

DOI 10.58351/2949-2041.2025.21.4.014

Зерчанинова Елена Игоревна

кандидат медицинских наук, доцент
ФГБОУ ВО УГМУ МЗ РФ, г. Екатеринбург

Бродовская Полина Максимовна, Студент ОЛД 115

ФГБОУ ВО УГМУ МЗ РФ, г. Екатеринбург

Кайгородов Михаил Сергеевич, Студент ОЛД 115

ФГБОУ ВО УГМУ МЗ РФ, г. Екатеринбург

СЕНЕСЦЕНТНО-АССОЦИИРОВАННЫЙ ФЕНОТИП КЛЕТКИ КАК ПРОЯВЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СТАРЕНИЯ ЧЕЛОВЕКА

Аннотация: В статье рассматриваются современные представления о клеточном старении, анализируется вклад сенесцентного фенотипа (SASP) клетки в старение человека и методы изучения SASP.

Ключевые слова: старение, сенесцентно-ассоциированный фенотип клетки.

Старение населения становится все более очевидной проблемой как в развитых, так и в развивающихся странах и вызовом для систем здравоохранения, социальной помощи, страхования. Возрастающая нагрузка на социальные институты ставит новые задачи перед медициной – выявить и замедлить старение на самых ранних этапах для профилактики возрастных заболеваний, улучшения продолжительности и качества жизни.

Старение определяется как неизбежное ухудшение состояния различных тканей и органов и представляет собой наибольший фактор риска возникновения возрастных заболеваний, таких как рак, сердечно-сосудистые заболевания, нарушения опорно-двигательного аппарата и нейродегенеративные состояния. Понимание биологических механизмов, ответственных за процесс старения от клеточного до организменного уровня, становится одним из основных направлений исследований в области естественных наук и медицины. Одновременно изучаются стратегии вмешательства в возрастные патологии и достижения здорового долголетия у людей.

Клеточное старение

Клеточное старение впервые было описано в человеческих эмбриональных легочных фибробластах как состояние необратимой остановки пролиферации после серийного пассирования в культуре [1]. В 1960-х годах американские ученые Хейфлик и Мурхед обнаружили, что культуры человеческих фибробластов имеют ограниченное количество клеточных делений, которые действительно не могут поддерживаться бесконечно. Причина оставалась в значительной степени неясной до тех пор, пока годы спустя ученые не выяснили, что такая пролиферативная остановка в основном вызвана постепенным укорочением хромосомных теломер, которое происходит во время каждого деления клетки, процесс, который теперь известен как репликативное истощение и наблюдается у различных видов млекопитающих. Количество делений, которых клетки достигают полностью в конце репликативного жизненного цикла, было названо пределом Хейфлика и составляет 50-60 делений. Репликативное старение не зависит от хронологического времени в культуре, а скорее зависит от количества делений, которые клетки претерпевают в культуре [2]. Считается, что укорочение теломер, которое происходит при каждом делении клетки из-за неполной репликации, является счетным механизмом для индукции репликативного старения клеток эпителия, эндотелия, глии, Т-лимфоцитов и других.



Теломеры становятся критически короткими после обширного деления, и концы теломер распознаются как двухцепочечные разрывы ДНК. Это активирует ответ на повреждение ДНК, и деление клеток затем останавливается посредством активации супрессора опухолей p53, p21, p16 и Rb. Активированный путем фосфорилирования фактор Rb образует комплекс с фактором транскрипции E2F, который важен для синтеза ДНК и прогрессирования фазы S клеточного цикла, и подавляет активность E2F в стареющих клетках. Поэтому стареющие клетки не могут войти в фазу S клеточного цикла и в основном поддерживаются в фазе G1 клеточного цикла. Таким образом, остановка старения клетки поддерживается посредством двух основных путей подавления опухолей, p53/p21 и p16/RB. Считается, что нормальный клеточный сигналинг данных путей является препятствием к злокачественному перерождению клетки.

Первоначально идентифицированное как механизм подавления опухолей, клеточное старение теперь считается центральным признаком старения, и его можно нацеливать на замедление старения и облегчение возрастных заболеваний. Между тем, необходимо отметить, что подобное необратимое, неделяющееся состояние может быть вызвано не только лимитом деления клетки, но воздействием на клетки чрезмерных внешних стрессоров. Эти стимулы включают в себя активные митогенные сигналы, такие как сверхэкспрессия активированных онкогенов, ДНК-повреждающие агенты, окислительный стресс, нарушение эпигенетической регуляции и эктопическая экспрессия опухолевых супрессоров [3].

