

УДК 577.24

## НАЙТИ И УНИЧТОЖИТЬ: ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ЭЛИМИНАЦИЯ СТАРЕЮЩИХ КЛЕТОК

© 2018 г. А. В. Бородкина\*, П. И. Дерябин,  
А. А. Грюкова, Н. Н. Никольский

Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий просп., 4

\*E-mail: borodkina618@gmail.com

Поступила в редакцию 21.08.2017

Принята к печати 04.09.2017

“Старость наша есть болезнь, которую нужно лечить, как всякую другую” — эта фраза, сказанная более ста лет назад, в свете современных исследований становится весьма актуальной. Сравнительно недавно было установлено, что одной из причин общего старения организма и прогрессии множества возрастных патологий является накопление стареющих клеток в органах и тканях, приводящее к их дисфункции. С одной стороны, это понимание приближает к реализации заветной цели — обращению или замедлению процесса старения, однако одновременно с этим поднимает ряд сложных вопросов: чем стареющие клетки отличаются от нормальных и как их идентифицировать, возможно ли направленно удалять стареющие клетки из организма и позволит ли это остановить/обратить старение, не будет ли таргетное удаление таких клеток сопровождаться негативными последствиями, в том числе увеличением риска возникновения рака? В настоящем обзоре суммированы основные описанные на сегодняшний день признаки стареющих клеток, а также освещены подходы для направленного удаления стареющих клеток *in vivo*, подчеркнуты их достоинства и недостатки.

**Ключевые слова:** клеточное старение, идентификация стареющих клеток, таргетная элиминация стареющих клеток

DOI:

### ВВЕДЕНИЕ

Старение является фактором риска для широкого спектра различных гериатрических заболеваний, таких как болезни Альцгеймера и Паркинсона, саркопении, остеоартрит, атеросклероз, сахарный диабет, ожирение и т.д. [1]. В последнее время появляется все больше свидетельств в пользу того, что возраст-зависимое ухудшение функционирования органов и тканей, равно как и прогрессия вышеперечисленных возраст-ассоциированных заболеваний связаны с накоплением в организме стареющих клеток [2]. Одновременно с этим установлено, что клеточное старение (КС), начиная со стадии формирования эмбриона, является неотъемлемой частью нормального развития организма [2, 3]. Как одно и то же явление может быть вовлечено в противоположные по смыслу процессы нормального развития и старения организма? Прежде всего, необходимо определить, что такое КС. Суть данного феномена заключается в необратимой потере пролиферативной

активности поврежденных клеток при сохранении их метаболической активности [4]. С одной стороны, препятствуя экспансии поврежденных клеток, КС служит эффективным противоопухолевым механизмом [5, 6]. С другой стороны, функциональная активность стареющих клеток нарушена, вследствие чего их накопление может приводить к дисфункции органов и тканей [7]. Во избежание этих негативных последствий в молодом здоровом организме стареющие клетки элиминируются из популяции клетками иммунной системы [8]. Однако с возрастом, когда эффективность работы всех систем, включая иммунную, снижена, происходит накопление стареющих клеток, что в свою очередь может обуславливать как прогрессию различных возраст-ассоциированных заболеваний, так и старение организма в целом [9].

Несмотря на достаточно устоявшуюся точку зрения о необратимости процесса старения, сегодня в научных кругах все чаще дискутируется вопрос о том, что старение обладает

пластичностью и при осторожной модуляции его можно обратить [10, 11]. Очевидно, что направленная модуляция такого сложного процесса, как старение предполагает детальное исследование механизмов, опосредующих его развитие. В первую очередь, важно установить причинно-следственные связи между клеточным и организменным старением. В частности необходимо понять, можно ли с помощью направленной элиминации стареющих клеток из организма предотвратить процесс развития старения или же устранить те последствия старения, которые уже проявились. Решение этих задач предопределяет необходимость разработки таргетной терапии против стареющих клеток, которая при этом не затронет здоровые клетки микроокружения. Молекулярная основа избирательного удаления стареющих клеток заключается в выявлении признака или признаков, характерных исключительно для стареющих клеток, которые в дальнейшем позволят однозначно идентифицировать такие клетки *in vivo*. В связи с этим настоящий обзор состоит из двух взаимодополняющих частей: первая освещает основные изменения, сопровождающие развитие КС, которые потенциально могли бы позволить идентифицировать стареющие клетки, а во второй части описаны существующие на сегодняшний день стратегии направленного удаления стареющих клеток *in vivo*.

## НАЙТИ СТАРЕЮЩИЕ КЛЕТКИ

Представление о том, что клетки могут стареть, сформировалось еще около полувека назад [12]. Однако с тех пор понятие КС существенно расширилось и дополнилось. Так, помимо репликативного старения, запуск которого опосредован укорочением теломер, сегодня выделяют еще одну форму КС – преждевременную. Преждевременное КС может возникать независимо от длины теломер в клетках в ответ на сверхэкспрессию онкогенов, обработку химиотерапевтическими агентами и различные стрессовые воздействия, такие как УФ- и  $\gamma$ -облучение, тепловой шок и окислительный стресс [13–17]. Согласно современным представлениям под термином КС принято понимать остановку пролиферации метаболически активных клеток, возникающую как следствие повреждения ДНК, причем в случае репликативного старения повреждения ассоциированы с теломерными регионами, а в случае преждевременного расположены стохастически [4]. Несмотря на различие в природе индукторов, основные признаки КС сходны как у различных его форм,

так и у различных типов пролиферирующих клеток [4]. Важно подчеркнуть, что КС является динамическим процессом, и большинство сопровождающих его изменений развивается во времени, что затрудняет установление однозначных причинно-следственных связей между ними. В рамках настоящего обзора предлагается кратко осветить внутриклеточные изменения, условно разделив их на события, происходящие в ядре и в цитоплазме, и отдельно вынести изменения клеточной мембраны и секреторного профиля стареющих клеток (рис. 1).

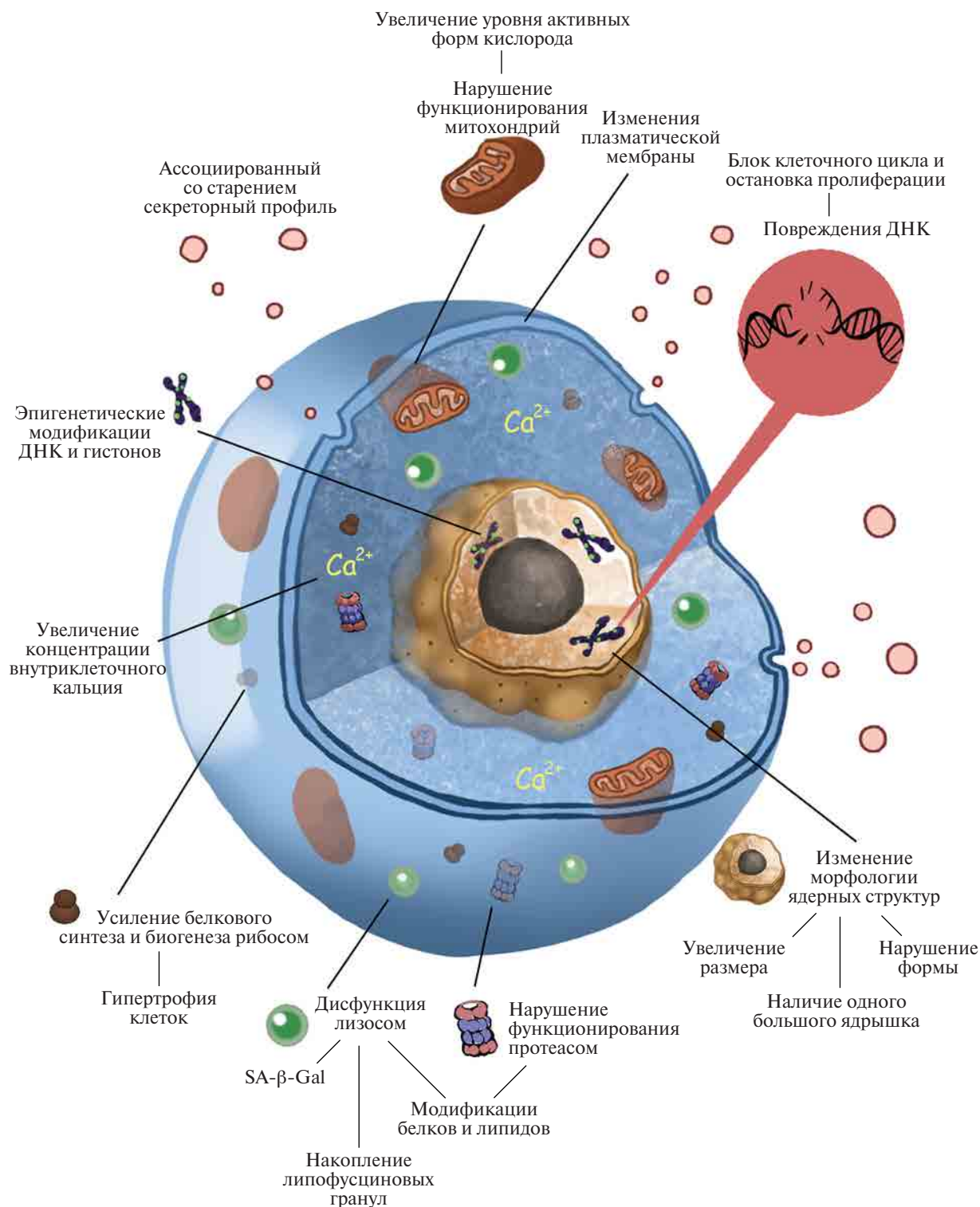
## 1. События, происходящие в ядре клеток

