

## МЕТФОРМИН ЗАМЕДЛЯЕТ ПРОЦЕССЫ СТАРЕНИЯ НА КЛЕТОЧНОМ УРОВНЕ У МЫШЕЙ ЛИНИИ SHR

© А. В. Аркадьева,<sup>1,3</sup> А. А. Мамонов,<sup>3</sup> И. Г. Попович,<sup>2</sup> В. Н. Анисимов,<sup>2</sup>  
В. М. Михельсон,<sup>1</sup> И. М. Спивак<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии РАН, <sup>2</sup> НИИ онкологии им. Н. Н. Петрова, Санкт-Петербург,  
и <sup>3</sup> С.-Петербургский государственный университет;  
<sup>3</sup> электронный адрес: asarkad@yandex.ru

Ранее было показано, что препарат метформин, не прямой ингибитор mTOR-киназы, значительно увеличивает среднюю (на 37.8 %) и максимальную (на 10.3 %) продолжительность жизни мышей линии SHR (Anisimov et al., 2008). В настоящей работе исследовали клеточные маркеры старения в фибробластах, выделенных из кожи мышей линии SHR различного возраста (11, 16, 19 и 23 мес), получавших метформин с 3-го и 9-го мес жизни. Обнаружено, что в фибробластах подопытных животных по сравнению с контролем уменьшаются среднее количество связанных со старением гетерохроматиновых фокусов (SAHF) в ядрах, средние значения площадей ядер и интенсивности флуоресценции ядер фибробластов при окраске антителами к фосфорилированной форме гистона H2AX ( $\gamma$ -H2AX). У контрольных животных выявляется большая доля фибробластов со значениями количества SAHF; активности, связанной со старением  $\beta$ -галактозидазы (SA- $\beta$ -gal), и интенсивности флуоресценции ядер после окраски антителами к  $\gamma$ -H2AX, существенно превышающими среднестатистический уровень этих значений в группе. В то же время в фибробластах всех животных, получавших метформин, уровень изученных маркеров старения близок к среднестатистическому в группе. Можно предположить, что появление в фибробластах контрольной группы превышающего среднестатистический уровень количества маркеров старения свидетельствует о необратимых клеточных изменениях, а накопление порогового количества «старых» клеток нарушает функционирование определенной ткани, органа, а затем и целого организма. Вероятно, метформин препятствует накоплению таких клеток и, таким образом, старению организма.

**Ключевые слова:** метформин, клеточное старение, рапамицин, TOR-киназа, геропротекторы.

Принятые сокращения: mTOR — mammalian target of rapamycin, AMPK — АМФ-активируемая серинтреониновая киназа, SAHF (senescence associated heterochromatic foci) — фокусы гетерохроматина, связанные со старением, SA- $\beta$ -gal — связанная со старением  $\beta$ -галактозидаза, IGF-1 — инсулиноподобный фактор роста-1,  $\gamma$ -H2AX — фосфорилированная форма гистона H2AX, ИФ — интенсивность флуоресценции.

Старение организма — сложный многоуровневый процесс, в котором старение индивидуальных клеток и тканей является важнейшим компонентом (см.: Анисимов, 2008).

mTOR-киназа — серинтреониновая протеинкиназа, регулирующая рост и пролиферацию клеток. Показано, что ингибирование TOR-сигналинга генетическим или фармакологическим путем приводит к продлению жизни дрожжей, а также беспозвоночных, в частности червей и мух (Vellai et al., 2003; Jia et al., 2004; Kapahi et al., 2004; Sharp, Bartke, 2005; Powers et al., 2006). На дрожжах, *Caenorhabditis elegans* и *Drosophila melanogaster* было получено подтверждение того, что ограничение калорийности питания, которое увеличивает продолжительность жизни почти у всех организмов от дрожжей до мыши, замедляет старение TOR-зависимым путем (Kaeberlein et al., 2005; Walker et al., 2005; Powers et al., 2006; Medvedik et al., 2007; Spindler, 2010).

Недавно на культурах клеток человека и грызунов было показано, что рапамицин (ингибитор mTOR) замед-

ляет старение клеток (Demidenko et al., 2009). В частности, на клетки действовали белками p21 и p16, что вызывало остановку клеточного цикла, но клеточный рост продолжался, что свидетельствует о вступлении клетки в старение. Однако присутствие рапамицина сохраняло способность клеток пролиферировать после изъятия этих белков из среды. Рапамицин переводил необратимую остановку клеточного цикла в обратимое состояние. На гибридных мышах, полученных скрещиванием двух различных линий, что позволяло избежать влияния генотипических различий, было показано, что рапамицин увеличивает продолжительность жизни этих животных (Harrison et al., 2009). Введение рапамицина трансгенным мышам HER-2/neu также увеличивало продолжительность их жизни и тормозило развитие аденокарцином молочной железы (Anisimov et al., 2010a).

Метформин — один из антидиабетических бигуанидов, которые в последние годы исследуются как миметики калорийно ограниченной диеты для увеличения продолжительности жизни (Anisimov et al., 2005b, 2010a;

Анисимов, 2008б). Метформин является непрямым ингибитором mTOR-киназы, действуя через АМФ-активируемую серинтреониновую киназу (АМРК) (Inoki et al., 2003; Corradetti et al., 2004; Shaw et al., 2004). Влияние на mTOR-киназу осуществляется через фосфорилирование и активацию TSC2 (tuberous sclerosis complex 2), являющегося субъединицей комплекса TSC1/TSC2 (hamartin/tuberin), негативно регулирующего mTOR-сигналинг (Shaw, 2009).

Эффективность метформина как геропротектора была ранее установлена в нескольких исследованиях. В работе Анисимова с соавторами на трансгенных мышцах HER-2/neu было показано, что метформин увеличивает среднюю продолжительность жизни на 8 %, у 10 % наиболее долгоживущих животных — на 13.1 %, и максимальную продолжительность жизни — на 1 мес (9.3 %) (Anisimov et al., 2005a, 2005b). В другой работе те же авторы показали, что длительное введение метформина мышам линии SHR уменьшает у них массу тела и замедляет связанное со старением выключение эстральной функции. Средняя продолжительность жизни этих животных увеличилась на 37.8 %, в то время как у 10 % наиболее долгоживущих животных — на 20.8 %, а максимальная продолжительность жизни — на 2.8 мес (10.3 %) по сравнению с контролем (Anisimov et al., 2008).

Действие метформина как геропротектора связано не только с mTOR-киназой. Метформин оказывает влияние на активность тех же генов, экспрессия которых изменяется при ограничении калорийности питания (Spindler, 2006). Это прежде всего гены, регулирующие метаболизм ксенобиотиков, клеточный стресс, энергетический обмен, биосинтез, передачу сигналов и цитоскелет. Имеются данные об антиокислительном эффекте антидиабетических бигуанидов, их прямом действии на митохондрии и их нейропротекторной активности (Анисимов, 2008а, 2008б).