Сенесцентно-ассоциированный фенотип клетки

Известно, что при прекращении пролиферации стареющие клетки остаются метаболически активными и демонстрируют общие фенотипы и молекулярные особенности независимо от их происхождения. Такие клетки характеризуются увеличенной и уплощенной морфологией, увеличенным содержанием цитоплазмы, увеличенным размером лизосом, увеличенным объемом и количеством митохондрий, значительным накоплением липофусцина, устойчивостью к апоптозу, нарушенной ядерной структурой, образованием очагов гетерохроматина, ассоциированных со старением и повышенной экспрессией провоспалительных медиаторов [4,5]. Стареющие клетки секретируют многочисленные биологически активные факторы, включая провоспалительные цитокины интерлейкин (ИЛ)-6 и ИЛ-8, хемокины, макрофагальные воспалительные белки, белок альфа, регулируемый ростом, факторы роста [сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), гранулоцитарный/макрофагальный колониестимулирующий фактор, трансформирующий фактор роста-бета и матриксные металлопротеиназы. Поскольку эти факторы действуют аутокринно и паракринно и оказывают плеiotропное действие на окружающие клетки, они могут влиять на окружающую микросреду, а также на саму стареющую клетку и могут участвовать в ремоделировании тканей в организмах. Это называется секреторным фенотипом, связанным со старением (SASP). Поскольку сенесцентно-ассоциированный секреторный фенотип имеет сложные и разнонаправленные эффекты, он может объяснить роль клеточной инволюции в старении целого организма, отдельных тканей и частоту возрастных заболеваний и патологий. В настоящее время имеется много сообщений, которые указывают на то, что стареющие клетки накапливаются в старых и болезнетворных тканях [6,7]. Это говорит о том, что клеточное старение активно способствует процессу старения и прогрессированию некоторых заболеваний на уровне целого организма.

Методы оценки сенесцентно-ассоциированного фенотипа клетки

Поскольку существует значительный репертуар стимулов, которые могут приводить к различным, но взаимосвязанным программам клеточного старения, которые индивидуально характеризуются специфическими фенотипическими изменениями, такими как SASP, отмечается сложность разработки единого надежного биомаркера клеточного старения и SASP. Систематическая оценка данных секвенирования объемной РНК из фибробластов как человека, так и мыши показала существенные различия в транскриптомных сигнатурах и SASP, профиль которых, как правило, зависит от индукторов старения, типов клеток и стадий старения, все факторы способствуют различиям в старении [8].



Другое исследование объединило изоляцию отдельных клеток и платформу наножидкостной ПЦР для изучения вклада отдельных клеток в общую картину экспрессии генов стареющих человеческих диплоидных фибробластов, с полученными данными, указывающими на гетерогенные сигнатуры экспрессии генов отдельных стареющих клеток, в то время как изменчивость от клетки к клетке приводит к потере корреляции между моделями экспрессии генов, связанных со старением [9]. В качестве особого примечания необходимо отметить, что многие гены, кодирующие факторы SASP, показали значительную изменчивость, хотя воспалительные гены в кластеризованных геномных локусах показали более высокую корреляцию со старением по сравнению с некластеризованными локусами, что предполагает совместную регуляцию генов определенными геномными локациями. Вместе эти результаты предоставили новое понимание модуляции экспрессии генов при клеточном старении. Таким образом, отдельных маркеров, вероятно, недостаточно для идентификации стареющих клеток, особенно в условиях *in vivo*. Учитывая сложность и гетерогенность старения, необходимы дополнительные усилия с привлечением подходов с высоким разрешением, таких как секвенирование РНК отдельных клеток (scRNA-seq) и секвенирование РНК отдельных ядер (snRNA-seq), для выявления характеристик стареющих клеток при различных патофизиологических состояниях.