### 1.1. Повреждение ДНК

Одной из наиболее важных характеристик стареющих клеток является повреждение ДНК, а именно двойные разрывы, возникновение которых приводит к активации ответа на повреждение ДНК (DNA damage response, DDR). В большинстве типов клеток DDR начинается с активации трех сенсорных киназ: ATM (Ataxia telangiectasia mutated), ATR (ATM and Rad-related) и DNA-PK (DNA-dependent protein kinase), которые распознают повреждения и фосфорилируют нижележащих участников этого сигнального ответа [18, 19]. Фосфорилирование H2AX приводит к формированию фокусов  $\gamma$ -H2AX, необходимых для последующего рекрутирования и заякоривания в сайтах повреждения ДНК остальных участников DDR, таких как MRE11/RAD50/NBS1 (MRN-комплекс), MDC1, BRCA1, RAD51 и 53BP1 [18]. Важно, что для установления необратимого ареста клеточного цикла в стареющих клетках необходимо поддержание DDR в постоянно активном состоянии, в результате чего формируются крупные фокусы, получившие название DNA-SCARS (DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence) или TIF (telomere dysfunction-induced foci) в случае локализации повреждений в теломерных регионах [20, 21].

### 1.2. Ассоциированный со старением арест роста (senescence associated growth arrest, SAGA)

Согласно классическому определению КС характеризуется необратимым арестом клеточного цикла в фазе G1 [4]. На молекулярном уровне блок цикла в стареющих клетках опосредован активацией сигнальных путей p53/p21<sup>Waf1/Cip1</sup>/Rb и/или p16<sup>INK4a</sup>/Rb. Известно, что p21<sup>Waf1/Cip1</sup> и p16<sup>INK4a</sup> подавляют активность циклин-зависимых киназ, что приводит к гипофосфорилированию белка ретинобластомы (Rb) и препятствует репликации ДНК [13, 14, 16]. Сегодня появляется все больше сведений о важной роли блока G2/M в реализации программы



**Рис. 1.** Признаки стареющих клеток. На рисунке отражены основные изменения, сопровождающие прогрессию КС.

старения [22, 23]. Так, в G2-клетках повреждение ДНК и последующая активация p53 опосредуют задержку циклина B1 в ядре и инициируют старение [24]. Можно предположить, что

блок G2/М служит неким защитным механизмом, препятствующим появлению полиплоидных клеток, если поврежденные клетки не остановились в G1 и прошли в S-фазу [24].

### 1.3. Эпигенетические модификации ДНК и гистонов

Избирательное метилирование ДНК лежит в основе дифференциальной экспрессии генов и является наиболее хорошо охарактеризованной эпигенетической модификацией, суть которой заключается в ковалентном присоединении метильных групп к остаткам цитозина в CpG-островках. Впервые возраст-зависимое снижение метилирования ДНК было описано в 1967 году [25]. Сегодня глобальное гипометилирование генома рассматривается как общая характеристика репликативного и преждевременного КС [26]. Показано, что гипометилирование происходит в основном в областях повторяющихся последовательностей и, предположительно, приводит к реактивации ретротранспозонов во время старения [27]. Кроме того, в контексте старения принято говорить о локальном гиперметилировании отдельных участков ДНК, в результате чего происходит подавление транскрипции определенных генов, например, генов-мишеней белков семейства Polycomb [26]. Стоит отметить, что помимо гиперметилирования ДНК КС сопровождается также гиперметилированием гистона H3 по остаткам лизина в положении 9 и 27 (H3K9me3 и H3K27me3) [28].

Еще один признак стареющих клеток — появление специфических ассоциированных со старением гетерохроматиновых фокусов (SAHF, senescence associated heterochromatin foci) [4, 29]. SAHF представляют собой особый факультативный гетерохроматин, отличный от других факультативных гетерохроматиновых участков (неактивная X-хромосома в клетках женских особей) и от конститутивного гетерохроматина (центромеры, теломеры) [30]. На молекулярном уровне формирование таких фокусов опосредовано рекрутированием различных белков, в частности белка ретинобластомы, к промоторам E2F-регулируемых генов, которые играют ключевую роль в переходе клеток из G1- в S-фазу и отвечают за пролиферацию клеток [30]. Следствием этих молекулярных событий является конденсация хроматина и подавление экспрессии генов-мишеней E2F. Важно отметить, что формирование SAHF присуще исключительно старым клеткам и не наблюдается в обратимо арестованных покоящихся клетках, так как для накопления фокусов необходимо стабильное подавление экспрессии генов-мишеней E2F.

### 1.4. Изменения морфологии ядерных структур

В процессе КС большинство ядерных структур, включая ядерную оболочку, матрикс, ядрышко и ядерные тельца (PML-тельца), претерпевает определенные изменения. Во-первых, в стареющих клетках значительно увеличивается размер

ядра [29]. Во-вторых, для старых клеток характерно наличие одного большого ядрышка, тогда как нормальные пролиферирующие клетки содержат множество мелких ядрышек [29]. В-третьих, изменяется экспрессия белков ядерного матрикса, а также их способность связываться с теломерными участками ДНК, что может влиять на прогрессию клеточного цикла и опосредовать его остановку в стареющих клетках [31]. В-четвертых, PML-тельца способны влиять на прохождение клеток по циклу и регуляцию КС [29]. Показано, что целостность PML-телец необходима для ацетилирования и стабилизации p53 и развития онкоген-индуцированного старения [32]. Кроме того, сверхэкспрессия белка PML, ключевого компонента PML-телец, может p53-зависимым образом инициировать старение. Наконец, установлено, что в процессе КС увеличивается фракция клеток с нарушенной формой ядра [33–35]. В частности, показано, что пространственные изменения ядерной оболочки совпадают с перераспределением ламина А и локальным снижением подвижности белков в ядрах старых клеток [35].

