

УДК 616-092.18:612.015.4

ВЫЯВЛЕНИЕ КЛЕТОК ВИСЦЕРАЛЬНЫХ ОРГАНОВ, ГИПОРЕЗИСТЕНТНЫХ К ЛИПОФУСЦИНОГЕНЕЗУ

Тризно М.Н., Куртусунов Б.Т., Тризно Е.В., Мажитова М.В.

ФГБОУ ВО Астраханский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Астрахань, e-mail: neiron-2010@mail.ru

В данной работе авторы рассматривают липофусцин в качестве наиболее универсального признака старения. Целью исследования стала характеристика распределения и локализации скоплений липофусцина у старых крыс с применением различных способов окрашивания липофусцина как одного из признаков старения в гистологических срезах. Материал: белые беспородные лабораторные крысы, составившие группу молодых (n=25) и группу старых (n=28) особей. После фиксации в 4%-ном параформе и стандартной гистологической проводки препаратов тканей почек, печени и сердца изготавливались парафиновые срезы в 4 мкм толщиной для окраски парой гематоксилин и эозин, Судан черный Б и по Шморлю. Вычисляли размеры включений липофусцина, площадь и процент заполнения ткани в 0,1 мм². В результате исследования было обнаружено, что среди трех исследуемых органов сердце оказалось наиболее подверженным образованию пигмента, но при этом включения носили мелкоочаговый характер, не имея тенденции к слиянию, составляя незначительную часть цитоплазмы. Отложения липофусцина визуализированы в S2 сегментах проксимальных извитых канальцев почек, вокруг центральной вены печеночной дольки, а также в перинуклеарной зоне цитоплазмы кардиомиоцитов преимущественно у старых особей. В результате проведенного исследования удалось выявить локализацию скопления липофусцина, дать характеристику его распределения. Таким образом, можно констатировать, что липофусцин – один из самых надежных признаков клеточной сенесценции. Наиболее оптимальный способ визуализации данного пигмента – окрашивание Суданом черным В.

Ключевые слова: липофусцин, старение, клеточная дисфункция, признаки старения.

IDENTIFICATION OF VISCERAL ORGAN CELLS THAT ARE RESISTANT TO LIPOFUSCINOGENESIS

Trizno M.N., Kurtusunov B.T., Trizno E.V., Mazhitova M.V.

Astrakhan State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Astrakhan, e-mail: neiron-2010@mail.ru

In this work, authors consider lipofuscin as the most universal signs of aging. The purpose of the study was characterization of the distribution and localization of lipofuscin accumulations in old rats with the use of various staining methods for staining lipofuscin as one of the signs of aging in histological sections. Material: white outbred laboratory rats, comprising a group of young (n=25) and a group of old (n=28) individuals. After fixation in 4% paraform and standard histological tissue preparations of the kidneys, liver and heart, paraffin sections 4 μm thick were prepared for staining with hematoxylin and eosin, Sudan black B and Schmorl. The size of lipofuscin inclusions, area and percentage of tissue filling of 0.1 mm² were calculated. As a result of the study, it was found that among the three organs studied, the heart was the most susceptible to the formation of ceroid pigment, but the inclusions were small-focal in nature, without a tendency to merge, constituting an insignificant part of the cytoplasm. Lipofuscin deposits were visualized in the S2 segments of the proximal convoluted tubules of the kidneys, around the central vein of the hepatic lobule, as well as in the perinuclear zone of the cytoplasm of cardiomyocytes, mainly in old individuals. As a result of the study, it was possible to identify how localization of lipofuscin accumulation, and to characterize its distributions. Thus, it can be stated that lipofuscin is one of the most reliable signs of cellular senescence. The most optimal way to visualize this pigment is to stain it with Sudan black B.

Keywords: lipofuscin, aging, cellular dysfunction, signs of aging.

