мл. За 14–15 ч до лизиса клеток среду заменяли на нерадиоактивную. 0,1 мл суспензии клеток, снятых со стекла раствором трипсина и суспендированных в растворе Хэнкса (20–100 тыс. клеток), наносили на 5–20%-ый градиент щелочной сахарозы (0,1M NaOH+0,9 M NaCl+0,003 M Na₂ ЭДТА, объем градиента 9 мл), на который предварительно наставляли 0,4 мл лизирующего раствора (0,5 M NaOH + 0,1 M Na₂ ЭДТА). Лизис продолжался 8,5 ч при комнатной температуре в темноте. Затем градиенты центрифугировали на центрифуге Beckman L5–50 (ротор SW–40, ускорение 5, 20°C, 8500 об/мин, 16 ч 15 мин).

В случае диплоидных фибробластов человека ^3H -тимидин (0,5 мКи/мл) вводили в среду через сутки после пересева. Замены среды не производили. Состав градиентов и лизирующего раствора был таким же, как и для клеток китайского хомячка. В 0,1 мл суспензии клеток в растворе Хэнкса, наносимой на градиент, содержалось около 20 тыс. клеток. Лизис продолжался 6 ч при комнатной температуре в темноте. Центрифугирование производили на той же центрифуге (ротор SW–40, ускорение 5, 10°C, 8500 об/мин, 17 ч). В обоих случаях градиенты фракционировали на 19 фракций по 0,5 мл, начиная со дна пробирки. ДНК полученных фракций осаждали 10%-ной трихлоруксусной кислотой (ТХУ) в течение 6 ч в холодильнике, наносили на фильтры "Whatman 3MM." и промывали их 10%-ной ТХУ и абсолютным этиловым спиртом. Радиоактивность высушенных фильтров определяли на жидкостных сцинтилляционных счетчиках "Mark III" (модель 6880, Searle Analytic, Inc.) или "Intertechnique SL-30" (Франция). При построении седиментограмм 19-ю фракцию в расчет не принимали.

На рис. 14 представлены результаты одного из опытов по изучению деградации ДНК в покоящихся клетках китайского хомячка. Видно, что седиментограмма ДНК клеток 10-суточной культуры значительно смещена в сторону более легких фракций по сравнению с седиментограммой ДНК клеток 3-суточной культуры, то есть культуры, находящейся в поздней

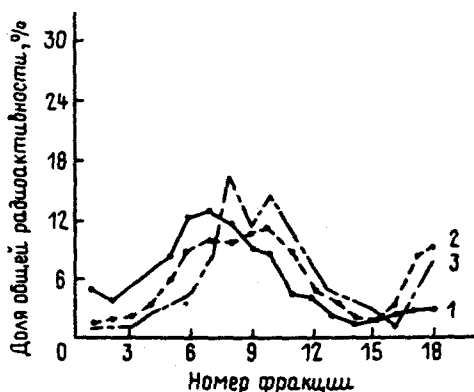


Рис. 14. Профили седиментации в щелочном градиенте сахарозы ДНК лизатов клеток китайского хомячка из культур разного "возраста". 1-3 - клетки из 3-суточной, 10-суточной и 17-суточной культур, соответственно [110]

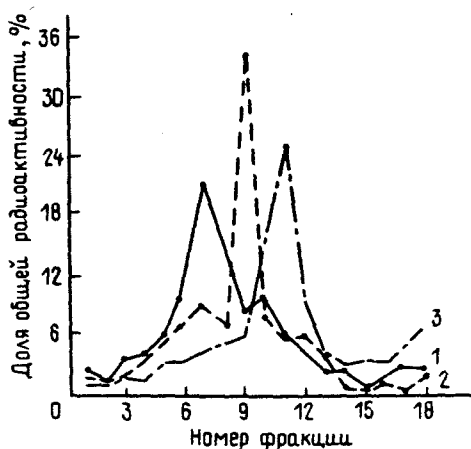


Рис. 15. Профили седиментации в щелочном градиенте сахарозы ДНК лизатов диплоидных фибробластов человека из культур разного "возраста". 1-3 - клетки из 3-суточной, 7-суточной и 10-суточной культур, соответственно [97]

лог-фазе. В случае 17-суточной культуры седиментограмма оказалась еще более сдвинутой вправо, хотя этот второй сдвиг явно меньше первого. Об этом свидетельствуют и результаты расчетов первых моментов седиментограмм (метод расчета см. в [95, 102]). Их величины составили соответственно, 7.73, 10.16 и 10.28.

На рис. 15 приведены данные эксперимента, проведенного на диплоидных фибробластах человека. Из рисунка видно, что по мере "стационарного старения" этих клеток также происходит смещение седиментограммы ДНК в сторону более легких фракций. Величины первых моментов седиментограмм составили 6,59, 8,72 и 11,04 для ДНК 3-, 7- и 10-суточных культур, соответственно.

Полученные результаты позволяют полагать, что в ДНК культивируемых клеток при их "стационарном старении" накапливаются одионитевые разрывы и (или) щелочелabile участки.

Нам представляется, что эти данные необходимо учитывать при постановке опытов по оценке процессов репарации ДНК в культивируемых клетках, ибо из них становится ясным, что молекулярная масса ДНК контрольных клеток зависит от времени, прошедшего после посева культуры.

2.2.2. Сшивки ДНК-белок

Проведенное нами [108, 120] исследование возможности накопления сшивок в комплексе "ДНК-белок" при "стационарном старении" культивируемых клеток представлялось целесообразным по следующим соображениям. Теория, согласно которой первичной причиной старения является прогрессирующее накопление сшивок между белками, нуклеиновыми кислотами и другими макромолекулами, была сформулирована Бьорк-стенгом еще в 1941-1942 годах [141, 142] и развита в его дальнейших работах [143, 144]. на основе как собственных данных, так и результатов, полученных другими исследователями. В последние годы появился ряд публикаций [66, 79, 80, 114, 264], свидетельствующих в пользу данной концепции. В частности, представляет интерес тот факт, что клетки больных прогерией (синдром преждевременного старения) не способны к репарации индуцированных сшивок ДНК-белок [114], хотя других дефектов системы репарации ДНК в них обнаружить не удалось [81].

Эксперименты проводили на культурах клеток китайского хомячка (линия B11dii-FAF28), нормальных эмбриональных диплоидных фибробластов человека (штамм Э2) и фибробластов большой пигментной ксеродермой (штамм ИМГ-667). Все клетки были получены из Института медицинской генетики АМН СССР. Клетки китайского хомячка выращивали на среде

Игла с глутамином, содержащей 10% сыворотки крупного рогатого скота, фибробласты человека - на среде, состоящей из 80-85% среды Игла с глутамином, 10-15% сыворотки крупного рогатого скота и 5% пуповинной сыворотки человека. Снятые со стекла раствором трипсина клетки пересевали в несколько флаконов Карреля (1 : 6 - в случае клеток китайского хомячка, 1 : 2 - в случае фибробластов большой пигментной ксеродермой, 1 : 3 - в случае нормальных эмбриональных фибробластов человека). При этом клетки китайского хомячка помещали во флаконы в обычной для них ростовой среде, а фибробласты обоих типов - в среде, состоящей из 85% среды Игла с глутамином, 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 5% пуповинной сыворотки человека. В среду вводили ^3H -тимидин (0.3 мкКи/мл, удельная активность 22 Ки/ммоль), ^{14}C -валин (10 мкКи/мл, 26 Ки/ммоль) и ^{14}C -лейцин (2 мкКи/мл, 32-58 Ки/ммоль). Взяв за основу описанную ранее методику определения количества сшивок в комплексе ДНК-белок [85], мы подвергли ее значительной модификации, поэтому считаем целесообразным привести целиком.

Через определенное время после посева клетки одного из флаконов снимали со стекла холодным раствором версена, осаждали центрифугированием (250 г, 5 мин, комнатная температура). Осадок суспендировали в 3-9 мл (в зависимости от количества клеток, выросших во флаконе) холодного 0.01 М фосфатного буфера (pH 7.0), содержащего мочевины (6 М) и KCl (2.5 М). Полученную суспензию в количестве 3 мл помещали в конической стеклянной пробирке в ледяную баню и озвучивали на ультразвуковом дезинтеграторе MSE в режиме "amplitude-4, power stand-high" (2 раза по 30 с с 30-секундным перерывом). По 0.3 мл гомогената наносили на 5 колонок (сделанных из обычных пастеровских пипеток) с оксиапатитом (объем 0.1 мл) американской фирмы "Biograd" (Bio-Gel^RHTR). Через каждую колонку пропускали 2 раза по 0.4 мл 0.2 М фосфатного буфера. Все растворы содержали мочевины (6 М) и KCl (2.5 М) и имели температуру около 4°C. Было показано, что основная масса ДНК (вместе с ковалентно связанными белками) выходит именно в первых 0.4 мл 0.4 М фосфатного буфера. По 7 капель этого элюата наносили на фильтры "Whatman 3MM". Высушенные фильтры помещали на два часа в холодную 10%-ную ТХУ, а затем на 30 мин - в абсолютный этанол. Радиоактивность вторично высушенных

фильтров определяли на сцинтилляционном счетчике "Mark III" (модель 6880 фирмы "Searle Analytic, Inc.") по программе 5 (двойная метка " $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ "). По величине коэффициента " $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ " (среднее для 5 колонок), рассчитанного с учетом проникновения счета из ^{14}C -канала в ^3H -канал, судили о количестве белка, ковалентно связанного с ДНК.

Данные об изменении коэффициента " $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ " в различных культивируемых клетках при их "стационарном старении" представлены на рис. 16. В первом эксперименте, проведенном на клетках китайского хомячка, определяли этот коэффициент для 3-, 6-, 10-, 15- и 22-дневных культур (рис. 16, а), а во втором - для 11-, 14-, 24-, 28-, 33- и 40-дневных (рис. 16, б). Нормальные диплоидные эмбриональные фибробласты человека находились во флаконах без пересева в течение 3, 6, 10 и 19 дней (рис. 16, в), а клетки больной пигментной ксеродермой - в течение 3, 6, 9 и 12 дней (рис. 16, г). Результаты каждого эксперимента были оценены с помощью регрессионного анализа. Линии регрессии и приведены на рис. 16.

Видно, что во всех случаях при "стационарном старении" коэффициент " $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ " возрастает, что свидетельствует о накоплении в клетках сшивок между молекулами ДНК и белков. Надо, однако, заметить, что регрессия оказалась значимой ($p < 0.05$) только в случае наиболее длительного эксперимента с клетками китайского хомячка (см. рис. 16, б). Это позволило нам предположить, что, во-первых, для выявления тонких молекулярных изменений 2-3-недельного "стационарного старения" уже недостаточно (необходимо 5-6 недель), а во-вторых, что, чем больше скорость пролиферации клеток исследуемой культуры (у клеток китайского хомячка она гораздо выше, чем у других изученных клеток), тем более выражены возникающие в них при ограничении пролиферации "возрастные" изменения.

Хотелось бы также отметить следующее. Коэффициент " $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ ", конечно, не может служить точным показателем абсолютного количества сшивок ДНК-белок в изучаемых клетках, ибо он в значительной степени зависит от конкретных условий данного эксперимента. Только его увеличение или уменьшение позволяют сделать вывод о возникновении или исчезновении, соответственно, ковалентных связей между молекулами ДНК и белков. Тем не менее, при обеспечении одинаковых концентраций меченых предшественников, объемов среды роста и количества посаженных во флакон клеток можно

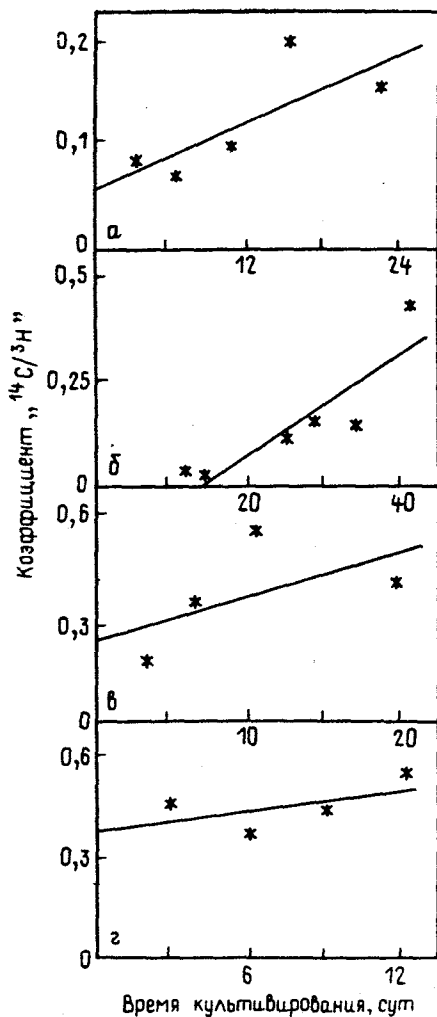


Рис. 16. Зависимость величины коэффициента " $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ " (пояснения в тексте) от времени, прошедшего после пересева клеток, а и б - клетки китайского хомячка (два эксперимента), в - нормальные эмбриональные фибробласты человека, г - фибробласты большой пигментной ксеродермой. Каждая точка представляет собой среднее из данных, полученных на 5 хроматографических колонках [108]

провести ориентировочную сравнительную оценку количества спонтанных сшивок ДНК-белок в клетках разных культур. Так как опыты на нормальных эмбриональных фибробластах и фибробластах большой пигментной ксеродермой ставились практически идентично, оценка величин коэффициента " $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ " (ось ординат на рис. 16, в, г) дала нам возможность предположить, что во втором случае этот показатель изначально выше и в процессе культивирования изменяется в меньшей степени. Несомненно, что этот феномен нуждается в дальнейшем исследовании.

2.2.3. Метилирование ДНК

Результаты целого ряда работ (обзор данных см. [11, 173, 195, 224]) позволяют полагать, что содержание 5-метилцитозина в ДНК существенно изменяется в процессе развития и старения организмов. Были получены данные [83] о том, что длительное введение мышам геропротектора-антиоксиданта эпигида (гидрохлорида 2-этил-6-метил-3-оксипиридина) приводит к увеличению снижающегося с возрастом содержания в ДНК 5-метилцитозина.

Что же касается культивируемых клеток, то нам известно очень мало работ, в которых была сделана попытка проанализировать возможную взаимосвязь изменений уровня метилирования ДНК со старением *in vitro*. Авторы одной из этих работ [367] показали, что с увеличением числа пройденных пассажей содержание 5-метилцитозина в ДНК нормальных диплоидных клеток снижается, а в ДНК клеток "бес- смертных" линий остается неизменным. Сходные данные были получены и другими авторами [168], выявившими снижение содержания в ДНК 5-метилцитозина при старении *in vitro* диплоидных фибробластов человека штамма MRC-5. Представляется интересным также тот факт, что импульсное воздействие на клетки MRC-5 аналогами цитозина, 5-азацитидином или 5-азадезоксцитидином, вызывающими снижение уровня метилирования ДНК, приводит к уменьшению собственного этим клеткам потенциала УКП [168, 224, 225].

Мы изучили уровень метилирования ДНК в культивируемых клетках китайского хомячка и человека через разное время после пересева, т. е. на разных стадиях "стационарного старения" [106].

Эксперименты проводили на трансформированных клетках китайского хомячка линии B11dii-FAF28 (клон 237_{2a}), эмбриональных диплоидных фибробластах человека штамма ИМГ-814 на 35-м пассаже и на диплоидных фибробластах штамма ИМГ-1013, полученных от большой пигментной ксеродермой женщины, на 5-м пассаже. Клетки культивировали на среде Игла, содержащей либо 10% (по объему) сыворотки крупного рогатого скота (клетки китайского хомячка), либо 10% сыворотки крупного рогатого скота и 5% пуповинной сыворотки человека (эмбриональные диплоидные фибробласты человека), либо 15% сыворотки крупного рогатого скота и 5% пуповинной сыворотки человека (фибробласты большой пигментной ксеродермой). Клетки, которые росли во флаконе в те-

чение 3-4 дней после посева, пересевали в несколько новых флаконов в отношении 1 : 6 (клетки китайского хомячка), 1 : 2 (эмбриональные фибробласты человека) и 1 : 4 (клетки больной пигментной ксеродермой). При посеве в среду роста вводили 6-³H-уридин (ЧССР, удельная активность 18 Ки/ммоль) до конечной концентрации 2 мКи/мл. Через определенное время клетки из 1-2 флаконов снимали со стекла трипсином, суспендировали в растворе Хэнкса, осаждали на центрифуге с охлаждением (900 г, 10°C, 6 мин), суспендировали в 80%-ном этаноле, оставляли на 1 ч при комнатной температуре, снова осаждали центрифугированием, суспендировали осадок в 90%-ном и затем абсолютном спирте и полученную суспензию ставили в холодильник до завершения опыта. Получив клетки всех "возрастов", их еще раз промывали этанолом, два раза ацетоном (ос. ч.) и один раз серным эфиром, после чего высушивали при 60°C (20-30 мин). Полученные образцы суспендировали в среде, содержащей 0,1 М Трис-НCl (рН 7,5), 0,1 М Na₄ ЭДТА, 1% ДДС-Na, 1 мг/мл проназы Е (Merk, ФРГ; предварительно прогретая в 0,1 М NaCl в течение 30 мин при 60°C). Смесь инкубировали при 37°C в течение 18 ч, затем охлаждали, добавляли 1/4 объема 5 М NaCl и проводили депротеинизацию встряхиванием с двойным объемом смеси хлороформ-изоамиловый спирт (9 : 1). Затем смесь центрифугировали 10 мин при 10 000 g и из водной фазы осаждали нуклеиновые кислоты двумя объемами охлажденного этанола. Осадок для освобождения от примесей РНК растворяли в 0,5 М NaOH и инкубировали 30 мин при 60°C. Раствор охлаждали до 0°C и осаждали ДНК добавлением равного объема охлажденной (0°C) 1 н. хлорной кислоты. Осадок 4 раза промывали 0,3 М хлорной кислотой и 3 раза этанолом (все процедуры при 0°C). Затем осадок при комнатной температуре промывали смесью этанол - серный эфир (1 : 1) и эфиром, после чего высушивали при 100°C (10 мин). ДНК гидролизовали до оснований 57%-ной хлорной кислотой (15 мкл/1 мг ДНК, 100°C, 1 ч). Гидролизат обрабатывали и основания разделяли с помощью двумерной тонкослойной хроматографии на целлюлозе, как это было описано ранее [52]. Каждый образец наносили на 4-5 пластинок. Радиоактивность оснований измеряли в стандартном диоксановом сцинтилляторе (ЖС-8) на счетчике "Mark III" (Tracor Analytic, Голландия). Уровень метилирования (УМ) меченой ДНК рассчитывали по формуле: $УМ = 100 \cdot m^5C / (C + m^5C)$. В этой формуле m⁵C означает

Уровень метилирования ДНК в "стационарно стареющих" культивируемых клетках [106]

Тип клеток	"Возраст" культуры, сут	Уровень метилирования (\pm ошибка среднего)	"Кажущееся" содержание ГЦ-пар (\pm ошибка среднего)
Клетки китайского хомячка	3	4.37 \pm 0.45	41.94 \pm 0.88
	6	3.61 \pm 0.19	42.60 \pm 0.23
	11	3.26 \pm 0.06	40.75 \pm 0.22
Эмбриональные диплоидные фибробласты человека	17	3.29 \pm 0.13	42.38 \pm 0.41
	3	3.86 \pm 0.21	45.82 \pm 0.58
	6	3.91 \pm 0.06	44.76 \pm 0.24
Фибробласты больной пигментной ксеродермой	11	4.14 \pm 0.11	43.07 \pm 0.13
	6	4.38 \pm 0.21	44.63 \pm 0.52
	10	3.85 \pm 0.10	45.81 \pm 0.33
	15	4.24 \pm 0.35	44.26 \pm 1.06

Примечание: По уровню метилирования различные статистически достоверно ($p < 0.05$) между 3- и 11-дневными, а также между 3- и 17-дневными клетками китайского хомячка

5-метилцитозин, а С - цитозин. Состав ДНК оценивали по сумме радиоактивностей цитозина, тимина и 5-метилцитозина, которую принимали за 50 мол. %, и на основании этой величины вычисляли "кажущееся" содержание ГЦ-пар. Статистическую обработку результатов проводили на ЭВМ "Hewlett-Packard 9830B".

Полученные данные представлены в табл. 11. Видно, что относительное содержание 5-метилцитозина в ДНК меняется с "возрастом" только у клеток китайского хомячка. Статистически достоверные ($p < 0.05$) различия были выявлены между 3- и 11-дневными, а также между 3- и 17-дневными клетками. Отсутствие выраженных изменений "кажущегося"

содержания ГЦ-пар в ДНК позволяет полагать, что во время пребывания клеток в стационарной фазе не происходит существенного включения радиоактивности в митохондриальную ДНК с иным, чем у ядерной ДНК, "кажущимся" составом и/или содержанием остатков 5-метилцитозина.

То, что уровень метилирования ДНК меняется только при "стационарном старении" обладающих высокой пролиферативной активностью клеток китайского хомячка, объясняется, на наш взгляд, следующим образом. Метилирование ДНК у эукариот является, по-видимому, одним из механизмов регуляции экспрессии генов и клеточной дифференцировки [11, 58]. В связи с этим уровень метилирования ДНК должен существенно меняться только при сильно выраженных регуляторных изменениях. Именно такое изменение претерпевают клетки китайского хомячка, переходящие из лог-фазы ("возраст" 3 сут), где скорость их пролиферации очень высока, в стационарную фазу, где она практически падает до нуля. В случае других культур этот перепад значительно меньше выражен в силу изначально гораздо более низкой скорости пролиферации клеток. Возможно, что при значительном увеличении времени "стационарного старения" этих клеток мы бы и в них обнаружили снижение уровня метилирования ДНК, сходное с наблюдаемым при старении *in vivo* [11] или *in vitro* [168, 367]. Иными словами, ситуация, судя по всему, очень сходна с той, которая выявилась при исследовании изменений количества шивок ДНК-белок в "стационарно стареющих" клетках (см. раздел 2.2.2).

2.2.4. Сестринские хроматидные обмены и углубление в состоянии покоя

После обнаружения около 15 лет назад феномена сестринских хроматидных обменов (СХО) [38, 246] появился целый ряд работ, посвященных изучению возможных возрастных изменений частоты как спонтанных, так и индуцированных различными агентами СХО (краткий обзор данных см. [365]). Однако результаты этих исследований достаточно противоречивы. Особенно это касается спонтанного уровня СХО. Имеются сообщения о его понижении [60] и повышении [32, 61, 115, 128, 185, 309] с возрастом, а также об отсутствии изменений этого показателя при старении [218, 316]. Что же касается уровня индуцированных СХО, то Шнайдер и его сотрудники показали, что он снижается при старении как *in vitro*, так и *in vivo*. [276, 313]. В то же время другими авторами было выявлено увеличение уровня индуцированных СХО с

возрастом в клетках костного мозга мышей [61] и лимфоцитах человека [32].

Таким образом, данные об изменениях уровня СХО при старении очень противоречивы. Одной из причин этого является, по-видимому, значительная межиндивидуальная вариабельность по уровню спонтанных и индуцированных СХО [32]. Кроме того, большой разброс данных в вышеуказанных работах может быть связан с тем, что исследования проводились, как правило, на чрезвычайно неоднородной клеточной популяции. В частности, наиболее часто исследуемые лимфоциты периферической крови очень сильно отличаются друг от друга по "возрасту" [109].

В связи с этим представлялось целесообразным провести исследования уровня СХО в культивируемых клетках на разных стадиях их "стационарного старения". Данная модельная система позволяет поставить большую часть клеток изучаемой популяции в практически одинаковые условия, синхронизировав как молекулярные, так и цитогенетические изменения в них с помощью "барьера" в виде искусственного ограничения пролиферации. При этом степень такого ограничения во много раз выше той, которая достигается в условиях *in vivo* (по крайней мере, для тех клеток, на которых обычно проводятся исследования СХО: лимфоцитов периферической крови, клеток костного мозга, клеток селезенки).

Такие исследования были нами проведены на культивируемых клетках китайского хомячка линии B11dii-FAF 28 (клон 2372a) [112, 113]. Клетки выращивали во флаконах Карреля на среде Игла с глутамином, содержавшей 10% сыворотки крупного рогатого скота. В качестве индуктора СХО использовали алкилирующий агент тиофосфамид. Выбор данного мутагена был обусловлен тем, что он широко применяется в цитогенетических исследованиях и к настоящему моменту накоплено большое количество информации о его действии на хромосомный аппарат клеток. Дозы мутагена были выбраны таким образом, чтобы количество СХО на клетку заметно (в несколько раз) превышало спонтанный уровень, но не сильно усложняло анализ препаратов.

Параллельно исследованию СХО мы изучили изменение в процессе "стационарного старения" клеток скорости их продвижения по циклу после стимуляции к делению. Эти исследования нам представлялось целесообразным провести, ибо использованная методика оценки частоты СХО, позволяет одновременно определять и скорость пролиферации клеток после их посева с 5-бромдезоксисуридином (БДУ).

Схема 1

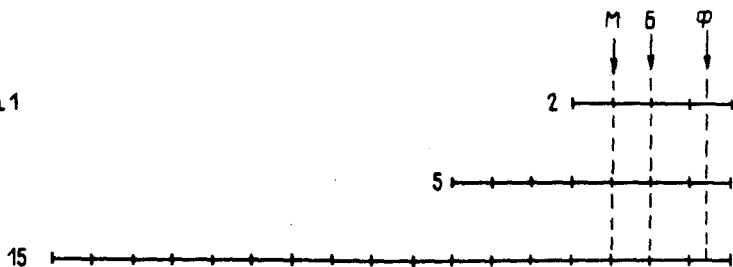


Схема 2

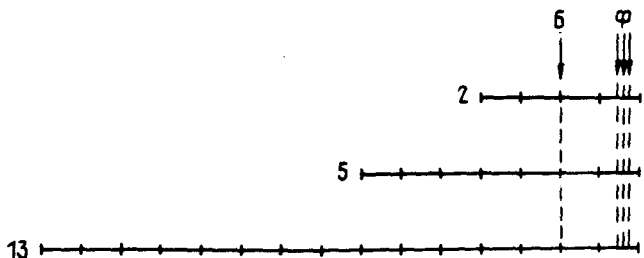


Рис. 17. Схемы 1 и 2 культивирования клеток китайского хомячка. М - введение мутагена, Б - пересев с БДУ, Ф - фиксация. Цифрами слева обозначено время культивирования клеток (в сутках) до пересева с БДУ [112, 113]

Эксперименты проводили по трем схемам (рис. 17 и 18). Перед всеми экспериментами несколько флаконов с клетками пересевали каждые 3-4 дня в отношении 1 : 4 (за это время клетки успевали образовать плотный монослой).

После этого по схеме 1 (см. рис. 17) четыре флакона выдерживали без пересева 15 сут, четыре - 5 сут и четыре - 2 сут. За сутки до пересева всех 12 флаконов в половину флаконов каждой группы добавляли 0.2 мкг/мл тиофосамида. Через сутки мутаген тщательно отмывали и все 12 флаконов пересевали 1 : 5 (при этом клетки с каждого флакона пересевали на один новый флакон), вводя в среду роста 10 мкг/мл БДУ. Через 36 ч после пересева с БДУ клетки фиксировали.

По схеме 2 (см. рис. 18) два флакона с клетками выдерживали без пересева 13 сут, два - 5 сут и два - 2 сут. Затем все 6 флаконов пересевали следующим образом. Клетки с двух флаконов одного "возраста" снимали со стекла трипсином, объединяли и полученную суспензию равномерно распределяли по 6 флаконам той же площади (пересев 1 : 3), вводя в среду роста 10 мкг/мл БДУ. Обработку клеток мутагеном не производили. Клетки фиксировали через 36, 40 и 44 ч

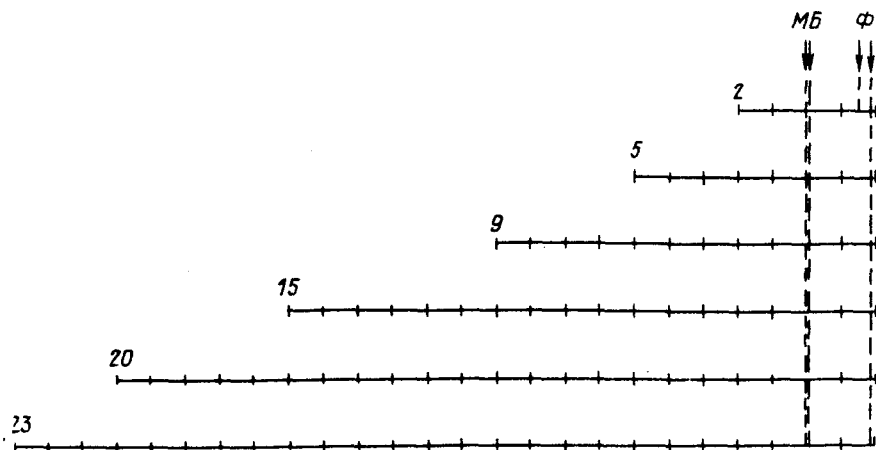


Рис. 18. Схема 3 культивирования клеток китайского хомячка. Обозначения, как на рис. 17 [113]

(через 40 ч – только для определения соотношения митозов) после пересева с БДУ.

По схеме 3 (см. рис. 18) флаконы выдерживали без пересева 23, 20, 15, 9, 5 и 2 сут (по два флакона каждого "возраста"). За 1 ч до пересева с БДУ в один из флаконов каждого "возраста" вводили тиофосамид до конечной концентрации 4.8 мкг/мл. Концентрация мутагена была подобрана так, чтобы ее произведение на время экспозиции было таким же, как в опыте, проведенном по схеме 1 (см. рис. 17). Через 1 ч мутаген тщательно отмывали и все 12 флаконов пересевали 1 : 4 (половину клеток каждого флакона, кроме 2-дневных, – поровну на два новых таких же флакона, а клетки с каждого из 2-дневных флаконов – поровну на 4 новых флакона). Клетки четырех флаконов (двух – с контрольными клетками, двух – с клетками, обработанными мутагеном) 2-дневного "возраста" фиксировали через 36 ч, а четырех других – через 44 ч. Клетки всех остальных флаконов фиксировали через 44 ч.

Приготовление препаратов и дифференциальную окраску сестринских хроматид проводили по методике, описанной в работе [117]. При определении уровня СХО на каждый флакон просчитывали по 25 метафаз. Отбор метафазных пластинок, пригодных для цитогенетического анализа, проводили по критериям, предложенными Н.П. Бочковым с соавторами [6]. Статистический анализ полученных данных проводили на калькуляторе "HP-97" и ЭВМ "Hewlett – Packard 9830B".

Подсчет соотношения митозов делали на тех же препаратах, с помощью которых оценивали уровень СХО. При этом на каждый флакон анализировали 150 метафаз. Отдельно подсчитывали метафазы первого, второго, а также третьего плюс следующих (3 + 4 + 5 + ...) митозов. Для вычисления коэффициента N , характеризующего соотношение митозов, использовали формулу, предложенную А.Н. Чеботаревым [116]:

$$N = \frac{\sum_{i=1}^n \left(\frac{f_i}{2^{i-1}} \cdot i \right)}{\sum_{i=1}^n \frac{f_i}{2^{i-1}}}, \quad (1)$$

где i - номер митоза, а f_i - его частота (номер митоза для популяции "3+" условно считали равным 3). Фактически данный коэффициент представляет собой среднее число делений, которое прошли клетки от момента стимуляции их к делению до фиксации. Чем выше параметр N , тем больше скорость пролиферации изучаемых клеток.