Несмотря на прогресс в исследовании антидиабетических бигуанидов, в частности метформина, остается все же неясным вопрос о детальном механизме их влияния на продолжительность жизни.

Задачей настоящего исследования было выявить, какие изменения на клеточном уровне (в количестве маркеров старения) происходят в течение жизни животных, получавших метформин длительное время. Мы выделяли фибробласты из кожи мышей линии SHR, получавших метформин в течение жизни, а также из кожи мышей той же линии, не получавших его и использовавшихся в качестве контроля. В полученных первичных культурах фибробластов мы исследовали различные клеточные маркеры старения.

## Материал и методика

Для получения культуры первичных фибробластов использовали кончики хвостов мышей линии SHR, которых содержали в лаборатории канцерогенеза и старения НИИ онкологии им. Н. Н. Петрова, добавляя в питьевую воду начиная с возраста 3 или 9 мес в течение всей последующей жизни метформин в концентрации 100 мг/кг. Всего были исследованы образцы тканей мышей четырех возрастных групп животных — 11, 16, 19 и 23 мес. Все мыши были разделены на три категории: получавшие метформин с 3-го мес жизни (группа М1), с 9-го мес жизни (группа М2) и животные, которые не получали мет-

формина и использовались в качестве контроля (группа К).

Полученные с соблюдением правил стерильности фрагменты хвостов помещали сначала в стерильную пробирку со средой DMEM без сыворотки, но с добавлением антибиотиков-антимикотиков (200 ед./мл пенициллина, 200 мкг/мл стрептомицина и 50 мкг/мл фунгизона). Затем фрагменты хвостов переносили в чашку Петри в такую же питательную среду и механически измельчали до получения как можно более дисперсных фрагментов. Полученные таким образом кожные фрагменты помещали под покровное стекло в чашки Петри диаметром 3 см (Nunc-clon, США) и добавляли полную ростовую питательную среду DMEM с 16 % сыворотки эмбрионов коров, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 25 мкг/мл фунгизона и 0.3 мг/мл L-глутамин. Эксплантат кожи инкубировали, меняя питательную среду раз в 4—7 дней, до появления достаточного количества фибробластов. При получении монослоя фибробластов клетки снимали стандартным способом с помощью раствора Трипсин—EDTA, рассеивали на чашки Петри и культивировали в стандартных условиях. Выброс фибробластов начинался во всех вариантах от 3 до 5 сут после посева кожи хвоста. При введении этих культур мы не использовали ни трансформирующих агентов, ни дополнительных факторов роста.

Для окрашивания полученные клетки сажали на поверхность покровных стекол, помещенных в чашки Петри, затем не менее чем через 1 сут, по возможности после достижения клетками субконфлюэнтного состояния, проводили окраску на покровных стеклах с последующим помещением их на предметные стекла для микроскопирования.

Методика визуализации клеток с помощью окраски DAPI. Отмытые от ростовой среды клетки фиксировали 10 мин на льду 3.7%-ным раствором формальдегида в PBS. После отмытки проводили пермеабиллизацию 3%-ным раствором Triton X-100 в PBS. Отмытые клетки окрашивали 5 мин раствором DAPI в PBS (1 мг/мл) и заключали в антифейтинг (пропилгаллат).

Окраска X-Gal для визуализации клеток, содержащих SA- $\beta$ -галактозидазу. Отмытые от ростовой среды клетки фиксировали 10 мин на льду 3.7%-ным раствором формальдегида в PBS. После отмытки их окрашивали раствором X-Gal (1 мг на 1 мл буфера pH 6.0) в течение ночи при 37 °C. После отмытки образцы заключали в антифейтинг.

Визуализация SAHF окраской DAPI в низкой концентрации. Отмытые от ростовой среды клетки фиксировали 10 мин на льду 3.7%-ным раствором формальдегида в PBS. После отмытки проводили пермеабиллизацию 3%-ным раствором Triton X-100 в PBS. Отмытые клетки окрашивали 2 мин раствором DAPI в PBS в концентрации 0.13 мкг/мл и заключали в антифейтинг.

Визуализация фокусов  $\gamma$ -H2AX. Отмытые от ростовой среды клетки фиксировали 10 мин на льду 3.7%-ным раствором формальдегида в PBS, отмывали от фиксатора раствором PBS в течение 30 мин на качалке и пермеабиллизовали в течение 5 мин 3%-ным раствором Triton X-100 на PBS. Отмытые клетки инкубировали от 30 мин до 12 ч в 1%-ном растворе BSA на PBS, который также отмывали. Для визуализации фокусов  $\gamma$ -H2AX стекла инкубировали последовательно с мышинными моноклональными антителами против  $\gamma$ -H2AX и кроличьи-

ми антителами к мышинному IgG, конъюгированными с флуорофором FITC.

Определение доли клеток, уходящих в апоптоз после воздействия перекиси водорода. Клетки снимали с подложки раствором Трипсин—EDTA, доводили до концентрации 300 000 кл./мл, затем одну часть клеток в такой концентрации оставляли без воздействия, другую обрабатывали перекисью водорода в концентрациях 250 и 500 мМ. Обе группы клеток инкубировали 1 ч в термостате при 37 °С, окрашивали пропидием иодидом в концентрации 50 мкг/мл и определяли количество мертвых/живых клеток на проточном цитофлуориметре Epics XL (фирма BeckMan Coulter).

Оценку площади ядер фибробластов проводили после окраски клеток красителем DAPI с помощью анализатора изображений «Видеотест», который состоит из микроскопа АХИОРНОТ (Carl Zeiss), видеокамеры Baumer Ortonics, компьютера и программы «Видеотест — Размер 5.0». Всего для каждого животного было проанализировано по 100 клеток.

Анализ активности SA- $\beta$ -галактозидазы и подсчет количества SAHF в клетках проводили с помощью микроскопа АХИОСКОП, визуальную интенсивность окраски и количество фокусов в ядрах соотносительно. Для получения результатов по количеству SAHF в ядрах было подсчитано количество фокусов в индивидуальных ядрах клеток различных групп (100 ядер на вариант). Для анализа активности SA- $\beta$ -галактозидазы также анализировали по 100 клеток для каждого животного.

Количественный анализ фокусов  $\gamma$ -H2AX проводили с помощью программы ImageJ, было проанализировано по 100 ядер на вариант и измерена интенсивность флуоресценции (ИФ). Перед этим окрашенные клетки снимали на камеру на микроскопе АХИОСКОП.

При статистической обработке данных использовали пакет программ Statistica 6.0.