Старение является основным фактором риска развития многих заболеваний. Клеточное старение – это гомеостатический биологический процесс, направленный на предотвращение размножения поврежденных клеток и опухолевой трансформации. Имеются доказательства того, что стареющие клетки накапливаются в тканях систем органов и могут

предрасполагать к возникновению возрастзависимых заболеваний или усугублять их течение. Считается, что накопление повреждений происходит случайным образом, что объясняет большое разнообразие фенотипов старения, даже у монозиготных близнецов. Взаимодействие между генетическим фоном, факторами окружающей среды и случайным характером возрастного накопления необратимых повреждений ДНК организма также может определять вероятность развития конкретного возрастного заболевания. Исследованиям старения препятствуют его вариабельность и отсутствие универсального маркера для однозначного выявления стареющих клеток.

Существует множество триггеров клеточного старения: укорочение теломер, активация онкогенов, присутствие активных форм кислорода. Старение может быть связано с дисфункцией митохондрий, их слиянием или фрагментацией. Стареющие клетки также претерпевают морфологические изменения. Клетки становятся крупнее, уплощаются и приобретают неправильную форму [1]. Эти изменения более заметны *in vitro*, чем *in vivo* и, по-видимому, вызваны перестройками цитоскелета и изменениями состава клеточных мембран. Чтобы лучше понять роль стареющих клеток в физиологических и патологических состояниях, важно иметь возможность визуализировать их. До сих пор исследованиям клеточного старения препятствовало отсутствие универсального, специфичного и широко применимого показателя клеточного старения. В данной работе авторы рассматривают липофусцин в качестве наиболее универсального маркера старения. Липофусцин – сложный комплекс химических веществ, имеющий различные морфологические физические и химические свойства, при этом обладающий флюоресценцией [2].

Не обладая гомогенным составом, структура липофусцина может варьироваться – как в различных тканях, так и среди разных видов животных. Основными компонентами являются белки (30–70%), жиры (20–50%) и следовые количества (1–3%) металлов (Fe^{3+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} , Mn^{2+} , Ca^{2+}) с небольшим количеством углеводов [3]. Согласно некоторым источникам, атомный состав пигмента представлен С (57%), Н (9,3%), N (9,1%) и S (1,6%) [4].

Окисленные белки как основная часть липофусцина наиболее гетерогенны и являются набором различных аминокислот. Триглицериды, свободные жирные кислоты, холестерол и фософлипиды – основные составные части липидного профиля липофусцина [5].

Есть ряд теорий, объясняющих накопление липофусцина. Большинство из них строятся вокруг окисления белков и липидов свободными радикалами.

Теория свободно-радикального окисления, изначально изложенная Д. Харманом в 1956 г., и затем расширенная многими авторами, подразумевает формирование реактивных форм кислорода при участии дефектных митохондрий. Впоследствии образуются альдегиды,

и происходит сшивка с аминоклуппами лизосомальных ферментов, что, вероятно, объясняет неспособность лизосом к разрушению составных компонентов липофусцина. Группе ученых удалось сформировать искусственный липофусцин в тканях печени, почек, мозга и сердечной мышцы перекисидацией белков и липидов в ультрафиолетовом свете [6]. Флюоресцентный спектр полученного цероида совпадал с аналогичным спектром естественного липофусцина.

Кроме того, известно, что липофусцин способен самостоятельно блокировать активность лизосомальных ферментов *in vitro*, протеаз, снижая активность некоторых из них на 90%, формируя таким путем порочный круг [7].

Благодаря процессам окислительной модификации и полимеризации белков в составе липофусцина они становятся невосприимчивы к ферментативному расщеплению и выведению из клетки, накапливаясь в лизосомах и клеточной цитоплазме. Клетки, активно участвующие в делении, эффективно разбавляют пигмент и имеют низкий уровень последнего в цитоплазме. Напротив, в постмитотических клетках накопление приводит к сенесценции. В результате процессов окислительной модификации и полимеризации белков в составе липофусцина они становятся устойчивыми к ферментативному расщеплению и выводу из клетки, накапливаясь в лизосомах и цитоплазме. Клетки, активно участвующие в делении, успешно снижают уровень липофусцина, поэтому его концентрация остается низкой. Однако в постмитотических клетках накопление липофусцина вызывает старение. Эти процессы взаимосвязаны, поэтому многие исследователи считают липофусцин надежным маркером старения клеток [8, 9].