### 1.5. Ассоциированные со старением некодирующие РНК

Согласно современным данным, в регуляцию КС вовлечены различные некодирующие РНК (non-coding RNA, ncRNA) [36]. Показано участие ncRNA UCA1, MEG3 и ANRIL, в усилении продукции белков p53, p21<sup>Waf1/Cip1</sup> и p16<sup>INK4a</sup>, ответственных за установление ареста цикла в стареющих клетках [36]. Кроме того, let-7, miR-34, miR-519 и lincRNA-p21 могут подавлять синтез белков, опосредующих пролиферацию, и участвовать таким образом в прогрессии КС [36]. Дополнительно выявлены ncRNA, влияющие на функционирование митохондрий и целостность теломер в процессе старения.

## 2. События, происходящие в цитоплазме клеток

2.1. Изменение морфологии клеток, модуляция функционирования рибосом и изменение белкового синтеза

Установлено, что старые клетки уплощены, избыточно вакуолизированы и заметно увеличены в размерах [4, 16]. В процессе старения пролиферация клеток останавливается, однако их рост остается неизменным, что приводит к гипертрофии [37]. Важным следствием такого “несбалансированного роста” является накопление в клетках белковых макромолекул, способствующее увеличению осмотического давления и входа воды и/или ионов внутрь клеток. На молекулярном уровне клеточная гипертрофия при развитии

старения обусловлена двумя взаимосвязанными процессами — модуляцией белкового синтеза и биогенеза рибосом [38].

Ключевую роль в регуляции белкового синтеза играет сигнальный путь mTOR [30]. Известно, что рибосомная S6-киназа — основная мишень mTOR — индуцирует трансляцию мРНК за счет фосфорилирования рибосомного белка S6 и регуляции различных факторов инициации трансляции, например эукариотического фактора 4B (eIF4B). Кроме того, ингибируя специфический eIF4E-связывающий белок (4E-BP), mTOR высвобождает фактор eIF4E, также запускающий трансляцию. Важно, что активность пути mTOR значительно возрастает в стареющих клетках, а ингибирование этого пути способно предотвратить развитие КС [30, 39].

Также mTOR участвует в синтезе компонентов рибосом, включая транскрипцию и процессинг пре-рРНК, экспрессию рибосомных белков и синтез 5S рРНК [38]. В последнее время появляется все больше работ, свидетельствующих о том, что некоторые рибосомные белки, в частности рибонуклеопротеидный комплекс 5S, способны активировать p53 и промотировать развитие КС [40]. Однако конкретные изменения в процессе биогенеза рибосом зависят от формы КС. Так, например, при онкоген-индуцированном старении ускоряется транскрипция рРНК, тогда как при репликативном старении замедляется процессинг рРНК [40]. В обоих случаях это приводит к накоплению рибосомных белков, не связанных с рибосомами, которые, взаимодействуя с MDM2, негативным регулятором p53, способствуют активации последнего и инициации КС.

## 2.2. Нарушение функционирования систем деградации

Тонко регулируемый процесс внутриклеточной деградации представлен в клетке двумя системами — лизосомной и протеасомной. Согласно современным данным, эффективность работы обеих систем значительно снижена в стареющих клетках [41, 42].

Нарушение процесса деградации поврежденных органелл и макромолекул в лизосомах приводит к накоплению большого числа агрегатов в цитоплазме. Эти агрегаты, вступая в реакции с различными клеточными компонентами, формируют флуоресцирующие липофусциновые гранулы, вовлеченные в генерацию активных форм кислорода (АФК) [43]. Еще одно следствие снижения эффективности функционирования лизосом — нарушение аутофагии [44]. Аутофагия представляет собой важнейший катаболический процесс, ответственный за утилизацию органелл

и макромолекул в специфических клеточных компартментах, образующихся при слиянии аутофагосом и лизосом. Дисфункция лизосом в процессе КС приводит к нарушению цикла аутофагии и накоплению поврежденных молекул [45].

Также установлено, что КС сопровождается падением активности 26S-протеасом [41]. Предполагается, что снижение функционирования протеасом приводит к временному запрету деградации и накоплению различных белков, включая p53, вследствие чего иницируется p53/p21<sup>Waf1/Cip1</sup>-опосредованный блок клеточного цикла. Частичное ингибирование протеасом способствует индукции преждевременного старения в молодых клетках [46].

## 2.3. Повышение активности ассоциированной со старением β-галактозидазы (SA-β-Gal)

Общепринятым маркером старения *in vitro* и *in vivo* служит повышение активности β-галактозидазы [4, 47]. Известно, что β-галактозидаза является важнейшим лизосомным ферментом, расщепляющим липиды и гликопротеины, активность которого детектируется в нормальных клетках при pH 4.0. Однако в стареющих клетках активность β-галактозидазы значительно возрастает, и ее можно обнаружить при более высоком значении pH — 6.0 [47]. В этом случае β-галактозидазу называют β-галактозидазой, ассоциированной со старением (SA-β-Gal).

## 2.4. Митохондриальные изменения и повышенный уровень АФК

Известно, что стареющие клетки содержат большее число митохондрий, причем в процессе развития КС их функционирование нарушается [48]. К наиболее известным КС-ассоциированным изменениям митохондрий относятся окислительные модификации некоторых митохондриальных ферментов, таких как аконитаза, адениннуклеотидтрансфераза и цитохром-с-оксидаза; перекисное окисление фосфолипидов, входящих в состав митохондриальной мембраны; падение мембранного потенциала митохондрий; накопление повреждений митохондриальной ДНК (мтДНК) [48, 49]. Предполагается, что накопление окислительных повреждений и мутаций мтДНК при развитии КС опосредовано нарушениями в системе репарации мтДНК [48].

Изменения физиологии митохондрий могут приводить к увеличению образования АФК в стареющих клетках [48]. В настоящее время установлено, что АФК вовлечены как в инициацию, так и в развитие репликативного, онкоген- и стресс-индуцированного старения [37, 49]. С одной стороны, показано, что АФК способствуют возникновению разрывов в ДНК, иницируя

таким образом активацию DDR, блок клеточного цикла и старение. С другой стороны, основные эффекторы DDR опосредуют генерацию АФК, что, в конечном итоге, приводит к формированию так называемой петли положительной обратной связи [49].

### 2.5. Повышение уровня внутриклеточного кальция

Установлено, что процесс КС сопровождается изменениями ионного гомеостаза в клетках и, особенно, регуляции уровня внутриклеточного кальция. Так, общим наблюдением при репликативном, онкоген- и стресс-индуцированном старении является повышенный уровень  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле [50–54]. При исследовании молекулярных механизмов, опосредующих участие ионов кальция в регуляции КС, показано, что увеличение концентрации внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  приводит к его аккумуляции в митохондриях и, как следствие, к нарушению нормального митохондриального метаболизма и генерации повышенных количеств АФК [52]. Интересно, что нокаут генов белков митохондриальных кальциевых каналов позволяет предотвратить развитие КС [52].

Альтернативным механизмом считается взаимосвязь между внутриклеточным кальцием и активностью транскрипционного фактора p53. Оказалось, что изменение концентрации кальция в цитозоле может регулировать взаимодействие кальций-связывающих белков и p53, приводя к усилению транскрипционной активности и стабильности последнего [55]. Согласно нашим данным, увеличение концентрации внутриклеточного кальция может регулировать инициацию и прогрессию КС посредством индукции DDR и активности сигнального пути p53/p21<sup>Waf1/Cip1</sup>/Rb, причем хелатирование кальция способно предотвращать развитие КС [54].

### 2.6. Модификации белков и липидов

Нарушения функционирования различных органелл, происходящие при КС, приводят к разнообразным химическим модификациям (окисление, гликирование, образование сшивок и т.д.) макромолекул в клетке [56]. Так, например, следствием повышения уровня эндогенных АФК является окисление полиненасыщенных жирных кислот в клеточных мембранах и органеллах [57]. Эти окисленные формы липидов также могут повреждать ДНК и способствовать прогрессии старения. Другая модификация, сопровождающая КС – карбонилирование белков [58]. Установлено, что развитие КС как *in vivo*, так и *in vitro* сопровождается существенным повышением карбонилирования, так что, в конечном итоге, каждый третий белок становится карбонилированным. Карбонилирование приводит к снижению или

полной утрате каталитической функции белков и формированию высокомолекулярных белковых агрегатов, токсичных для клеток. В норме карбонилирование маркирует поврежденные или aberrантные белки, направляя их на деградацию в протеасомах. Однако значительное увеличение числа карбонилированных белков в процессе старения может негативно влиять на функционирование протеасом [59]. Таким образом, несмотря на то что все описанные модификации могут возникать и в нормальных клетках, причиной их повреждающего действия в стареющих клетках является то, что модифицированные молекулы накапливаются значительно быстрее, чем деградируют.