Данные масштабируемого и мультиплексного секвенирования РНК отдельных клеток показали, что клетки, испытывающие окислительный стресс, вызывающий старение, могут быстро принимать одно из двух основных транскрипционных состояний, включая одно, которое связано с реакцией на стресс, и другое, связанное с ремоделированием ткани [10]. Благодаря технологическим достижениям методы секвенирования РНК отдельных клеток и отдельных ядер, действительно, являются одними из самых мощных платформ, которые могут быть использованы для исследования гетерогенности старения, поскольку они обладают преимуществами при изучении отдельных клеток на молекулярном уровне и определении транскрипционных характеристик. Несмотря на эти перспективы метода, глубина секвенирования пока остается относительно низкой, при этом только до 50–60% транскриптов секвенируются и обнаруживаются в отдельных клетках. Учитывая такую техническую сложность картирования сенесцентных клеток из-за их низкой распространенности в тканях, подходы к обогащению сенесцентных клеток, такие как сортировка клеток, могут быть перспективным вариантом для улучшения чувствительности секвенирования.

Для поддержки точного исследования стареющих клеток *in vivo* разработана технология проточной цитометрии с визуализацией [11]. Этот подход позволяет обнаруживать ряд маркеров или репортеров старения на уровне белка, а также оценивать несколько признаков старения на уровне отдельных клеток с высокой пропускной способностью. Связанные со старением признаки, такие как положительность окрашивания бета-галактозидазы, морфологическое увеличение, очаги повреждения ДНК и цитоплазматические хромосомные фрагменты, которые в настоящее время невозможно измерить с помощью секвенирования, могут быть учтены с помощью проточной цитометрии с визуализацией. Для более глубокой оценки старения будущее развитие методов масс-спектрометрии отдельных клеток, таких как протеомика отдельных клеток и метаболомика отдельных клеток, которые позволяют идентифицировать белковые молекулы и метаболиты в больших масштабах, может оказать существенное влияние на исследования стареющих клеток.

Несмотря на сложность идентификации стареющих клеток *in vivo*, в последнее время наблюдается некоторый захватывающий прогресс. В качестве перспективного образца для анализа стареющих клеток с общедоступными наборами данных отдельных клеток, такими как те, которые содержат объемные данные РНК-секвенирования, исследовательская группа создала полный список маркеров, связанных со старением (специальный набор генов под названием SenMayo) с данными, полученными из биопсий костей двух пожилых групп людей [12]. Включая в себя в общей сложности 125 генов, многие из которых являются факторами SASP, SenMayo продемонстрировал геноспецифическое сокращение в костных тканях после генетического очищения стареющих клеток у экспериментальных мышей и в жировой ткани



у пациентов после фармакологического истощения стареющих клеток. Следует отметить, что SenMayo может идентифицировать стареющие клетки в тканях и видах с высокой точностью, и такая панель старения обеспечивает мощный источник для характеристики стареющих клеток на уровне отдельных клеток и идентификации ключевых межклеточных сигнальных путей. Гены данной панели тесно коррелируют с хроническим старением, включая p16 и p21, а также с нагрузкой стареющих клеток в тканях человека и мыши, представляют собой важный ресурс для идентификации стареющих клеток, оценки нагрузки стареющих клеток, связанной со старением, и фармакологических исследований новых сенолитиков.

Разработка высокочувствительных методов обнаружения может функционально дополнять высокопроизводительные методы. Визуализация транскриптома *in situ* с высокой точностью является серьезной проблемой в биологии отдельных клеток, которая в основном обусловлена пределами оптического разрешения и плотностью транскриптов отдельных клеток. Недавно была разработана техника последовательной флуоресцентной гибридизации *in situ* (seqFISH +), позволяющая беспристрастно идентифицировать классы клеток и их пространственную организацию в тканях [13]. В частности, seqFISH + выявляет субклеточные паттерны локализации мРНК и пары лиганд-рецептор в соседних клетках, демонстрируя способность создавать пространственные атласы клеток и проводить основанные на открытиях исследования биологических процессов *in situ*. Аналогичным образом был разработан подход к идентификации и картированию типов клеток *in situ* на основе визуализации, который был объединен с scRNA-seq для создания молекулярно аннотированного и пространственно разрешенного атласа клеток [14]. Эта техника позволила профилировать около 1 миллиона клеток и идентифицировать до 70 нейронных популяций, которые характеризовались различными нейромодуляторными сигнатурами и пространственными организациями, обеспечивая высокоразрешающую структуру для механистического исследования поведенческих цепей преоптической области гипоталамуса млекопитающих. Таким образом, мультиплексная флуоресцентная гибридизация *in situ* (mFISH) может быть использована в качестве важного подхода для обнаружения стареющих клеток, фокусируясь на более чем 100 выбранных генах с разрешением одной молекулы, стратегия, необходимая для проверки молекулярных мишеней, идентифицированных с помощью sc/snRNA-seq, а также для профилирования микросреды, окружающей стареющие клетки.