Клеточная сенесценция – один из основных механизмов как нормального развития и гомеостаза, так и многих патологических процессов [10, 11].

Гистологически включения липофусцина желто-коричневые с широким спектром оттенков и интенсивностью. Формы включений варьируют от крупных овальных до мелкозернистых. Ультраструктурно липофусцин окружен трехслойной мембраной, аналогичной лизосомальной. При электронной микроскопии можно выделить ряд форм: гранулярные, гомогенные, пластинчатые и смешанные [12]. Выявляется пигмент как при рутинных окрашиваниях парой гематоксилин/эозин, так и специальными методами окраски, такими как Судан черный Б, по Шморлю, Люксол и др.

Липофусцин обладает естественной аутофлюоресценцией, но из-за гетерогенности состава спектр эмиссии колеблется в широких пределах. Основные волновые характеристики эмиссии находятся в диапазоне от 400 до 700 нм, с максимумом на 578 нм, возбуждение с максимумом на 364 нм [13]. В связи с гетерогенной структурой белков специфических антител не существует.

Судан черный Б – краситель, известный более 60 лет. Он обладает высоким родством к липидам и включениям, содержащим липиды, окрашивает включения в парафиновых срезах в черно-коричневый цвет, в замороженных срезах – в сине-черный; при связывании с липофусцином нивелирует естественную аутофлуоресценцию, что используется для иммуногистохимического окрашивания с целью снижения шума фоновой флуоресценции и повышения отношения сигнал/шум [14].

Окраска проста и дает стабильные и воспроизводимые результаты при применении. Работает как на замороженных срезах, так и на парафиновых, в том числе и архивном материале. К слову, данные свойства выгодно отличают методику определения липофусцина от способа идентификации известного маркера старения – β -галактозидазы (SA- β -gal), окрашиваемого хромогенным субстратом X-gal. Так, при различных условиях культивирования клеток уровень SA- β -gal может повышаться, давая ложноположительный результат. Ограничивает спектр применения данного анализа тот факт, что его можно использовать только на свежих или замороженных тканях (в отличие от идентификации липофусцина) [15, 16].

Кроме того, большинство перечисленных способов определения признаков старения достаточно дорогостоящие и затруднительны в приобретении. В отечественной литературе способ определения липофусцина в качестве маркера старения используется неоправданно редко. Таким образом, целью данного практически ориентированного исследования является характеристика распределения и локализации скоплений липофусцина у старых крыс с применением различных способов окрашивания липофусцина как одного из признаков старения в гистологических срезах.

Материалы и методы исследования

В исследовании были использованы самцы белых беспородных лабораторных крыс, составившие группу молодых (n=25) и группу старых (n=28) особей: молодые 6–7 месяцев, с массой тела 197–221 г, и старые (старше 20 месяцев, массой тела 565–619 г). Животные предоставлены виварием лаборатории физиологии, морфологии, генетики и биомедицины ФГБОУ ВО «Астраханский государственный университет» (Россия, Астрахань). В работе авторы руководствовались рекомендациями Commission of the European Communities, 86/609/ЕЕС, а также «Положением о содержании и использовании лабораторных животных в ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ Минздрава России».

Вырезку ткани почки осуществляли вертикальным разрезом через пазуху, верхний, нижний полюс и наружный край.

Препараты печени извлекались продольным разрезом от ворот печени до диафрагмальной поверхности, таким способом, чтобы площадь препарата составляла не менее 120 мм².

Блоки сердечной мышцы извлекались вырезкой от верхушки сердца до основания аорты через левый желудочек. Для идентификации гранул липофусцина использовали участки препарата с продольным, структурированным расположением мышечных волокон, без видимых признаков травмы, некроза и инфильтрации.