В работе использованы среда DMEM (Gibco, США), сыворотка эмбрионов коров (Gibco, США), пенициллин (Gibco, США), стрептомицин (Gibco, США), фунгизон (Gibco, США), L-глутамин (Gibco, США), Трипсин—EDTA (Gibco, США), формальдегид (Sigma, США), Triton X-100 (Биолот, Россия), DAPI (Invitrogen, США), пропилгаллат (Sigma, США), раствор X-Gal (Sigma, США), BSA (Sigma, США), мышинные моноклональные антитела против фосфорилированной формы гистона H2AX (Abcam, США), кроличьи антитела к мышинному IgG, конъюгированные с флуорофором FITC (Abcam, США).

## Результаты

Одним из наиболее популярных маркеров клеточного старения является показатель связанной со старением  $\beta$ -галактозидазной (SA- $\beta$ -gal) активности, которая фиксируется при pH 6.0 в клетках, находящихся в ситуации репликативного или индуцированного старения, но отсутствует в пролиферирующих клетках (Dimri et al., 1995). Активность SA- $\beta$ -gal обычно измеряется *in situ* с помощью хромогенного субстрата X-gal и традиционно используется как один из наиболее надежных, просто и быстро определяемых маркеров старения (Itahana et al., 2007).

При анализе клеток, окрашенных на SA- $\beta$ -gal, исследовали фибробласты, полученные из 19-месячных мышей. При подсчете числа положительных и отрицатель-

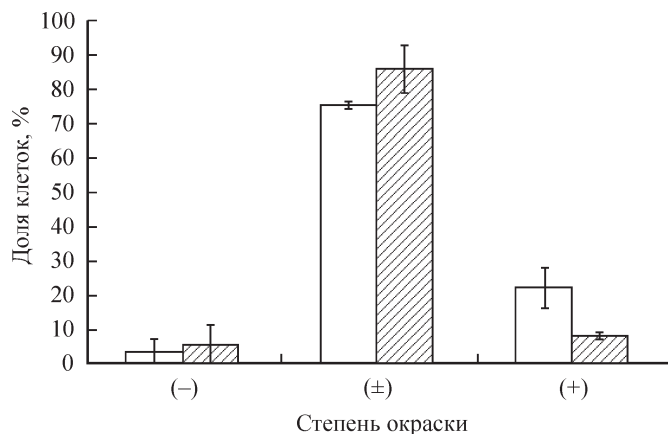


Рис. 1. Распределение степени окраски при визуализации клеток, содержащих SA- $\beta$ -gal.

Фибробласты получены из кожи двух групп 19-месячных мышей: контроль (белые столбцы) и мыши, получавшие метформин с 3-го мес жизни (заштрихованные столбцы). Все клетки по степени окраски были разделены на три группы: «-» — неокрашенные клетки, «±» — клетки со средней интенсивностью окраски, «+» — наиболее ярко окрашенные клетки.

ных клеток по SA- $\beta$ -gal не было получено достоверных различий: отрицательные (-) и положительные (+) клетки, K vs M1 соответственно 3.5 vs 5.5 % и 96.5 vs 94.5 %. Для более подробного анализа фибробласты были разделены на три группы: отрицательные клетки (-) по SA- $\beta$ -gal (эти клетки вообще никак не окрашивались), отрицательно/положительные клетки (±) по SA- $\beta$ -gal (клетки со средней интенсивностью окраски) и положительные клетки (+) по SA- $\beta$ -gal (к ним мы относили ярко окрашенные зеленые клетки). В результате в клетках мышей группы M1 было выявлено значительно меньше (по сравнению с контролем того же возраста) количество (+)-клеток (8.5 vs 22 %) и большее (±)-клеток (74.5 vs 86 %), т. е. метформин сдвигает распределение влево, уменьшая долю клеток с большой активностью SA- $\beta$ -gal (рис. 1).

Другим маркером клеточного старения является фосфорилированная форма гистона H2AX ( $\gamma$ -H2AX). Гистон H2AX является одним из известных вариантов корового гистона H2A, который в отличие от основного H2A и других коровых гистонов может быть встроено в хроматин в течение всех фаз клеточного цикла, а не только во время S-фазы. При повреждении ДНК или репликативном старении гистон H2AX может быть фосфорилирован протеинкиназой ATM по лизину в 139-м положении. Так как такое явление было впервые описано после действия  $\gamma$ -облучения, фосфорилированная форма гистона H2AX получила название  $\gamma$ -H2AX. К настоящему времени сложились представления о том, что  $\gamma$ -H2AX является одним из важнейших маркеров двухнитевых разрывов ДНК и нарушения конформации хроматина при старении (Scaffidi, Misteli, 2006).

При анализе количества  $\gamma$ -H2AX в ядрах фибробластов, полученных от 19-месячных мышей, было показано, что средняя ИФ в ядрах фибробластов мышей M1 и M2 достоверно отличается от контрольной группы (3272 vs 2857 vs 2676), однако эти различия невелики. Для более подробного анализа данного маркера старения были построены диаграммы боксплот, которые отражают размах изменения ИФ внутри каждой группы животных (рис. 2). Графики показывают, что в обеих подопытных группах максимальное значение, значения 25 и 75 перцентилей и

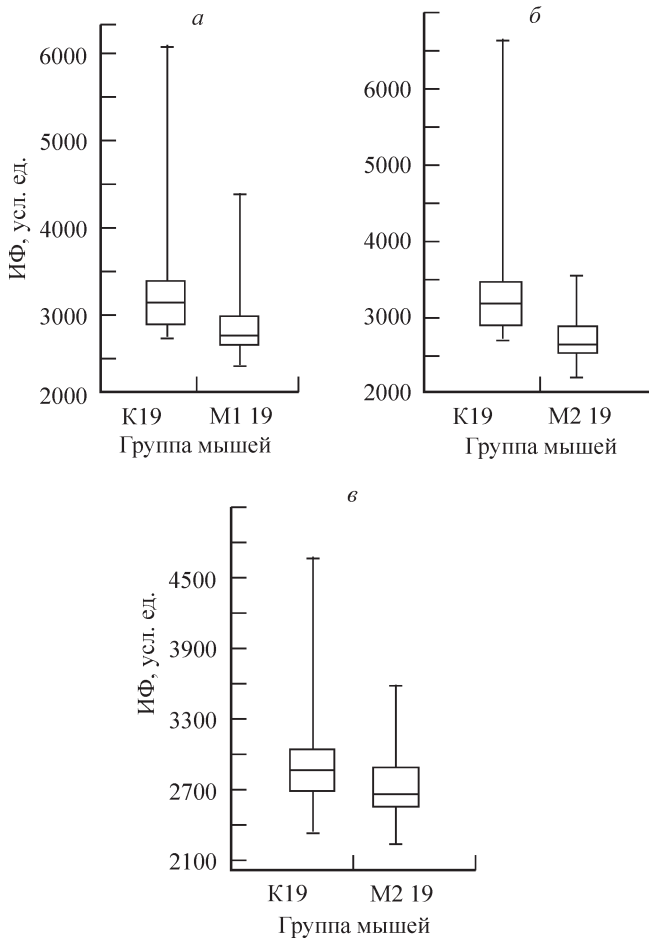


Рис. 2. ИФ при окраске фибробластов на  $\gamma$ -H2AX.