Результаты эксперимента, проведенного по схеме 1 (см. рис. 17), представлены в табл. 12. Видно, что с увеличением "возраста" клеток уровень спонтанных СХО, непрерывно растет (регрессия значима, $P < 0.05$). Уровень же СХО, индуцированных тиофосфамидом, от 2- до 5-дневного "возраста" резко увеличивается (~ на 35%), а затем практически не меняется до 15-дневного "возраста". Мы предположили, что отсутствие разницы в уровне СХО, индуцированных тиофосфамидом, между 5- и 15-дневными клетками свидетельствует об отсутствии изменений активности системы репарации ДНК, функционирование которой проявляется в виде СХО, в процессе "стационарного старения". Резкое же увеличение этого показателя от 2- до 5-дневного "возраста", на наш взгляд, было связано со следующим обстоятельством. Клетки подвергали воздействию мутагена в течение 24 ч. В то же время продолжительность клеточного цикла использованных в работе клеток состав-

Уровень СХО в культивируемых клетках китайского комьяка через различное время после посева [112]

Время культиви-рования, сут	Число СХО на клетку *	
	Спонтанные	Индукцированные тио-фосфамидом
2	6.82 ± 0.54	36.88 ± 1.95
5	7.38 ± 0.79	49.70 ± 2.69
15	8.04 ± 0.63	47.64 ± 2.67

* Указаны 95%-ные доверительные интервалы. Достоверность различий: 1) в спонтанном уровне СХО - между 2- и 15-суточными клетками ($p = 0.004$); 2) в уровне индуцированных СХО - между 2- и 5-суточными ($p = 1.1 \cdot 10^{-9}$), а также между 2- и 15-суточными ($p = 1.8 \cdot 10^{-9}$) клетками

ляет 16 ч. Таким образом, - в случае активно делящихся клеток (2-дневные культуры) часть индуцированных повреждений успевает до введения БДУ пройти через репликацию ДНК, и поэтому СХО, к которым эти повреждения приводят (а СХО, по всей видимости, образуются именно вследствие повреждения ДНК [332]), не выявляются при микроскопировании. В случае же 5-дневных культур, состоящих практически на 100% из покоящихся клеток, почти все индуцированные повреждения - "предшественники СХО" проходят через репликацию ДНК в присутствии БДУ (после стимуляции клеток к делению при пересеве) и реализуются в видимые при микроскопировании СХО. Частично это положение относится и к данным, касающимся уровня спонтанных СХО.

Для проверки этого предположения был проведен эксперимент по по схеме 3 (см. рис. 18), в котором время действия мутагена было достаточно мало по сравнению с длительностью клеточного цикла. Кроме того, в этом случае было увеличено время "стационарного старения" для уточнения характера "возрастных" изменений количества как спонтанных, так и индуцированных СХО.

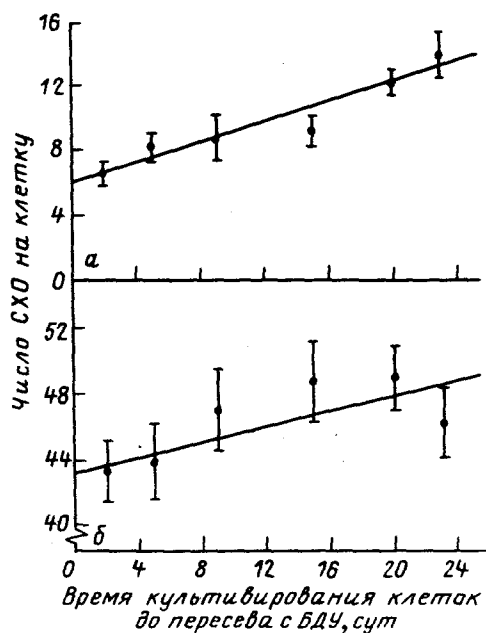


Рис. 19. Зависимость уровня спонтанных (а) и индуцированных (б) СХО от "возраста" культивируемых клеток китайского хомячка. Указаны 95%-ные доверительные интервалы [113]

Перед этим экспериментом мы провели вспомогательный опыт (схема 2, см. рис. 17), в котором клетки фиксировали через 36, 40 и 44 ч после пересева с БДУ. В опыте по схеме 1 (см. рис. 17), когда клетки фиксировали через 36 ч после пересева с БДУ, подсчет числа СХО у 5-дневных и, в особенности, 15-дневных клеток оказался довольно трудоемким, так как лишь небольшая часть клеток успевала пройти 2 цикла репликации в присутствии БДУ и имела дифференциально окрашенные сестринские хроматиды. Поэтому целесообразно было фиксировать клетки на более поздних сроках. Эксперимент по схеме 2 (см. рис. 17) и был поставлен с целью подбора удобных сроков фиксации (для клеток, "возраст" которых составляет 5 и более дней) и выяснения вопроса о том, влияет ли время фиксации на получаемые значения уровня СХО в клетках.

Приведенные в табл. 13 результаты вспомогательного опыта по схеме 2 (см. рис. 17), во-первых, позволили нам заключить, что величины уровня СХО, определяемые через 36 и 44 ч после пересева, не различаются между собой (первая строка таблицы), а во-вторых, подтвердили вывод о возрастании частоты спонтанных СХО при "стационарном старении"

Таблица 13

Изменение уровня спонтанных СХО в процессе "стационарного старения" культивируемых клеток китайского хомячка (фиксация через 44 ч после пересева с БДУ, указаны 95%-ные доверительные интервалы) [113]

"Возраст" клеток, сут	Число спонтанных СХО на клетку		
	Первый флакон	Второй флакон	Среднее
2	6.04 ± 1.18	6.00 ± 0.89*	6.02 ± 0.74
5	6.92 ± 1.05	7.24 ± 1.30	7.08 ± 0.80
13	7.84 ± 0.76	7.32 ± 1.36	7.58 ± 0.75

* Фиксация через 36 ч после пересева с БДУ

клеток, сделанный на основании данных эксперимента по схеме 1 (регрессия значима, $p = 0.026$).

Результаты эксперимента по схеме 3 (см. рис. 18) представлены на рис. 19. Видно, что по мере увеличения "возраста" клеток спонтанный уровень СХО (рис. 19, а) непрерывно растет (от 6.78 для 2-дневных до 13.9 для 23-дневных клеток, регрессия высоко значима, $p = 1.64 \cdot 10^{-6}$). Уменьшение времени воздействия на клетки алкилирующим агентом с 24 до 1 ч, как мы и полагали, привело к исчезновению разницы в уровне индуцированных СХО между 2- и 5-дневными клетками. Хотя увеличение времени эксперимента до 23 сут дало все же возможность выявить некоторое возрастание этого показателя в процессе "стационарного старения" (регрессия значима, $p = 0.0145$), необходимо заметить, что количественно это увеличение соответствует изменению уровня спонтанных СХО (см. рис. 19, б). Видно, что линии регрессии, характеризующие рост уровня спонтанных и индуцированных СХО, идут практически параллельно. Это позволяет полагать, что ни ограничение пролиферации само по себе, ни "старение" клеток в стационарной фазе роста не приводят к изменению количества СХО, индуцированных 1-часовым воздействием тиофосфамидом. Эти данные согласуются с результатами работы [32], проведенной на лимфоцитах периферической крови

Влияние "стационарного старения" культивируемых клеток китайского хомячка на скорость их продвижения по циклу после стимуляции к делению (в каждом эксперименте было проанализировано по 2 флакона каждого "возраста"; просчитывали по 150 клеток на флакон) [113]

Эксперимент	Время от момента посева с БДУ до момента фиксации, ч	"Возраст" клеток, сут	Коэффициент N	
			без мутагена	с мутагеном
По схеме 1 (рис. 17)	36	2	1.81*, ***	1.78
		5	1.61	1.27
		15	1.29 *	1.61
	36	2	1.76	-
		5	1.32	-
		13	1.29	-
По схеме 2 (рис. 17)	40	2	2.10	-
		5	1.50	-
		13	1.71	-
	44	2	2.41**	-
		5	1.70	-
		13	1.78	-
По схеме 3 (рис. 18)	44	2	2.79	2.47
		5	1.85	1.89
		9	2.23	2.03
		15	1.95	1.96
		20	1.93	1.89
		23	1.07	1.89

* Анализировали 3 флакона

** Анализировали 1 флакон

*** Для одного из флаконов просчитано 110 клеток

новорожденных и взрослых людей (большая выборка). В ней было показано, что уровень СХО в клетках, оцениваемый после их обработки тиофосфамидом или митомизином С, увеличивается с возрастом донора. Однако при этом разница между уровнями спонтанных и индуцированных СХО от возраста практически не зависит, то есть количество "собственно индуцированных" СХО не меняется при старении.

Нужно отметить, что при оценке уровня СХО (как спонтанных, так и индуцированных) в 2-дневных клетках (см. схеме 3, рис. 18) были объединены данные, полученные при фиксации через 36 и 44 ч после пересева с БДУ (в последнем случае было проанализировано всего 22 клетки на два флакона для спонтанных СХО и 8 клеток одного флакона - для индуцированных СХО). Это оказалось возможным, ибо, как и в опыте по схеме 2 (см. рис. 17), разницы между этими данными не было обнаружено.

Одной из характерных черт клеток старого организма является их сниженная пролиферативная активность. В частности, было показано, что лимфоциты периферической крови пожилых людей медленнее входят в цикл, у них растянут период G_1 [346]. В другой работе при помощи дифференциальной окраски с БДУ было обнаружено, что в культуре лимфоцитов молодых индивидов число клеток, прошедших за 72 ч одно деление, составляет 8%, два деления - 24%, три деления и более - 68%. Для клеток старых людей эти величины составили 30%, 42% и 28%, соответственно [364]. Но не только возраст организма-"хозяина", но и время пребывания клеток в состоянии покоя (обзор данных см. [39]), пропорциональны степени их углубления в R-фазу клеточного цикла, что выражается в удлинении пререпликативного периода после стимуляции к делению.

В табл. 14 приведены результаты нашего исследования влияния "стационарного старения" клеток китайского хомячка на скорость их продвижения по циклу (которую характеризует коэффициент N) после пересева с БДУ. Наблюдается явная тенденция к снижению величины N при "стационарном старении", особенно от 2- до 5-дневного "возраста". Интересно также отметить, что между контрольными и обработанными мутагеном клетками одного "возраста" нет резкой разницы по коэффициенту N . Это позволило сделать вывод, что тиофосфамид в использованной дозе не вызывает значительной задержки продвижения клеток по циклу. Более того, в случае "старых" клеток (15-дневных из эксперимента по схе-

ме 1, рис. 17, и 23-дневных из эксперимента по схеме 3, рис. 18) даже наблюдалось некоторое увеличение скорости пролиферации (после стимуляции клеток к делению) под влиянием мутагена. К сожалению, недостаток данных не позволяет сделать какой-либо определенный вывод о сути этого феномена, свидетельствуя лишь о необходимости его дальнейших исследований.

Из результатов, представленных в табл. 14, также видно, что воздействие мутагеном уменьшает различия по коэффициенту N между "молодыми" и "старыми" клетками и что увеличение времени между пересевом клеток и их фиксацией приводит к пропорциональному возрастанию величины N . Последнее обстоятельство служит, на наш взгляд, подтверждением целесообразности использования коэффициента N для характеристики средней скорости пролиферации клеток.

Таким образом, полученные нами результаты подтверждают тот факт, что "стационарно стареющие" клетки (не только нормальные, но и трансформированные), как и клетки, стареющие *in vivo*, со временем углубляются в состояние покоя.

2.3. Клетки микоплазмы

Целый ряд исследований феномена "стационарного старения" был выполнен в одной и той же лаборатории на культивируемых клетках *Acholeplasma laidlawii* [2, 46-51, 118]. Правда, в большинстве своих работ авторы не объясняли, почему они называют старением деградацию клеток микоплазмы в стационарной фазе роста. Только в обзорной статье 1986 года [46] попытка такого объяснения была сделана, при этом впервые был упомянут (без ссылки на источник) введенный нами в 1983 году [111] термин "стационарное старение". В частности, было приведено положение, согласно которому "...стационарное старение" должно быть свойственно самым различным клеточным популяциям независимо от их природы" [111].

Клетки микоплазмы выбрали для данных экспериментов по следующим соображениям [46]. Во-первых, за счет очень быстрого размножения клеток культура успевает пройти все фазы роста и "состариться" за время, не превышающее 80-100 ч. Это обстоятельство сильно сокращает время экспериментов и трудозатраты на них. Во-вторых, так как клетки микоплазмы имеют только плазматические мембраны, получение чистых мембранных препаратов значительно облегчается, а

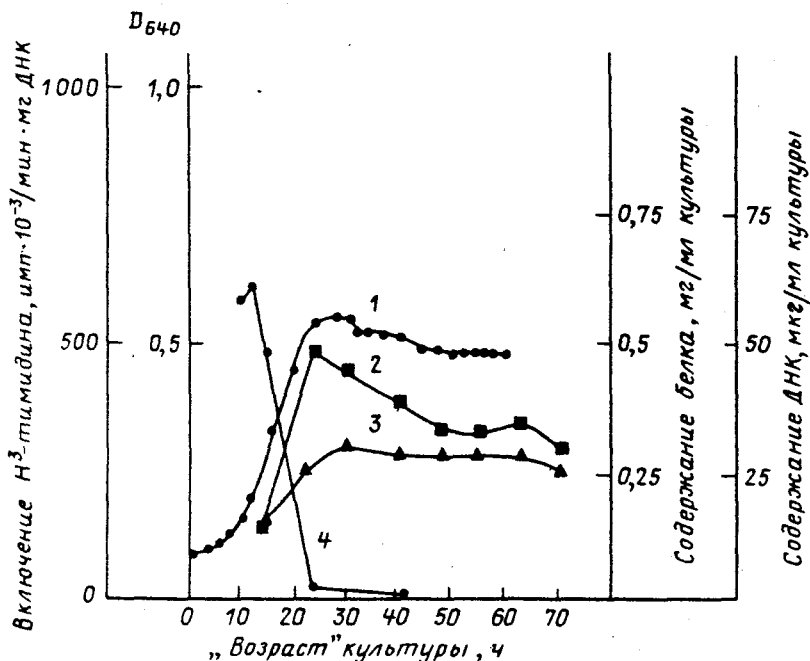


Рис. 20. Зависимость оптической плотности (1) суспензионной культуры *Acholeplasma laidlawii*, содержания в ней ДНК (2) и белка (3), а также интенсивности синтеза ДНК в клетках (4) от времени культивирования [46] .

именно "возрастные" изменения плазматических мембран в первую очередь интересовали авторов этих исследований.

Кинетику роста суспензионной культуры *Acholeplasma laidlawii* оценивали, измеряя через определенные промежутки времени оптическую плотность этой культуры при 640 нм, а также количество белка и ДНК в ней. Кроме того, измеряли интенсивность синтеза ДНК в клетках по включению ³H-тимидина (методика, к сожалению, не приведена) [48]. Полученные результаты представлены на рис. 20.

Исследуя относительное количество колониеобразующих единиц в культурах разного "возраста" (оцениваемое путем высева аликвоты клеточной суспензии на плотную питательную среду), получили данные, приведенные на рис. 21 [46, 48]. Видно, что количество колониеобразующих единиц в определенном объеме клеточной суспензии возрастает до начала стационарной фазы роста (это согласуется с изложенными в

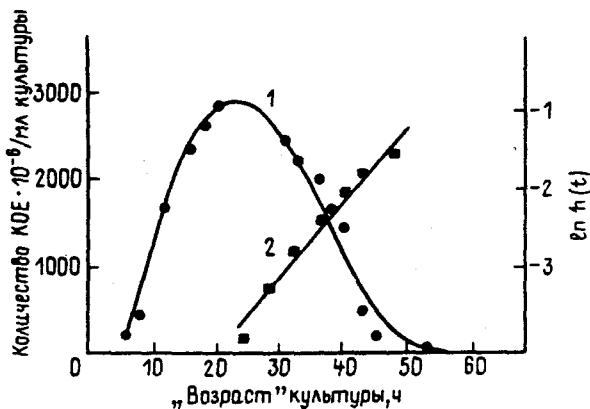


Рис. 2.1. Изменение количества колониобразующих единиц в мл культуры (1) и логарифма интенсивности "пролиферативной" гибели клеток (2) при "стационарном старении" суспензионной культуры *Acholeplasma laidlawii* [48]

разделе 3.7 настоящего обзора результатами, полученными при изучении феномена "стационарного старения" клеток китайского хомячка с помощью клеточно-кинетической модели), а потом снижается. Рассчитывая интенсивность "пролиферативной смерти" клеток, показали, что ее зависимость от "возраста" культуры (после вступления последней в стационарную фазу роста) близка к линейной. На основании этого авторы заключили, что культура клеток микоплазмы в стационарной фазе роста вымирает по тем же законам, что и популяции людей или лабораторных животных, то есть клетки культуры стареют.

Однако во введении к настоящей работе уже отмечалось, что говорить о старении клеток нужно с большой осторожностью, ибо их переход в неделящееся состояние еще не означает немедленной гибели, хотя, конечно, при увеличении относительного числа в популяции непролиферирующих клеток скорость накопления в ней "возрастных" повреждений должна увеличиваться. Кинетика же "настоящей" гибели клеток может сильно отличаться от кинетики "пролиферативной смерти". Во всяком случае, в многоклеточных организмах при их развитии переход клеток в состояние покоя происходит совсем не "по Гомпертцу", хотя в дальнейшем смертность в популяции этих организмов действительно увеличивается экспоненциально.

И, наконец, в случае микоплазмы (из-за ее очень малых размеров) практически невозможен подсчет общего числа живых клеток в аликвоте, отбираемой для определения количества колониеобразующих единиц, то есть расчет делается на 1 мл суспензии, что, конечно, также сильно искажает истинную картину "старения" культуры. Используемый метод просто не позволяет отличить гибель клетки от ее необратимого перехода в состояние покоя (в случае культур эукариотических клеток эта проблема исчезает, ибо перед посевом на колониеобразование возможны как подсчет клеток с помощью обычного микроскопа, так и оценка — например, с помощью витального красителя — числа живых клеток).

Как показали наши совместные исследования, в процессе "стационарного старения" культуры клеток микоплазмы увеличивается количество однонитевых разрывов и щелочеллабильных участков в ДНК [46, 97].

Было, кроме того, установлено, что при этом изменяется электрофоретический профиль мембранных белков и увеличивается время их существования (за счет снижения скорости как синтеза, так и распада), а также происходит снижение активности таких ферментов катаболизма, как ДНКаза, РНКаза, катепсин D и β -глюкозидаза [2, 46]. К сожалению, обнаружив эти факты, исследователи не сравнили их с имеющимися данными об изменении соответствующих параметров при старении *in vivo* (что, на наш взгляд, совершенно необходимо для выводов об адекватности используемой модели).

Как уже отмечалось, основное внимание при исследовании "стационарного старения" микоплазмы авторы обращали на состояние плазматических мембран. Им удалось показать, что с увеличением "возраста" культуры величина отношения "холестерин / фосфолипиды" для этих мембран возрастает от 0.15 до 0.6 [46, 51]. Предполагая, что такое изменение мембраны должно привести к увеличению ее микровязкости, провели соответствующие исследования с помощью флуоресцентного зонда пирена [46, 51]. Установили, что вязкость мембраны, оцениваемая по эффективности эксимеризации пирена (чем больше этот показатель, тем меньше вязкость), сначала уменьшается с 12-часового до 24-часового "возраста", затем увеличивается до 50-часового "возраста" и после этого практически не меняется. Иными словами, эти данные совсем не коррелируют с непрерывным возрастанием индекса "холестерин / фосфолипиды", хотя и согласуются с выявленными изменениями активности в мембранах H^+ -АТФазы, NADH-де-

гидрогеназы и глюкозосвязывающего белка [46]. На наш взгляд, это отнюдь не отрицает жизнеспособности модели "стационарного старения", свидетельствуя лишь о том, что изменения относительного содержания холестерина в мембранах, по-видимому, не являются ключевыми в клеточном старении, а есть следствие других (как нам кажется, происходящих в ДНК) изменений.

2.4. Растительные клетки

Исследованиям "стационарного старения" культивируемых растительных клеток посвящено довольно большое количество работ. Однако большинство из них — биотехнологического плана, и речь в них о клеточном старении как феномене вообще не идет, исследователей просто интересуют определенные процессы деградации клеток в стационарной фазе роста. В связи с этим хотелось бы в настоящем обзоре остановиться только на серии исследований, выполненных на биологическом факультете МГУ и посвященных изучению деструктивных процессов в суспензионных культурах растительных клеток, ибо авторы этих работ подчеркивают целесообразность использования таких культур для моделирования старения целого растения [24, 26, 43, 124-127].

Эксперименты проводили на суспензионных культурах клеток диоскореи дельтовидной (*Dioscorea deltoidea* Wall.) и табака сорта Висконсин-38 (*Nicotiana tabacum* L.). Плотность культуры определяли путем подсчета клеток в камере Фукса-Розенталя. Относительное количество живых клеток оценивали с помощью окраски 0.1%-ным водным раствором эозина. Митотический индекс определяли как процент делящихся клеток, выявляемых на фиксированных препаратах. Жизнеспособность клеток культуры определяли либо по кинетике роста после высева инокулюма определенного "возраста" в свежую жидкую питательную среду, либо по эффективности клонирования клеток на твердой (агаризованной) питательной среде.

На рис. 22 и 23 приведены кривые, описывающие зависимость от "возраста" культуры плотности клеток, плотности мертвых клеток, митотического индекса и относительного количества живых клеток. Авторы показали, что гибель клеток идет как в логарифмической фазе роста (при сохранении приблизительно постоянного соотношения живых и мертвых клеток), так и, естественно, в стационарной фазе, когда размножение клеток прекращается. При этом для клеток диоскореи

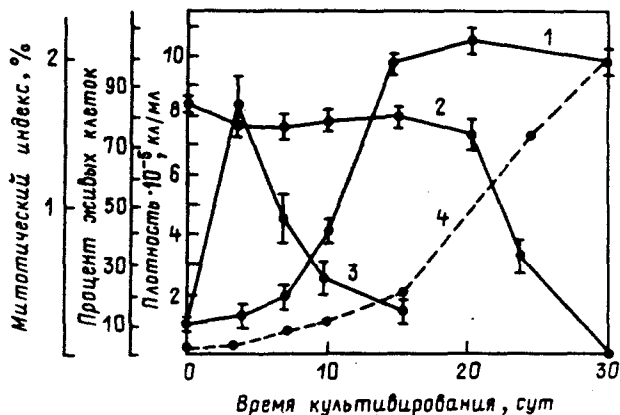


Рис. 22. Зависимость от "возраста" суспензионной культуры клеток диоскореи плотности клеток в культуре (1), относительного количества живых клеток (2), митотического индекса (3) и плотности мертвых клеток (4) [126]

характерно гораздо более быстрое уменьшение доли живых клеток, чем для клеток табака.

Используя распространенный в микробиологии метод выявления живых клеток по реакции восстановления хлорида 2,3,5-трифенилтетразолия (то есть по количеству образующегося формазана, фиксируемому спектрофотометрически), получили данные, представленные на рис. 24. Авторы заключили, что эти результаты свидетельствуют об идентичности кинетики гибели клеток при "стационарном старении", оцениваемой двумя разными методами — по окраске эозином и по реакции образования формазана. Нам представляется, что этот вывод не совсем соответствует действительности. Из рис. 24 видно, что как наклон, так и точки пересечения с осью абсцисс кривых, полученных разными методами, сильно различаются. В частности, полная гибель клеток табака, определяемая с помощью окраски эозином, фиксируется только к 70-м сут, а определяемая по реакции с хлоридом 2,3,5-трифенилтетразолия — уже к 40-м.

В табл. 15 представлены данные, свидетельствующие о непрерывном уменьшении содержания белка в "стареющих" клетках диоскореи и табака.

Было также показано, что с "возрастом" в культурах обоих растений происходят закономерное уменьшение числа деля-

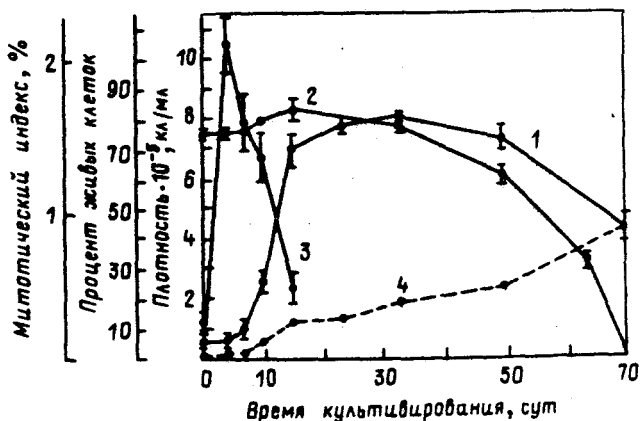


Рис. 23. Зависимость от "возраста" суспензионной культуры клеток табака плотности клеток в культуре (1), относительного количества живых клеток (2), митотического индекса (3) и плотности мертвых клеток (4) [126]

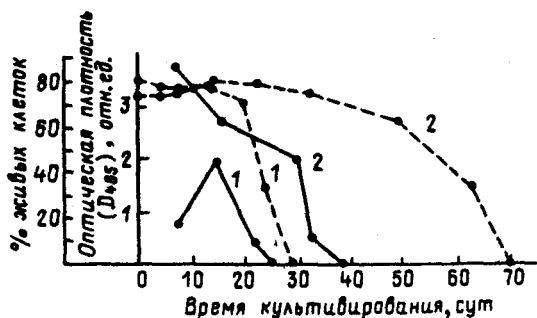


Рис. 24. Зависимость от "возраста" суспензионных культур клеток диоскорей (1) и табака (2) интенсивности образования формазана (—), оцениваемой по поглощению растворов при 485 нм, и относительного количества живых клеток (- - - -) [126]

щихся клеток меристематического типа и нарастание количества зрелых вакуолизированных, гигантских и, наконец, мертвых клеток. Клетки 5-дневной культуры (как диоскорей, так и табака) - в основном меристематического типа, их содержимое представлено электронноплотной гиалоплазмой, клет-

Таблица 15

Изменение содержания белка в культивируемых клетках диоскорей и табака при их "стационарном старении" [126]

Культура	"Возраст" культуры, сут	Содержание белка в клетках	
		мкг/10 ⁶ клеток	%
Диоскорейя	5	557	100
	12	532	96
	18	375	67
	25	220	40
Табак	5	585	100
	34	455	78
	70	396	68

ки слабо вакуолизированы. Ядро находится близко к центру клетки, имеет гомогенную мелкозернистую нуклеоплазму. Хорошо развиты элементы эндоплазматического ретикулума. В таких "молодых" клетках диоскорейи выявляются участки с параллельно расположенными цистернами гранулярного эндоплазматического ретикулума. При переходе клеток в стационарную фазу роста (в "возрасте" 12 и 16 дней для диоскорейи и табака, соответственно) гиалоплазма становится менее электронноплотной, нуклеоплазма — менее гомогенной, заметно увеличивается объем вакуолей. На еще более поздних этапах роста объем цитоплазмы существенно уменьшается, особенно в клетках табака. Увеличивается степень конденсации хроматина в ядрах клеток. В "старых" (24-дневных) клетках диоскорейи происходит сегрегация нуклеоплазмы, ядерная оболочка становится едва заметной. В 29-дневных клетках табака выявляются гигантские митохондрии с разбухшими кристами и наблюдается отделение плазмалеммы от клеточной стенки. В клетках обоих растений при "стационарном старении" уменьшается количество пластид, митохондрий, диктиосом, элементов эндоплазматического ретикулума. По мнению авторов, все эти "старческие" изменения отражают глубокие деструктивные измене-

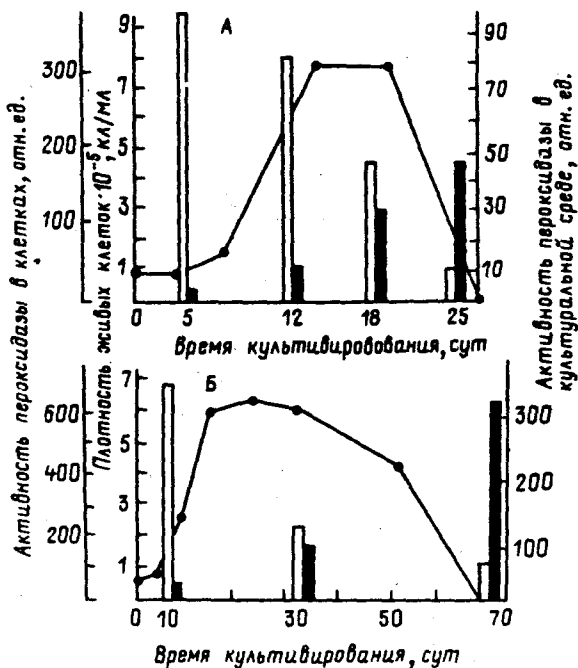


Рис. 25. Активность пероксидазы в суспензионных культурах клеток диоскореи (А) и табака (Б) разного "возраста". Светлые столбики - активность внутриклеточной пероксидазы, темные - активность пероксидазы в культуральной жидкости [126]

ния, происходящие с "возрастом" в клетках и приводящие к нарушению их метаболизма, а затем и к гибели.

У клеток диоскореи перед гибелью наблюдали почти полное разрушение мембранных структур (ядра, вакуолей, эндоплазматического ретикулума, митохондрий) при сохранении клеточной оболочки. У клеток же табака перечисленные мембранные структуры, как правило, сохранялись - даже при разрушении этой оболочки. Это позволило авторам высказать гипотезу о наличии у клеток диоскореи аутолитической активности по отношению к собственным внутриклеточным мембранным структурам. Эта активность, по их мнению, может играть роль в значительном уменьшении с "возрастом" относительного содержания белка в клетках (гораздо более выраженном, чем в клетках табака) и являться одной из причин более быстрой гибели культуры клеток диоскореи.

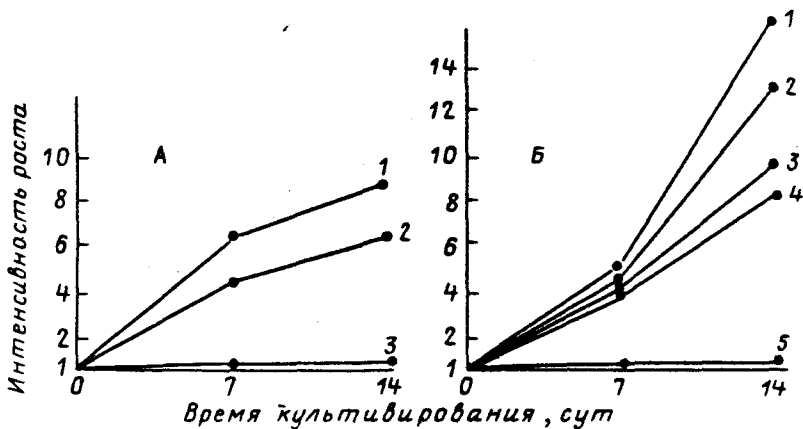


Рис. 26. Зависимость от "возраста" инокулюма кинетики размножения клеток диоскореи (А) и табака (Б) в суспензионной культуре. А: (1) - 14 сут; (2) - 21 сут; (3) - 29 сут; Б: (1) - 14 сут; (2) - 23 сут; (3) - 42 сут; (4) - 50 сут; (5) - 70 сут. Интенсивность роста выражена как отношение плотности клеток в суспензии в данный момент к плотности клеток в момент посева [126]

Исследуя интенсивность дыхания и тепловыделения в культурах разного "возраста", установили, что для клеток как диоскореи, так и табака свойственно резкое увеличение этих показателей в первые дни культивирования и последующее их снижение в процессе "стационарного старения". При этом такие изменения коррелируют с изменением числа живых клеток в культуре.

С числом живых клеток, как оказалось, коррелирует и активность пероксидазы (рис. 25). Обнаружили, что с увеличением "возраста" культуры пероксидазная активность культуральной жидкости значительно возрастает. Оценка этой активности в расчете на общее количество клеток и на число живых клеток позволила авторам предположить, что выявленный всплеск активности пероксидазы в ростовой среде "старой" культуры есть следствие высвобождения содержимого из отмерших клеток.

Высевая аликвоты суспензионных культур разного "возраста" в свежую среду, получили данные, представленные на рис. 26. Видно, что интенсивность роста культуры тем меньше, чем "старше" исходные клетки. Хотелось бы отметить,

что эти результаты коррелируют с данными наших экспериментов на клетках китайского хомячка (см. разделе 3.7).