После фиксации в 4%-ном параформе и стандартной гистологической проводки препаратов изготавливались парафиновые срезы в 4–6 мкм толщиной для окраски парой гематоксилин-эозин, Судан черный Б и по Шморлю.

Окраска гематоксилином-эозином производилась классическим методом, а Суданом черным Б – в модифицированном варианте, где депарафинирование завершалось на этапе 70% спирта в силу нерастворимости Судана в воде. Окраску среза производили, накрыв каплю покровным стеклом во избежание высыхания спиртового раствора при продолжительной экспозиции (более 15 минут), контрокрашивание ядер – нейтральный красный. Окраска по Шморлю 10 минут – хлорид железа 1% и Гексацианоферрат (III) калия 1%, приготовленные непосредственно перед окрашиванием.

Изображения препаратов оцифровывались с помощью ImageView вер. 4.11.22913 и микроскопа Meiji Techno MT6000 с CMOS камерой.

Вычисляли размеры включений липофусцина, площадь и процент заполнения ткани в 0,1 мм². Морфологический анализ и сегментацию оцифрованных гистологических препаратов производили в QuPath 0.51.

Статистика. Нормальность вариационных рядов определяли с помощью критериев Шапиро–Уилка и Колмогорова–Смирнова. Данные представлены в виде средней величины (M) и стандартного отклонения (s). Если вариационные ряды не соответствовали распределению Гаусса, то статистическую обработку осуществляли непараметрическим методом с помощью дисперсного анализа с вычислением медианы (Me) и P5-, P95-перцентилей. Уровень значимости различий признаков соответствовал $p \leq 0,05$. Анализ производили с помощью дескриптивных статистических методик программы Statistica 11,0 (США, StatSoft).

Результаты исследования и их обсуждение

Почка

Включения липофусцина отметили в 28,5% препаратов старых крыс со средней площадью $0,63 \pm 0,08$ мкм². В группе молодых животных около 8% препаратов содержали небольшие включения липофусцина. Следует сказать, что извитая часть проксимального

канальца состоит из 2 отдельных сегментов (S1 и S2), различающихся по уровню трансмембранного транспорта метаболитов. Метаболиты, отфильтрованные клубочком, реабсорбируются из первичной мочи клетками S1 через апикальную мембрану (рис. 1).

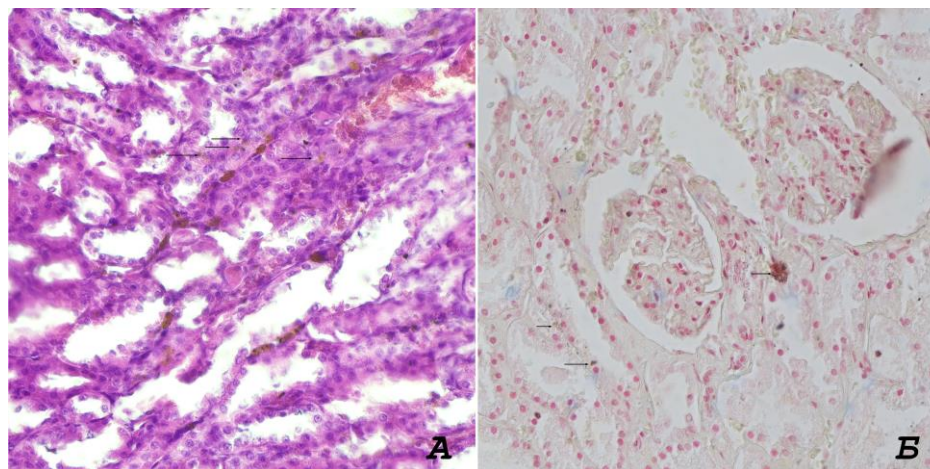


Рис. 1. Ткань почки. (А) окраска гематоксилином-эозином. (Б) Судан черный Б. Увеличение x400. Стрелками указаны скопления липофусцина