### 3. Изменения плазматической мембраны стареющих клеток

Помимо различных ядерных и цитоплазматических изменений развитие КС сопровождается модификациями плазматической мембраны (ПМ). Липидный состав ПМ старых клеток, а также ее биофизические, химические и электрические свойства отличаются от свойств мембраны нормальных клеток. Так, ПМ стареющих клеток становится более жесткой и менее эластичной [60–62]. Более того, показано снижение количества липидных доменов, богатых сфингомиелином, при репликативном старении кератиноцитов [63]. При исследовании старения фибробластов было установлено снижение количества кавеол и, соответственно, кавеолина на поверхности ПМ [64]. Кроме свойств самой ПМ изменяется экспрессия связанных с ней белков, например, повышается экспрессия ICAM-1 [65]. Недавно было обнаружено, что в процессе старения фибробластов на поверхности ПМ возрастает экспрессия виментина, модифицированного малондиальдегидом по цистеину 328 (C328) [66]. Определен целый ряд белков, ассоциированных с ПМ, которые экспрессируются старыми клетками и потенциально могут использоваться для их идентификации, в частности: DEP, NTAL, EBP50, STX4, VAMP3, ARMX3, B2MG, LANCL1, VPS26A и PLD3 [67].

Стоит отметить, что данные о взаимосвязи КС и модификаций ПМ очень немногочисленны. При этом большая часть работ носит скорее описательный характер, нежели направлена на установление механизмов, опосредующих изменения, наблюдаемые в процессе КС. Интересное предположение сделано японскими учеными Копо и соавт. Согласно неопубликованным данным этих авторов повреждение ПМ может инициировать арест цикла в клетках млекопитающих. Так, обнаружили связь между формированием “шрама” в месте повреждения мембраны и репликативным старением клеток и ввели новое понятие старение,

зависимое от повреждения плазматической мембраны (plasma membrane damage-dependent).

#### 4. Ассоциированный со старением секреторный профиль

В течение длительного времени КС рассматривали исключительно с точки зрения ядерно-цитоплазматических модификаций. Позднее ученые обратили внимание на то, что по мере развития старения существенно меняется профиль секретируемых клетками факторов [68–71]. Так, значительно возрастает продукция цитокинов, хемокинов, матриксных металлопротеаз, кроме того, качественно и количественно изменяется продукция большинства ростовых факторов [68]. Профиль секретируемых стареющими клетками молекул получил название Senescence Messaging Secretome (SMS), или Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP) [68, 70]. Предполагается, что молекулы, секретируемые стареющими клетками, попадая во внеклеточное пространство, способны через аутокринный/паракринный пути воздействовать на соседние клетки [68–70]. Считается, что именно SASP опосредует участие стареющих клеток в самых разнообразных процессах, таких как репарация, распространение старения, иммунный клиренс, эмбриогенез и туморогенез [3, 72–75].

#### УНИЧТОЖИТЬ СТАРЕЮЩИЕ КЛЕТКИ

Как видно из предыдущего раздела, прогрессия КС сопровождается большим количеством модификаций, затрагивающих практически все внутриклеточные системы. Казалось бы, имея такой широкий диапазон изменений, выбрать подходящий маркер для таргетной терапии, направленной на элиминацию стареющих клеток, не должно составить особого труда. Однако в вопросе однозначной идентификации стареющих клеток *in vivo* возникает ряд сложностей. Стоит отметить, что не все из вышеупомянутых маркеров универсальны, более того, не все характерны исключительно для стареющих клеток. Так, например, все стареющие клетки находятся в состоянии необратимого ареста клеточного цикла, однако при этом не все экспрессируют p21<sup>Waf1/Cip1</sup> или p16<sup>INK4a</sup> [13, 76–78]. Интересно, что SA-β-Gal — наиболее распространенный и надежный маркер стареющих клеток, который не детектируется ни в покоящихся, ни в терминально дифференцированных клетках, может обнаруживаться в клетках, находящихся в состоянии плотного монослоя [79]. Конкретный состав факторов, секретируемых стареющими клетками, в значительной степени зависит от клеточного типа и от индуктора старения [68, 80–82]. Конденсация ДНК, сопровождающая арест клеточного цикла, появляется в основном в части

клеток, экспрессирующих p16<sup>INK4a</sup> [83]. Таким образом, в настоящее время не существует какого-то конкретного маркера, позволяющего надежно идентифицировать стареющие клетки в живом организме. Тем не менее в вопросе продления жизни стратегия направленного удаления стареющих клеток из организма рассматривается как весьма перспективная [11, 84, 85]. Ниже описаны наиболее распространенные маркеры, используемые для идентификации стареющих клеток *in vivo*, и разработанные на их основе подходы к таргетной элиминации этих клеток (рис. 2).

Исторически первым признаком, позволяющим идентифицировать стареющие клетки *in vivo*, стала SA-β-Gal. Активность этого фермента была обнаружена в биоптатах кожи человека и надежно коррелировала с возрастом донора [86]. Однако, учитывая, что детекция активности SA-β-Gal предполагает предварительную фиксацию и окрашивание образцов клеток или тканей, использование этого признака в качестве маркера для направленной элиминации стареющих клеток из организма не представляется возможным [87].

На сегодняшний день ключевым признаком стареющих клеток принято считать экспрессию ингибитора циклин-зависимых киназ p16<sup>INK4a</sup> [88]. Именно наличие p16<sup>INK4a</sup> в стареющих клетках легло в основу создания первой мышинной модели INK-АТТАС, позволяющей направленно удалять стареющие клетки из живого организма [89]. Суть этой модели заключается в получении линии трансгенных мышей, в клетках которых промотор Fabp4, опосредующий экспрессию особого слитого белка, содержащего неактивную каспазу-8, заменен на фрагмент промотора гена p16<sup>INK4a</sup> (рис. 2). В этом случае одновременно с инициацией экспрессии p16<sup>INK4a</sup> в клетках запускается экспрессия неактивной каспазы-8. Последующее добавление особого агента AP20187 приводит к активации каспазы-8 и, соответственно, к направленному удалению p16<sup>INK4a</sup>-положительных клеток из организма.

Чуть позднее на основе экспрессии p16<sup>INK4a</sup> в стареющих клетках была разработана еще одна мышинная модель p16–3MR, позволяющая направленно удалять стареющие клетки *in vivo* [73]. В этой модели под промотор гена p16<sup>INK4a</sup> помещена последовательность, кодирующая трехдоменный слитый белок, содержащий укороченную тимидинкиназу вируса простого герпеса типа 1 (HSV-TK) (рис. 2). Добавление особого антигерпесного агента ганцикловира, сродство которого к вирусному ферменту на два порядка больше, чем к тимидинкиназе клеток хомяка, приводит к запуску гибели клеток, экспрессирующих p16<sup>INK4a</sup>. Молекулярный механизм гибели опосредован способностью HSV-TK фосфорилировать