*a–в* — фибробласты получены из кожи трех групп 19-месячных мышей: контроль (К 19), мыши, получавшие метформин с 3-го мес жизни (M1 19), и мыши, получавшие метформин с 9-го мес жизни (M2 19).

медиа́на значительно ниже, чем в контроле (рис. 2, *a, б*). Метформин способствует накоплению «усредненных» клеток и препятствует появлению клеток с большим количеством фокусов  $\gamma$ -H2AX. Причем в клетках животных группы M2 это явление выражено значительно сильнее, чем в группе M1 (рис. 2, *в*). Различия между группами К и M1, К и M2 и M1 и M2 показаны с помощью непараметрических критериев Крускала—Уоллиса, Манна—Уитни и Смирнова ( $P < 0.05$ ).

Маркером старения также является формирование в ядрах стареющих клеток особых гетерохроматиновых структур, называемых ассоциированными со старением гетерохроматиновыми фокусами — SAHF. Образование этих структур связано с необратимой гетерохроматинизацией, ведущей к инактивации расположенных на этих участках ДНК генов. SAHF состоят из плотно упакованных гетерохроматиновых нитей и выявляются в виде ярко окрашенных глыбок ДНК при окрашивании красителем DAPI. В нормальных фибробластах человека в процессе ускоренного старения SAHF были впервые выявлены и описаны Наритой и соавторами (Narita et al., 2003), показавшими, что их формирование совпадает с Rb-зависимой конститутивной репрессией генов-мишеней транскрипционных факторов E2F.

Накопление SAHF было изучено в ядрах фибробластов 11, 16 и 19-месячных мышей. У 11- и 16-месяч-

ных мышей оценивали количество SAHF в группах К и M1, у 19-месячных — в группах К, M1 и M2.

При сравнении средних арифметических значений количества SAHF было показано, что с возрастом и в контрольной, и в подопытной группах содержание SAHF в ядрах фибробластов увеличивается. Однако в контрольной группе после 16 мес средний уровень SAHF в ядрах не изменяется и равен 19 (рис. 3, *a*). В подопытной группе после 16 мес среднее количество SAHF продолжает увеличиваться, но так и не достигает уровня 19-месячных мышей контрольной группы (рис. 3, *б*). Также было показано, что и в 11, и в 16, и в 19 мес среднее количество SAHF в фибробластах контрольной группы достоверно меньше, чем в фибробластах подопытной группы (рис. 3, *a, б*).

Для более полного представления данных были построены гистограммы, показывающие распределение фибробластов по классам в зависимости от количества SAHF в ядрах. Видно, что с возрастом во всех группах медиана распределения сдвигается вправо, а распределение становится более симметричным (рис. 4, *a, б*). Однако в контроле (рис. 4, *a*) после 16 мес жизни медиана и форма распределения практически не меняются (медианы при 11, 16 и 19 мес равны соответственно 8, 19 и 18; коэффициенты асимметрии при 11, 16 и 19 мес равны 1.46,  $-0.07$  и  $-0.05$ ). В подопытной группе (рис. 4, *б*) после 16 мес и медиана, и форма распределения продолжают изменяться (медианы в группе M1 равны 6, 13, 16 и для M2, 19 мес — 16; коэффициенты асимметрии в группе M1 равны 1.19, 0.95, 0.46 и для M2, 19 мес — 0.36). Метформин замедляет сдвиг распределения вправо, в сторону больших значений. Это также подтверждает и сравнение значений 25-го и 75-го перцентиля: в подопытной группе в каждой возрастной категории они ниже, чем в контроле того же возраста (значения 25 и 75 перцентиля, контроль vs метформин: 11 мес — 6 vs 4 и 10 vs 8; 16 мес — 15 vs 11 и 23 vs 16; 19 мес: M1 — 14 vs 13 и 22 vs 20 и M2 — 14 vs 14 и 22 vs 19). Возможно, для запуска старения на тканевом и организменном уровнях необходима определенная доля «старых» клеток. В контроле в 16 и 19 мес доля клеток с количеством SAHF больше 25 равна 12 %; видимо, этого достаточно для появления стареющего фенотипа. В подопытных группах доля клеток с количеством SAHF больше 25 в 16 мес равна 3 %, в 19 мес в группе M1 — 8 %, а в группе M2 — 4 %. Различия во всех приведенных случаях достоверны и показаны с помощью непараметрических

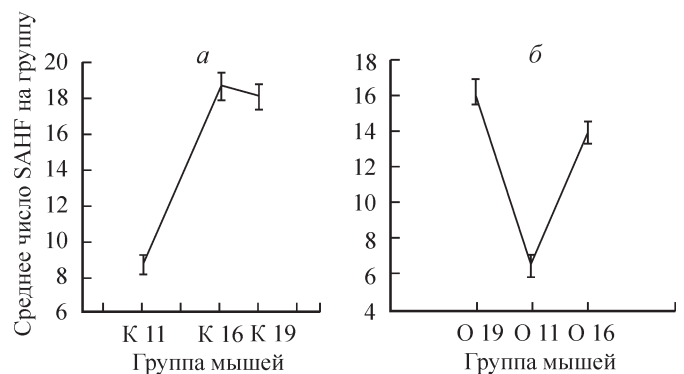


Рис. 3. Изменение среднего количества SAHF в зависимости от возраста внутри контрольной (*a*) и подопытной группы мышей, получавших метформин с 3-го мес жизни (*б*).

Три точки: 11 мес (К 11, О 11), 16 мес (К 16, О 16) и 19 мес (К 19, О 19).