В то же время клетки S2 имеют высокое содержание рецепторов базолатеральных переносчиков жирных кислот и органических анионов, которые могут импортировать субстраты непосредственно из крови. Более того, они более плотно упакованы пероксисомами, которые могут генерировать липидные субстраты путем бета-окисления длинноцепочечных жирных кислот. Между тем, избыток переносчиков свободных жирных кислот в клетках S2 может накапливаться в специализированных многослойных образованиях, обнаруженных в этой области, для предотвращения липотоксичности [17]. Данное исследование подтвердило, что в 87,5% установленных случаев пигмент локализовался в сегментах S2 проксимальных извитых канальцев, накапливаясь ближе к основанию микроворсинок кубического эпителия. В 12,5% случаев в сегментах S1 проксимальных канальцев почки и единичные включения в дистальных извитых канальцах мозгового вещества почки. В последнем случае липофусцин аккумулировался в крупные образования диаметром до 26 μm .

Интенсивная фоновая окраска цитозоля эпителия проксимальных канальцев осложняет выделение включений липофусцина и их идентификацию. Оптимальным способом окраски почечной ткани является Судан черный Б благодаря большей контрастности включений.

Печень

В ткани печени 25% препаратов старых крыс содержали включения липофусцина. Среди молодых животных зарегистрирован всего 1 случай, или 4% от общего числа.

Пигмент концентрировался вокруг центральной вены и вдоль синусоидных капилляров, при этом диффузно заполняя цитоплазму гепатоцитов на 64–72%, с крупными включениями высокой интенсивности и средней площадью $1,38 \pm 0,1 \text{ мкм}^2$, имеющими тенденцию к слиянию в крупные агломераты до 69 мкм^2 (рис. 2).

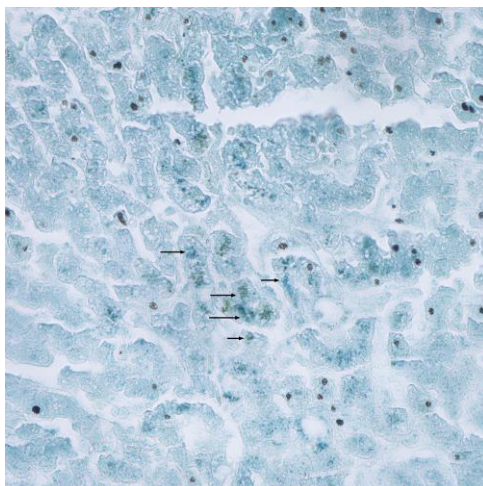


Рис. 2. Печень. Окраска по Шморлю. Увеличение $\times 400$. Стрелками указаны скопления липофусцина

Присутствие пигмента в печени (и почках) часто сочеталось с патоморфологическими изменениями ткани в виде фиброза, склерозирования и других признаков дегенерации. Наблюдаемый комплекс морфологических изменений можно объяснить функциональным перенапряжением метаболических процессов в оставшихся неповрежденных клетках и нарастающим оксидативным стрессом [18]. В печени, которая является метаболически высокоактивным органом, выделение липофусцина затруднено из-за большого количества других типов пигментов. Могут встречаться железосодержащие пигменты, скопления желчных кислот, жировые включения, формалиновый пигмент и иные, которые выглядят сходно при окрасках ШИК или парой гематоксилин и эозин. Использование такой специфичной окраски, как Судан черный Б, позволяет избежать ошибочной идентификации.

Сердечная мышца

В первой группе не обнаружили липофусцин-положительных клеток.

Среди всего массива препаратов сердечной мышцы старых крыс в 14,2% случаев авторы обнаружили зоны интерстициального фиброза, отека и гипертрофии мышечных волокон. Включения липофусцина в сердечной мышце преимущественно наблюдались в перинуклеарной зоне цитоплазмы в виде веретенообразных скоплений. Включения, как правило, овальной формы, с эксцентриситетом в $0,72 \pm 0,03$. Средняя площадь гранул составила $0,42 \pm 0,02 \text{ мкм}^2$. Площадь включений в зоне $0,1 \text{ мм}^2$ у животных старше 24 месяцев составляла 0,92%, в группе молодых – 0,13% (рис. 3).