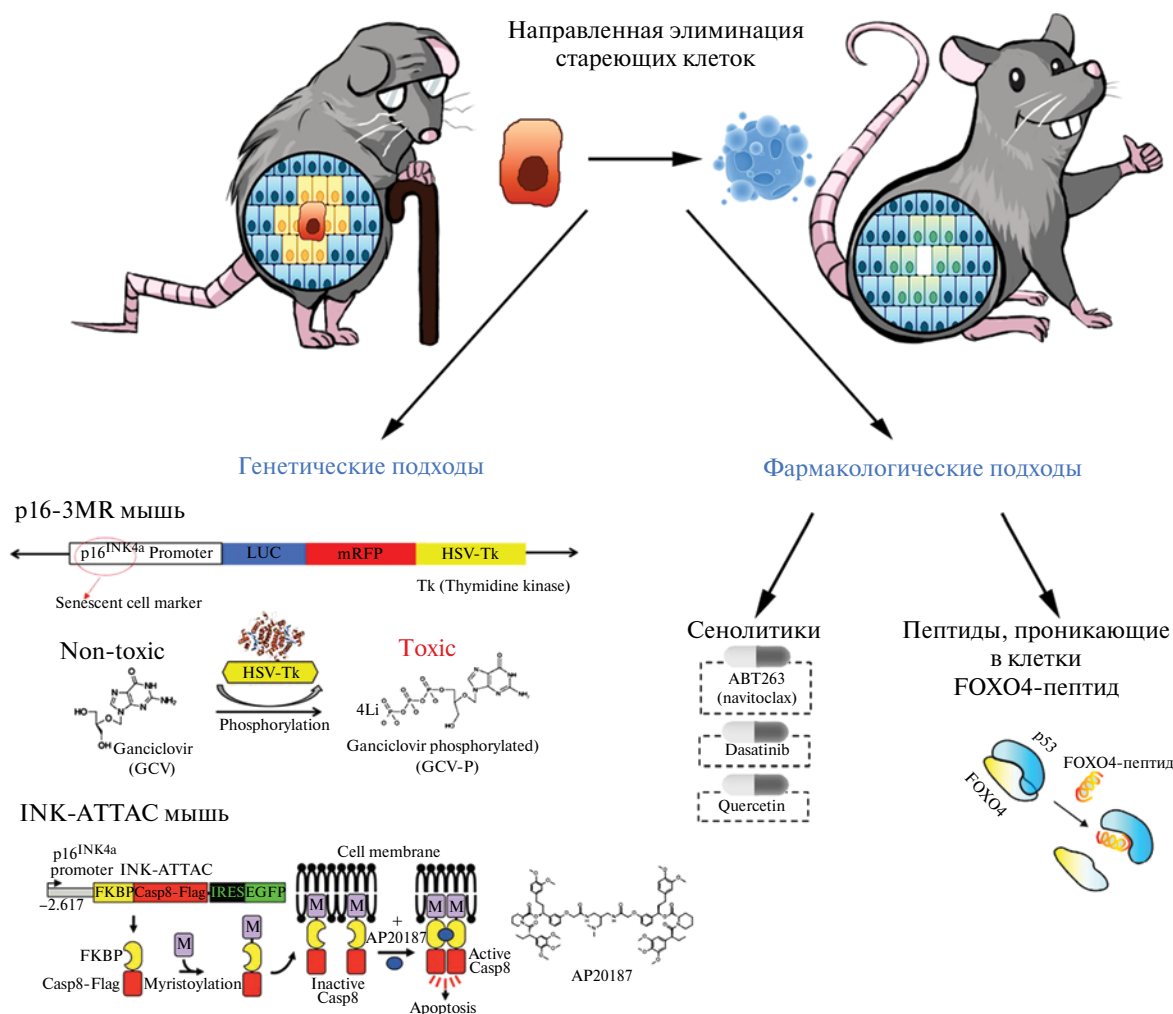


Рис. 2. Подходы к направленной элиминации стареющих клеток из организма.

ганцикловир, который, благодаря работе клеточных киназ, превращается в трифосфат и включается в синтезирующуюся цепь ДНК, завершая таким образом процесс репликации.

При направленном удалении p16<sup>INK4a</sup>-положительных клеток из организма получены весьма впечатляющие результаты. Оказалось, что элиминация стареющих клеток предотвращает прогрессию возраст-ассоциированных патологий у молодых животных и замедляет у старых. Так, например, показано увеличение диаметра мышечных фибрилл, повышение выносливости, утолщение подкожного жирового слоя, более отсроченное появление таких старческих изменений, как искривление позвоночника и катаракта [89]. Кроме того, установлено, что локальное удаление стареющих клеток препятствует развитию посттравматического артрита и создает благоприятное микроокружение для регенерации [90]. Таким образом, удаление стареющих клеток способствует

улучшению здоровья и продлению активной жизни мышей [84, 89, 90].

Данные, полученные с использованием генетических конструкций, вдохновили исследователей на разработку альтернативных вариантов удаления стареющих клеток из организма с помощью фармакологических агентов [85, 91–94]. Одним из важнейших следствий КС является чрезвычайная устойчивость стареющих клеток к гибели. Анализ сигнальных путей, обеспечивающих выживаемость стареющих клеток и, соответственно, их высокую устойчивость к апоптозу, лег в основу разработки особого класса соединений, получившего название сенолитики [92]. В частности, к таким соединениям относятся агенты АВТ-263 (навитоклакс) и АВТ-737 – специфические ингибиторы антиапоптотических белков BCL-2 и BCL-XL, селективно убивающие стареющие клетки посредством индукции в них апоптоза [93, 94]. Оказалось, что пероральное введение АВТ263



старым или облученным мышам приводит к эффективному удалению стареющих клеток, включая стареющие гемопоэтические стволовые клетки костного мозга, и таким образом способствует омоложению организма, улучшению функционирования сердечно-сосудистой системы, увеличению выносливости и снижению остеопороза [91]. Кроме того, обнаружено положительное влияние и других сенолитиков, включая дазатиниб — ингибитор киназ семейства Src, и кверцетин — ингибитор сигнального пути PI3K [91, 92]. Комбинация этих соединений приводит к продлению активной жизни мышей, способствует улучшению функции сердца, восстановлению реактивности сонной артерии, снижению остеопороза и препятствует потере протеогликанов в межпозвоночных дисках [92].

Помимо сенолитиков, для запуска направленной гибели стареющих клеток активно разрабатывается другой класс соединений — пептиды, проникающие в клетки. Эти пептиды могут блокировать конкретные белок-белковые взаимодействия, не влияя при этом на активность самих белков, что позволяет очень тонко регулировать специфические сигнальные события. Сравнительно недавно обнаружена ключевая роль FOXO4 в выживаемости стареющих клеток [85]. На основании этих данных разработан особый пептид, препятствующий взаимодействию FOXO4 с p53, в результате чего в стареющих клетках накапливается p53 в цитоплазме и запускается апоптоз. Использование такого FOXO4-пептида *in vivo* препятствует выпадению волос и способствует улучшению общего состояния мышей Xpd<sup>TTD/TTD</sup> с синдромом преждевременного старения [85].

Несмотря на положительные результаты направленного удаления стареющих клеток, каждый из подходов имеет существенные ограничения. Например, при улучшении качества жизни так и не удалось увеличить продолжительность жизни мышей INK-АТТАС [89]. Более того, таргетная элиминация, основанная на экспрессии p16<sup>INK4a</sup>, не работает в тех тканях, где КС развивается независимо от p16<sup>INK4a</sup>, в частности в печени [89]. При использовании мышинной модели p16-3MR обнаружили, что удаление стареющих клеток препятствует нормальному заживлению ран [73]. Применение сенолитиков также имеет ряд недостатков. До сих пор не найдено соединение, способное эффективно удалять стареющие клетки во всех тканях организма. Дазатиниб уничтожает стареющие клетки преимущественно в жировой ткани, а кверцетин более эффективен в отношении стареющих клеток пуповины человека [92]. При использовании навитоклакса и других ингибиторов членов семейства BCL необходимо помнить, что помимо стареющих

клеток, в организме эти белки экспрессируются в большинстве других типов клеток. Поэтому эти соединения не являются селективными, что может приводить к нежелательным побочным эффектам. Показано, что навитоклакс может вызывать тяжелую форму тромбоцитопении [85]. И, наконец, нерешенным остается еще один вопрос: принимая во внимание, что КС является эффективным противоопухолевым механизмом, не повысится ли риск возникновения опухолей при направленной элиминации стареющих клеток. Многообещающие результаты, полученные при таргетном удалении стареющих клеток, указывают на потенциальную возможность направленной модуляции процесса старения, однако приведенные выше ограничения свидетельствуют о необходимости дальнейших исследований в этой области.