Для количественной характеристики изменения пролиферативной активности клеток проводили оценку эффективности их клонирования на твердых средах. Показали, что при "стационарном старении" обеих культур этот показатель снижается и на стадии, предшествующей гибели культуры, величина его становится равной нулю. Необходимо заметить, что в определенные периоды "стационарного старения", когда количество живых клеток изменялось незначительно, эффективность клонирования уменьшалась во много раз. Это еще раз подтверждает выказанное нами выше положение, согласно которому "пролиферативная смерть" клетки совсем не сразу влечет за собой ее "истинную" гибель, так что кинетика этих двух процессов может очень сильно различаться. Авторы рассматриваемых работ подчеркивают, что динамика "стационарного старения", оцениваемая по реакции восстановления хлорида 2,3,5-трифенилтетразолия, наиболее близка к динамике снижения эффективности клонирования клеток.

Таким образом, для суспензионных культур клеток и диоскореи, и табака свойственно "стационарное старение", признаки которого описаны выше. К сожалению, как и в случае с микоплазмой, авторы не пытаются сопоставить конкретные выявленные "возрастные" изменения с соответствующими возрастными (уже без кавычек) изменениями клеток целого растения. В то же время именно такое сопоставление позволило бы сделать окончательное заключение о жизнеспособности предлагаемой модели.

2.5. Цианобактерии (сине-зеленые водоросли)

К цианобактериям относится большая группа микроорганизмов, сочетающих свойственное прокариотам строение клетки, характерное для всех бактерий, со способностью осуществлять фотосинтез, сопровождающийся выделением кислорода. Последнее свойственно водорослям и высшим растениям. Объединение черт, присущих организмам, относящимся к разным царствам живой природы, поставило цианобактерии на границе между низшими растениями (водорослями) и бактериями (прокариотами). Подробно история вопроса рассмотрена в книгах [27, 29].

В настоящем разделе хотелось бы кратко остановиться на данных некоторых исследований, проведенных на сине-зеленой водоросли *Anabaena variabilis* и посвященных явлению

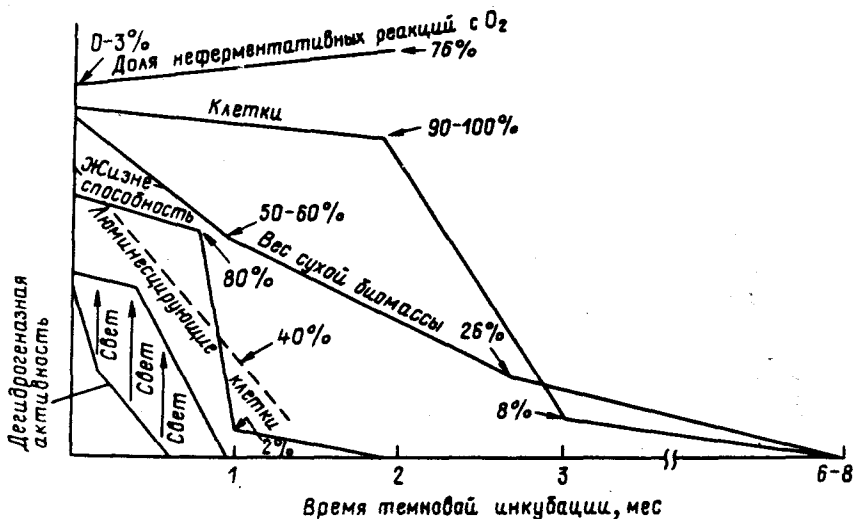


Рис. 27. Изменение различных показателей клеток культуры цианобактерии *Anabaena variabilis* в процессе ее длительной темновой инкубации. Жизнеспособность культуры оценивали, высевая клетки на агаризованную (1%) минеральную среду с последующим подсчетом числа выросших на свету колоний [55]

ее так называемой "темновой деструкции" [5, 25, 28, 40, 55-57]. Будучи облигатным фототрофом, эта цианобактерия в темноте перестает размножаться и претерпевает в процессе своего "стационарного старения" определенные деструктивные изменения. Переведение же культуры на свет стимулирует размножение ее клеток, играя фактически ту же роль, что и пересев "стационарно старых" эукариотических клеток в свежую среду.

На рис. 27 представлены некоторые данные, полученные в результате исследований темновой деструкции цианобактерии *Anabaena variabilis*. Видно, что весь процесс "стационарного старения" протекает за 6-8 месяцев. К концу этого срока в культуре уже не обнаруживаются целые клетки. При этом на протяжении первых 2-х месяцев количество клеток практически не меняется и лишь затем начинает снижаться. Суммарный же вес отфильтрованных и высушенных клеток (именно так мы интерпретировали использованный авторами термин "вес сухой биомассы") непрерывно снижается в процессе темновой инкубации.

Трудно согласиться с тем смыслом, который авторы (как и авторы работ, выполненных на клетках диоскореи и табака) вкладывают в слово "жизнеспособность" (см. подпись к рис. 27). Как уже неоднократно отмечалось, эффективность клонирования далеко не всегда позволяет отличить живую клетку от мертвой. Вряд ли нейроны высших животных можно считать жизнеспособными только на том основании, что они не способны к пролиферации. Вольное же употребление обсуждаемого термина приводит к появлению таких, например, высказываний: "Утратившие в темноте жизнеспособность клетки *A. baobab* *variabilis* продолжают метаболизировать..." [25]. Так что если мы вкладываем в это слово его первоначальный смысл "способность жить", то, прочитав эту фразу, заключим, что изученные клетки способны к осуществлению каких-то функций после своей гибели.

Из рис. 27 видно, что этот показатель (то есть эффективность клонирования клеток на свету) уменьшается гораздо быстрее, чем число клеток в культуре, и снижается до нуля к 2-месячному "возрасту", когда гибель клеток еще даже не началась. Вопрос же о том, как "по-настоящему" оценивать жизнеспособность культивируемых клеток, на наш взгляд, остается открытым.

Выявленное авторами быстрое уменьшение при "стационарном старении" относительного количества люминесцирующих клеток (не сопровождавшееся снижением содержания в клетках пигментов) позволило им сделать вывод о происходящем нарушении связи молекул хлорофилла с липопротеидным комплексом в системе ламелл, то есть о нарушении интактности фотосинтетического аппарата. Этот вывод согласуется с полученными данными об уменьшении способности клеток к фотосинтетическому выделению кислорода (на свету) уже после 1,5 мес. темновой инкубации.

Полагая, что дегидрогеназная активность клеток может служить показателем их метаболической активности, исследовали этот параметр на разных стадиях "стационарного старения" *A. baobab* *variabilis*. Дегидрогеназную активность оценивали по восстановлению хлорида 2,3,5-трифенилтетразолия в формазан. Оказалось, что уже к концу второй недели темновой инкубации данный показатель падает до нуля. Предварительная кратковременная инкубация клеток на свету позволяла восстановить (полностью или частично - в зависимости от "возраста" клеток) эту активность (см. рис. 27).

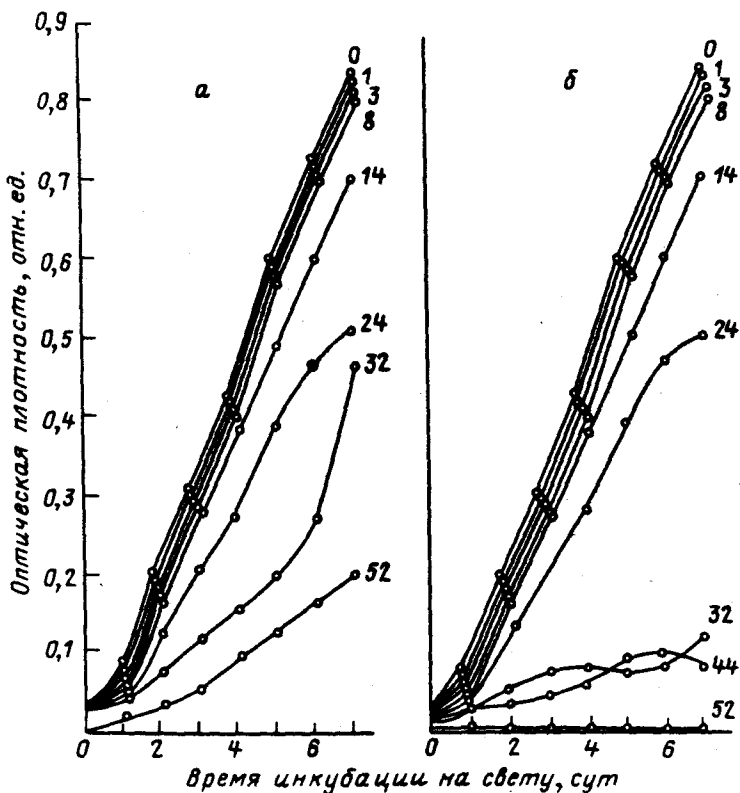


Рис. 28. Кинетика размножения на свету клеток цианобактерии *Anabaena variabilis* после выдерживания их в темноте. Время темновой инкубации (в сутках) указано цифрами около каждой кривой. а - аэробные условия; б - анаэробные условия [56].

Показали также, что при "стационарном старении" увеличивается доля неферментативного поглощения кислорода в суммарном эндогенном поглощении кислорода клетками *Anabaena variabilis*.

Интересно, что в самые первые дни пребывания культуры цианобактерии в темноте изредка в ее нитях появлялись мелкие клетки, которые никогда не обнаруживались в культуре, развивающейся на свету. Авторы полагают, что эти клетки возникают в результате неполноценного процесса клеточного деления в темноте.

Исследуя содержание в "стационарно стареющих" клетках *Anabaena variabilis* различных соединений, установили,

что с "возрастом" количество полисахаридов, белка, ДНК и РНК в клетках уменьшается, а количество липидов практически не меняется. При этом содержание ДНК начинает уменьшаться в последнюю очередь (начиная с 2-месячного "возраста"). Авторы подчеркивают, что данные изменения происходят в клетках еще до начала их гибели, при сохранении целостности клеток и их структурных компонентов.

На рис. 28 [56] представлены кривые роста клеток *Anabaena variabilis* разного "возраста" на свету в аэробных и анаэробных условиях. Видно, что в обоих случаях "стационарное старение" клеток приводит к уменьшению интенсивности их размножения в условиях избытка света и питательных веществ. Данный феномен более отчетливо выражен при снятии кривых роста в анаэробных условиях. К сожалению, авторы не получали "классических" ростовых кривых с выраженным "плато", позволяющим оценить насыщающую плотность клеточной культуры. В связи с этим трудно полноценно сопоставить их данные (как и данные, полученные на культивируемых клетках диоскорей и табака) с результатами наших сходных исследований, проведенных на клетках животных и человека (см. разделе 3). Тем не менее, можно отметить, что во всех случаях "стационарное старение" клеточной популяции приводит к уменьшению скорости ее размножения в соответствующих условиях. Представляется несколько поспешным вывод, сделанный авторами работ на *Anabaena variabilis*, согласно которому зависимость кинетики роста клеток от их "возраста" определяется тем, насколько эффективно могут накопившиеся в клетках "возрастные" повреждения "репарироваться светом" [55]. На наш взгляд, отличить накопление повреждений (возможно, летальных и нерепарируемых) в каждой клетке от увеличения числа клеток, несущих такие повреждения, использованными методами невозможно.

И, наконец, было установлено, что перенесение на свет достаточно "старых" (1,5 месяца) клеток приводит к развитию в них процесса деструкции, по интенсивности значительно превосходящего этот процесс в темноте и завершающегося в течение нескольких дней. В частности, очень быстрому разрушению подвергаются пигменты. Удаление из среды кислорода защищало клетки от фотодеструкции. На основании этих фактов авторы заключили, что данный процесс деградации клеток протекает по механизму фотоокисления, механизмы защиты от которого у *Anabaena variabilis* нарушаются в процессе ее "стационарного старения" в темноте.

3. КИНЕТИКА РАЗМНОЖЕНИЯ КЛЕТОК И СТАРЕНИЕ

3.1. Общие положения

Изменение кинетики роста культивируемых клеток под влиянием разных факторов позволяет сделать определенные выводы об изменениях либо самих клеток, либо условий их существования [99]. Значительную информацию можно получить и при сравнительном исследовании кривых роста разных клеток. Об этом свидетельствует целый ряд накопленных к настоящему времени данных. В частности, хорошо известно то обстоятельство, что чем выше возраст донора диплоидных фибробластов человека, тем менее крутой является кривая их роста *in vitro* и тем меньше высота "плато", характеризующая насыщающую плотность клеточной популяции, на этой кривой [316]. Сходные изменения были выявлены и при изучении старения *in vitro*, то есть увеличения числа пассажей, пройденных нормальными культивируемыми клетками [179, 253, 255, 285]. Например, в работе [179], проведенной на кожных фибробластах 16-летней девочки, были получены данные, представленные на рис. 29. К сожалению, как и большинство других исследователей, авторы используют выражение "плотность клеток в состоянии сомкнутого монослоя". Как уже отмечалось, это выражение не позволяет судить о том, что в действительности измеряли в работе, ибо четких критериев "сомкнутости" клеток не существует. Мы предпочитаем использовать выражение "насыщающая плотность клеточной культуры", вкладывая в него следующий смысл: насыщающая плотность — это такая плотность клеток в культуре, при которой полностью прекращается их размножение. При этом надо заметить, что величина ее для разных клеток может очень сильно различаться и определяется, по-видимому, тонкими механизмами межклеточных контактов (подробно этот вопрос изложен в монографии [54]).

В связи с вышесказанным интересны также данные о том, что некоторые стероидные гормоны, увеличивающие продолжительность жизни культивируемых диплоидных фибробластов человека, вызывают изменения кинетики роста этих клеток, свидетельствующие об их "омоложении" [242, 252]. Кроме того, хотелось бы отметить, что в некоторых случаях изменение кинетики роста *in vitro* клеток человека свидетельствует о наличии у их донора определенных заболеваний и патологических процессов [199].

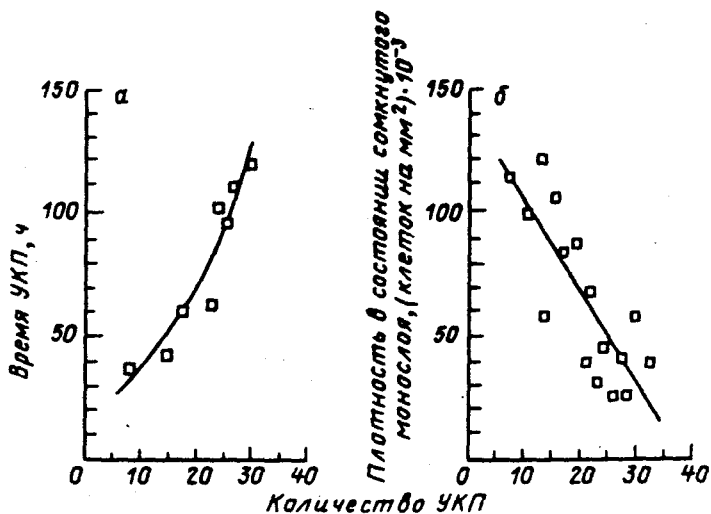


Рис. 29. Зависимость времени УКП (а) и плотности клеток в состоянии сомкнутого монослоя (б) от количества УКП, пройденных культивируемыми фибробластами человека. Линии отражают полученные с помощью аппроксимации на ЭВМ экспоненциальную (а) и линейную (б) зависимости [179].

3.2. Клеточно-кинетическая модель

К сожалению, до сих пор, насколько нам известно, не существует метода количественной оценки изменений кинетики роста культивируемых клеток. Эксперименты такого рода ставятся, как правило, следующим образом.

В несколько культивационных флаконов засеивается одинаковое количество клеток, а затем через определенные интервалы времени клетки одного или нескольких флаконов снимаются со стекла и с помощью специального счетчика (Coulter Counter) либо обычных камер Горяева оценивается их количество на флакон или на единицу площади. В результате исследователь получает набор экспериментальных точек, описывающих рост числа клеток во флаконе со временем. Соединяя эти точки, получают ломаную кривую, позволяющую в первом приближении судить о кинетике роста исследуемой клеточной популяции. Точные выводы затруднены, ибо по такой ломаной кривой очень сложно оценить как скорость размножения клеток в лог-фазе, так и насыщающую плотность куль-

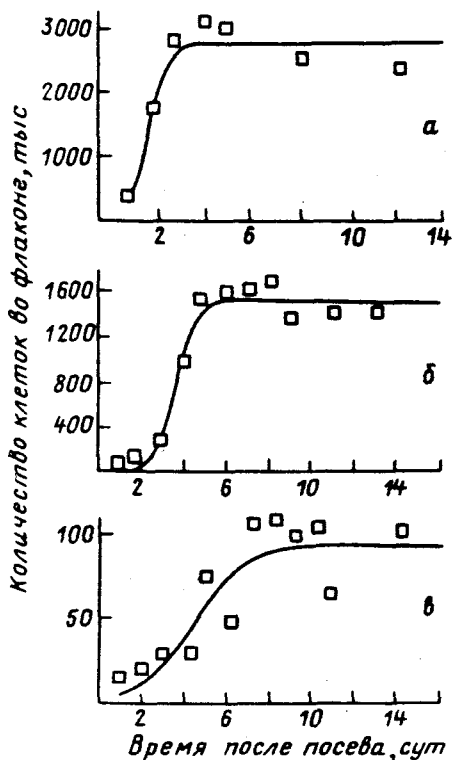


Рис. 30. Кинетика роста культивируемых клеток. а - клетки китайского хомячка, выращиваемые во флаконах площадью 20 см²; б - те же клетки, выращиваемые в пенициллиновых флаконах; в - эмбриональные диплоидные фибробласты человека, выращиваемые в пенициллиновых флаконах [103].

туры. Использование определенных математических методов позволяет "сгладить" эту кривую. Однако нам не известны работы, в которых были бы разработаны точные способы построения таких кривых, обеспечивающие количественную оценку различных кинетических показателей клеточной культуры, в частности, крутизны кривой роста и уровня "плато" на ней. В связи с этим мы попытались разработать модель, позволяющую решать эту задачу с достаточной степенью достоверности [103, 121].

Эксперименты проводили на перевиваемой линии клеток китайского хомячка B11dii-FAF28 (клон 2372а) и эмбриональных диплоидных фибробластах человека штамма ИМГ-814 на 40-м пассаже. Образовавшие монослой во флаконе Карреля клетки снимали со стекла раствором трипсина и пересевали одним из двух следующих способов: 1) в культивационные флаконы площадью около 20 см² помещали приблизительно по 350 тыс клеток в 5 мл среды роста, после чего каждые 24 ч клетки с 3 флаконов снимали в определенном количестве

100

раствора версена и оценивали с помощью камер Горяева (4 камеры на флакон) количество клеток на 1 флакон; 2) по 1 мл суспензии клеток в ростовой среде (около 30 тыс клеток/мл) помещали в одинаковые пенициллиновые флаконы, после чего оценку кинетики роста культуры проводили так же, как в первом случае. Исследования на клетках хомячка выполнили обоими способами, а на фибробластах человека — только вторым. Необходимо подчеркнуть, что подсчитывались только клетки, прикрепленные к стеклу (но не перешедшие в суспензию).

Математические расчеты и построение кривых роста производили на ЭВМ "Hewlett—Packard 9830B". Для аппроксимации полученных данных использовали уравнение логистической кривой Верхалста—Пирла [68, 86], в интегральной форме имеющее следующий вид:

$$N_t = \frac{N_0 \cdot K \cdot e^{r_m \cdot t}}{K - N_0 \cdot (1 - e^{r_m \cdot t})}, \quad (2)$$

где N_t — численность размножающейся популяции в момент времени t ; N_0 — численность популяции в нулевой момент времени; r_m — мгновенная рождаемость (r), определяемая как $\frac{dN_t}{dt} \cdot \frac{1}{N_t}$, при малой плотности популяции (то есть максимально возможное значение r); K — высота "плато" на кривой роста популяции.

Это уравнение с некоторыми оговорками используется для анализа закономерностей роста популяций млекопитающих, а также простейших и бактерий [68, 86].

В связи с тем, что далеко не все посаженные во флакон клетки способны прикрепиться и начать размножаться [261], мы заменили в уравнении (2) N_0 (количество посаженных клеток) на N_1 — число клеток, прикрепившихся к флакону через 24 ч после посева. В связи с этим все кривые роста начинаются именно с 24-часовой точки.

Вводя в ЭВМ экспериментальные данные, методом наименьших квадратов получали оценки всех трех параметров (N_1 , K и r_m), необходимых для построения кинетических кривых с помощью графопостроителя ЭВМ. Попытки подбора параметров K и r_m при введении в ЭВМ определенного значения N_1 , установленного в эксперименте, показали, что такой способ ухудшает соответствие получаемой функции экспериментальным данным.

Адекватность уравнения (2) оценивали с помощью метода анализа остатков [34].

На рис. 30 представлены данные, полученные при изучении кинетики роста культивируемых клеток. Оказалось, что расчетные кинетические кривые во всех случаях (различные клетки и различные культивационные флаконы) адекватно описывают экспериментальные результаты ($p > 0.05$). В связи с этим в дальнейших экспериментах мы всегда выращивали клетки только в пенициллиновых флаконах.

Для того, чтобы убедиться, что уравнение (2) действительно может быть использовано для анализа кинетики роста клеток независимо от их природы и условий культивирования, мы с помощью аналого-цифрового графического преобразователя "HP 9864A Digitizer" проанализировали данные других авторов, касающиеся самых различных культивируемых клеток. Анализу были подвергнуты результаты, полученные на эмбриональных диплоидных легочных фибробластах человека [242], эмбриональных куриных фибробластах [255], гладкомышечных артериальных клетках человека [199], суставных хондроцитах кролика [130], а также на прокариотических клетках *Acholeplasma laidlawii* [51, 107]. Оказалось, что во всех случаях уравнение (2) адекватно описывает кинетику роста клеток ($p > 0.05$). Аппроксимировав экспериментальные данные с помощью этого уравнения, мы в каждом случае получаем вполне определенные значения параметра r_m (характеризующего способность клеточной популяции к размножению и определяющего крутизну ростовой кривой) и параметра K (определяющего высоту "плато" на этой кривой). Это позволяет проводить на основе анализа кинетики роста точное количественное сравнение разных клеточных популяций как по скорости размножения, так и по насыщающей плотности клеток.

Необходимо также отметить, что использование предлагаемой модели для описания кинетики роста культивируемых клеток позволяет получить некоторую дополнительную полезную информацию. Как уже указывалось, параметр r_m представляет собой мгновенную рождаемость при малой плотности популяции. Иными словами, при малой плотности клеток

$$r_m = \frac{dN_t}{dt} \cdot \frac{1}{N_t} \quad (3)$$

Пусть в момент времени t_1 число клеток равно N_1 , а в момент времени t_2 оно составляет $2N_1$. Тогда, интегрируя в этих пределах уравнение (3), получим

$$r_m \cdot (t_2 - t_1) = \ln 2.$$

Выражение $t_2 - t_1$ представляет собой не что иное, как время удвоения клеточной популяции ($T_{удв.}$). Таким образом,

$$T_{удв.} = \frac{\ln 2}{r_m}.$$

Если бы в популяции делились все клетки, то длительность клеточного цикла ($T_{кц.}$) была бы равна $T_{удв.}$. Однако, как известно, не все клетки, даже приклепившиеся к поверхности роста, способны к делению [261]. Поэтому в общем случае будет справедлива формула:

$$T_{кц.} = \frac{\ln \frac{2N - N_{нд}}{N}}{r_m}, \quad (4)$$

где N - общее число клеток, а $N_{нд}$ - число неделяющихся клеток в изучаемой клеточной популяции. Если параметр $T_{кц.}$ известен из других экспериментов, проведенных, например, с помощью радиоавтографии или цитраферной киносъемки [129], то появляется возможность оценить относительное содержание неделяющихся клеток в исследуемой культуре. Преобразовав уравнение (4), получим

$$\frac{N_{нд}}{N} = 2 - e^{-T_{кц.} \cdot r_m} = 2 - e^{-\frac{T_{кц.}}{T_{удв.}} \cdot \ln 2}.$$

Если же для данной культуры известна величина $\frac{N_{нд}}{N}$, то может быть решена обратная задача - вычисление $T_{кц.}$.

Таким образом, полученные нами данные [103, 121] позволяют полагать, что предложенная модель адекватно описывает кинетику роста самых разных культивируемых клеток и обеспечивает возможность оценки как времени УКП, так и относительного содержания в этой популяции неделяющихся клеток.

3.3. Влияние гамма-излучения

Разработав вышеописанную клеточно-кинетическую модель, мы, естественно, поставили перед собой задачу испытания на ней некоторых факторов, интересных в геронтологическом отношении. И в качестве первого такого фактора выбрали [104] гамма-излучение, представляющее собой классический пример геропротора [53, 59, 73, 76].

Эксперименты проводили на клетках китайского хомячка линии B11dii-FAF28 (клон 237_{2a}). Кривые роста клеток, выращиваемых в пенициллиновых флаконах, получали так же, как в работе, посвященной разработке клеточно-кинетической модели [103]. Отсчет времени всегда вели от момента посева. Клеточную суспензию для посева получали, снимая со стекла образовавшие монослой во флаконе Карреля клетки раствором трипсина. По 1 мл суспензии клеток в ростовой среде (около 30 тыс. клеток) помещали в пенициллиновые флаконы, которые ставили в термостат. Через 3,5 ч, когда клетки прикреплялись к стеклу, треть флаконов облучали гамма-лучами (установка "Стебель-3а", источник - ⁶⁰Co, мощность дозы 10 рад/сек) в дозе 250 рад, другую треть - в дозе 500 рад, после чего опять ставили флаконы в термостат.

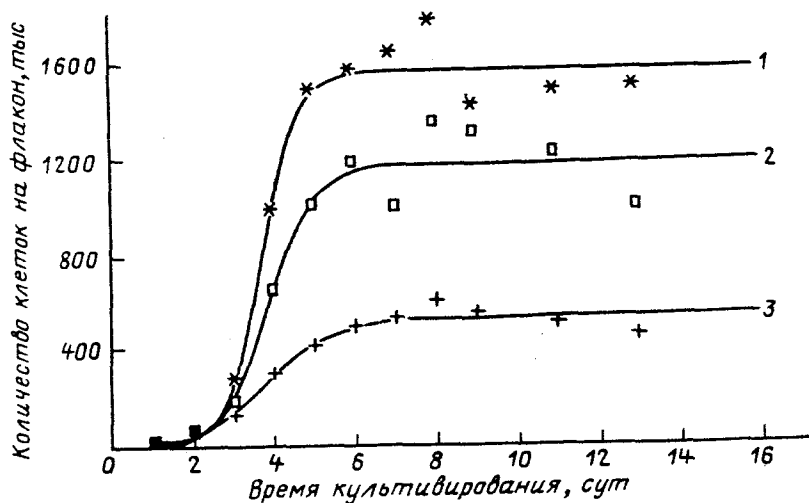


Рис. 31. Влияние гамма-излучения на кинетику роста культивируемых клеток китайского хомячка (1 - контроль; 2 - облучение в дозе 250 рад; 3 - облучение в дозе 500 рад) [104]

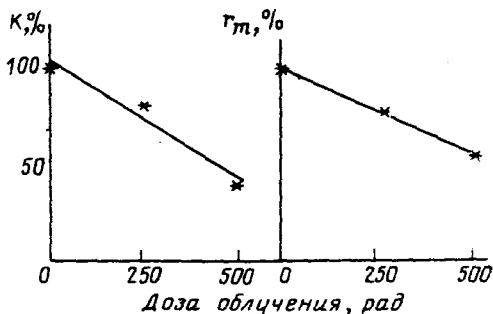


Рис. 32. Зависимость параметров кривых роста, приведенных на рис. 31, от дозы облучения. Величины параметров для контрольной кривой приняты за 100% [104]

Результаты представлены на рис. 31. Видно, что по мере увеличения дозы облучения как крутизна кривой роста, так и высота "плато" на ней снижаются. Об этом же свидетельствуют и значения рассчитанных для каждого графика параметров γ_m и K . Оказалось, что оба показателя практически линейно (рис. 32) зависят от дозы облучения ($R^2 = 0.979$ для K ; $R^2 = 0.999$ для γ_m).

3.4. Влияние тиофосфамида

Как уже указывалось, ионизирующее излучение большинство ученых-геронтологов всегда считало фактором, ускоряющим естественное старение [12, 53, 63, 73, 74, 76]. При этом ряд данных позволял полагать, что этот фактор проявляет себя как геропротор, повреждая ДНК облучаемых организмов [73, 74]. Если это предположение верно, то и другие ДНК-тропные агенты должны ускорять старение. Было установлено [133], что некоторые химические мутагены действительно вызывают сокращение продолжительности жизни экспериментальных животных. Однако очень сильный мутаген, монофункциональный алкилирующий агент этилметансульфонат, не оказывает в этом отношении заметного действия [133]. В этой связи представлялось интересным выяснить, как влияет на кинетику роста культивируемых клеток ДНК-тропное химическое соединение.

Мы исследовали на нашей клеточно-кинетической модели известный алкилирующий агент тиофосфамид [104]. Испытания проводили на тех же клетках и по той же схеме, что и испытания гамма-излучения. По 0.5 мл суспензии клеток в ростовой среде (около 27 тыс клеток) помещали в пенициллиновые фла-

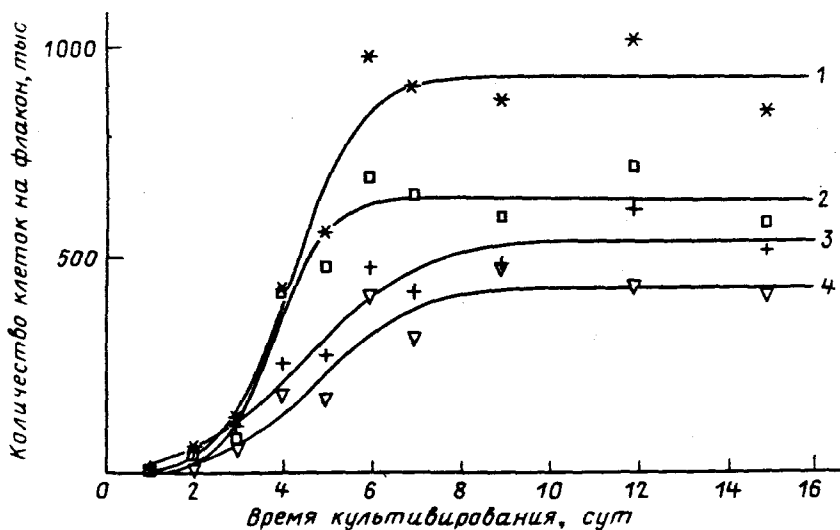


Рис. 33. Влияние кратковременного воздействия тиофосфамидом на кинетику роста культивируемых клеток китайского хомячка (1 - контроль; 2 - 10 мкг/мл тиофосфамида; 3 - 12,5 мкг/мл тиофосфамида; 4 - 15 мкг/мл тиофосфамида) [104]

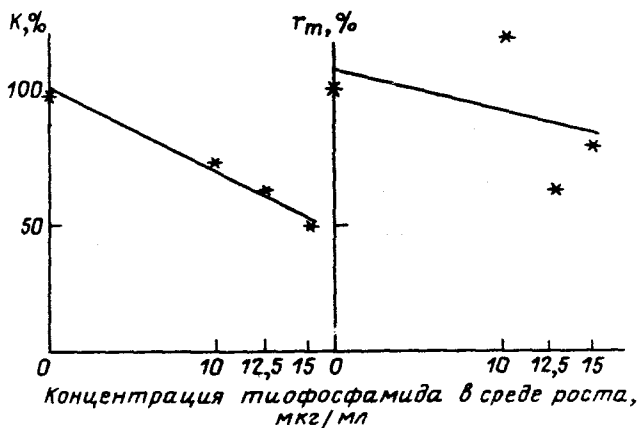


Рис. 34. Зависимость параметров кривых роста, приведенных на рис. 33, от концентрации тиофосфамида. Величины параметров для контрольной кривой приняты за 100% [104]

коны, которые ставили в термостат на 2 ч. Затем в каждый флакон добавляли по 1 мл ростовой среды либо без тиофосфамида (контроль), либо содержащей тиофосфамид (до конечной концентрации его во флаконах 10, 12.5 или 15 мкг/мл). Концентрации и время действия тиофосфамида были выбраны такими, чтобы цитогенетический эффект препарата (уровень индуцируемых хромосомных aberrаций) приблизительно соответствовал цитогенетическому эффекту гамма-излучения в использованных дозах (см. предыдущий раздел). Флаконы ставили обратно в термостат на 2 ч 15 мин, а затем выливали из них среду, промывали клетки один раз 2 мл холодного раствора Хэнкса и один раз 1 мл ростовой среды, после чего добавляли во флаконы по 1 мл среды и ставили их в термостат.