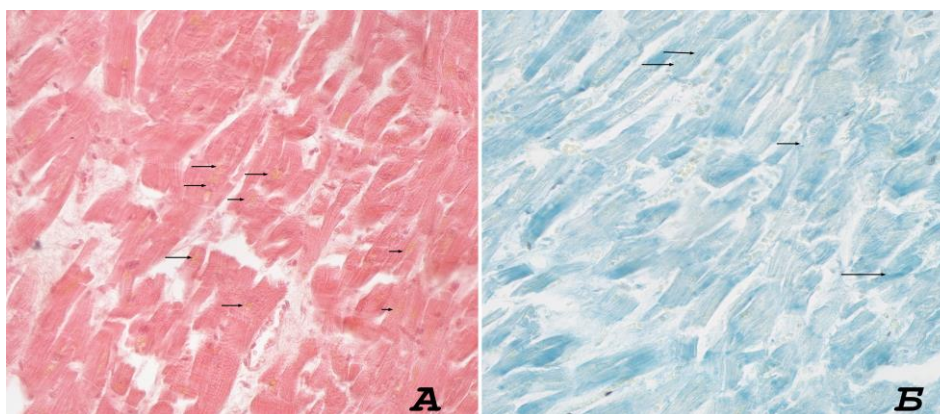


Рис. 3. Миокард. (А) окраска гематоксилином-эозином. (Б) по Шморлю. Увеличение $\times 400$.

Стрелками указаны скопления липофусцина

Данные исследования согласуются с большим количеством ранее проведенных работ, в которых доказано наличие обратной связи между возрастом и количеством накопленного липофусцина в тканях [10, 11, 19, 20].

Согласно полученным данным, выраженность и интенсивность пигментации у животных старшей возрастной группы действительно были выше. Среди трех исследуемых органов сердце оказалось наиболее подверженным образованию цероида, но при этом включения носили мелкоочаговый характер, не имея тенденцию к слиянию, составляя незначительную часть цитоплазмы.

Два других органа – печень и почки – значительно реже подвергались накоплению липофусцина. Принимая во внимание, что исследование ограничивалось использованием микроскопии в светлом поле, включения липофусцина размером менее 0,5 мкм могли остаться незамеченными или представлять сложность для идентификации. Это обстоятельство, вероятно, служит объяснением относительно низкого процента липофусцин-положительных тканей у молодых животных.

Во всех случаях наблюдений было отмечено, что пигмент локализуется в клеточных зонах с высокой метаболической активностью (транспорт жирных кислот клетками S2 проксимальных канальцев) и большим количеством митохондрий (вокруг центральной вены печеночной дольки, а также в перинуклеарной зоне цитоплазмы кардиомиоцитов. Известно, что примерно 25–30% цитоплазмы клеток сердца занято митохондриями, обеспечивающими сократительную функцию миофибрилл. Эпителий проксимальных канальцев почки, активно участвующий в реабсорбции, гепатоциты печеночных долек также относятся к высокоактивным клеткам с большим количеством митохондрий. Аккумуляция липофусцина находится в тесной взаимосвязи с процессами аутоокисления ненасыщенных жирных кислот и оксидативным стрессом в целом, при этом нарушения функции митохондрий выступают в роли основного источника продуктов оксидации.

Печень, почки и сердце играют важную роль в поддержании обмена веществ, удалении продуктов распада, постоянстве химического состава, осмотического давления и устойчивости основных физиологических параметров организма. Чрезмерная функциональная нагрузка на уровне данных органов способствует отложению липофусцина в их клетках, что приводит к их патологии и снижению способности поддерживать гомеостаз с возрастом.