Авторы выражают глубокую благодарность М.Ю. Сироткиной за помощь в оформлении рисунков к статье.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-50-00068).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lopez-Otin C., Blasco M., Partridge L., Serrano M., Kroemer G. 2013. The hallmarks of aging. *Cell*. **153**, 1194–1217.
2. Muñoz-Espín D., Serrano M. 2014. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 482–496.
3. Muñoz-Espín D., Cañamero M., Maraver A., Gómez-López G., Contreras J., Murillo-Cuesta S., Rodríguez-Baeza A., Varela-Nieto I., Ruberte J., Collado M., Serrano M. 2013. Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell*. **155**, 1104–1118.
4. Campisi J., d'Adda di Fagagna F. 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 729–740.
5. Campisi J. 2001. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell. Biol.* **11**, S27–S31.
6. Lowe S., Cepero E., Evan G. 2004. Intrinsic tumour suppression. *Nature*. **432**, 307–315.
7. Campisi J. 2005. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*. **120**, 513–522.
8. Sagiv A., Krizhanovsky V. 2013. Immunosurveillance of senescent cells: the bright side of the senescence program. *Biogerontol.* **14**, 617–628.
9. Franceschi C., Campisi J. 2014. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to

- age-associated diseases. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **69**, S4–S9.
10. Ocampo A., Reddy P., Martinez-Redondo P., Platero-Luengo A., Hatanaka F., Hishida T., Li M., Lam D., Kurita M., Beyret E., Araoka T., Vazquez-Ferrer E., Donoso D., Roman J., Xu J., Rodriguez Esteban C., Nuñez G., Nuñez Delicado E., Campistol J., Guillen I., Guillen P., Izpisua Belmonte J. 2016. *In vivo* amelioration of age-associated hallmarks by partial reprogramming. *Cell*. **167**, 1719–1733.
  11. Soto-Gamez A., Demaria M. 2017. Therapeutic interventions for aging: the case of cellular senescence. *Drug Discov. Today*. **22**, 786–795.
  12. Hayflick L. 1965. The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **37**, 614–636.
  13. Serrano M., Lin A., McCurrach M., Beach D., Lowe S. 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*. **88**, 593–602.
  14. Toussaint O., Medrano E., von Zglinicki T. 2000. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp. Gerontol.* **35**, 927–945.
  15. Roninson I. 2003. Tumor cell senescence in cancer treatment. *Cancer Res.* **63**, 2705–2715.
  16. Burova E., Borodkina A., Shatrova A., Nikolsky N. 2013. Sublethal oxidative stress induces the premature senescence of human mesenchymal stem cells derived from endometrium. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2013**, 474931.
  17. Fridlyanskaya I., Alekseenko L., Nikolsky N. 2015. Senescence as a general cellular response to stress: A mini-review. *Exp. Gerontol.* **72**, 124–128.
  18. d'Adda di Fagagna F. 2008. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat. Rev. Cancer*. **8**, 512–522.
  19. Borodkina A., Shatrova A., Abushik P., Nikolsky N., Burova E. 2014. Interaction between ROS dependent DNA damage, mitochondria and p38 MAPK underlies senescence of human adult stem cells. *Aging*. **6**, 481–495.
  20. Rodier F., Muñoz D., Teachenor R., Chu V., Le O., Bhaumik D., Coppé J., Campeau E., Beauséjour C., Kim S., Davalos A., Campisi J. 2011. DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *J. Cell Sci.* **124**, 68–81.
  21. Herbig U., Ferreira M., Condel L., Carey D., Sedivy J. 2006. Cellular senescence in aging primates. *Science*. **311**, 1257.
  22. Mao Z., Ke V., Gorbunova V., Seluanov A. 2012. Replicatively senescent cells are arrested in G1 and G2 phases. *Aging*. **4**, 431–435.
  23. Gire V., Dulic V. 2015. Senescence from G2 arrest, revisited. *Cell Cycle*. **14**, 297–304.
  24. Krenning L., Feringa F., Shaltiel I., van den Berg J., Medema R. 2014. Transient activation of p53 in G2 phase is sufficient to induce senescence. *Mol. Cell*. **55**, 59–72.
  25. Berdyshev G., Korotaev G., Boiarskikh G., Vaniushin B. 1967. Nucleotide composition of DNA and RNA from somatic tissues of humpback and its changes during spawning. *Biokhimiia*. **32**, 988–993.
  26. Jung M., Pfeifer G. 2015. Aging and DNA methylation. *BMC Biol.* **13**, 7.
  27. De Cecco M., Criscione S., Peckham E., Hillenmeyer S., Hamm E., Manivannan J., Peterson A., Kreiling J., Neretti N., Sedivy J. 2013. Genomes of replicatively senescent cells undergo global epigenetic changes leading to gene silencing and activation of transposable elements. *Aging Cell*. **12**, 247–256.
  28. Wagner W., Fernandez-Rebollo E., Frobel J. 2016. DNA-methylation changes in replicative senescence and aging: two sides of the same coin? *Epigenomics*. **8**, 1–3.
  29. Mehta I., Figgitt M., Clements C., Kill I., Bridger J. 2007. Alterations to nuclear architecture and genome behavior in senescent cells. *Ann. NY Acad. Sci.* **1100**, 250–263.
  30. Galluzzi L., Vitale I., Kepp O., Kroemer G. 2013. *Cell senescence. Methods and protocols*. NY: Springer Science+Business Media, LLC. 538 p.
  31. Ludérus M., van Steensel B., Chong L., Sibon O., Creemers F., de Lange T. 1996. Structure, subnuclear distribution, and nuclear matrix association of the mammalian telomeric complex. *J. Cell Biol.* **135**, 867–881.
  32. Pearson M., Carbone R., Sebastiani C., Cioce M., Fagioli M., Saito S., Higashimoto Y., Appella E., Minucci S., Pandolfi P., Pelicci P. 2000. PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature*. **406**, 207–210.
  33. Freund A., Laberge R., Demaria M., Campisi J. 2012. Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Mol. Biol. Cell*. **23**, 2066–2075.
  34. Shah P., Donahue G., Otte G., Capell B., Nelson D., Cao K., Aggarwala V., Cruickshanks H., Rai T., McBryan T., Gregory B., Adams P., Berger S. 2013. Lamin B1 depletion in senescent cells triggers large-scale changes in gene expression and the chromatin landscape. *Genes Dev.* **27**, 1787–1799.
  35. Righolt C., van 't Hoff M., Vermolen B., Young I., Raz V. 2011. Robust nuclear lamina-based cell classification of aging and senescent cells. *Aging*. **3**, 1192–1201.
  36. Abdelmohsen K., Gorospe M. 2015. Noncoding RNA control of cellular senescence. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*. **6**, 615–629.
  37. Kuilman T., Michaloglou C., Mooi W., Peeper D. 2010. The essence of senescence. *Genes Dev.* **24**, 2463–2479.
  38. Mayer C., Grummt I. 2006. Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all