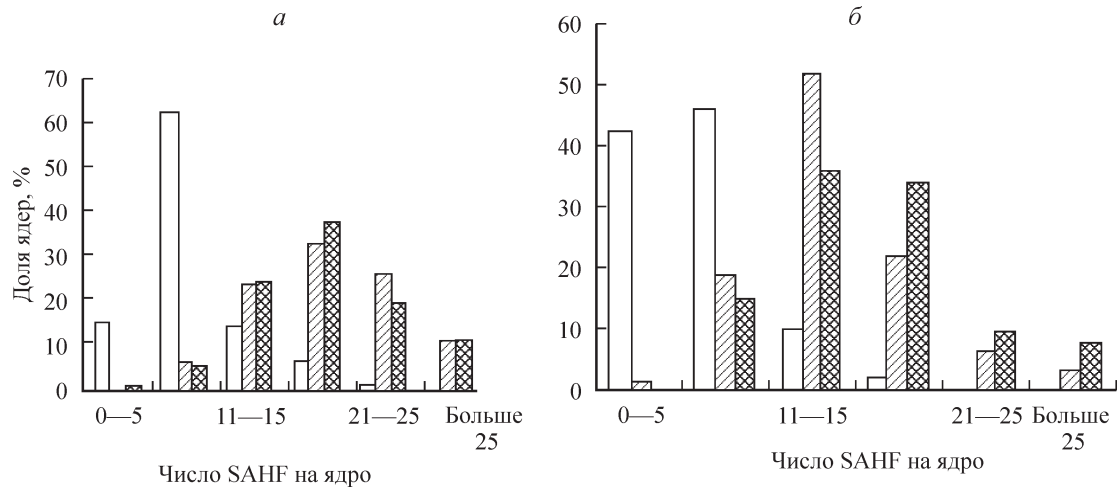


Рис. 4. Гистограмма распределения фибробластов по классам в зависимости от количества SAHF в ядрах контрольной (а) и подопытной (б) групп мышей, получавших метформин с 3-го мес жизни.

Белые столбцы — 11 мес, светлые столбцы — 16 мес и темные столбцы — 19 мес.

критериев Крускала—Уоллиса, Манна—Уитни и Смирнова ( $P < 0.05$ ).

Известно, что первичные нетрансформированные клеточные культуры изменяются с каждым пассажем. Время удвоения популяции возрастает, морфология клеток меняется, накапливаются различия между клетками. Если на ранних пассажах клетки были достаточно однородными, имеющими веретенообразную форму, то с увеличением продолжительности культивирования появляются более крупные, менее вытянутые округлые клетки, которые принято считать более старыми по сравнению с более мелкими молодыми. Постепенно более крупных клеток становится все больше, деление замедляется и практически останавливается (см.: Михельсон, 1984; Logenzini et al., 2005).

Поэтому наряду с изучением биохимических признаков и описанием изменения хроматина с помощью программы «Видеотест — Размер 5.0» были измерены площади ядер фибробластов, полученных от экспериментальных

животных. Показано, что в контрольной группе во всех возрастных категориях максимальное значение площади ядер существенно больше по сравнению с животными, получавшими метформин. В возрасте 11, 16 и 19 мес эти значения  $K$  vs  $M1$  соответственно составили 890 vs 448, 1530 vs 963, 958 vs 411 и для  $M2$ , 19 мес — 958 vs 1065. В контрольной группе животных межквартильный интервал и значение 75-го перцентиля больше по сравнению с подопытной группой того же возраста (значения 75-го перцентиля: 267 vs 185, 364 vs 248, 445 vs 218 и 445 vs 277 ( $M2$ , 19 мес)), причем в контроле с увеличением возраста значение 75-го перцентиля возрастает, тогда как в опыте практически не изменяется (рис. 5). Это также свидетельствует о том, что под влиянием метформина замедляется сдвиг распределения вправо, в сторону больших значений. В контрольной группе на гистограммах можно выделить два пика (второй пик — ядра с площадью больше 500 мкм), тогда как в подопытной группе виден только один пик (рис. 6). Доля ядер с площадью более 500 мкм в контрольной груп-

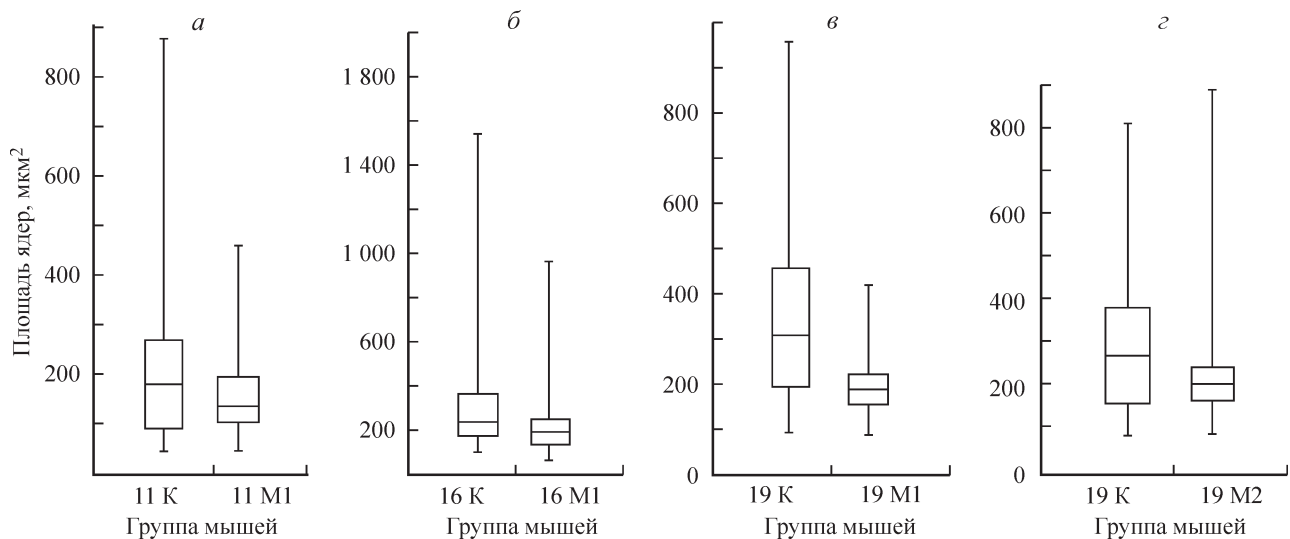


Рис. 5. Диаграммы box-plot (а—г) по количеству SAHF в ядрах фибробластов в контрольной группе мышей (К) и в подопытной группе мышей (M1 — получавших метформин с 3-го мес жизни и M2 — получавших метформин с 9-го мес жизни), в 11 мес (11 К, 11 M1), 16 мес (16 К, 16 M1) и 19 мес (19 К, 19 M1 и 19 M2).