Дизайн исследования намеренно включал два гистохимических метода выявления – Судан черный Б и окраску по Шморлю – для сравнения удобства и информативности полученных препаратов. Оказалось, что окраска по Шморлю обладает определенной неспецифичностью и интенсивно окрашивала цитоплазму проксимальных извитых канальцев почки, что сильно затрудняло поиск включений. Напротив, цитоплазма мышечных волокон при окраске по Шморлю, обладая низким восстановительным потенциалом, хорошо контрастировала с темно-голубыми включениями липофусцина. Кроме того, был замечен необычный эффект интенсивной положительной окраски эндотелия и внутренней эластической пластинки артерий крупного и среднего калибра почки, чего не наблюдалось в других органах.

Заключение

В результате проведенного исследования удалось выявить локализацию скопления липофусцина и дать характеристику его распределения: локализация и паттерн распространения включений липофусцина не изменялись в разных возрастных группах, лишь затрагивали выраженность и количество включений. Липофусцин – один из надежных признаков клеточной сенесценции.

Судан черный Б подтвердил свой статус золотого стандарта, продемонстрировав слабое фоновое окрашивание цитоплазмы клеток, что существенно упростило обнаружение включений липофусцина.

Проведенное исследование позволяет говорить о возможной целесообразности включения предложенного метода окрашивания срезов при проведении рутинного гистологического исследования по показаниям таких тканей, как миокард, почка, печень, в дополнение к существующим методам.

Список литературы

1. Cormenier J., Martin N., Deslй J., Salazar-Cardozo C., Pourtier A., Abbadie C., Pluquet O. The ATF6 α arm of the Unfolded Protein Response mediates replicative senescence in human

fibroblasts through a COX2/prostaglandin E 2 intracrine pathway // *Mech. Ageing Dev.* 2018. Vol. 170. P. 82-91. DOI: 10.1016/j.mad.2017.08.003.

2. Wiley C.D., Flynn J.M., Morrissey C., Lebofsky R., Shuga J., Dong X., Unger M.A., Vijg J., Melov S., Campisi J. Analysis of individual cells identifies cell-to-cell variability following induction of cellular senescence // *Aging Cell.* 2017. Vol. 16. P. 1043-1050. DOI: 10.1111/accel.1.

3. Porta E.A. Advances in age pigment research. *Arch. Gerontol // Geriatr.* 1991. Vol. 212. P. 303-320.

4. Kurputi G., Carpenter S., Wolf L.S. Clinical and experimental studies on lipofuscin in skeletal muscle fibers // In: Zs.-Nagy, I. (Ed.): *Lipofuscin-1987: State of the Art.* Excerpta Medica. 1988. P. 227-243.

5. Gorgoulis V.G., Pefani D., Pateras I.S., Trougakos I.P. Integrating the DNA damage and protein stress responses during cancer development and treatment // *J. Pathol.* 2018. DOI: 10.1002/path.5097.

6. Wang X., Liao Y., Li G., Yin D., Sheng S. A comparative study of artificial ceroid/lipofuscin from different tissue materials of rats // *Exp Aging Res.* 2008. Vol. 34. № 3. P. 282-295. DOI: 10.1080/03610730802070282.

7. Sitte N., Huber M., Grune T., Ladhoff A., Doecke W. D., T. Von Zglinicki, Davies K. J. Proteasome inhibition by lipofuscin/ceroid during postmitotic aging of fibroblasts // *FASEB J.* 2000. Vol. 14. P. 1490-1498.

8. Kritsilis M.V., Rizou S., Koutsoudaki P.N., Evangelou K., Gorgoulis V. G., Papadopoulos D. Ageing, Cellular Senescence and Neurodegenerative Disease // *Int. J. Mol Sci.* 2018. Vol. 19. № 10. P. 2937. DOI: 10.3390/ijms19102937

9. Evangelou K., Lougiakis N., Rizou S. V., Kotsinas A., Kletsas D., Muñoz-Espín D., Kastrinakis N.G., Pouli N., Marakos P., Townsend P., Serrano M., Bartek J., Gorgoulis V.G. Robust, universal biomarker assay to detect senescent cells in biological specimens // *Aging Cell.* 2017. Vol. 16. № 1. P. 192-197. DOI: 10.1111/accel.12545.