- three classes of nuclear RNA polymerases. *Oncogene*. 25, 6384–6391.
39. Demidenko Z., Zubova S., Bukreeva E., Pospelov V., Pospelova T., Blagosklonny M. 2009. Rapamycin decelerates cellular senescence. *Cell Cycle*. 8, 1888–1895.
40. Nishimura K., Kumazawa T., Kuroda T., Katagiri N., Tsuchiya M., Goto N., Furumai R., Murayama A., Yanagisawa J., Kimura K. 2015. Perturbation of ribosome biogenesis drives cells into senescence through 5S RNP-mediated p53 activation. *Cell Rep*. 10, 1310–1323.
41. Chondrogianni N., Stratford F., Trougakos I., Friguet B., Rivett A., Gonos E. 2003. Central role of the proteasome in senescence and survival of human fibroblasts: induction of a senescence-like phenotype upon its inhibition and resistance to stress upon its activation. *J. Biol. Chem*. 278, 28026–28037.
42. Matjusaitis M., Chin G., Sarnoski E., Stolzing A. 2016. Biomarkers to identify and isolate senescent cells. *Ageing Res. Rev*. 29, 1–12.
43. Georgakopoulou E., Tsimaratou K., Evangelou K., Fernandez Marcos P., Zoumpourlis V., Trougakos I., Kletsas D., Bartek J., Serrano M., Gorgoulis V. 2013. Specific lipofuscin staining as a novel biomarker to detect replicative and stress-induced senescence. A method applicable in cryo-preserved and archival tissues. *Ageing*. 5, 37–50.
44. Carmona-Gutierrez D., Hughes A., Madeo F., Ruckenstein C. 2016. The crucial impact of lysosomes in aging and longevity. *Ageing Res. Rev*. 32, 2–12.
45. Tai H., Wang Z., Gong H., Han X., Zhou J., Wang X., Wei X., Ding Y., Huang N., Qin J., Zhang J., Wang S., Gao F., Chrzanoska-Lightowlers Z., Xiang R., Xiao H. 2017. Autophagy impairment with lysosomal and mitochondrial dysfunction is an important characteristic of oxidative stress-induced senescence. *Autophagy*. 13, 99–113.
46. Chondrogianni N., Trougakos I., Kletsas D., Chen Q., Gonos E. 2008. Partial proteasome inhibition in human fibroblasts triggers accelerated M1 senescence or M2 crisis depending on p53 and Rb status. *Ageing Cell*. 7, 717–732.
47. Dimri G., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E., Linskens M., Rubelj I., Pereira-Smith O. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92, 9363–9367.
48. Correia-Melo C., Passos J. 2015. Mitochondria: Are they causal players in cellular senescence? *Biochim. Biophys. Acta*. 1847, 1373–1379.
49. Passos J., Nelson G., Wang C., Richter T., Simillion C., Proctor C., Miwa S., Olijslagers S., Hallinan J., Wipat A., Saretzki G., Rudolph K., Kirkwood T., von Zglinck. 2010. Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Mol. Syst. Biol*. 6, 347.
50. McCarthy D., Clark R., Bartling T., Trebak M., Melendez J. 2013. Redox control of the senescence regulator interleukin-1 $\alpha$  and the secretory phenotype. *J. Biol. Chem*. 288, 32149–32159.
51. Yu X., Li X., Jiang G., Wang X., Chang H., Hsu W., Li Q. 2013. Isradipine prevents rotenone-induced intracellular calcium rise that accelerates senescence in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neuroscience*. 246, 243–253.
52. Wiel C., Lallet-Daher H., Gitenay D., Gras B., Le Calvé B., Augert A., Ferrand M., Prevarskaya N., Simonnet H., Vindrieux D., Bernard D. 2014. Endoplasmic reticulum calcium release through ITPR2 channels leads to mitochondrial calcium accumulation and senescence. *Nat. Comm*. 5, 3792.
53. Han X., Tai H., Wang X., Wang Z., Zhou J., Wei X., Ding Y., Gong H., Mo C., Zhang J., Qin J., Ma Y., Huang N. Xiang R., Xiao H. 2016. AMPK activation protects cells from oxidative stress induced senescence via autophagic flux restoration and intracellular NAD<sup>+</sup> elevation. *Ageing Cell*. 15, 416–427.
54. Borodkina A., Shatrova A., Deryabin P., Griukova A., Abushik P., Antonov S., Nikolsky N., Burova E. 2016. Calcium alterations signal either to senescence or to autophagy induction in stem cells upon oxidative stress. *Ageing*. 8, 3400–3418.
55. Mueller A., Schäfer B., Ferrari S., Weibel M., Makek M., Höchli M., Heizmann C. 2005. The calcium binding protein S100A2 interacts with p53 and modulates its transcriptional activity. *J. Biol. Chem*. 180, 29186–29193.
56. Sergiev P., Dontsova O., Berezkin G. 2015. Theories of aging: an ever-evolving field. *Acta Naturae*. 7, 9–20.
57. Flor A., Kron S. 2016. Lipid-derived reactive aldehydes link oxidative stress to cell senescence. *Cell. Death Dis*. 7, e2366.
58. Stadtman E., Levine R. 2000. Protein oxidation. *Ann. NY Acad. Sci*. 2000, 899, 191–208.
59. Nyström T. 2005. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J*. 24, 1311–1317.
60. Fulop T., Le Page A., Garneau H., Azimi N., Baehl S., Dupuis G., Pawelec G., Larbi A. 2012. Aging, immunosenescence and membrane rafts: the lipid connection. *Longev. Healthspan*. 1, 6.
61. Pontes B., Ayala Y., Fonseca A., Romão L., Amaral R., Salgado L., Lima F., Farina M., Viana N., Moura-Neto V., Nussenzweig H. 2013. Membrane elastic properties and cell function. *PLoS One*. 8, e67708.
62. Momchilova A., Petkova D., Staneva G., Markovska T., Pankov R., Skrobanska R., Nikolova-Karakashian M., Koumanov K. 2013. Resveratrol alters the lipid composition, metabolism and peroxide level in senescent rat hepatocytes. *Chem. Biol. Interact*. 207, 74–80.

