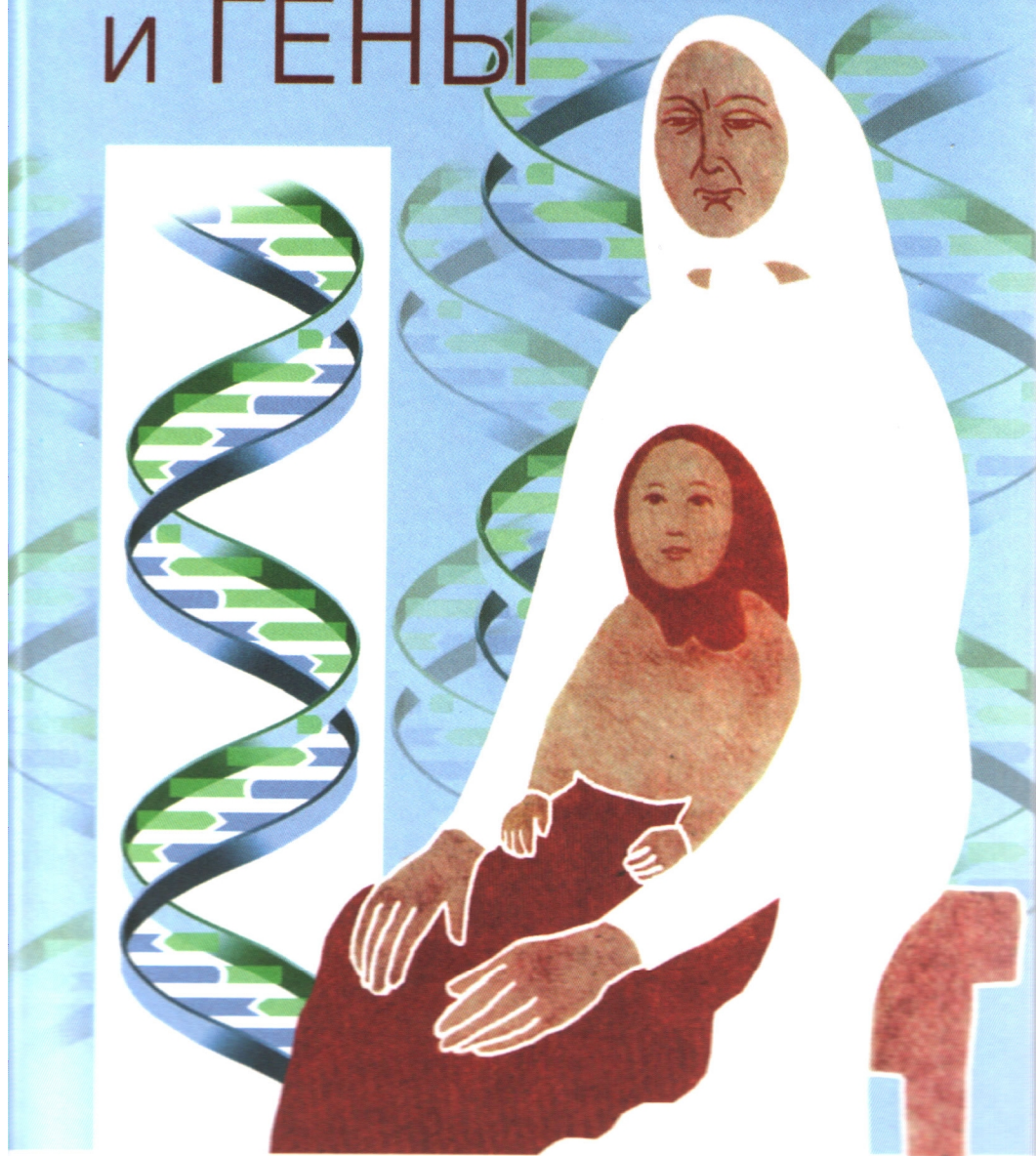


А. А. Москалев

СТАРЕНИЕ и ГЕНЫ



РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

Уральское отделение

Коми научный центр

Институт биологии

RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES

Ural Branch Komi Research

Centre

Institute of Biology

А. А. Москалев

СТАРЕНИЕ и ГЕНЫ



Санкт-Петербург
«НАУКА»
2008

УДК 577 + 575
ББК 28.04
М82

Москалев А. А. Старение и гены. — СПб.: Наука, 2008. — 358 с.

ISBN 978-5-02-026314-7

Представлен аналитический обзор достижений генетики старения и продолжительности жизни. Обобщены эволюционные, клеточные и молекулярно-генетические взгляды на природу старения. Рассмотрены классификации генов продолжительности жизни (эволюционная и феноменологическая), предложена новая, функциональная, классификация. Проанализированы преимущества и недостатки основных модельных объектов генетики старения: дрожжей, нематод, дрозофил, грызунов. Обсуждены достижения генетики старения человека. Подробно описаны основные механизмы, плейотропно влияющие на скорость старения, — репликативное и стресс-индуцированное клеточное старение, поддержание стабильности генома и апоптоз. В экстремальных условиях среды (при голодании, температурном стрессе, нарушениях светового режима, облучении, окислительном стрессе) происходит переключение с программы размножения на программу стрессоустойчивости. Рассмотрены основные регуляторные и эффекторные пути, лежащие в основе такой устойчивости. Сделан всесторонний обзор взаимодействия репродукции и старения.

Монография предназначена для специалистов, интересующихся проблемами старения и продления жизни, генетиков, геронтологов, гериатров, экологов и радиобиологов. Библиогр. 551 назв. Ил. 17. Табл. 9.

Ответственный редактор

проф. В. Н. АНИСИМОВ

Рецензенты:

акад. РАН Ю. С. ОВОДОВ, чл.-кор. РАН В. С. БАРАНОВ,

проф. В. Г. ЗАЙНУЛЛИН

Moskalev A. Aging and genes. — Saint Petersburg: Nauka, 2008. — 358 p.

ISBN 978-5-02-026314-7

It is presented modern review of aging and longevity genetics achievements. We summarized evolutionary, cell and molecular genetics points of view on aging nature. It is considered classifications of longevity genes (evolutional and phenomenological) and has been proposed new functional classification. It is investigated the progress, advantages and imperfections of basic model objects of aging genetics: yeasts, roundworms, flies, rodents. It is discussed the results of human longevity genetics. It is described in details the fundamental mechanisms, which influenced pleiotropically on aging speed — replicative and stress-induced cell senescence, genome stability maintenance and apoptosis. In extreme environment (starvation, heat shock, light cycle disturbances, ionizing irradiation, and oxidative stress) occurs switching from reproduction program to stress-tolerance. It has been examined basic regulatory and effector pathways, which underlies such stress-resistance. It has been offered thorough review of reproduction and aging interaction.

The book may be recommended to readership, interested in aging and longevity problems, geneticists, gerontologists, geriatricians, ecologists and radiobiologists. Bibl. 551. Il. 17. Tabl. 9.

В оформлении обложки использован фрагмент рисунка Б. Ермолаева (1977 г.)

© А. А. Москалев, 2008

© Институт биологии КомиНЦУрО РАН, 2008

© Редакционно-издательское оформление.

Издательство «Наука», 2008

ISBN 978-5-02-026314-7

ВВЕДЕНИЕ

Nascimur uno modo, multis morimur¹
Lusius Cestius Pius

Согласно классическому определению, старение — многопричинный разрушительный процесс, вызываемый комплексом регуляторных и стохастических факторов и определяемый генетически детерминированной биологической организацией живой системы (Фролькис, 1992).

Анализ изменения функций при старении (плодовитости, подвижности, памяти) демонстрирует, что различные органы и ткани подвергаются возрастзависимым нарушениям с разной скоростью (Helfand, Inouye, 2002; Girardot et al., 2006). Кроме того, длительность жизни варьирует от особи к особи, что, по-видимому, обусловлено внешними и стохастическими причинами. Даже генетически сходные или идентичные особи могут иметь различные траектории продолжительности жизни (например, рабочие особи и матки общественных насекомых). Различия в долгожительстве между разными видами составляют несколько порядков: 10^6 — между всеми таксонами (от дрожжей до сосны долговечной) и 10^2 — внутри одного класса (от бурозубок до гренландского кита, от почвенных нематод до паразитических) (Finch, 1998; Miller, 2001). Возрастные изменения могут различаться по скорости: быть медленными (у некоторых губок, деревьев, глубоководных рыб, черепахах), постепенными (у человека) или внезапными (у лососей). Существуют также практически нестареющие виды и виды с «отрицательным старением» — когда плодовитость и размеры с возрастом увеличиваются (Finch, 1998; Vaupel et al., 2004). При этом возникают вопросы: есть ли в природе место для генетической обусловленности продолжительности жизни на фоне тако-

¹ Одним способом мы рождаемся, разными — умираем, *Луций Цестий Пий*.

го разнообразия вариантов старения? Что является основным субстратом старения и возможно ли его замедление?

До середины 90-х годов XX века считалось, что мы знаем ответы: в геронтологии доминировала концепция износа, пассивного снижения функционирования с возрастом (гипотеза «катастрофы ошибок», свободнорадикальная теория, гипотеза соматического мутагенеза). Кроме того, основные эволюционные теории старения подразумевали, что «гены старения» не могут возникнуть в естественных условиях, когда до старости доживают единицы и их генетический вклад в популяцию минимален.

Последние достижения молекулярной генетики, клинической эпидемиологии и демографии подготовили почву для смены парадигмы. Экспериментальные исследования, проведенные на модельных организмах (дрожжах, нематодах, дрозофилах, грызунах), показали реальную возможность увеличения стрессоустойчивости и продления активной жизни в результате гипоморфных мутаций, делеций или сверхэкспрессии отдельных генов. Как оказалось, многие регуляторные пути, контролирующие продолжительность жизни модельных животных, являются эволюционно консервативными. Картирование некоторых локусов исключительного долгожительства у человека подтвердило эту точку зрения. Мы также близки к пониманию основ самого старения. Детально изучены старение на молекулярном (модификации ДНК, белков и липидов) и клеточном (репликативное и стресс-индуцированное старение) уровнях, а также роль дерегуляции апоптоза и генетической нестабильности в возрастных патологиях. В настоящее время намечается переход от понимания старения как пассивного накопления ошибок к представлениям о регуляторных эпигенетических изменениях, влияющих на экспрессию генов (повреждение промоторов генов, деметилирование ДНК и гистонов, компенсаторный ферментативный стресс-ответ). В целом эти эпигенетические процессы уже не выглядят спонтанными, поскольку воспроизводятся от индивидуума к индивидууму (хотя и с поправкой на биологический возраст) и зачастую предшествуют возрастным проявлениям нарушения функций.

Вполне вероятно, что небольшое количество регуляторных генов может либо непосредственно контролировать продолжительность жизни, либо делать это в ответ на внешнесредовые стимулы (Helfand, Inouye, 2002). Роль генов в процессах старения обсуждается давно, начиная с эволюционных теорий Медавара (Medawar, 1946, 1952), Вильямса (Williams, 1957) и Кирквуда (Kirkwood, 1977), однако явных успехов в данной области до последнего времени добиться не удавалось. Было известно лишь то, что наследуемость продолжительности жизни, как правило, не превышает 30 %,

т. е. соответствует наследованию полигенного количественного признака (наподобие роста или массы тела).

Генетика старения человека долгое время была ограничена методически, поскольку классические методы к данному объекту не применимы. В последнее время наметился определенный прогресс, в частности, благодаря появлению молекулярно-генетических методов работы с культурами клеток человека, картированию ряда локусов долгожительства у лиц в возрасте 90—100 лет и старше (ниже — столетние индивидуумы), и сравнению экспрессии генов различных тканей (мозга, мышц, печени, почек) стареющих и молодых индивидуумов. Была выявлена роль генотоксического и оксидативного стрессов в старении клеток человека; установлено, что при старении органов происходит репрессия около 1 % генов, начинающаяся довольно рано (после 40 лет); показана роль регуляции липопротеинового обмена и чувствительности к инсулину в долгожительстве (Lu et al., 2004; Englander, Ma, 2006; Zahn et al., 2006). Появляется вполне обоснованная надежда, что разработанных подходов уже достаточно, чтобы вскоре сделать человека главным генетическим объектом при исследовании механизмов старения.

Как оказалось, активные формы кислорода, возникающие в результате случайных ошибок в работе митохондрий, повреждают митохондриальный геном и внутреннюю мембрану этих органелл (Zhang, Herman, 2002; Balaban et al., 2005; Rand et al., 2006). Свободные радикалы, образуясь в достаточном количестве, модифицируют липиды, белки и, что часто необратимо, наследственный аппарат клетки (Martin, Grotewiel, 2006). Часть таких изменений носит регуляторный характер: например, ингибирование фосфатаз, контролирующего внутриклеточный сигналинг, т. е. цепь событий, запускаемых цитокином или гормоном (Giorgio et al., 2007). Промоторы генов ядра, которые в соответствии со своей природой богаты легко повреждаемыми GC-последовательностями, под действием свободных радикалов получают трудно реparable нарушения, что приводит к возрастзависимому выключению ряда чувствительных к оксидативному стрессу генов (Lu et al., 2004).

Помимо этого процесса в пролиферирующих тканях (красный костный мозг, эпителий кожи и кишечника) в результате стресс-активации ингибиторов циклинзависимых киназ (p21 и p16) запускается механизм, останавливающий клеточный цикл, что делает невозможным регенерацию (Patil et al., 2005; Herbig, Sedivy, 2006; Matheu et al., 2007). Схожие процессы затрагивают даже стволовые клетки, ранее считавшиеся нестареющими (Geiger et al., 2005; Sharpless, DePinho, 2007). Генетический анализ частичных синдро-

мов преждевременного старения у человека (прогерия Хатчинсона—Джилфорда, синдром Вернера, атаксия—телеангиэктазия) выявил роль нарушения структуры хроматина и нестабильности генома в старении и в возрастных патологиях (Woodruff, Thompson, 2003; Du et al., 2004; Kurz, 2004; Carter et al., 2005; Hofer et al., 2005; Scaffidi et al., 2005).

При выяснении роли генов в регуляции старения неоценимую роль сыграли модельные генетические организмы (дрожжи, нематоды, дрозофилы, грызуны). В общей сложности на этих объектах удалось выявить около ста консервативных в эволюции генов, мутации в которых существенно (иногда в несколько раз) изменяют длительность жизни. Наибольший интерес представляют гены, мутации в которых увеличивают продолжительность жизни. Показано, что некоторые из них в различных аллельных вариантах принимают участие и в естественном варьировании продолжительности жизни.

Одним из таких механизмов является инсулиновый сигналинг. Так, мутация в рецепторе инсулина у нематод в 2 раза продлевает жизнь. Исследование этого феномена выявило механизм долгожительства. В ответ на внешнесредовые стимулы (обилие пищи, обонятельные и вкусовые сигналы) инсулиновый сигналинг в нервной ткани запускает каскад реакций, в том числе опосредованных вторичными гормонами, приводящий к активному росту и развитию организма, а также к готовности репродуктивной системы к размножению. Однако при этом происходит подавление транскрипционных факторов семейства FOXO, контролирующих стресс-ответ (через индукцию белков теплового шока, митохондриальной супероксиддисмутазы, ферментов репарации ДНК) и регулирующих состав липопротеинов. В результате ускоряются процессы старения и снижается продолжительность жизни. В условиях неблагоприятной внешней среды (температурный стресс, перенаселение) инсулиновый и TOR-сигналинг подавляются, угнетаются процессы роста и размножения (Kaeberlein et al., 2005c; Baumeister et al., 2006). Одновременно индуцируются параллельные пути SIRT и JNK, в результате чего реактивируется FOXO, что позволяет увеличить общую стрессоустойчивость организма и продолжительность жизни. При этом, как следствие, мобилируются все возможности организма, происходит продление жизни для переживания неблагоприятных условий, чтобы позже приступить к размножению (Guarente, Kenyon, 2000; Partridge et al., 2005a). Данный механизм имеет место не только у примитивных животных, но, по-видимому, и у млекопитающих. Например, пептидный гормон Klotho, мутация в гене которого приводит к уменьшению продолжительности жизни мышей, служит одним из позитивных

регуляторов FOXO и контролирует окислительный стресс (Kurosu et al., 2005; Yamamoto et al., 2005).

На модельных животных свободнорадикальная теория старения также получила свое развитие. Оксидативный стресс является неотъемлемой частью клеточного старения. Репрессия или сверхэкспрессия генов ферментов антиоксидантной защиты существенно изменяет продолжительность жизни (Bayne et al., 2005; Orr et al., 2005). Однако не стоит преувеличивать их роль в естественном старении. Аналогично действуют и мутации генов белков теплового шока и ферментов репарации ДНК (Wang et al., 2003; Morrow et al., 2004; Olsen et al., 2006).

Таким образом, в последние несколько лет достигнуты значительные успехи в осмыслении генетических механизмов старения и долгожительства, благодаря чему наметились мишени для фармакологической коррекции старения и возрастзависимых заболеваний у человека.

Какова конечная цель таких исследований? После того как генетические механизмы регуляции старения будут изучены, наступит этап разработки методов замедления старения, позволяющих предотвращать развитие возрастзависимых патологий. Цель написания данной работы заключается в обзоре и систематизации достижений генетики старения и продолжительности жизни последних лет. Нами были поставлены следующие ключевые задачи:

1) обобщить эволюционные, клеточные и молекулярно-биохимические взгляды на природу генетической регуляции продолжительности жизни;

2) рассмотреть имеющиеся эволюционные и феноменологические классификации генов продолжительности жизни и предложить новую — функциональную;

3) исследовать достижения, методические особенности, преимущества и недостатки основных объектов генетики старения — дрожжей, нематод, дрозофил, грызунов; обсудить успехи генетики старения человека;

4) проанализировать основные процессы, плейотропно влияющие на скорость старения, — репликативное и стресс-индуцированное клеточное старение, поддержание стабильности генома и апоптоз;

5) рассмотреть генетические механизмы стрессоустойчивости и гормезиса, обеспечивающие возможность продления жизни при их активации молекулярно-генетическими манипуляциями или внешнесредовыми воздействиями;

6) всесторонне отразить возможные пути взаимодействия репродукции и старения, механизмы полового диморфизма продолжительности жизни.

Идея написания монографии возникла у автора после прочтения таких фундаментальных трудов, как «Молекулярные и физиологические механизмы старения» проф. Владимира Николаевича Анисимова (2003), «Стресс, старение и их биохимическая коррекция» Игоря Николаевича и Германа Игоревича Тодоровых (Тодоров, Тодоров, 2003). Кроме того, побудительной причиной была необходимость всестороннего анализа собственных экспериментальных работ в области стресс-индуцированного старения и гормезиса (влияния ионизирующей радиации, нарушения светового режима и индукции стерильности на продолжительность жизни дрозофил) в контексте современных достижений генетики старения и продолжительности жизни.

Работа не была бы возможна без обсуждения затронутых вопросов с коллегами — геронтологами и генетиками А. М. Оловниковым, Е. Г. Пасюковой, А. В. Халявкиным и М. В. Шапошниковым, со студентами и аспирантами И. О. Велегжаниновым, Е. В. Турьшевой, А. С. Яцкивом, О. А. Малышевой, Е. Н. Плюсниной и А. И. Шептяковой, а также с оппонентом моих диссертаций А. П. Акифьевым. Выражаю глубокую признательность за поддержку директору Института биологии Коми НЦ УрО РАН А. И. Таскаеву, ответственному редактору В. Н. Анисимову и рецензентам Ю. С. Оводову, В. С. Баранову и В. Г. Зайнуллину за глубокий анализ монографии, а также И. В. Рапоте, которая взяла на себя труд высказать замечания о рукописи.

Особая благодарность моей матери, Москалевой Н. И., за терпение и поддержку.



1.1. Эволюционная генетика старения

1.1.1. Эволюционные взгляды на природу старения

Если человек будет всю жизнь сохранять такую же устойчивость к стрессу и болезням, какую имеет в возрасте 10 лет, то высока вероятность того, что он будет жить несколько сот лет. Причина, по которой этого не удастся достичь, в том, что у человека и у многих, но, возможно, не у всех животных способность к саморегулированию и самоподдержанию снижается с возрастом, вследствие чего вероятность болезней и смерти возрастает. Это явление носит название «старения» (Helfand, Rogina, 2003a).

Одним из центральных догматов исследования старения был и остается закон Гомпертца (Gompertz, 1825). В начале XIX века Бенджамин Гомпертц показал, что темп смертности человека возрастает экспоненциально, и предположил, что это свойство касается всех организмов. Он назвал это явление «законом смертности». В силу экспоненциальной природы гомпертцовой кривой выживания неизбежно наступает момент, когда уже нельзя ожидать выживания ни одного представителя вида (Gompertz, 1825). Как известно, старение происходит лишь в определенный период жизни, тогда как смерть может наступать в любом возрасте. Однако именно старение делает гибель неизбежной, обуславливая снижение способности отвечать на стресс и увеличение частоты патологий (Weinert, Timiras, 2003).

Поскольку естественный отбор способствует репродуктивной приспособленности, продолжительность жизни является селективным признаком, если она содействует репродуктивному успеху (Weinert, Timiras, 2003). Как следствие, продолжительность жизни на видовом уровне пластична: при благоприятных условиях обитания она максимизируется отбором, поскольку способствует более длительной репродукции; при неблагоприятных условиях (на-

пример, давление хищников) она уменьшается, но возрастает ранняя репродукция.

Эта идея была проверена в естественных условиях при сравнении опоссумов, живущих на континенте и на свободных от хищников островах. В случае адаптивности продолжительности жизни островные опоссумы получают возможность естественного отбора на долгожительство. Действительно, островные опоссумы живут дольше и стареют медленнее, чем континентальные (Weinert, Timiras, 2003).

Однако находится ли под давлением естественного отбора старение, ограничивающее продолжительность жизни?

Начиная с Рональда Фишера (Fisher, 1930) эволюционные биологи выдвигают в качестве главной причины возникновения старения возрастзависимое снижение силы отбора. Данная точка зрения получила свое развитие в эволюционной концепции сэра Питера Медавара (Medawar, 1946, 1952), который постулировал старение как случайное неадаптивное явление. При этом он опирался на то, что популяция подвержена голоду, засухе, давлению хищников, болезням и несчастным случаям и что причиной смерти зачастую являются случайные повреждения. Отсюда Медавар делает вывод, что старые индивидуумы в природе встречаются слишком редко, чтобы влиять на генофонд популяции как в пользу старения, так и против него. Наравне с демонстрацией неадаптивности старения данная концепция обосновывает отсутствие специализированных генов «программы старения».

Медавар показал, что изменения, которым подвергается организм после остановки размножения, не имеют значения для эволюции. Другими словами, после пика репродукции сила естественного отбора стремится к нулю, а остающаяся часть жизни представляет собой стохастическое снижение функциональности (Helfand, Inouye, 2002). Если вредные мутации, проявляющиеся в молодости, встречают жесткое сопротивление отбора из-за отрицательного вклада в приспособленность (оставление потомства), то аналогичные мутации, проявляющиеся поздно, относительно нейтральны, поскольку их носители уже передали гены потомству. Эволюционная концепция Медавара получила название «теории накопления мутаций», и ее смысл заключается в следующем: поскольку гены с вредными эффектами, проявляющимися поздно, практически не встречают сопротивления естественного отбора, такие мутации накапливаются и обуславливают старение.

Например, пациенты с прогерией Хатчинсона—Джилфорда (синдромом преждевременного старения) живут около 12 лет и не успевают передать свои гены потомству, поэтому данное заболевание возникает заново за счет спонтанных мутаций. Наследст-

венная болезнь Альцгеймера проявляется поздно, и носители данной мутации успевают оставить потомство до появления симптомов, поэтому данное заболевание более распространено (Gavrilov, Gavrilova, 2002). Одно из предсказаний теории накопления мутаций, таким образом, состоит в том, что частота наследственных заболеваний, проявляющихся в старости, выше, чем в молодости. Выражаясь генетическим языком, равновесные частоты генов вредных мутаций увеличиваются с возрастом их проявления. Генетическое разнообразие по продолжительности жизни (аддитивная генетическая вариация) будет нарастать с возрастом. Теория Медавара также предсказывает, что зависимость долгожительства потомства от продолжительности жизни родителей не является линейной, как это справедливо и для других количественных признаков (например, массы тела). В то же время она будет иметь необычную — нелинейную форму, проявляющуюся в увеличении угла наклона для регрессионной зависимости длительности жизни потомства от долгожительства родителей. Это теоретическое положение было подтверждено при анализе данных продолжительности жизни в аристократических европейских семьях (Charlesworth, 1994; Gavrilova et al., 1998).

Прямое подтверждение концепции Медавара затруднено, поскольку речь идет о кумулировании множества малых вредных эффектов аллелей, тогда как стандартные методы мутационного анализа и картирования локусов количественных признаков (QTL) способны выявлять лишь большие эффекты. Однако сочетание методов QTL-анализа с изучением паттернов возрастзависимой экспрессии генов в будущем позволит идентифицировать и небольшие эффекты.

Генетическую изменчивость, вернее говоря, ее статистический эквивалент — дисперсию принято подразделять на отдельные компоненты: аддитивную генетическую дисперсию (аллели не взаимодействуют), доминантную (неаддитивную дисперсию, обусловленную взаимодействием аллелей в одинаковых хромосомных локусах) и эпистатическую (неаддитивную дисперсию, обусловленную взаимодействием разных локусов). Если накопление мутаций вносит вклад в старение, то будет иметь место возрастзависимое увеличение доминантной генетической дисперсии. Инбредная депрессия (снижение жизнеспособности потомства в результате выхода вредных аллелей в гомозиготу) также должна нарастать с возрастом. Действительно, вредные эффекты инбридинга накапливаются как для возраст-специфичной смертности, так и для фертильности самцов. Увеличение происходит, поскольку генетическая дисперсия и инбредный груз пропорциональны равновесным частотам вредных аллелей и поскольку эти частоты

будут увеличиваться с возрастом (Hughes et al., 2002; Snoko, Promislow, 2003).

Однако, как отмечает Боулз, положенная в основу теории накопления мутаций ситуация — лишь частный случай популяции, характеризующейся возрастной структурой, смещенной по направлению к молодым индивидуумам. Он считает, что выводы Медавара нельзя распространять на популяции, свободные от давления хищников; кроме того, теория Медавара не учитывает конкуренцию за ресурсы и полностью игнорирует существование нестареющих видов (Bowles, 2000).

Согласно теории Медавара, следующая за пиком размножения часть жизни представляет собой стохастическое пассивное снижение функционирования. Однако исследования у дрозофилы экспрессии генов, помеченных маркером *lacZ* (дает окраску на β -галактазидазу), а также экспрессионных чипов у различных животных свидетельствуют о динамическом, но воспроизводимом изменении паттерна генной активности с возрастом. При этом не выявлено дисрегуляции или глобальной потери гомеостаза (Helfand, Inouye, 2002). Следовательно, организм активно пытается компенсировать стохастически накапливающиеся повреждения, т. е. нет никакого пассивного функционального спада, что также необходимо учитывать в обобщенной модели старения.

Наконец, постепенное снижение функционирования предполагает строгий экспоненциальный рост темпа смертности с возрастом. Однако использование очень больших объемов данных по продолжительности жизни дрозофил, средиземноморских мух *Ceratitis capitata* и людей выявило на кривой смертности плато или даже спад, соответствующий пострепродуктивному периоду жизни. Во времена Гомпертца, сформулировавшего экспоненциальный закон смертности, это явление не было отмечено по той причине, что замедление темпов смертности наступает у человека после 80 лет, а плато не обнаруживается до 110 лет. Таких данных во времена Гомпертца просто не могло быть (Helfand, Inouye, 2002).

Таким образом, несмотря на подтверждения отдельных предсказаний теории накопления мутаций, в существующем виде она не является законченной моделью, поскольку противоречит некоторым фактам генетики и демографии продолжительности жизни.

Джордж Вильямс предположил, что аллели, увеличивающие выживаемость или репродукцию на ранних этапах жизненного цикла, но при этом снижающие их на поздних этапах, могут накапливаться в популяциях, поскольку селективные преимущества ранней пользы перевешивают поздний ущерб (Williams, 1957). Эта теория старения получила название «антагонистическая плейотропия». Вильямс постулировал также, что быстрое развитие ин-

дивидуума будет коррелировать с быстрым старением: чем скорее будет достигнуто половое созревание, тем раньше начнется старение (Williams, 1957). Однако в экспериментах на дрозофиле было показано, что между скоростью развития и продолжительностью жизни отсутствует линейная связь — зависимость здесь обратная двухфазная (Economos, Lints, 1986). Теория Вильямса делает еще одно предсказание: отбор на увеличение продолжительности жизни ведет к снижению ранней плодовитости. Действительно, экспериментально показана отрицательная взаимосвязь между ранней и поздней плодовитостью, по крайней мере для лабораторных популяций (Hughes et al., 2002). Кроме того, с возрастом снижается величина соотношения доминирования и аддитивной дисперсии, что также соответствует теории антагонистической плейотропии (Snoke, Promislow, 2003).

Теория антагонистической плейотропии получила яркие подтверждения в современных молекулярно-генетических исследованиях природы старения. Например, антагонистически плейотропным может быть старение делящихся клеток (необратимое прекращение делений при повреждениях), стимулируя раннюю жизнеспособность путем уменьшения вероятности рака и в то же время ограничивая продолжительность жизни вследствие накопления дисфункциональных стареющих клеток (Campisi, 2005). Механизмом такой антагонистической плейотропии может быть укорочение теломер при последовательных делениях соматических клеток. Данная точка зрения подтверждается тем, что благоприятные лабораторные условия содержания и размножения приводят к чрезмерному удлинению теломер многих линий мышей. По-видимому, отбор грызунов, направленный на увеличение репродукции, был противопоставлен репродуктивному старению и нивелировал отбор, который способствовал подавлению опухолей (Weinstein, Ciszek, 2002). Еще одним примером можно считать ген *p53*, который одновременно является и супрессором опухолей, и геном клеточного старения. У человека рост и нормальное функционирование простаты стимулируются андрогенами. В старости эти гормоны могут вносить вклад в возникновение рака простаты — одной из распространенных причин смертности мужчин (Weinert, Timiras, 2003). Гены, задействованные в инсулиновом сигналинге, синтезе и рецепции липофильных гормонов (дафахроновой кислоты, экидизона, ювенильного и тиреоидных гормонов, эстрогенов и андрогенов), от нематод до млекопитающих выполняют двоякую функцию: стимулируя рост и размножение, они подавляют стрессоустойчивость, в результате ускоряя старение.

Таким образом, известны гены, играющие важную роль в ранней приспособленности и плодовитости, мутации которых прод-

левают жизнь. Однако эти данные могут свидетельствовать в пользу теории антагонистической плейотропии только в случае селективности таких генов в естественных популяциях. На этот вопрос помогли ответить исследования локусов количественных признаков в популяциях дрозофил. Оказалось, что многие известные по мутационному анализу гены продолжительности жизни участвуют во внутривидовом варьировании скорости старения, среди них локус инсулиноподобного рецептора, кластер белков теплового шока и др. (Flatt, 2004). У человека полиморфизм генов, участвующих в сигналинге IGF-1, также тесно коррелирует с долгожительством (Bonafe et al., 2003). Таким образом, главные «геронтогены», обнаруженные методами молекулярной генетики, играют роль в формировании продолжительности жизни в естественных популяциях, что может служить веским подтверждением теории антагонистической плейотропии.

При антагонистической плейотропии старение возникает как результат «компромисса» между ранней и поздней приспособленностью и любое генетическое или эволюционное изменение, влияющее на старение, будет сопровождаться модификацией той компоненты приспособленности, которая касается молодости. Напротив, теория накопления мутаций предполагает, что старение вызывается, по крайней мере отчасти, аллелями, нейтральными в молодости, поэтому генетические или эволюционные изменения, затрагивающие старение, не должны сопровождаться изменениями в ранней приспособленности (Hughes et al., 2002). Таким образом, главным различием этих теорий является то, что в теории накопления мутаций гены с негативными эффектами в старости пассивно кумулируются от одного поколения к другому, тогда как при антагонистической плейотропии эти гены активно поддерживаются в популяции посредством естественного отбора. Тем не менее эти теории не являются взаимоисключающими. Оба эволюционных механизма могут иметь место одновременно (Gavrilov, Gavrilova, 2002).

Эволюционные теории предсказывают влияние различий во внешней смертности на внутренний темп смертности (т. е. на скорость старения), а также на рост, созревание, размер тела и репродукцию. Если смертность от внешних причин увеличивается, то вероятность достижения пострепродуктивного возраста уменьшается и ускоряется снижение силы отбора с возрастом. Отсюда следует вывод: высокий темп смертности от внешних причин должен вести к увеличению скорости старения и снижению наследственно закрепленной продолжительности жизни. Экспериментально доказано, что мухи, живущих в условиях высокой смертности взрослых особей, развиваются быстрее, имеют меньшие раз-

меры и раньше достигают пика яйцепродукции. Скорость демографического старения (внутренняя смертность) у них также значительно выше (Stearns et al., 2000).