10. Тризно Е.В. Просенесцентное действие сероводорода в почках крыс // *Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки.* 2023. Т. 68. № 4. С. 221-230. Doi: 10.21685/2072-3032-2023-4-22.

11. Тризно Е.В., Беднов И.А., Тризно М.Н., Давыдова Д.Р., Шур В.Ю., Дюкарева О.С. Влияние сероводорода на показатели гемостаза, ионов Ca⁺⁺ и развитие признаков сенесценции в сосудистой сети // *Микроэлементы в медицине.* 2023. Т. 24. № 2. С. 53-59. DOI: 10.19112/2413-6174-2023-24-2-53-59.

12. Riew T.R., Kim H.L., Choi J.H., Jin X., Shin Y.J., Lee M.Y. Progressive accumulation of autofluorescent granules in macrophages in rat striatum after systemic 3-nitropropionic acid: a

correlative light- and electron-microscopic study // *Histochemistry and cell biology*. 2017. Vol. 148. № 5. P. 517-528. DOI: 10.1007/s00418-017-1589-x.

13. Rózanowska M.B. Lipofuscin, Its Origin, Properties, and Contribution to Retinal Fluorescence as a Potential Biomarker of Oxidative Damage to the Retina // *Antioxidants* (Basel, Switzerland). 2023. Vol. 12. № 12. P. 2111. DOI: 10.3390/antiox12122111.

1. Georgakopoulou E.A., Tsimaratou K., Evangelou K., Fernandez Marcos P.J., Zoumpourlis V., Trougakos I.P., Kletsas D., Bartek J., Serrano M., Gorgoulis V.G. Specific lipofuscin staining as a novel biomarker to detect replicative and stress-induced senescence. A method applicable in cryo-preserved and archival tissues // *Aging*. 2013. Vol. 5. P. 37-50.

14. Evangelou K., Gorgoulis V.G. Sudan Black B, The Specific Histochemical Stain for Lipofuscin: A Novel Method to Detect Senescent Cells // *Methods Mol Biol*. 2017. Vol. 1534. P. 111-119. DOI: 10.1007/978-1-4939-6670-7_10.

15. Barbouti A., Evangelou K., Pateras I.S., Papoudou-Bai A., Patereli A., Stefanaki K., Rontogianni D., Mucoz-Espñ D., Kanavaros P., Gorgoulis V.G. In situ evidence of cellular senescence in Thymic Epithelial Cells (TECs) during human thymic involution // *Mech. Ageing Dev*. 2019. Vol. 177. P. 88-90. DOI: 10.1016/j.mad.2018.02.005.

16. Hall A.M., de Seigneux S. Metabolic mechanisms of acute proximal tubular injury // *Pflugers Archiv: European journal of physiology*. 2022. Vol. 474. № 8. P. 813-827. DOI: 10.1007/s00424-022-02701-y.

17. Chawla H.V., Singh N., Singh S.B. The Association Between Oxidative Stress and the Progression of Heart Failure: A Systematic Review // *Cureus*. 2024. Vol. 16. № 3. P. e55313. DOI: 10.7759/cureus.55313.

18. Li W.W., Wang H.J., Tan Y.Z., Wang Y.L., Yu S.N., Li Z.H. Reducing lipofuscin accumulation and cardiomyocytic senescence of aging heart by enhancing autophagy // *Exp Cell Res*. 2021. Vol. 403. № 1. P. 112585.

19. Basova L., Strahl J., Philipp E.E.R., Brey T., Sukhotin A., Abele D. Lipofuscin accumulation in tissues of *Arctica islandica* indicates faster ageing in populations from brackish environments // *Mar Biol* Vol. 2017. 164. № 72. DOI: 10.1007/s00227-017-3110-4.