На рис. 33 представлены результаты этого опыта. Оказалось, что и в этом случае высота "плато" на кривой роста понижается под действием изучаемого фактора, причем величина показателя K опять — так практически линейно (рис. 34) зависит от концентрации тиофосфамида в среде ($R^2 = 0.99$). Однако для показателя τ_m (рис. 34) такой хорошей линейной зависимости "доза-эффект" получено не было. ($R^2 = 0.21$). Величины τ_m составили 1.29, 1.65, 0.77 и 0.90 для контроля и концентраций тиофосфамида 10, 12.5 и 15 мкг/мл соответственно. Таким образом, в этом случае даже монотонность изменения параметра τ_m с увеличением дозы воздействия отсутствовала. В связи с этим был сделан вывод о том, что, хотя тиофосфамид и является геропротектором (это следует из факта понижения высоты "плато" на кривой роста клеток), однако механизм его действия значительно отличается от механизма действия гамма-излучения. К такому же выводу ранее пришел и М. М. Виленик [12], анализирувавший "витбрависный" (то есть проявляющийся в укорочении продолжительности жизни) эффект химических мутагенов и радиации.

3.5. Влияние геропротектора-антиоксиданта

Установив, что геропротекторы действительно понижают высоту "плато" на кривой роста культивируемых клеток, мы задались целью испытать на нашей модельной системе какой-либо известный геропротектор. Выбор остановили на антиоксиданте эпигиде (хлоргидрат 2-этил-6-метил-3-оксипиридина), который как было показано в многочисленных исследованиях [71], достоверно замедляет старение экспериментальных животных.

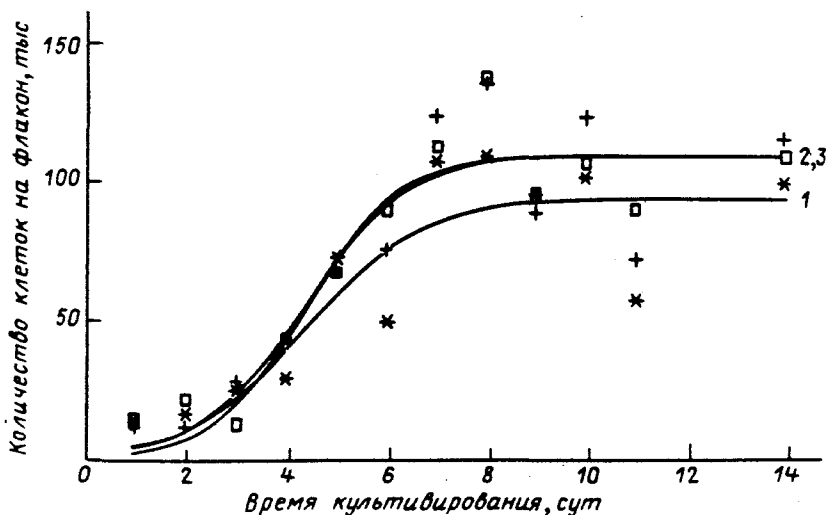


Рис. 35. Влияние эпигида на кинетику роста эмбриональных диплоидных фибробластов человека. 1 — контроль (*); 2 — 10^{-5} М эпигида (+); 3 — 10^{-7} М эпигида (□) [105]

Эксперименты проводили [105] по стандартной схеме на эмбриональных диплоидных фибробластах человека штамма ИМГ-814, прошедших 40 УКП. Находившиеся в состоянии монослоя клетки (5 сут после посева) снимали со стекла раствором трипсина и помещали в банку с ростовой средой. Полученную суспензию делили на три части и в две из них добавляли эпигид до конечной концентрации 10^{-5} или 10^{-7} М. Эти концентрации ранее были признаны эффективными в опытах *in vitro* как другими исследователями [3], так и нами [107]. Затем по 1 мл клеточной суспензии (~ 25 тыс. клеток) помещали в пенициллиновые флаконы и оценивали кинетику роста клеток, как обычно.

Из данных, представленных на рис. 35, видно, что присутствие в среде роста эпигида приводит к подъему (как показали соответствующие расчеты, статистически достоверному) "плато" на кривой роста фибробластов человека, причем до одинаковой величины при обеих использованных концентрациях препарата.

Сходные результаты были нами получены [107] и при исследовании влияния эпигида на кинетику роста прокариотических клеток *Acholeplasma laidlawii* (рис. 36). Правда, в последнем случае аппроксимации не производили, ибо экспе-

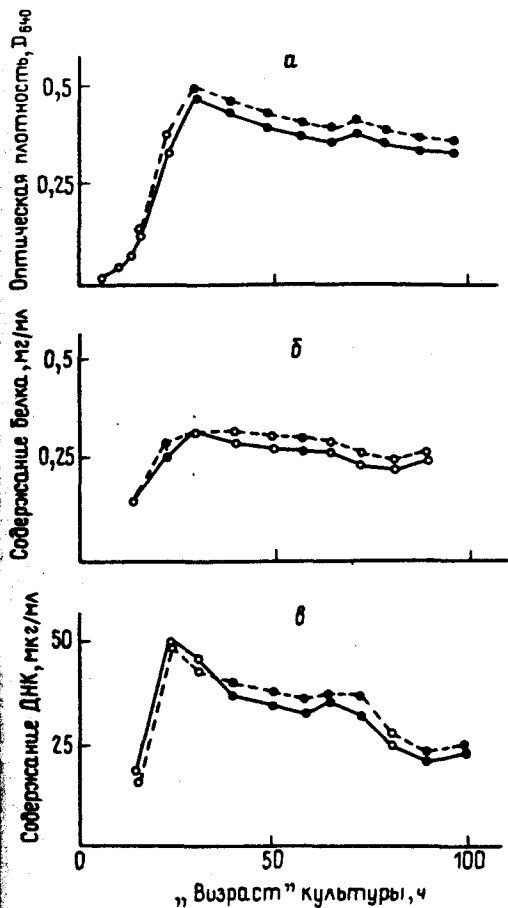


Рис. 36. Зависимость оптической плотности (а) суспензионной культуры *Acholeplasma laidlawii*, а также содержания в ней белка (б) и ДНК (в) от времени культивирования. Сплошная линия — контроль, пунктирная — 10^{-5} М эпигида. Черными кружками обозначены точки, в которых различия статистически достоверны [107]

риментальные точки и без этого позволяли сделать вывод о различии между контролем и опытом.

Таким образом, в обоих случаях налицо было "пролиферативное омоложение" клеток под влиянием эпигида. Правда, если для геропромоторов нами была выявлена ливневая зависимость изменения высоты "плато" от дозы воздействия, то в случае геропротектора мы этой зависимости не получили. По всей видимости, это связано с тем, что "омоложение" клеток может происходить только до какого-то определенного уровня, в то время как понизить их жизнеспособность можно до нуля. Иначе говоря, если опускать "плато" можно до самой оси абсцисс, то поднимать его удастся только до некоторого "потолка", величина которого определяется как внутренними

возможностями исследуемых клеток, так и свойствами используемого геропротектора. В связи с этим представляет интерес тот факт, что нам не удалось с помощью эпигида достоверно изменить высоту "плато" на кривой роста культивируемых клеток китайского хомячка, обладающих неограниченным пролиферативным потенциалом и требующих, по-видимому, очень мощных геропротекторов для "омоложения". Впрочем, на то обстоятельство, что трансформированные клетки с высокой митотической активностью по некоторым молекулярным параметрам "моложе" даже эмбриональных диплоидных фибробластов первых пассажей, мы уже указывали [101].

Хотелось бы также отметить следующее. Так как эксперимент проводился на диплоидных клетках 40-го пассажа, нельзя с уверенностью сказать, что такие же данные были бы получены и на клетках ранних пассажей. Возможно, и в этом случае "мощности" эпигида не хватило бы для повышения "плато".

3.6. Влияние низкочастотного электромагнитного поля

Проблема биологических эффектов электромагнитного поля (ЭМП) в последние годы привлекает внимание все большего числа исследователей как в нашей стране, так и за рубежом [65]. Однако о молекулярно-генетических механизмах биологического действия ЭМП известно еще немного, хотя данные ряда работ и свидетельствуют о мутагенности этого фактора [75]. Было, в частности, установлено, что воздействие ЭМП (3.2 кГц, 0.88 Э) на культивируемые лимфоциты периферической крови человека вызывает повышение частоты нарушений типа полиплоидии и анеуплоидии, а также деспирализации и возникновения нечеткой конфигурации хромосом [35]. Кроме того, было установлено [36], что ЭМП звуковых частот влияет на уровень СХО в культивируемых клетках китайского хомячка. Ряд имеющихся данных позволяет также полагать, что ЭМП может активировать свободнорадикальные процессы в клетке [77].

В связи с вышесказанным мы попытались выяснить [104, 122], как будет себя вести низкочастотное ЭМП при его испытании на нашей модели (как геропротектор или как геропромотор).

Опыты ставили так же, как при испытании гамма-излучения и тиофосфамида, на клетках китайского хомячка линии Bldii-FAF 28 (клон 237_{2a}). Обработку клеток ЭМП проводили в находившемся прямо в термостате соленоиде

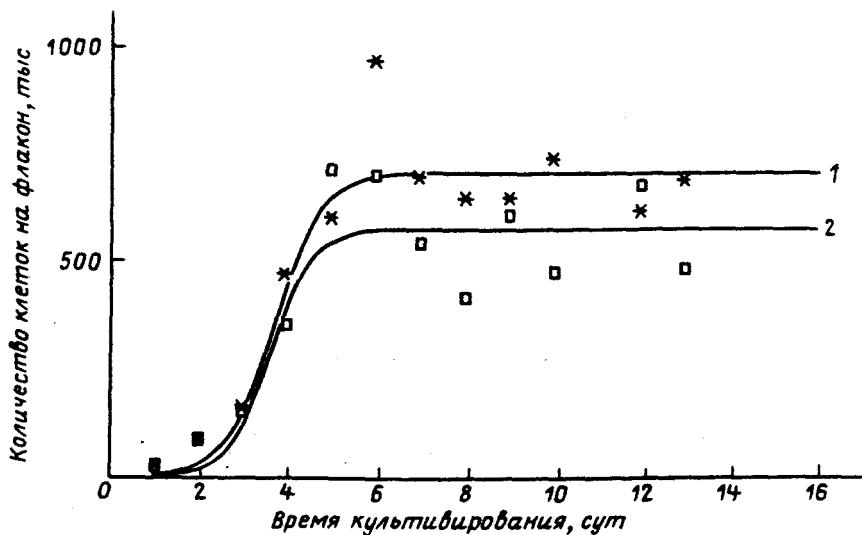


Рис. 37. Влияние воздействия низкочастотным ЭМП на кинетику роста культивируемых клеток китайского хомячка (1 - контроль; 2 - ЭМП) [104]

(длина - 28 см, число витков - 150, напряженность ЭМП - 0.88 Э), который подключали через систему конденсаторов к звуковому генератору ГЗ-34. С помощью генератора и набора конденсаторов задавали необходимую частоту ЭМП (13 кГц).

По 1 мл суспензии клеток в ростовой среде (~ 25 тыс. клеток) помещали в пенициллиновые флаконы, которые ставили в термостат таким образом, что половина из них оказывалась внутри соленоида. Через 2 ч включали ЭМП на 22 ч.

На рис. 37 приведены результаты одного из поставленных экспериментов. Видно, что высота "плато" на кривой роста под влиянием ЭМП понижается, как и в случае воздействия на клетки ионизирующим излучением или алкилирующим агентом. Эти данные позволили нам предположить, что низкочастотное ЭМП представляет собой геропромотор.

Необходимо отметить, что в случае ЭМП, как и в случае тиофосамида, снижение высоты "плато" не сопровождалось уменьшением величины r_m . Напротив, этот параметр даже несколько возрос по сравнению с контролем (2.16 и 1.86, соответственно). Это свидетельствует о том, что "мощность" роста клеток (параметр r_m) не всегда коррелирует с насыщающей плотностью культуры (параметр K).

3.7. Влияние "стационарного старения"

Для выяснения вопроса о том, как влияет "стационарное старение" культивируемых клеток на кинетику их роста (которая, по-видимому, и определяется "возрастом" клеток) после посева в свежую среду, мы провели следующие эксперименты [105].

Снимали трипсином клетки китайского хомячка линии Bldii-FAF28 (клон 237_{2a}) с трех флаконов, "возраст" которых (то есть время после посева с разведением 1 : 6) составлял 3, 7 и 14 сут, и по 1 мл клеточной суспензии (~ 25 тыс клеток) в ростовой среде помещали, как обычно, в пенициллиновые флаконы, которые ставили в термостат. Кривые роста оценивали стандартным образом.

Из данных, представленных на рис. 38, следует, что уровень "плато" максимален в случае 7-суточных клеток (находившихся при посеве в ранней стационарной стадии) и минимален в случае 14-дневных клеток (поздняя стационарная стадия). Клетки же, находившиеся в момент посева в лог-фазе (3-суточные), по уровню "плато" занимают промежуточное положение между 7- и 14-суточными клетками.

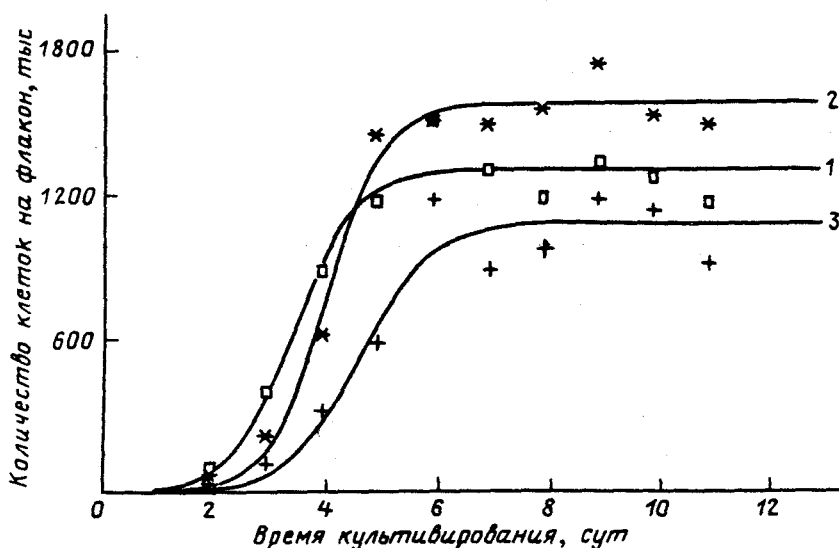


Рис. 38. Влияние "стационарного старения" клеток китайского хомячка на кинетику их роста (1 - "возраст" клеток 3 сут; 2 - "возраст" клеток 7 сут; 3 - "возраст" клеток 14 сут) [105]

Полученные результаты позволяют полагать, что жизнеспособность клеточной популяции, находящейся в ранней стационарной стадии роста, является максимальной. Этот вывод согласуется с результатами других исследователей, изучавших зависимость устойчивости культивируемых клеток на разных стадиях роста к блеомицину [351] и имурану [64]. Сходные данные были получены и при изучении изменения термоустойчивости клеток простейшего *Tetrahymena pyriformis* в процессе длительного культивирования [44].

3.8. Влияние плотности посева

За счет чего же изменяется кинетика роста клеточной популяции? Одним из возможных механизмов этого явления может быть переход части клеток в состояние, исключающее деление, при сохранении жизнеспособности. На такого рода положении построен целый ряд теорий клеточного старения. Смоделировать эти изменения на нашей клеточно-кинетической модели можно путем искусственного изменения начальной плотности клеточной популяции.

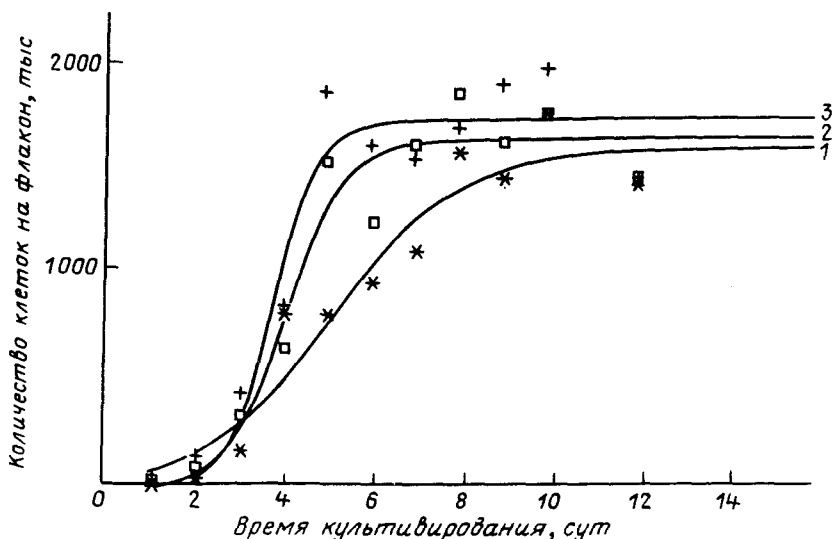


Рис. 39. Влияние плотности посева культивируемых клеток китайского хомячка на кинетику их роста. 1 — 15 тыс клеток на флакон (*); 2 — 30 тыс клеток на флакон (□) 3 — 45 тыс клеток на флакон (+) [105]

Эти эксперименты также были проведены на культивируемых клетках китайского хомячка [105]. Исходные количества клеток в пенициллиновых флаконах составляли 15, 30 и 45 тыс. клеток. Использовали клетки, находившиеся несколько суток в состоянии сомкнутого монослоя (6 сут. после посева).

Из данных, приведенных на рис. 39, видно, что по мере увеличения плотности посева высота "плато" на кривой роста непрерывно возрастает. Надо, однако, заметить, что возрастание это хотя и статистически достоверное, но не очень большое. Величина же r_m , характеризующая скорость размножения клеточной популяции [103], как показали соответствующие расчеты, увеличивается пропорционально плотности посева. Эти результаты, на наш взгляд, позволяют полагать, во-первых, что небольшие погрешности в плотности посева, допускаемые в процессе эксперимента, не должны значимо сказываться на высоте "плато" кривой роста, а во-вторых, что наблюдаемые в наших опытах изменения насыщающей плотности культуры под влиянием различных геропротекторов и геропромоторов вряд ли могут определяться только изменением числа делящихся клеток в популяции. Выяснение же истинных механизмов этого явления требует, конечно, дальнейших исследований.

4. ПОЛОВЫЕ КЛЕТКИ И СТАРЕНИЕ

В последние годы появилось большое число монографий на русском языке, посвященных половым клеткам [1, 72, 78, 84, 87, 88]. К сожалению, проблема, вынесенная в заголовок настоящего раздела, во всех этих публикациях практически не рассматривается. В связи с этим представлялось целесообразным уделить ей определенное внимание.

В сентябре 1881 года, то есть более 100 лет назад, Август Вейсман прочел для Ассоциации Немецких Естествоиспытателей лекцию под названием "О продолжительности жизни" ("Über die Dauer des Lebens"). Фактически впервые в ней были высказаны положения клеточной теории старения. Впоследствии они были опубликованы Вейсманом в нескольких работах [361-363], но, к сожалению, в настоящее время уже мало кто о них знает. Правда, несколько лет назад в журнале "Human Genetics" появилась статья, посвященная заслугам Вейсмана в разработке этих положений [237], однако и в ней подчеркивается, что большая их часть (несмотря на то, что эти положения предсказывали очень многое из

впоследствии "открытого" геронтологами) была очень быстро забыта.

Однако одно из положений Вейсмана (о "зародышевой плазме" - Keimplasma), опубликованное впервые в 1885 году [362] и окончательно сформулированное в 1892 году в статье "Зародышевая плазма: теория наследования" [363], известно, пожалуй, всем ученым-биологам.

Вкратце оно сводится к признанию существования непрерывной линии половых клеток (Keimbahn), переходящих из поколения в поколение. При этом половым клеткам противопоставляются все остальные - соматические, имеющие ограниченную продолжительность жизни. Роль последних, по мнению Вейсмана, сводится лишь к обеспечению половым клеткам нормальных условий для перехода в следующее поколение, то есть для полового размножения.

Согласно взглядам Вейсмана, "зародышевая плазма" локализована в хроматине ядра яйца. В период развития она неравномерно распределяется по соматическим клеткам в виде определенных частиц - носителей различных признаков. Эти частицы, составляющие "зародышевую плазму" (идиоплазму), Вейсман назвал детерминантами. В результате такого неравномерного распределения клетки разных органов приобретают различные детерминанты. Только в клетках, которые станут превитальными половыми, сохраняется полный набор наследственных факторов, определяющих структуру и функции клеток и органов данного вида. Таким образом, "бессмертны" не сами половые клетки, а только "зародышевая плазма", которую они содержат.

В последнее время интерес к проблеме "бессмертия" клеток зародышевого пути резко возрос, о чем свидетельствует, в частности, целый ряд публикаций [96, 136, 181, 237 - 240, 263]. В большинстве случаев постулируется определенная "исключительность" половых клеток, то есть совокупность тех или иных особых их свойств, обеспечивающих "бессмертие". Все авторы указанных работ являются сторонниками теорий, согласно которым в основе старения организма лежит старение составляющих его клеток. Поэтому к представлению о необходимости "исключительности" половых клеток приходят, как правило, путем следующих рассуждений. Если старение организма является следствием накопления в его клетках каких-либо повреждений (например, повреждений ДНК), то такой процесс должен идти и в половых клетках. Таким образом, с увеличением числа поколений дети должны возникать из все более старых гамет. Не случайно одна из вышеуказан-

ных статей называется "Почему дети рождаются юными"? [136].

Так как дети рождаются все-таки юными, возникли различные гипотезы, касающиеся механизмов "омоложения" половых клеток. При этом все ученые, как и Вейсман, противопоставляют половые клетки соматическим. Собственно, Вейсман ввел это противопоставление, основываясь на положении об обособлении клеток полового пути в процессе развития эмбриона — как правило, довольно раннем. Фактически он развил идеи Нусбаума [284], впервые подчеркнувшего факт раннего обособления половых клеток в процессе развития и высказавшего, кстати, идею о непрерывности линии этих клеток в ряду поколений, то есть идею "зародышевого пути".

Эти вопросы подробно рассмотрены в ряде публикаций [1, 72, 82, 87]. Им был посвящен специальный международный симпозиум, материалы которого опубликованы в СССР [78]. Так вот, проанализировав указанные работы, можно прийти к выводу, что далеко не всем организмам свойственно раннее обособление половых клеток. Напротив, у некоторых низших беспозвоночных, таких, например, как кишечнополостные или турбеллярии, половые клетки образуются непрерывно за счет запаса полипотентных элементов — необластов или интерстициальных клеток.

У тех же организмов, у которых четко установлено раннее обособление половых клеток (все позвоночные и многие беспозвоночные), найдены так называемые "цитоплазматические половые детерминанты" (см., например, [9]), то есть участки цитоплазмы оплодотворенного яйца, обогащенные, по-видимому, крупными гранулами РНК. Из этих участков впоследствии и возникают первичные гоноциты — предшественники половых клеток.

В этой связи интересно вспомнить ставшие классическими опыты Бригса и Кинга по трансплантации ядер, проведенные еще в 1960 году [148]. Эти исследователи после удаления ядра из яйцеклетки *Rana pipiens* замещали его ядром, извлеченным из клеток презумптивной экто- и мезодермы blastулы, не содержащих полового детерминанта. Иными словами, они вводили в цитоплазму яйцеклетки заведомо чисто соматическое ядро эмбриона. Это сочетание приводило к развитию совершенно нормальных личинок, гонады которых содержали многочисленные половые клетки. Таким образом, ядро эмбриональной клетки, в норме предназначенное для образования соматических органов, способно вести себя как ядро яйцеклетки

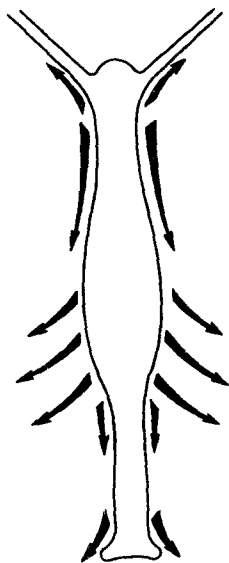


Рис. 40. Схематическое изображение гидры. Зона непрерывного роста расположена под гипостомом. Стрелки показывают направление перемещения клеточного материала: вверх — к гипостому и щупальцам; вниз — к образующимся почкам и половым железам, а также по стембельку к подошве, через пору которой выделяются некротические массы. Размеры и индивидуальные особенности полипа остаются постоянными [8]

и не препятствует дифференцировке полового зачатка, определяемой половым детерминантом. Как отмечает известный эмбриолог Луи Бунур [9], из данных этих опытов следует, что трансплантированное ядро нейтрально по отношению к соме и половым клеткам; в ткани, из которой его извлекли, оно оставалось бы соматическим ядром и, следовательно, не обладало бы никаким "половым предназначением". Будучи же пересаженным в яйцеклетку, оно полностью заменяет ее ядро. Поэтому Бунур заключает, что и ядро яйцеклетки, поскольку оно может быть замещено соматическим ядром, также не имеет никакого "полового предназначения". В связи с этим "...именно цитоплазматический половой детерминант представляется единственным подлинно эффективным фактором дифференциации полового зачатка".

Если же у организма не происходит раннего обособления половых клеток, как, например, у гидры, то в этом случае мы имеем возможность наблюдать "бессмертную" (то есть нестареющую) особь (рис. 40). Как уже указывалось в разделе 2.1, чем выше скорость пролиферации клеток, тем легче они должны избегать накопления на уровне всей клеточной популяции определенных повреждений. Гидре за счет непрерывного обновления всех клеток удается сохранять в определенных условиях свою жизнеспособность на неизменном уровне в течение практически неограниченного времени.

Периоды онтогенеза		Стадии оогенеза	Локализация половых клеток	Состояние половых клеток
Антегенетальный	эмбриональный		Вне зачатка гонад	Проплиферация и миграция гоноцитов
	плодный		Зачатки гонад	Проплиферация овогоний. Профаза мейоза ооцитов (лептотена → диплотена)
Постнатальный	перинатальный		Яичники	Диплотена. Период медленного роста ооцитов
	постпудертальный			Период быстрого роста ооцитов. Созревание ооцитов (Завершение I деления) Овуляция (начало II деления созревания) Оплодотворение (завершение II деления созревания) I деление дробления зиготы

Рис. 41. Основные периоды оогенеза у млекопитающих (1,2 - первое и второе редукционные тельца) [37]

Полагается [8], что так называемые интерстициальные клетки (или просто *i*-клетки) гидры способны как участвовать в образовании почек, так и давать начало гаметам. Гаметогенез у гидры происходит периодически, после чего она может вновь переходить к бесполому размножению. Однако в определенных условиях (изменение температуры окружающей

среды) гаметогенез затягивается, что приводит к истощению запасов i -клеток, к одряхлению особи и ее смерти.

Таким образом, складывается впечатление, что наличие недифференцированных клеток, способных давать начало как половым, так и соматическим клеткам, делает организм "бессмертным".

Теперь от нестареющих организмов вернемся к стареющим, в число которых, к сожалению, входит и человек, судьба которого интересует нас в первую очередь.

Что же происходит в этом случае после появления на свет новорожденного существа, половые клетки которого обособились от соматических? У млекопитающих ситуация, как правило, складывается следующим образом. У самки в момент рождения имеется некоторое ограниченное количество ооцитов, остановившихся в стадии диктиотены мейоза (рис. 41) - стадии "покоя", в которую ооциты переходят из диплотены мейоза. Впоследствии новые ооциты уже не возникают. Лишь у некоторых низших приматов процесс размножения оогоний продолжается не только после рождения, но и у взрослых особей. У данных животных активность этого процесса регулируется гормонами и зависит от стадии полового цикла.

В связи с вышесказанным хотелось бы отметить, что известная теория Карол и Харриса Бернстайнов, согласно которой механизмом, обеспечивающим "бессмертие" половых клеток, является рекомбинационная репарация в процессе мейоза всех накопившихся повреждений ДНК [136, 137, 181], представляется весьма сомнительной. В самом деле, ооциты в стадии диктиотены уже прошли профазу первого деления мейоза (лептотену, зиготену, пахитену, диплотену), то есть произошли синапсис, конъюгация хромосом и кроссинговер [37]. Таким образом, у самки все ооциты после рождения уже миновали стадию синаптонемного комплекса, на которой, собственно, и идут процессы рекомбинационной репарации. Поэтому все повреждения ДНК, которые возникают в половой клетке до момента ее оплодотворения (а у человека этот промежуток времени может составлять 40-50 лет), уже не могут быть удалены с помощью мейотической рекомбинационной репарации. Странно, что этот факт ускользнул от внимания Бернстайнов.

Что же касается новорожденных самцов, то у них половые клетки представлены гоноцитами, которым в дальнейшем в пубертатном периоде предстоит дать начало сперматогониям, сперматоцитам и сперматозоидам (рис. 42). Первые сперма-

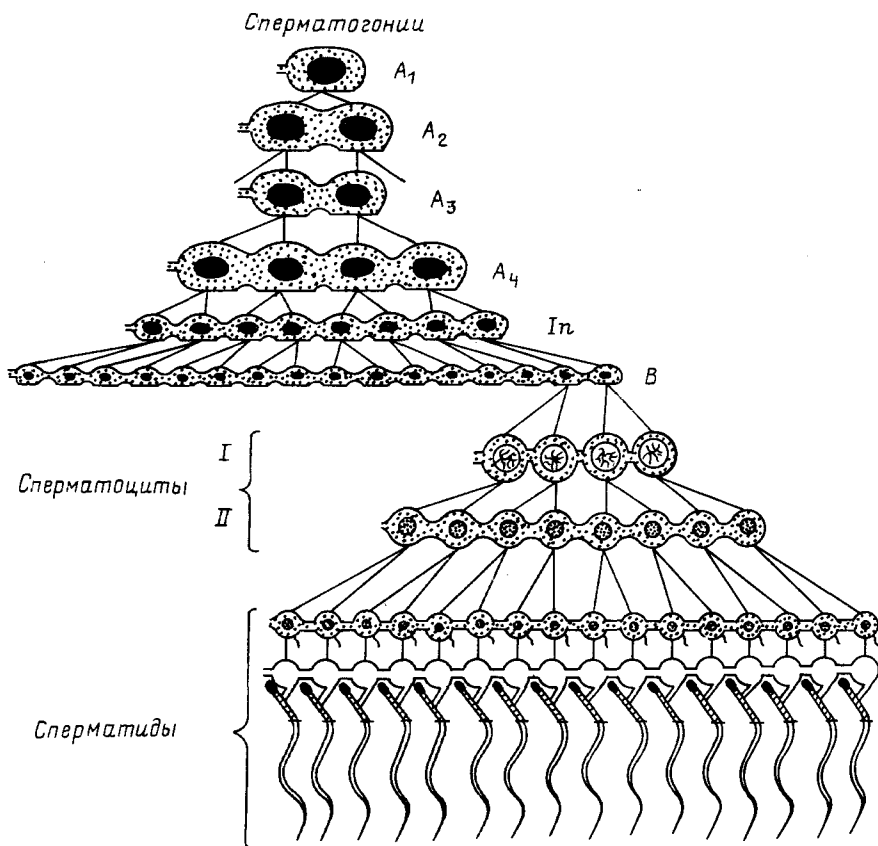


Рис. 42. Схема сперматогенеза [31]

тозоиды в семеннике человека обнаруживаются, по некоторым данным [82], в возрасте около 16 лет. Учитывая известные случаи рождения детей от мальчиков в возрасте около 14 лет, можно считать именно этот возраст наименьшим, в котором появляются зрелые сперматозоиды.

В то же время интенсивное размножение сперматогоний и превращение их в сперматоциты происходят у человека уже в 6-7 лет [7], а надо сказать, что именно на этот период падает длинная профазы мейоза, когда происходит конъюгация гомологичных хромосом и может идти рекомбинационная репарация ДНК. Впрочем, в дальнейшем из так называемых "стволовых сперматогоний" на протяжении всей жизни организма (вернее, до наступления климакса) образуются сперматозоиды, так что каждая новая порция сперматозоидов

проходит через процесс рекомбинационной репарации ДНК, поэтому теория Бернстайнов к ним вполне может быть применима.