В настоящее время разрабатываются подходы на основе точных алгоритмов, коррелирующие с искусственным интеллектом (ИИ), в частности, машинным обучением. Чтобы определить специфичный для SASP транскрипционный фенотип, в недавнем исследовании изучалась выборка данных для увеличения вероятности того, что модель машинного обучения не зависит от типа клеток, онкогенной сигнализации и других факторов, связанных с условиями окружающей среды и/или экспериментальными условиями [15]. Ссылаясь на Атлас белков человека (HPA) для получения списка из 1903 человеческих генов (полученных из всего 10 гетерогенных наборов данных из 9 когорт), которые, как предполагается, секретируют белковые факторы, авторы провели первоначальный скрининг соответствующих генов в наборах данных временного ряда и обхода. В результате этого процесса был составлен список из 40 генов с повышенной или пониженной экспрессией, которые были определены как фенотип, специфичный для SASP [15].

Сверточные нейронные сети (CNN) часто используются в качестве моделей для отображения данных, отображающих естественную пространственную инвариантность, например, с изображениями. Благодаря значительному увеличению вычислительной мощности обработки и манипулирования данными, а также более надежной и дешевой технологии генерации данных, область глубокого обучения в последние годы развивается экспоненциально. Модели глубокого обучения CNN также обучаются различать различные типы клеток на основе оценки особенностей клеток с помощью наблюдений, основанных на микроскопии. Недавно был разработан алгоритм классификатора, связанный с морфологией клеточного старения, для сверточной многослойной нейронной сетевой системы, в основном использующий входные наборы данных, включающие уровень разрешения отдельных клеток 50×50 пикселей и фазово-контрастные изображения нестареющих и стареющих



эндотелиальных клеток пупочной вены человека, индуцированных перекисью водорода, противораковым препаратом камптотецином или непрерывным пассивированием [16]. Таким образом, обученные многослойные алгоритмы глубокого обучения искусственных нейронных сетей являются перспективным инструментом классификации для обнаружения клеточного старения, и в ближайшем будущем мы должны увидеть дальнейшие улучшения в их классификационной способности.

Перспективные направления сенолитической терапии

Терапевтические стратегии для воздействия на сенесцентные клетки в совокупности называются сенотерапией (или сенолитической терапией). Гетерогенность фенотипов, связанных со старением, во всех тканях предполагает, что не все ткани одинаково подвержены воздействию одной и той же сенотерапии, а отсутствие универсального биомаркера может вызывать нецелевые эффекты. Гетерогенность сенесцентных клеток наблюдалась, когда эти клетки проявляли различную степень восприимчивости к сенолитикам, в то время как большинство современных сенолитиков показали отчетливую эффективность в отношении различных субпопуляций сенесцентных клеток. Например, дазатиниб эффективен в воздействии на сенесцентные преадипоциты, в то время как кверцетин способен устранять эндотелиальные клетки [3]. Физетин способен вызывать апоптоз стареющих фибробластов и эндотелиальных клеток, но имеют ограниченную эффективность в отношении стареющих преадипоцитов [3]. Остается в значительной степени неясным, какие популяции клеток более конкретно нацелены на сенолитики *in vivo* на уровне отдельных клеток, что потенциально ограничивает полезность сенолитиков в более широком патологическом диапазоне. Несмотря на такие технические трудности, доклинические исследования представили ряд многообещающих результатов и продемонстрировали потенциал новых сенотерапевтических средств в замедлении старения организма и вмешательстве в возрастные патологии, в частности эффективность сенолитиков для облегчения симптомов хронических заболеваний и продления общей продолжительности здоровой жизни.

Заключение

Увеличение продолжительности жизни привело к росту частоты хронических возрастных патологий. Растущие направления исследований предоставили доказательства критической роли клеточного старения в подавляющем большинстве этих заболеваний. Основные характеристики стареющих клеток включают остановку клеточного цикла, устойчивость к апоптозу и развитие SASP, последнее приводит к усиленной секреции многочисленных биоактивных факторов, важных для патофизиологии, связанной со старением. Однако клеточное старение является крайне фенотипически гетерогенным статусом, серьезно затрудняющим открытие и установление специфических, точных и универсальных биомаркеров. Не только молекулярные и транскриптомные фенотипы и профиль SASP различаются среди субпопуляций стареющих клеток, но также и индуцирующие триггеры, патофизиологические контексты и роли стареющих клеток крайне неоднородны.