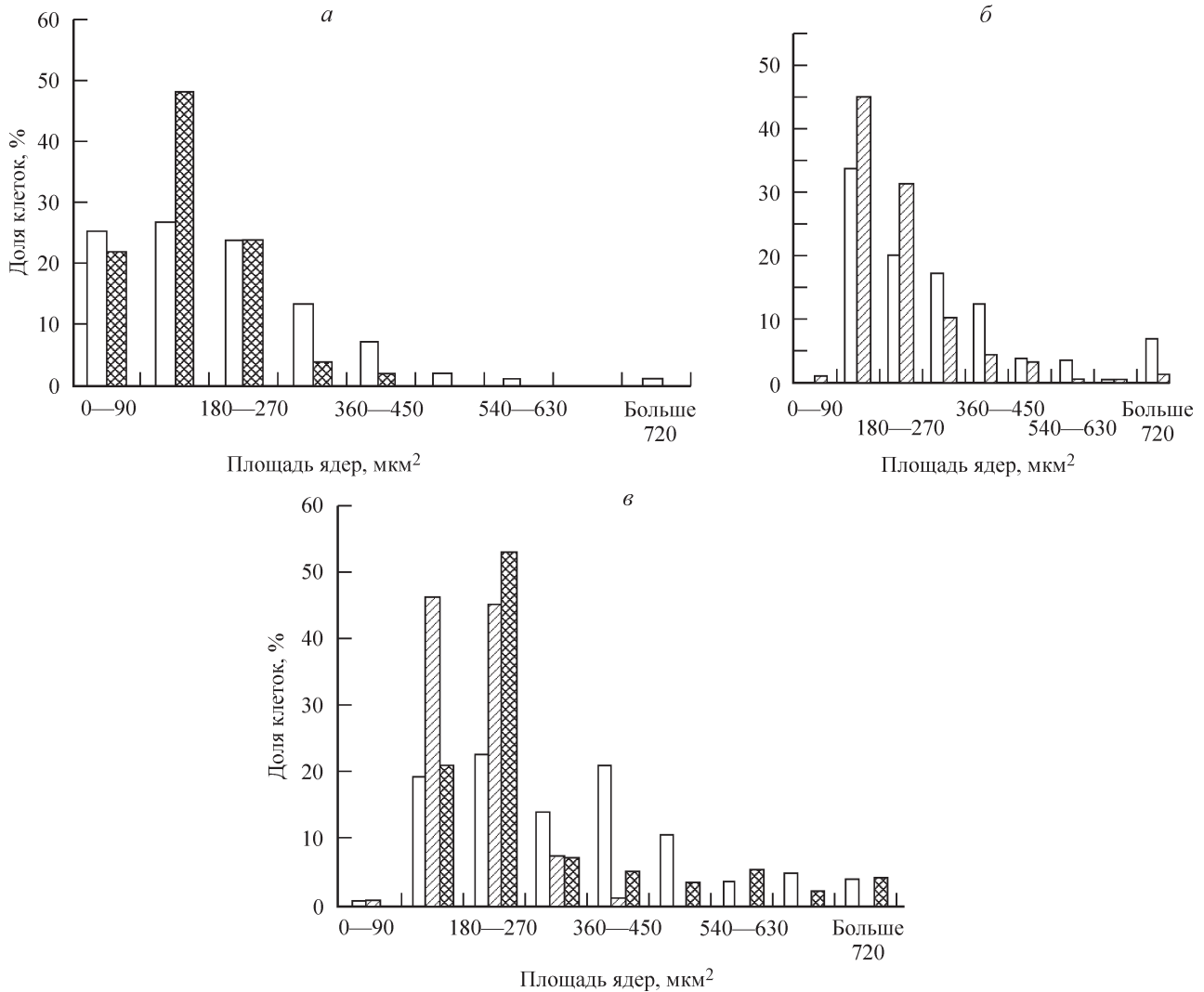


Рис. 6. Площадь ядер фибробластов в контрольной и подопытной группах мышей (белые столбцы — контрольная группа, светлые столбцы — группа мышей, получавших метформин с 3-го мес жизни, темные столбцы — группа мышей, получавших метформин с 9-го мес жизни), в 11 мес (а), 16 мес (б) и 19 мес (в).

пе увеличивается с возрастом и варьирует от 4 до 12 %. В метформиновой группе такие ядра тоже присутствуют, но их количество незначительно.

Установлено, что с возрастом изменяется устойчивость клеток к действию повреждающих агентов, в первую очередь перекиси водорода (Chen et al., 1998; Ryter et al., 2007). На культуре первичных фибробластов 23-месячных мышей была определена доля клеток, уходящих в апоптоз после воздействия перекиси водорода в двух концентрациях — 250 и 500 мМ. При воздействии 500 мМ перекиси водорода в группе М1 отмечена тенденция к уменьшению доли клеток, уходящих в апоптоз, по сравнению с контрольной группой (22 % vs 27.85 %), однако данные различия не достоверны (рис. 7).

### Обсуждение

По средним значениям изученных в наших опытах клеточных маркеров старения контрольная группа животных отличается от подопытной группы, но эти различия невелики и не могут объяснить выраженный геропротекторный эффект метформина, показанный ранее на мышах

линии SHR: увеличение средней продолжительности жизни на 37.8 %, а максимальной — на 2.8 мес (10.3 %) по сравнению с контролем (Anisimov et al., 2008).

Интересно, что метформин препятствует появлению клеток с количеством SAHF, резко превышающим средний уровень, и препятствует появлению клеток с сильно увеличенной площадью ядер (предположительно полиплоид-

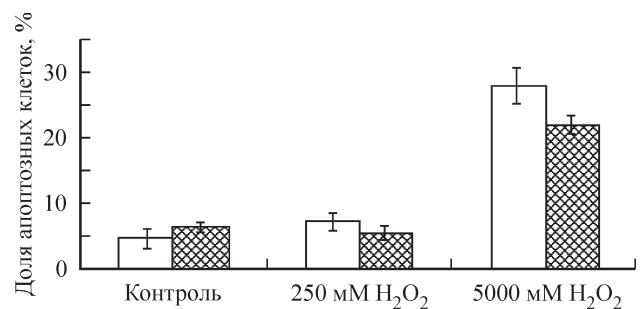


Рис. 7. Влияние  $\text{H}_2\text{O}_2$  на долю клеток, вступивших в апоптоз. Белые столбцы — контрольная группа животных, темные столбцы — группа М1 (животные, получавшие метформин с 3-го мес жизни).

ных). Такой же вывод можно сделать и по интенсивности флуоресценции  $\gamma$ -H2AX, и по интенсивности окраски SA- $\beta$ -gal. Видимо, именно появление в клетке большого числа маркеров старения вызывает необратимый блок клеточного цикла и уход клетки в старение, а метформин тормозит этот процесс, продлевая молодость клетки.

Вызывает интерес и тот факт, что скорости изменения с возрастом количества SAHF в контроле и опыте существенно различаются. Можно предположить, что для запуска процесса тканевого и организменного старения достаточно небольшой (не более 10—12 %) популяции старых (т. е. несущих большое количество маркеров старения и, вероятно, уже не способных делиться) клеток. Таким образом, то, что средние значения маркеров старения (в частности, количество SAHF) не намного различаются в фибробластах подопытных и контрольных животных, не является критичным. Именно при накоплении порогового количества «старых» клеток нарушается функционирование определенной ткани, органа, а затем и всего организма, а метформин тормозит накопление порогового числа «старых» клеток.