Нам, к сожалению, не удалось обнаружить в имеющейся литературе точных сведений об изменениях сперматогенеза от рождения до полового созревания. В большинстве исследований, посвященных этому вопросу, речь идет только о "моментальных снимках" данного процесса, выполненных, например, с помощью электронной микроскопии. Такие результаты позволяют сделать вывод о появлении у 6-7 летних мальчиков сперматоцитов, но не дают ответа на следующий вопрос: появляются эти клетки из "пробудившихся от покоя" сперматогоний или же просто непрерывно идущий процесс сперматогенеза в этом возрасте становится длиннее на одну стадию, а до этого обрывался на стадии сперматогоний типа Б с гибелью последних? То же и для 14-16-летних мальчиков: образуются ли у них первые сперматозоиды из "банка" накопленных до этого сперматид (либо сперматоцитов II порядка) или никогда не останавливающийся процесс сперматогенеза опять-таки удлиняется на 1-2 стадии (см. рис. 42), став, наконец, таким, каков он у взрослых мужчин?

И в связи с этим еще несколько вопросов, на которые нам не удалось найти ответа. Что происходит со сперматогенезом у взрослого человека при длительном отсутствии семяизвержения? Подавляется ли образование сперматозоидов? Переходит ли часть их предшественников в состояние временной "спячки"? Или, может быть, резко интенсифицируется гибель либо самих сперматозоидов, либо сперматид, либо сперматоцитов, либо сперматогоний?

Ответы на все эти вопросы представляются нам очень важными для понимания механизмов старения гамет.

А стареют ли, вообще говоря, половые клетки в организме самцов и самок? Иными словами, накапливаются ли различные "старческие" дефекты в половых клетках так же, как и в соматических?

Мы не останавливаемся здесь на данных экспериментов, свидетельствующих об уменьшении жизнеспособности сперматозоидов со временем после эякуляции (то, что называется "старением в половых путях"). Подробные сведения об этом процессе приведены в обзоре Ж. А. Медведева [263]. На наш взгляд, считать это старение "истинным" нельзя, ибо клетки лишаются практически всех систем поддержания их жизнеспособности и помещаются в очень неблагоприятные для них условия существования.

О том же, что полноценность половых клеток снижается с увеличением возраста как матери, так и отца, свидетельствует в первую очередь так называемый "эффект возраста родителей" (буквальный перевод английского выражения "parental age effect"). (Суть этого феномена заключается в том, что чем больше возраст родителей, тем выше вероятность появления у них детей с врожденными аномалиями и уродствами. Надо сказать, что "эффект возраста родителей" был обнаружен у самых разных видов: коловраток, нематод, насекомых, различных грызунов.

До недавнего времени указанный эффект связывали только с возрастом матери [62, 263, 289 и др.]. При этом предполагалось, что для возраста отца, по крайней мере у человека, влияние данного параметра на "качество" потомства практически отсутствует. Однако в последние годы появился целый ряд работ, свидетельствующих об обратном (см., например, [166, 235]). В частности, отмечалось, что вероятность появления ребенка с синдромом Дауна повышается с увеличением возраста отца [166, 228, 356]. Была также показана зависимость от возраста отца частоты рождения детей с синдромами Марфана, Апера, Варденбурга, Крузона и др. [235], а также с синдромом Клайнфельтера [244]. А совсем недавно появилась статья, которая так и называется: "Папы, остановитесь в 40 лет". [291]. Автор этого проблемного обзора, анализируя целый ряд экспериментальных и клинических данных, приходит к выводу, что вклад отца в "эффект возраста родителей" никак не меньше (если не больше!), чем вклад матери.

Нужно сказать, что разделить влияние отца и матери на потомство не так уж просто, ибо, как правило, возраст супругов коррелирует довольно хорошо, то есть 30-летняя женщина с гораздо большей вероятностью выйдет замуж за 30-40-летнего мужчину, чем за 18- или 80-летнего. Провести такое разделение оказалось возможным только путем тщательного статистического анализа на ЭВМ данных, полученных на очень больших выборках.

Если у женщины возможный механизм старения половых клеток представляется более или менее ясным (накопление генетических дефектов в покоящихся на протяжении всей жизни ооцитах), то можно лишь предполагать, как это старение происходит у мужчин. Если бы сперматогенез шел постоянно с одинаковой активностью, вряд ли можно было бы рассчитывать на накопление дефектов в таких интенсивно размножающихся клетках.

Представляются вероятными несколько механизмов старения мужских половых клеток. Первое возможное "узкое место": если у мальчика в 6-7 лет действительно, как предполагалось выше, возникшие сперматоциты переходят в состояние покоя и "ждут" своего превращения в сперматозоиды при наступлении половой зрелости, то в них, как и в покоящихся ооцитах, могут накапливаться различные генетические дефекты. Кстати, такое предположение может объяснить тот факт, что минимальна частота аномального потомства у отцов в возрасте от 25 до 35 лет [291]. Это может быть следствием появления в первые годы после наступления половой зрелости сперматозоидов из "залежавшихся" сперматоцитов (или сперматогоний). И только после установления сперматогенеза (а на это требуется несколько лет, [82]) частота аномалий потомства становится минимальной. После же 35-40 лет проявляется прогрессирующее ухудшение полового аппарата мужчины на самых разных уровнях, приводящее, в том числе, к резкому замедлению процесса сперматогенеза. Явление ограничения пролиферации (по-видимому, главным образом сперматогоний) опять начинает работать - увеличивается количество дефектных сперматозоидов и, как следствие, возрастает вероятность рождения ребенка с аномалией.

Возможно, определенную роль играет и то обстоятельство, что сперматогенез идет в виде развития синцитиальных клонов (см. рис. 42). Такие синцитиальные клоны претерпевающих соответствующие изменения мужских половых клеток у большинства млекопитающих развиваются изолированно друг от друга в цистах, которые окружены соматическими клетками цисты, образующими "барьер" [31]. Таким образом, клетки двигаются от стадии к стадии "скопом" и элиминация дефектных клеток может быть вследствие этого затруднена.

Надо сказать, что с возрастом, вообще говоря, может снижаться и "качество" тех клеток, которые называют стволовыми сперматогониями. Но это совсем не обязательно. Возможно, скажем, и такая ситуация, при которой определенные условия вызывают увеличение промежутка времени между созреванием сперматозоидов и моментом оплодотворения. При этом мы имеем дело с процессом, сходным с тем самым "ненастоящим" старением спермиев в половых путях, о котором говорилось выше, однако результат будет тем же: повышение частоты генетических повреждений и увеличение риска появления аномального потомства.

Можно полагать, что увеличение относительного количества дефектных сперматозоидов при длительном отсутствии эякуляции может быть связано либо как раз с такого рода "старением" зрелых сперматозоидов, либо с ограничением пролиферации их предшественников.

Впрочем, стволовые сперматогонии, конечно, стареют — как и все стволовые клетки (через ограничение их пролиферации). Целый ряд данных позволяет полагать, что эти клетки отнюдь не являются "бессмертными" и обладают вполне определенным пролиферативным потенциалом. Подробно этот вопрос рассмотрен в работе И.Л. Черткова [119]. В связи с этим не будем останавливаться здесь на этой проблеме. Подчеркнем только, что, по-видимому, в организме вообще отсутствуют клетки с неограниченной способностью к пролиферации. Поэтому во всех клетках организма должны накапливаться со временем те или иные дефекты, хотя скорость этого процесса будет сильно различаться для разных клеточных популяций.

Итак, судя по всему, половые клетки ничем особенным от соматических не отличаются, не обладают никакими специальными системами, повышающими их надежность, и в них также накапливаются с возрастом повреждения генетического материала [69, 96, 136, 239]. Правда, существует и другая точка зрения [1], согласно которой половые клетки отличаются от соматических сохранением своей тотипотентности. На наш взгляд, изложенные выше данные опытов Бригса и Кинга [148] противоречат этой точке зрения. Однако в любом случае для нас наиболее важно, что с геронтологической точки зрения эти клетки, по-видимому, одинаковы.

Об отсутствии "сверхнадежности" половых клеток свидетельствуют, в частности, многочисленные данные об их высокой чувствительности к различным факторам внешней среды — ионизирующим излучениям, химическим соединениям и т. д.

Позволим себе высказать следующую мысль: с эволюционной точки зрения виду невыгодно иметь устойчивые (в генетическом смысле) к неблагоприятным внешним воздействиям половые клетки. Именно их изменчивость создает материал для естественного отбора. Поэтому в половых клетках с определенной частотой возникают повреждения генетического материала, часть которых носит характер мутаций.

Вторая мысль заключается в следующем: в способном стареть организме существуют механизмы, сводящие к минимуму число повреждений (назовем их повреждениями "старческого" типа), "проскальзывающих" через естественные барьеры и

реализующихся в дочернем организме [96, 239, 263]. То есть нет никаких систем "омоложения" половых клеток, а есть системы, сводящие к минимуму (или даже исключают) случаи появления на свет потомства из гамет, несущих "старческие" изменения. Именно эти системы и обеспечивают "бессмертие" зародышевой линии.

Можно перечислить следующие механизмы и барьеры, препятствующие проникновению в половые клетки дочерних организмов "старческих" повреждений родительских гамет:

1) В половых клетках, обладающих гаплоидным набором хромосом, рецессивные летальные мутации, проявляющиеся на клеточном уровне, приводят к элиминации несущих эти мутации геномов.

2) Репликация ДНК, несущей "старческие" повреждения, становится невозможной.

3) В процессе сперматогенеза половые клетки "скидывают" практически весь цитоплазматический материал, а вместе с ним и накопивший повреждения аппарат трансляции.

4) Накопившиеся в половых клетках до начала мейоза повреждения ДНК устраняются в процессе рекомбинационной репарации.

5) В процессе гаметогенеза (главным образом, сперматогенеза) и раннего эмбрионального развития происходит полная реконструкция ядерного аппарата транскрипции, выражающаяся в исчезновении "старых" белков хроматина и возникновении новых - "молодых".

6) При оогенезе происходит удаление "испорченных" геномов путем перевода их в полярные тельца.

7) Существует такое явление, как атрезия - гибель части фолликулов до окончания их роста. Процесс атрезии фолликулов контролируется гонадотропинами гипофиза через половые стероидные гормоны [37]. Однако остается неясным, на какие клеточные элементы яичника оказывают в данном случае действие стероиды. Как указывают в своей статье Дыбан и Баранов [37], ссылаясь на работы [163, 219], "трудно допустить, что выбор пути развития фолликулов определяется чистой случайностью, логичнее предполагать наличие селекции, т. е. элиминации генетически неполноценных ооцитов на разных стадиях их развития". Согласно гипотезе Гендерсона и Эдвардса [219], атрезии подвергаются фолликулы либо с генетически неполноценными ооцитами, либо с ооцитами, у которых нарушена последовательность прохождения профазы мейоза. Необходимо подчеркнуть, что в норме в яичнике приматов и

человека много больших фолликулов погибает и не достигает овуляции. Таким образом, в предовуляторный период большая часть крупных фолликулов подвергается атрезии. Это явление наблюдается и в яичниках у полиовулирующих животных, в том числе у мышевидных грызунов.

8) У большинства видов млекопитающих созревшая яйцеклетка очень быстро перезревает — уже через несколько часов она теряет способность к оплодотворению. Если оплодотворение все же происходит, то развитие прекращается уже на стадии первого деления дробления, после чего наблюдаются фрагментация и лизис образовавшейся структуры.

9) Процесс оплодотворения происходит таким образом, что проникает в яйцеклетку только один из наиболее жизнеспособных сперматозоидов. У дефектных спермиев практически нет шансов на успех.

10) При возникновении зиготы из аномальных половых клеток часто нарушается процесс эмбрионального развития.

11) Из "проскочивших" остальные барьеры половых клеток появляется нежизнеспособное или неспособное к размножению потомство.

Несомненно, что перечень этот является далеко не полным. Для досконального выяснения механизмов, обеспечивающих "бессмертие" зародышевой линии (но не составляющих ее отдельных клеток!) необходимы интенсивные исследования ученых довольно широкого круга специальностей.

Как уже указывалось в соответствующих разделах этой книги, ограничение пролиферации любых клеток, судя по всему, приводит к накоплению в них повреждений генетического материала. Мы предположили, что при возникновении в половых клетках определенных дефектов, для которых перечисленные барьеры не являются препятствием и которые приводят к ограничению пролиферации клеток эмбриона, вероятность возникновения у последнего различных аномалий должна возрастать. В связи с этим была сделана попытка выяснить [100], не влияет ли возраст матери на пролиферативную активность клеток плода. В качестве объекта исследования выбрали клетки хориона, представляющего собой очень рано обособливающуюся эмбриональную ткань с низким уровнем пролиферативной активности [89, 145, 359], обеспечивающим достаточно простой ее анализ. Образцы ткани хориона (около 5 мг) получали из области плацентарных ворсин (которые, в отличие от экстраплацентарных ворсин, являются функционально активными [4]) во время прерывания беременности на 6-12-й неделе. Для

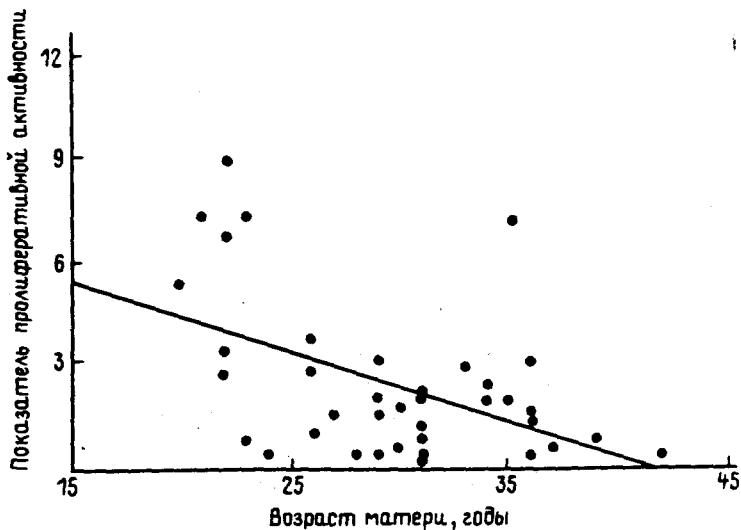


Рис. 43. Зависимость показателя пролиферативной активности клеток хориона (пояснения в тексте) от возраста матери [100]

получения препаратов применяли методику Симони с соавторами [322]. Используя эти препараты, для каждого образца ткани микроскопировали 15 000 свободно лежащих ядер и рассчитывали так называемый "показатель пролиферативной активности", то есть число метафазных пластинок, приходящихся на 3 000 таких ядер.

Полученные данные представлены на рис. 43. Видно, что с увеличением возраста матери пролиферативная активность клеток хориона уменьшается (коэффициент корреляции равен -0.50 ; регрессия значима: $0.001 < p < 0.005$). Соответствующий статистический анализ не выявил достоверного влияния срока беременности (от 6 до 12 недель) на изучаемый показатель. Необходимо отметить, что средняя величина индекса митотической активности изученных культур оказалась близкой к оценкам этого параметра, сделанным другими исследователями [145, 359].

Конечно, состояние клеточной популяции, образующей хорион, не может служить показателем состояния других клеточных популяций развивающегося плода, пролиферативная активность которых может в гораздо меньшей степени зависеть от возраста матери. Нам не известны данные об увеличении срока развития плода у пожилых матерей. Впрочем, даже

небольшое уменьшение пролиферативной активности клеток может, как уже указывалось, приводить к переходу "барьера", за которым возникает прогрессирующий процесс накопления (на уровне всей клеточной популяции) различных молекулярно-генетических повреждений. При дальнейшем развитии эмбриона такие повреждения могут реализоваться в хромосомные aberrации, в свою очередь приводящие к различным аномалиям на организменном уровне (речь в данном случае, конечно, идет о мозаицизме).

Хотелось бы также подчеркнуть, что, как видно из рис. 43, разброс данных между разными индивидами довольно велик. Пролиферативная активность клеток образцов, полученных от некоторых женщин в возрасте свыше 35 лет, находится на уровне, свойственном 20-25-летним матерям. На наш взгляд, это может свидетельствовать о сниженном риске возникновения аномалий плода у этих женщин. Конечно, это предположение нуждается в дальнейших исследованиях на достаточно больших выборках.

В заключение хотелось бы отметить, что экспериментальные исследования механизмов старения половых клеток ставят перед нами проблему поиска соответствующих объектов, на которых можно было бы их проводить. В частности, несомненный интерес могут представлять так называемые "эмбриональные опухоли" (в число которых входят, например, тератомы), происходящие, по всей вероятности, именно из половых клеток.

Полезными могут оказаться исследования, проводимые на икре и молоках рыб и земноводных, яйцах птиц, сперме млекопитающих. И, конечно, бесспорна необходимость дальнейшей разработки методик проведения подробных исследований (включая и работы на молекулярно-биологическом уровне) яйцеклеток человека. В этой связи чрезвычайно важными представляются разработанные методы культивирования изолированных ооцитов млекопитающих [164], а также фолликулов, извлеченных из яичника в интактном виде [37].

5. ПРОЛИФЕРАЦИЯ КЛЕТОК И БОЛЕЗНИ ПРЕЖДЕВРЕМЕННОГО СТАРЕНИЯ

Как уже отмечалось, аргументируя роль изменений пролиферативных характеристик клеток организма в процессе старения, в качестве одного из доказательств приводят, как правило, тот факт, что потенциал УКП для фибробластов людей

Показатели пролиферативной активности клеток людей с некоторыми прогероидными синдромами

Заблевание	Показатели пролиферативной активности					Литературные источники
	Потенциал УКП	Эффективность клонирования	Инт енсивность репликативно-го синтеза ДНК	Скорость УКП	Насыщающая плотность культуры	
Синдром Вернера	30,7 ± 2,9 n = 10(6)	19,3 ± 3,9 n = 3 (2)	53,3 n = 1 (0) (КВТ/1 мин)	70,1 ± 2,2 n = 4(0)	35,0 n = 1(0)	[177, 178, 189, 191, 220, 257, 258, 277, 280, 281, 287, 307, 308, 343]
Прогерия (синдром Хатчисона-На-Гилфорда)	а) 47,5 ± 9,3 n = 6(2) б) норма n = 2	23,8 ± 7,7 n = 2(1)	46,5 ± 0,4 n = 2(1) (СММ ДНК)	69,4 n = 1 (ТЛП)	а) 43,9 ± 20,5 n = 2(1) б) норма n = 1	[158, 190, 191, 200, 344, 360]
Синдром Дауна	62,2 ± 6,2 n = 4(1)	норма n = 1 (НЛ)	Данных нет	69,8 ± 5,0 n = 5(5) норма (НЛ)	75,6 n = 1(1)	[232, 258, 294, 312, 317-319]
Атаксия-телеанги-эктазия	61,8 ± 3,9 n = 2(1)	59,4 ± 12,0 n = 3(2)	89,7 n = 1(1) (КВТ/48 ч)	74,9 n = 1(1)	Данных нет	[165, 221, 321, 344, 360]
Диабет и "предиабет" (г. е. состояние повы- шение повы- шенной ге- нетической предрасполо- женности к диабету)	а) 78,6 ± 5,7 n = 4(4) б) норма n = 1	а) 71,4 ± 5,5 n = 3(2) б) норма n = 1	71,7 n = 1(1) (КВТ/24 ч)	а) 70,9 ± 5,8 n = 3(3) б) норма n = 1 (СДВ)	а) 55,3 ± 6,1 n = 2(2) (СДВ) 31,6 n = 1(1) (ЮСД) б) норма n = 1	[134, 167, 192, 194, 229, 303, 306, 354, 355]

* Пояснения в тексте

с прогероидными синдромами значительно снижен. Сведения же о других показателях пролиферативной активности клеток больных с такими синдромами достаточно разрознены.

Необходимо заметить, что заболевания классифицируют как прогероидные синдромы на основании комплекса клинических и физиологических признаков, считающихся характерными для "нормального" старения, но развивающихся раньше или с большей скоростью, чем в норме. В частности, учитываются характерный "старческий" вид, раннее поседение и выпадение волос, атеросклеротические проявления, "старческие" изменения гемодинамики, повышение частоты возникновения опухолей и заболевания сахарным диабетом и т.д. Прямые же данные, свидетельствующие об изменении кинетики выживания людей с такими заболеваниями, отсутствуют, поэтому строгого доказательства ускорения или более раннего начала старения у них нет.

Из-за этой "размытости" классификации за последние годы список прогероидных синдромов сильно расширился [256]: кроме "классических" синдромов Вернера и Хатчинсона-Гилфорда в него были включены и многие другие заболевания — главным образом, именно по вышеуказанным косвенным клинико-физиологическим признакам. В связи с этим представлялось интересным собрать и проанализировать имеющиеся в литературе данные исследований *in vitro* различных показателей пролиферативной активности клеток людей с заболеваниями, классифицируемыми авторами как прогероидные синдромы.

Результаты нашего анализа представлены в табл. 16. Большая часть данных получена на кожных диплоидных фибробластах. В остальных случаях тип клеток указан. Приведены значения показателей пролиферативной активности в процентах от контроля (клетки здоровых доноров близкого возраста) с ошибкой среднего. Показатели рассчитаны как средние из данных всех проанализированных работ, n — количество источников (в скобках — число работ, в которых объем сравниваемых выборок позволил сделать вывод о достоверности различий между ними). В расчеты не включали данные тех исследований, в которых авторы сделали вывод об отсутствии влияния прогероидных синдромов у людей на пролиферативную активность их клеток (пункты "б" в таблице). Использованы следующие сокращения: ТКФ — трансформированные кожные фибробласты; ТЛЦ — трансформированные лимфоциты; НЛ — нормальные лимфоциты; СЛЦ — стимулированные митогеном лим-

фоциты; СДВ - сахарный диабет взрослых; ЮСД - ювенильный сахарный диабет; КВТ - количество меченого тимидина, включенного в ДНК клеток за время инкубации; СММ ДНК - средняя молекулярная масса ДНК, синтезированной за 1 ч инкубации (авторы, использовавшие этот показатель, считают, что он отражает скорость элонгации ДНК [177]).

В таблицу не включены данные по муковисцидозу - заболеванию, представлявшемуся нам интересным, ибо, хотя оно не относится к прогероидным синдромам, однако характеризуется значительно сниженной продолжительностью жизни больных. Показано [345], что для клеток разных больных с муковисцидозом потенциал УКП может быть как больше, так и меньше контроля. Это свидетельствует об отсутствии связи данного заболевания с пролиферативной активностью клеток.

Анализ данных, представленных в табл. 16, позволил сделать следующие выводы:

1) При прогероидных синдромах наблюдается явная тенденция к уменьшению пролиферативной активности культивируемых клеток больных (оцениваемой по самым разным показателям), хотя механизмы этого уменьшения при разных прогероидных синдромах, по-видимому, различны, поскольку при одних заболеваниях (синдром Дауна, атаксия-телеангиэктазия) все изученные показатели пролиферативной активности снижены приблизительно в равной степени, а при других (синдром Вернера, прогерия) - в различной.

2) Снижение пролиферативной активности наиболее выражено при "классических" прогероидных синдромах - Вернера и Хатчинсона-Гилфорда.

6. СТАРЕНИЕ ПРОСТЕЙШИХ

В книге, посвященной анализу взаимосвязи изменений клеточной пролиферации с процессом старения, нельзя, конечно, обойти вниманием такое явление, как старение простейших. Надо сказать, что на эту тему опубликовано огромное количество работ (см. в частности, обзоры [53, 92, 272, 278, 324-331]). В предисловии к недавно опубликованному сборнику "Клеточное старение" [135] известный специалист в области исследования простейших К. Ауфдерхайде отмечает, что использование одноклеточных организмов для изучения механизмов старения имеет по крайней мере 4 преимущества:

1) возможность применения генетических и квазигенетических

методов (это совсем не просто сделать в случае культур клеток многоклеточных организмов); 2) система "одна клетка простейшего в культуре" есть система, обеспечивающая фактически исследования *in vivo*, так что отсутствует проблема возможных артефактов при переходе от организма к культуральным условиям; 3) так как многие простейшие — это большие клетки, то несложно произвести определенные "хирургические" манипуляции (перенос ядер или частей цитоплазмы); 4) по той же причине достаточно проста процедура отбора отдельных клеток для формирования линий и клонов.

Однако основная трудность при рассмотрении данного материала заключается в отсутствии четкого определения, что же это такое — старение простейших. Разные авторы придерживаются различных определений, и это создает путаницу в данном вопросе. В частности, Б. П. Токин полагает [92], что "под онтогенезом простейших следует понимать совокупность процессов развития организма, начиная с формирования индивидуума в результате бесполого размножения "материнской" клетки, его молодость, взрослое состояние и итоговые этапы жизни — морфофизиологические процессы старения и смерти организма. Конечным этапом онтогенеза, подготовленным развитием организма, является очередное деление — размножение. Таким образом, согласно этому определению, старение приводит одноклеточный организм к размножению путем деления. А как же быть в таком случае с классическим определением старения как увеличения вероятности гибели организма с возрастом? Если придерживаться определения Б.П. Токина, то каким же образом получить кривую выживания популяции простейших, с помощью которой, собственно, только и можно оценить, стареют ли данные организмы? Не получается ли, что только при уменьшении жизнеспособности простейшего до минимума оно становится способным к размножению?

Джоан Смит-Зоннеборн в одной из своих обзорных работ [328], посвященных старению простейших, выделяет несколько типов этого явления: 1) колониальное старение; 2) клональное старение; 3) культуральное старение.

Первый тип старения свойствен, например, колониальному зеленому жгутиковому *Volvox carteri*. Его молодая особь представляет собой сфероид, образованный приблизительно 2 000 двужгутиковых соматических клеток и содержащий внутри 8–16 половых клеток. Продолжительность жизни соматических клеток ограничена, в то время как половые составляют часть "бессмертной" зародышевой линии (как и у высших многоклеточных организмов) [33, 328].

В цикле полового размножения из половых клеток образуются как сперматозоиды, так и яйцеклетки. Сперматозоиды активно разыскивают яйцеклетки и сливаются с ними. Образовавшаяся зигота окружается плотной оболочкой. Через некоторое время при благоприятных условиях она дает начало новой колонии путем последовательных палинтомических (то есть без роста и увеличения объема получающихся клеток) делений; старая (материнская) колония разваливается и ее соматические клетки погибают.

В цикле бесполого размножения эти половые клетки ведут себя, как стволовые. После 11 быстрых делений такой клетки (приблизительно за 10 ч) образуется эмбриональный сфероид. В процессе превращения во взрослый сфероид он должен "вывернуться" (как чулок). Когда миниатюрный сфероид начинает откладывать внеклеточный материал, он становится зрелым, продолжая сосуществовать с "родителем". Внутри материнской колонии образуется несколько таких дочерних колоний. "Вылупление" происходит через предельное ферментативным воздействием в родителемском матриксе отверстие, а оставшаяся "скорлупа" претерпевает запрограммированную деградацию и растворяется. Через 12 ч, или через 48 ч после начала развития, в новом сфероиде начинается гонидиальный эмбриогенез. Бесполое размножение идет очень быстро и может быть синхронизировано светом. Соматические клетки претерпевают за 72-96 ч старение, характеризующееся уменьшением интенсивности синтеза клеточных белков, снижением скорости фотосинтеза и, наконец, смертью, происходящей приблизительно через 144 ч после завершения клеточных делений. У *Volvox* факторы окружающей среды, влияющие на скорость метаболизма, оказывают влияние и на время наступления смерти постмитотических соматических клеток. Например, при 40°C смерть наступает через 144 ч после прекращения деления клеток, а при 20°C - через 264 ч. Сходным образом, культивирование клеток в темноте или с ингибитором синтеза белка (циклогексимидом) задерживает как развитие гонидиальных, так и гибель соматических клеток.

Таким образом, из вышесказанного видно, что процесс старения у *Volvox* сходен с этим процессом у примитивных многоклеточных.

Примером клонального старения является старение парамеций, выражающееся в уменьшении вероятности появления способной делиться клетки с увеличением количества делений, пройденных потомством одной единственной парамеции, воз-

никшей после оплодотворения. Рассмотрим коротко методику исследований этого феномена. Как правило, используются либо метод так называемой "ежедневной изоляции", разработанный Зоннеборном [333] для *Paramecia aurelia*, либо методы массового культивирования, применяемые при исследовании *P. caudatum* [341], *P. bursaria* [231], и *P. multimicronucleatum* [334]. Методика "ежедневной изоляции" требует использования определенных генетических маркеров для контроля возможного аутогамного полового процесса. При исследовании старения *P. tetraurelia* используются два таких генетических маркера: 1) мутация, затрагивающая малатдегидрогеназу; 2) мутация, затрагивающая функции трихоциста — маленькой стреловидной органеллы около поверхности клетки. Оба маркера дают возможность различить гомо- и гетерозиготы (в первом случае — с помощью электрофореза, во втором — по фенотипу простейшего).

При культивировании парамеций в массовой культуре определенное их количество помещают в питательную среду, содержащую бактерии *Klebsiella aerogenes*, служащие инфузориям пищей. Инкубация идет до достижения культурой насыщающей плотности, после чего делается пересев на свежую среду. Такая методика используется при исследовании *P. caudatum*, *P. bursaria* и *P. multimicronucleatum*, у которых не наблюдается аутогамии. Предпринимаются соответствующие меры, исключая скрещивание особей внутри клона. Рассчитывается сначала количество делений, пройденных клетками в каждом инкубационном цикле до достижения насыщающей плотности, а затем общее количество делений клеток от самого начала культивирования до гибели культуры после прекращения размножения.

При методике "ежедневной изоляции" исследуемые линии образуются из нескольких оплодотворенных клеток, которые в первый день отдельно помещаются в лунки с питательной средой. На второй день подсчитывается число клеток в каждой лунке и одна клетка переносится в новую лунку. Эта процедура повторяется каждый день и обеспечивает оценку как количества делений за сутки, так и суммарного "пролиферативного возраста" клеток (общее количество делений, пройденных с первого дня). Число делений за сутки определяется путем вычисления \log_2 от числа образовавшихся в течение этого времени потомков одной клетки. Каждая клеточная линия представляет собой так называемую репрезентативную сублинию клона. Обычно в каждом исследовании используют 100

таких репрезентативных линий. Момент гибели линии фиксируется тогда, когда в лунке не обнаруживают клетки, помещенной туда за сутки до этого. Когда все репрезентативные линии погибают, рассчитывают среднюю продолжительность жизни для клона. Максимальное число делений клеток сублинии считают максимальной продолжительностью жизни репрезентативных линий клона. Некоторые клетки даже в присутствии избытка пищи могут претерпевать самооплодотворение (аутогамию), после которой "часы" клона сбрасываются на нулевое деление, то есть возникает новый "молодой" клон. Такие сублинии выявляются по потере гетерозиготности с помощью вышеуказанных генетических маркеров. Выявленные "омолодившиеся" репрезентативные линии изымаются из эксперимента.

Нетрудно видеть, что при таком подходе продолжительность жизни исследуемых клеток оценивается приблизительно тем же образом, что и продолжительность жизни культивируемых диплоидных клеток, "стареющих" *in vitro* "по Хейфлику".

На протяжении своей "клональной жизни", продолжительность которой варьирует от 50 дней для *P. aurelia* до 5 400 дней для *P. multimicronucleatum*, парамеции проходят следующие стадии [329]: 1) стадия половой зрелости, на которой клетки не способны вступать в конъюгацию или претерпевать аутогамию, но могут делиться; 2) стадия зрелости, на которой возможны и конъюгация, и аутогамия; 3) стадия старости, которая характеризуется переменчивым числом микронуклеусов, аномалиями макронуклеуса, нестабильностью фенотипа, увеличением количества мутаций, увеличением интервалов между делениями, увеличением вероятности смерти сразу после аутогамии, увеличением чувствительности к рентгеновскому и УФ-излучению и уменьшением вероятности того, что данная клетка даст жизнеспособное потомство; 4) стадия смерти, когда клетка, потерявшая способность делиться, погибает. Как уже отмечалось, парамеции являются уникальным объектом в том смысле, что "счетчик" времени может быть практически в любой момент (если только клетка совсем не состарилась) сброшен на нулевую отметку с помощью конъюгации или аутогамии. Значительная задержка оплодотворения приводит к уменьшению продолжительности "клональной жизни" потомства, возникшего от старых родителей (то есть, как и у высших организмов, имеет место "эффект возраста родителей").