Еще одним доказательством правильности эволюционных взглядов на генетику старения является уменьшение продолжительности жизни линий дрозофилы, долгое время культивируемых в лабораторных условиях, по сравнению с природными популяциями. Лабораторные линии обычно поддерживаются при 2-недельном времени генерации, при котором мухи старше 5—6 дней не имеют возможности внести генетический вклад в будущие поколения. Это создает благоприятные условия для ранней репродукции и потенциального увеличения частоты генов, ей способствующих. Отрицательная корреляция между ранней плодовитостью и выживаемостью обуславливает уменьшение продолжительности жизни. Новые вредные мутации, чьи эффекты ограничены возрастом, превышающим неделю, будут фактически нейтральными. Частота таких генов в поколениях будет возрастать одновременно с предрасположенностью к ранней плодовитости и с низкой продолжительностью жизни. Действительно, долго поддерживаемые в лабораторных условиях линии дрозофил дикого типа живут меньше, чем вновь отловленные в дикой природе (Linnen et al., 2001).

Постулированная Вильямсом взаимосвязь между продолжительностью жизни и плодовитостью не абсолютна. Некоторые долгоживущие линии дрозофилы имеют нормальную репродуктивную способность, а долгоживущие каролинские коробчатые черепахи (*Terrapene carolina*) продолжают размножаться, даже когда им более 60 лет. Виды животных, избежавшие давления хищников, могут одновременно повергаться естественному отбору как на долгожительство, так и на плодовитость. Например, общественные насекомые кооперируются для поддержания единственной матки. Матка, защищенная от внешней среды и испытывающая заботу со стороны рабочих муравьев, дает начало сотням и тысячам потомков в день и при этом в ряде случаев доживает до 30 лет. При этом родственные необщественные виды насекомых живут всего лишь месяцы (Weinert, Timiras, 2003).

Однако вышесказанное не противоречит представлениям эволюционистов. Если отсутствуют высокие темпы смертности и отбора на раннюю репродукцию, то будут наблюдаться задержка созревания, меньшее инвестирование ресурсов в репродукцию и большее — в соматическое поддержание. Организмы с эффективной защитой — роющие, летающие, планирующие, глубоководные, использующие укрытия (пещеры) либо имеющие раковины, панцирь, большие размеры, а также общественные животные развивают эффективные молекулярные адаптации антистарения (Hol-

mes, Ottinger, 2003). Напротив, не способные к полету или плохо летающие представители млекопитающих и птиц имеют более высокую скорость старения и значительно меньшую продолжительность жизни, чем летающие хорошо, несмотря на высокий темп метаболизма и потребность в кислороде в связи с полетом. Например, летучие мыши и планирующие млекопитающие живут дольше наземных, а селящиеся на земле птицы, такие как охотничье-промысловые, страусы, пастушки, относятся к короткоживущим (и быстро стареющим) представителям класса птиц (Holmes, Ottinger, 2003).

Относительное долгожительство птиц по сравнению с млекопитающими сопровождается замедлением репродуктивного старения обоих полов. Это еще раз подтверждает эволюционную селективность продолжительности жизни. Домашние птицы размером с мышь, например волнистые попугайчики и канарейки, имеют репродуктивную продолжительность жизни иногда в несколько раз большую, чем крысы и мыши (5 лет вместо 2). Американская пустельга с массой тела 110 г и максимальной продолжительностью жизни 10 лет характеризуется незначительным репродуктивным старением вплоть до 7-летнего возраста. В условиях неволи птицы часто имеют пострепродуктивную фазу порядка одной трети от продолжительности жизни. Многие морские птицы, включая чаек, альбатросов, глупышей и крачек, характеризуются лишь незначительным снижением плодовитости в конце жизни (например, у глупышей — после 50 с лишним лет), при этом старение других систем ясно прослеживается (Anderson, Apanius, 2003; Holmes, Ottinger, 2003).

Предложенная Томом Кирквудом теория «отработанной сомы» (*disposable soma theory*) — особый случай антагонистической плейотропии (Kirkwood, 1977). В ней постулируется существование генов, которые контролируют перераспределение энергетических ресурсов от сомы к репродукции. Согласно этой теории, репарация соматических повреждений, требующая затрат энергии, конкурирует за потребности в энергии с репродукцией. С эволюционной точки зрения, бесполезно расходовать слишком много энергии на поддержание сомы, если в результате постоянного давления на популяцию неблагоприятных условий среды шансы прожить долго невелики. В такой ситуации более адекватным решением является быстрое размножение, чтобы успеть оставить потомство до своей гибели. Когда жизненные условия вида улучшаются (например, выход в новую экологическую нишу, заселение новых местообитаний) и соответственно возрастает шанс более длительного существования, полезно будет переключить баланс в пользу поддержания жизнеспособности, поскольку в таком

случае репродуктивная жизнь увеличится. Так, например, если бы полевая мышь обладала способностью самоподдержания, достаточной для 20-летней жизни, то она неверно распределила бы свои соматические ресурсы, так как лисы и совы съедают большинство полевых мышей за 3 месяца. Ей ничего не остается, как направить все усилия на оставление потомства. Люди эволюционировали по пути вложения большей части энергетических ресурсов в репарацию тканей и могут позволить себе долгожительство, оставляя небольшое количество потомков, но предоставляя им качественную и долговременную заботу (Wright, Shay, 2005a).

Идентификация десятков мутаций, увеличивающих продолжительность жизни и стрессоустойчивость модельных систем, поддерживает еще одну теорию — «программу продолжительности жизни» (Lithgow et al., 1995; Murakami, Johnson, 1996; Guarente, Kenyon, 2000; Longo et al., 2005; Partridge et al., 2005a). В отличие от вариантов, рассматриваемых теориями накопления мутаций и отработанной сомы, опирающихся на постоянное давление неблагоприятных условий среды (хищников, болезней), программа долгожительства могла возникнуть в эволюции для переживания кратковременных экстремальных внешних воздействий (перегрев, переохлаждение, снижение калорийности питания). В условиях стресса эта программа позволяет организму превысить его нормальную продолжительность жизни путем вступления в «режим поддержания». Он связан с такими изменениями, как подавление биосинтеза структурных белков и экспрессии генов «домашнего хозяйства», роста и размножения клеток, а также с приостановкой репродукции и повышением стрессоустойчивости. Дело в том, что выживаемость потомства в условиях кратковременных неблагоприятных изменений среды будет минимальной, поэтому более выгодно перераспределить ресурсы на пережидание, чтобы после приступить к размножению. Искусственно вызванные мутации долгожительства влияют на эту программу таким образом, что особи переходят в режим поддержания уже независимо от внешнесредовых условий.

Идея программы продолжительности жизни во многом напоминает концепцию гормезиса — стимулирующего действия малых доз факторов, оказывающих губительное воздействие в больших дозах (среди них, например, тяжелые металлы, ионизирующая и УФ-радиация, гипергравитация, гиперосмотический шок). По-видимому, возникнув в эволюции для выживания популяции в условиях экстремальных температур и кратковременного голодания, молекулярные (БТШ, ферменты репарации ДНК) и клеточные (временная остановка роста и деления клетки либо апоптоз с последующей компенсаторной пролиферацией) механизмы

стрессоустойчивости могут справляться и с другими стрессами (например, с генотоксическими и окислительными эффектами радиации). Они же противостоят спонтанному возрастзависимому накоплению повреждений, обуславливающих старение. Иными словами, речь идет о своеобразной перекрестной адаптации. Если такая перекрестная адаптация действительно имеет место, то, к примеру, умеренный температурный стресс или скученность особей на ранних стадиях развития будут вызывать адаптивный ответ на последующее облучение, а радиационный гормезис обусловлен теми же генами, что и «программа продолжительности жизни» при действии теплового шока. Однако данное предположение требует тщательной экспериментальной проверки.

Программу долгожительства следует отличать от эволюционной теории «запрограммированного старения», которая стала исторически первой эволюционной теорией старения. Ее сформулировал немецкий биолог XIX века Август Вейсман (**Weismann, 1889**). Основная идея его теории в том, что старение — побочный продукт реализации генетической программы онтогенеза. Цель такой запрограммированной гибели — освобождение жизненного пространства и ресурсов для молодых поколений. Вейсман предложил биологический механизм для такой программы — ограничение числа делений соматических клеток в отличие от неограниченно пролиферирующих герминативных клеток. Межвидовые различия в продолжительности жизни животных он пытался объяснить числом клеточных генераций.

Одним из способов проверки гипотезы запрограммированной смерти является сравнение продолжительности жизни особей вида в естественных и защищенных (домашних, лабораторных) условиях. Если гипотеза верна, то программа старения не позволит сильно различаться естественной длительности жизни, сформированной под давлением хищников, голода, инфекций, и продолжительности жизни в лабораторных условиях. Однако реальная картина оказалась совершенно противоположной: продолжительность жизни в защищенной среде значительно превышает наблюдаемую в природе. Например, зяблик (*Fringilla coelebs*) доживает в неволе до 29 лет, тогда как в природе продолжительность его жизни в среднем 1.5 года. Аналогичным образом, отдельные особи серой полевки (*Microtus arvalis* Pall) в лаборатории доживают до 25 месяцев, однако в природе они в среднем живут 1.2 месяца. У шимпанзе (*Pan troglodytes*) медианная продолжительность жизни в неволе составляет 23 года для самцов и 30 лет для самок, почти 20 % особей доживают до 50 лет. В естественной среде медианная продолжительность жизни не превышает 8 лет (**Gavrilov, Gavrilova, 2002**). Второй способ верификации теории запрограм-

мированной смерти — изучение зависимости уровня смертности от возраста животного. Если теория верна, то в определенном возрасте, когда мнимая программа запускается в действие, уровень смертности будет нарастать взрывообразно. На практике зависимость уровня смертности от возраста часто плавная и монотонная, без критических точек. В предельно старом возрасте уровень смертности даже ниже, чем ожидается в соответствии с монотонной моделью Гомпертца (Gavrilov, Gavrilova, 2002).

С эволюционной точки зрения, механизмы терминации едва ли способствуют успеху выживания индивидуума и его потомства. В то же время спонтанные мутации, отменяющие предполагаемую программу, способны привести к быстрому вытеснению из популяции запрограммированных на гибель особей — ведь их конкуренты за более долгую жизнь будут оставлять большее количество потомства или предоставлять ему длительную родительскую заботу (Гаврилов, Гаврилова, 1991; Gavrilov, Gavrilova, 2002).

Приведем здесь еще несколько возражений против концепции запрограммированного старения (Longo et al., 2005): 1) вклад старения в индивидуальную приспособленность полностью негативен; 2) вклад старения в приспособленность на популяционном уровне слишком не прямой и размытый, чтобы быть важным для отбора, поэтому не может рассматриваться как адаптация; 3) старение легко объяснить снижением силы давления отбора с возрастом.

Идея Вейсмана (Weismann, 1885) получила развитие в концепции фенотоза, выдвинутой акад. В. П. Скулачевым (Скулачев, 1999; Longo et al., 2005). Она предполагает специальную программу суицида целого организма. В качестве основного механизма фенотоза постулируется апоптоз, в свою очередь запускаемый митоптозом — самоликвидацией митохондрий. Эволюционным механизмом такого суицида может быть родственник (когда организмы стареют и гибнут для пользы родственников) либо групповой отбор (гибель для пользы организмов, не связанных родственными узами). Теоретически старение может обуславливать стабилизацию популяции, усиление генетического разнообразия, укорочение эффективного цикла генерации и ускорение адаптации. Локальное вымирание в результате перенаселения может поддерживать популяционный отбор, достаточно сильный и быстрый для преодоления индивидуальной цены за запрограммированное старение. Аргументами в пользу данной теории можно считать существование быстро стареющих видов и программ апоптоза у одноклеточных (дрожжей).

В связи с запрограммированностью старения следует вспомнить гипотезу Алексея Бойко (2007). Он обосновывает относительно быстрое старение млекопитающих возникшим у них апо-21

морфозом — развитием «постмитотического мозга» при трансформации в онтогенезе клеток радиальной глии в звездчатые астроциты после завершения процессов нейрогенеза. Бойко рассматривает старение млекопитающих как генетическую болезнь, преодоление которой возможно путем восстановления радиальной глии. В качестве аргумента он указывает на сохранение радиальной глии и возможность обновления мозга у птиц, которые стареют медленнее, чем многие млекопитающие. Однако идея о ключевой роли данного ароморфоза в старении млекопитающих вступает в конфликт с фактом существования видов-долгожителей среди китообразных, рукокрылых, грызунов (голово слепыша) и не объясняет значительных различий в скорости старения рыб, сохраняющих радиальную глию.

Согласно известному выражению выдающегося генетика XX века Феодосия Добржанского (Dobzhansky, 1964), «биология приобретает смысл только в свете эволюции». Эволюционные теории старения заложили прочный фундамент генетики старения и продолжительности жизни. Они обосновали механизмы влияния генов на скорость старения и сделали предсказания, побудившие экспериментаторов к поиску конкретных генов долгожительства, в последние годы увенчавшемуся успехом.

1.1.2. Межвидовые различия продолжительности жизни

Существование межвидовых различий продолжительности жизни иногда рассматривается как доказательство генетической обусловленности процесса старения. Таким образом, анализ этих различий проливает свет на генетическую регуляцию продолжительности жизни и позволяет выявлять эволюционно консервативные («публичные») и уникальные для конкретных видов («приватные») гены продолжительности жизни.

Продолжительность жизни видоспецифична, поскольку она есть функция жизнеспособности и репродуктивной стратегии в конкурентной среде (Weinert, Timiras, 2003). При этом длительность жизни размножающихся половым путем организмов различается в миллион раз (табл. 1). Однако следует иметь в виду, что общая продолжительность жизни не всегда соответствует скорости старения, поскольку длина стадий развития варьирует между видами или даже популяциями в широких пределах. Крайняя степень разделения развития и старения наблюдается у определенных растений, чьи ювенильные фазы длятся многие десятилетия или даже столетия, а после созревания и цветения они быстро стареют

Таблица 1
 Виды с высокой скоростью старения
 (по: AnAge Database, 2006)*

| Видовое название | Максимальная продолжительность жизни |
|--|---|
| <i>Puya raimondii</i> (пуйя Раймонда) | 150 лет, гибнет после первого цветения |
| <i>Phyllostachys bambusoides</i> (толстостебельный бамбук) | 120 лет, гибнет после первого цветения |
| <i>Oncorhynchus</i> sp. (тихоокеанский лосось) | 6 лет, гибнет после первой репродукции |
| <i>Nothobranchius furzeri</i> (нотобранх) | 3 месяца |
| <i>Octopus hummelincki</i> (шмелевидный двупятнистый осьминог) | 2 года, самка погибает после яйцекладки |
| <i>Drosophila melanogaster</i> (плодовая муха) | 100 дней |
| <i>Caenorhabditis elegans</i> (нематода) | 30 дней |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (дрожжи) | 2—4 дня в течение полового деления |

* Здесь и далее, табл. 2—5, данные см. в сети **Internet** (<http://genomics.senescence.info/species/index.html>).

и погибают (бамбук). По скорости старения виды условно подразделяются на стареющие быстро, постепенно, незначительно и отрицательно (Finch, 1998; Vaupel et al., 2004).

Быстрое старение может длиться от нескольких часов до нескольких дней и часто приводит к гибели после первой репродукции (табл. 1). При этом функциональный спад с возрастом в популяции происходит у всех особей практически одновременно. Нередко такое старение запускается гормональным триггером (Finch, 1998). Например, самка шмелевидного двупятнистого осьминога перестает питаться и гибнет сразу после откладки яиц, что можно предотвратить удалением обеих оптических желез (Wodinsky, 1977; Longo et al., 2005). Тихоокеанский лосось погибает в течение первого репродуктивного сезона, и его гибель запускается глюкокортикоидными гормонами (Finch, 1998). Некоторые исследователи возражают против самого применения термина «ускоренное старение» к данным случаям. Так, ускоренная гибель лосося объясняется необходимостью увеличения эвтрофикации участков нереста: разлагающиеся трупы родительских особей служат кормом для рачков, которые в свою очередь станут пищей для мальков.

Однако сам факт суицида не отвергает возможности его протекания по механизму ускоренного старения, тем более что глюкокортикоиды играют заметную роль в естественном старении человека (см., например: Тодоров, Тодоров, 2003).

К категории быстростареющих организмов можно отнести дрожжи, нематоду, дрозофилу, некоторые цветковые растения, поскольку их малая продолжительность жизни связана с коротким периодом репродукции (табл. 1). Данный вид старения нечасто встречается у позвоночных животных (лишь у некоторых видов рыб). Примером является нотобранх (*Nothobranchius furzeri*, сем. карпозубые), обитающий в быстро пересыхающих африканских водоемах. В неволе последний доживает лишь до 3 месяцев, что является рекордно коротким сроком среди позвоночных животных (Terzibasi et al., 2007).

Человеку и другим млекопитающим, как правило, свойственно постепенное старение (табл. 2), которое (в отличие от быстрого старения) не синхронизируется с репродуктивной активностью в популяции. Практически все млекопитающие имеют постепенное

Таблица 2
Виды, характеризующиеся постепенным старением
(по: AnAge Database, 2006)*

| Видовое название | Максимальная продолжительность жизни, число лет |
|--|---|
| <i>Sula granti</i> (галапагосская морская олуша) | 1301, |
| <i>Aquila chrysaetos</i> (беркут) | 1481, |
| <i>Mus musculus</i> (обыкновенная мышь) | 1141, |
| <i>Heterocephalus glaber</i> (голый слепыш) | 128.3 |
| <i>Plecotus auritus</i> (бурый ушан) | 1301, |
| <i>Myotis blythii</i> (остроухая ночница) | 1331, |
| <i>Myotis lucifugus</i> (малая бурая ночница) | 1341, |
| <i>Pteropus giganteus</i> (индийская летучая лисица) | 1401, |
| <i>Myotis brandti</i> (обыкновенная ночница) | 1411, |
| <i>Elephas maximus</i> (азиатский слон) | 165.5 |
| <i>Balaena mysticetus</i> (гренландский кит) | 2111, |
| <i>Homo sapiens</i> (человек) | 122.5 |

* См. табл. 1. 24

возрастзависимое снижение репродукции и функционирования: потеря костной массы, ухудшение атерогенеза, нарушение пролиферации сосудистого эпителия, накопление амилоида в нервной ткани (Finch, 1998). При сопоставлении механизмов старения лабораторных мышей и человека первых иногда относят к быстро-стареющим организмам, что не совсем верно, поскольку их старение не запускается триггером и не синхронизируется с репродукцией.

Среди постепенно стареющих групп животных особо выделяются летучие мыши, которые, несмотря на высокий метаболизм, стареют более медленно, чем соответствующие им по массе тела грызуны. В среднем продолжительность жизни летучих мышей в 3.5 раза больше, чем нелетающих плацентарных млекопитающих подобного размера. С чем это связано? Долгожительством значительно возрастает у видов летучих мышей, характеризующихся появлением зимней спячки и использованием укрытий (например, пещер), но снижается с увеличением темпов размножения и времени, проводимого в полете, однако не зависит от диеты или размеров колоний (Wilkinson, South, 2002). Исключительное долгожительство летучих мышей ранее объясняли снижением темпов метаболизма в связи с периодами оцепенения и зимней спячки (теория интенсивности жизнедеятельности). Однако птицы, обладающие более интенсивным метаболизмом, чем млекопитающие, тем не менее живут дольше. Напротив, продолжительность жизни сумчатых млекопитающих, имеющих в среднем меньший темп метаболизма, короче, чем у плацентарных. Сильная корреляционная связь между продолжительностью жизни, темпами репродукции и наличием зимней спячки может свидетельствовать в пользу теории отработанной сомы, поскольку в зимнее время имеет место перераспределение энергетических ресурсов организма от репродукции к самоподдержанию. Тем не менее продолжительность жизни не впадающих в спячку тропических видов летучих мышей не меньше, чем у гибернирующих. Альтернативное объяснение относительно длинной продолжительности жизни летучих мышей — снижение риска смертности от внешних причин. Эти результаты согласуются с эволюционной концепцией Медавара (Medawar, 1952), связывающей увеличение рисков гибели со скоростью старения: при благоприятных условиях существования вида репродуктивная продолжительность жизни возрастает, что способствует отметанию аллелей, имеющих возрастзависимые вредные эффекты (Wilkinson, South, 2002).

Еще больше замедляется старение у птиц. Большинство птиц живет в несколько раз дольше млекопитающих с эквивалентной массой тела. При этом у них выше скорость метаболизма (в 1.5—

2.5 раза), энергозатраты (до 10 раз), температура тела (на 3 °C), уровень глюкозы в крови (в 2—5 раз). Даже колибри и маленькие певчие птицы часто доживают в дикой природе до 5 лет. Некоторые дикие морские птицы живут свыше 50 лет. Попугаи в неволе достигают возраста свыше 75 лет. Тем не менее птицы, как и млекопитающие, склонны ко многим возрастным патологиям, включая бесплодие, сердечно-сосудистые заболевания, рак, катаракту, остеоартрит и диабет. Однако возникают они в более позднем возрасте. Это вполне согласуется с эволюционными взглядами на старение, поскольку медленно стареющие виды птиц менее подвержены внешним причинам смерти (прежде всего, нападениям хищников) благодаря способности к полету (Holmes, Ottinger, 2003).

Мнение о повсеместности старения весьма распространено. Однако несколько видов (табл. 3) из различных филетических групп не проявляют снижения функциональности с возрастом. Среди них некоторые рыбы, морские и сухопутные черепахи, лобстеры, раковинные моллюски и некоторые растения (Helfand, Rogina, 2003a). Существуют свидетельства отсутствия возрастзависимого снижения функций у таких долгожителей, как хвойные растения. Отдельные экземпляры сосны долговечной в штате Невада доживают до 4800 лет и более. Причем репродуктивного старения деревьев в возрасте 700—4700 лет не обнаружено. Гибель этих древних деревьев наступает по внешним причинам: пожар, эрозия почвы, насекомые-вредители. Старейшие деревья живут на возвышенностях (здесь они реже подвергаются атакам насекомых или испытывают конкуренцию со стороны других деревьев), в более равнинной местности продолжительность жизни редко превышает 1500 лет (Finch, 1998). Незначительное старение (negligible senescence) встречается и у некоторых глубоководных рыб, доживающих, по данным радиоизотопного анализа, по крайней мере до 140 лет. Это алеутский морской окунь на северо-западе Тихого океана, атлантический большешолов в Южном полушарии и глубоководный солнечник-аллоцит, обитающий у побережья на юго-востоке Камчатки. Выловленные старые особи имеют обильную икру и характеризуются отсутствием выраженной патологии (Finch, 1998; Бойко, 2007).

«Отрицательное старение» (negative senescence) характеризуется снижением смертности с возрастом после наступления репродуктивной зрелости. Оно довольно распространено и встречается среди видов, на зрелых стадиях жизненного цикла которых как размеры, так и плодовитость продолжают увеличиваться. Если постепенному старению присущи нарастающие темпы гибели, то «отрицательное старение» отличается снижением с возрас-

Таблица 3 Виды с незначительным старением (по: AnAge Database, 2006)*

| Видовое название | Максимальная продолжительность жизни, число лет |
|--|---|
| <i>Scolymastra joubini</i> (гигантская антарктическая губка) | 15000 |
| <i>Larrea tridentata</i> (креозотовый куст), клональный организм | 11700 |
| <i>Cinachyra antarctica</i> , эпибентосная губка | 11550 |
| <i>Pinus longaeva</i> (сосна долговечная) | 14862 |
| <i>Sequoiadendron giganteum</i> (секвойдендрон гигантский) | 14000 |
| <i>Strongylocentrotus franciscanus</i> (красный морской еж) | 11200 |
| <i>Homarus americanus</i> (североатлантический омар) | 11100 |
| <i>Arctica islandica</i> (исландская циприна), двустворчатый моллюск | 11220 |
| <i>Sebastes aleutianus</i> (морской окунь алеутский) | 11205 |
| <i>Hoplostethus atlanticus</i> (атлантический большеголов) | 11149 |
| <i>Allocyttus verrucosus</i> (лунник, или глубоководный солнечник-аллоцит) | 11140 |
| <i>Acipenser fulvescens</i> (американский озерный осетр) | 11152 |
| <i>Bufo bufo</i> (обыкновенная жаба) | 11140 |
| <i>B. americanus</i> (американская жаба) | 11136 |
| <i>Geochelone nigra</i> (гигантская галапагосская черепаха) | 11177 |
| <i>G. gigantea</i> (исполинская черепаха) | 11152 |
| <i>Terrapene carolina</i> (каролинская коробчатая черепаха) | 11138 |
| <i>Emydoidea blandingii</i> (пресноводная черепаха блэндинга) | 11177 |
| <i>Chrysemys picta</i> (черепаха расписная) | 11161 |

* См. табл. 1.

том скорости гибели и замедлением функционального спада (Vaupel et al., 2004). Веские доказательства «отрицательного старения» у животных получены на кораллах. Три вида кораллов (*Goniastrea aspera*, *G. favulus* и *Platygyra sinensis*) характеризуются смертностью, обратно пропорциональной размеру колонии и возрасту. Более того, суммарная выработка половых продуктов у них постоянно возрастает. Аналогичные результаты были получены для

двух других кораллов, *Muricea californica* и *M. fruticosa*. Подобно массивным рифообразующим кораллам, некоторые растения развиваются в большие клональные кластеры. Американская осина *Populus tremuloides* достигает возраста 10 000 лет. Очевидно, что чем больше размер клонального кластера, тем меньше вероятность гибели (Vaupel et al., 2004).

Если существование «отрицательного старения» для колониальных и клональных видов доказано, то возникает вопрос: имеет ли оно место у индивидуальных организмов? К видам с «отрицательным старением» можно отнести черемшу (*Allium tricoccum*), бурую водоросль келп (*Ascophyllum nodosum*), деревья гарцинию (*Garcinia lucida*) и цекропию (*Cecropia obtusifolia*) и растение-подушку кермек (*Limonium delicatulum*) (Vaupel et al., 2004). «Отрицательное старение» обнаруживается у некоторых моллюсков — у морских гастропод — умбониума (*Umbonium costatum*) и литорины (*Littorina rudis*), а также у двустворчатого моллюска йольдии (*Yoldia notabilis*). У них плодовитость после полового созревания продолжает увеличиваться (в 10 раз), а смертность при этом резко падает. Есть свидетельства «отрицательного старения» у морских ежей. Гидра испытывает «отрицательное старение» в зрелом возрасте, хотя в конце жизненного цикла у нее отмечается незначительное старение (Vaupel et al., 2004; Бойко, 2007). У позвоночных также встречаются примеры отрицательного старения. После достижения репродуктивной зрелости у некоторых рептилий (у заборных игуан *Sceloporus graciosus* и *S. undulatus*, а также у живородящей ящерицы *Lacerta vivipara*) темп смертности снижается (Vaupel et al., 2004).

Такое разнообразие темпов старения (быстрое, медленное, незначительное или «отрицательное» старение) в очередной раз подтверждает, что продолжительность жизни является селективным признаком, обуславливающим приспособленность вида к конкретным условиям местообитания и связанным с интенсивностью размножения. Несмотря на то что само по себе старение неадаптивно, его скорость косвенно подчиняется естественному отбору: при неблагоприятных условиях существования вида ускоренное снижение силы отбора с возрастом способствует и ускоренному старению. При благоприятных внешних условиях увеличивается репродуктивная продолжительность жизни, что ужесточает отбор против вредных аллелей с поздним фенотипическим проявлением. Некоторые авторы (Скулачев, 1999; Бойко, 2007) полагают, что незначительное старение присуще лишь менее эволюционно прогрессивным видам в каждой филетической группе, в то время как быстрое старение ускоряет эволюцию и достижение прогресса за счет быстрой смены поколений и отметания неудачных вариантов.

1.1.3. Внутривидовые различия продолжительности жизни

Внутривидовое варьирование продолжительности жизни велико. Так, деревья из высотных популяций такого абсолютного долгожителя, как сосна долговечная, могут жить в 3 раза дольше, чем особи из низин (Finch, 1998). Различия в индивидуальной продолжительности жизни у генетически однородных особей нематоды *Caenorhabditis elegans* могут быть 50-кратными (Rea et al., 2005). Средняя и максимальная продолжительности жизни как самок, так и самцов дрозофилы для одной и той же линии в одной и той же лаборатории изменяются в пределах 30 %. При этом исключается влияние колебаний температуры, относительной влажности, качества пищи и других факторов (Lints et al., 1989).

Альтернативная картина старения (табл. 4), когда отдельные особи становятся долгоживущими гигантскими хищниками, наблюдается у некоторых рыб. Достигая определенных размеров, они меньше других особей подвергаются внешним причинам смертности. У кумжи (*Salmo trutta*) часто встречаются экземпляры, охо-

Таблица 4
Животные с альтернативным жизненным циклом
(по: AnAge Database, 2006)*

| Животные | Максимальная продолжительность жизни |
|---|--|
| Термиты и муравьи | Матка — 18—30 лет, рабочие — несколько месяцев |
| Пчелы и осы | Матка — 4—5 лет, рабочие — несколько месяцев |
| <i>Salmo trutta</i> (кумжа) | Обычный малый биотип — 3—5 лет, гигантская форма — до 38 лет |
| <i>Salvelinus alpinus</i> (арктический голец) | Карликовая форма — до 14 лет, гигантская — до 40 лет |
| <i>Micropterus salmoides</i> (большеротый черный окунь) | Гигантская форма — до 23 лет, обычная — в среднем 6 лет |
| <i>Danaus plexippus</i> (бабочка-монарх) | Летние особи — 6 нед., осенние — 10 месяцев |

* См. табл. 1.

тящиеся на более мелких рыб, достигающие внушительных размеров (до 1 м) и живущие до 20 лет, тогда как их собратья длиной 30 см живут не более 3—5 лет. Арктический голец (*Salvelinus alpinus*), большеротый окунь (*Micropterus salmoides*) и обыкновенный окунь (*Perca fluviatilis* L.) могут демонстрировать сходный альтернативный жизненный цикл (Finch, 1998). У большинства общественных насекомых продолжительность жизни особей из разных каст различается в 100 и более раз. При этом они имеют идентичные гены, в зависимости от касты различным образом экспрессируемые в процессе развития (Finch, 1998).

Если межвидовое варьирование продолжительности жизни может свидетельствовать в защиту генетических основ долгожительства, то внутривидовые различия часто рассматривают как стохастические. Однако не следует исключать наследственную предрасположенность, достигающую для данного признака 30 %. Как будет показано далее, многие гены долгожительства в популяции присутствуют в различных аллельных вариантах (т. е. полиморфны), что может отчасти объяснять варьирование данного признака. Даже когда речь идет о сравнении генетически идентичных особей в одинаковых лабораторных условиях, индивидуальное варьирование внешних микроусловий может различным образом влиять на генетическую программу стрессоустойчивости, противостоящую старению. Таким образом, генетические системы, регулирующие продолжительность жизни, можно рассматривать с точки зрения их чувствительности или устойчивости к внешне-средовым флуктуациям и болезням.

Из вышесказанного следует, что внутривидовое варьирование может определяться случайными причинами (как у сосны), особенностями жизненного цикла (виды с альтернативным старением), различиями в онтогенетических программах (матки и рабочие особи общественных перепончатокрылых), а также полиморфизмом генов продолжительности жизни.

1.2. Генетика продолжительности жизни

Продолжительность жизни, т. е. способность поддерживать жизнеспособность организма длительное время, является комплексным количественным признаком, вносящим определяющий вклад в дарвиновскую приспособленность. Раскрытие генетической структуры долгожительства — фундаментальная проблема эволюции онтогенеза, эволюционной генетики и молекуляр-

ной геронтологии. Среди множества факторов, ограничивающих продолжительность жизни, включая несчастные случаи, голод и насильственную гибель, только старение является внутренней причиной (Flatt, 2004; Vijg, Suh, 2005). Даже в благоприятных лабораторных условиях старение имеет место у подавляющего большинства животных. К сожалению, в эксперименте крайне трудно отделить биологический компонент продолжительности жизни от остальных (Poirier, Seroude, 2005).

Старению можно дать такое рабочее определение: это потеря приспособленности, проявляющаяся после достижения максимума репродуктивной функции (Vijg, Suh, 2005). На популяционном уровне старение выражается в снижении способности давать потомство и в увеличении вероятности гибели. Оно протекает с разными скоростями у разных видов животных, а это, по всей вероятности, указывает на то, что скорость старения определяется не только механическим износом (Partridge, Gems, 2002). Таким образом, старение — комплексный результат взаимодействия генов и среды, регулируемый стрессом, метаболическими факторами и репродукцией (Heininger, 2002), а также защитными системами на уровне клетки, ткани и организма. В отличие от продолжительности жизни, старение сложно оценить при помощи каких-либо простых критериев. Проявления его чрезвычайно сложны. Более того, многие из них могут быть частью патологий (Vijg, Suh, 2005).

Как правило, при поиске «геронтогенов» (так называемых генов старения и продолжительности жизни) у модельных объектов применяют фенотипический скрининг, который имеет целью выделение мутантных линий, характеризующихся свойствами, отражающими значительное изменение темпа старения. Фенотипом, оцениваемым при таком скрининге, может быть либо сама продолжительность жизни, либо скорость функциональных нарушений, связанных со старением. Для ускорения темпов исследований могут быть оценены фенотипы стресс-ответа (устойчивость к тепловому и окислительному шоку), поскольку они часто связаны с увеличением продолжительности жизни (Poirier, Seroude, 2005). Функциональное старение модельных объектов можно измерить по возрастзависимой динамике поведенческих реакций. Жизнеспособность, измеренная через анализ стереотипных поведенческих актов, снижается с возрастом предсказуемым образом. Отбор мутантных особей, проявляющих задержку функционального старения, является альтернативой исследования продолжительности жизни (Poirier, Seroude, 2005).