Указания на то, что процесс старения на тканевом уровне связан с небольшой популяцией клеток, встречаются и в других работах. Результаты, полученные при использовании таких маркеров старения, как p16 и SA- $\beta$ -gal, показали, что клетки с их высоким содержанием накапливаются с возрастом в различных тканях грызунов и человека. Более того, эти клетки присутствуют при некоторых связанных со старением заболеваниях, таких как атеросклероз, трофические язвы, артрит, а также в доброкачественных и злокачественных опухолях предстательной железы и печени (Krtolica, Campisi, 2002).

Каким образом стареющие клетки могут вызывать старческий фенотип или связанные с возрастом заболевания? Накопление неделящихся клеток может нарушать обновление и репарацию ткани. В то же время многие из генов, связанных со старением, кодируют секреторные белки и могут изменять тканевое микроокружение, изменяя таким образом структуру и функцию ткани (Shelton et al., 1999; Chang et al., 2000; Zhang et al., 2003). Обе гипотезы имеют право на существование, но доказательства в пользу последней представляются более убедительными (Campisi, 2005).

Факторы, секретируемые стареющими клетками, различаются в зависимости от типа клеток. Так, стареющие фибробласты секретируют высокий уровень некоторых матриксных металлопротеаз, эпителиальных факторов роста и воспалительных цитокинов (Krtolica, Campisi, 2002). Стареющие клетки могут вызывать хроническое локальное воспаление и (или) другие изменения структуры и функции ткани и таким образом вносить свой вклад в развитие связанных со старением заболеваний. Также стареющие клетки, возможно, стимулируют деление клеток, несущих предопухолевые мутации (Campisi, 2005).

Показанное Анисимовым и соавторами (Anisimov et al., 2008) увеличение средней и максимальной продолжительности жизни мышей, получавших метформин, хорошо поддается объяснению с помощью теории «накопления порогового количества „старых” клеток». В наших опытах показано, что метформин замедляет появление популяции «старых» клеток, что, вероятно, тормозит развитие процессов старения на тканевом уровне и в результате приводит к увеличению средней и максимальной продолжительности жизни мышей, как бы продлевая молодость животных.

На организменном уровне влияние метформина на процессы старения похоже на влияние ограничения калорийности питания — происходит снижение интенсивности обмена веществ. При ограничении калорийности питания наблюдается стойкое снижение уровня глюкозы и инсулина в плазме крови, а также многих других гормонов (см.: Анисимов, 2008а), что позволило назвать этот метод «псевдогипофизэктомией» из-за схожести вызываемых эффектов (Everitt et al., 1980). Метформин уменьшает гипергликемию, улучшает утилизацию глюкозы, уменьшает утилизацию свободных жирных кислот, снижает уровень сывороточных липидов, инсулина и IGF-1 в крови, а также уменьшает массу тела у людей и у экспериментальных животных (Анисимов, 2008а, 2008б).

Можно предположить, что действие метформина как геропротектора обусловлено его системным эффектом и его влиянием на снижение интенсивности обмена веществ. Один из возможных механизмов его геропротекторного действия может заключаться в замедлении им клеточной пролиферации и соответственно влиянии на скорость укорочения теломер (Mikhelson, Gamaley, 2008; Михельсон, Гамалей, 2010), что мы планируем проанализировать в последующих исследованиях.

#### Список литературы

- Анисимов В. Н. 2008а. Молекулярные и физиологические механизмы старения. СПб.: Наука. 2 : 434 с.
- Анисимов В. Н. 2008б. Роль системы гормон роста—инсулиноподобный фактор роста-1—инсулин в старении и долголети: эволюционный аспект. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 94 (12) : 1092—1109.
- Михельсон В. М. 1984. Старение клеточных культур. В кн.: Биология клетки в культуре. Л.: Наука. 235—255.
- Михельсон В. М., Гамалей И. А. 2010. Укорочение теломер — основной механизм естественного и лучевого старения. Радиационная биология. Радиоэкология. 50 (3) : 269—275.
- Anisimov V. N., Berstein L. M., Egormin P. A., Piskunova T. S., Popovich I. G., Zabezhinski M. A., Kovalenko I. G., Poroshina T. E., Semenchenko A. V., Provinciali M., Re F., Franceschi C. 2005a. Effect of metformin on life span and on the development of spontaneous mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice. Exp. Gerontol. 40 : 685—693.
- Anisimov V. N., Berstein L. M., Egormin P. A., Piskunova T. S., Popovich I. G., Zabezhinski M. A., Tyndyk M. L., Yurova M. V., Kovalenko I. G., Poroshina T. E., Semenchenko A. V. 2008. Metformin slows down aging and extends life span of female SHR mice. Cell Cycle. 7 : 2769—2773.
- Anisimov V. N., Berstein L. M., Popovich I. G., Zabezhinski M. A., Egormin P. A., Tyndyk M. L., Anikin I. V., Semenchenko A. V., Yashin A. I. 2005b. Central and peripheral effects of insulin/IGF-1 signaling in aging and cancer: antidiabetic drugs as geroprotectors and anticarcinogens. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1057 : 220—234.
- Anisimov V. N., Egormin P. A., Piskunova T. S., Popovich I. G., Tyndyk M. L., Yurova M. V., Zabezhinski M. A., Anikin I. V., Karkach A. S., Romanyukha A. A. 2010a. Metformin extends life span of HER-2/neu transgenic mice and in combination with melatonin inhibits growth of transplantable tumors *in vivo*. Cell Cycle. 9 : 188—197.
- Anisimov V. N., Zabezhinski M. A., Popovich I. G., Piskunova T. S., Semenchenko A. V., Tyndyk M. L., Yurova M. V., Antoch M. P., Blagosklonny M. V. 2010b. Rapamycin extends maximal life span in cancer-prone mice. Amer. J. Pathol. 176 : 1092—2096.
- Blagosklonny M. V. 2008. Aging: ROS or TOR. Cell Cycle. 7 : 3344—3354.
- Campisi J. 2005. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. Cell. 120 : 513—522.