Надо сказать, что у ресничных инфузорий встречаются виды, не подверженные клоальному старению. К их числу относится, например, *Tetrahymena pyriformis*. Штаммы этого одноклеточного можно разбить на три группы: 1) те, у которых никогда не наблюдается полового процесса; 2) те, у которых скрещивание происходит только при смешивании клонов в определенных комбинациях; 3) те, у которых конъюгация регулярно происходит внутри клонов ("selfers"). Аутогамии у этого вида не наблюдается. Штаммы первой группы никогда не стареют. Подробный анализ возможных причин такого "бессмертия" проведен в работе [329]. Предполагается, что они могут быть связаны с генетическими особенностями данного простейшего.

Еще одна разновидность "бессмертных" одноклеточных — это Амеба. Этот организм, размножающийся только бесполом путем, обладает неограниченным митотическим потенциалом. Амебу можно культивировать практически бесконечно при обеспечении ее нормальным количеством пищи (800 штук *Tetrahymena* на мл культуральной среды). При этом время УКП составляет приблизительно 1,8 суток. Размножение клеток можно приостановить путем уменьшения количества пищи или постоянного перемешивания среды для затруднения захвата амебами своих жертв [366]. После 4–6 недель такого ограничения питания амеб переводят на обычную диету. При этом размножение клеток становится ограниченным: продолжительность их "пролиферативной жизни" варьирует от 30 суток до 30 недель. Такие амебы с ограниченным митотическим потенциалом подразделяются на два типа — А и В. Клетки типа А производят при делении одну жизнеспособную и одну нежизнеспособную (клетка умирает в течение 1–2 дней после возникновения) особь. Клетки типа В образуют линии, особи которых при делении производят одинаково жизнеспособные дочерние клетки до тех пор, пока все члены клона не погибнут. Перенос ядра "бессмертных" клеток в цитоплазму "стареющих" клеток (как типа А, так и типа В) приводит к появлению штамма, целиком состоящего из "стареющих" клеток типа В. Когда осуществляется перенос ядра клетки типа В в "бессмертную" цитоплазму, образуется "стареющая" клетка типа А. Перенос ядра клетки типа А в "бессмертную" цитоплазму приводит к возникновению клеток типа А. Таким образом, "стареющие" клетки несут информацию об ограниченном митотическом потенциале как в ядре, так и в цитоплазме [271]. Ситуация, следовательно, сходна с таковой для культивируемых кле-

ток млекопитающих. Индуцированная пересадками ядра или цитоплазмы экспрессия фенотипа, обеспечивающего старение, не требует предварительного перевода амёб на соответствующую диету [366].

Третий тип старения простейших по классификации Смит-Зоннеборн — это культуральное старение [328]. К сожалению, определения этого термина она в своей работе не даёт. Из текста же главы, ему посвященной, сделать конкретные выводы просто невозможно. По-видимому, речь идет все-таки о деградации клеток при создании спределенных культуральных условий, в частности, при искусственном ограничении размножения простейших тем или иным путем. Например, когда клетки *Euplotes* длительно выдерживают в условиях голодания, у них возникают мембранные везикулы, окружающие цитоплазму, крупные митохондрии дегенерируют и уменьшается число ядрышек макронуклеуса [301]. Сходные изменения возникают и в клетках, претерпевающих клональное старение.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Конечно, в такой небольшой работе нельзя отметить не все вопросы, стоящие перед цитогеронтологией. Попробуем, тем не менее, сделать некоторые выводы, вытекающие из рассмотренного материала.

Были проанализированы две основные модели, используемые в настоящее время для изучения механизмов старения в экспериментах на клеточных культурах — модель Хейфлика и модель "стационарного старения". Несомненно, что первая гораздо более известна, ибо интенсивно используется уже в течение четверти века. Однако целый ряд данных позволяет полагать, что результаты, полученные на этой модели, часто не совпадают с результатами исследований старения *in vivo*. Кроме того, эксперименты такого рода зачастую не менее трудоемки, чем опыты на лабораторных животных. Собственно, и сам Л. Хейфлик считает, что клетки *in vivo* почти никогда не используют весь свой пролиферативный потенциал и не достигают фазы III. Иными словами, организм никогда не стареет из-за истощения клетками "лимита Хейфлика". Он стареет из-за накопления в клетках тех или иных повреждений вследствие, как мы полагаем, ограничения их пролиферации при возникновении в процессе дифференцировки популяций специализированных покоящихся или размножающихся с низкой скорос-

5831

тью клеток. Поэтому исследовать механизмы старения на клеточном уровне нам представляется более целесообразным на модели "стационарного старения", базирующейся на положении, согласно которому в клетках стационарных клеточных культур со временем должны возникать различные изменения, сходные с изменениями клеток стареющего организма. Представленный в соответствующих разделах этой работы материал, как нам кажется, свидетельствует в пользу этого положения. Показано, что в стационарных культурах действительно накапливаются "возрастные" изменения на самых разных уровнях. При этом выявляются такие изменения, как правило, очень быстро — через 2–3 недели после начала эксперимента. Это позволяет нам считать модель "стационарного старения" хорошей альтернативой модели Хейфлика.

Хотелось бы отметить, что данная модель, как и клеточно-кинетическая модель, рассмотренная в разделе 3, позволяет также достаточно быстро и эффективно проводить исследования потенциальных геропротекторов и геропромоторов. Напомним, что этими терминами мы обозначаем факторы (физические или химические), которые, соответственно, замедляют или ускоряют старение экспериментальных животных или человека. При этом оценка их действия, вообще говоря, может быть корректно произведена только путем снятия кривых выживания контрольной и опытной популяций. Сдвиг такой кривой вправо означает замедление процесса старения (фактор, вызывающий этот сдвиг, можно считать геропротектором), влево же — его ускорение (фактор — геропромотор).

К сожалению, такого рода эксперименты на людях, во-первых, часто невозможны по этическим соображениям (если, например, изучаемый химический препарат не охарактеризован фармакологически), а во-вторых, потребовали бы работы по меньшей мере двух поколений исследователей. Опыты же на экспериментальных животных занимают также достаточно много времени и, кроме того, данные, полученные в таких опытах, далеко не всегда могут быть перенесены на человека, старение которого интересует нас в первую очередь.

В связи с вышесказанным, особую актуальность приобретают работы, направленные на разработку различных подходов, обеспечивающих достаточно быстрое получение адекватных сведений о действии потенциальных геропротекторов и геропромоторов, поиском которых занимаются в настоящее время многие ученые-геронтологи.

Фактически сейчас существует три основных типа таких подходов: 1) с помощью оценки биологического возраста организма; 2) с помощью чисто химических модельных систем; 3) с помощью экспериментов на клеточных культурах.

Необходимо подчеркнуть, что все эти подходы обеспечивают лишь косвенную информацию о геропротекторном или геропромоторном характере действия изучаемых факторов, ибо снятия кривых выживаемости не производится.

Исследования первого типа могут проводиться как на животных, так и на человеке. В этом случае мы делаем вывод о характере действия исследуемого фактора по направлению сдвига в сторону более "молодых" или "старых" значений некоторого параметра (физиологического, биохимического и т. д.), который мы считаем существенным для процесса старения на основании его корреляции с возрастом. Недостатки такого рода работ уже отмечены выше.

Ко второй группе относятся, например, эксперименты по модификации "старения" растворов коллагена. Методология интерпретации данных этих экспериментов сходна с таковой для первой группы исследований. Хотя результаты в такого рода работах могут быть получены за достаточно короткий срок и с низкими материальными затратами, их применимость для выводов о старении человека представляется пока недостаточно аргументированной.

И, наконец, в третью группу попадают исследования на нескольких клеточных модельных системах, рассмотренных в настоящей работе: а) модели Хейфлика (старение *in vitro*); б) модели "стационарного старения"; в) клеточно-кинетической модели. В первом случае вывод о геропротекторном или геропромоторном действии изучаемого фактора делается на основании данных о его влиянии либо на потенциал УКП, либо на скорость тех или иных изменений клеток в процессе их старения *in vitro*. В случае второй модели фиксируются изменения скорости накопления тех или иных повреждений в клетках стационарных клеточных культур. Наконец, в третьем случае заключение о действии исследуемого фактора делается на основе характера изменения кинетики роста культивируемых клеток — главным образом, увеличения или уменьшения насыщающей плотности культуры. Именно эта модель обеспечивает наиболее быстрое получение данных, позволяющих количественно охарактеризовать исследуемые геропротекторы или геропромоторы.

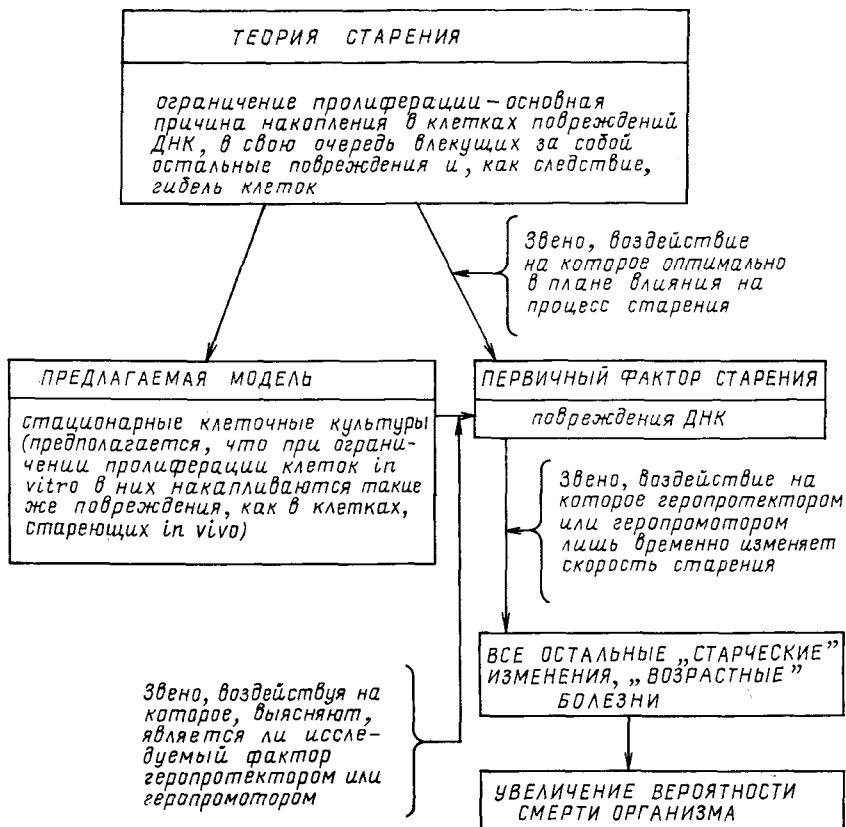


Рис. 44. Методология разработки модельной системы для испытания геропротекторов и геропромоторов (на примере теории ограничения клеточной пролиферации как основной причины накопления повреждений при старении организма)

Необходимо подчеркнуть, что выбор той или иной модели, а также интерпретация полученных на ней данных полностью зависят от концепции старения, которой придерживается конкретный исследователь. Методология такого выбора проиллюстрирована схемой, представленной на рис. 44. В качестве примера рассмотрена теория старения, основывающаяся на признании решающей роли в процессе старения ограничения пролиферации клеток и последующего накопления в них повреждений генетического материала (см. раздел 2). Большими буквами в прямоугольниках указаны общие названия частей

схемы, а маленькими отмечены положения, вытекающие из рассматриваемой теории.

В связи с изложенным на рис. 44 необходимо подчеркнуть следующее. Громадное количество существующих сейчас различных концепций старения постулирует в качестве его причины такое же количество процессов или феноменов. Как же можно определить, первичны ли, например, повреждения мембран для процесса старения или они всего лишь следствие других изменений, скажем, повреждений ДНК либо накопления липофусцина? Чрезвычайно важно помнить, что первопричина старения может быть в принципе неустранима, в то время как с ее следствиями (собственно, и вызывающими нарушение определенных функций организма) вполне можно бороться. Например, согласно рассмотренной на рис. 44 теории основной причиной старения организма является ограничение пролиферации составляющих ее клеток. Однако само по себе ограничение пролиферации не влияет на жизнеспособность организма. К нарушению целого ряда его функций, согласно гипотезе, приводит происходящее вследствие ограничения пролиферации накопление в клетках дефектов на молекулярном уровне. Таким образом, для понимания механизмов, запускающих старение, важно изучение явления ограничения пролиферации — например, на стационарных клеточных культурах, организмах с фиксированным числом клеток (типа коловерток) или организмах, обладающих неограниченным ростом (типа рыб) либо неограниченным "клеточным обменом" (типа гидры). В то же время, для поиска того феномена, который необходимо уничтожить для замедления (или даже, в идеале, для полного подавления) старения, нужна уже совсем другая стратегия. Необходимо выявить те изменения, которые в первую очередь возникают в клетках вследствие ограничения их пролиферации (это могут быть изменения ДНК или мембран, модификации свободно-радикальных либо каких-нибудь иных процессов), приводя в дальнейшем к "цепной реакции" накопления дефектов на самых разных уровнях. Именно на эти "первичные среди вторичных" явления и должно быть направлено наше внимание при поиске средств борьбы со старением, ибо бороться с явлением ограничения пролиферации, которое просто необходимо для нормального развития организма, мы не в состоянии. Нам представляется, что на роль такого "первичного среди вторичных" фактора больше всего подходит ДНК, так как именно она определяет структуру и функции всех остальных макромолекул и органелл в клетках [98], однако на этот счет могут быть, естественно, и другие мнения.

В настоящем обзоре не были рассмотрены некоторые широко известные теории клеточного старения: "коммитирования" [223, 227, 236, 238], "иммортализации" [233, 234, 320] и др. Первая причина этого — ограниченный объем работы, вторая же заключается в том, что практически во всех этих теориях делается попытка объяснить причины старения "по Хейфлику" и практически не затрагивается вопрос о старении *in vivo*. В связи с этим применимость таких концепций оказывается довольно ограниченной.

Анализ данных, касающихся "бессмертия" клеток зародышевой линии (см. разделе 4), позволяет полагать, что настоящий феномен вполне объясним с позиций теории ограничения пролиферации как основной причины накопления в клетках возрастных повреждений. Основной вывод, к которому мы пришли, рассмотрев эти данные, сводится к тому, что половые клетки (как, впрочем, и стволовые) стареют так же, как и все другие клетки, в смысле накопления в них соответствующих "старческих" дефектов. Об этом, в частности, свидетельствует широко известный "эффект возраста родителей". Зародышевая же линия в целом обеспечивает себе "бессмертие", по-видимому, за счет эффективной системы отбора и элиминации "испорченных" гамет. Таким образом, в большинстве случаев потомство возникает лишь из неповрежденных половых клеток. Собственно, с похожей ситуацией мы имеем дело в случае "стационарного старения" культивируемых клеток. Если в "старой" популяции сохраняется некоторое количество неповрежденных клеток, они, при создании соответствующих условий, снимающих "пролиферативный блок", могут образовать новую, "молодую", клеточную популяцию.

В связи с вышесказанным хотелось бы кратко коснуться проблемы надежности клеток и клеточных популяций и ответить на вопрос, обязательна ли "сверхнадежность" для клеток нестареющей клеточной популяции. Нестареющей, как уже отмечалось, мы называем такую клеточную популяцию, в которой со временем не накапливаются структурные и функциональные дефекты, появляющиеся в клетках стареющего организма, а "сверхнадежностью" — ту, более высокую, по мнению некоторых авторов [45, 136, 239, 263], надежность, которая свойственна клеткам таких нестареющих клеточных популяций и которая, как полагают многие, и определяет их "бессмертие". Материал, изложенный в настоящей работе, позволяет полагать, что надежность клеток "бессмертных" клеточных популяций совсем не обязательно должна быть выше, чем надежность

клеток стареющих популяций. Более того, в отдельных случаях она даже может быть меньше. При этом под надежностью отдельной клетки мы понимаем ее способность противостоять накоплению тех или иных "старческих" дефектов. Высокая надежность в этом смысле не обязательно должна сопровождаться высокой устойчивостью к неблагоприятным факторам, не играющим роли в естественном старении. Согласно нашей концепции, именно ограничение пролиферации (либо полное, либо частичное) приводит к снижению эффективности замены в системе (клеточной популяции) поврежденных элементов (отдельных клеток) путем размножения "здоровых" элементов. Хотелось бы подчеркнуть, что повышенная устойчивость клеточной популяции к накоплению "старческих" дефектов, на наш взгляд, определяется не "включением" размножения "холодного резерва" при необходимости [23], а увеличенной пролиферативной активностью составляющих эту популяцию клеток либо увеличенным относительным количеством делящихся клеток в популяции. Скорость накопления "старческих" изменений в клетках должна определяться как степенью ограничения пролиферации, так и надежностью отдельных клеток. По-видимому, у клеток, нормальное существование которых происходит при низком или даже нулевом уровне пролиферативной активности (гепатоциты, нейроны, кардиомициты и т. д.) эта надежность выше. Таким образом, "стационарное старение" клеток с более высокой надежностью тоже идет, хотя и с меньшей скоростью.

В литературе, главным образом радиобиологической, бытует мнение о более высокой устойчивости клеток в стационарной фазе роста к неблагоприятным воздействиям. В частности, это положение можно найти в нескольких работах сборника, специально посвященного надежности биологических систем [45, 91]. Наша концепция совсем не противоречит этому имеющему значительное количество экспериментальных подтверждений положению, как может показаться на первый взгляд. Действительно, если подвергнуть действию ионизирующей радиации в значительных дозах покоящиеся и активно делящиеся клетки, то выживаемость последних будет значительно меньшей. Причины этого ясны: сублетальные повреждения, которые могут репарироваться в покоящихся клетках, быстро превращаются в летальные в случае клеток, активно продвигающихся по митотическому циклу. В случае же клеточного старения речь идет о повреждениях, возникающих в неизмеримо меньших количествах и не затрагивающих одновременно все

клетки популяции. Именно поэтому число таких повреждений в расчете на всю клеточную популяцию увеличивается только при достаточно низком уровне пролиферации, когда размножение "здоровых" клеток не в состоянии "пересилить" процесс накопления "старческих" дефектов.

Таким образом, из разработанных еще в первой трети нашего столетия концепций [123, 138, 265-267], согласно которым ограничение роста организмов играет главенствующую роль в развитии процесса старения, нужно признать наиболее соответствующей нашим представлениям гипотезу Майнота. Уже в самом начале века он высказал мысль, что старение есть прямое следствие дифференцировки клеток и что дифференцированные клетки из-за изменений, происшедших главным образом в цитоплазме во время морфогенеза, становятся неспособными ни к росту, ни к восстановлению [266].

В ряде работ, появившихся совсем недавно, ограничению пролиферации также придается большое значение в процессе старения (см. обзор [358]). Сделана даже попытка создания математической модели, связывающей ограничение пролиферации и накопление с возрастом в организме так называемых "шлаков" [93], но не использующей, к сожалению, никаких экспериментальных данных.

Результаты соответствующих исследований (см. раздел 5) дают основание предположить наличие определенной связи между изменениями пролиферативной активности клеток организма человека и наличием у него тех или иных заболеваний, вызывающих преждевременное или ускоренное старение. Трудно в настоящее время предположить, какую пользу может принести практической медицине понимание данного обстоятельства, однако, несомненно, что сниженная пролиферативная активность клеток конкретного человека позволяет отнести его к группе повышенного риска возникновения как прогероидных заболеваний, так и классических "возрастных" болезней — атеросклероза и рака.

Наконец, рассмотрение вопроса о старении одноклеточных (см. раздел 6) дает возможность сделать вывод, что и в этом феномене ограничение клеточной пролиферации играет, по-видимому, решающую роль. О каком бы типе старения простейших не шла речь, всегда прослеживается вполне определенная закономерность — "старческая" деградация наблюдается только после уменьшения (по тем или иным причинам) способности клеток к делению.

И напоследок хотелось бы заметить следующее. У критически настроенного читателя наверняка сложилось впечатление о некоторой тенденциозности автора в интерпретации многочисленных данных, рассмотренных в этом обзоре. Во всех случаях он пытался доказать, что концепция старения, которой сам придерживается, позволяет объяснить эти данные. Причина этого достаточно проста — автор действительно искренне полагает, что теория ограничения пролиферации как основной причины старения организмов и клеточных популяций применима для всех проанализированных феноменов. Естественно, он может и ошибаться. Что ж, если появятся соответствующие экспериментальные доказательства его неправоты, автор готов пересмотреть свои взгляды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Айзенштадт Т.Б. Цитология оогенеза. М., Наука", 1984, 248 с.
2. Аксенов М.Ю., Левина О.А., Дальгина В.Г., Капитанов А.Б. Зависимость обновления мембранных белков клеток микоплазм от возраста культуры. "Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.", 1987, № 5, 20-24.
3. Аксюткина М.С., Дилчина Л.П., Мамаев В.Б., Смирнов Л.Д., Сорокина А.В., Лебелева Т.В., Федотова И.И. Влияние антиоксидантов на пролиферацию клеток человека в различные фазы роста культуры. В сб.: Тез. докл. Всес. симп. Молекул. и клеточ. механизмы старения, 1981. Киев, 1981, 7-8.
4. Барцева О.Б. Изучение митотической активности клеток ворсинчатого хориона для целей пренатальной цитогенетической диагностики в первом триместре беременности. В сб.: V Съезд Всес. общества генетиков и селекционеров им. Н.И. Вавилова. Москва, 24-28 ноября 1987 г. Т. II. Генетика человека и мед. генетика. Тез. докл. М., 1987, 13-14
5. Баулина О.И., Гусев М.В. Динамика ультраструктурных изменений облигатно фототрофной водоросли *Alabaena variabilis* в период сохранения ею жизнеспособности в темноте. "Физиол. раст.", 1978, 25, № 6, 1168-1171
6. Бочков Н.П., Демин Ю.С., Лучник Н.В. Классификация и методы учета хромосомных aberrаций в соматических клетках. "Генетика", 1972, 8, № 5, 133-141
7. Бреслер В.М. Цитологические механизмы бластоогенеза в яичке. Л., "Наука", 1964, 184 с.
8. Бриан П. Бластогенез и гаметогенез. В кн.: Происхождение и развитие половых клеток в онтогенезе позвоночных и некоторых групп беспозвоночных. Л., "Медицина", 1968, 17-74
9. Бунур Д. Линия половых клеток у бесхвостных амфибий (Алига). Там же, 186-215
10. Ван-Ганзев П. Старение клеток *in vitro*. "Цитология", 1979, 21, № 6, 627-649
11. Ванюшин Б.Ф. Метилирование ДНК у эукариотов - новый механизм регуляции экспрессии генов и клеточной дифференцировки. "Усп. биол. химии", 1983, 24, 170-193
12. Виленчик М.М. Молекулярные механизмы старения. М., "Наука", 1970, 168 с.

13. Виленчик М.М. Изменение цитоплазматической ДНК при малигнизации клетки. "Усп. совр. биол.", 1973, 75, № 3, 388-405
14. Виленчик М.М., Хохлов А.Н. О механизмах регуляции системы репарации ДНК в клетке. В сб.: Влияние радиации на регуляторные процессы в клетке. Тез. докл. Всес. симп. (Пушино, 25-28 мая 1976 г.), Пушино, 1976, 58-59
15. Виленчик М.М., Хохлов А.Н., Бердышев Г.Д. Изменение репаративного и редупликативного синтеза ДНК в процессе старения животных клеток. В сб.: Молекулярная генетика и биофизика, вып. 5, Респ. межвед. науч. сборник. К., "Вища школа", 1980, 108-119
16. Ворсанова С.Г. Стационарные клеточные популяции как модель старения. В сб.: Геронтология и гериатрия, 1977. Ежегодник, Киев, 1977, 118-123
17. Гаврилов Л.А., Гаврилова Н.С. Культура диплоидных клеток как объект изучения молекулярных механизмов старения. "Усп. совр. биол.", 1978, 85, № 2, 267-283
18. Гаврилов Л.А., Гаврилова Н.С. Старение в клеточных культурах. В кн.: Биология старения. Л., "Наука", 1982, 236-247
19. Гаврилов Л.А., Гаврилова Н.С. Биология продолжительности жизни. М., "Наука", 1986, 169 с.
20. Гринберг К.Н. Исследование цитогенетического действия некоторых метаболитов. Автореф. дис. канд. мед. наук. М., 1971, 37 с.
21. Гринберг К.Н., Терехов С.М. Хромосомный дисбаланс и пролиферативный потенциал клеток *in vitro*. "Бюл. эксперим. биол. мед.", 1985, 49, № 2, 191-193
22. Грунтенко Е.В. Что нам стоит многоклеточность? Новосибирск, "Наука", 1985, 136 с.
23. Гулков И.Н. Надежность меристем растений. В сб.: Надежность биологических систем. К., "Наукова думка", 1985, 118-127
24. Гусев М.В., Бутенко Р.Г., Корженевская Т.Г., Юрина Т.П. Влияние возраста суспензионных культур диоскореи и табака на репродуктивную выживаемость и характер роста клеток. "Физиол. раст.", 1981, 28, № 3, 562-569
25. Гусев М.В., Корженевская Т.Г. Темновой метаболизм облигатных фототрофов. "Усп. совр. биол.", 1977, 84, № 1 (4), 66-80
26. Гусев М.В., Корженевская Т.Г., Юрина Т.П. Влияние куль-

- туральной жидкости табака и диоскореи на процесс окисления 3,4-диоксифенилаланина. "Физиол. раст.", 1982, 29, № 6, 1225-1230
27. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология. М., Изд-во Моск. ун-та, 1985, 376 с.
28. Гусев М.В., Никитина К.А. Изучение темнового отмирания сине-зеленых водорослей. "Микробиология", 1974, 43, № 2, 333-337
29. Гусев М.В., Никитина К.А. Цианобактерии: Физиология и метаболизм. М., "Наука", 1979, 228 с.
30. Далакишвили С.М., Делашвили Н.Г., Гецалдзе Х.А. Популяционный подход к изучению молекулярных и клеточных механизмов долголетия. Тбилиси, "Мещниереба", 1986, 150 с.
31. Данилова Л.В. Сперматогонии, сперматоциты, сперматиды. В сб.: Современные проблемы сперматогенеза. М., "Наука", 1982, 25-72
32. Дебова Г.А. Межиндивидуальная вариабельность частот спонтанных и химически индуцированных сестринских хроматидных обменов. Автореф. дис. канд. биол. наук. М., 1984, 24 с.
33. Догель В.А. Зоология беспозвоночных. М., "Высшая школа", 1981, 606 с.
34. Дрейпер Н., Смит Г. Прикладной регрессионный анализ. М., "Статистика", 1973, 392 с.
35. Думбадзе Г.Г. Влияние электромагнитных полей (ЭМП) звуковых частот (ЗЧ) на хромосомный набор культивируемых лимфоцитов человека. "Изв. АН ГССР. Сер. биол.", 1981, 7, № 5, 457-460
36. Думбадзе Г.Г., Чеботарев А.Н. Уровень сестринских хроматидных обменов при комбинированном действии низкочастотного электромагнитного поля и тиофосфамида. "Изв. АН ГССР. Сер. биол.", 1985, 11, № 6, 418-421
37. Дыбан А.П., Баранов В.С. Оогенез млекопитающих. В кн.: Современные проблемы оогенеза. М., "Наука", 1977, 200-239
38. Еголина Н.А., Захаров А.Ф. Спирализация хромосом китайского хомячка после воздействия 5-бромдезоксипурином на клетки в двух последовательных митотических делениях. "Цитология", 1972, 14, № 2, 165-171
39. Елифанова О.И., Терских В.В., Полновский В.А. Покоящиеся клетки. Свойства и функции в организме. М., "Наука", 1983, 176 с.

40. Ефимцев Е.И., Бойченко В.А., Гусев М.В., Никитина К.А., Литвин Ф.Ф. Исследование изменений фотосинтетических характеристик сине-зеленых водорослей в зависимости от длительности темновой инкубации. "Физиол. раст.", 1977, 24, № 1, 23-29
41. Зеленин А.В., Куш А.А., Прудовский И.А. Реконструированная клетка. М., "Наука", 1982, 207 с.
42. Зеленин А.В., Прудовский И.А. Зачем лишать клетку ядра. "Природа", 1983, № 7, 15-25
43. Ивашкина Т.П., Корженевская Т.Г., Гусев М.В., Бутенко Р.Г., Жолкевич В.Н. Дыхание и теплопродукция клеток табака и диоскореи в цикле выращивания культур. "Физиол. и биохим. культ. раст.", 1983, 15, № 3, 227-232
44. Ирлина И.С. Фазы роста массовой культуры и теплоустойчивость клеток. "Цитология", 1980, 22, № 4, 462-470
45. Календо Г.С. Возможные причины высокой надежности роста популяции опухолевых клеток. В сб.: Надежность биологических систем. К., "Наукова думка", 1985, 127-132
46. Капитанов А.Б. Микоплазма как объект для изучения клеточного старения. В сб.: Надежность и элементарные события процессов старения биологических объектов. К., "Наукова думка", 1986, 167-176
47. Капитанов А.Б., Аксенов М.Ю., Лалыгина В.Ф., Лалыгина В.Г., Муханкин А.И. Старение культуры клеток микоплазмы. В сб.: Разл. аспекты анал. биол. систем. Докл. МОИП, 1984. Общ. биол. М., 1986, 70-72
48. Капитанов А.Б., Аксенов М.Ю., Татишев О.С., Кольцов В.К. Культура клеток *Acholeplasma laidlawii* как объект для изучения возрастных изменений биологических мембран. "Докл. АН СССР", 1985, 281, № 1, 186-189
49. Капитанов А.Б., Иванова В.Ф., Муханкин А.И., Лалыгина В.Г., Добрынина О.В., Клебанов Г.И., Саженин Г.И., Арчаков А.И. Изменение активности ферментов плазматической мембраны в процессе роста культуры клеток *Acholeplasma laidlawii*. "Биохимия", 1984, 49, № 11, 1747-1753
50. Капитанов А.Б., Лалыгина В.Г., Муханкин А.И., Иванова В.Ф., Грунерт М. Накопление холестерина в плазматической мембране и изменение активности ферментов при старении клеток *Acholeplasma laidlawii* В сб.: Тез. и реф. докл. IV Всес. съезда геронтологов и гериатриков. М., 1984, 10-11

- тров. Кишинев, 14-17 сент. 1982 г., Киев, 1982, 158
51. Капитанов А.Б., Ладыгина В.Г., Муханкин А.И., Иванова В.Ф., Клебанов Г.И., Кудачкова С.Н. Накопление холестерина в мембранах *Acholeplasma laidlawii* в стационарной фазе роста культуры. "Биохимия", 1983, 48, № 11, 1921-1926
 52. Кирнос М.Д., Александрюшкина Н.И., Ванюшин Б.Ф. 5-Метилцитозин в пиримидиновых последовательностях ДНК растений и животных: специфичность метилирования. "Биохимия", 1981, 46, № 8, 1458-1474
 53. Комфорт А. Биология старения. М., "Мир", 1967, 398 с.
 54. Конев С.В., Махуль В.М. Межклеточные контакты. Минск, Наука и техника, 1977, 312 с.
 55. Корженевская Т.Г. Выживание и деструкция в темноте облигатно фототрофной синезеленой водоросли *Anabaena variabilis*. Автореф. дис. канд. биол. наук. М., 1975, 23 с.
 56. Корженевская Т.Г., Гусев М.В. Некоторые характеристики поведения сине-зеленой водоросли *Anabaena variabilis* в условиях темноты. "Микробиология", 1973, 42, № 6, 963-968
 57. Корженевская Т.Г., Гусев М.В. Метаболизм и деструкция сине-зеленой водоросли *Anabaena variabilis* в темноте. "Микробиология", 1976, 45, № 5, 795-799
 58. Кудряшова И.Б., Ванюшин Б.Ф. Метилирование *in vitro* ядерной ДНК из разных органов крысы: тканевые и возрастные различия акцепторной способности ДНК. "Биохимия" 1976, 41, № 6, 1106-1115
 59. Кутлахмедов Ю.А. Сходство и различие радиационного поражения и процессов старения многоклеточных систем. В сб.: Надежность и элементарные события процессов старения биологических объектов. К., "Наукова думка", 1986, 52-61
 60. Лежава Т.А., Читащвили Р.Я. Сестринские хроматидные обмены в лимфоцитах человека в глубокой старости. "Цитология", 1982, 24, № 1, 59-65
 61. Лильд И.Г. Влияние возраста и генотипа мышей на частоту сестринских хроматидных обменов в клетках костного мозга. "Генетика", 1984, 20, № 2, 260-265
 62. Лыга-Каллик М.О. Значение возраста матери и некоторых внешних факторов в этиологии врожденных пороков развития плода. "Tartu Ülikooli toimetised. Уч. зап. Тартус. ун-та", 1980, № 548, 50-51

63. Лэмб М. Биология старения. М., Мир", 1980, 206 с.
64. Макарова Г.Ф., Елифанова О.И., Логинов Б.В. Реакция культуры клеток китайского хомька на цитотоксическое действие имурана в ранней и поздней стационарной фазе роста. "Цитология", 1983, 25, № 1, 39-46
65. Механизмы биологического действия электромагнитных излучений. Тез. докл. симпозиума (Пушино, 27-31 октября 1987). Пушино, 1987, 203 с.
66. Михельсон В.М. О роли нарушений репарации ДНК в старении. В кн.: Мутагенез и репарация в системе вирус-клетка. М., "Наука", 1983, 83-95
67. Михельсон В.М. Старение клеточных культур. В сб.: Биология клетки в культуре. Л., "Наука", 1984, 235-254
68. Мерфи Дж. Модели популяций. В кн.: Математическое моделирование. М., "Мир", 1979, 109-127
69. Никитин А.И. Старение гамет и врожденная патология. "Акушерство и гинекология", 1981, № 3, 6-9
70. Никитин В.Н., Бердильцев Г.Д. Возрастные изменения структуры генетического аппарата клеток. В кн.; Биология старения. Л., "Наука", 1982, 175-194
71. Обухова Л.К., Эмануэль Н.М. Молекулярные механизмы замедления старения антиоксидантами. В сб.: Итоги науки и техники ВИНТИ. Общ. пробл. биол., 1984, 4, 44-80
72. Пожидаев Е.А. Оогенез млекопитающих (его значение для эмбрионального развития в норме и патологии). Л., "Медицина", 1967, 172 с.
73. Потапенко А.И. Радиационно индуцированное укорочение продолжительности жизни и естественное старение *Drosophila melanogaster*. Автореф. дис. канд. биол. наук. Пушино, 1984, 23 с.
74. Потапенко А.И., Акифьев А.П. ДНК как субстрат радиационно индуцированного укорочения продолжительности жизни. В сб.: Всес. симп. Молекул. и клеточ. механизмы старения, 1981. Тез. докл., Киев, 1981, 144-145
75. Пресман А.С. Электромагнитные поля и живая природа. М., "Наука", 1968, 287 с.
76. Проблемы радиационной геронтологии: (Особенности возрастных изменений облученного организма). Ред. С.Н. Александров. М., "Атомиздат", 1978, 208 с.
77. Проблемы экспериментальной и практической электромагнитобиологии. Сб. науч. трудов. Пушино, 1983, 150 с.