Взгляд на старение как на процесс пассивного функционального постепенного спада поддерживается исследованиями, показы-31

вающими, что с возрастом происходит снижение общего синтеза РНК и белка (Brack et al., 1996; Tahoe et al., 2004). Однако такой вывод справедлив лишь отчасти. Дело в том, что наибольший вклад в общий синтез макромолекул вносит герминативная ткань. Глобальное снижение биосинтеза в пострепродуктивном возрасте можно считать результатом уменьшения именно ее вклада. Современные молекулярные методы измерения активности определенных генов и белков в соматических тканях показали, что процесс старения является периодом воспроизводимых динамических изменений. Уровень экспрессии одних генов возрастает, тогда как других — снижается, часто демонстрируя довольно сложные временные паттерны. Причем эти изменения не являются стохастическим нарушением гомеостаза, поскольку стереотипно воспроизводятся от животного к животному (Helfand, Inouye, 2002). Выделяют два вида изменений экспрессии генов при старении: репарацию (компенсационный ответ с позитивным эффектом) и дерегуляцию (ответ с нейтральным или негативным эффектом) (Tower, 1996). Скоординированное изменение экспрессии генов начинается в ранней зрелости (Lu et al., 2004; McCarroll et al., 2004). Однако геномная регуляция еще не доказывает того, что старение «запрограммировано» или эволюционно селективно. Напротив, изменение экспрессии может быть ответом на случайные повреждения (молекулярные ошибки, оксидативный стресс) или отражать побочные плейотропные эффекты адаптивных генов (Block et al., 2003).

В идеале следует различать события, которые вызывают старение, и те, что вызывают болезни. Оба этих феномена снижают продолжительность жизни у модельных организмов. Старение — это угасание, которое наблюдается у подавляющего большинства особей популяции, тогда как конкретные возрастзависимые болезни случаются лишь у некоторых из них. Применительно к модельным объектам можно сказать, что механизм или ген, относящийся к старению, будет проявляться у большинства лабораторных линий дикого типа (Bitterman et al., 2003). Форма кривых выживания дрозофил, мышей и человека, представленная в безразмерных величинах, практически одинакова. Этот факт может свидетельствовать об универсальности фундаментального механизма старения (Акифьев и др., 1997). Таким образом, с определенными ограничениями (см. разд. 1.3) результаты, полученные на одном модельном объекте, могут использоваться для объяснения старения других.

Ранние исследования генетических основ старения базировались на использовании селективного скрещивания. В 60-х годах XX века на трех различных линиях *Drosophila subobscura* было показано увеличение продолжительности жизни в потомстве от ста-

рых долгоживущих родителей по сравнению с потомками от молодых родителей (Wattiaux, 1968). В 80-х годах удалось существенно увеличить среднюю продолжительность жизни как методом прямой селекции, так и косвенно — через отбор на позднюю репродукцию (Rose, Charlesworth, 1981; Luckinbill, Clare, 1985). Новый этап в исследованиях генетики продолжительности жизни начался в конце 80-х годов, когда были обнаружены мутации, способные продлевать жизнь. Долгоживущая линия и связанная с ней мутация были впервые выявлены у нематоды *Caenorhabditis elegans*. Так был открыт ген *age-1*, кодирующий компонент фосфоинозитол-3-киназного (PI3K) каскада. Затем было показано увеличение продолжительности жизни нематод в результате мутации гена *daf-2* инсулиноподобного рецептора, контролирующего PI3K (Klass, Hirsh, 1976; Friedman, Johnson, 1988; Johnson, 1990; Kenyon et al., 1993). Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* стали следующим организмом, у которого были выявлены гены долгожительства (Kennedy et al., 1995). Как выяснилось позже, эти гены (например, *Sir2*) высококонсервативны в эволюции от дрожжей до человека (Fabrizio et al., 2005b). Наконец, в 1998 г. был открыт *methuselah* (*mth*) — первый «геронтоген» (ген, мутация в котором продлевает жизнь) у дрозофилы (Lin et al., 1998). В следующем году были опубликованы результаты, свидетельствующие об увеличении продолжительности жизни мышей с мутацией в гене *p66* (Migliaccio et al., 1999). К данному моменту установлены десятки таких генов (см. ниже, табл. 5—8).

Однако исследователи в области генетики продолжительности жизни столкнулись с целым рядом проблем (Felkai et al., 1999). Так, вовлечение того или иного гена в процесс старения можно изучить лишь на интактном организме и в связи с его продолжительностью жизни (такие эксперименты отличаются длительностью), а изменение функций многих генов ведет к уменьшению продолжительности жизни, однако это может быть не только результатом ускорения нормального старения, но и следствием независимой от старения специфичной патологии.

Решением последней проблемы может стать поиск генов, выключение которых продлевает жизнь. Гены долгожительства могут быть также идентифицированы путем измерения продолжительности жизни мутантов со сверхэкспрессией гена-кандидата (Butler et al., 2003). Однако и здесь мы можем затронуть не механизмы самого старения, а, например, уровень метаболизма (путем снижения температуры или ограничения подвижности) или плодовитость (Helfand, Rogina, 2003a, 2003b). Так или иначе, но мы не можем заплатить слишком высокую цену за долгожительство — пожертвовать качеством жизни (снижение репродукции или по-

движности). Поэтому любое увеличение продолжительности жизни в эксперименте должно сопровождаться измерениями уровня метаболизма, физической активности и репродукции (Helfand, Rogina, 2003a, 2003b).

Как часто бывает с признаками, связанными с приспособленностью, продолжительность жизни уменьшается при инбредной депрессии и увеличивается при гетерозисе, когда разные инбредные линии скрещиваются друг с другом. Ранние исследования Гонзалеса и Пирла на дрозофиле выявили, что фиксация рецессивных мутаций снижает продолжительность жизни (Gonzalez, 1923; Pearl et al., 1923). Впоследствии Кларк и Мейнард Смит показали, что скрещивания между инбредными линиями *Drosophila subobscura* приводят к удвоению средней продолжительности жизни (Clarke, Smith, 1955). А в 1995 г. Хьюджес выяснил, что инбридинг увеличивает прежде всего возрастзависимую (биологическую) компоненту смертности, т. е. скорость старения (Hughes, 1995).

Генетическая основа инбредной депрессии неясна. Инбридинг оказывает негативное влияние практически на все признаки, такие как репродукция, развитие и выживаемость. Предположительно, это вызывается возросшей гомозиготностью, приводящей либо к экспрессии вредных рецессивных аллелей, либо к снижению вклада локусов, которые проявляют сверхдоминирование. Эффекты инбридинга на жизнеспособность можно подразделить на чрезмерно (например, летали) и умеренно (полулетали и квазинормали) вредные. Межлинейные различия эффектов у дрозофил указывают на то, что инбредная депрессия в каждом случае определяется различными генами. Вклад этих генов в старение зависит от частоты их аллелей в аутбредной популяции (Vermeulen, Bijlsma, 2004).

Генетические подходы обычно требуют унификации генетического фона, что увеличивает степень инбридинга и вероятность накопления вредных мутаций. Это приводит к искусственному снижению продолжительности жизни. Использование инбредных лабораторных линий в исследованиях старения является рискованным, поскольку фиксирование вредных аллелей в таких линиях может приводить к идентификации генов, продлевающих жизнь единственно путем ослабления инбредной депрессии, как генов долгожительства. Генетические вмешательства могут просто «спасать» от вредных мутаций, не замедляя старения, а просто увеличивая продолжительность жизни до «нормальной» (Helfand, Rogina, 2003a, 2003b; Swindell, Bouzat, 2006; Toivonen et al., 2007).

Существует вероятность, что известные эксперименты по селекции дрозофилы на увеличение продолжительности жизни у ла-

бораторных линий также могут просто восстанавливать исходную длительность жизни особей дикого типа. Как оказалось, продолжительности жизни мух из вновь пойманной популяции и особей линии, селектируемой на долгожительство в лабораторных условиях в течение 20 лет, существенно не отличаются, так же как и скорости старения, оцениваемые по величине угла наклона линии Гомпертца (Linnen et al., 2001).

Сравнение продолжительности жизни в поколениях инбредной и аутбредной линий дрозофил, подвергаемых хроническому облучению ионизирующей радиацией в малых дозах, показало, что облучение инбредной линии значительно увеличивает продолжительность жизни мух, начиная со второго облучаемого поколения. У аутбредной линии такого эффекта не наблюдали. Вероятно, это связано с радиационно-индуцированным подавлением инбредной депрессии (Москалев, Зайнуллин, 2006).

Несмотря на существенное, иногда на 85 %, продление жизни у ряда мутантов дрозофилы (*methuselah*, *InR*, *Chico*, *Sod*), зачастую они живут не дольше линий, недавно отловленных в дикой природе (Spencer et al., 2003). Эксперименты с использованием инбредных линий очень распространены. Результаты известных исследований долгожительства у трансгенных дрозофил, сверхэкспрессирующих ген *Cu,Zn-Sod*, могут быть артефактом, поскольку генетический фон исходных линий сам по себе приводил к относительному укорочению их продолжительности жизни (Orr, Sohal, 2003). Сверхэкспрессия гена цитозольной Cu,Zn-SOD в долгоживущих линиях дрозофил не продлевает жизнь (Trifunovic et al., 2005). Знаменитый «геронтоген» дрозофилы *Indy* (*I'm not dead yet*), кодирующий транспортный белок промежуточных компонентов цикла Кребса и якобы увеличивающий продолжительность жизни вдвое, также оказался артефактом. Причины этого артефакта — высокоинбредный генетический фон и зараженность внутриклеточным паразитом *Wolbachia* (Toivonen et al., 2007).

С другой стороны, использование только аутбредного фона тоже чревато проблемами — влияние невыравненного генетического фона может привести к ложным выводам. Одним из вариантов устранения проблемы является тестирование генетического вмешательства в разном генетическом окружении, включая другие инбредные или аутбредные линии (Helfand, Rogina, 2003a, 2003b; Toivonen et al., 2007). Еще одним способом решения проблемы генетического фона является использование модифицированных индуцибельных генов (содержащих регуляторные последовательности, активирующие экспрессию гена в ответ на внешнее воздействие — изменение температуры, добавление антибиотика и т. п.), поскольку в этом случае генетический фон идентичен, а

различия обусловлены присутствием или отсутствием индуцирующего агента. При этом мы исключаем также нежелательную активизацию мутации на ранних стадиях развития, так как она может обусловить снижение продолжительности жизни не за счет ускорения старения (процесса, протекающего у взрослой особи), а в силу повреждений на ранних стадиях онтогенеза, либо вовсе быть летальной (Helfand, Rogina, 2003a, 2003b).

Как следует из исследований, выполненных на организмах в ряду от дрожжей до человека, продолжительность жизни имеет выраженный генетический компонент (Vijg, Suh, 2005). Его вклад включает аддитивную и неаддитивную составляющие генетической дисперсии (меры изменчивости) наследуемости, достигающие от 10 до 35 % (Finch, 1998; Flatt, 2004).

Поиск генов, вовлеченных в процесс старения, на генетически управляемых модельных организмах, таких как дрожжи, нематоды, дрозофилы и мыши, показал, что старение регулируется специфическими генами, и позволил проанализировать механизмы этого влияния, включая физиологические изменения на уровне организма, трансдукцию сигналов и регуляцию генов. Сходство фенотипов мутаций ортологичных генов у разных модельных видов демонстрирует, что подобные дефекты могут нарушать регуляторные системы, контролирующие старение и у высших организмов (Guarente, Kenyon, 2000). В то же время становится очевидным, что организмы не запрограммированы на старение, однако имеют программу продолжительности жизни, опирающуюся на активность систем самоподдержания и стресс-ответа (Vijg, Suh, 2005).

Многие механизмы старения могут быть идентичны у различных видов, благодаря тому что все эукариоты функционально схожи между собой (Bitterman et al., 2003). Тем не менее стоит различать частные («приватные») и общие («публичные») «гены старения» (Martin et al., 1996). «Приватные» гены проявляются при случайных герминативных мутациях, которые нейтральны в раннем возрасте, но проявляют вредные свойства в старости. У человека, например, они обуславливают некоторые возрастзависимые заболевания, такие как наследственные формы болезней Альцгеймера и Хантингтона. Сюда относятся и видоспецифичные «гены старения». Количество различных локусов таких генов, вероятно, очень велико, но мутации в них являются редкими. Общих (для всех особей вида и для разных видов) «генов старения», напротив, относительно мало. К ним можно отнести *p53*, участвующий в предотвращении рака через индукцию клеточного старения в делящихся тканях или апоптоза в сердце и в мозгу (Vijg, Suh, 2005).

Изложенные в предыдущем разделе эволюционные теории старения предполагают наличие не менее трех классов «геронтогенов».

1. Согласно теории отработанной сомы, старение вызывается накоплением соматических повреждений, которым противостоят системы соматического поддержания, такие как антиоксидантная защита, репарация ДНК и белков. Таким образом, данная теория постулирует существование генов обеспечения долгожительства (**longevity assurance genes**), основная функция которых — поддержание выживания организма путем репарации соматических клеток. Потеря генов обеспечения долгожительства ускоряет проявление фенотипов старения и уменьшает продолжительность жизни (Vijg, Suh, 2005).

2. Теория антагонистической плейотропии постулирует наличие плейотропных «генов старения». Их задача — усиление репродуктивного успеха в молодости, несмотря на отсроченные негативные эффекты. Их мутации способны продлевать жизнь ценой снижения репродукции (Vijg, Suh, 2005).

3. Теория накопления мутаций постулирует наличие аллелей с небольшими вредными эффектами, не проявляющимися до старости и, таким образом, избегающими давления естественного отбора (Martin et al., 2007).

Ричард Миллер (Miller, 2001) феноменологически подразделил гены долгожительства на шесть больших групп.

1. Гены, вызывающие старение. Гипотетическая группа, возникающая в эволюции для преобразования молодого здорового индивидуума в старый и больной. Такие гены до сих пор обнаружены не были (Miller, 2001). Большинство геронтологов уверено, что аналогичных генов нет, поскольку они будут снижать репродуктивную пригодность и элиминироваться отбором (Гаврилов, Гаврилова, 1991; Butler et al., 2003). В изогенных популяциях при одинаковых внешнесредовых условиях одни особи умирают рано, тогда как другие характеризуются долгожительством. Такое наблюдение ставит под сомнение мнение о «генетической программе» старения (Rea et al., 2005). Другие свидетельства против запрограммированности старения приведены выше при рассмотрении соответствующей эволюционной теории.

2а. Гены, мутации в которых изменяют продолжительность жизни, увеличивая риск заболеваний в молодости или зрелости. Сюда относятся, например, врожденные нарушения функции сердца, диабет I типа. В естественных условиях они приводят к существенному снижению продолжительности жизни. По-видимому, многие из таких генов не способны пролить свет на причины старения (Miller, 2001). Однако в том случае, если они уско-

ряют множество аспектов старения, их можно отнести к истинным генам продолжительности жизни. Например, полное отсутствие митохондриального фермента супероксиддисмутазы 2 (*Sod2*) у мышей приводит к их гибели спустя месяц после рождения по причине кардиомиопатии. Является ли этот ген истинным геном продолжительности жизни, или просто вызывает несовместимый с жизнью дефект? Гетерозиготы по данной мутации характеризуются измененной функцией митохондрий и высокой чувствительностью кардиомиоцитов к апоптоз-индуцирующим агентам, что отмечается и при естественном старении (Butler et al., 2003).

26. Мутантные гены, изменяющие продолжительность жизни, увеличивая риск раннего возникновения заболеваний, частично напоминающих своими симптомами старение. Классические примеры таких заболеваний — прогерии Вернера и Хатчинсона—Джилфорда (Miller, 2001). Некоторые симптомы данных заболеваний напоминают естественное старение, хотя другие важные признаки могут отсутствовать. Например, мутации в гене заболевания Хатчинсона—Джилфорда приводят к преждевременному развитию сердечно-сосудистой патологии, однако у таких больных не развивается другого характерного признака старения — нейродегенерации (Butler et al., 2003).

3. Гены, влияющие на возрастзависимые патологии. Их очень много. Это гены, мутации в которых приводят к болезням Альцгеймера, атеросклерозу, раку груди, дегенерации желтого пятна, диабету II типа, облысению, саркопении, старению иммунной системы. Такие гены с возрастзависимым проявлением были предсказаны эволюционными теориями старения (Miller, 2001). Данные локусы не регулируют весь процесс старения, а лишь отдельные его фенотипы. Так, у человека различия в этих генах обуславливают, как скоро конкретный индивидуум поседеет, облысеет, приобретет остеопороз, диабет или когнитивные нарушения (Butler et al., 2003).

4. Гены, мутации в которых увеличивают максимальную продолжительность жизни путем замедления процессов старения. Известны уже десятки генов, мутации в которых увеличивают жизнь модельных объектов — нематод, дрозофил и мышей. Как правило, они замедляют старение. Например мутантные карликовые мыши *Pit^{dw/dw}* характеризуются меньшей скоростью старения иммунной системы, суставов и соединительной ткани. Таким образом, это гены не только долгожительства, но и антистарения. Поскольку долгоживущие мутанты не вытесняют носителей других аллелей в естественных и лабораторных популяциях, при обычных условиях они не несут особых селективных преимуществ (Miller, 2001), хотя некоторые из них участвуют во внутри-

видовом варьировании продолжительности жизни (Flatt, 2004). Аллели, приводящие к долгожительству, присутствуют и у человека, но их труднее продемонстрировать у долгоживущего вида по сравнению с короткоживущими модельными животными. Примерами являются гены *Prop1* и *Ghr*. Наилучший путь их идентификации — обнаружение таких генов сначала у беспозвоночных, подтверждение их наличия у млекопитающих, а затем исследование их причастности к продолжительности жизни человека (Butler et al., 2003).

Генетические исследования беспозвоночных животных выявили множество механизмов, обуславливающих продолжительность жизни. Среди них инсулин/IGF-1-сигналинг, регулирующий транскрипционный фактор FOXO и TOR-путь, сиртуины, JNK-каскад, системы детоксификации свободных радикалов и вредных метаболитов, репарации белков и ДНК. Все эти механизмы присутствуют и у млекопитающих.

Важно знать при этом, обусловлен ли эффект инактивацией гена (**loss of function**), или индуцированным увеличением экспрессии (**gain of function**). Скрининг мутантов с потерей функции гена обычно приводит к обнаружению гипоморфных (частичная потеря функции) или нулевых, нокаутных (полная потеря функции), аллелей. Поиск генов с повышенной экспрессией, приводящей к увеличению продолжительности жизни, позволяет выявить гены, вовлеченные в процессы, не обнаруживаемые методом мутаций инактивации (Poirier, Seroude, 2005). Метод РНК-интерференции у нематоды позволил *in vivo* подавлять экспрессию генов, причем на интересующей нас стадии развития. С появлением данной методики количество открытых «геронтогенов» выросло в разы.

Для примера, у имаго нематод РНК-интерференция в одном из экспериментов позволила выявить 64 гена, увеличивающих продолжительность жизни на 10 % и более. Как оказалось, более 90 % из них высококонсервативно в эволюции от дрожжей до человека. Инактивация генов синтеза белка (генов факторов инициации трансляции и компонентов 40S-субъединицы рибосомы) сопровождалась наибольшим увеличением продолжительности жизни. Возможно, что снижение общего биосинтеза белка позволило перенаправить энергию на поддержание генома и адаптацию к стрессам. В условиях стресс-процесса в эндоплазматической сети также блокируется синтез белка. Инактивация оксидоредуктазы эндоплазматического ретикулума, кодируемой геном *ero-1*, продлевает жизнь на 32 %. Выключение генов сигналинга — еще один путь влияния на долгожительство. Потеря функции гена *sem-5*, негативно регулирующего RAS-MAP- и IP3-трансдукцию сигнала, привела к увеличению жизни на 24 %, так же как

инактивация генов серин-треониновых протеинкиназ — *tpa-1* и *tag-181*, а также *sel-5* (гены ARK-семейства киназ) и *pat-4* (ген интегриноподобной киназы). Выключение рецептора инсулина *daf-2* продлило жизнь на 79 %, как и ингибирование структурно сходных с *daf-2* серпентиновых рецепторов *str-49* и *sre-25*. Около 20 % обнаруженных генов участвуют в связывании и процессинге РНК (гены РНК-геликаз, факторов сплайсинга мРНК, рибонуклеаз, факторов полиаденилирования и метилирования РНК) и во взаимодействии с хроматином (гены регуляторов репликации ДНК и транскрипционных факторов), что может быть одной из причин наблюдаемого при старении изменения экспрессии генов (Curran, Ruvkun, 2007).

Мутации, изменяющие продолжительность жизни, очень часто рассматриваются как ускоряющие или замедляющие старение. Однако надо всегда помнить, что старение составляет основу лишь возрастзависимой компоненты смертности. Расчет параметров этой компоненты не обнаружил статистически значимого замедления старения у известных долгоживущих мутантов мышей *GHRHR, IGF-1R, INSR, PROP1* и *TRX* либо его ускорения у мутантов *ATM + TERC, BubR1, klotho, LMNA, PRDX1, p53, WRN + TERC* или *TOP3B*. Зачастую изменения экспрессии в этих генах влияют на независимую от возраста компоненту смертности, определяющую здоровье. В то же время статистически значимое изменение скорости старения было отмечено у мышей с изменениями активности *C/EBP, MSRA, SHC1*, гены гормона роста, *GHR, PIT1* и *PolgA* (Magalhaes et al., 2005).

5. Естественно встречаемые аллели и аллельные комбинации, изменяющие продолжительность жизни. Как уже говорилось, наследуемость продолжительности жизни у мух, грызунов и людей обычно составляет 15—25 %. Она представляет собой долю дисперсии выживаемости, обусловленную генетическими факторами у особей с определенным генотипом в определенных условиях среды. Среди таких факторов следует отметить гены категории 3 (см. выше, с. 38), а также локусы количественных признаков (QTL), представляющие собой полиморфные гены, отвечающие за скорость старения внутри вида. QTL-анализ у нематод, дрозофил и мышей выявил десятки таких локусов, вовлеченных в естественный внутривидовой полиморфизм продолжительности жизни (Miller, 2001; Flatt, 2004). Подобных локусов, вероятно, гораздо больше, однако аллели с очень малыми эффектами, действующими кумулятивно, остаются за рамками исследований (Butler et al., 2003). Выявление последних может стать реальностью при сочетании QTL-анализа с анализом экспрессии на микрочипах. Суть последнего метода заключается в изучении результатов

гибридизации выделенной из клетки информационной РНК с нуклеотидными последовательностями, соответствующими интересующим нас генам. Данным способом можно количественно оценить активность тех или иных генов.

Исследование методом QTL-анализа позволяет ответить на важный вопрос: участвуют ли «геронтогены», выявленные методами молекулярной генетики, в естественной вариации продолжительности жизни в популяциях? Для перехода от карты QTL к конкретным генам необходимо определить как можно более малый участок. Затем применяется делеционный комплементационный анализ, который позволяет производить тонкое картирование рецессивных мутаций через использование хорошо изученных хромосомных делеций (Poirier, Seroude, 2005). Наиболее успешно метод был применен при изучении нематод и дрозофил (Shmookler et al., 2006).

У нематод методом QTL-анализа продолжительности жизни с использованием транспозонов в качестве маркеров были картированы локусы на хромосоме I (около локуса *hP4*), III (около *stP127*), IV (около *stP44*), V (около *stP192*, *stP23* и *stP6*), а также на X-хромосоме (около *stP129* и *stP2*). По признаку длительности жизни наблюдали значимое эпистатическое взаимодействие между локусами (*stP128*) (хромосома V) и (*stP127*) (хромосома III). На хромосоме I в QTL расположены гены *rad-8*, *sod-2* и *daf-16*, влияющие на стрессоустойчивость. Остальные локусы близки «геронтогенам» *akt-1* (хромосома V), *akt-2* (X-хромосома), *daf-12* (X-хромосома), *clk-1*, *clk-2* и *gro-1* (хромосома III). Активная копия *sir-2* расположена возле локуса на хромосоме IV. Мутация *spe-26*, близко расположенная к *sir-2*, также увеличивает продолжительность жизни нематоды через ослабление сперматогенеза (Ayyadevara et al., 2003).

У дрозофилы исследования методом QTL-анализа выявили влияние на вариацию продолжительности жизни как доминирования этих локусов (аллельного взаимодействия для одного гена), так и эпистаза (взаимодействия аллелей разных генов). Было показано, что генетическая архитектура (т. е. количество генов и степень аллельных и генных взаимодействий) зависит от средовых условий, в которых существуют индивидуумы (Fox et al., 2004). Кроме того, большинство локусов количественных признаков у дрозофилы оказалось пол-специфичным (Wilson et al., 2006). В естественном варьировании продолжительности жизни могут принимать участие известные молекулярным геронтологам гены: локус алкоголь-дегидрогеназы (*Adh*), чья экспрессия также снижается с возрастом, и локус инсулиноподобного рецептора (*InR*), мутация в котором значительно продлевает жизнь. Как оказа-41

лось, дикие популяции дрозофилы имеют обширный полиморфизм по локусу *InR*. Кластеры генов белков теплового шока (*hsp22—hsp28*) и акцессорных белков (*Acp26A* и *Acp70A*, причем последний широко известен как половой пептид, ускоряющий старение самок), вовлеченных в репродукцию и регуляцию продолжительности жизни, также проявляют генетическую вариацию по продолжительности жизни (Flatt, 2004).

Метод QTL-анализа позволяет выявлять и новые гены продолжительности жизни. Например, с его помощью была обнаружена причастность к старению генов ДОФА-декарбоксилазы (*Ddc*), *Shuttle craft (stc)* и *ms(2)35ci*. *Ddc* кодирует фермент, необходимый для выработки дофамина и серотонина в ЦНС и гиподерме. Ген *stc* является гомологом *NF-X1* человека, кодирующего транскрипционный фактор РНК полимеразы II. Ген *stc* экспрессируется на эмбриональной, личиночной и взрослой стадиях жизни, прежде всего в мозгу и яичниках мух. О гене *ms(2)35Ci* известно только то, что это рецессивная аллель, в гомозиготе приводящая к стерильности самцов (De Luca et al., 2003; Poirier, Seroude, 2005).

Исследования полиморфизма и дивергенции по гену долгожительства *mth* на естественном популяционном уровне у трех видов дрозофилы (*Drosophila melanogaster*, *D. simulans* и *D. yakuba*) выявили нестереотипный паттерн аминокислотной дивергенции во внутри- и внеклеточном петлевых доменах белка *Mth*. Хотя эти данные не отвечают на вопрос, эволюционировал ли полиморфизм гена *mth* в ответ на отбор по продолжительности жизни, они показывают важность данного признака (*mth*) для организма (Schmidt et al. 2000).

Приведенные выше данные не являются сюрпризом: нет причин, по которым главные «геронтогены» не играли бы роли в более тонких аллельных вариантах при формировании продолжительности жизни в естественных популяциях. Однако они перекидывают необходимый мостик между молекулярной генетикой и эволюционной генетикой старения (Flatt, 2004).

6. Гены, обуславливающие долгожительство определенных видов. Почему животные, имеющие одинаковые размеры, например грызуны (крысы) и птицы (голуби), так различаются по продолжительности жизни (Butler et al., 2003)? Различия долгожительства имеют место и у относительно близких филетических групп. Паразитические нематоды млекопитающих и почвенные нематоды различаются по продолжительности жизни на 2 порядка. Среди грызунов суматранский гребенчатый дикобраз (27.75 лет) и имеющий размеры мыши голый слепыш (30 лет) живут гораздо дольше, чем близкие к ним виды. Люди живут дольше, чем шим-42

панзе, павианы и лемуры. Гены, обеспечивающие замедленное старение, приобретают эволюционное преимущество, когда вид оказывается в благоприятных условиях, характеризующихся невысокими рисками гибели. В этом случае в результате отбора возникает вид, живущий вместо нескольких месяцев годы и даже десятилетия. Снижение рисков стало следствием таких ароморфозов, как приобретение способности к полету или средств пассивной защиты от хищников (панцырь, иглы), а также появления возможности обмена информацией для защиты от хищников и поиска пропитания либо возникновения географической изоляции от хищников. В новых условиях жизненный цикл, при котором образуется малое количество потомков за длительный период времени, получает преимущество по сравнению с имевшей место высокой ранней плодовитостью (Miller, 2001).

Какое количество генов необходимо для подобного перехода? Одни считают, что таких генов должно быть очень много: переход требует изменений, ведущих к отсрочке возникновения рака, дегенерации мышц, костей и печени, развития катаракты, а также повышению долговременной устойчивости к инфекциям. Основной проблемой данной модели является необходимость механизма координации и синхронизации этих процессов, поскольку долгожительство невозможно при отсутствии хотя бы одного из них (Miller, 2001). В таком случае, вероятно, большая часть генов долгожительства будет видоспецифична. Действительно, лишь около одной трети изменений возрастзависимой экспрессии генов коррелирует у мышей и человека, что может косвенно подтверждать данную точку зрения (Kyng et al., 2003).

Согласно другой модели, количество генов межвидовых различий долгожительства невелико. При этом они регулируют множество процессов развития и старения наподобие реостата, обуславливая темп дегенерации. Действительно, как ограничение калорийности пищи, так и отдельные мутации показывают, что широкий круг возрастзависимых процессов замедляется скоординированно (Miller, 2001). На наш взгляд, обе модели могут иметь право на существование. Несмотря на то что консервативных в эволюции генов стрессоустойчивости немного, они контролируют большое количество эффекторных генов. И те и другие способны влиять на продолжительность жизни.

С нашей точки зрения, данную феноменологическую классификацию необходимо дополнить еще двумя группами. Это гены со старение-ассоциированной экспрессией и генетические маркеры старения. Рассмотрим их.

7. Гены, экспрессия которых изменяется при старении.

Сюда следует отнести сотни генов, испытывающих возрастзави-

симое подавление или сверхактивацию. Эта новая область исследования требует дорогостоящих методов и мощных компьютерных средств обработки данных, поскольку речь идет об измерении активности десятков тысяч генов, а также о межвидовом сравнении экспрессии ортологичных генов.

С возрастом у дрожжей изменяется экспрессия 150 генов (т. е. 2.5 % генома) в 2 раза и более. При старении репрессируется ряд генов гликолиза, биосинтеза, сворачивания и деградации белка, тогда как несколько генов белков-транспортеров, напротив, сверхактивируется. Это приводит к снижению функции гликолиза, белкового обмена и стресс-ответа, но при этом к более активному использованию транспортной системы. Примечательно, что изменения экспрессии генов оксидативного стресс-ответа не происходит (Koc et al., 2004). В старых клетках также индуцируются гены глюконеогенеза, глиоксилатного цикла, метаболизма липидов и выработки гликогена, т. е. при клеточном старении происходит сдвиг к накоплению энергии (Lesur, Campbell, 2004).

У дрозофилы в одном из экспериментов изучение возрастной динамики транскрипционной активности выявило 43 гена, активность которых с возрастом увеличивается, и 89 генов, экспрессия которых снижается. Снижение репродуктивной способности — один из фенотипов старения. В то же время сигналы из герминативной ткани влияют на длительность жизни. У дрозофилы показано снижение уровня РНК нескольких генов репродукции. Среди них 2 гена акцессорных белков семейства *Asp*. Белки *Asp* самца облегчают сохранение спермы в семяприемниках самки и стимулируют откладку яиц, однако уменьшают продолжительность ее жизни. Снижается экспрессия ряда предполагаемых генов гаметогенеза, в частности это касается гена белка из семейства септинов, участвующих в сперматогенезе. Метаболизм также является физиологическим процессом, претерпевающим изменение с возрастом: снижается транскрипция генов фруктозо-1,6-бисфосфат-альдозолазы, альдозо-3-эпимеразы, митохондриальной глицерол-3-фосфат-дегидрогеназы. Все они контролируют превращения глюкозы и других сахаров, участвующих в гликолизе. Возрастзависимое снижение претерпевает и экспрессия гена фермента цикла трикарбоновых кислот — аконитазы. Наблюдали также уменьшение транскрипционных уровней цитохрома *c* и других ферментов окислительного фосфорилирования и электронотранспортной цепи митохондрий. Известным атрибутом старения является постепенное уменьшение устойчивости к различным стрессам, таким как тепловой шок и оксидативный стресс. С возрастом снижается транскрипция генов малого белка теплового шока (*hsp26*) и алкогольдегидрогеназы. Гены глутатион-S-трансферазы *D1* и шапел-

рона 60, напротив, сверхэкспрессированы у старых особей (Zou et al., 2000).