- Chang B. D., Watanabe K., Broude E. V., Fang J., Poole J. C., Kalinichenko T. V., Roninson I. B. 2000. Effects of p21Waf1/Cip1/Sdi1 on cellular gene expression: implications for carcinogenesis, senescence, and age-related diseases. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 97 : 4291—4296.
- Chen Q. M., Bartolomew J. C., Campisi J., Acosta M., Reagan J. D., Ames B. N. 1998. Molecular analysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 an Rb control G1 arrest but not cell replication. *J. Biochem.* 332 : 43—50.
- Corradetti M. N., Inoki K., Bardeesy N., DePinho R. A., Guan K. L. 2004. Regulation of the TSC pathway by LKB1: evidence of a molecular link between tuberous sclerosis complex and Peutz—Jeghers syndrome. *Genes Develop.* 18 : 1533—1538.
- Demidenko Z. N., Zubova S. G., Bukreeva E. I., Pospelov V. A., Blagosklonny M. V. 2009. Rapamycin decelerates cellular senescence. *Cell Cycle*. 8 : 1888—1895.
- Dimri G. P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E. E., Linskens M., Rubeljii I., Pereira-Smithii O., Peacocke M., Campisi J. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 92 : 9363—9367.
- Everitt A. V., Seedsman N. J., Jones F. 1980. The effects of hypophysectomy and continuous food restriction, begun at ages 70 and 400 days, on collagen aging, proteinuria, incidence of pathology and longevity in the male rat. *Mech Ageing Develop.* 12 : 161—172.
- Harrison D. E., Strong R., Sharp Z. D., Nelson J. F., Astle C. M., Flurkey K., Nadon N. L., Wilkinson J. E., Frenkel K., Carter C. S., Pahor M., Javors M. A., Fernandez E., Miller R. A. 2009. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature*. 460 : 392—395.
- Inoki K., Zhu T., Guan K. L. 2003. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*. 115 : 577—590.
- Itahana K., Campisi J., Dimri G. P. 2007. Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated  $\beta$ -galactosidase. *Methods Mol. Biol.* 371 : 21—32.
- Jia K., Chen D., Riddle D. L. 2004. The TOR pathway interacts with the insulin signaling pathway to regulate *C. elegans* larval development, metabolism and life span. *Development*. 131 : 3897—3906.
- Kaeberlein M., Powers R. W., 3rd, Steffen K. K., Westman E. A., Hu D., Dang N., Kerr E. O., Kirkland K. T., Fields S., Kennedy B. K. 2005. Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients. *Science*. 310 : 1193—1196.
- Kapahi P., Zid B. M., Harper T., Koslover D., Sapin V., Benzer S. 2004. Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway. *Curr. Biol.* 14 : 885—890.
- Krtolica A., Campisi J. 2002. Cancer and aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34 : 1401—1414.
- Lorenzini A., Tresini M., Austad S. N., Cristofalo V. J. 2005. Cellular replicative capacity correlates primarily with species body mass not longevity. *Mech. Ageing Develop.* 126 : 1130—1133.
- Medvedik O., Lamming D. W., Kim K. D., Sinclair D. A. 2007. MSN2 and MSN4 link calorie restriction and TOR to sirtuin-mediated lifespan extension in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Biol.* 5 : 261.
- Mikhelson V. M., Gamaley I. A. 2008. Telomere shortening is the sole mechanism of aging. *Open Longevity Sci.* 2 : 23—28.
- Narita M., Nunez S., Heard E., Narita M., Lin A. W., Hearn S. A., Spector D. L., Hannon G. J., Lowe S. W. 2003. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*. 113 : 703—716.
- Powers R. W., Kaeberlein M., Caldwell S. D., Kennedy B. K., Fields S. 2006. Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling. *Genes Develop.* 20 : 174—184.
- Ryter S. W., Kim H. P., Hoetzel A., Park J. W., Nakahira K., Wang X., Choi A. M. 2007. Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* 9 : 49—59.
- Scaffidi P., Misteli T. 2006. Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science*. 312 : 1059—1063.
- Sharp Z. D., Bartke A. 2005. Evidence for downregulation of phosphoinositide 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR)-dependent translation regulatory signaling pathways in Ames dwarf mice. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 60 : 293—300.
- Shaw R. J. 2009. LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signaling and growth. *Acta Physiol.* 196 : 65—80.
- Shaw R. J., Bardeesy N., Manning B. D., Lopez L., Kosmatka M., DePinho R. A., Cantley L. C. 2004. The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. *Cancer Cell*. 6 : 91—99.
- Shelton D. N., Chang E., Whittier P. S., Choi D., Funk W. D. 1999. Microarray analysis of replicative senescence. *Curr. Biol.* 9 : 939—945.
- Sonntag W. E., Lynch C. D., Cefalu W. T., Ingram R. L., Bennett S. A., Thornton P. L., Khan A. S. 1999. Pleiotropic effects of growth hormone and insulin-like growth factor (IGF)-1 on biological aging: inferences from moderate caloric-restricted animals. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 54 : B521—B538.
- Spindler S. R. 2006. Use of microarray biomarkers to identify longevity therapeutics. *Aging Cell*. 5 : 39—50.
- Spindler S. R. 2010. Caloric restriction: from soup to nuts. *Ageing Res. Rev.* 9 : 324—353.
- Vellai T., Takacs-Vellai K., Zhang Y., Kovacs A. L., Orosz L., Muller F. 2003. Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*. *Nature*. 426 : 620.
- Zhang H., Pan K. H., Cohen S. N. 2003. Senescence-specific gene expression fingerprints reveal cell-type-dependent physical clustering of up-regulated chromosomal loci. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 100 : 3251—3256.

Поступила 23 IX 2010

## METFORMIN SLOWS DOWN AGEING PROCESSES AT THE CELLULAR LEVEL IN SHR MICE

A. V. Arkadieva,<sup>1,3</sup> A. A. Mamonov,<sup>1</sup> I. G. Popovich,<sup>2</sup> V. N. Anisimov,<sup>2</sup>  
V. M. Mikhelson,<sup>1</sup> I. M. Spivak<sup>1</sup><sup>1</sup> Institute of Cytology RAS and <sup>2</sup> N. N. Petrov Research Institute of Oncology, St. Petersburg;<sup>3</sup> e-mail: asarkad@yandex.ru

It has been shown recently that metformin, the indirect mTOR-kinase inhibitor, significantly increases medium (by 37.8 %) and maximum (by 10.3 %) life span of SHR mice (Anisimov et al., 2008). We obtained fibroblasts from skin of 11-, 16-, 19- and 23-months-old SHR mice treated with metformin since the third and ninth day of life. We studied markers of cellular senescence in these fibroblasts. Significant differences were observed



between the average number of senescence-associated heterochromatic foci (SAHF), the average of area nuclei and fluorescence intensity of nucleus after staining for  $\gamma$ -H2AX in control and experimental animals. Also, we showed that metformin prevented the accumulation of fibroblasts with large area of nuclei; high activity of senescence-associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal), and high fluorescence intensity after staining for  $\gamma$ -H2AX. It appears that accumulation of large quantity of senescence markers within a cell triggers it to enter the aging process. It appears that the increase of «old» cell population above the threshold disrupts the normal function of certain tissues, organs, and finally, the whole organism. It appears that metformin delays the «old» cells accumulation and prolongs the organism youth.

Key words: metformin, cellular senescence, rapamycin, mTOR-kinase, geroprotectors.

---