63. Mounda A., Lozanovaa V., Warnonb C., Hermanta M., Robicc J., Guerec C., Viec K., de Rouvroita C., Tytecad D., Debacq-Chainiaux F., Poumay Y. 2017. Non-senescent keratinocytes organize in plasma membrane submicrometric lipid domains enriched in sphingomyelin and involved in reepithelialization. *BBA – Mol. and Cell. Biol. of Lipids*. 1862, 958–971.
64. Wheaton K., Sampsel K., Boisvert F., Davy A., Robbins S., Riabowol K. 2001. Loss of functional caveolae during senescence of human fibroblasts. *J. Cell Physiol.* 187, 226–235.
65. Schnabl B., Purbeck C., Choi Y., Hagedorn C., Brenner D. 2003. Replicative senescence of activated human hepatic stellate cells is accompanied by a pronounced inflammatory but less fibrogenic phenotype. *Hepatology*. 37, 653–664.
66. Frescas D., Roux C., Aygun-Sunar S., Gleiberman A., Krasnov P., Kurnasov O., Strom E., Virtuoso L., Wrobel M., Osterman A.L., Antoch M., Mett V., Chernova O., Gudkov A. 2017. Senescent cells expose and secrete an oxidized form of membrane-bound vimentin as revealed by a natural polyreactive antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 114, E1668–E1677.
67. Althubiti M., Lezina L., Carrera S., Jukes-Jones R., Giblett S., Antonov A., Barlev N., Saldanha G., Pritchard C., Cain K., Macip S. 2014. Characterization of novel markers of senescence and their prognostic potential in cancer. *Cell Death Dis.* 5, e1528.
68. Coppe J., Patil C., Rodier F., Sun Y., Munoz D., Goldstein J., Nelson P., Desprez P., Campisi J. 2008. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-non-autonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol.* 6, 2853–2868.
69. Fumagalli M., d'Adda di Fagagna F. 2009. SASPense and DDRama in cancer and ageing. *Nat. Cell Biol.* 11, 921–923.
70. Kuilman T., Peeper D.S. 2009. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nat. Rev. Cancer.* 9, 81–94.
71. Adams P., Sedivy J. 2010. *Cellular Senescence and Tumor Suppression*. Springer Science+Business Media. 272 p.
72. Iannello A., Thompson T., Ardolino M., Lowe S., Raullet D. 2010. p53-dependent chemokine production by senescent tumor cells supports NKG2D-dependent tumor elimination by natural killer cells. *J. Exp. Med.* 210, 2057–2069.
73. Demaria M., Ohtani N., Youssef S., Rodier F., Tousseint W., Mitchell J., Laberge R., Vijg J., Van Steeg H., Dolle M., Hoeijmakers J., Bruin A., Hara E., Campisi J. 2014. An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev. Cell.* 31, 722–733.
74. Parrinello S., Coppe J., Krtolica A., Campisi J. 2005. Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *J. Cell Sci.* 118, 485–496.
75. Acosta J., Banito A., Wuestefeld T., Georgilis A., Janich P., Morton J., Athineos D., Kang T., Lasitschka F., Andrulis M., Pascual G., Morris K., Khan S., Jin H., Dharmalingam G., Snijders A., Carroll T., Capper D., Pritchard C., Inman G., Longerich T., Sansom O., Benitah S., Zender L., Gil J. 2013. A complex secretory program orchestrated by the inflammatory controls paracrine senescence. *Nat. Cell Biol.* 15, 978–990.
76. Di Leonardo A., Linke S., Clarkin K., Wahl G. 1994. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cipl in normal human fibroblasts. *Genes Dev.* 8, 2540–2551.
77. Brown J., Wei W., Sedivy J. 1997. Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science*. 277, 831–834.
78. Galanos P., Vougas K., Walter D., Polyzos A., Maya-Mendoza A., Haagenzen E., Kokkalis A., Roumelioti F., Gagos S., Tzetzis M., Canovas B., Igea A., Ahuja A., Zellweger R., Havaki S., Kanavakis E., Kletsas D., Roninson I., Garbis S., Lopes M., Nebreda A., Thanos D., Blow J., Townsend P., Sørensen C., Bartek J., Gorgoulis V. 2016. Chronic p53-independent p21 expression causes genomic instability by deregulating replication licensing. *Nat. Cell Biol.* 18, 777–789.
79. Severino J., Allen R., Balin S., Balin A., Cristofalo V. 2000. Is beta-galactosidase staining a marker of senescence in vitro and in vivo? *Exp. Cell Res.* 257, 162–171.
80. Coppé J., Rodier F., Patil C., Freund A., Desprez P., Campisi J. 2011. Tumor suppressor and aging biomarker p16(INK4a) induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype. *J. Biol. Chem.* 286, 36396–36403.
81. Correia-Melo C., Marques F., Anderson R., Hewitt G., Hewitt R., Cole J., Carroll B., Miwa S., Birch J., Merz A., Rushton M., Charles M., Jurk D., Tait S., Czapiewski R., Greaves L., Nelson G., Bohlooly-Y M., Rodriguez-Cuenca S., Vidal-Puig A., Mann D., Saretzki G., Quarato G., Green D., Adams P., von Zglinicki T., Korolchuk V., Passos J. 2016. Mitochondria are required for pro-ageing features of the senescent phenotype. *EMBO J.* 35, 724–742.
82. Wiley C., Velarde M., Lecot P., Liu S., Sarnoski E., Freund A., Shirakawa K., Lim H., Davis S., Ramanathan A., Gerencser A., Verdin E., Campisi J. 2016. Mitochondrial dysfunction induces senescence with a distinct secretory phenotype. *Cell Metab.* 23, 303–314.
83. Kosar M., Bartkova J., Hubackova S., Hodny Z., Lukas J., Bartek J. 2011. Senescence-associated heterochromatin foci are dispensable for cellular senescence, occur in a cell type- and insult-dependent manner and follow expression of p16(ink4a). *Cell Cycle*. 10, 457–468.
84. Baker D., Childs B., Durik M., Wijers M., Sieben C., Zhong J., Saltness R., Jeganathan K., Verzosa G.,

- Pezeshki A., Khazaie K., Miller J., van Deursen J. 2016. Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature*. **530**, 184–189.
85. Baar M., Brandt R., Putavet D., Klein J., Derks K., Bourgeois B., Stryeck S., Rijksen Y., van Willigenburg H., Feijtel D., van der Pluijm I., Essers J., van Cappellen W., van Jcken W., Houtsmuller A., Pothof J., de Bruin R., Madl T., Hoeijmakers J. Campisi J., de Keizer P. 2017. Targeted apoptosis of senescent cells restores tissue homeostasis in response to chemotoxicity and aging. *Cell*. **169**, 132–147.
  86. Dimri G., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E., Linskens M., Rubelj I., Pereira-Smith O., Peacocke M., Campisi J. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **92**, 9363–9367.
  87. Debacq-Chainiaux F., Erusalimsky J., Campisi J., Toussaint O. 2009. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and *in vivo*. *Nat. Protoc.* **4**, 1798–1806.
  88. Krishnamurthy J., Torrice C., Ramsey M., Kovalev G., Al-Regaiey K., Su L., Sharpless N. 2004. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J. Clin. Invest.* **114**, 1299–1307.
  89. Baker D., Wijshake T., Tchkonia T., LeBrasseur N., Childs B., van de Sluis B., Kirkland J., van Deursen J. 2001. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*. **479**, 232–236.
  90. Jeon O., Kim C., Laberge R., Demaria M., Rathod S., Vasserot A., Chung J., Kim D., Poon Y., David N., Baker D., van Deursen J., Campisi J., Elisseff J. 2017. Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. *Nat. Med.* **23**, 775–781.
  91. Chondrogianni N., Kapeta S., Chinou I., Vassilatou K., Papassideri I., Gonos E. 2010. Anti-ageing and rejuvenating effects of quercetin. *Exp. Gerontol.* **45**, 763–771.
  92. Zhu Y., Tchkonia T., Pirtskhalava T., Gower A., Ding H., Giorgadze N., Palmer A., Ikeno Y., Hubbard G., Lenburg M., O'Hara S., LaRusso N., Miller J., Roos C., Verzosa G., LeBrasseur N., Wren J., Farr J., Khosla S., Stout M., McGowan S., Fuhrmann-Stroissnigg H., Gurkar A., Zhao J., Colangelo D., Dorronsoro A., Ling Y., Barghouthy A., Navarro D., Sano T., Robbins P., Niedernhofer L., Kirkland J. 2015. The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell*. **14**, 644–658.
  93. Chang J., Wang Y., Shao L., Laberge R., Demaria M., Campisi J., Janakiraman K., Sharpless N., Ding S., Feng W., Luo Y., Wang X., Aykin-Burns N., Krager K., Ponnappan U., Hauer-Jensen M., Meng A., Zhou D. 2016. Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat. Med.* **22**, 78–83.
  94. Yosef R., Pilpel N., Tokarsky-Amiel R., Biran A., Ovadya Y., Cohen S., Vadai E., Dassa L., Shahar E., Condiotti R., Ben-Porath I., Krizhanovsky V. 2016. Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nat. Commun.* **7**, 11190.

## To Find and Destroy: Identification and Elimination of Senescent Cells

© 2018 г. А. В. Borodkina\*, P. I. Deryabin,  
А. А. Griukova, N. N. Nikolsky

*Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Tikhoretskii pr. 4, St. Petersburg, 194064 Russia*

*\*E-mail: borodkina618@gmail.com*

“Our oldness is a disease that has to be treated like any other”, – this statement formulated about a hundred years ago seems to be of current interest in the context of modern investigations. Recently, it has been established that accumulation of senescent cells in various organs and tissues is one of the main causes for the organism aging, as well as for the progression of multiple age-related pathologies. On the one hand, this observation brings us one step closer to the desired goal – reversal or slowing down of aging. On the other hand, this raises a number of complicated questions: in what essentially lies the difference between senescent and normal cells and how they can be identified/distinguished; whether senescent cells can be eliminated from the body and can this elimination stop/reverse aging; can such a targeted removal of senescent cells be accompanied by negative consequences, in particular, by an increase in the cancer incidence? This review summarizes the main features of senescent cells, surveys the existing approaches of targeted elimination of senescent cells *in vivo*, and highlights their advantages and disadvantages.

**Keywords:** cell senescence, identification of senescent cells, targeted elimination of senescent cells