Транскрипция около 23 % генома дрозофилы оказалась подвержена изменению при старении. Изначально предполагалось, что возрастзависимый паттерн экспрессии опосредуется транскрипционным подавлением через модификацию структуры и организации хромосом, что приводит к дерегуляции отдельных генов, нарушая гомеостаз организма. Однако у дрозофилы не было обнаружено свидетельств возрастзависимого изменения транскрипции в специфичных участках генома или повсеместной дерегуляции экспрессии генов (Pletcher et al., 2002). Использование технологии экспрессионных микрочипов для изучения специфичности транскрипционных ответов при старении в голове, тораксе и туловище дрозофилы привело к обнаружению как специфических, так и общих транскрипционных ответов в этих тканях в процессе старения. Около половины генов, снижающих свою экспрессию с возрастом, связано с репродукцией и относится к гонадам. Подавление митохондриальных генов, активация JNK-механизма и сверхактивация субъединиц протеосомы в грудном отделе тела стареющей мухи предполагают особую чувствительность мышц (метаболически высокоактивной ткани) к старению. Возрастзависимое нарушение генов синаптической передачи наблюдали в головном отделе мухи. Общим оказалось подавление активности многих генов, связанных с метаболизмом (генов окислительного фосфорилирования, цикла трикарбоновых кислот, выработки АТФ), тогда как гены синтеза пуринов сверхактивируются (Girardot et al., 2006). Сравнение паттернов экспрессии при старении нематод и дрозофил показало наличие общей возрастзависимой программы генной экспрессии, запускающейся в ранней зрелости и модифицирующей репарацию ДНК, катаболизм, пептидолиз и клеточный транспорт. С возрастом репрессируются гены компонентов митохондриальной дыхательной цепи, АТФ-синтазного комплекса и цикла Кребса, а также АТФ-зависимого активного транспорта (включая транспорт ионов, питательных веществ и транмиттеров). Это приводит к снижению экскреции и физиологической активности нейронов и мышц. Межвидовая корреляция экспрессии генов-ортологов составляла в среднем 0.16 и была достоверной. Таким образом, большинство возрастзависимых изменений видоспецифично, однако консервативный компонент составляет несколько сотен пар ортологов. Было показано, что консервативная в эволюции репрессия генов окислительного метаболизма и глобальные изменения паттерна экспрессии начинаются внезапно в ранней зрелости, задолго до начала функциональных нарушений. Данный паттерн у обоих организмов достоверно коррелирует с из-

менениями при тепловом и оксидативном стрессе. Это свидетельствует о том, что далеко не все изменения генной экспрессии при старении обусловлены накоплением повреждений. Нематоды имели, кроме того, и видоспецифичные особенности экспрессии генов при старении. У *Caenorhabditis elegans* репрессируются гены коллагенов и индуцируются гены гистонов, транспозаз, ДНК- и РНК-геликаз. Однако подобные изменения не отмечались у дрозофилы. Напротив, только при старении дрозофилы индуцируются гены цитохрома P450s, гликозилаз и пептидогликановых рецепторов (McCarroll et al., 2004).

Старение мышей связано со специфическими изменениями транскрипции генов в мускулатуре кишечника, коре головного мозга, мозжечке (Kayo et al., 2001). Старение мозга приводит к нарушению когнитивных и моторных способностей и является фактором риска для развития таких неврологических заболеваний, как болезнь Альцгеймера и Паркинсона. При сравнении неокортекса и мозжечка 5- и 30-месячных мышей было показано, что из 6347 изученных генов 63 (1 %) увеличили свою экспрессию в 1.7 раза в стареющем неокортексе и столько же — в 2 раза в стареющем мозжечке. Одну четверть из них составляли гены воспалительного ответа. Затем идут гены стресс-ответа, что согласуется с оксидативным стрессом и накоплением поврежденных белков (Lee C. et al., 2000). С использованием олигонуклеотидных массивов высокой плотности были проанализированы различия в экспрессии генов в гипоталамусе и коре молодых и старых мышей. Показано, что старение связано со снижением активности многих генов, вовлеченных в синаптическую передачу как в гипоталамусе, так и в кортексе. Уровень экспрессии гена синаптического везикула-ассоциированного белка синаптоагмина I, вовлеченного в регуляцию высвобождения нейротрансмиттера, снижается более чем в 10 раз. Ген одного из белков, участвующих в экзоцитозе синаптических везикул, также снижает свою экспрессию в несколько раз. Экспрессия гена цАМФ-зависимой протеинкиназы С снижается более чем в 3 раза. Она играет роль в синаптической пластичности и формировании следов памяти. Изменяется при старении экспрессия генов динамина и связанного с клатрином белка AP-2. Последние играют роль в росте нейронов и рециркуляции синаптических пузырьков. В ткани стареющего мозга также накапливается А—Х-актин, сверхактивированный при болезни Альцгеймера (Jiang et al., 2001).

Сопоставление экспрессии транскриптов в гематопозитических стволовых клетках и в переднем мозгу инбредных мышей с продолжительностью жизни (один из вариантов метода QTL-анализа) выявило, что экспрессия генов двух членов семейства глута-46

тион-S-трансфераз — *Gstm6* и *Gsta3* в стволовых клетках и в мозгу коррелирует с продолжительностью жизни. Экспрессия генов стволовых клеток — *Ube2s* (ген фермента, конъюгирующего убиквитин) и *C5r1* (ген рецептора 1 компонента комплемента 5) также коррелирует с продолжительностью жизни (De Haan, Williams, 2004).

Анализ экспрессии генов клеток печени показал, что старение сопровождается изменением активности примерно 1 % генов. При этом 43 % из них активируются, а 57 % — подавляются. Большинство сверхактивированных генов связано с воспалением. Известны и другие патогенные белки, сверхактивированные в стареющей печени: бигликан — протеогликан внеклеточного матрикса печени, ответственный за фиброз; амилоид P — компонент сыворотки, гликопротеин амилоидных отложений, индуцирующий воспаление; цистатин B — ингибитор цистеиновых протеаз, участвующий в фиброзе. Одна четверть индуцированных при старении печени белков участвует в стресс-ответе, прежде всего оксидативном. В репликации ДНК и регуляции клеточного цикла участвуют 23 % генов, чья экспрессия снижается при старении, причем большинство из них имеет негативное влияние на рост клетки и деление. При старении печени также снижается экспрессия генов метаболизма ксенобиотиков и гена аполипопротеина E, секретируемого печенью и необходимого для выведения липопротеинов из крови. Нарушения в этом гене связаны с тяжелой формой атеросклероза у мышей. Снижение его экспрессии также может увеличивать количество атеросклеротических повреждений (Cao et al., 2001).

Всесторонний анализ экспрессии генов в сердце молодых (5 месяцев) и старых (30 месяцев) мышей показал, что старение связано с транскрипционными изменениями, способствующими сдвигу от метаболизма жиров к углеводному метаболизму и повышению экспрессии генов внеклеточного матрикса. Ряд генов, продукты которых (смутелин B, кальпонин 2, тропонины T1 и C, клаудин 5, коннексин 43) выполняют структурную функцию (функции компонентов внеклеточного матрикса, клеточной адгезии и роста), индуцируется в результате старения. Многократно увеличивается экспрессия гена главного компонента телец Леви α -синуклеина — маркера нейродегенерации при паркинсонизме. Это может свидетельствовать о нарушении симпатической иннервации сердца с возрастом. Окисление жирных кислот служит главным источником энергии для сердца. Происходит скоординированное снижение экспрессии генов, участвующих в транспорте жирных кислот в митохондрии, включая карнитин-О-пальмитоилтрансферазу 1, карнитин-ацетилтрансферазу, митохондриальную

карнитин/ацилкарнитинтранслоказу и карнитин-пальмитоилтрансферазу 2. Некоторые подавляемые гены отвечают за липолиз: триацилглицеролгидролаза, мобилизующая триацилглицеролы из хранилищ; гормон-чувствительная липаза; ацил-КоА-тиоэстераза 1, модулирующая клеточный уровень лигандов комплекса жирных кислот с КоА. Старение также приводит к подавлению генов β -окисления жирных кислот в митохондриях. Все это обуславливает нарушение функций митохондрий и снижение пальмитоил-карнитинзависимого дыхания в митохондриях сердца стареющих крыс. Подавляется также экспрессия фруктозо-1,6-бисфосфатазы 2 — ключевого фермента глюконеогенеза. Аллостерический фермент фосфофруктокиназа, контролирующая скорость гликолиза, напротив, индуцируется (Lee et al., 2002).

Идентифицировано 712 транскриптов, различным образом экспрессирующихся в молодых и старых скелетных мышцах мышей. Индивидуальный анализ генов показал, что транскрипционный профиль при старении мышц связан с повышенной активностью p53 (Edwards et al., 2007).

Около 4 % из 11 000 исследованных генов фронтального кортекса человека претерпевают значительные изменения экспрессии с возрастом (в 1.5 раза и более). Существенно снижается экспрессия рецепторов нейротрансмиттеров, вовлеченных в синаптическую пластичность, а также генов, отвечающих за высвобождение синаптических пузырьков и их циркуляцию. Компоненты главных путей, трансдуцирующих сигнал и опосредующих длительное потенцирование и хранение памяти, также подавляются с возрастом. Главные кальций-связывающие белки, кальциевый насос и кальций-активируемый транскрипционный фактор, которые стимулируют нейрональное выживание, также значительно репрессированы. В стареющем кортексе снижается экспрессия генов, включенных в везикулярный/белковый транспорт, и подавлен синтез белков, которые стабилизируют микротрубочки и стимулируют аксональный транспорт. В то же время старение фронтального кортекса человека связано с увеличением экспрессии генов воспалительного и иммунного ответов, а также генов, которые опосредуют стресс-ответ и репарацию: это гены, участвующие в сворачивании белковой молекулы, в антиоксидантной защите и в гомеостазе ионов металлов (Lu et al., 2004).

В скелетной мышце человека при старении было обнаружено достоверное изменение экспрессии 250 генов. Среди них *CYP26B1*, который в возрасте 50 лет увеличивает экспрессию на 90 %. Он кодирует монооксигеназу, являющуюся членом семейства цитохрома P450 и метаболизирующую токсичные вещества. Напротив, ген *LASS5* (гомолог гена долгожительства дрожжей *lag1*) снижает

свою экспрессию на 25 %. Он участвует в керамидном сигнальном пути, опосредующем стресс-ответ и апоптоз. Гены симпортеров и переносчиков хлорида необходимы для транспорта растворенных веществ при мышечном сокращении. Снижение уровня их экспрессии ведет к ослаблению тонуса мышц (Zahn et al., 2006).

Обнаружено 985 генов, изменяющих экспрессию в коровом веществе и центральной части почки человека с возрастом, причем профили экспрессии в этих двух частях органа сходны. При старении увеличивается экспрессия генов, связанных с формированием внеклеточного матрикса — базальной мембраны, участвующей в почечной фильтрации. Показано, что 7 сверхактивированных генов участвуют в поддержании эпителиальной полярности, 11 — кодируют рибосомальные белки, ряд генов кодирует транскрипционные факторы и сигнальные белки (Rodwell et al., 2004).

Таким образом, некоторые аспекты старения влияют только на специфические ткани, например, обуславливают постепенное ослабление мышц, снижение синаптической функции в мозгу и темпа фильтрации в почке. Другие проявления старения наблюдаются во всех клетках (накопление оксидативных повреждений в митохондриях, повреждения ДНК и белков). Поэтому неудивительно, что сравнение транскрипционного профиля стареющих мышц, почек и мозга привело к обнаружению общих свойств, соответствующих шести генетическим путям. Четыре группы генов с возрастом активируются (гены внеклеточного матрикса, регуляции роста клеток, активации комплемента, компонентов цитозольных рибосом), оставшиеся две — подавляются (гены хлоридного транспорта и субъединиц митохондриальной электронотранспортной цепи) (Zahn et al., 2006).

8. Генетические маркеры старения. На примере мышей были выявлены некоторые маркеры старения, предсказывающие оставшуюся продолжительность жизни и физиологический возраст. Среди них следует отметить изменение уровня CD4-лимфоцитов и экспрессии генов клеточного цикла, таких как, например, *p16^{INK4a}* (Krishnamurthy et al., 2004; Zahn et al., 2006). Регулятор старения *p16* экспрессируется многими (но не всеми) стареющими клетками, а также некоторыми опухолевыми клетками, особенно потерявшими функциональный pRB (Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007). Еще один известный биомаркер — это старение-ассоциированная β-галактозидаза. В образцах кожи человека с возрастом ее экспрессия увеличивается как в фибробластах, так и в кератиноцитах (Dimri et al., 1995). Ее накопление является результатом увеличения числа лизосом в стареющей клетке (β-галактозидаза — лизосомальный фермент). В данном случае стареющие клетки отличались от нестареющих за счет окрашивания при pH 6. В этом случае

только старые клетки имеют достаточную активность β -галактозидазы для конвертирования неокрашенного субстрата в синий продукт расщепления (Kurcz, 2004). При изучении преждевременного старения клеток, индуцированного онкогенами, были идентифицированы еще три белка, впоследствии позволившие успешно маркировать другие типы стареющих клеток: DEC1, p15 и DCR2. Их функция при старении неясна (Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007). В дальнейшем в категорию биомаркеров могут перейти возрастзависимые гены из категории 7 (экспрессия которых меняется при старении), что позволит оценивать физиологический возраст вне зависимости от хронологического (Rodwell et al., 2004).

Всесторонний анализ имеющихся у нас сведений позволил предложить функциональную классификацию генов продолжительности жизни.

1. «Регуляторы» продолжительности жизни — переключатели онтогенетических программ, которые отвечают за восприятие и передачу внешнесредовых сигналов, синтез, рецепцию и трансдукцию гормонов инсулинового пути, вторичных липофильных гормонов. Большая часть из них способствует росту и размножению, но подавляет стрессоустойчивость. Некоторые, напротив, стимулируют устойчивость к стрессу (например, *klotho*).

2. «Медиаторы» (гены киназ, деацетилаз белков, транскрипционных факторов), под действием регуляторов осуществляющие переключение программ стрессоустойчивости в ответ на сигналы из окружающей среды (наличие пищи, перенаселение, температурный и световой режимы, облучение) или на эндогенный окислительный стресс. «Медиаторы» тканеспецифичным образом регулируют экспрессию различных эффекторных генов либо непосредственно активность или время жизни белков. Кроме того, они взаимодействуют между собой, подавляя или стимулируя эффекты друг друга.

3. «Эффекторы» продолжительности жизни — гены стрессоустойчивости (гены белков теплового шока, антиоксидантной защиты, репарации белков и ДНК, компонентов протеосомы, кальпаинов, белков автофагии, врожденного иммунитета, детоксификации ксенобиотиков, регуляторов метаболизма). В определенном смысле их можно считать генами антистарения, и их сверхэкспрессия, как правило, увеличивает продолжительность жизни. Зачастую они действуют аддитивно, активируясь под действием отдельных «медиаторов» и увеличивая продолжительность жизни в условиях стресса. Ряд «медиаторов», напротив, подавляет их активность.

4. Гены жизнеспособности — обычные гены «домашнего хозяйства» (*housekeeping genes*). Они функционируют повсеместно,

на всех стадиях жизненного цикла, и обеспечивают структуру клетки, биосинтез аминокислот, липидов и нуклеотидов, гликолиз, цикл трикарбоновых кислот и т. д. Их мутации либо летальны, либо ведут к патологиям. В условиях стресса некоторые из них могут временно репрессироваться под действием «медиаторов», что позволяет сэкономить ресурсы для функционирования «генов-эффекторов» и увеличить продолжительность жизни.

5. Гены, участвующие в функционировании митохондрий, — гены компонентов электронотранспортной цепи, рассопрягающих белков и ген *clk-1* нематод. Эти гены регулируют энергетический метаболизм, уровень свободных радикалов, а некоторые из них — апоптоз.

6. Гены-регуляторы клеточного старения и апоптоза (*p53*, *p21*, *p16*, *pRB*). Они участвуют в предотвращении рака, в регуляции клеточного цикла и гибели ненужных или вредных клеток в раннем онтогенезе и зрелости. Их плеiotропным побочным действием в старости является старение (репликативное или стресс-индуцированное) делящихся клеток или избыточная убыль постмитотических клеток. Как показано на нематодах, эти гены способны неизвестным апоптозnezависимым образом влиять на старение так называемых постмитотических организмов.

Таким образом, гены играют важную роль как в детерминации продолжительности жизни, так и в процессе старения. Однако это не означает обязательного присутствия в геноме локусов, непосредственно управляющих старением (наподобие эмбрионального развития). Гены могут просто очерчивать пределы, в которых организм отвечает на стресс или повреждение. Они не контролируют процесс, а детерминируют возможные ответы, задавая скорость старения. Например, если старение вызывается накоплением повреждений от токсичного агента, то гены, участвующие в детоксификации, будут играть большую роль в детерминировании продолжительности жизни, но не будут ответственны за причину процесса (Helfand, Rogina, 2003a).

Количественный признак в отличие от менделевского характеризуется градиентом фенотипов. Варьирование обусловлено влиянием нескольких различных генов, каждый из которых привносит свой небольшой вклад в исследуемый фенотип. Кроме того, многие количественные признаки подвержены влиянию внешнесредовых и онтогенетических факторов. В результате такого взаимодействия различные генотипы могут приводить к идентичным фенотипам (Poirier, Seroude, 2005). С другой стороны, один и тот же генотип может лежать в основе различающихся фенотипов. Изучение общественных насекомых, у которых касты различаются по продолжительности жизни на порядки, продемон-

стрировало это со всей очевидностью. Касты сильно различаются по поведению, морфологии и продолжительности жизни, что является результатом баланса между наследуемыми профилями генной экспрессии и внешними рисками смертности. В онтогенезе эти различные программы запускаются эпигенетическими факторами, такими как качественный состав пищи (Rueppell et al., 2004).

Поскольку люди живут гораздо дольше модельных животных (которые к тому же умирают от неохарактеризованных патологий и болезней), генетика продолжительности жизни человека является более сложной. Даже возрастзависимые патологии мышей и человека явно различаются (Butler et al., 2003).

Чтобы по возможности отделить «геронтогены» от генов возрастзависимых заболеваний, геронтология человека делает основной упор в исследованиях на так называемое «обычное», или «благополучное», старение при отсутствии патологий (Weinert, Timiras, 2003). Наиболее плодотворным объектом исследования в связи с этим являются столетние индивидуумы. Во-первых, они обычно поддерживают хорошее здоровье до очень старости, даже вне зависимости от образа жизни — столетние индивидуумы часто избавлены от сердечно-сосудистых заболеваний, болезни Альцгеймера, сахарного диабета и рака. Во-вторых, их потомки наследуют устойчивость ко многим причинам смертности — среди них на 50 % менее распространены вышеперечисленные заболевания. Вероятность наследования долгожительства в семьях долгожителей возрастает в 4—17 раз, что предполагает скорее генетические, чем внешнесредовые предпосылки к исключительному долголетию (Butler et al., 2003; Atzmon et al., 2006). Кровные родственники столетних индивидуумов характеризуются 4-кратным увеличением вероятности дожить до 91 года, тогда как кровные родственники 95-летних имеют в 2.3 раза больше шансов дожить до этого возраста (Schoenmaker et al., 2006).

Изучение генов чрезвычайно старых здоровых индивидуумов с точки зрения генетики старения очень плодотворно, поскольку они «насыщены» генами долгожительства и являются генетически гомогенными в большей степени, чем остальная популяция. Однако они представляют собой недостаточно большую выборку, к тому же отсутствует контрольная когорта (Karasik et al., 2005). За последние 10 лет в различных популяциях среди столетних индивидуумов неоднократно были предприняты попытки найти гены долгожительства. На данную роль у человека претендуют *PON1*, *IGF-1*, *PAPR-1* и гены цитокинов, ферментов антиоксидантной защиты (*Sod*) и компонентов метаболизма липидов. Среди лиц

в возрасте 90—100 лет и старше (т. е. столетних индивидуумов) особо выделяются три генотипа: аллели гена *CETP* (*CETP VI*) и гена аполипопротеина C3 (*APOC-3 CC*) и делеция в гене адипонектина (*ADIPOQ*). Важно отметить, что *APOC-3* находится под транскрипционным контролем *FOXO-1*, ортологи которого контролируют долгожительство у всех генетических моделей (Martin et al., 2007). Для столетних индивидуумов характерны крупные липопротеиновые частицы и большое количество липопротеинов высокой плотности (Atzmon et al., 2006). В отличие от тех, кто не доживает до 90 лет, они сохраняют чувствительность к инсулину и устойчивость к оксидативному стрессу (Cheng et al., 2005).

Чтобы обойти проблемы, связанные с исследованием долгожителей, для изучения был предложен альтернативный фенотип — биологический («физиологический», «функциональный») возраст. Поскольку ткани стареют с разной скоростью, а болезни варьируют от индивидуума к индивидууму, люди с возрастом все больше различаются. В результате хронологический возраст не способен быть точным индикатором процесса старения. Биологический возраст имеет выраженный генетический компонент (27—57 %) и позволяет сравнивать функциональный статус одного индивидуума с другим того же хронологического возраста и в результате такого сопоставления делать выводы о различии в скорости старения (Karasik et al., 2005). Вариация фенотипа биологического возраста во многом определяется аддитивными генетическими факторами (наследственность составляет 0.57 ± 0.06) и в меньшей степени — средовыми. Она обусловлена локусами количественных признаков на хромосомах 3p, 7q, 11p, 16q и 21q (Karasik et al., 2005).

Наиболее обещающие гены-кандидаты межиндивидуальных отличий по биологическому возрасту у человека участвуют в регуляции кровяного давления и метаболизма липидов, определяют функциональные регуляторной оси гормона роста/инсулина/ростовых факторов, регулируют процессы воспаления, метилирования ДНК, эпигенетического подавления генов (в том числе генов ДНК-геликаз и экзонуклеаз). Кроме того, сюда относятся гены антиоксидантных ферментов (*Sod1* и *Sod2*), гены стресс-ответа, факторы поддержания теломер. Ряд исследований посвящен потенциальной роли в регуляции продолжительности жизни аполипопротеина A1 (*APOA-I*), аполипопротеина C3 (*APOC-III*), аполипопротеина A4 (*APOA-IV*), ингибитора активатора плазминогена типа I (*PAI-1*) и SHC-трансформирующего белка (*SHC1*) (Karasik et al., 2005).

Исследования близнецов показали, что примерно 25 % вариации продолжительности жизни человека объясняется гене-53

тическими факторами (Schoenmaker et al., 2006). Для оценки вклада генов в варьирование продолжительности жизни человеческой популяции в будущем потребуются крупномасштабные исследования методом случай-контроля. При этом большое количество аллелей генов продолжительности жизни, соответствующих модификациям всех функциональных модулей таких генов, будут проанализированы на все возможные вариации последовательности и сопоставлены с детальной информацией о фенотипе каждого индивидуума за продолжительный период времени. Это позволит вскрыть генетические факторы, вносящие вклад в каждое отдельное проявление старения человека (Vijg, Suh, 2005).

С точки зрения генетики продолжительности жизни и старения, перспективными задачами являются поиск биомаркеров старения, негенетических методов вмешательства в процессы старения (лекарств), генетических механизмов их действия и SNP (полиморфизмов одиночных генов долгожительства и возраст-зависимых заболеваний), а также анализ механизмов внешне-средового влияния (калорийности пищи и др.) и дальнейшие исследования в области сравнительной биологии старения (Butler et al., 2003).

1.3. Объекты генетики продолжительности жизни и старения

Модельные организмы сыграли решающую роль в обнаружении генов продолжительности жизни и контролируемых ими механизмов. Модель генетического исследования старения должна обладать (Holmes, Ottinger, 2003) рядом признаков:

- 1) специфичностью, способностью прямо отвечать на поставленную исследователем задачу или гипотезу;
- 2) общностью, т. е. высокой степенью вероятности, с которой находки могут быть применены к другим видам;
- 3) выполнимостью, которая включает в себя стоимость и требования к содержанию данного вида или линии.

В полной мере данным требованиям удовлетворяют следующие классические модели: дрожжи, нематоды, дрозофилы и мыши. В последнее время заслуженное внимание в качестве моделей уделяют и долгоживущим представителям видов насекомых, птиц, рукокрылых, грызунов (голому слепышу). Возрастзависимые изменения экспрессии генов иногда удобнее изучать на бо-

лее близких к человеку видах — обезьянах, собаках, крупных домашних животных, которые для другого вида исследований не удовлетворяют вышеперечисленным требованиям к модели старения.

1.3.1. Дрожжи

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* были предложены в качестве геронтологической модели в 1959 г. (Mortimer, Johnston, 1959), что было воспринято с определенным скептицизмом: как одноклеточный организм может прояснить самый сложный биологический феномен — старение человека? Однако именно исследования на дрожжах позволили накопить доказательства того, что все эукариоты обладают удивительно консервативными механизмами продолжительности жизни (Bitterman et al., 2003).

Дрожжи как объект исследования имеют ряд преимуществ — предельно малую продолжительность жизни (2—4 дня), полностью секвенированный геном и хорошо изученную биологию (Lesur, Campbell, 2004). Они несут 32 хромосомы. Размер их генома составляет всего 12 Мб. Из 6300 имеющихся в наличии генов 11 % гомологичны генам человека (Vijg, 2007).

У дрожжей измеряют репликативную и хронологическую продолжительности жизни (Fabrizio et al., 2005b).

В середине XX века Эндрю Бартон проследил судьбу индивидуальной клетки дрожжей и обнаружил, что материнские клетки смертны (Barton, 1950). У почкующихся дрожжей репликативное старение возникает из-за асимметричного деления клетки, приводящего к возникновению большой материнской клетки (почки) и маленьких дочерних. Большая часть макромолекулярного состава дочерней клетки синтезируется заново, в то время как состав материнской клетки стареет с каждым делением (Guarente et al., 1998). По сути дела, при такой «спиральной» форме старения материнская клетка при делении стареет на одно поколение, тогда как каждая новая почка начинает жизнь с нулевого возраста (Hoopes et al., 2002). Репликативное старение дрожжей измеряется под микроскопом по количеству дочерних клеток, образуемых одиночной материнской клеткой до момента остановки делений. Оно аналогично репликативной продолжительности жизни фибробластов и лимфоцитов млекопитающих в первичных культурах клеток (Fabrizio et al., 2005b). Однако имеется два важных отличия: во-первых, деление клетки дрожжей асимметричное, во-вторых, в конце своей жизни материнская дрожжевая клетка лизируется, а не подвергается терминальной дифференцировке,

как у млекопитающих (Hoopes et al., 2002). Медианная репликативная продолжительность жизни дикого типа *S. cerevisiae* составляет около 25 генераций, максимальная — 40 генераций (Lesur, Campbell, 2004). При старении клетка дрожжей подвергается характерным структурным и метаболическим изменениям. Когда клетка стареет, она накапливает рубцы почкования, увеличивается в размерах, делится более медленно и, наконец, становится стерильной (Bitterman et al., 2003), в итоге заканчивая свою жизнь по механизму альтруистического самоубийства (Longo et al., 2005).

Хронологическое старение — неделящееся состояние клетки при недостатке питательных веществ (Bitterman et al., 2003). Оно может служить в качестве модели старения постмитотической клетки высших организмов. Хронологическое старение измеряется средним и максимальным временем выживания популяции неделящихся дрожжей. Для исследования хронологического старения дрожжевые клетки выращивают на среде с глюкозой, а затем либо поддерживают на этой среде без обновления питательных веществ, либо отмывают и инкубируют в воде (ограничение калорийности питания). Выживаемость отслеживается до гибели 99 % популяции (Fabrizio et al., 2005).

Дрожжи как объект геронтологии позволили выявить несколько десятков генов, способных влиять на продолжительность жизни; многие из них эволюционно консервативны (табл. 5).

Таким образом, почкующиеся дрожжи как модельный объект генетики старения позволяют найти ответы на следующие вопросы.

1. Какие механизмы старения возникли в эволюции на стадии одноклеточности?
2. Почему при асимметричном цитокинезе дочерние клетки не наследуют показания часов репликативного старения?
3. Почему клетка подвергается репликативному старению даже при активной теломеразе?

В гл. 2—4 будет подробно рассмотрен вклад исследований генетики старения дрожжей в современную геронтологию. Тем не менее, несмотря на то что дрожжи являются простым одноклеточным организмом, изучение их генетики помогло понять процесс функционирования одного из главных механизмов старения — генетической нестабильности. Кроме того, изучение данного объекта позволило выявить эволюционно консервативные генные сети, отвечающие за реализацию «программы продолжительности жизни» в условиях стресса (когда определяющую роль играют сиртуины, TOR-сигналинг, антиокислительные ферменты, ферменты репарации ДНК).

Таблица 5
Гены продолжительности жизни дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

| Ген | Белок | Влияние мутации на продолжительность жизни | Функция | Гомолог у человека* | Литературный источник |
|--------------|--|--|---|---------------------|---|
| <i>Tlc1</i> | РНК-матрица конститутивно экспрессируемой теломеразы | + | Делеция приводит к укорочению теломер | <i>Terc</i> | Azam et al., 2006 |
| <i>Est2</i> | Каталитическая субъединица теломеразы | — | Та же | <i>Tert</i> | Bitterman et al., 2003 |
| <i>Sgs1p</i> | АТФ-зависимая RecQ 3'-5'-ДНК-геликаза | — | Rad52-зависимый механизм гомологичной рекомбинации, поддержание теломер, репликация, контрольная точка S-фазы | <i>Wtm, Bim</i> | Azam et al., 2006 |
| <i>Dna2</i> | Репликативная геликаза/нуклеаза | — | Репликация ДНК, стабильность генома | <i>DNA2L</i> | Hoopes et al., 2002; Lesur, Campbell, 2004 |
| <i>Rad27</i> | Нуклеаза | — | Та же | <i>FEN-1</i> | Hoopes et al., 2002 |
| <i>Rad50</i> | Субъединица MRX-комплекса с Mre11p и Xrs2p | — | Стабильность генома | <i>RAD50</i> | Park et al., 1999 |
| <i>Rad51</i> | Белок, участвующий в обмене целей ДНК | — | Рекомбинационная репарация двухцепочечных разрывов ДНК | <i>RAD51</i> | Тот же |

Таблица 5 (продолжение)

| Ген | Белок | Влияние мутации на продолжительность жизни | Функция | Гомолог у человека* | Литературный источник |
|-----------------------------------|---------------------------------------|--|--|---------------------|---|
| <i>Rad52</i> | Белок, участвующий в обмене цепей ДНК | — | Репарация двухцепочечных разрывов ДНК | <i>RAD52</i> | Park et al., 1999 |
| <i>Rad57</i> | Тот же | — | Рекомбинационная репарация двухцепочечных разрывов ДНК | <i>XRCC3</i> | Тот же |
| <i>Sir2p</i> | Сиртуиновая деацетилаза | — | Регуляция хроматинового сайленсинга путем модификации гистонов; защита клетки от последствий оксидативного повреждения | <i>SIRT1</i> | Balaban et al., 2005; Baumeister et al., 2006 |
| <i>Hst2</i> | Тот же | + (при сверхэкспрессии) | Цитоплазматическая деацетилаза | <i>SIRT3</i> | Lamming et al., 2005 |
| <i>Uth2</i> (<i>Sir4-42</i>) | » » | + | Перемещение комплекса Sir в ядро, сайленсинг | <i>SIRT4</i> | Bitterman et al., 2003 |
| <i>Rpd3</i> | Деацетилаза гистонов | + | Деацетилирует гистон H4, сайленсинг, экспрессия генов | <i>HDAC2</i> | Тот же |

| | | | | | |
|-------------|--|-------|---|---------------|------------------------|
| <i>Uth1</i> | ? | + | Индукцируется оксидативным стрессом, делеция увеличивает сайленсинг | ? | » |
| <i>Uth4</i> | ? | — | Распределение комплекса Sir в ядре, сайленсинг | ? | » |
| <i>Fob1</i> | Родственен интегразам ретровирусов | + | Ядерный белок, выполняющий функцию блокирования репликационной вилки ДНК | ? | » |
| <i>Hxt2</i> | Гексакиназа | + | Фосфорилирует поступающую в клетку глюкозу, снижает активность генов дыхания, глюконеогенеза и глиоксилатного цикла | <i>GCK</i> | » |
| <i>Snf1</i> | AMФ-активируемая серин/треониновая протеинкиназа | + | Активирует гены, необходимые для утилизации отходов от глюкозы источников углерода | <i>PRKAA2</i> | Guarente, Kenyon, 2000 |
| <i>Sip2</i> | β -Субъединица SNF1 | — | Корепрессор SNF1 | <i>PRKAB2</i> | Тот же |
| <i>Snf4</i> | γ -Субъединица SNF1 | + | Коактиватор SNF1 | <i>PRKAG2</i> | » |
| <i>Sod1</i> | Cu,Zn-супероксиддисмутаза | + | Детоксируют супероксид-радикал, увеличивают хронологическую продолжительность жизни, но не репликативную | <i>SOD1</i> | Bitterman et al., 2003 |
| <i>Sod2</i> | Mn-супероксиддисмутаза | То же | Та же | <i>SOD2</i> | Тот же |

Таблица 5 (продолжение)

| Ген | Белок | Влияние мутации на продолжительность жизни | Функция | Гомолог у человека* | Литературный источник |
|------------------------------|---|--|---|---------------------|---------------------------------|
| <i>Sch9</i> | Серин/треонинная протеинкиназа | + | Сигналинг глюкозы, рост и гликолиз, накопление глицерина, глюконеогенез | <i>Akt, SGK-1</i> | Bitterman et al., 2003 |
| <i>Tor1</i> | Протеинкиназа | + | Сигналинг присутствия питательных веществ | Tor | Kaeberlein et al., 2005a, 2005c |
| <i>Rpl31a</i> и <i>Rpl6b</i> | Компоненты большой (60S) субъединицы рибосомы | + | Синтез белка, регулируется TOR-сигналингом | <i>RPL31, RPL6</i> | Kaeberlein et al., 2005a |
| <i>BRE5</i> | Кофактор убиквитиновой протеазы | + | Транспорт между эндоплазматической сетью и аппаратом Гольджи | <i>USP10</i> | Тот же |
| <i>Cyt1</i> | Аденилатциклаза | + | Сигналинг глюкозы, стимулирует цАМФ-зависимую протеинкиназу | <i>PLEKHE1</i> | Bitterman et al., 2003 |
| <i>Ras2</i> | G-белок | + | Регулирует Cyt1 и ответ на азотное голодание и споруляцию | <i>RRAS2</i> | Тот же |
| <i>Pka</i> | Протеинкиназа | + | Отвечает на наличие питательных веществ | ? | » » |

| | | | | | |
|---------------------------|---|---|---|-----------------|---------------------------|
| <i>Gra2</i> | α-Субъединица G-белка | + | Активирует аденилатциклазу | <i>GNAI3</i> | Kaerberlein et al., 2005a |
| <i>Gpr1</i> | Связанный с G-белками рецептор плазматической мембраны | + | цАМФ-сигналинг | <i>GPR1</i> | Тот же |
| <i>MsrA</i> и <i>MsrB</i> | Метионин-R-сульфоксидредуктазы | — | Репарация окисленных метионинов в составе белков | ? | Koc et al., 2004 |
| <i>Agp1</i> | Глутаминовая пермеаза | + | Транспорт аминокислот | <i>SLC7A4</i> | Powers et al., 2006 |
| <i>Cdc25</i> | Мембраносвязанный фактор обмена гуанина | + | Регуляция клеточного цикла | <i>RASGEF1B</i> | Lin et al., 2000 |
| <i>Cdc6</i> | АТФ-связывающий белок репликации ДНК | + | Образование пререпликативного комплекса | <i>CDC6</i> | Sinclair, Guarente, 1997 |
| <i>Gln3</i> | Активатор транскрипции | + | Регулятор репрессоров прорудуктов катаболизма азота | ? | Powers et al., 2006 |
| <i>Idh2</i> | Субъединица митохондриальной NAD ⁺ -зависимой изоцитратдегидрогеназы | + | Фермент цикла трикарбонных кислот | <i>IDH3A</i> | Kaerberlein et al., 2005a |
| <i>Lag1</i> | Компонент перамидсинтазы | + | Синтез церамида | <i>LASS2</i> | D'mello et al., 1994 |

Примечание. Здесь и далее, табл. 5—8: «←» — снижение, и «+» — увеличение продолжительности жизни. * Цитирование по базе данных «GenAge Model Organisms» (<http://genomics.senescence.info/genes/models.html>).