Важным достижением стало то, что новые стратегии по ограничению патологического воздействия стареющих клеток во время старения организма посредством воздействия на стареющие клетки, в частности, способствуя их выведению из тканей, продемонстрировали значительный потенциал в доклинических исследованиях, при этом ряд пионерских исследований уже находятся на ранних стадиях клинических испытаний. Хотя перспективные значения и практическая применимость этих сенотерапевтических схем для пациентов-людей были поставлены под сомнение, в основном из-за отсутствия надлежащих маркеров, специфичных для старения, и безопасных стратегий нацеливания, разработка новых сенотерапевтических решений активно ведется. Текущие данные относительно эффективности, надежности, стадии разработки и потенциала вмешательства в пожилые популяции людей предоставили прекрасную основу для дальнейшей разработки терапевтических линий для будущей гериатрической медицины.



Список литературы:

1. Hayflick L., Moorhead P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains // *Experimental Cell Research*. 1961, Vol. 25. P. 585-621
2. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts // *Nature*. 1990. Vol 345. P. 458–60.
3. Basisty N., Kale A, Patel S. et al. The power of proteomics to monitor senescence-associated secretory phenotypes and beyond: toward clinical applications // *Expert Review of Proteomics*. 2020. Vol. 17. P. 297-308.
4. Sun Y., Coppe J.P., Lam E.W. Cellular senescence: the sought or the unwanted? // *Trends of Molecular Medicine*. 2018. Vol. 24. P. 871-885
5. Song S., Tchkonja T., Jiang J. et al. Targeting senescent cells for a healthier aging: challenges and opportunities // *Advance in Science*. 2020. Vol. 7, Article 2002611.
6. Mavrogonatou E, Pratsinis H., Kleitsas D. The role of senescence in cancer development // *Seminars in Cancer Biolology*. 2020. Vol. 62. P. 182-191
7. Liu H., Zhao H., Sun Y. Tumor microenvironment and cellular senescence: understanding therapeutic resistance and harnessing strategies // *Seminars in Cancer Biolology*. 2022. Vol. 86. P.769-781.
8. Hernandez-Segura A, de Jong T.V., Melov S. et al. Unmasking transcriptional heterogeneity in senescent cells // *Current Biology* 2017. Vol.27. P. 2652-2660.
9. Wiley C.D., Flynn J.M., Morrissey C. et al. Analysis of individual cells identifies cell-to-cell variability following induction of cellular senescence // *Aging Cell*. 2017. Vol. 16. P. 1043-1050.
10. N. Burnaevskiy, J. Oshima, A.R. Mendenhall Rapid emergence of transcriptional heterogeneity upon molecular stress predisposes cells to two distinct states of senescence // *Geroscience*.2023. Vol. 45. P. 1115-1130.
11. Biran A., Zada L., Karam A.P. et al. Quantitative identification of senescent cells in aging and disease // *Aging Cell*. 2017. Vol. 16.P. 661-671.
12. Saul D., Kosinsky R.L., Atkinson E.J. et al. A new gene set identifies senescent cells and predicts senescence-associated pathways across tissues // *Nature Communations*. 2022. Vol.13.P. 4827.
13. Eng C.L., Lawson M., Zhu Q. et al. Transcriptome-scale super-resolved imaging in tissues by RNA seqFISH // *Nature*. 2019. Vol. 568. P. 235-239.
14. Moffitt J.R., Bambach-Mukku D., Eichhorn S.W. et al. Molecular, spatial, and functional single-cell profiling of the hypothalamic preoptic region // *Science*. 2018. P. 362
15. Han Y, Micklem G., Kim S.Y. Transcriptional landscape of oncogene-induced senescence: a machine learning-based meta-analytic approach // *Ageing Research*. 2023. Vol. 25. Article 101849
16. D. Kusumoto, M. Lachmann, T. Kunihiro, et al. Automated deep learning-based system to identify endothelial cells derived from induced pluripotent stem cells // *Stem Cell Report*. 2018. Vol. 10. P.1687-1695.