78. Происхождение и развитие половых клеток в онтогенезе позвоночных и некоторых групп беспозвоночных (Труды международного семинара под руководством проф. Э.Вольфа. Париж, 1962). Ред. П.Г. Светлов. Л., Медицина, 1968, 351 с.
79. Прокофьева В.В., Михельсон В.М., Горин А.И., Цейтлин П.И. Отсутствие снижения способности к удалению ДНК-белковых сшивок в культивируемых человеческих фибробластах с возрастом донора. В сб.: Первый съезд Белорусского общества геронтологов и гериатров. Тез. докл. Минск, 1983, 151-152
80. Прокофьева В.В., Плескач Н.М., Божков В.М., Демин В.Г., Ляшко В.Н., Кухаренко В.И., Гринберг К.Н., Михельсон В.М. Репарация ДНК, пролиферативная активность и биохимические особенности клеток при синдроме преждевременного старения человека (прогерия). "Цитология", 1982, 24, № 5, 592-603
81. Прокофьева В.В., Плескач Н.М., Божков В.М., Демин В.Г., Михельсон В.М. О возможных механизмах преждевременного старения при прогерии Хатчинсона-Гилфорда. В сб.: Тез. докл. Всес. симп. Молек. и клет. механизмы старения. Киев, 1981, 148-149
82. Райцина С.С. Происхождение и развитие половых клеток. В кн.: Современные проблемы сперматогенеза. М., Наука, 1982, 5-24
83. Романенко Е.Б., Обухова Л.К., Ванюшин Б.Ф. Изменение метилирования ДНК у мышей с возрастом, под влиянием гидрокортизона и антиоксиданта. "Науч. докл. высш. школы. Биол. н.", 1981, № 2, 63-70
84. Рузен-Ранге Э. Сперматогенез у животных. М. "Мир", 1980, 256 с.
85. Рупасов В.В., Кухаренко В.И., Горин А.И., Гринберг К.Н., Цейтлин П.И. Образование сшивок ДНК-белок и их возможная элиминация в культуре нормальных фибробластов человека после действия эмбихина. "Бюл. эксперим. биол. мед.", 1978, 86, № 9, 365-367
86. Смит Дж. Математические идеи в биологии. М., "Мир", 1970, 179 с.
87. Современные проблемы оогенеза. Отв. ред. Т.А. Детлаф. М., "Наука", 1977, 344 с.
88. Современные проблемы сперматогенеза. Отв. ред. Т.А. Детлаф. М., "Наука", 1982, 260 с.
89. Станек И. Эмбриология человека. Братислава, "Веда", 1977, 440 с.

90. Терехов С.М., Гепадзе Х.А., Гринберг К.Н. Индивидуальная изменчивость пролиферативного потенциала диплоидных фибробластов человека *in vitro*. "Бюл. эксперим. биол. мед.", 1984, 47, № 4, 465-466
91. Терских В.В. Состояние покоя и жизнеспособность клеточных популяций. В сб.: Надежность биологических систем. К., "Наукова думка", 1985, 135-136
92. Токин Б.П. Старение и смерть одноклеточных. В кн.: Биология старения. Л., "Наука", 1982, 61-73
93. Фролов Ю.П. Некоторые вопросы кинетики старения клеток, организмов и клеточных популяций. "Изв. АН СССР. Сер. биол.", 1983, № 6, 935-939
94. Фролькис В.В. Старение и функциональная специфика клеток. "Вестн. АМН СССР", 1984, № 3, 9-16
95. Хохлов А.Н. Исследование репарации ДНК в культивируемых клетках человека. Автореф. дис. канд. биол. наук, М., 1980, 22 с.
96. Хохлов А.Н. К вопросу о бессмертии половых клеток. В сб.: Тез и реф. докл. IV Всес. съезда геронтологов и гериатров. Кишинев, 14-17 сент. 1982 г., Киев, 1982, 409-410
97. Хохлов А.Н. Ограничение пролиферации как возможная причина накопления повреждений при старении. В сб.: Исслед. первич. механизмов биол. систем. Докл. МОИП, 1983. Общ. биол. М., 1985, 60-63
98. Хохлов А.Н. Возможные механизмы накопления с возрастом молекулярно-генетических повреждений. В сб.: Надежность и элементарные события процессов старения биологических объектов. К., "Наукова думка", 1986, 110-115
99. Хохлов А.Н. "Возраст" клеточной популяции и кинетика ее роста. Теоретические и прикладные аспекты. В сб.: Структурные особенности и функциональные свойства биологических систем. Докл. МОИП, 1985. Общая биология. М., "Наука", 1987, 59-62
100. Хохлов А.Н., Барцева О.Б. Влияние возраста матери на пролиферативную активность клеток хориона. Деп. в ВИНТИ 25 марта 1986 г. № 1990-В86, 8 с.
101. Хохлов А.Н., Бердальцев Г.Д., Виленчик М.М. Зависимость молекулярной массы ДНК клеток человека и их способности к репарации индуцированных гамма-излучением повреждений ДНК от митотического потенциала этих клеток. В сб.: Тез. докл. Всес. симп. Молекул. и клеточ. механизмы старения, 1981. Киев, 1981, 176-178

102. Хохлов А.Н., Виленчик М.М. Возрастные изменения ДНК диплоидных фибробластов человека, обнаруженные с помощью метода центрифугирования в градиенте щелочной сахарозы. Деп. в ВИНТИ 26 октября 1978 г., № 3379-78Деп, 9 с.
103. Хохлов А.Н., Головина М.Э., Чиркова Е.Ю., Налжарян Т.Д. Анализ некоторых кинетических закономерностей роста культивируемых клеток. I. Модель. "Цитология", 1985, 27, № 8, 960-965
104. Хохлов А.Н., Головина М.Э., Чиркова Е.Ю., Налжарян Т.Д. Анализ некоторых кинетических закономерностей роста культивируемых клеток. II. Действие ионизирующей радиации, алкилирующего агента, низкочастотного электромагнитного поля. "Цитология", 1985, 27, № 9, 1070-1075
105. Хохлов А.Н., Головина М.Э., Чиркова Е.Ю., Налжарян Т.Д. Анализ некоторых кинетических закономерностей роста культивируемых клеток. III. Влияние плотности посева, герпротектора-антиоксиданта, "стационарного старения". "Цитология", 1987, 29, № 3, 353-357
106. Хохлов А.Н., Кирнос М.Д., Ванюшин Б.Ф. Уровень метилирования ДНК и "стационарное старение" культивируемых клеток. "Изв. АН СССР. Сер. биол.", 1988, № 3, 476-478
107. Хохлов А.Н., Ушаков В.Л., Капитанов А.Б., Налжарян Т.Д. Влияние герпротектора хлоргидрата 2-этил-6-метил-3-оксиридина на пролиферацию клеток *Acholeplasma laidlawii*. "Докл. АН СССР", 1984, 274, № 4, 930-933
108. Хохлов А.Н., Чиркова Е.Ю., Горин А.И. Упрочнение ДНК-белкового комплекса в процессе "стационарного старения" культивируемых клеток. "Бюл. эксперим. биол. мед.", 1986, № 4, 416-418
109. Хохлов А.Н., Чиркова Е.Ю., Налжарян Т.Д. Использование лимфоцитов и культивируемых фибробластов человека для оценки действия биологически активных препаратов. В сб.: Материалы Всес. науч. конф. Использование моделей патол. состояний при поиске биол. активных препаратов, 29-30 марта 1983 г., ч. II. М., 1983, 4-6
110. Хохлов А.Н., Чиркова Е.Ю., Налжарян Т.Д. Деградация ДНК в покоящихся культивируемых клетках китайского хомячка. "Цитология", 1984, 26, № 8, 965-968

111. Хохлов А.Н., Чиркова Е.Ю., Ушаков В.Л. Использование стационарных культур для изучения механизмов клеточного старения. В сб.: Первый съезд Белорусского общества геронтологов и гериатров. Тез. докл. Минск, 1983, 188-189
112. Хохлов А.Н., Чиркова Е.Ю., Чеботарев А.Н. Изменения уровня сестринских хроматидных обменов в культивируемых клетках китайского хомячка при ограничении их пролиферации. "Цитология и генетика", 1985, 19, № 2, 90-92
113. Хохлов А.Н., Чиркова Е.Ю., Чеботарев А.Н. Изменения уровня сестринских хроматидных обменов в культивируемых клетках китайского хомячка при ограничении их пролиферации. Дополнительные исследования. "Цитология и генетика", 1987, 21, № 3, 187-190
114. Цейтлин П.И., Горин А.И., Рупасов В.В., Гринберг К.Н., Терехов С.М., Кухаренко В.И., Михельсон В.М. О некоторых молекулярных дефектах в нарушении репарации ДНК в фибробластах кожи больного прогерией. В сб.: Тез докл. Всес. симп. Молек. и клеточ. механизмы старения. Киев, 1981, 179-180
115. Цонева М., Георгиева В., Юлзари Р. Сестринские хроматидные обмены у человека в онтогенезе. "Мед.-биол. пробл." (НРБ), 1982, № 10, 105-113
116. Чеботарев А.Н. Количественные закономерности образования сестринских хроматидных обменов. Автореф. дис. докт. мед. наук. М., 1985, 46 с.
117. Чеботарев А.Н., Селезнева Т.Г., Платонова В.И. Модифицированный метод дифференциальной окраски сестринских хроматид. "Бiol. эксп. биол. мед.", 1978, 85, № 2, 242-243
118. Черкасова Т.Д., Ягунов М.Ю., Иванова В.Ф., Капитанов А.Б. Изменение содержания внутриклеточного цАМФ при старении клеток *Acholeplasma laidlawii*. В сб.: Тез и реф. докл. IV. Всес. съезда геронтологов и гериатров. Кишинев, 14-17 сент. 1982 г. Киев, 1982, с. 418.
119. Чертков И.Д. Существует ли стволовая кроветворная клетка? "Мол. биология", 1984, 18, № 3, 565-573
120. Чиркова Е.Ю. Использование стационарных культур клеток для изучения процесса старения и действия на него физических и химических факторов. Автореф. дис. канд. биол. наук. М., 1987, 22 с.

121. Чиркова Е.Ю., Головина М.Э., Налжарян Т.Л., Хохлов А.Н. Клеточно-кинетическая модель для изучения геропротекторов и геропромоторов. "Докл. АН СССР", 1984, 278, № 6, 1474-1476
122. Чиркова Е.Ю., Хохлов А.Н., Думбалзе Г.Г., Чеботарев А.Н. Модификация "стационарного старения" культивируемых клеток электромагнитным полем звуковых частот. "Изв. АН СССР. Сер. биол.", 1984, 10, № 3, 193-196
123. Шмальгаузен И.И. Проблема смерти и бессмертия. М.-Л., 1926, 92 с.
124. Юрина Т.П. Ослабление репродуктивной выживаемости клеток суспензионных культур диоскорей и табака с возрастом. В сб.: Современ. пробл. биологии. Тбилиси, ТГУ, 1980, с. 217
125. Юрина Т.П. Возрастные изменения в суспензионных культурах диоскорей и табака. В сб.: Матер. XI -й конфер. молодых ученых биофака МГУ, 1980, Деп. в ВИНТИ, № 2406-80, 62-68
126. Юрина Т.П. Изучение деструктивных процессов в суспензионных культурах клеток диоскорей и табака. Автореф. дис. канд. биол. наук, М., 1984, 23 с.
127. Юрина Т.П., Корженевская Т.Г. Изменение активности пероксидазы в суспензионных культурах диоскорей и табака в процессе их роста. В сб.: Матер. XII -й конфер. молодых ученых биофака МГУ, 1981. Деп. в ВИНТИ, № 5484-81, 137-141
128. Яковенко К.Н., Платонова В.И. Спонтанный уровень сестринских хроматидных обменов и их распределение по клеткам человека. "Генетика", 1979, 15, № 6, 1115-1123
129. Absher P.M., Absher R.G., Barnes W.D. Time-lapse cinematographic studies of cell division patterns of human diploid fibroblasts (WI-38) during their in vitro lifespan. In: Cell Impairment in Ageing and Development. Eds V.J. Cristofalo, E. Holečkova. New York-London, Plenum Press, 1975, 91-105
130. Adolphe M., Ronot X., Jaffray P., Hecquet C., Fontagne J., Lechat P. Effects of donor's age on growth kinetics of rabbit articular chondrocytes in culture. "Mech. Ageing and Dev.", 1983, 23, № 2, 191-198
131. Aging, carcinogenesis, and radiation biology. The role of nucleic acid addition reactions. Ed. K.C. Smith. New York - London, Plenum Press, 1976, 561 pp.

132. Aging in cell and tissue culture. Eds E. Holečková, V.J. Cristofalo. New York, Plenum Press, 1970
133. Alexander P. Is there a relationship between aging, the shortening of life-span by radiation and the induction of somatic mutation? In: *Perspectives in Experimental Gerontology.* Ed. N. Shock. Springfield, Illinois, Charles C. Thomas, 1966, 266-279
134. Archer J., Kaye R. Cultured skin fibroblasts and juvenile diabetes: senescence and collagen synthesis. "Diabetes", 1977, 26, №1 (suppl.), 361
135. Aufderheide K.J. Cellular aging: an overview. In: *Cellular ageing.* Ed. H.W. Sauer. Basel, Karger, 1984, 2-8
136. Bernstein C. Why are babies young? Meiosis may prevent aging of the germ line. "Perspect. Biol. Med.", 1979, 22, № 4, 539-544
137. Bernstein H. Germ line recombination may be primarily a manifestation of DNA repair processes. "J. Theor. Biol.", 1977, 69, № 2, 371-380
138. Bidder G.P. Senescence. "Brit. Med. J.", 1932, 2, 583-585
139. Bierman E.L. The effect of donor age on the in vitro lifespan of cultured human arterial smooth-muscle cells. "In vitro", 1978, 14, № 11, 951-955
140. Bierman E.L., Albers J.J., Chait A. Effect of donor age on the binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human arterial smooth muscle cells. "J. Gerontol.", 1979, 34, № 4, 483-488
141. Bjorksten J. Recent developments in protein chemistry. "Chem. Industries", 1941, 48, № 6, 746-751
142. Bjorksten J. The chemistry of duplication. "Chem. Industries.", 1942, 50, № 1, 68-72
143. Bjorksten J. The crosslinking theory of aging. "J. Amer. Geriatr. Soc.", 1968, 16, № 4, 408-427
144. Bjorksten J. Crosslinkage and the aging process. In: *Theoretical aspects of aging.* Ed. M. Rockstein. New York e.a., Acad. Press. 1974, 43-59
145. Blakemore K.J., Watson M.S., Lieber W.A., Hobbins J.C., Samuelso J.M., Breg W.R., Mahoney M.J. Prenatal diagnosis in the 1st trimester using chorionic villi. "Amer. J. Hum. Genet.", 1983, 35, № 6, A78
146. Bours J. The cristallins of the aging lens from five species. Studies by various methods of thin layer isoelectric focusing. In: *Electrofocusing and isotachopheresis.* Proc. Int. Symp., Aug. 2-4, 1976, Hamburg. Germany. Ed. B.J. Radola, D. Graesslin. Berlin - New York, De Gruyter, 1977, 303-312

147. Breathnach A.S., Wyllie L.M.—A. Ultrastructure of retinal pigment epithelium of the human fetus. "J. Ultrastruct. Res.", 1966, 16, № 5–6, 584–597
148. Briggs R., King T.J. Nuclear transplantation studies on the early gastrula (*Rana pipiens*). I. Nuclei of presumptive endoderm. "Develop. Biol.", 1960, 2, № 3, 252–270
149. Bunn C.L., Tarrant C.M. Limited lifespan in somatic cell hybrids and cybrids. "Exp. Cell Res.", 1980, 127, № 2, 385–396
150. Carrel A. Artificial activation of the growth in vitro of connective tissue. "J. Exp. Med.", 1912, 17, № 1, 14–19
151. Carrel A. Contributions to the study of the mechanism of the growth of connective tissue. "J. Exp. Med.", 1913, 18, № 3, 287–299
152. Carrel A., Burrows M.T. Cultivation of tissues in vitro and its technique. "J. Exp. Med.", 1911, 13, 387–396
153. Carrel A., Ebeling A.H. Age and multiplication of fibroblasts. "J. Exp. Med.", 1921, 34, № 6, 599–623
154. Cell Culture Committee, Permanent Section on Microbiological Standardization. Minutes of the Sixth Meeting, 1970. Available from F. T. Perkins, Medical Research Council, Hampstead Laboratories, London, England
155. Cell Culture Committee, Permanent Section on Microbiological Standardization. Minutes of the Seventh Meeting, 1971. Available from F. T. Perkins, Medical Research Council, Hampstead Laboratories, London, England
156. Cellular ageing. Ed. H.W. Sauer. Basel, Karger, 1984, 276 pp.
157. Cristofalo V.J. Animal cell cultures as a model system for the study of aging. In: Advances in Gerontological Research, V. 4. Ed. B.L. Strehler. New York–London, Acad. Press, 1972, 45–79
158. Danes B.S. Progeria: a cell culture study on aging. "J. Clin. Invest.", 1971, 50, № 9, 2000–2003
159. Daniel C.W. Aging of cells during serial propagation in vivo. In: Advances in Gerontological Research, V. 4. Ed. B.L. Strehler. New York–London, Acad. Press, 1972, 167–200
160. Danner D.B., Schneider E.L., Pitha J. Macromolecular synthesis in human diploid fibroblasts. A viral probe examining the effect of in vivo aging. "Exp. Cell Res.", 1978, 114, № 1, 63–67
161. Dell'Orco R.T. The use of arrested populations of human diploid fibroblasts for the study of senescence in vitro. In: Cell Impairment in Aging and Development. Eds V.J. Cristofalo, E. Holečková. New York–London, Plenum Press, 1975, 41–49

162. Dell'Orco R.T., Whittle W.L. Evidence for an increased level of DNA damage in high doubling level human diploid cells in culture. "Mech. Ageing and Dev.", 1981, 15, № 2, 141-152
163. Edwards R.G. First stages of the development of the human ovum. In: Malformations congénitales des mammifères. Sous la direction de H. Tuchmann-Duplessis. Paris, Masson Publ., 1971
164. Edwards R.G. Conception in the human female. London - New York, Acad. Press, 1980, 1087 pp.
165. Elmore E., Swift M. Growth of cultured cells from patients with ataxia-telangiectasia. "J. Cell. Physiol.", 1976, 89, № 3, 429-431
166. Erickson J.D., Bjerkedal T. Down syndrome associated with father's age in Norway. "J. Med. Genet.", 1981, 18, № 1, 22-28
167. Fabris N., Giunta S., Muzzioli M. Decline of thymus-cell potential in diabetic and aged men. "J. Gerontol.", 1983, 38, № 5, 549-555
168. Fairweather D.S., Fox M., Margison G.P. The in vitro lifespan of MRC-5 cells is shortened by 5-azacytidine-induced demethylation. "Exp. Cell Res.", 1987, 168, № 1, 153-159
169. Feeney L. Lipofuscin and melanin of human retinal pigment epithelium. Fluorescence, enzyme cytochemical, and ultrastructural studies. "Invest. Ophthal. Vis. Sci.", 1978, 17, № 7, 583-600
170. Feeney L., Grieshaber J.A., Hogan M.J. Studies on human ocular pigment. In: The structure of the eye. II Symposium. Ed. J. Rohen. Stuttgart, Schattauer, 1965, 535-548
171. Fine B.S., Kwapien R.P. Pigment epithelial windows and drusen: an animal model. "Invest. Ophthal. Vis. Sci.", 1978, 17, № 11, 1059-1068
172. Fischbach G.D., Nelson R.G. Cell culture in neurobiology. In: The nervous system. (Handbook of physiology, a critical comprehensive presentation of physiological knowledge and concepts, sect. 1). Sect. eds J.M. Brookhart, V.B. Mountcastle. V. 1. Cellular biology of neurons, Part 2. Vol. ed. E.R. Kandel. Bethesda, Md., Amer. Physiol. Soc., 1977, 719-774
173. Flodin N.W. The senescence of postmitotic mammalian cells: a cell-clock hypothesis. "Mech. Ageing and Dev.", 1984, 27, №1, 15-27
174. Flood M.T., Gouras P. The organization of human retinal epithelium in vitro. "Vision Res.", 1981, 21, № 1, 119-126

175. Flood M.T., Haley J.E., Gouras P. Cellular aging of human retinal epithelium in vivo and in vitro. In: Cellular ageing. Ed. H.W. Sauer. Basel, Karger, 1984, 80-93
176. Friedman E., Ts'o M.O.M. The retinal pigment epithelium. II. Histologic changes associated with age. "Arch. Ophthal.", 1968, 79, № 3, 315-320
177. Fujiwara Y., Higashikawa T., Tatsumi M. A retarded rate of DNA replication and normal level of DNA repair in Werner's syndrome fibroblasts in culture. "J. Cell. Physiol.", 1977, 92, № 3, 365-374
178. Fukuchi K., Tanaka K., Nakura J., Kumakara Y., Uchida T., Okada Y. Elevated spontaneous mutation rate in SV 40-transformed Werner syndrome fibroblast cell lines. "Somat. Cell. Mol. Genet.", 1985, 11, № 4, 303-308
179. Gazzola G.C., Bussolati O., Longo N., Dall'Asta V., Franchi-Gazzola R., Guidotti G.G. Effect of in vitro ageing on the transport of neutral amino acids in human fibroblasts. In: Cellular ageing. Ed. H.W. Sauer. Basel, Karger, 1984, 234-244
180. Gelfant S., Smith J.G., Jr. Ageing: noncycling cells an explanation". Science", 1972, 178, № 4059, 357-361
181. Gensler H.L., Bernstein H. DNA damage as the primary cause of aging. "Quart. Rev. Biol.", 1981, 56, № 3, 279-303
182. Gilchrest B.A. Relationship between actinic damage and chronological aging in keratinocyte cultures of human skin. "J. Invest. Dermatol.", 1979, 72, № 5, 219-223
183. Gilchrest B.A. Prior chronic sun exposure decreases the lifespan of human skin fibroblasts in vitro. "J. Gerontol.", 1980, 35, № 4, 537-541.
184. Gilchrest B.A. In vitro assessment of keratinocyte aging. "J. Invest. Dermatol.", 1983, 81, № 1 (Suppl.), 184-189
185. Goh K. Sister-chromatid-exchange in the aging population. "J. Med.", 1981, 12, № 2-3, 195-198
186. Goldstein S. Lifespan of cultured cells in progeria. "Lancet", 1969, 1, 424
187. Goldstein S. The role of DNA repair in aging of cultured fibroblasts from xeroderma pigmentosum and normals. "Proc. Soc. Exp. Biol. Med.", 1971, 137, 730-734
188. Goldstein S. Tee biology of aging. "New Engl. J. Med.", 1971, 285, № 20, 1120-1129
189. Goldstein S. Studies on age-related diseases in cultured skin fibroblasts. "J. Invest. Dermatol.", 1979, 73, № 1, 19-23
190. Goldstein S., Moerman E. Heat-labile enzymes in skin fibroblasts from subjects with progeria. "New Engl. J. Med.", 1975, 292, № 25, 1305-1309

191. Goldstein S., Moerman E.J. Defective proteins in normal and abnormal human fibroblasts during aging in vitro. "Interdisciplinary Topics Gerontol.", 1976, 10, 24-43
192. Goldstein S., Moerman E.J., Soeldner J.S., Gleason R.E., Barnett D.M. Chronologic and physiologic age affect replicative life-span of fibroblasts from diabetic, prediabetic, and normal donors. "Science", 1978, 199, № 4330, 781-782
193. Goldstein S., Moerman E.J., Soeldner J.S., Gleason R.E., Barnett D.M. Diabetes mellitus and genetic pre-diabetes: decreased replicative capacity of cultured fibroblasts. "J. Clin. Invest.", 1979, 63, № 3, 358-370
194. Goldstein S., Niewiarowski S., Singal D.P. Pathological implications of cell aging in vitro. "Fed. Proc.", 1975, 34, № 1, 56-63
195. Goldstein S., Shmookler Reis R.J. Genetic modifications during cellular aging. "Mol. and Cell. Biochem.", 1984, 64, № 1, 15-30
196. Green H. Cyclic AMP in relation to proliferation of the epidermal cell: a new view. "Cell", 1978, 15, № 3, 801-811
197. Green H. The keratinocyte as differentiated cell type. "Harvey Lect.", 1980, 74, 101-139
198. Green H., Thomas J. Pattern formation by cultured human epidermal cells: development of curved ridges resembling dermatoglyphs. "Science", 1978, 200, № 4348, 1385-1388
199. Grünwald J., Mey J., Schönleben W., Hauss J., Hauss W. H. Cultivated human arterial smooth muscle cells. The effect of donor age, blood pressure, diabetes and smoking on in vitro cell growth. "Path. Biol.", 1983, 31, № 10, 819-823
200. Harley C.B., Goldstein S., Posner B.L., Guyda H. Decreased sensitivity of old and progeric human fibroblasts to a preparation of factors with insulinlike activity. "J. Clin. Invest.", 1981, 68, № 4, 988-994
201. Hart R.W., Setlow R.B. Correlation between deoxyribonucleic acid excision-repair and life span in a number of mammalian species. "Proc. Natl. Acad. Sci. USA", 1974, 71, № 6, 2169-2173
202. Hay R.J. Cell and tissue culture in aging research. In: Advances in Gerontological Research, V. 2. Ed. B.L. Strehler. New York-London, Acad. Press., 1967, 121-158
203. Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. "Exp. Cell Res.", 1965, 37, № 3, 614-636
204. Hayflick L. Senescence and cultured cells. In: Perspectives in Experimental Gerontology. Ed. N. Shock. Springfield, Illinois, Charles C. Thomas, 1966, 195-211

205. Hayflick L. Aging under glass. "Exp. Gerontol.", 1970, 5, № 4, 291-303
206. Hayflick L. Cell senescence and cell differentiation in vitro. In: Aging and Development, Academy of Science and Literature, V. 4. Eds H. Eredt and J.W. Rohen. Stuttgart-New York, F.K. Schattauer Verlag, 1972, 1-15
207. Hayflick L. Current theories of biological aging. "Fed. Proc.", 1975, 34, № 1, 9-13
208. Hayflick L. The cellular basis for biological aging. In: Handbook of the Biology of Aging. Eds C. Finch, L. Hayflick. New York, Van Nostrand Reinhold, 1977, 159-186
209. Hayflick L. Cell biology of aging. "Fed. Proc.", 1979, 38, № 5, 1847-1850
210. Hauflick L. Progress in cyto gerontology. "Mech. Ageing and Dev.", 1979, 9, № 5-6, 393-408
211. Hayflick L. Cell aging. In: Annual Review of Gerontology and Geriatrics. V. 1. Ed. C. Fisdorfer. New York e.a., Springer Publishing Co., 1980, 26-67
212. Hayflick L. Origins of aging. In: Environ. Physiol.: Aging, Heat and Altitude. Proc. Life, and Altitude Conf., Las Vegas, Nev., May 15-17, 1979. New York e.a., 1980, 399-414
213. Hayflick L. Recent advances in the cell, biology of aging. "Mech. Ageing and Dev.", 1980, 14, № 1-2, 59-79
214. Hayflick L. The cell biology of human aging. "Sci. Am.", 1980, 242, № 1, 58-65
215. Hayflick L. Biological aspects of aging. In: Biol. and Soc. Aspects Mortal. and Length Life. Proc. Semin., Fiuggi, May 13-16, 1980. Liege, 1982, 223-258
216. Hayflick L. Intracellular determinants of cell aging. "Mech. Ageing and Dev.", 1984, 28, № 2, 177-185
217. Hayflick L., Moorhead P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains. "Exp. Cell Res.", 1961, 25, № 3, 585-621
218. Hedner K., Högstedt E., Kolnig A.M., Mark-Vendel E., Strömbeck B., Mitelman F. Sister chromatid exchanges and structural chromosome aberrations in relation to age and sex. "Hum. Genet.", 1982, 62, № 4, 305-309
219. Henderson S.A., Edwards R.G. Chiasma frequency and maternal age in mammals. "Nature", 218, № 5136, 22-28
220. Higashikawa T., Fujiwara Y. Normal level of unsheduled DNA synthesis in Werner's syndrome fibroblasts in culture. "Exp. Cell Res.", 1978, 113, № 2, 438-442
221. Hoar D.I. Phenotypic manifestation of ataxia-telangiectasia. "Lancet", 1975, 2, № 7943, 1048