1.3.2. Нематоды

Почвенная нематода *Caenorhabditis elegans* была введена как модельный организм в биогеронтологию Сиднеем Бреннером в 1974 г. (Brenner, 1974). Она имеет ряд преимуществ. Это животное характеризуется малой продолжительностью жизни, составляющей в норме 15 дней, начиная со стадии яйца (Mooijaart et al., 2005). Нематоды прозрачны в течение всей жизни, что дает возможность исследовать развитие клеток и органов под микроскопом. Они довольно малы (1 мм в длину), что позволяет выращивать их в огромных количествах в стандартных условиях на чашках Петри или в жидкой культуре. *C. elegans* — первый и единственный многоклеточный организм, у которого была исследована вся последовательность клеточных поколений, включая 959 соматических клеток (Baumeister et al., 2006). У данного объекта 12 хромосом. Геном нематоды секвенирован и имеет размер около 100 Мб. Около трети из 19 100 ее генов гомологичны генам человека (Vijg, 2007).

Для выяснения вклада тех или иных генов в старение необходимо выравнивание генетического фона. Однако интенсивный инбридинг приводит к фиксации в гомозиготной форме вредных рецессивных мутаций, часто возникающих у любого вида. У самооплодотворяющейся *C. elegans* быстро наступает гомозиготность по всем новым мутациям. В результате вредные мутации быстро удаляются, а гетерозис (гибридная сила) встречается довольно редко (Shmookler Reis et al., 2006).

После завершения стадий развития и короткого репродуктивного периода нематода *C. elegans* становится организмом, полностью состоящим из постмитотических клеток (Raices et al., 2005). Таким образом, она служит моделью старения постмитотических тканей, таких как нервная и мышечная системы у человека.

Старение характеризуется постепенными дегенеративными изменениями во многих тканях. На мелких модельных объектах сложно делать прижизненные измерения физиологических показателей. Тем не менее некоторые из них отслеживаются и у *C. elegans*, включая угасание таких физиологических процессов, как движения тела, нагнетание пищи в глотку, откладка яиц, частота дефекаций, а также потеря целостности тканей, изменение распределения желтка, снижение числа спермиев, увеличение размеров тела, накопление флуоресцентного материала (липофусцина), нарушение стабильности хроматина (Huang et al., 2004).

У этой нематоды был получен первый в истории мутант-долгожитель и охарактеризован первый ген продолжительности жизни (Klass, Hirsh, 1976; Friedman, Johnson, 1988). Данный объект по-

Таблица 6
Гены продолжительности жизни нематоды *Caenorhabditis elegans*

| Ген | Белок | Влияние мутации на продолжительность жизни | Функция | Гомолог у человека* | Литературный источник |
|---|---|--|--|---|--|
| <i>daf-19</i> | Транскрипционный фактор | + | Отсутствие сенсорных ресничек | <i>RFX1</i> | Apfeld, Kenyon, 1999 |
| <i>che-2</i> , <i>che-13</i> , <i>osm-1</i> , <i>osm-5</i> , <i>osm-6</i> | Белки хемотаксиса | + | Делеция среднего и дистального сегментов сенсорных ресничек | <i>IFT80</i> , <i>ESRRBL1</i> , <i>IFT172</i> , <i>TTC10</i> , <i>C20orf9</i> | Тот же |
| <i>che-3</i> , <i>che-11</i> , <i>daf-10</i> | Njn ;t | + | Редуцированные сегменты сенсорных ресничек | <i>DYNC2H1</i> , <i>IFT140</i> | » » |
| <i>tax-4</i> | α-Субъединица связанного с циклическими нуклеотидами канала | + | Передача сенсорного сигнала | <i>CNGA1</i> | » » |
| <i>ak-2</i> | α-Субъединица АМФ-активируемой протеинкиназы | — | Сенсор соотношения АМФ : АТФ (энергетического уровня клетки) | <i>PRKAA2</i> , <i>PRKAA1</i> | Apfeld et al., 2004 |
| <i>mes-1</i> | Тирозинкиназный рецептор | + | Пролиферация половых клеток | <i>STK24</i> | Arantes-Oliveira et al., 2002; Baumeister et al., 2006 |

Таблица 6 (продолжение)

| Ген | Белок | Влияние мутации на продолжительность жизни | Функция | Гомолог у человека* | Литературный источник |
|-------------------|--------------------------------------|--|--|---------------------|--|
| <i>gfp-1</i> | Рецептор Notch | + | Пролиферация половых клеток | <i>GLP1R</i> | Arantes-Oliveira et al., 2002; Baumeister et al., 2006 |
| <i>daf-12</i> | Ядерный рецептор стероидного гормона | + | Ответ на сигнал стероидного гормона | <i>NR1H2</i> | Baumeister et al., 2006 |
| <i>daf-36</i> | Оксигеназа Риске | + | Синтез стероидного гормона | ? | Тот же |
| <i>daf-9</i> | Цитохром P450 | + | Та же | <i>CYP2</i> | » » |
| <i>ins-7</i> | Инсулиноподобный пептид | + | Инсулиновый сигнал | <i>INS</i> | Kawano et al., 2006 |
| <i>ins-11</i> | Тот же | — | Антагонист DAF-2, подавляет инсулиновый сигнал | <i>INS</i> | Тот же |
| <i>daf-2</i> | Рецептор инсулина | + | Инсулиновый сигнал | <i>InR, IGF-1R</i> | Baumeister et al., 2006 |
| <i>age-1</i> | Фосфоинозитол-3-киназа | + | Та же | <i>PI3K</i> | Тот же |
| <i>daf-18</i> | Фосфатаза | — | Антагонист инсулинового сигнала | <i>PTEN</i> | » » |
| <i>Pdk-1</i> | PI3K-зависимая киназа | + | Инсулиновый сигнал | <i>PDPK1</i> | » » |
| <i>Aki1, Aki2</i> | Киназы | + | Та же | <i>Akt/PKB</i> | » » |

| | | | | | | |
|----------------------|---|-------------------------|---|---|-------------------|---|
| <i>sgk-1</i> | Тот же | + | » | » | <i>SGK</i> | » |
| <i>daf-16</i> | Транскрипционный фактор | + (при сверхэкспрессии) | » | Стресс-ответ | <i>FOXO</i> | » |
| <i>sir-2.1</i> | Деацетилаза | То же | » | Та же | <i>SIRT1</i> | » |
| <i>jnk-1</i> | c-Jun N-концевая киназа | » | » | » | <i>JNK</i> | » |
| <i>hsf-1</i> | Транскрипционный фактор теплового шока | » | » | Ответ на тепловой шок | <i>HSF</i> | » |
| <i>skn-1</i> | Транскрипционный фактор | + | — | Ответ на оксидативный стресс, контроль развития | <i>Nrf1, Nrf2</i> | » |
| <i>cst-1</i> | Протеинкиназа | — | — | Ответ на оксидативный стресс | <i>MST1</i> | Lehtinen et al., 2006 |
| <i>tkr-1 (old-1)</i> | Рецептор, связанный с G-белками | + | + | Регуляция липидного метаболизма | <i>TACRI</i> | Guarente, Kenyon, 2000; Gami, Wolkow, 2006 |
| <i>K04G7.4</i> | NADH-дегидрогеназа | + | + | Белок электронотransпортной цепи | <i>NDUFA10</i> | Zahn et al., 2006 |
| <i>isp-1</i> | Железосерный белок Рискс комплекса III электронотransпортной цепи | + | + | Клеточное дыхание | <i>UQCRCFSI</i> | Balaban et al., 2005; Baumeister et al., 2006 |
| <i>Mev-1</i> | Сукцинатдегидрогеназа | — | — | Та же | <i>SDHC</i> | Balaban et al., 2005 |
| <i>nuo-5</i> | NADH-убихиноноксидоредуктаза | + | + | Компонент дыхательной цепи митохондрий | <i>NDUFS1</i> | Hansen et al., 2005 |
| <i>ccht-1</i> | Гемм-лиаза цитохрома c | + | + | Та же | <i>HCCS</i> | Тот же |

Таблица 6 (продолжение)

| Ген | Белок | Влияние мутации на продолжительность жизни | Функция | Гомолог человека* | Литературный источник |
|----------------|--|--|--|-------------------|-------------------------|
| <i>clk-1</i> | Кофермент Q7 | + | Выработка убихинона (кофермента Q) | <i>COQ7</i> | Balaban et al., 2005 |
| <i>clk-2</i> | Гомолог <i>Tel2p</i> у <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | + | Ответ на повреждение ДНК | <i>KIAA0683</i> | Raices et al., 2005 |
| <i>hwp-1</i> | Гомолог РНП A1 | + | Метаболизм РНК | <i>DRPLA</i> | Тот же |
| <i>let-363</i> | TOR-киназа | + | Регулятор роста клеток в ответ на присутствие питательных веществ | <i>TOR</i> | Baumeister et al., 2006 |
| <i>daf-15</i> | Ассоциированный с TOR регуляторный белок | + | Та же | <i>RAPTOR</i> | Тот же |
| <i>nac-3</i> | Транспортер дикарбоксилатов | + | Транспорт сукцината | <i>SLC13A5</i> | Walker et al., 2005 |
| <i>nac-2</i> | Транспортер дикарбоксилата/трикарбоксилата | + | Транспортирует цитрат — предшественник синтеза жирных кислот, холестерина и изотерпеноидов | <i>SLC13A4</i> | Тот же |

| | | | | | |
|---------------|---|---|--|----------------|-------------------------|
| <i>nfx-2</i> | Na ⁺ , H ⁺ обменник | + | Обеспечивает закисление цитоплазмы, необходимое для H ⁺ -зависимого поглощения дипептидов и трипептидов из просвета кишечника | <i>SLC9A3</i> | » |
| <i>tub-1</i> | Tub-семейство белков | + | Обмен триглицеридов | <i>TUB</i> | Baumeister et al., 2006 |
| <i>lin-4</i> | МикроРНК | — | Определяет судьбу клеток личинки на стадии L2, подавляет экспрессию транскрипционного фактора <i>lin-14</i> | ? | Katsnelson, 2006 |
| <i>lin-14</i> | Транскрипционный фактор | + | Синхронизация онтогенеза личинки | <i>MUC17</i> | Тот же |
| <i>ctl-1</i> | Цитозольная каталаза | — | Детоксикация окислителей | ? | Guarente, Kenyon, 2000 |
| <i>eat-2</i> | Управляемый лигандами ионный канал | + | Дефект питания | <i>CHRNA7</i> | Hamilton et al., 2006 |
| <i>ttr-1</i> | Транстиретин | + | Белок-переносчик липофильного гормона(?) | ? | Hansen et al., 2005 |
| <i>taos-1</i> | Дегидрогеназа стероидов | + | Синтез липофильного гормона(?) | ? | Тот же |
| <i>gpi-1</i> | Гомолог глюкозо-6-фосфатизомеразы и нейрولىкина | + | Гликолиз(?) | <i>GPI</i> | » |
| <i>sinh-1</i> | Белок, взаимодействующий со стресс-активируемой MAP-киназой | + | Ответ на повреждение ДНК(?) | <i>MARKAP1</i> | » |

Таблица 6 (продолжение)

| Ген | Белок | Влияние мутации на продолжительность жизни | Функция | Гомолог у человека* | Литературный источник |
|---------------|-----------------------------|--|---|---------------------|-----------------------|
| <i>ddl-1</i> | Биспиральный белок | + | Связывание HSB-1 — негативного регулятора HSF-1 | <i>CCDC53</i> | Hansen et al., 2005 |
| <i>ddl-2</i> | ? | + | Взаимодействие с DDL-1 | <i>LOC349338</i> | Тот же |
| <i>ddl-3</i> | Легкая цепь кинезина | + | Взаимодействие белков, инсулиновый и герминативный сигналинг | <i>TTC19</i> | » » |
| <i>sams-1</i> | S-аденозилметионинсинтетазы | + | Универсальный донор метильной группы во многих биохимических реакциях | <i>MAT2A</i> | » » |
| <i>rab-10</i> | ГТФаза | + | Регулятор везикулярного транспорта(?) | ? | » » |
| <i>pat-4</i> | Интегриноподобная киназа | + | Интегриновый сигналинг | <i>ILK</i> | » » |
| <i>pat-6</i> | Актопаксин | + | Интегриновый сигналинг, связывается с интегриноподобной киназой | <i>PARVA</i> | » » |

| | | | | | |
|------------------------------|---|---|--|------------------|--------------------------|
| <i>rha-2</i> | РНК-геликаза | + | Регуляция экспрессии генов или метаболизм нуклеиновых кислот | <i>DHX37</i> | » |
| <i>hsp6</i> | Белок теплового шока | + | Митохондриальный импорт, выработка энергии | <i>mthsp70</i> | Kimura et al., 2006 |
| <i>hsp16</i> | Малый белок теплового шока | + | Шаперон | <i>CRYAB</i> | Morrow et al., 2004 |
| <i>hsp4</i> | Тот же | — | Шаперон эндоплазматической сети | <i>BiP</i> | Olsen et al., 2006 |
| <i>cid-1</i> | Белок с поли(A)полимеразным доменом | + | Регулятор контрольных точек | ? | Тот же |
| <i>chk-1</i> | Серин/треониновая киназа | + | Та же | <i>CHEK1</i> | » |
| <i>cdc-25.1</i> | ? | + | Пролиферация герминативных клеток | <i>Cdc25</i> | » |
| <i>abu-11</i> | Прионоподобный глутамин/аспарагин-богатый белок | + | Ген стресс-ответа эндоплазматической сети | <i>KRTAP10-3</i> | Viswanathan et al., 2005 |
| <i>bac-1</i> | Биспиральный белок | — | Автофагия | <i>bac11</i> | Hars et al., 2007 |
| <i>atg-7</i> и <i>atg-12</i> | ? | — | Та же | ? | Тот же |

* См. табл. 5.

зволил выявить такие консервативные в эволюции механизмы регуляции продолжительности жизни, как инсулиновый сигналинг, TOR-путь, липофильный сигналинг гонад.

Методическим достоинством нематоды является возможность применения на целостном организме масштабной интерференции РНК. С помощью данной методики вместе с пищей внедряются в тело *C. elegans* антисмысловые РНК интересующих генов, позволяя на любой стадии онтогенеза подавлять экспрессию исследуемого гена в большинстве тканей (Hamilton et al., 2006). В результате комбинации классических и молекулярных генетических методов нематода стала лидером по числу обнаруженных генов долгожительства (табл. 6).

Нематоды являются удобным объектом поиска новых препаратов антистарения. Возможность введения препарата простым его добавлением в питательную среду и быстрый анализ изменений делают их удачным объектом для тестирования эффектов лекарств. Так, было показано, например, что резвератрол (полифенол в составе красного вина) увеличивает продолжительность ее жизни в присутствии деацетилазы Sir-2.1 (Kaeberlein et al., 2005b). Выявлено, что антиконвульсионные препараты — этозуксимид, триметадион и 3,3-диэтил-2-пирролидинон, которые регулируют нейромышечную активность, увеличивают среднюю и максимальную продолжительности жизни нематод и задерживают возрастзависимое снижение физиологических процессов (Evason et al., 2005).

Подводя итог, следует отметить, что благодаря своим преимуществам при использовании в качестве объекта генетики старения нематода стала первым организмом, у которого были открыты гены долгожительства. Исследования на нематодах позволили выявить ключевую генную сеть, плеiotропно влияющую на старение, — инсулиновый сигналинг, а также подтвердить эволюционно консервативную роль сиртуинов, JNK- и TOR-сигналинга, митохондриальных механизмов, обнаружить регулирующий продолжительность жизни липофильный сигналинг гонад.

1.3.3. Дрозофила

С полным основанием можно сказать, что *Drosophila melanogaster* является наиболее изученным многоклеточным организмом. Знание устройства генома дрозофилы и организации генетического контроля большинства физиологических процессов позволяет считать эту муху одним из наиболее перспективных объектов генетики старения. В то же время она является старей-

шей моделью геронтологических исследований. Начиная с 1916 г. проведенные с ее помощью исследования позволили обнаружить существование наследственных основ старения, обосновать теорию интенсивности жизнедеятельности, показать взаимосвязь между репродукцией и старением (Loeb, Northrop, 1916; Gonzalez, 1923; Pearl et al., 1923; Smith, 1958). Дрозофила интенсивно используется для исследований механизмов влияния внешнесредовых стрессов на продолжительность жизни. Она играет важную роль в проверке эволюционно-генетических теорий старения, а также часто используется в исследованиях возрастных изменений по методу анализа экспрессионных микрочипов.

Основные ее преимущества следующие: 1) короткий жизненный цикл (12 дней) и малая продолжительность жизни (3 месяца); 2) относительная легкость содержания в лабораторных условиях; 3) удобство проведения генетических экспериментов — наличие балансеров и маркерных признаков (Москалев, 2004). Кроме того, она имеет ряд других несомненных преимуществ (Helfand, Rogina, 2003a): недорогое содержание; отточенность генетических и внешнесредовых манипуляций, влияющих на продолжительность жизни; обилие уже доступной информации о старении данного объекта; доступность линий, содержащих измененные гены; мощные технологии молекулярной генетики; полностью секвенированный геном; с ее помощью уже достигнут успех в анализе другого сложного биологического феномена — развития.

В то же время как объект поиска консервативных в эволюции генов долгожительства дрозофила имеет и недостатки, причем такие же, как и нематода. Поскольку соматические ткани имаго дрозофилы состоят из постмитотических клеток (исключение составляют некоторые интерстициальные клетки), она подходит как модель механизмов старения только нервной и мышечной систем человека (Brack et al., 1996). Она не позволяет обнаруживать отрицательное влияние новых мутаций на сосудистую систему, которая отсутствует. По этой причине нарушение инсулинового сигналинга, приводящее у низших животных к долгожительству, у человека связано с тяжелой патологией — сахарным диабетом. Для адекватного анализа продолжительности жизни необходимо исследовать долгожительство не менее 200—300 особей дрозофилы каждого пола (Helfand, Rogina, 2003a).

Геном *D. melanogaster* имеет в диплоидном наборе 8 хромосом, его размер 180 Мб. Из 13 600 ее генов 39 % гомологичны генам человека (Vijg, 2007).

Среди основных стратегий изучения генетики старения у дрозофилы выделяют селективное скрещивание, картирование локусов количественных признаков и исследование единичных мута-

Таблица 7
Гены продолжительности жизни *Drosophila melanogaster*

| Ген | Белок | Влияние мутации на продолжительность жизни | Функция | Гомолог у человека* | Литературный источник |
|------------------|---|--|-----------------------------|---------------------|-----------------------|
| <i>mth</i> | Рецептор Methuselah, сопряженный с ГТФ-связывающими белками | + | Устойчивость к стрессам | ? | Balaban et al., 2006 |
| <i>sun</i> | Лиганд Methuselah | + | Та же | ? | Тот же |
| <i>jnk</i> | Киназа | + | » » | ? | » » |
| <i>gen</i> | Связывающий белок | — | Пролиферация половых клеток | ? | Barnes et al., 2006 |
| <i>cell-less</i> | ? | — | Та же | ? | Тот же |
| <i>tudor</i> | Транскрипционный фактор | + | Апоптоз при повреждении ДНК | <i>p53</i> | Bauer et al., 2005 |

| | | | | | |
|---|----------------------------------|---|---|--------------|------------------------|
| <i>Grim</i> , <i>Eiger</i> , <i>Dronc</i> | ? | — (при повсе- местном вы- ключении) + (при сверх- экспрессии в нервной системе) | Проапоптозные белки | ? | Тот же |
| <i>rpd3</i> | Деацетилаза гистонов | — + | Деацетилирует гистон H4, ре- гулирует экспрессию генов | <i>HDAC2</i> | Bitterman et al., 2003 |
| <i>dSir2</i> | Деацетилаза гистонов | + (при сверх- экспрессии) | Стресс-ответ | <i>SIRT1</i> | Rogina, Helfand, 2004 |
| <i>dilp</i> | Лиганд рецептора инсулина | + | Инсулиновый сигналинг | <i>Ins</i> | Broughton et al., 2005 |
| <i>ImR</i> | Рецептор инсулина | + | Та же | <i>ImR</i> | Тот же |
| <i>chico</i> | Субстрат рецептора инсу- лина | + | » » | <i>ImRS</i> | » » |
| <i>dAkt</i> | Протеинкиназа | + | » » | <i>Akt</i> | » » |
| <i>Sgk-1</i> | Тот же | + | » » | ? | » » |

Таблица 7 (продолжение)

| Ген | Белок | Влияние мутации на продолжительность жизни | Функция | Гомолог у человека* | Литературный источник |
|--------------|---------------------------|--|--|---------------------|------------------------|
| <i>dPTEN</i> | Фосфатаза | + (при сверх-экспрессии) | Антагонист инсулинового сигналинга | <i>PTEN</i> | Hwangbo et al., 2004 |
| <i>dFOXO</i> | Транскрипционный фактор | + (при сверх-экспрессии) | Стрессоустойчивость | <i>FOXO</i> | Broughton et al., 2005 |
| <i>rct1</i> | Карбоксилметилтрансфераза | То же | Репарация белков (изоаспартиловых остатков) | <i>PCMT1</i> | Chavouis et al., 2001 |
| <i>hsp70</i> | Белок теплового шока | » » | Шаперон | <i>HSPA1A</i> | Flatt, 2004 |
| <i>hsp68</i> | Тот же | » » | Ответ на тепловой шок | ? | Wang et al., 2003 |
| <i>hsp27</i> | » » | » » | Шаперон | <i>HSPB1</i> | Poirier, Seroude, 2005 |
| <i>hsp26</i> | » » | » » | Та же | ? | Morrow et al., 2004 |
| <i>hsp23</i> | » » | » » | » » | ? | Тот же |
| <i>hsp22</i> | » » | » » | Обретение правильной вторичной и третичной структуры | ? | » » |

| | | | | | |
|------------------------------|---|--|--|---------------------|----------------------------|
| <i>drosoph</i> | Скаффолд белок | » | Модулирует активность JNK сигналинга | ? | Seong et al., 2001a, 2001b |
| <i>Sod2</i> | Митохондриальная супероксиддисмутаза | » | Превращает O ₂ ⁻ в перекись водорода | <i>Sod2</i> | Вауне et al., 2005 |
| <i>Sod1</i> | Цитоплазматическая супероксиддисмутаза | + (при сверхэкспрессии; эффект зависит от генетического фона) | Та же | <i>Sod1</i> | Flatt, 2004 |
| <i>mus Hamartin, tuberin</i> | Мембранный белок | + | Интегриновый сигналинг | <i>ITGB1</i> | Goddeeris et al., 2003 |
| <i>dTOR</i> | Гены 1 и 2 комплекса туберозного склероза | + (при сверхэкспрессии) | Сигналинг доступности аминокислот | <i>dTsc1, dTsc2</i> | Карahi et al., 2004 |
| | Киназа | + (при доминантно-негативной форме) | Та же | <i>TOR</i> | Тот же |
| <i>dS6K</i> | Тот же | То же | » | <i>S6K</i> | » |
| <i>d4E-BP</i> | Регуляторный белок | — | Подавляет биосинтез белка | ? | Tettweiler et al., 2005 |

Таблица 7 (продолжение)

| Ген | Белок | Влияние мутации на продолжительность жизни | Функция | Гомолог у человека* | Литературный источник |
|----------------|---|---|--|---------------------|-----------------------|
| <i>MstA</i> | Метионин-R-сульфоксид-редуктаза | + (при сверх-экспрессии в нервной системе) | Репарация белков | <i>MSRA</i> | Koc et al., 2004 |
| <i>dGMI</i> | α -Маннозидаза II | + (при сверх-экспрессии) | Ключевой фермент процессинга N-гликанов | ? | Landis et al., 2001 |
| <i>VhaSFD</i> | Регуляторная субъединица вакуолярного протонного насоса | То же | H^+ -АТФаза. Закисление оргanelл (везикул аппарата Гольджи, лизосом) | <i>ATP6V1H</i> | Landis et al., 2003 |
| <i>Sug</i> | Фермент | » » | Метаболизм нуклеотидов, регуляция транскрипции | <i>GLIS2</i> | Тот же |
| <i>filamin</i> | Актин-полимеризующий белок | » » | Организация актинового цитоскелета | <i>ABP280</i> | » » |
| <i>fwd</i> | Фосфатидилинозитол-4-киназа | » » | Метаболизм фосфолипидов | <i>PIK4CB</i> | » » |

| | | | | | |
|-----------------------------|------------------------|-------|---|---------------|------------------------|
| <i>Cct1</i> | Цитидилтрансфераза 1 | » | Фермент синтеза фосфатидилхолина, метаболизм фосфолипидов | <i>PCYT1A</i> | » |
| <i>edtp</i> | Фосфатаза фосфолипидов | — | Метаболизм фосфолипидов | ? | Poirier, Seroude, 2005 |
| <i>Or83b</i> | Обонятельный рецептор | + | Обоняние | ? | Libert et al., 2007 |
| <i>Dnmt2</i> | ДНК-метилтрансфераза | + | Контроль экспрессии генов | <i>DNMT2</i> | Lin et al., 2005 |
| <i>totA</i> | Totandot A | То же | Ответ на тепловой стресс | ? | Morrow et al., 2004 |
| <i>gcl</i> | Глутамат-цистеинлигаза | + | Синтез глутатиона, окислительный стресс | <i>GCL</i> | Orr et al., 2005 |
| <i>EcR</i> | Рецептор эклизона | + | Развитие и репродукция | <i>NR1H3</i> | Simon et al., 2003 |
| <i>ApoD</i> | Аполипопротеин | + | Репарация поврежденных мембран(?) | ? | Walker et al., 2006b |
| <i>Hyperkinetic, Shaker</i> | K ⁺ -каналы | — | Нейрологические мутанты, подвижность | ? | Helfand, Rogina, 2003b |

* См. табл. 5.

ций (Poirier, Seroude, 2005). Помимо мутаций, нарушающих или выключающих функцию гена, используют скрининг генов с повышенной экспрессией, приводящей к увеличению продолжительности жизни. У дрозофилы данный скрининг основан на использовании двух различных индуцибельных систем экспрессии генов: системы *Tet-On* и системы поиска генов (Poirier, Seroude, 2005). Благодаря применению таких подходов у дрозофилы были выявлены десятки «геронтогенов» (табл. 7).

Таким образом, как наиболее изученный и давно используемый генетический объект, дрозофила первой позволила оценить генетический вклад в процесс старения (в экспериментах по селекции долгоживущих линий). Кроме того, ее использование оказалось плодотворным при исследовании механизмов влияния на продолжительность жизни стрессовых воздействий (экстремальных температур, ионизирующей радиации, светового режима, окислительного стресса, ограниченной диеты) и при анализе взаимоотношений плодовитости и долгожительства. В результате исследований, проведенных на дрозофиле, были детально изучены высококонсервативные в эволюции механизмы регуляции продолжительности жизни, такие как инсулиновый и TOR-сигналинг, активация деацетилаз, JNK-каскада и пути устранения повреждений, например, антиоксидантных белков, ферментов репарации ДНК, белков теплового шока.

1.3.4. Мыши

Геном мыши *Mus musculus* содержит 40 хромосом и имеет размер примерно 3450 Мб. Секвенирование ее генома показало наличие 22—25 тысяч генов, 79 % из которых гомологичны генам человека (Vijg, 2007), что делает *M. musculus* уникальным объектом генетики старения.

Мыши генетически, анатомически и физиологически более близки к человеку, чем другие распространенные генетические модели. Возможность производить скрещивания и генетическую трансформацию (получение мышей с выключенной функцией гена или с его сверхэкспрессией, ограниченной определенной тканью или повсеместной) уже принесла определенные плоды (табл. 8). Другими их преимуществами являются относительная простота содержания и малая продолжительность жизни (максимум 4 года), полностью секвенированный геном и отработанные молекулярно-биологические приемы. Продолжительность жизни часто связывают с интенсивностью метаболизма и размерами тела. Поэтому мыши являются важным объектом сравнения биохимических

Таблица 8
Гены продолжительности жизни мыши *Mus musculus*

| Ген | Белок | Влияние мутации на продолжительность жизни | Функция | Гомолог у человека* | Литературный источник |
|------------------------------|----------------------------------|--|---|---------------------|---|
| <i>Klotho</i> | Гормон | + (при сверх-экспрессии) | Подавляет инсулин/IGF-1-сигналинг | <i>KLOTHO</i> | Kurosu et al., 2005; Yamamoto et al., 2005 |
| <i>p66^{shc}</i> | Адапторный белок | + | Окислительный стресс | <i>p66</i> | Balaban et al., 2005 |
| <i>InR</i> | Рецептор инсулина | + | Инсулин/IGF-1 сигналинг | <i>InR</i> | Broughton et al., 2005 |
| <i>IGF-1R</i> | Рецептор IGF-1 | + | Та же | <i>IGF-1R</i> | Тот же |
| Короткие изоформы <i>p53</i> | Транскрипционный фактор | — (при сверх-экспрессии) | Ответ на повреждение ДНК | <i>p53</i> | Gentry, Venkatachalam, 2005 |
| <i>Arf</i> | Позитивный регулятор <i>p53</i> | + | Та же | <i>p19</i> | Mathen et al., 2007 |
| <i>p63</i> | Связывающийся с хроматином белок | — | Регулятор апоптоза, пролиферации и дифференцировки клеток | <i>p63</i> | Keyes et al., 2005 |

Таблица 8 (продолжение)

| Ген | Белок | Влияние мутации на продолжительность жизни | Функция | Гомолог у человека* | Литературный источник |
|-----------------|--|--|------------------------------------|---------------------|---------------------------|
| <i>p21</i> | Ингибитор циклинзависимых киназ | + (при нарушениях в теломерах) | Контрольные точки клеточного цикла | <i>p21</i> | Choudhury et al., 2007 |
| <i>Wtn, Bim</i> | Геликазы | — (при нарушениях в теломерах) | Стабильность генома | <i>Wtn, Bim</i> | Du et al., 2004 |
| <i>Ki86</i> | ДНК-связывающая субъединица ДНК-зависимой протейкиназы | То же | Репарация ДНК | <i>Ki86</i> | Franco et al., 2005 |
| <i>DNA-PKcs</i> | Каталитическая субъединица ДНК-зависимой протейкиназы | — | Та же | <i>DNA-PKcs</i> | Espejel et al., 2004 |
| <i>Brcal</i> | <i>Brcal</i> | — | » | <i>Brcal</i> | Cao et al., 2003 |
| <i>Xpg</i> | Эндонуклеаза | — | » | <i>Xpg</i> | Narada et al., 1999 |
| <i>SIRT1</i> | Деацетилаза | — | Стресс-ответ | <i>SIRT1</i> | Motta et al., 2004 |
| <i>SIRT6</i> | Тот же | — | Репарация ДНК | <i>SIRT6</i> | Mostoslavsky et al., 2006 |

| | | | | | |
|------------------------------|--|-----------------------------------|--|---------------------------------|--|
| <i>Terc</i> | Субъединица теломеразы | — (спустя несколько поколений) | Поддержание теломер | <i>Terc</i> | Franco et al., 2005 |
| <i>PASG</i> | Геликаза | — | Репликация, метилирование, репарация, комбинация ДНК | <i>PASG</i> | Lee D. et al., 2000; Sun et al., 2004 |
| <i>pit-1</i> и <i>ppor-1</i> | Транскрипционные факторы | + | Развитие гипофиза, гормональная регуляция | <i>POU1F1</i> , <i>PROPI</i> | Cheng et al., 2005 |
| <i>MsrA</i> | Метилонин-S-сульфоксидредуктаза | — | Репарация белков | <i>MsrA</i> | Кос et al., 2004 |
| <i>Polg</i> | Митохондриальная ДНК-полимераза γ | — | Репликация и стабильность генома в митохондриях | <i>POLG</i> | Trifunovic et al., 2004; Kujioth et al., 2005 |

* См. табл. 5.

и генетических особенностей со сходными по размеру долгоживущими видами — голым слепышом, летучими мышами, некоторыми птицами. Несмотря на то что гены долгожительства мышей были открыты позже, чем у других объектов, грызуны стали одной из первых моделей, для которых было показано позитивное действие ограничения калорийности питания. Оказалось, что это универсальное внешнесредовое воздействие, продлевающее жизнь и замедляющее старение у всех исследованных с этой точки зрения видов (McCauley et al., 1939). Мыши являются удобной моделью изучения возрастзависимой динамики экспрессии генов.

Однако имеются и существенные ограничения при распространении на человека выводов, полученных на мышах. Во-первых, мыши характеризуются ускоренным старением, тогда как человек — постепенным (Finch, 1998). Во-вторых, различия касаются исследований связи клеточного старения и старения организма в целом. В отличие от клеток человека и приматов, клетки лабораторных мышей имеют чрезвычайно длинные теломеры, поэтому не испытывают репликативного старения (Weinstein, Ciszek, 2002; Pelicci, 2004). В то же время клетки мышей гораздо более чувствительны к окислительным повреждениям — стресс-индуцированному преждевременному старению, чем клетки человека (Weinert, Timiras, 2003). Кроме того, у мышей, так же как у нематод и дрозофил, выключение рецептора инсулина в жировой ткани приводит к увеличению продолжительности жизни, тогда как у человека нарушение инсулинового сигналинга ведет к сахарному диабету.

Таким образом, в качестве наиболее генетически близкого к человеку короткоживущего модельного объекта мыши играют важную роль в проверке механизмов старения, выявленных на более простых моделях. Анализ (табл. 8) показывает, что все гены долгожительства мышей имеют ортологов у человека.

1.3.5. Человек

Несмотря на огромный вклад в генетику старения, модельные системы, описанные в предыдущих разделах, имеют определенные ограничения при экстраполяции полученных с их помощью данных на человека. Во-первых, они относятся к быстростареющим животным. Мутации, продлевающие их жизнь, добавляют недели или месяцы жизни беспозвоночным и год или менее грызунам. Это так называемые «г-стратегии», характеризующиеся быстрыми темпами развития, высокой плодовитостью и короткой продолжительностью жизни. Для человека характерна «К-стратегия», отличающаяся длинным периодом развития, не-

большим потомством и относительным долгожительством. Неудивительно, что некоторые маркеры старения человека (например, полиморфный локус *CETP*) у грызунов и беспозвоночных не обнаружены. В случае с модельными организмами мы зачастую мало знаем о патофизиологии их старения. Дополнительные уникальные быстроэволюционирующие интронные последовательности ДНК отличают *Homo sapiens* даже от ближайших родственников — шимпанзе (*Pan troglodytes*), чья продолжительность жизни вдвое меньше. Наконец, генетика модельных объектов ограничена исследованиями высокоинбредных организмов в однотипном средовом окружении, тогда как современная генетика человека имеет дело с огромным разнообразием межгенных и гено-средовых взаимодействий, что позволяет вскрыть причины межиндивидуальных отличий в продолжительности жизни (Martin et al., 2007). Для изучения генетики старения человека разработаны методы анализа клеточного старения в культуре клеток и технологии экспрессионных микрочипов, используются также близнецовый метод и исследование долгожителей.

Существует три подхода к генетическому анализу биологии старения человека. Первый и самый развитый — поиск биохимических и генетических основ варьирования чувствительности к основным гериатрическим заболеваниям. К нему относится изучение прогероидных синдромов. Если принять во внимание, что главным фактором риска практически всех гериатрических болезней является биологическое старение, то синдромы ускоренного старения могут служить отправной точкой в исследованиях причин старения. Второй подход — поиск аллелей, обуславливающих экстраординарное продление жизни. Хотя ранее обнаруженная связь долголетия с локусом на хромосоме 4 не была подтверждена, ассоциативные исследования позволили выявить существование полиморфизмов, имеющих отношение к продолжительности жизни. Третий подход существует в проекте. Он потребует долговременного исследования большого количества пар сиблингов среднего возраста, в высшей степени дискордантных или конкордантных по скорости снижения разнообразных физиологических функций (Martin et al., 2007).

Какова «естественная» продолжительность жизни человека? Анализ продолжительности жизни 53 родов приматов показал, что вариация по этому показателю может быть объяснена массой мозга и размерами тела. Основываясь на этой модели, «естественная» продолжительность жизни представителей рода *Homo* должна находиться в пределах 52—90 лет (Bronikowski et al., 2002). Остеологический анализ останков показывает, что предки человека в среднем жили 36 лет, их возраст редко превышал 50-лет. Однако иссле-

дования предконтактных охотников-собирателей свидетельствуют о том, что наши предки имели более длинную жизнь. В среднем 15-летний представитель племени *Dobe !Kung* доживает до 69 лет. Ожидаемая продолжительность жизни лесных жителей *Ache* 15-летнего возраста составляет 52 (мужчины) и 58 (женщины) лет. Для примера отметим, что в 1900 г. в США 15-летний индивидуум доживал до 62 лет, в настоящее время — до 77 лет (совмещенные данные по мужчинам и женщинам всех рас) (Bronikowski et al., 2002). Увеличение продолжительности жизни в индустриализованных обществах за последнее столетие — результат уменьшения основной смертности, т. е. улучшения общего состояния здоровья, но не снижения накопления возрастзависимых повреждений (Partridge et al., 2005). Иными словами, это следствие произошедшего в середине XX века «эпидемиологического скачка», приведшего к снижению темпов смертности от острых инфекционных заболеваний (в связи с развитием гигиены и открытием антибиотиков). За ним последовало (в 70—80-х годах) вторичное снижение смертности от сердечно-сосудистых заболеваний в старом возрасте (Weinert, Timiras, 2003). Тем не менее для осуществления качественно нового скачка долгожительства и достижения «благополучного» старения (без патологий) не обойтись без понимания генетических механизмов продолжительности жизни. Имеющийся в настоящий момент арсенал молекулярно-генетических и клинических методов исследования вселяет уверенность в прогрессе данного направления биogerонтологии. Возможно, что уже в ближайшем будущем человек станет первостепенным источником информации о «геронтогенах», вытеснив другие объекты исследований на второй план.

Глава 2 МЕХАНИЗМЫ СТАРЕНИЯ

2.1. Клеточное старение

2.1.1. Репликативное и стресс-индуцированное старение клеток

Август Вейсман еще в XIX веке предложил в качестве механизма запрограммированного старения ограничение числа делений соматических клеток (герминативные клетки в отличие от соматических делятся бесконечно). Различия в продолжительности жизни животных он пытался объяснить количеством клеточных поколений (цит. по: *Gavrilov, Gavrilova, 2002*). Однако впоследствии Алексис Каррель, культивировавший фибробласты сердца цыпленка на протяжении десятков лет, обнаружил, что клетки в культуре бессмертны при соблюдении подходящих условий существования (*Carrel, Ebeling, 1921*).

Данная точка зрения главенствовала до конца 50-х годов XX века, когда было обнаружено старение клеток в культуре, получившее название лимита Хейфлика (*Hayflick, Moorhead, 1961*). Принцип эксперимента Хейфлика и Мурхеда был прост: смешали равные части нормальных мужских фибробластов, прошедших 40 удвоений популяции в культуре (старые клетки), и женских фибробластов, выдержавших только 10 удвоений. Когда контрольная несмешанная популяция мужских клеток перестала делиться, смешанная опытная культура содержала только женские клетки — все мужские клетки уже погибли (*Hayflick, Moorhead, 1961*). Таким образом, Хейфлик заключил, что нормальные клетки имеют ограниченную способность к делению в отличие от раковых клеток, которые иммортабельны (*Shay, Wright, 2000*). Возникло предположение, что «митотические часы» находятся внутри каждой клетки, о чем свидетельствовали два наблюдения: 1) нормальные фетальные человеческие фибробласты в культуре подвергаются только определенному числу удвоений популяции; 2) криогенно сохраненные клетки «помнят» сколько раз они делились до заморозки.

Согласно распространенной точке зрения, лимит Хейфлика является проявлением механизма, возникшего у многоклеточных организмов для подавления опухолеобразования. Другими словами, опухолесупрессорные механизмы, такие как репликативное старение и апоптоз, полезны в раннем онтогенезе и зрелости, но побочно являются причиной старения (Keyes et al., 2005; Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007). В этом заключается их антагонистическая плеiotропия. Стимулируя раннюю жизнеспособность, уменьшая вероятность возникновения рака и являясь барьером на пути накопления мутаций, они ограничивают продолжительность жизни в результате накопления дисфункциональных стареющих клеток или избыточной гибели функциональных (Zhang H. et al., 2003; Campisi, 2005).

Многоклеточные организмы содержат соматические клетки двух различных типов: постмитотические, не способные делиться, и митотически компетентные. У многих простых организмов, подобных дрозофиле и *Caenorhabditis elegans*, постмитотические клетки у взрослых особей преобладают. У более сложных животных, таких как млекопитающие, напротив, многие соматические ткани содержат митотические клетки. Такие ткани имеют преимущество, поскольку они способны к обновлению, репарации и в ряде случаев к регенерации (Campisi, 2005). Появление способности к обновлению соматических тканей, вероятно, позволило значительно увеличить продолжительность жизни организмов. Однако обновляемые ткани чувствительны к гиперпролиферативным заболеваниям, наиболее смертельным из которых является рак. Это происходит потому, что, во-первых, нарушение регуляции пролиферации клеток служит важным шагом на пути к раку, во-вторых, репликация ДНК увеличивает вероятность приобретения соматических мутаций, в том числе ведущих к опухолеобразованию (Campisi, 2005). Таким образом, у сложных организмов увеличение продолжительности жизни привело к опасности заболеть раком. Это вызвало необходимость коэволюции механизмов регенерации тканей и супрессии опухолей.

Одна мутантная клетка должна дать миллионы потомков, чтобы редкие мутационные события встретились в опасном сочетании. Более того, большинство раковых мутаций являются рецессивными, а это значит, что обе копии гена должны нести мутации. Обычно это происходит в результате редкого события нерасхождения хромосом, при котором обе нормальные копии уходят одной дочерней клетке, тогда как другая не имеет нормальной копии вовсе. В результате клетка получает способность экспрессировать рецессивную, потенциально раковую мутацию. Она опять должна дать миллион клеток-потомков, прежде чем произойдет новая

необходимая для озлокачествления мутация. Это соответствует 20—40 клеточным делениям на одну мутацию. Общепринято, что одной-единственной клетке требуется от четырех до шести мутаций для превращения в злокачественную (если эпигенетические изменения не ускорят этот процесс). Таким образом, ограничения общего числа делений до 100 вполне достаточно, чтобы предотвратить получение «недостающих» мутаций предраковой клеткой с одной-двумя предрасполагающими к возникновению рака мутациями. Возможно, что репликативное старение клеток человека позволяет «подсчитывать» число делений. Вероятно, лишь немногие предки людей жили дольше 30—40 лет из-за болезней и давления хищников. В результате эволюция нашла баланс между заменой клеток (тканевой репарацией) и остановкой пролиферации. Это привело к ограничению числа клеточных делений на уровне 50—80 (для фибробластов в культуре клеток), что соответствует возрасту 40 лет, без лишнего запаса делений. Современные успехи санитарии, профилактики и лечения заболеваний привели к тому, что продолжительность жизни большой массы людей существенно выше 40 лет. Поэтому репликативное старение, играющее позитивную роль до достижения этого возраста, вносит свой вклад в снижение функционирования тканей в старости (Wright, Shay, 2005a).

Клетки у организмов с обновляемыми тканями постоянно выходят из клеточного цикла в ответ на повреждение ДНК, нарушение хроматина и на сильные митогенные сигналы (сверхактивация протоонкогенов *Ras*, *Raf*, *Mek*, *Mos*, *E2F-1*). Данный вид ответа, называемый клеточным старением, прежде всего контролируется супрессорами опухолей (p53 и RB) и, как уже говорилось, является потенциальным противораковым механизмом (Macip et al., 2002; Campisi, 2005; Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007).

Чем характеризуются стареющие клетки? Они существенно отличаются от молодых клеток по морфологии: увеличены в размерах, иногда имеют несколько ядер, избыточно вакуолизованы, уплощены; кроме того, они отличаются экспрессией генов и другими своими функциональными характеристиками (Cao et al., 2003; Kurz, 2004; Papazoglu, Mills, 2007). Например, стареющие фибробласты человека устойчивы к керамид-индуцируемой программированной гибели клеток либо к апоптозу, вызванному лишением ростовых факторов или оксидативным стрессом (но не Fas-лигандом). Однако не все стареющие клетки теряют чувствительность к апоптозу. Так, стареющие эндотелиальные клетки или лимфоциты предпочитают клеточному старению апоптоз (Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007). По-видимому, устойчивость к апоптозу позволяет фибробластам и эпителиальным клеткам продолжать

выполнять свои функции в ткани, несмотря на серьезные повреждения. В противном случае такая ткань быстро дегенерировала бы, поскольку с возрастом происходит снижение способности к компенсаторной пролиферации.

In vivo стареющие клетки в ткани обнаружить непросто, так как их трудно отличить от покоящихся или терминально дифференцированных клеток. Однако были выявлены специфичные биомаркеры клеточного старения: старение-ассоциированная β -галак-тозидаза, регулятор старения p16, белки DEC1, p15 и DCR2 (Dimri et al., 1995; Kurz, 2004; Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007). Таким образом, было доказано накопление с возрастом *in vivo* клеток с признаками старения (Dimri et al., 1995).

Различают репликативную и стресс-индуцированную формы клеточного старения (Weinert, Timiras, 2003).

Репликативное старение — это перманентное неделяющееся состояние, которое возникает в соматических клетках после определенного количества клеточных делений. В идеальных условиях клеточной культуры неопухолевые соматические клетки способны совершать несколько десятков митозов, после чего стареют. Стареющие клетки блокируются в G₁-фазе клеточного цикла, после чего они уже не способны реплицироваться, оставаясь метаболически активными и жизнеспособными.

Фибробласты человека с мутацией гена ключевого сенсора повреждения ДНК — *ATM (ataxia-telangiectasia mutated)*, в которых сверхэкспрессирована каталитическая субъединица теломеразы (hTERT), приводящая к удлинению теломер, защищены от преждевременного репликативного старения. Однако они по-прежнему подвержены активации проверочной точки G₁ и гиперчувствительны к ионизирующей радиации. Таким образом, в дополнение к репликативному старению фибробласты подвергаются еще и стресс-индуцированному преждевременному старению (SIPS). Оно часто возникает при повреждении ДНК, индуцированном ультрафиолетом или рентгеновским облучением, окислительным стрессом (H₂O₂ или гипероксия), воздействием этанола и ингибиторов деацетилаз гистонов. Данный вид старения фенотипически похож на репликативное: наблюдается увеличение и уплощение клеток, позитивное окрашивание на старение-ассоциированную β -галактозидазу, прекращение синтеза ДНК, накопление p53, p21 и p16, фосфорилирование p38 митоген-активируемой протеинкиназы — p38 MAPK (Naka et al., 2004; Pascal et al., 2005). SIPS может вносить значительный вклад в клеточное старение в целом. У мышей оно полностью замещает репликативное старение. Тогда как фибробласты человека способны делиться в культуре при нормальной концентрации кислорода 40—60 раз, клетки мышей —

около 14 раз. Дело в том, что фибробласты мышей вступают в стресс-индуцированное старение в ответ на обычную концентрацию кислорода (20 %), однако при 3 % кислорода клетки мышей не подвергаются репликативному старению вовсе (мышинные клетки имеют очень длинные теломеры). Эти данные определяют место клеточного старения, по крайней мере стресс-индуцированного, в свободнорадикальной теории старения (Weinert, Timiras, 2003).

Репликативное старение определяется количеством делений клеточной популяции; следовательно, существуют некие «митотические часы», способные записывать эти деления. На роль таких часов претендуют теломеры (Оловников, 1971). Укорочение теломер может также быть ассоциировано с SIPS, так как сверхэкспрессия антиоксидантных белков в фибробластах человека замедляет скорость укорочения теломер и продлевает их жизнь (Naka et al., 2004; Pascal et al., 2005). Рассмотрим теломеразависимые механизмы репликативного старения.

2.1.2. Теломеры и теломераза

Теломеры, структуры на концах линейных хромосом эукариот, были впервые описаны в первой половине XX века Германом Мёллером в его классическом исследовании на дрозофиле (Muller, 1938). Он отметил, что хромосомные инверсии, происходящие при радиационно-индуцируемых двухцепочечных разрывах, никогда не содержат самый конец хромосомы. Он же ввел термин «теломера» от греческих слов «телос» (конец) и «мерос» (часть). Спустя некоторое время Барбара Мак-Клинток обнаружила, что, в то время как нарушенные концы хромосом кукурузы сливаются, образуя дицентрики, ненарушенные концы не вызывают aberrаций (McClintock, 1941). Таким образом, была доказана защитная роль теломер.

Почти сразу после открытия полуконсервативной природы репликации ДНК было показано, что 3'-концы линейных хромосом не могут копироваться репликационной машиной из-за РНК-прайма, инициирующего синтез ДНК *de novo* и удаляемого при процессинге фрагментов Оказаки. Возникла идея, что с каждым клеточным делением теряется короткий сегмент 5'-концевой дочерней цепи ДНК (Оловников, 1971; Olovnikov, 1973). Данное укорочение не нарушает целостности генома до превышения критической величины. Подобные же изменения в теломерах могут также быть вызваны экзонуклеазами, обрабатывающими 5'-конец родительской цепи, и активными формами кислорода (Herbig, Sedivy, 2006).

В 1978 г. Элизабет Блекберн обнаружила, что теломеры ресничного простейшего *Tetrahymena thermophila* состоят из простого гексамерного повтора **TTGGGG** (Blackburn, Gall, 1978). Теломеры клеток человека также состоят из тысяч повторов, но уже нуклеотидов **TTAGGG**. В 1986 г. было показано, что теломеры человека не во всех тканях имеют одинаковую длину и что при делениях нормальных фибробластов в культуре они укорачиваются (Shay, Wright, 2000).

Однако оставалась проблема теломер в половых и раковых клетках высших организмов. В 1985 г. Кароль Грейдер открыла у *Tetrahymena* фермент теломеразу, синтезирующую повторы и удлиняющую теломеры (Greider, Blackburn, 1985). Позже этот фермент был обнаружен в экстрактах иммортальных клеточных линий человека и в большинстве опухолей (Shay, Wright, 2000). Наконец, в 1998 г. внесение в геном фибробластов активной копии гена фермента теломеразы, достраивающего теломеры, доказало возможность продления жизни клеточных популяций (Bodnar et al., 1998; Vaziri, Benchimol, 1998).

Теломеры — высокоспециализированные гетерохроматиновые ДНК-белковые структуры, защищающие концы хромосом эукариотических клеток от деградации, рекомбинации или объединения (Chai et al., 2005; Franco et al., 2005). Они необходимы для поддержания стабильности генома, точной репликации хромосом, опосредуют регуляцию клеточного цикла, перемещение и локализацию хромосом в ядре, транскрипционную регуляцию субтеломерных генов, а также репликативное клеточное старение. У ряда эукариотов теломеры имеют дополнительные специфические функции. Например, частая конверсия субтеломерных генов определяет разнообразие поверхностных антигенов у трипаносом, быстро эволюционирующие семейства субтеломерных генов дают селективные преимущества линиям дрожжей (Riethman et al., 2004).

Структура теломер у большинства эукариотов высококонсервативна и представляет собой короткие прямые повторы, богатые **G** (на 3'-конце) и **C** (в комплементарной цепи). Например, теломерная ДНК человека состоит из 5000—15 000 пар оснований повторяющихся гексамеров **TTAGGG**, следующих за одноцепочечным выступом размером 100—400 нуклеотидов на 3'-конце **G**-богатой цепи (Kurz, 2004; Chai et al., 2005; Franco et al., 2005; LeBel, Wellinger, 2005; Herbig, Sedivy, 2006).

В норме теломерные концы не распознаются в качестве поврежденной ДНК, что обусловлено различными защитными механизмами. Одноцепочечные 3'-выступы теломер могут быть защищены белками, связывающимися с одноцепочечной ДНК, такими

как Cdc13 у *Saccharomyces cerevisiae*, ТЕРР у ресничного простейшего *Oxytricha nova*, или POT-1 у млекопитающих. Одноцепочечный 3'-выступ может быть также спрятан в специализированном участке теломерной ДНК — в так называемой Т-петле (Chai et al., 2005). Т-петля формируется путем сворачивания 3'-выступа в двухцепочечную ДНК (Franco et al., 2005). Структура Т-петли напоминает промежуточный продукт гомологичной рекомбинации. Поэтому неудивительно, что белки гомологичной рекомбинации ДНК — Rad54 и Rad51D играют важную роль в кепировании (покрыве) теломер и регуляции их длины (Blasco, 2005).

Теломеры млекопитающих связаны со многими другими белками, участвующими в защите от деградации и репарации двухцепочечных разрывов (Bitterman et al., 2003). Белок TRF1 формирует мультибелковый комплекс, участвующий в контроле длины теломер. Кроме того, этот комплекс включает TIN2, TANK1 и TANK2 поли(АДФ-рибозо)полимеразы, POT-1 и РТОР/PIP1, а также TRF2 через его взаимодействие с TIN2. Предполагают, что TRF2 играет фундаментальную роль в защите одноцепочечного теломерного выступа от деградации и в предотвращении объединения теломер. Он также привлекает к теломерам ряд других белков, участвующих в репарации ДНК, например комплекс MRE11, состоящий из RAD50, MRE11 и NBS1 и являющийся ключевым компонентом механизмов гомологичной рекомбинации и негомологичного соединения концов, участвующих в репарации двухцепочечной ДНК. Кроме того, TRF2 взаимодействует с другими белками репарации ДНК: PARP-2, Ku, Werner, комплексом эксцизионной репарации нуклеотидов XPF/ERCC1. Последний выступает в роли экзонуклеазы, отсекающей 3'-выступ при отсутствии функционального TRF2. В дополнение следует отметить, что TRF2 специфически связывает АТМ, что вызывает блокирование АТМ-зависимого ответа на повреждение ДНК. Наконец, TRF2 привлекает к теломерам человека hRAP1, сверхэкспрессия которого вызывает удлинение теломер (Blasco, 2005).

Весь этот комплекс белков можно обнаружить на теломерах методом иммунофлуоресценции. Он получил название TIF (telomere dysfunction induced foci). В большинстве стареющих клеток часть теломер имеет признаки потери такой белковой защиты, о чем свидетельствует присутствие на них других белков, участвующих в репарации двухцепочечных разрывов, — γ -H2AX, 53BP1, MRE11, АТМ, Chk2 и Chk1 (Herbig, Sedivy, 2006).

Важная роль перечисленных белков в старении клеток не вызывает сомнений. Инактивация TRF2 приводит к клеточному старению, зависимому от функции ключевых факторов распознавания поврежденной ДНК — АТМ и p53. Главными компонентами

сигналинга в ответ на укорочение теломер в фибробластах человека являются два субстрата фосфорилирования АТМ — **Chk2** и **H2AX**. Стареющие фибробласты в культуре накапливают γ -H2AX, маркер двухцепочечных разрывов ДНК. Протеинкиназа **Chk2** является компонентом сигнального пути проверочной точки клеточного цикла в ответ на повреждение ДНК, например, под действием ионизирующей радиации или при блокировании репликации гидроксимочевинной. Активированный **Chk2** в свою очередь фосфорилирует супрессоры опухолей **p53** и **BRCA1** или представителей семейства CDC25-фосфатаз. В результате иницируются проверочные точки **G₁**, **S** или **G₂/M** клеточного цикла, что обуславливает необратимую остановку роста стареющей клетки. В то же время АТМ не только распознает сигнал о повреждении теломер, но и напрямую участвует в поддержании их длины. Активация нижележащего сигналинга в ответ на повреждение теломер присуща не только АТМ, но и его гомологу АТР, также способному фосфорилировать киназу **Chk2** (Gire et al., 2004). В стареющих клетках количество связанного с теломерами АТМ возрастает в 37 раз, а количество АТР — в 6 раз (Shay, Wright, 2004). При выключении гена АТМ или его мишени **Chk2** задержки в фазе **G₁** клеточного цикла при клеточном старении не происходит. Однако поврежденные теломеры все же активируют задержку в **G₂** через АТР/Chk1-сигнальный механизм (Herbig, Sedivy, 2006).

Универсальность данного механизма теломерозависимого старения подтвердилась на модели дрожжей. В норме их теломеры не укорачиваются, так как клетки дрожжей имеют активный фермент теломеразу. Однако его выключение приводит к ускоренному репликативному старению. Как оказалось, ферменты **Tel1p** и **Mec1p** (гомологи АТМ и АТР человека) также участвуют в поддержании целостности теломер. **Mec1p** выступает в роли сенсора теломерных нарушений. Он связывается со структурно измененными теломерами, которые образуются в позднюю **S**-фазу или в результате дефектов метаболизма теломер (при делеции гена каталитической субъединицы теломеразы *est2* или гена репарационного белка *yKu70*). **Tel1p** и **Mec1p** взаимозависимо удерживаются на теломерах в течение всего клеточного цикла. В ответ на повреждение теломерной ДНК **Mec1p** передает сигнал через **Chk1** и (или) **Rad53/Dun1**, активируя проверочную точку клеточного цикла и транскрипцию ферментов репарации. Киназа **Tel1p** при повреждении ДНК также подает сигнал на репарационный путь **Rad53/Dun1** (Shay, Wright, 2004). Таким образом, связанные с теломерами биохимические пути являются эволюционно консервативными. Эти пути продемонстрировали также роль **Ku70** — фермента репарации двухцепочечных разрывов ДНК в поддержании теломер.

Исследования мышей с подавленной функцией репарационного белка **Ku86** и ДНК-зависимой протеинкиназы (**DNA-PK**) показало, что эти белки также важны для защиты теломер. Отмена функции любого из них имеет результатом слияние хромосом. Кроме того, мутация в гене фермента **DNA-PK** приводит к ускоренному укорочению теломер с возрастом. Каков механизм их участия в поддержании теломер? **DNA-PK** кооперируется с теломеразой, участвуя в поддержании длины теломер, тогда как **Ku86** является негативным регулятором теломеразы. **Ku86** и **DNA-PK** также принимают участие в распознавании и процессинге критически укороченных теломер в качестве поврежденной ДНК (Espel et al., 2004; Blasco, 2005).

Теломеры содержат нуклеосомы, что предполагает подверженность модификациям их гистонов — ацетилированию, метилированию и фосфорилированию, изменяющим структуру хроматина. Как правило, конститутивный гетерохроматин является транскрипционно неактивным («молчащим») и характеризуется гиперметилованием ДНК, гипоацетилированием гистонов, гиперметилованием гистонов **H3** и **H4**. Теломеры представляют собой часть конститутивного гетерохроматина клетки. Модельные объекты — дрожжи и мухи с дефектной активностью генов, модифицирующих состояние хроматина, характеризуются в частности, ненормальной регуляцией длины и функции теломер. Триметилирование гистона **H3-K9** гистоновыми метилтрансферазами **Suv39h** является маркером гетерохроматина, создавая участок связывания главного гетерохроматинового белка **1 (HP1)**. Мутация **HP1** у дрозофил приводит к дефекту покрова теломер и к увеличению частоты их рекомбинации. Все это свидетельствует в пользу эпигенетического регулирования функции теломер. У мышей теломеры также обогащены триметилированным **H3-K9** и **HP1**. У данного объекта активность метилтрансфераз **Suv39h1** и **Suv39h2** необходима для поддержания как триметилирования **H3-K9**, так и связывания **HP** на теломерах. В результате мыши с двойной делецией **Suv39h1** и **Suv39h2** несут атипично удлиненные теломеры. Потеря гетерохроматинизации теломер не только играет роль в поддержании длины теломер, но и изменяет экспрессию близлежащих (прителомерных) генов — это так называемый «позиционный эффект теломер». Кроме того, эпигенетические модификации могут также регулировать связывание с теломерами белков **TRF1** и **TRF2**, защищающих их от распознавания в качестве поврежденной ДНК. Действительно, у мутантов **Suv39h** наблюдали увеличение связывания **TRF1** на единицу **TAGGG**-повторов (Blasco, 2005).

Укорочение теломер с возрастом, являющееся следствием неспособности отстающей цепи закончить репликацию концов ли-

нейных хромосом — это так называемая проблема концевой недорепликации, предсказанная А. М. Оловниковым (1971). На модели дрожжей было показано, что концевая недорепликация приводит к потере 4—6 оснований за клеточное деление. В культуре фибробластов человека скорость укорочения составляет 48 ± 21 пар оснований за удвоение клеточной популяции. Исследования *in vivo* на лимфоцитах выявили укорочение на 33 пары оснований в год (Xu, Yang, 2003).

В культуре неопухолевых клеток человека клетки вступают в репликативное старение (фазу смертности 1, M1), когда по крайней мере несколько теломер достигают критического укорочения (Shay, Wright, 2005). Иногда в таких клетках наблюдается слияние теломер (Herbig, Sedivy, 2006). Репликативное старение в культуре может быть преодолено инактивацией белков p53 и ретинобластомы (Rb), что приводит к некоторому увеличению продолжительности жизни клеток перед достижением фазы кризиса (M2), когда большинство клеток подвергается апоптозу из-за большого количества накопленных повреждений ДНК (Chai et al., 2005; Shay, Wright, 2005). Изредка в клетках на стадии M2 теломераза реактивируется, что приводит к неконтролируемой пролиферации. Такая иммортализация является лимитирующим шагом в канцерогенезе (Shay, Wright, 2005). Существует и обратная взаимосвязь между длиной теломер, функциями регуляторов клеточного цикла и старением — отсутствие членов Rb-семейства p107 и p130 вызывает удлинение теломер (Blasco, 2005). Таким образом, очевидно, что репликативное старение регулируется длиной теломер. Однако как это осуществляется? Дисфункция теломер может быть результатом изменений, стимулирующих постепенную или быструю потерю последовательностей теломер, или уже упоминавшихся изменений в теломера-ассоциированных белках, покрывающих теломеры (Bailey, Murnane, 2006).

Первая гипотеза возникла на основе наблюдения, согласно которому G-богатый 3'-выступ теломер разрушается при старении. Было высказано предположение о том, что потеря этой последовательности является молекулярным сигналом, запускающим старение. Однако не ясно, является ли потеря выступа первичным событием, или же это вторичное следствие укорочения теломер, дающее сигнал о повреждении ДНК. Этот сигнал может индуцировать события процессинга теломерного конца, приводящие к укорочению выступа (Chai et al., 2005).

Согласно второй гипотезе, индукция происходит вследствие инициированного слишком короткими теломерами нарушения белкового покрова теломерных концов. Действительно, эктопическая экспрессия доминантно-негативной формы белка TRF2, связы-

вающегося с теломерой, индуцирует быструю потерю 3'-выступа, объединение концов хромосом, остановку клеточного роста даже без потери двухцепочечной теломерной ДНК. Обнаружено, что исчезновение выступа в клетках с нефункциональным TRF2 является следствием разрезания выступа по D-петле эндонуклеазой ERCC1/XPF, а не разрушения самого одноцепочечного выступа. Кроме того, нормальные фибробласты человека способны сохранять одноцепочечные теломерные выступы при старении (Chai et al., 2005). Следовательно, не потеря одноцепочечного выступа, а утрата покрывающих белков (например, TRF2) может вести к клеточному старению. Каким образом это происходит? Укорочение теломер индуцирует сигнал о двухцепочечном разрыве ДНК, который стимулирует р53-зависимую необратимую задержку клеточного цикла или апоптоз (Gire et al., 2004; Franco et al., 2005).

Наконец, третьим возможным механизмом репликативного старения является потеря с возрастом сайленсинга (подавления активности) прителомерных генов. Уже упоминавшийся «позиционный эффект теломер», или теломерный сайленсинг, наиболее детально изучен у дрожжей. У *Saccharomyces cerevisiae* белок Rap1p взаимодействует с теломерными повторами и вместе с белками репарации и рекомбинации yKu70p и yKu80p, связывающимися с хромосомными концевыми участками, привлекает белковый комплекс сайленсинга (Mason et al., 2004). У дрожжей теломеры служат хранилищем факторов сайленсинга (Sir2/3/4), которые изменяют конформацию хроматина и активность генов, в зависимости от расстояния данных генов от теломеры и от длины самой теломеры. Кроме того, вероятно, что эти белки способствуют минимизации возможности рекомбинации между теломерными повторами. Интересно отметить, что укорочение теломер и старение клеток дрожжей (в отличие от клеток млекопитающих) увеличивает репликативную длительность жизни, так как ведет к перераспределению деацетилазы Sir2 (см. разд. 3.3) с теломер в ядрышко, содержащее 140 тандемных копий рибосомальной ДНК на хромосоме XII, что повышает общую стабильность ДНК (Guarente, Ruvkun, 1998; Bitterman et al., 2003; Pedram et al., 2006).