222. Hoehn H., Bryant E.M., Martin G.M. The replicative life spans of euploid hybrids derived from short-lived and long-lived human skin fibroblast cultures. "Cytogenet. Cell Genet.", 1978, 21, № 5, 282-295
223. Holliday R. The unsolved problem of cellular ageing. In: Cellular ageing. Ed. H.W. Sauer. Basel, Karger, 1984, 60-77
224. Holliday R. The significance of DNA methylation in cellular aging. In: Mol. Biol. Aging. Proc. Symp., Upton, N.Y., Sept. 30 - Oct. 3, 1984. Eds A.D. Woodhead, A.D. Blackett, A. Hollander. New York-London, Plenum Press, 1985, 269-283
225. Holliday R. Strong effects of 5-azacytidine on the in vitro life-span of human diploid fibroblasts. "Exp. Cell Res.", 1986, 166, № 2, 543-552
226. Holliday R., Huschtscha L.I., Kirkwood T.B.L. Cellular aging: further evidence for commitment theory. "Science", 1981, 213, № 4515, 1505-1508
227. Holliday R., Huschtscha L.I., Tarrant G.M., Kirkwood T.B.L. Testing the commitment theory of cellular aging. "Science", 1977, 198, № 4312, 366-372
228. Hook E.B., Cross P.K., Lamson S.H., Regal R.R., Baird P.A., Uh S.H. Paternal age and Down syndrome in British Columbia. "Amer. J. Hum. Genet.", 1981, 33, № 1, 123-128
229. Howard B.V., Fields R.M., Mott D.M., Savage P.J., Nagulesparan M., Fennet P.H. Diabetes and cell growth: lack of differences in growth characteristics of fibroblasts from diabetic and nondiabetic Pima Indians. "Diabetes", 1980, 29, № 2, 119-124
230. Icard C., Beaupain R. Spontaneous structural changes in DNA during fibroblast aging and the establishment process in vitro. "Mech. Ageing and Dev.", 1980, 14, № 1-2, 81-87
231. Jennings H.S. Paramecium bursaria: life history. I. Immaturity, maturity and age. "Biol. Bull.", 1944, 86, № 3, 131-145
232. Kaback M.M., Bernstein L.H. Biologic studies of trisomic cells growing in vitro. "Ann. N.Y. Acad. Med.", 1970, 171, № 2, 526-536
233. Karatza C., Shall S. The reproductive potential of normal mouse embryo fibroblasts during culture in vitro. "J. Cell Sci.", 1984, 66, Mar, 401-409
234. Karatza C., Stein W.D., Shall S. Kinetics of in vitro ageing of mouse embryo fibroblasts. "J. Cell Sci.", 1984, 65, Jan, 163-175
235. Karp L.E. Older fathers and genetic mutations. "Amer. J. Med. Genet.", 1980, 7, № 4, 405-406

236. Kirkwood T.E.L. Towards a unified theory of cellular ageing. In: Cellular ageing. Ed. H.W. Sauer. Basel, Karger, 1984, 9-20
237. Kirkwood T.E.L., Cremer T. Cytoogerontology since 1881: a reappraisal of August Weismann and a review of modern progress. "Hum. Genet.", 1982, 60, № 2, 101-121
238. Kirkwood T.E.L., Holliday R. Commitment to senescence: a model for the finite and infinite growth of diploid and transformed human fibroblasts in culture. "J. Theor. Biol.", 1975, 53, № 2, 481-496
239. Kirkwood T.E.L., Holliday R. The evolution of ageing and longevity. "Proc. Roy. Soc. London", 1979, B205, № 1161, 531-546
240. Kirkwood T.E.L., Holliday R. Selection for optimal accuracy and the evolution of ageing. In: Accuracy in molecular processes: its control and relevance to living systems. Eds T.P.L. Kirkwood, R.F. Rosenberger, D.J. Galas. New York, Chapman and Hall, 1986, 363-379
241. Kolb H., Gouras P. Electron microscopic observations of human retinitis pigmentosa, dominantly inherited. "Invest. Ophthalmol.", 1974, 13, № 7, 487-498
242. Kondo H., Kasuga H., Noumura T. Effects of various steroids on in vitro lifespan and cell growth of human fetal lung fibroblasts (WI-38). "Mech. Ageing and Dev.", 1983, 21, № 3-4, 335-344
243. Kram D., Schneider E.L., Tice R.R., Gianas P. Aging and sister chromatid exchange. I. The effect of aging on mitomycin-C induced sister chromatid exchange frequencies in mouse and rat bone marrow cells in vivo. "Exp. Cell Res.", 1978, 114, № 2, 471-475
244. Krawczyński M. Wiek rodziców i kolejność urodzenia dzieci z zespołem Turnera i Klinefeltera. "Pediat. Pol.", 1980, 55, № 10, 1119-1125
245. Krooth R.S., Shaw M.W., Campbell E.K. A persistent strain of diploid fibroblasts. "J. Nat. Cancer Inst.", 1964, 32, № 5, 1031-1040
246. Latt S.A. Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. "Proc. Natl Acad. Sci. USA", 1973, 70, № 12, 3395-3399
247. Lavker R.M. Structural alterations in exposed and unexposed aged skin. "J. Invest. Dermatol.", 1979, 73, № 1, 59-66
248. Le Guilly Y., Simon M., Lenoir P., Bourel M. Long-term culture of human adult liver cells: morphological changes related to in vitro senescence and effect of donor's age on growth potential. "Gerontologia", 1973, 19, № 5-6, 303-313

249. Lindahl T., Nyberg E. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. "Biochemistry", 1972, 11, № 19, 3610-3618
250. Lipsich L.A., Lucas J.J., Kates J.R. Cell cycle dependence of the reactivation of chick erythrocyte nuclei after transplantation into mouse L 929 cell cytoplasts. "J. Cell. Physiol.", 1978, 97, № 2, 199-207
251. Littlefield J.V. Attempted hybridizations with senescent human fibroblasts. "J. Cell. Physiol.", 1973, 82, № 1, 129-132
252. Macieira-Coelho A. Action of cortisone on human fibroblasts in vitro. "Experientia", 1966, 22, № 6, 390-391
253. Macieira-Coelho A. Kinetics of the proliferation of human fibroblasts during their lifespan in vitro. "Mech. Ageing and Dev.", 1977, 6, № 5, 341-343
254. Macieira-Coelho A. Tissue culture in aging research: present status and prospects. "Experientia", 1981, 37, № 10, 1050-1053
255. Macieira-Coelho A., Loria E., Perumen L. Relationship between cell kinetic changes and metabolic events during cell senescence in vitro. In: Cell Impairment in Ageing and Development. Eds V.J. Cristofalo, E. Holečková. New York-London, Plenum Press, 1975, 51-65
256. Martin G.M. Syndromes of accelerated aging. "Natl. Cancer Inst. Monogr.", 1982, 60, 241-247
257. Martin G.M., Gartler S., Epstein J., Motulsky A.G. Diminished lifespan of cultured cells in Werner's syndrome. "Fed. Proc.", 1965, 24, № 2 (part 1), 678
258. Martin G.M., Sprague C.A., Epstein C.J. Replicative life-span of cultivated human cells. Effects of donor's age, tissue, and genotype. "Lab. Invest.", 1970, 23, № 1, 86-92
259. Matsumura T., Pfendt E.A., Hayflick L. DNA synthesis in the human diploid cell strain WI-38 during in vitro aging: an autoradiography study. "J. Gerontol.", 1979, 34, № 3, 323-327
260. Matsumura T., Zerrudo Z., Hayflick L. Senescent human diploid cells in culture: survival, DNA synthesis and morphology. "J. Gerontol.", 1979, 34, № 3, 328-334
261. Mauro F., Falpo E., Briganti G., Elli R., Zupi G. Effects of antineoplastic drugs on plateau-phase cultures of mammalian cells. II. Bleomycin and hydroxyurea. "J. Nat. Cancer Inst.", 1974, 52, № 3, 715-722
262. McCarthy K.D., de Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. "J. Cell Biol.", 1980, 85, № 3, 890-902

263. Medvedev Zh.A. On the immortality of the germ line: genetic and biochemical mechanisms. A review. "Mech. Ageing and Dev.", 1981, 17, № 4, 331-359
264. Mikhelson V.M., Prokofieva V.V., Zeitlin P.I., Gorin A.I. The possible role of DNA-protein crosslinks in natural and pathological senescence. "Studia biophysica", 1984, 101, 99-100
265. Minot C.S. Senescence and rejuvenation. "J. Physiol.", 1891, 12, 97; 153
266. Minot C.S. The problem of age, growth, and death; a study on cytomorphosis, based on the lectures at the Lowell Institute, March 1907. New York - London, G.P. Putnam's Sons. 1908, 302 pp.
267. Minot C.S. Modern problems of biology. Phila, P. Blakiston's Son & Co., 1913
268. Moore G.E., McLimans W.F. Life span of cultured normal cell. Concepts derived from studies of human lymphocytes. "J. Theor. Biol.", 1968, 20, № 2, 217-226
269. Moorhead P.S., Nicholls W.W., Perkins F.T., Hayflick L. Standards of karyology for human diploid cells. "J. Biol. Stand.", 1974, 2, № 2, 95-101
270. Mueller S.N., Rosen E.M., Levine E.M. Cellular senescence in a cloned strain of bovine fetal aortic endothelial cells. "Science", 1980, 207, № 4433, 889-891
271. Muggleton A., Danielli J.F. Inheritance of the "life-spanning" phenomenon in *Amoeba proteus*. "Exp. Cell Res.", 1968, 49, № 1, 116-120
272. Muggleton-Harris A.L. Reassembly of cellular components for the study of aging and finite life span. In: International Review of Cytology, V.9., suppl. New York e.a., Acad. Press, 1979, 279-301
273. Muggleton-Harris A.L., De Simone D.W. Replicative potentials of various fusion products between WI-38 and SV 40 transformed WI-38 cells and their components. "Somat. Cell Genet.", 1980, 6, № 6, 689-698
274. Muggleton-Harris A.L., Hayflick L. Cellular aging studied by the reconstruction of replicating cells from nuclei and cytoplasm isolated from normal human diploid cells. "Exp. Cell Res.", 1976, 103, № 2, 321-330
275. Muggleton-Harris A.L., Palumbo M. Nucleoplasmic interactions in experimental binucleates formed from normal and transformed components. "Somat. Cell Genet.", 1979, 5, № 3, 397-407

276. Nakanishi Y., Dein R.A., Schneider F.L. Aging and sister chromatid exchange. V. The effect of post-embryonic development on mutagen-induced sister chromatid exchanges in mouse and rat bone marrow cells. "Cytogenet. Cell Genet.", 1980, 27, № 2-3, 82-87
277. Nakao Y., Kishihara M., Yoshimi H., Inoue Y., Tanaka K., Sakamoto N., Matsukura S., Imura H., Ichihashi M., Fujiwara Y. Werner's syndrome. In vivo and in vitro characteristics as a model of aging. "Amer. J. Med.", 1978, 65, № 6, 919-932
278. Nanney D.L. Aging and long term temporal regulation in ciliated protozoa. A critical review. "Mech. Ageing and Dev.", 1974, 3, № 2, 81-105
279. Nette E.G., Sit H.L., King D.W. Reactivation of DNA synthesis in aging diploid human skin fibroblasts by fusion with mouse L karyoplasts and whole L cells. "Mech. Ageing and Dev.", 1982, 18, № 1, 75-87
280. Nienhaus A.J., De Jong B., Ten Kate L.P. Fibroblast culture in Werner's syndrome. "Hum. Genet.", 1971, 13, № 3, 244-246
281. Norwood T.H., Hoehn N., Salk D., Martin G.M. Cellular aging in Werner's syndrome. A unique phenotype. "J. Invest. Dermatol.", 1979, 73, № 1, 92-96
282. Norwood T.H., Pendergrass W.R., Martin G.M. Reinitiation of DNA synthesis in senescent human fibroblasts upon fusion with cells of unlimited growth potential. "J. Cell Biol.", 1975, 64, № 3, 551-556
283. Norwood T.H., Pendergrass W.R., Sprague C.A., Martin G.M. Dominance of the senescent phenotype in heterokaryons between replicative and postreplicative human fibroblast-like cells. "Proc. Natl. Acad. Sci. USA", 1974, 71, № 6, 2231-2235
284. Nussbaum M. Zur Differenzierung des Geschlechts im Tierreich. "Arch. Mikr. Anat.", 1880, 18, 1-121
285. Ohashi M., Aizawa S., Ooka H., Ohsawa T., Kaji K., Kondo H., Kobayashi T., Noumura T., Mitsui M., Murota S., Yamamoto K., Ito H., Shimada H., Utakoji T. A new human diploid cell strain, TIG-1, for the research on cellular aging. "Exp. Gerontol.", 1980, 15, № 2, 121-133
286. Orgel L.E. The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing. "Proc. Natl. Acad. Sci. USA", 1963, 49, № 4, 517-521
287. Pendergrass W.R., Saulewicz A.C., Salk D., Norwood T.H. Induction of DNA polymerase alpha in senescent cultures of normal and Werner's syndrome cultured skin fibroblasts. "J. Cell. Physiol.", 1985, 124, № 2, 331-336.

288. Perry M.M., Tassin J., Courtois Y. A comparison of human lens epithelial cells in situ and in vitro in relation to aging: an ultrastructural study. "Exp. Eye Res.", 1979, 28, № 3, 327-341
289. Piasecki E. Wiek rodziców a trwanie życia potomstwa. "Mater. i pr. antropol. Zakł. antropol. PAN", 1981, № 101, 133-167
290. Ponten J., Macintyre E.H. Long term culture of normal and neoplastic human glia. "Acta Pathol. Microbiol. Scand.", 1968, 74, № 4, 465-486
291. Postel-Vinay O. Papas: arrêtez à 40 ans. "Sci. et vie", 1985, № 816, 20-25, 176
292. Rabinovitch P.S., Norwood T.H. Comparison of cellular senescence and the serum deprived state in heterokaryon studies. "J. Cell. Biol.", 1979, 83, № 2 (part 2), 6A
293. Rabinovitch P.S., Norwood T.H. Comparative heterokaryon study of cellular senescence and the serum deprived state. "Exp. Cell Res.", 1980, 130, № 1, 101-110
294. Rebhorn H., Pfeiffenberger H. In vitro life span and "unsheduled DNA synthesis" in subconfluent cultures and clones of trisomic and normal diploid fibroblasts. "Mech. Ageing and Dev.", 1982, 18, № 3, 201-208
295. Reff M., Schneider E.L. Cell culture aging. "Mol. and Cell. Biochem.", 1981, 36, № 3, 169-176
296. Rheinwald J.G., Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. "Cell.", 1975, 6, № 3, 331-344
297. Rheinwald J.G., Green H. Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. "Nature", 1977, 265, № 5593, 421-424
298. Rink H. Growth potential, repair capacity and protein synthesis in lens epithelial cells during aging in vitro. In: Cellular ageing. Ed. H.W. Sauer. Basel, Karger, 1984, 94-107
299. Rink H., Vornhagen R., Koch H.-R. Rat lens epithelial cells in vitro. I. Observations on aging, differentiation and culture alterations. "In vitro", 1980, 16, № 1, 15-19
300. Röhme D. Evidence for a relationship between longevity of mammalian species and the life spans of normal fibroblasts in vitro and erythrocytes in vivo. "Proc. Natl. Acad. Sci. USA", 1981, 78, № 8, 5009-5013
301. Rosati G., Verni F., Nobili R., Angeli M. Starvation in *Euplotes crassus* (Ciliata, Hypotrichida): Ultrastructure modifications and effects on reproduction. "Acta Protozool.", 1981, 20, № 3, 225-232

302. Rosen R. Cells and senescence. In: International Review of Cytology, V. 54. New York e.a., Acad. Press, 1978, 161-191
303. Rosenbloom A.L., Rosenbloom E.K. Do cultured fibroblasts (CFB) from youngsters with diabetes mellitus (DM) demonstrate precocious aging (PA)? "Pediatr. Res.", 1977, 11, № 4, 521
304. Ross R., Glomset J.A. The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). "N. Engl. J. Med.", 1976, 295, № 7, 369-377
305. Ross R., Glomset J.A. The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts). "N. Engl. J. Med.", 1976, 295, № 8, 420-425
306. Rowe D.W., Starman B.J., Fujimoto W.Y., Williams R.H. Abnormalities in proliferation and protein synthesis in skin fibroblast cultures from patients with diabetes mellitus. "Diabetes", 1977, 26, № 4, 284-290
307. Salk D. Werner syndrome: A review of recent research with an analysis of connective tissue metabolism, growth control of cultured cells, and chromosome aberrations. "Hum. Genet.", 1982, 62, № 1, 1-15
308. Salk D., Bryant E., Au K., Hoehn H., Martin G.M. Systematic growth studies, cocultivation, and cell hybridization studies of Werner syndrome cultured skin fibroblasts. "Hum. Genet.", 1981, 58, № 3, 310-316
309. Schmidt M.A., Sanger W.G. Sister chromatid exchange in aged human lymphocytes. A brief note. "Mech. Ageing and Dev.", 1981, 16, № 1, 67-70
310. Schneider E.L. Cell replication and aging - in vitro and in vivo studies. "Fed. Proc.", 1979, 38, № 5, 1857-1861
311. Schneider E.L., Chaillet J.R., Tice R.R. In vivo BUdR labeling of mammalian chromosomes. "Exp. Cell Res.", 1976, 100, № 2, 396-399
312. Schneider E.L., Epstein C.J. Replication rate and lifespan of cultured fibroblasts in Down's syndrome. "Proc. Soc. Exp. Biol. Med.", 1972, 141, № 3, 1092-1094
313. Schneider E.L., Gilman B. Sister chromatid exchanges and aging. III. The effect of donor age on mutagen-induced sister chromatid exchange in human diploid fibroblasts. "Hum. Genet.", 1979, 46, № 1, 57-63
314. Schneider E.L., Mitsui I. The relationship between in vitro cellular ageing and in vivo human age. "Proc. Natl Acad. Sci. USA.", 1976, 73, № 10, 3584-3588
315. Schneider E.L., Monticone R.E. Aging and sister chromatid exchange. II. The effect of the in vitro passage level of human

- fetal lung fibroblasts on baseline and mutagen-induced sister chromatid exchange frequencies. "Exp. Cell Res.", 1978, 115, № 2, 269-276
316. Schneider E.L., Smith J.R. The relationship of in vitro studies to in vivo human aging. In: International Review of Cytology, V. 69. New York e.a., Acad. Press, 1981, 261-270
317. Segal D.J., McCoy E.E. Premature aging in Down's syndrome skin fibroblasts. "Clin. Res.", 1972, 20, № 5, 931
318. Segal D.J., McCoy E.E. Altered growth rate and protein content of Down's syndrome skin fibroblasts. "Clin. Res.", 1973, 21, № 2, 297
319. Segal D.J., McCoy E.E. Studies on Down's syndrome in tissue culture. I. Growth rates and protein contents of fibroblast cultures. "J. Cell. Physiol.", 1974, 83, № 1, 85-90
320. Shall S., Stein W.D. A mortalization theory for the control of cell proliferation and for the origin of immortal cell lines. "J. Theor. Biol.", 1979, 76, № 2, 219-231
321. Shiloh Y., Tabor E., Becker Y. Colony-forming ability of ataxia-telangiectasia skin fibroblasts is an indicator of their early senescence and increased demand for growth factors. "Exp. Cell. Res.", 1982, 140, № 1, 191-200
322. Simoni G., Brambati B., Danesino C., Rosella F., Terzoli G.L., Ferrari M., Fraccaro M. Efficient direct chromosome analyses and enzyme determinations from chorionic villi samples in the 1st trimester of pregnancy. "Hum. Genet.", 1983, 63, № 4, 349-357
323. Smith J.R., Pereira-Smith O.M., Schneider E.L. Colony size distributions as a measure of in vivo and in vitro aging. "Proc. Natl Acad. Sci. USA", 1978, 75, № 3, 1353-1356
324. Smith-Sonneborn J. Genetics and aging in Protozoa. In: International Review of Cytology, V. 73. New York e.a., Acad. Press, 1981, 319-354
325. Smith-Sonneborn J. Programmed increased longevity induced by weak pulsating current in Paramecium. "Bioelectrochem. Bioenerg.", 1983, 11, № 4-6, 373-382
326. Smith-Sonneborn J. Aging in Protozoa. In: Review of biological research in aging, V. 1. Ed. M. Rothstein. New York, Alan R. Liss, Inc., 1983, 25-28
327. Smith-Sonneborn J. Protozoan aging. In: Invertebrate models in aging research. Eds D.H. Mitchell, T.E. Johnson. Boca Raton, Fla., CRC Press, 1984, 1-14
328. Smith-Sonneborn J. Aging in Protozoa. In: Review of Biological Research in Aging, V. 2. Ed. M. Rothstein. New York, Alan R. Liss, Inc., 1985, 13-27

329. Smith-Sonneborn J. Protozoa. In: Non-mammalian models for research on aging (Interdisciplinary Topics in Gerontology, V. 21). Ed. F.A. Lints. Basel-New York, Karger, 1985, 201-230
330. Smith-Sonneborn J. Aging in unicellular organisms. In: Handbook of the biology of aging. Eds C.E. Finch, E.L. Schneider. New York, Van Nostrand Reinhold, 1985
331. Smith-Sonneborn J. Genome interactions in the pathology of aging Protozoa. In: CRC handbook of cell biology of aging. Ed. V.J. Cristofalo. Boca Raton, Fla., CRC Press, 1985, 453-479
332. Solomon E., Bobrow M. Sister chromatid exchanges - a sensitive assay of agents damaging human chromosomes. "Mutat. Res.", 1975, 30, № 2, 273-278
333. Sonneborn T.M. The relation of autogamy to senescence and rejuvenescence in *Paramecium aurelia*. "J. Protozool.", 1954, 1, № 1, 38-53
334. Sonneborn T.M. Breeding systems, reproductive methods, and species problems in Protozoa. In: The species problem. A symposium presented at the Atlanta meeting of the Amer. assoc. for the advancement of science, Dec. 28-29, 1955. Ed. E. Mayr. Washington, 1957, 155
335. Stanbridge E.J. Suppression of malignancy in human cells. "Nature", 1976, 260, № 5546, 17-20
336. Stein G., Yanishevsky R. Positive and negative control of mammalian cell proliferation: evidence from cell fusion studies. "J. Supramol. Struct.", 1980, 4 (suppl.), 152
337. Stein G.H., Yanishevsky R.M. Entry into S phase is inhibited in two immortal cell lines fused to senescent human diploid cells. "Exp. Cell Res.", 1979, 120, № 1, 155-165
338. Strehler B.L. Aging research: current and future. "J. Invest. Dermatol.", 1979, 73, № 1, 2-7
339. Sun T.T., Green H. Differentiation of the epidermal keratinocyte in cell culture: formation of the cornified envelope. "Cell", 1976, 9, № 4, 511-521
340. Swim H.E., Parker R.F. Culture characteristics of human fibroblasts propagated serially. "Amer. J. Hyg.", 1957, 66, № 1, 235-243
341. Takagi Y., Yoshida M. Clonal death coupled with the number of fissions in *Paramecium caudatum*. "J. Cell Sci.", 1980, 41, Feb, 177-191
342. Tassin J., Malaise E., Courtois Y. Human lens cells have in vitro proliferative capacity inversely proportional to the donor age. "Exp. Cell Res.", 1979, 123, № 2, 388-392

343. Thompson K.V.A., Holliday R. Genetic effects on the longevity of cultured human fibroblasts. I. Werner's syndrome. "Gerontology, 1983, 29, № 2, 73-82
344. Thompson K.V.A., Holliday R. Genetic effects on the longevity of cultured human fibroblasts. II. DNA repair deficient syndromes. "Gerontology", 1983, 29, № 2, 83-88
345. Thompson K.V.A., Holliday R. Genetic effects on the longevity of cultured human fibroblasts. IV. Enhanced growth potential of cystic fibrosis cells. "Gerontology", 1983, 29, № 2, 97-101
346. Tice R.R., Schneider E.L., Kram D., Thome P. Cytokinetic analysis of the impaired proliferative response of peripheral lymphocytes from aged humans to phytohemagglutinin. "J. Exp. Med.", 1979, 149, № 5, 1029-1041
347. Topics in the Biology of Aging. Ed. P.L. Krohn. New York, Interscience Publishers, John Wiley, 1966
348. Is'o M.O.M., Friedman E. The retinal pigment epithelium. I. Comparative histology. "Arch. Ophtal.", 1967, 78, № 5, 641-649
349. Is'o M.O.M., Friedman E. The retinal pigment epithelium. III. Growth and development. "Arch. Ophtal.", 1968, 80, № 2, 214-216
350. Turner D.R., Morley A.A., Seshadri R.S. Age-related variations in human lymphocytes DNA. "Mech. Ageing and Dev.", 1981, 17, № 3, 305-309
351. Twentyman P.R., Bleehen N.M. 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", 1975, 31, № 1, 68-74
352. Van Gansen P. Le vieillissement cellulaire en culture et dans les animaux. "Rev. Univ. Bruxelles", 1983, № 1-2, 243-261
353. Vilenchik M.M., Khokhlov A.N., Grinberg K.N. Study of spontaneous DNA lesions and DNA repair in human diploid fibroblasts aged in vitro and in vivo. "Studia biophysica", 1981, 85, № 1, 53-54
354. Vracko R., Benditt E.P. Restricted replicative life-span of diabetic fibroblasts in vitro: its relation to microangiopathy. "Fed. Proc.", 1975, 34, № 1, 68-70
355. Vracko R., McFarland B.H. Lifespans of diabetic and non-diabetic fibroblasts in vitro. Results of replicate determinations. "Exp. Cell Res.", 1980, № 2, 345-350
356. Wagenbichler P. Zur Ätiologie des Mongolismus. "Naturwissenschaften", 1981, 68, № 2, 76-81

357. Walford R.L., Jawaid S.O., Naeim F. Evidence for in vitro senescence of T-lymphocytes cultured from normal human peripheral blood. "Age", 1981, 4, № 3, 67-70
358. Walton J. The role of limited cell replicative capacity in pathological age change. A review. "Mech. Ageing and Dev.", 1982, 19, № 3, 217-244
359. Watanabe M., Ito T., Yamamoto M., Watanabe G. Origin of mitotic cells of the chorionic villi in direct chromosome analysis. "Hum. Genet.", 1978, 44, № 2, 191-193
360. Weichselbaum R.R., Nove J., Little J.E. X-ray sensitivity of of fifty-three human diploid fibroblast cell strains from patients with characterized genetic disorders. "Cancer Res.", 1980, 40, № 3, 920-925
361. Weismann A. Die Entstehung der Sexualzellen bei Hydromedusen. Zugleich ein Beitrag zur Kenntnis des Baues und der Lebenserscheinungen dieser Gruppe. Jena, G. Fischer Verlag, 1883
362. Weismann A. Die Kontinuität des Keimplasmas als Grundlage einer Theorie der Vererbung. Jena, G. Fischer Verlag, 1885
363. Weismann A. Das Keimplasma. Eine Theorie der Vererbung. Jena, G. Fischer Verlag, 1892
364. Weksler M.E. The influence of immune function on lifespan. "Bull. N.Y. Acad. Med.", 1978, 54, № 10, 964-969
365. Wen W.-N., Liew T.-L., Wu Sh.W., Jan K.Y. The effect of age and cell proliferation on the frequency of sister chromatid exchange in human lymphocytes cultured in vitro. "Mech. Ageing and Dev.", 1983, 21, № 3-4, 377-384
366. Widdus R., Taylor M., Powers L., Danielli J.F. Characteristics of the "life spanning" phenomenon in Amoeba proteus. Independent nuclear and cytoplasmic ability to impose finite "lifespan". "Gerontology", 1978, 24, № 3, 208-219
367. Wilson V.V., Jones P.A. DNA methylation decreases in aging but not in immortal cells. "Science", 1983, 220, № 4601, 1055-1057
368. Wing G.L., Blanchard G.C., Weiter J.J. The topography and age relationship of lipofuscin concentration in the retinal pigment epithelium. "Invest. Ophthal. Vis. Sci.", 1978, 17, № 7, 601-607
369. Witkowski J.A. Dr. Carrel's immortal cells. "Med. Hist.", 1980, 24, № 2, 129-142
370. Wright W.E., Hayflick L. Nuclear control of cellular aging demonstrated by hybridization of anucleate and whole cultured normal human fibroblasts. "Exp. Cell Res.", 1975, 96, № 1, 113-121

371. Wright W.E., Hayflick L. Use of biochemical lesions for selection of human cells with hybrid cytoplasms. "Proc. Natl Acad. Sci. USA", 1975, 72, № 5, 1812-1816
372. Wright W.E., Hayflick L. Contributions of cytoplasmic factors to in vitro cellular senescence. "Fed. Proc.", 1975, 34, № 1, 76-79

СОДЕРЖАНИЕ

Хохлов А.Н. ПРОЛИФЕРАЦИЯ И СТАРЕНИЕ

Предисловие	3
Список сокращений	4
Введение	5
1. Феномен Хейфлика ("старение in vitro ")	7
1.1. Немного истории	7
1.2. Фибробласты	9
1.3. Кератиноциты	45
1.4. Эпителиальные клетки хрусталика	48
1.5. Клетки пигментного эпителия сетчатки	52
1.6. Глиальные клетки и нейроны	56
1.7. Эндотелиальные клетки	57
1.8. Гладкомышечные клетки	57
2. "Стационарное старение"	57
2.1. Общие положения	57
2.2. Клетки животных	63
2.2.1. Щелочлабыльные участки и однонитевые раз-	
рывы ДНК	63
2.2.2. Сшивки ДНК-белок	66
2.2.3. Метилирование ДНК	70
2.2.4. Сестринские хроматидные обмены и углубле-	
ние в состоянии покоя	73
2.3. Клетки микоплазмы	83
2.4. Растительные клетки	87
2.5. Цианобактерии (сине-зеленые водоросли)	93
3. Кинетика размножения клеток и старение	98
3.1. Общие положения	98
3.2. Клеточно-кинетическая модель	99
3.3. Влияние гамма-излучения.	104
3.4. Влияние тиофосафида	105
3.5. Влияние геропротектора-антиоксиданта.	107
3.6. Влияние низкочастотного электромагнитного поля	110
3.7. Влияние "стационарного старения"	112
3.8. Влияние плотности посева	113
4. Половые клетки и старение	114
5. Пролиферация клеток и болезни преждевременного	
старения	128
6. Старение простейших	131
Заключение	137
Литература.	146

Хохлов А.Н. "Пролиферация и старение". Общие проблемы физико-химической биологии (Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР), М., 1988, 9, с 5-174

Том посвящен исследованиям клеточных механизмов старения - главным образом в экспериментах на культивируемых клетках. Рассматривается так называемый "феномен Хейфлика", анализируется применимость данной модели ("старение" нормальных клеток *in vivo*) для изучения старения *in vivo*. Особое внимание уделяется разрабатываемой автором концепции ограничения пролиферации клеток как основной причины старения многоклеточных организмов, а также возможности использования стационарных клеточных культур для моделирования возрастных изменений клеток *in vivo*. Излагаются данные, свидетельствующие о целесообразности применения клеточно-кинетической модели (оценка кинетики роста культивируемых клеток в пределах одного пассажа) для тестирования потенциальных геропротекторов и геропромоторов. Рассматриваются также проблемы старения простейших и "бессмертия" клеток зародышевой линии. Библ. 372

Технический редактор В.Ф. Овчинникова

Корректор О.С. Лазеева

Сдано в набор 22.07.88

Подписано в печать 08.07.88

T-16747

Формат 60 × 90/16

Бум. офсет.

Печать офсетная

Усл.печ.л. 11,0

Усл.кр.-отт. 11,19

Уч.-изд.л. 9,80

Тир. 550 экз.

Зак. 5831

Цена 1 р. 50 к.

Производственно-издательский комбинат ВИНТИ

140010, Люберцы 10, Московской обл., Октябрьский проспект, 403

О ПЕЧАТКИ

ИНТ «Общие проблемы ф.-х. биол. Том 9», 1988 г.

Страница	Строка	Напечатано	Следует читать
34	5 сверху	«возрастных» Хейфлику СХО, СХО, зате по по схеме жизнеспособными $\frac{dN_t}{dt} \cdot \frac{1}{N_t}$ (□) размножение. «Таким отметить клеток in vivo	«возрастных» Хейфлику- СХО СХО затем по схеме не жизнеспособными $\frac{dN_t}{dt} \cdot \frac{1}{N_t}$ (□); размножение.» Таким ответить клеток in vitro
34	22 сверху		
74	3 снизу		
77	15 снизу		
77	12 снизу		
78	6 снизу		
95	7 сверху		
101	20 снизу		
113	1 снизу		
132	23 снизу		
132	22 снизу		
137	22 снизу		
176	12 снизу		

Заказ 5831