Изменение транскрипции генов в стареющей клетке млекопитающих также может отчасти быть вызвано перераспределением факторов подавления экспрессии с укорачивающихся теломер в другие области (Bitterman et al., 2003). Действительно, позиционный эффект теломер в клетках млекопитающих прямо пропорционален длине теломер (Baur et al., 2001). Трансгенные копии маркерных генов, внедренных в прителомерные области, экспрессируются на очень низком уровне по сравнению с такими же генами,

но встроенными в другие участки. Причем спустя некоторое время происходит полное подавление экспрессии за счет метилирования ДНК (Pedram et al., 2006). Транскрипция субтеломерных генов может регулироваться длиной *TTAGGG*-последовательности, содержанием и численностью субтеломерных участков, а также благодаря наличию специфических последовательностей, необходимых для локального сайленсинга, или путем предоставления длинных гомологичных участков, на которых происходит формирование гетерохроматина (Riethman et al., 2004). Потеря эффекта положения в результате укорочения теломер представляется одной из вероятных причин постепенного изменения профиля генной экспрессии при увеличении репликативного возраста клетки. Теломерный эффект положения может также играть роль в наследственных заболеваниях человека в результате перемещения активных генов к теломерам или к субтеломерным последовательностям при хромосомных перестройках, например у индивидуумов с кольцевыми хромосомами (Pedram et al., 2006).

Субтеломерные структуры млекопитающих состоят из субтеломерных повторов, сегментных дупликаций, сателлитных последовательностей и внутренних *TTAGGG*-подобных последовательностей. Кроме того, для каждой субтеломерной структуры человека описаны транскрипты, в общей сложности их 941, из них 15 % — это возможные псевдогены (нефункционирующие гены). Субтеломерные гены по нуклеотидной последовательности имеют сходство с генами тяжелых цепей иммуноглобулинов, обонятельных рецепторов, генов белков типа «цинковых пальцев», F-box-белков (Riethman et al., 2004). Была проанализирована экспрессия 34 субтеломерных генов в молодых и старых фибробластах человека. Показано, что сама по себе длина теломер не определяет уровень экспрессии таких генов. Однако эпигенетическое изменение локальной структуры теломерного гетерохроматина может оказывать влияние на экспрессию. Выявлено, что повышенная экспрессия прителомерных генов *MGC3101* и *CPNE7* запускалась клеточным старением, тогда как экспрессия *GAS11* (гена фактора задержки роста клетки) и *CDK10* (гена киназы, родственной *CDC2* и регулирующей G₂/M-фазу клеточного цикла) увеличивается как в стареющих, так и в покоящихся клетках, т. е. она индуцируется задержкой клеточного цикла (Ning et al., 2003). В другом эксперименте, изменения активности известных субтеломерных генов (генов обонятельного рецептора, рецептора IL9 и *RABL2B*) при старении не отмечалось. Не было выявлено диспропорции между возрастзависимой сверхактивацией субтеломерных генов и генов из других участков хромосом (Zhang H. et al., 2003). Таким образом, роль потери сайленсинга прителомерными генами при глобальном

изменении паттерна экспрессии в стареющей клетке остается под вопросом.

Однако есть еще один путь участия процесса укорочения теломер в клеточном старении. Утрата функции теломер является важнейшим механизмом хромосомной нестабильности. Она приводит к соединению сестринских хроматид и активации цикла фрагмент/соединение/мост, приводящего к масштабной амплификации ДНК или большим концевым делециям. Путем транслокаций данная нестабильность мигрирует с одной хромосомы на другую (Bailey, Murnane, 2006). Помимо репликативного старения это может благоприятствовать опухолевому перерождению клетки.

Оксидативный стресс также может индуцировать или ускорять репликативное старение (так называемое стресс-индуцируемое преждевременное старение) по механизму образования одноцепочечных разрывов в теломерной ДНК (Kurcz, 2004).

Следует иметь в виду, что за остановку репликации ответственные не одна-две короткие теломеры, а целый набор из нескольких таких теломер (около 10 % общего их количества) (Zou et al., 2004). Наиболее короткие теломеры обнаруживаются при старении в местах скопления белков-маркеров двухцепочечных разрывов — γ -H2AX/53BP1 (Chai et al., 2005), что позволяет видеть стареющие клетки под микроскопом.

Индивидуальная длина теломер различных хромосом в одной и той же клетке очень гетерогенна (Zou et al., 2004). Как и предполагал А. М. Оловников (1971), после репликации родительская и дочерняя цепи ДНК имеют разную длину. Причины этого явления — не только недорепликация конца отстающей цепи ДНК, но и пострепликативный процессинг теломеры. В зависимости от того, какая цепь используется в качестве матрицы, дочерние клетки наследуют теломеры разной длины, что приводит к варьированию размеров в пределах нескольких килобаз после 50 удвоений популяции клеток в культуре, причем даже для потомков одной теломеры определенной длины. Дополнительный фактор, вносящий вклад в вариабельность размеров, — оксидативное повреждение, стохастически действующее на теломеры и ускоряющее их укорочение (Zou et al., 2004).

Таким образом, средняя длина теломер варьирует между клетками одной и той же ткани, отражая различия в репликативной истории (степень клональной экспансии). В большей мере это касается разных индивидуумов одного возраста. В то же время исследования лейкоцитов периферической крови у близнецов выявили, что на 78 % индивидуальная гетерогенность наследственно детерминирована. Мужской пол, курение и высокое кровяное давление коррелируют с более короткими теломерами наравне с ранним

возникновением инфаркта миокарда, каротидного атеросклероза и коронарных болезней (Kurz, 2004). Несмотря на то что длина теломер флуктуирует, существует определенная минимальная (критическая) длина, необходимая для их нормального функционирования (LeBel, Wellinger, 2005).

Половые и стволовые клетки избегают проблемы критического укорочения теломер благодаря наличию активного фермента теломеразы. Этот фермент добавляет **TTAGGG-повторы** к концам хромосом. Он состоит из двух компонентов, кодируемых разными генами — геном обратной транскриптазы (**telomerase reverse transcriptase — Tert**) и геном РНК-компонента (**telomerase RNA component — Terc**), являющегося матрицей для синтеза новых теломерных повторов (Blasco, 2005). Теломераза использует 3'-конец G-хвоста (одноцепочечного теломерного выступа) в качестве праймера для добавления G-повторов в соответствии со своей РНК-матрицей. С-богатая цепочка теломеры достраивается репликативным аппаратом клетки по принципу комплементарности. Синтез теломерных повторов происходит в поздней S-фазе клеточного цикла (LeBel, Wellinger, 2005).

В то же время большинство нормальных соматических клеток человека имеет предельно низкий уровень теломеразной активности и подвергается изнашиванию теломер с каждым клеточным делением (Blasco, 2005). После рождения существенная активность теломеразы отмечается лишь в герминативных клетках, в некоторых соматических стволовых клетках (таких как гематопоэтический росток и стволовые клетки эпидермиса), в клетках-предшественницах и в пролиферирующих лимфоцитах (Kurz, 2004; Sharpless, DePinho, 2007). Лимитирующим компонентом теломеразной активности является обратная транскриптаза **hTERT**, тогда как **hTERC** присутствует и в теломераза-негативных клетках. Дело в том, что транскрипция **hTERT** в нормальных клетках человека подавлена репрессором, расположенным на 3-й хромосоме и расщепляющим мРНК **hTERT** во втором интроне (Szutorisz et al., 2003). Теломеразная активность в соматических клетках регулируется несколькими путями: транскрипционной регуляцией каталитической субъединицы **hTERT**, посттранскрипционным ее фосфорилированием протеинкиназой **Akt**, активным транспортом **hTERT** к теломерам и от них (Kurz, 2004).

Как и следовало ожидать, реактивация теломеразы предотвращает критическое укорочение теломер и увеличивает выживаемость как клеток в культуре, так и клеток теломераза-дефицитных мышей *in vivo* (Bodnar et al., 1998; Vaziri, Benchimol, 1998; Blasco, 2005). Сверхактивация каталитической субъединицы человеческой теломеразы (**hTERT**) может приводить к иммортализации

некоторых типов соматических клеток: фибробластов на стадии предстарения, пигментированных эпителиальных клеток ретины, клеток сосудистого эндотелия, мезотелиальных клеток. Однако ее реактивация не является достаточным фактором для иммортализации других клеток — фибробластов молочной железы, эпителиальных клеток человека, миобластов и меланоцитов, кератиноцитов, уротелиальных клеток мочевого пузыря, клеток эпителия простаты (Rheinwald et al., 2002; Hardy et al., 2005).

Теломераза предотвращает критическое укорочение теломер более чем в 90 % злокачественных опухолей человека. Некоторые клеточные линии и опухоли, потерявшие теломеразную активность, все еще способны поддерживать или удлинять теломеры благодаря альтернативным механизмам, основанным на рекомбинации. Клетки, индуцировавшие альтернативное удлинение теломер (ALT), характеризуются одновременным присутствием коротких и длинных теломер в одном и том же ядре, а также наличием ALT-ассоциированных PML-телец. Каков механизм ALT? По крайней мере у дрожжей ALT опосредовано гомологичной репарацией и репарацией ошибочно спаренных оснований. У млекопитающих ключевую роль в ALT играет фермент гомологичной репарации Rad54. Делеция его гена приводит к существенной потере теломерной последовательности и высокой частоте соединения концов хромосом. Фактор генетической рекомбинации Rad51D также необходим для поддержания длины теломер и их покрова. Наконец, активность уже известных нам (см. выше) факторов гетерохроматинизации играет важную роль в механизме ALT (Kurz, 2004; Blasco, 2005).

Насколько консервативно функционирование теломер у эукариотов? Дрожжевые клетки дикого типа постоянно экспрессируют теломеразу, и их теломеры не укорачиваются при репликации. Тем не менее делеция генов теломеразы дрожжей (*est2* или *tlc1*, кодирующих каталитическую субъединицу и РНК-матрицу соответственно) приводит к укорочению теломер и репликативному старению: популяция клеток перестает делиться, когда теломеры достигают критической величины, что распознается клеткой как двухцепочечный разрыв ДНК (Bitterman et al., 2003). Наступает перманентная G₂/M-задержка клеточного цикла. Изредка такие мутантные клетки избегают старения, используя RAD52-зависимый рекомбинационный механизм поддержания теломер (Azam et al., 2006).

В результате налицо гомология ключевых аспектов биохимии теломер от дрожжей до млекопитающих. Как оказалось, *Saccharomyces cerevisiae* обладают геном супрессора роста Sgs1p, гомологом гена синдрома преждевременного старения Вернера (*WRN*).

Мутация *Sgs1p* в клетках с выключенной теломеразой вызывает ускоренное старение, напоминающее фенотип клеток синдрома Вернера. При этом нарушается процесс восстановления теломерной ДНК, основанный на рекомбинации (Bitterman et al., 2003). Каким образом RecQ 3'-5'-ДНК-геликазы, к которым относятся *Sgs1p* дрожжей, а также белки синдромов Вернера (WRN), Блума (BLM) и Ротмунда—Томсона (RTS) у человека, принимают участие в биологии теломер? *Sgs1p* вовлечен в *rad52*-зависимый рекомбинационный механизм поддержания теломер. Экспрессия *Sgs1p* замедляет старение у мутантов по теломеразе дрожжей *tlc1*. В данном эффекте ключевая роль принадлежит доменам *Sgs1p*, ответственным за гомологическую рекомбинацию (геликазный домен и участок взаимодействия с топоизомеразой III). Для сравнения хотелось бы отметить, что общая геномная нестабильность, вызванная мутациями генов дрожжей *mus81*, *srs2*, *rrm3*, *slx1* и *top1*, не ускоряет старения мутантов *tlc1*. Аналогично WRN и BLM млекопитающих взаимодействуют с белком теломерного хроматина TRF2, участвующим в формировании защитных Т-петель. Сверхэкспрессия гена *BLM* удлиняет теломеры путем рекомбинации, а одновременное наличие у мышей мутаций гена теломеразы (*Terc*) и генов *Wtn* или *Blm* ускоряет дисфункцию теломер (Azam et al., 2006). Напротив, выключение только гена *Wtn* не приводит к выраженной дисфункции, благодаря тому что у мышей длинные теломеры и относительно высокая теломеразная активность (Du et al., 2004). Таким образом, аналогия между репликативным старением дрожжей и частичной прогерией Вернера у человека может свидетельствовать об общности механизмов, основанных на геликазазависимом поддержании функции теломер или, по крайней мере, на нестабильности генома в целом.

Скорее исключением, чем правилом являются хромосомные концы у дрозофил. Они устроены иначе, чем у дрожжей, простейших, нематод и млекопитающих. Для удлинения хромосом дрозофила использует три вида ретротранспозонов (мобильных генетических элементов) с недлинными концевыми повторами: *HeT-A*, *TART* и *TAHRE*. Длина и состав массивов из этих ретротранспозонов может значительно варьировать как между разными теломерами, так и между линиями мух. Рядом с набором концевых ретротранспозонов на теломерах дрозофил находится несколько килобаз сложных сателлитов, носящих название «теломера-ассоциированные последовательности» (*TAS*), которые структурно подобны аналогичным последовательностям других эукариотов. Несмотря на то что дрозофила не обладает набором простых повторов, связывающих такие белки, как Rap1p, она имеет общие с другими организмами свойства теломерных последовательностей, в частности

теломерный эффект положения. В данном явлении, по-видимому, ключевую роль играют *TAS* (Mason et al., 2004; Walter et al., 2006).

Кратко подытожим данные, свидетельствующие в пользу роли укорочения теломер в обеспечении лимита Хейфлика — репликативного старения клеток (Weinstein, Ciszek, 2002).

1. Длина теломер уменьшается с возрастом клеточной линии *in vitro*.

2. Большинство иммортальных линий клеток теряет лимит Хейфлика, при этом они реактивируют фермент теломеразу, достраивающую теломеры.

3. Соматические ткани пациентов с синдромами преждевременного старения имеют пониженную репликативную способность *in vitro*. Больные синдромом Хатчинсона—Джилфорда имеют более короткие теломеры уже при рождении, у больных синдромом Вернера происходит быстрая эрозия изначально нормальных теломер, причем данная эрозия может быть предотвращена *in vitro* активацией теломеразы.

Тем не менее лишь у человека удалось идентифицировать поврежденные теломеры в стареющих (накапливающих старение-ассоциированную β -галактозидазу) клетках *in vivo* (Martin, Buckwalter, 2001; Chai et al., 2005). По-видимому, это связано с тем, что теломеры человека гораздо короче, чем, например, у мышей, и в большинстве соматических клеток людей активность теломеразы репрессирована. У многих модельных объектов (дрожжей, мышей) теломера-ассоциированное репликативное старение удается обнаружить лишь в случае вмешательств, приводящих к выключению механизмов, достраивающих теломеры. Этот факт, а также ряд других спорных моментов теломерной гипотезы старения вынудили А. М. Оловникова отказаться от ее дальнейшего использования. В настоящий момент он развивает новую «редумерную» концепцию. Где помещаются в клетке эти предполагаемые структуры? Редумеры в комплексе с белками образуют частицы «редусомы», расположенные вдоль соответствующих хромосом. Оловников постулировал, что за процесс старения может отвечать идущее одновременно с укорочением теломер убывание длины редумер, что потенциально способно генерировать сигнал старения благодаря снижению числа генов, теряемых на конце редумеры. Таким образом, согласно Оловникову, именно редусомы, а не теломеры являются «молекулярными часами» процесса старения (Оловников, 2005).

Подводя итоги, следует отметить, что, согласно имеющимся экспериментальным данным, концевые участки линейных хромосом эукариотов (теломеры) при отсутствии фермента теломеразы и рекомбинантных механизмов восстановления их длины укора-

чиваются с каждой репликацией ДНК. В результате концы хромосом теряют защитные структуры (связанные с ними покровные белки и Т-петлю) и воспринимаются клеткой в качестве нерепарируемых двухцепочечных разрывов, что является сигналом для индукции апоптоза или перманентной остановки деления (репликативного старения), либо служит причиной возникновения нестабильности генома и бласттрансформации. Еще одним возможным механизмом участия возрастзависимого укорочения теломер в старении клетки является разблокирование активности молчащих прителомерных генов. По-видимому, генные сети, которые индуцируются в клетках в ответ на повреждение ДНК, связывают укорочение теломер с лимитом Хейфлика, а также старение на клеточном и на организменном уровнях. Как оказалось, эффекторные механизмы репликативного старения схожи с механизмами так называемого стресс-индуцируемого преждевременного старения клетки, вызываемого оксидативным или генотоксическим стрессами. Рассмотрим эти механизмы.

2.1.3. Гены репликативного и стресс-индуцированного клеточного старения

Поскольку «клеточное старение» характеризуется перманентной остановкой клеточного цикла и соответствующими морфологическими и биохимическими изменениями, то можно предполагать его запрограммированность по аналогии с такими феноменами, как дифференцировка или апоптоз (Balaban et al., 2005). Таким образом, клеточное старение — это генетическая программа необратимой остановки клеточного цикла, блокирующая реакцию клетки на пролиферативные стимулы и факторы роста при наличии нерепарируемых повреждений ДНК (Papazoglu, Mills, 2007).

К клеточному старению способно приводить изменение экспрессии таких генов, как *Ras*, *Raf*, *E2F1*, *MEK*, *p53*, *p16*, *Rb*, и гена теломеразы (Cao et al., 2003). В старении участвуют также киназа *p38* и транскрипционные факторы NF-κB и C/EBP (Hardy et al., 2005). Все они являются регуляторами клеточного цикла или участниками сигнальных каскадов стресс-ответа.

Как известно, прохождение цикла клеточного деления контролируется активностью циклин-зависимых киназ (CDK). В G₁-фазе клеточного цикла CDK4 и CDK6 активируются, связываясь с D-типом циклинов, тогда как индукцию CDK2 запускают циклины E и A. Как комплекс циклин E — CDK2, так и комплекс циклин D — CDK4/6 фосфорилируют белок ретинобластомы (Rb), задача которого — изолировать и инактивировать отдельные белки

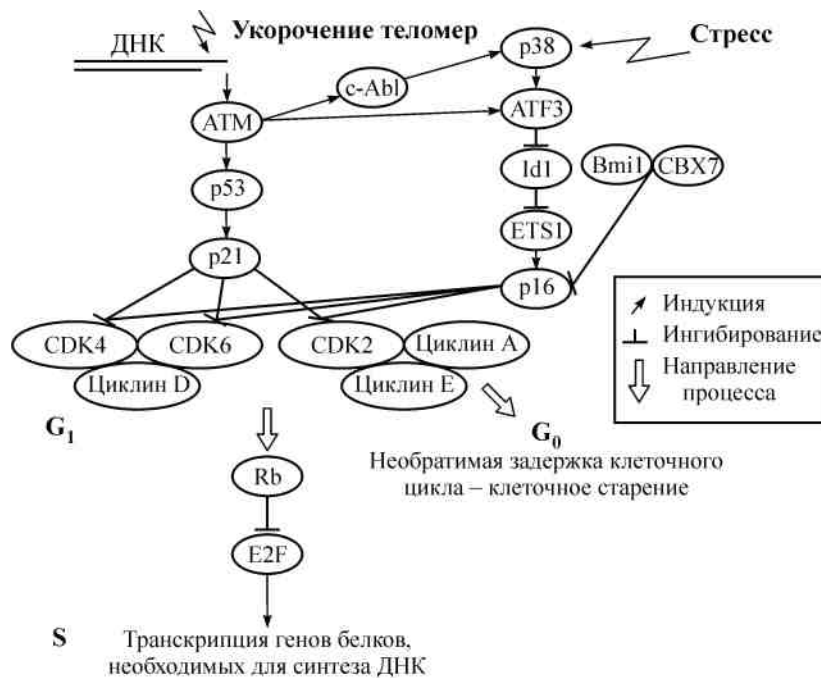


Рис. 1. Механизмы репликативного и стресс-индуцированного клеточного старения.

Здесь и далее, рис. 2—9, 12 и 16, см. условные обозначения, представленные в рамке на этом рисунке.

E2F-семейства транскрипционных факторов. Фосфорилирование Rb высвобождает E2F, что приводит к транскрипции генов, необходимых для вступления в S-фазу клеточного цикла, т. е. в фазу синтеза ДНК (Herbig, Sedivy, 2006).

Для эффективного выведения клетки из клеточного цикла активность CDK должна ингибироваться, что предотвращает фосфорилирование Rb и запуск E2F-зависимой транскрипции генов пролиферации. Такая необходимость может возникнуть, например, при получении ДНК клетки серьезных повреждений, как это бывает при старении. Известно два семейства ингибиторов CDK. Семейство CIP/KIP включает белки p21, p27 и p57. Другое семейство, INK4, состоит из белков p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c} и p19^{INK4d}. Некоторые из этих ингибиторов сверхэкспрессируются в стареющих клетках человека. Наиболее изучены пути активации p21 и p16 (рис. 1). Количество p21 в клетке регулируется на уровне транскрипционной активации и посттранскрипционной стабили-

зации мРНК и белка. Уровень мРНК белка p21 увеличивается под действием транскрипционных факторов Sp1, Sp3, E2F, STAT, AP2 и, наконец, p53, играющих ключевую роль в поддержании стабильности генома (см. разд. 2.2.3). Транскрипционная активация гена p21 в ответ на повреждение ДНК и онкогенные сигналы опосредована преимущественно p53 (Herbig, Sedivy, 2006). Белок p53 совместно со своим позитивным регулятором ARF, активирует терминальный ответ (остановку клеточного деления), который удаляет поврежденные клетки из пролиферативного пула (Matheu et al., 2007).

Каким образом p53-зависимая индукция p21 приводит к клеточному старению? Белок p21 ингибирует ключевые регуляторы клеточного цикла — циклин-зависимые киназы, а также блокирует репликацию ДНК, связываясь с ядерным антигеном пролиферирующих клеток (PCNA). Он также способен индуцировать необратимую остановку роста по p53-независимому пути (Macip et al., 2002). Кодированные локусом *INK4A-ARF* белки p16^{INK4A} и p14^{ARF} (ARF) также представляют собой ключевые регуляторы клеточного старения. Оба этих белка являются супрессорами опухолей, расположенными в иерархии регуляции над p53 и pRB. Уровень p16 увеличивается в ответ на способствующие бласттрансформации гипермутагенные сигналы, такие как свехэкспрессия RAS, киназы MAP или MYC (Herbig, Sedivy, 2006; Bracken et al., 2007). Белок p16^{INK4A} также выступает в роли ингибитора CDK4 и CDK6 при старении клетки (Rheinwald et al., 2002). Как и уровень p21, концентрация p16 не увеличивается постепенно при клеточном старении, а способна быстро возрасть в отдельных клетках, испытывающих оксидативный или генотоксический стресс. Связано ли это с критическим укорочением теломер? По-видимому, повреждение теломерной ДНК лишь создает перmissive условия для увеличения уровня p16, не являясь необходимым условием (Herbig, Sedivy, 2006). Тем не менее оба пути клеточного старения (p21 и p16) объединяются на pRB, останавливая репликацию ДНК и деление клетки (Patil et al., 2005).

Как уже упоминалось в предыдущем разделе, у мышей нет репликативного (p21-зависимого) старения. Поэтому p16 является главным геном клеточного старения у мышей. Экспрессия p16^{INK4A} и ARF существенно увеличивается с возрастом практически во всех тканях грызунов, при этом заметного изменения экспрессии других родственных ингибиторов клеточного цикла не происходит. Экспрессия *Bla/Arf* не только тесно связана с клеточным старением и нарушением пролиферации, но и коррелирует с экспрессией другого маркера клеточного старения — старение-ассоциированной β-галактозидазы (Krishnamurthy et al., 2004).

Одним из регуляторов гена клеточного старения *p16* является группа белков **Polycomb** и взаимодействующая с ними группа белков **Trithorax** (рис. 1). Они формируют комплексы, подавляющие и активирующие генную экспрессию путем перестройки хроматина и модификации гистонов в промоторной области генов (**Her-big, Sedivy, 2006**). Первый комплекс, **Bmi1**-содержащий **Polycomb**-репрессирующий комплекс **1 (PRC1)**, существует во многих вариантах. Он также содержит белки **CBX (CBX2, CBX4, CBX6, CBX7 и CBX8)**, **RNC1-3, RNF1-2 и SCML1-2**. Второй (**Trithorax**) комплекс — **PRC2** содержит метилтрансферазу гистонов **EZH2**, которая совместно с белками **EED** и **SUZ12** триметилирует гистон **H3** по лизину **27** (с образованием гетерохроматиновой метки **H3K27me3**). Оба комплекса взаимодействуют между собой: способность **PRC1** регулировать состояние хроматина зависит от функции **PRC2**, поскольку **PRC1** подавляет экспрессию гена, связываясь только с **H3K27me3**-меткой (**Bracken et al., 2007**).

Каким образом эти регуляторы структуры хроматина контролируют экспрессию гена клеточного старения *p16*? Дело в том, что **Bmi1** вместе с другими белками группы **Polycomb**, связываясь с **H3K27me3**-меткой, блокирует локус **Ink4a/Arf**. Подавление зависит от функции **EZH2**-содержащего **PRC2**-комплекса, генерирующего метку. В то же время, уровень белка **EZH2** снижается в подверженных стрессу или старению клетках. Это снижение приводит к потере **H3K27me3**, вытеснению **Bmi1** и активации транскрипции *p16*, а в результате — к клеточному старению (**Bracken et al., 2007**).

По-видимому, раскрытие определенных хроматиновых доменов (переход из гетеро- в эухроматин) с последующей активацией кластеров старение-ассоциированных генов может быть одной из основных причин клеточного старения. Несмотря на то что изменение экспрессии при старении существенно отличается в фибробластах и клетках эпителия, можно выделить физические кластеры сверхактивации в определенных участках хромосом. Так, выше уже упоминался локус **Ink4a/Arf**. Еще одно подтверждение состоит в том, что ингибиторы гистоновых деацетилаз (конденсирующих хроматин) индуцируют в человеческих фибробластах состояние клеточного старения. Деацетилаза гистонов **SIRT1**, напротив, приводит к гетерохроматинизации и, таким образом, противостоит **PML-p53**-индуцированному старению (см. разд. 3.3) (**Zhang H. et al., 2003**).

Стареющие ткани характеризуются состоянием хронического стресса даже при отсутствии внешних стрессоров. Это проявляется в увеличении уровня активности генов стресс-ответа, например генов острой фазы ответа, через индукцию контролируемых

их транскрипционных факторов (С/ЕВР α и С/ЕВРР). Кроме того, происходит повышение базального уровня р38 митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК) и SAPK/JNK стресс-сигналинга. Какова причина их активации в ответ на стресс? Дело в том, что в свободной от стресса клетке восстановленная форма тиоредоксина (Trx) взаимодействует с N-концевой частью апоптоз-стимулирующей киназы 1 (ASK1), ингибируя активность этой серинтреониновой киназы МККК-семейства. Окисление Trx, например активными формами кислорода, нарушает комплекс, приводя к активации ASK1. Далее уже следует активация стресс-ответов р38 МАРК и SAPK/JNK (Hsieh, Papaconstantinou, 2006). Белок р38 — стресс-индуцируемая изоформа МАРК. МАРК р38 вносит свой вклад в начало старения, индуцируемого укорочением теломер, оксидативным стрессом, культуральным шоком или активацией RAS/RAF-сигналинга (Naka et al., 2004). В результате активации р38 МАР-киназного пути, в частности р38-активирующих киназ МКК3 и МКК6, уровень экспрессии *pi 6* повышается (рис. 1). Механизм выглядит следующим образом: стресс-индуцированный р38-сигналинг приводит к экспрессии белка ATF3, репрессора транскрипции гена *Id1*. Поскольку белок *Id1* подавляет транскрипционные факторы ETS1 и ETS2, ETS-зависимая транскрипция гена *p16* возрастает (Herbig, Sedivy, 2006). Сигналинг МАР-киназного пути может инициироваться факторами роста или другими митогенами, которые активируют ERK-каскад фосфорилирования, либо цитокинами и стресс-сигналами, активирующими р38- и JNK-каскады. Некоторые белки ERK-пути (RAS, RAF, MEK) способны увеличивать количество белка р16 в клетке. Дело в том, что их нижележащими мишенями являются те же транскрипционные факторы ETS1 и ETS2. Однако делают ли они это при клеточном старении? Известно, что уровень белка ETS1 с возрастом клетки увеличивается, а его негативного регулятора *Id1* — уменьшается. Однако активность MEK с возрастом, напротив, снижается. Таким образом, RAS/RAF/MEK-механизм может и не отвечать за увеличение уровня р16 при клеточном старении (Herbig, Sedivy, 2006).

Первичные культуры кератиноцитов человека перестают стареть при подавлении активности гена *14-3-3a*, участвующего в экстраклеточном сигналинге и стресс-ответе. Его выключение сопровождается существенным снижением количества белка р16 и реактивацией теломеразной активности. Восстановление функции *14-3-3a* приводит к повышению уровня р16 и к репликативному старению. В других тканях данный механизм отмечен не был (Herbig, Sedivy, 2006).

Протеинкиназа ATM (ataxia-telangiectasia-mutated) — ключевой белок, отвечающий за распознавание поврежденной ДНК.

В частности, именно он передает сигнал об укороченных теломерах на p53 (рис. 1). Играет ли АТМ роль в другом, стресс-индуцированном, типе старении клетки? При наличии разрыва цепочки ДНК АТМ вызывает активацию белка АТФ3, участвующего в МАРК p38-сигналинге, контролирующем p16. Кроме того, АТМ может выступать триггером стресс-активируемого МАРК-сигналинга путем активации ядерной тирозинкиназы c-Abl. Тем не менее индукция стресс-индуцированного старения в клетках с мутацией АТМ, сверхэкспрессирующих TERT (т. е. лишенных другого типа старения — репликативного), не отличается от таковой в нормальных фибробластах, что предполагает существование АТМ-независимого пути SIPS (Naka et al., 2004).

Таким образом, увеличение уровня белка p16 в стареющих клетках является результатом комбинации различных сигнальных каскадов, активирующихся под действием стресс-ответа (через p38 МАРК и ERK, а также 14-3-3σ) или вследствие возраст-зависимого изменения структуры или целостности ДНК (через Bmi1/EZH2 и АТМ).

Важная роль в клеточном старении принадлежит также промиелоцитарному белку лейкемии (PML). Белок PML является компонентом структур, известных под названием «ядерные тельца» и связанных с процессами старения, апоптоза и дифференцировки клеток. В ответ на старение-индуцирующие стимулы размер и число PML ядерных телец в клеточных культурах значительно возрастает (Keyes et al., 2005). PML имеет отношение к p53-индуцированному старению (Zhang H. et al., 2003). Кроме того, клеточное старение в культуре клеток может вызываться подавлением методом интерференции РНК активности транскрипционного фактора FOXO3a, что проявляется в изменении клеточной морфологии, увеличении времени удвоения популяции, накоплении активных форм кислорода, окрашивании на β-галактозидазу и активации p53/p21-механизма (Kim et al., 2005).

Возрастзависимое стресс-индуцированное изменение активности транскрипционных факторов и степени гетерохроматинизации участков хромосом приводит к изменению экспрессии генов. Среди тех генов, экспрессия которых меняется как в стареющих, так и в деиммортиализованных клетках (модель синхронного старения клеточной культуры), можно выделить DUSP1, RGS3, NRAA3, GAS6, PLOD2, ген неприлизина (MME), IGFBP4, а также FOXM1, ген ядерного нуклеопротеина A1 (HNRPA1), HMG17L1, CDC25B, CENPF, гены регулятора цитокинеза (PRC1) и убиквитин-конъюгирующего фермента 2C (UBE2C). К генам, изменяющим экспрессию только в стареющих клетках, относятся гены металлопротеинов, коллагена 6A3 (COL6A3), усилителя коллагеновой про-

теиназы (*COLCE*), остеобласт-специфичного фактора 2 (*OSF2*), и ген *MGP*. Изучение экспрессии подтвердило такие свойства клеточного старения, как активация p53-механизма и участие членов семейства Rb и инактивации ERK в репрессии генов синтеза ДНК, в цитокинезе и в других аспектах пролиферации. Выявлено наличие отрицательной обратной связи, которая не только стабилизирует экспрессию генов при старении, но и компенсирует сверхэкспрессию других генов (Hardy et al., 2005). Таким образом, изменение экспрессии генов в стареющей клетке является компенсаторной реакцией в ответ на хронический стресс.

В то же время стареющие фибробласты демонстрируют дерегуляцию различных клеточных процессов, таких как воспалительный ответ, митоз, клеточная адгезия, транспорт, трансдукция сигнала, метаболизм. Технология экспрессионных ДНК-чипов выявила 84 гена, которые в молодых и старых фибробластах отличаются по экспрессии более чем 2-кратно. Чрезвычайно активны в старых клетках гены IGF-связывающих белков 3 и 5 и *Groα*, которые регулируют рост клетки. Увеличение активности генов *CD36* и *DPP4* можно приписать дерегуляции метаболизма жирных кислот и ухудшению метаболизма глюкозы, потере чувствительности к инсулину. Гены, обеспечивающие клеточный цикл, митоз и цитокинез, такие как *GOS2*, *CENP-F* (ген белка центромера-кинетохорного комплекса в митозе) и *KIF4A* (участвует в стабилизации веретена деления), снижают свою экспрессию в постаревших клетках, так же как гены адгезии и внеклеточного матрикса — *EPB41L3/Dal-1*, *OSF2*, *ISLR*, гены нейротримина и дерматопонтинина (Yoon et al., 2004). В другом эксперименте сравнение протеомов молодых и подвергшихся репликативному старению эмбриональных фибробластов человека выявило 13 белков, изменяющих свою экспрессию. Часть из них является компонентами цитоскелета, участвует в метаболизме и выработке энергии, Ca^{2+} -сигналинге, ядерно-цитоплазматическом транспорте и регуляции активности теломер (Trogakos et al., 2006).

Стареющие клетки характеризуются определенными (перечисленными в разд. 2.1.1) морфологическими изменениями. Какие молекулярные механизмы лежат в основе этих изменений? В процессе старения сверхактивируются такие белки цитоскелета, как •-актин, тубулин и виментин, в то же время снижается экспрессия кератина. Кроме того, меняется физиология клетки — ее энергетический статус. При старении активируются цитоплазматические гликолитические ферменты α-енолаза и креатинкиназа, отвечающие за распределение энергии в тканях с высоким энергопотреблением, снижается экспрессия одной из цепей фермента анаэробного гликолиза L-лактатдегидрогеназы. Наблюдаемая

с возрастом сверхактивация аннексина I, способствующего распознаванию и перевариванию апоптозной клетки фагоцитами, может служить для удаления постепенно накапливающихся стареющих клеток. Снижение ядерно-цитоплазматического транспорта при старении клетки обусловлено такими изменениями, как подавление экспрессии активирующего белка RAN-специфической ГТФазы. Репрессия молекулярного шаперона p23, участвующего в формировании теломеразного комплекса, может служить дополнительной противоопухолевой защитой (Toungakos et al., 2006).

Индукцированная активностью p16 остановка клеточного цикла (стресс-индуцированное старение) не связана с центрами сосредоточения укороченных теломер в культуре клеток (Shay, Wright, 2004). Кроме того, сверхэкспрессия *hTERT* не отменяет SIPS (Naka et al., 2004; Pascal et al., 2005). Таким образом, укорочение теломер не ведет к стресс-индуцированному старению. Тем не менее репликативная и стресс-индуцированная формы старения все же пересекаются (рис. 1) (Pelicci, 2004). Об этом свидетельствует и сходство экспрессируемых генов при обоих типах клеточного старения. Наблюдается сходная экспрессия генов задержки роста (*PTEN*, *IGFBP-3*, *LRP-1* и *CAVI*), морфогенеза старения (*TGFβ1* и *LOXL2*) и метаболизма железа (*TFR* и *FTL*). Одинаково сверхэкспрессируются гены аполипопротеина J (*apoJ*), фибронектина, остеоонектина, трансформирующего фактора роста β1 (*TGFβ1*) и кавеолина 1. Среди них *Apo J* обладает внеклеточной шапероноподобной активностью. Фибронектин является важным компонентом внеклеточного матрикса и может быть ответственным за морфологические изменения в стареющих фибробластах. Остеонектин — кальций-связывающий белок, ингибирующий вступление клетки в S-фазу через избирательное связывание фактора роста PDGF. TGF-β1 контролирует появление маркеров клеточного старения в ответ на стресс. Кавеолин 1 — структурный белок, являющийся компонентом кавеолярных мембран и участвующий в концентрировании, организации и модулировании сигнальных молекул (Pascal et al., 2005).

Таким образом, очевидно, что старение клеток есть результат комплексного взаимодействия между генетическими факторами и возрастзависимым накоплением разнообразных стохастических повреждений (Toungakos et al., 2006). Суммируя вышесказанное, следует сказать, что существует два молекулярных механизма клеточного старения — p21- и p16-зависимые (рис. 1). В ответ на повреждение ДНК, которое распознается ATM и передается на транскрипционный фактор p53, происходит индукция ингибитора клеточного цикла p21. В активации p16 важную роль играют стимуляция MAPK p38-, SAPK/JNK- и ERK-каскадов фосфорилиро-

вания активными формами кислорода, а также эпигенетические изменения хроматина (потеря гетерохроматинизации) в результате возрастзависимого снижения экспрессии метилтрансферазы гистонов EZH2 и повреждения ДНК (через АТМ). Важно отметить, что активация этих механизмов не является прерогативой клеточного старения. Она обратимо происходит при кратковременных стрессах. Нормальная функция этих путей — приостановить клеточный цикл, чтобы предоставить клетке время для устранения повреждений перед делением. Старение сопровождается хроническим стрессом (сверхпродукция свободных радикалов, присутствие нерепарируемых двухцепочечных разрывов в виде укороченных теломер, эпигенетические изменения хроматина), что в результате индукции вышеперечисленных механизмов приводит к перманентной остановке делений.

Каким образом происходит выключение клеточного цикла? Репликативная (АТМ/p53/p21-механизм) и стресс-индуцированная (p38/p16-путь) формы клеточного старения, инициируясь разными причинами (укорочение теломер, повреждение ДНК, окислительный стресс), соединяются на белке ретинобластомы pRB, подавляющем синтез генов, необходимых для репликации (рис. 1). В следующем разделе рассмотрим экспериментальные данные, свидетельствующие об участии клеточного старения в возрастзависимых патологических изменениях.

2.1.4. Взаимосвязь старения клетки и организма

Как уже говорилось, в соответствии с теорией антагонистической плейотропии, основанное на теломерах репликативное старение возникло как защитный механизм против возникновения рака в репродуктивном периоде жизни. Обратная сторона такой защиты — постепенная утрата регенеративной способности, приводящая к дегенеративным процессам в старости, т. е. в тот период жизни, на который действие естественного отбора распространяется слабо (Weinstein, Ciszek, 2002; Kurz, 2004). В условиях высокой смертности от внешних причин естественный отбор против старения еще больше ослабляется. Это приводит к закреплению на популяционном уровне коротких теломер и, таким образом, к снижению вероятности появления опухолей. Сильный отбор против старения (при высокой репродуктивной продолжительности жизни) сдвигает баланс в пользу более длинных теломер и высокой тканевой регенерации, что замедляет старение при росте рисков образования опухолей (Weinstein, Ciszek, 2002). 110

му положению. Теломераза-зависимое старение вносит серьезный вклад в ограничение роста фибробластов у долгоживущих приматов, но не у короткоживущих млекопитающих. У таких относительно быстро стареющих видов, как мыши, наличие более длинных теломер либо экспрессия теломеразы приводят к чрезвычайно большой репликативной способности, поэтому их клетки в норме не подвергаются репликативному старению (Patil et al., 2005). У них же высока частота образования опухолей. Справедливости ради надо отметить, что у животных, клетки которых не подвержены репликативному старению, большое значение играет стресс-индуцированное старение клеток.

Следует признать, что экспериментальных фактов, позволяющих связать воедино репликативное старение клеток и старение организма, в настоящее время мало. Например, длина теломер изменяется при старении некоторых видов животных. Однако мало известно о том, живут ли дольше животные с более длинными теломерами (особи одного и того же вида на изогенном фоне), чем их собратья с нормальными теломерами. Удобным объектом для подобного рода исследований является нематода. Как оказалось, сверхэкспрессия теломерасвязывающего белка HRP-1 у нематоды приводит к постепенному увеличению длины теломер и повышению ее продолжительности жизни. Кроме того, нематоды с длинными теломерами более устойчивы к тепловому стрессу (данный эффект зависит от активности гена *daf-16*). Таким образом, длина теломер может индуцировать сигналинг, регулирующий продолжительность жизни даже у постмитотического организма.

Каким образом длинные теломеры могут влиять на продолжительность жизни нематод? Возможно, что они регулируют эффект положения прителомерных генов либо что теломера-связывающие белки влияют на сигнальные пути, определяющие метаболизм и жизнедеятельность (Joeng et al., 2004). Таким образом, в постмитотических тканях нематод белки проверочных точек клеточного цикла, перестав регулировать пролиферацию, все еще контролируют выживаемость клетки, ускоряя старение организма. Возможно, это связано со способностью таких белков удерживать постмитотические клетки в неделящемся состоянии, а также влиять на внутриклеточную устойчивость к стрессу (Olsen et al., 2006). В то же время, согласно данным другого эксперимента, нематоды из клонов с более длинными теломерами живут не дольше других (Raices et al., 2005). Однако у дождевого червя поддержание длины теломер вновь связано с увеличением продолжительности жизни (Wright, Shay, 2005a). У дрозофил доминантный генетический фактор *Tel* приводит к многократному удлинению кластеров ретротранспозонов на всех теломерах. С увеличением

теломер продолжительность жизни взрослых мух не изменялась, тогда как фертильность и яйцепродукция у самок даже снижалась в результате развития ненормальных ооцитов (Walter et al., 2006). У муравья *Lasius niger* соматические ткани короткоживущих самцов имеют значительно более короткие теломеры, чем у долгоживущих маток и рабочих особей. Эти различия запрограммированы в раннем личиночном развитии, вероятно, через быстрое укорочение теломер клеток самцов. Однако рабочие самки имеют такие же теломеры, что и более долговечные матки. Данные различия, по-видимому, обусловлены особенностями раннего развития, поскольку взрослые насекомые — постмитотические организмы. Однако различия не связаны с количеством делений личиночных клеток, поскольку самцы имеют меньшие размеры (содержат меньше клеток), а теломераза активна в соматических клетках всех трех каст (Keller, Jemielity, 2006; Jemielity et al., 2007). Теломерная ДНК птиц в 5—10 раз длиннее, чем у более короткоживущих млекопитающих. Теломеры наибольших (из известных) размеров принадлежат белоголовому орлану и ястребу-тетеревятнику. Однако прямой корреляции с видовой продолжительностью жизни при этом не установлено. У птиц с возрастом также доказано укорочение теломер (Holmes, Ottinger, 2003).

In vivo эффект ускоренного укорочения теломер млекопитающих можно наблюдать у мышей. При этом они обладают чрезвычайно длинными теломерами, а особи с делецией гена *Terc* жизнеспособны вплоть до третьей генерации включительно. Однако затем происходит увеличение числа слияний концов хромосом, приводящее к следующим фенотипическим проявлениям: повышенной эмбриональной смертности из-за дефекта смыкания нервной трубки; малым размерам и стерильности самцов и самок; атрофии кишечника и селезенки; уменьшению ангиогенеза и снижению пролиферативного потенциала стволовых клеток красного костного мозга и нервных стволовых клеток взрослых особей, сердечной дисфункции. Таким образом, мыши *Terc* характеризуются выраженным прогероидным синдромом, сопровождающимся снижением продолжительности жизни, дефектами в активно пролиферирующих тканях, снижением фертильности. Отсюда следует, что для поддержания тканевого гомеостаза необходима хотя бы минимальная длина теломер. У теломераз-дефицитных мышей реактивация этого фермента предотвращает вышеперечисленные проявления. На основе данных, полученных на мышинной модели, можно предположить, что у человека укорочение теломер с возрастом также ведет к подобным патологическим состояниям, тем более что теломеры у человека гораздо короче мышинных (Pelicci, 2004; Blasco, 2005; Franco et al., 2005). Как оказалось, делеция *p21*

(гена ингибитора циклинзависимых киназ) увеличивает продолжительность жизни теломераза-дефицитных мышей с нарушенными теломерами. При этом имеет место улучшение гематолимфопоэза и регенерации кишечного эпителия, хотя восстановления функции самих теломер не происходит, апоптотический ответ также остается интактным и не наблюдается ускорения хромосомной нестабильности или возникновения рака. Таким образом, экспериментально подтверждено, что дисфункция теломер индуцирует p21-зависимую проверочную точку клеточного цикла *in vivo*, которая ограничивает продолжительность жизни на организменном уровне (Choudhury et al., 2007).

Возможно, что теломераза может контролировать клеточный цикл по механизмам, отличным от регуляции теломер (Kurz, 2004). Анализ генов, индуцированных в половых клетках самцов мышей, лишенных теломеразы, показал, что дисфункция теломер вызывает выраженный компенсаторный ответ, направленный на восстановление нарушенной функции половых клеток через индукцию сигналов выживания, связанных с PI3-киназным механизмом, и через скоординированную стимуляцию транскриптов, необходимых для сперматогенеза (Franco et al., 2005).

Хотя укорочение теломер не играет главной роли у мышей дикого типа, есть свидетельства, что у человека оно вносит существенный вклад в естественное старение. Даже среди приматов человек обладает наиболее короткими теломерами (Stindl, 2004). У человека снижение уровня теломеразной активности в половых и стволовых клетках приводит к ускоренному укорочению теломер и синдрому преждевременного старения, известному как врожденный дискератоз (*dyskeratosis congenita*) (Franco et al., 2005). Это X-сцепленное заболевание вызвано мутацией фермента, вовлеченного в метаболизм теломеразной РНК-субъединицы (*hTR*) (Weinert, Timiras, 2003). Кроме того, симптомы, наблюдаемые при других синдромах ускоренного старения человека, сопряженных с короткими теломерами, во многом напоминают нормальное старение (Hofer et al., 2005). Подробнее об этом см. ниже, разд. 2.2.2.

У здоровых женщин, являющихся матерями детей с хроническими заболеваниями, в мононуклеарных клетках периферической крови теломеры короче, чем у матерей здоровых детей; оксидативный стресс у первых также выше (Sapolsky, 2004). Таким образом, даже хронический эмоциональный стресс способен приводить к укорочению теломер.

Укорочение теломер человека при старении изучено для многих типов тканей (Satyanarayana et al., 2003). Например, было показано, что теломеры возрастзависимо укорачиваются в клетках почек, особенно в зоне их коры (Melk et al., 2000). Длина теломер

может ограничивать репликативный потенциал гемопоэтических клеток, внося вклад в снижение с возрастом функции иммунной системы. Кроме того, укорочение теломер стимулирует опухолеобразование через усиление нестабильности генома: теломера-индуцированный кризис генома приводит к трансформации клетки, следующая за которой активация теломеразы вызывает неограниченную пролиферацию (Weinert, Timiras, 2003). У человека длина теломер в лейкоцитах коррелирует с маркерами сердечно-сосудистых заболеваний. Длина теломер зарекомендовала себя как прогностический фактор смертности у людей старше 60 лет: пожилые люди с более короткими теломерами умирают чаще и раньше, чем те, чьи теломеры длиннее (Wright, Shay, 2005a). Потеря теломер является причиной некоторых возрастзависимых патологий. Так, укорочение теломер в клетках печени больных с хроническим гепатитом является причиной цирроза, а также одной из возможных причин такого старение-ассоциированного заболевания, как атеросклероз (Sharpless, DePinho, 2007). Клетки в очаге остеоартрита также несут маркеры старения. Маркер клеточного старения p16 сопутствует возрастным нарушениям нейрогенеза, гематопоза и функции поджелудочной железы (Campisi, d'Adda di Fagnano, 2007).

Ряд исследований выявил обратную взаимосвязь между возрастом донора и репликативной продолжительностью жизни фибробластов в культуре. Клетки от старых доноров стареют после меньшего числа удвоений популяции, чем клетки от молодых. Клетки, взятые у особей короткоживущих видов, имеют меньший репликативный потенциал, чем клетки долгоживущих. То же наблюдается и при сравнении клеток людей с синдромами преждевременного старения и одновозрастного контроля (Dimri et al., 1995). Исследование культуры фибробластов, полученных от молодых и старых доноров, обнаруживает достоверное уменьшение с возрастом скорости миграции этих клеток, времени начала репликативного старения, темпов репликации (Schneider, Mitsui, 1976).

Однако старый вывод о том, что длина теломер у человека коррелирует с возрастом донора, сейчас часто ставится под сомнение из-за индивидуальной вариабельности (Patil et al., 2005). Корреляция между возрастом донора и репликацией клеток в культуре является слабой и иногда недостоверной. Например, анализ репликативной продолжительности жизни 124 клеточных культур фибробластов здоровых индивидуумов не выявил достоверной связи с возрастом доноров (Cristofalo et al., 1998).

Широко распространено убеждение, что клонированные животные могут наследовать биологический возраст клеток-доноров

ядра и по этой причине преждевременно погибать. Первое клонированное млекопитающее, овечка Долли, действительно умерла в раннем возрасте. Сравнение длины теломер Долли в 2-летнем возрасте с одновозрастным контролем показало их существенное укорочение (19 против 23 килобаз), что примерно соответствует 6-летнему животному (Xu, Yang, 2003).

Однако многочисленные дальнейшие эксперименты показали, что перенос соматического ядра в ооцит сопровождается последующей реактивацией теломеразы и достраиванием теломер, прежде всего на стадии бластоцисты. Величина, на которую происходит восстановление теломер, варьирует в зависимости от вида животного, типа клетки — донора ядра, процедур переноса ядра и измерения теломер. Естественно, особи, клонированные из клеток эмбрионов, имеют более длинные теломеры, чем полученные из клеток взрослого организма. Интересен тот факт, что чрезмерно долгое содержание клеток-доноров в культуре, ведущее к выраженному разрушению их теломер, у клонов приводит к формированию даже более длинных теломер, чем у обычных животных. По-видимому, очень короткие теломеры в эмбрионе запускают системы репарации, приводящие к их удлинению (Xu, Yang, 2003).

Насколько клеточное старение существенно для старения целостного организма, ведь существуют стволовые клетки, имеющие активную теломеразу? Многие ткани состоят из короткоживущих клеток, требующих постоянного замещения. Кожа, выстилка просвета кишечника и кроветворные ткани являются наиболее яркими примерами. Стволовые клетки обнаружены даже в мозгу и в сердце (Geiger et al., 2005). Старение на клеточном уровне достаточно хорошо изучено и проявляется через снижение репликативной способности пролиферирующих клеток и функциональной активности постмитотических клеток. Ранее предполагали, что стволовые клетки имеют неограниченные способности к самообновлению и, таким образом, не зависят от старения. Однако получены свидетельства постепенного спада репликативной способности кроветворных, кишечных и мышечных стволовых клеток. Поскольку активность стволовых клеток необходима для восполнения потери дифференцированных клеток в тканях (управляемых стволовыми клетками), было выдвинуто предположение, что старение стволовых клеток ведет к нарушению тканевого гомеостаза. В результате снижается регенеративная способность организма, ведущая к его старению и к таким патологиям, как атеросклероз и диабет II типа. Повреждение ДНК также приводит к старению стволовых клеток. Роль повреждения ДНК в старении стволовых клеток подтверждают и данные, полученные на мышцах с мутациями генов репарации (Geiger et al., 2005; Sharpless, DePinho, 2007).

Таким образом, несмотря на то что стволовые клетки экспрессируют теломеразу, они не являются иммортальными и подвергаются эрозии теломер, что обусловлено теломера-независимыми механизмами регуляции репликативного старения стволовых клеток *in vivo*. Продолжительность их жизни ограничивается теми же сигнальными механизмами (**ARF/p53, p16/Rb**), которые активируются при повреждениях ДНК (возникающих при дисфункции теломер и средовых стрессах) и приводят к клеточному старению или апоптозу. Запуск проверочных точек клеточного цикла при обнаружении повреждений ДНК приводит к истощению стволовых клеток и старению организма, тогда как их инактивация — к опухолеобразованию (**Pelicci, 2004**). Возрастзависимое снижение активности клеток-предшественниц может быть также результатом изменения экспрессии системных факторов. Например, снижение активности стволовых клеток скелетных мышц (сателлитных клеток) из-за потери Notch-сигналинга ведет к нарушению регенерации стареющих мышц. Уменьшение пролиферации печеночных клеток-предшественниц благодаря формированию комплекса, включающего **сEBP-α** и фактор ремоделинга хроматина **Brm (brahma)**, ингибирует регенераторные способности стареющей печени. Данные изменения удается предотвратить при помощи обработки старых мышей белками сыворотки от молодых животных (**Conboy et al., 2005**).

Таким образом, клеточное старение истощает пул функциональных клеток, причем как пролиферирующих, так и стволовых, нарушая нормальное функционирование ткани, ее репарацию и самообновление. Стареющие клетки могут вносить вклад в возрастзависимую патологию путем индукции или стимулирования перестройки тканей и локального воспаления, что нарушает их целостность и функции. Они также могут стимулировать пролиферацию и озлокачествление близлежащих предопухолевых клеток. Это связано с тем, что стареющие клетки дисфункциональны и секретируют металлопротеиназы (разрушающие внеклеточный матрикс), факторы роста эпителия и воспалительные цитокины. Все это может нарушать структуру нормальной ткани и вызывать воспалительные реакции (**Campisi, 2005; Papazoglu, Mills, 2007**). Например, стареющие эндотелиальные клетки сверхактивируют воспалительный цитокин интерлейкин-1α и EGF-подобный фактор роста. Действительно, рост преднеопластических и неопластических эпителиальных клеток в культуре в большей мере стимулируется присутствием стареющих фибробластов по сравнению с предстареющими (**Weinert, Timiras, 2003**). Многие ткани, причем даже у столетних долгожителей, содержат лишь небольшое количество стареющих клеток (**Shay, Wright, 2000**). В зависимости

от эксперимента, вида и ткани, доля таких клеток варьирует от 1 до 15 % (Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007). Однако присутствие даже нескольких стареющих клеток может нарушать функцию нормальной соматической ткани (Shay, Wright, 2000). Кроме того, клеточное старение может сообщаться от одних типов клеток другим (Keyes et al., 2005).

Отметим в заключение, что длина теломер связана со старением организма, по крайней мере у некоторых групп животных (нематод, перепончатокрылых, приматов, возможно, птиц). Модельные организмы с дефектами теломеразы характеризуются ускоренным старением, которое можно приостановить, подавив активность генов *p53* или *p21*. Аналогичным образом некоторые прогероидные заболевания сопряжены с преждевременной дисфункцией теломер. Хронический стресс также приводит к ускоренному старению и укорочению теломер. Стареющие клетки (накапливающие соответствующие биомаркеры — старение-ассоциированную Р-галак-тозидазу и p16) обнаруживаются *in vivo* в небольшом количестве во многих тканях. В результате клеточное старение (репликативное и стресс-индуцированное), сокращающее количество пролиферирующих клеток вообще и стволовых в частности, приводит к нарушению регенераторных способностей тканей. На фоне возрастзависимой активизации апоптоза в ряде тканей и подавления компенсаторной пролиферации наблюдаются дегенеративные нарушения. Более того, стареющие клетки способны активно разрушать межклеточный матрикс и индуцировать локальное воспаление и онко-генез. Таким образом, обе формы клеточного старения можно рассматривать в качестве механизма старения организма в целом.

2.2. Генетическая нестабильность

2.2.1. Постоянство генома и старение

В процессе старения первыми выходят из строя те системы, чье поддержание энергозатратно, а повреждение необратимо. Среди них особое место занимает поддержание постоянства генома. Энергия, требуемая для распознавания повреждений и репарации ДНК десятками различных ферментов, огромна, а износ генома часто невосполним. В результате генетическая нестабильность является одной из главных причин старения всех эукариотов. Непостоянство генома — одна из ведущих проблем в молекулярной генетике (Хесин, 1984). Его эффекты могут иметь раз-

личные проявления, включая дестабилизацию хромосом, обмена сестринских хроматид и анеуплоидию, мутации и амплификацию генов, клональную гетерогенность, отсроченную репродуктивную и апоптотическую гибель клетки (**delayed apoptosis**), неопластическую трансформацию (Limoli et al., 1998).

От дрожжей до человека возрастзависимая генетическая нестабильность может иметь разнообразные проявления: потеря рибосомальной ДНК, дестабилизация теломер и увеличение количества хромосомных перестроек. Так, у человека определенные мутации ферментов репарации ДНК, например *Ercc2 (Xpd)*, *Xcc5 (Ku86)* и *Wrr*, связанные с нарушением стабильности генома, приводят к частичным прогериям (Nikitin et al., 1997; Carter et al., 2005; Kujoth et al., 2005). Однако прежде всего нестабильность генома приводит к изменению генной экспрессии и, таким образом, к возрастным нарушениям в клеточной физиологии. Действительно, долгожительство у дрожжей, *Caenorhabditis elegans* и дрозофил можно вызвать увеличением активности деацетилазы гистонов, вовлеченной в хроматиновый сайленсинг — подавление экспрессии генов (см. разд. 3.3).

Как и любое биологическое явление, нестабильность генома, а вернее, механизмы, лежащие в ее основе, могут иметь и важное позитивное значение в жизни клетки. Достаточно вспомнить в связи с этим соматический гипермутагенез при формировании средств антител. В то же время нарушение контроля стабильности может привести к накоплению мутаций или эпигенетических изменений, что в свою очередь ведет к патологии — канцерогенезу или старению (Зайнуллин, Москалев, 2000). Таким образом, также как и клеточное старение и апоптоз, механизм генетической нестабильности по отношению к старению организма может быть антагонистически плеiotропным.

Предполагаемых причин возникновения возрастзависимой нестабильности генома может быть несколько: наличие комплексов двухцепочечных разрывов ДНК, укорочение теломер, активация мобильных генетических элементов и снижение эффективности функционирования процессов репарации (Зайнуллин, Москалев, 2000). В свою очередь нестабильности генома противостоят мощные эшелоны клеточной защиты. «Гены-уборщики» (**caretaker**) в норме предотвращают повреждения ДНК. Они увеличивают стабильность генома, снижая риск рака и отсрочивая старение. Делеция этих генов, напротив, вызывает синдромы ускоренного старения (см. разд. 2.2.2). «Гены-контролеры» (**gatekeeper**), ответственные за гибель клетки и задержку клеточного цикла в ответ на повреждение ДНК, включают в себя классические супрессоры опухолей, например *p53* (см. разд. 2.2.3). Они часто инактиви-

руются посредством мутаций или эпигенетического сайленсинга при возникновении различных типов рака. Усиление функции супрессоров опухолей, напротив, подавляет пролиферацию стволовых клеток, усиливает апоптоз или клеточное старение митотических клеток, опосредуя, таким образом, старение организма в целом (Papazoglu, Mills, 2007).

Дрожжи стали одним из первых объектов, продемонстрировавших роль генетической нестабильности в качестве основного механизма старения. В 80-х годах XX века Эгилмец и Джазвинский выдвинули гипотезу о том, что старение дрожжей происходит благодаря стохастическому появлению фактора старения, который экспоненциально накапливается, пока не убьет клетку (Egilmez, Jazwinski, 1989). В 1997 г. Синклер и Гваренте предположили, что таким фактором может быть экстрахромосомная ДНК, образующаяся вследствие генетической нестабильности в локусе рибосомальной ДНК — *RDNI*, составляющем 10 % всего генома дрожжей (Sinclair, Guarente, 1997). Как оказалось, старые клетки дрожжей переполняются экстрахромосомными кольцами рДНК (до 1000 шт.), что, по-видимому, ведет к фильтрации факторов транскрипции и репликации, вызывая гибель клетки похожим на апоптоз способом (Bitterman et al., 2003).

Таким образом, большинство случаев репликативного старения у дрожжей возникает из-за неспособности поддерживать целостность генома. Вышеупомянутые экстрахромосомные кольцевые рДНК являются самореплицирующимися и ассиметрично перераспределяются между материнской и дочерней клетками при митозе, что приводит к их накоплению исключительно в стареющей клетке. Эктопическое попадание таких колец в клетку уменьшает продолжительность ее жизни, тогда как генетические манипуляции, снижающие образование колец, продлевают ее жизнь (Bitterman et al., 2003; Kaeberlein et al., 2005a, 2005c). Другие типы экстрахромосомной кольцевой ДНК, например плазмиды *TRP1/ARS1*, также могут укорачивать жизнь дрожжей (Guarente, Kenyon, 2000). Фенотипические изменения, происходящие в стареющей материнской клетке дрожжей, заключаются не только в дестабилизации локуса рДНК, но и в одновременной экспрессии генов *a*- и α -типов спаривания вследствие нарушения репрессии локусов *HML* и *HMR*. Гаплоидные клетки в норме экспрессируют либо *a*-, либо α -информацию из локуса типа спаривания *MAT*. Одновременная экспрессия генов обоих типов спаривания приводит к стерильности материнской клетки (репродуктивному старению) из-за неспособности при половом процессе быть правильно распознанной (Guarente, Kenyon, 2000; Bitterman et al., 2003). Как уже упоминалось в предыдущем разделе, старение дрожжей связано 119

с умолканием генов возле теломерных концов (Bitterman et al., 2003).

В результате генетических исследований процесса старения дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* было сделано заключение, что гены, вовлеченные в сайленсинг (умолкание) хроматина, могут быть ключевыми регуляторами старения. Как уже отмечалось, сайленсинг — это процесс, в результате которого целые участки хромосом, охватывающие блоки генов, оказываются транскрипционно неактивными (Guarente, Kenyon, 2000). Упаковка ДНК и гистонов в «молчащий» гетерохроматин — основной механизм, посредством которого дрожжи подавляют образование экстрахромосомной кольцевой ДНК. Наличие гетерохроматина в локусе *RDN1* обусловлено активностью комплекса белков SIR2, NET1, CDC14 и NAN1 (Bitterman et al., 2003). В старых материнских клетках деацетилаза SIR2 перераспределяется с теломер и генов типа спаривания в ядрышко (Guarente et al., 1998). Причем механизм сайленсинга не предотвращает транскрипцию генов рДНК, а лишь подавляет их рекомбинацию (Bitterman et al., 2003), что является компенсаторной реакцией антистарения. В подтверждение этих слов следует отметить, что сверхэкспрессия SIR2 увеличивает репликативную продолжительность жизни. Еще одна гистоновая деацетилаза — RPD3 деацетилирует гистон H4. У дрожжей она необходима для начала репликации и регуляции рДНК; кроме того, она подавляет транскрипцию генов. Мутация в гене *rpд3* ведет к гипердеацетилированию гистонов, но в отличие от SIR2 это приводит к умолканию всех трех локусов генетической нестабильности стареющей клетки дрожжей (локуса типа спаривания, теломер и рДНК). В итоге мутация в гене *rpд3* значительно увеличивает продолжительность жизни клеток дрожжей (Bitterman et al., 2003).

Ген продолжительности жизни дрожжей *foб1* кодирует ядерный белок, необходимый для блокирования репликационной вилки ДНК непосредственно в точках ее начала, расположенных в рДНК, что способствует возможности рекомбинации. Линии с делецией *foб1* имеют в 100 раз более низкий уровень рДНК-рекомбинации и несут меньше кольцевых экстрахромосомных ДНК. Такие мутанты живут в 2 раза дольше линий дикого типа (Bitterman et al., 2003).

АТФ-зависимая геликаза Sgs1p семейства RecQ участвует в репликации, рекомбинации и в формировании проверочной точки S-фазы дрожжей (Azam et al., 2006), взаимодействуя с топоизомеразами II и III (Guarente, 1996; Sinclair et al., 1998). Мутанты *sgs1 δ* характеризуются снижением средней продолжительности жизни. По одной из моделей, это происходит благодаря гиперрекомбина-120

ции рДНК, приводящей к появлению экстрахромосомных колец, накапливающихся в материнской клетке и вызывающих ее гибель. Однако ряд наблюдений противоречит этой точке зрения. Например, преждевременного накопления колец рДНК не было обнаружено как у *sgs1*-мутантов, так и при нарушении гомологичной рекомбинации в результате мутаций других генов репарации (*RAD50*, *RAD51*, *RAD52* и *RAD57*). Более того, у клеток, выведенных из состояния стационарной фазы, продолжительность жизни снижается без появления кольцевых рДНК. Некоторые случаи, при которых длительность жизни дрожжевой клетки увеличивается (например, ретроградный ответ при сигналинге из митохондрий в ядро), также сопровождаются экспоненциальным накоплением кольцевых рДНК. Таким образом, накопление экстрахромосомных рДНК не является непосредственной причиной репликативного старения. По-видимому, мутация гена *sgs1* имеет более глубокие последствия, приводя к систематическим эндогенным повреждениям ДНК и хромосомным перестройкам, т. е. к нестабильности генома (Hoopes et al., 2002).

Другая репликативная геликаза/нуклеаза дрожжей — DNA2, также являющаяся членом семейства RecQ-геликаз, необходима для нормальной продолжительности жизни. У мутантов *dna2* все фенотипы, присущие старым клеткам (удлинение клеточного цикла, возрастзависимые дефекты транскрипционного сайленсинга, реорганизация ядрышка), возникают спустя лишь несколько поколений. Однако продолжительность их жизни можно увеличить экспрессией дополнительной копии *sir2* или делецией *lob1*. Мутация *rad27 δ* в гене гомолога нуклеазы FEN-1 млекопитающих, участвующей в поддержании геномной стабильности, также приводит к преждевременному старению дрожжей (Hoopes et al., 2002). Более того, сверхэкспрессия RAD27 подавляет эффекты мутации *dna2-1*. Таким образом, SGS1, DNA2, RAD27 и FOB1 взаимодействуют в процессе поддержания стабильности генома и репликативного старения у дрожжей (Lesur, Campbell, 2004).

В настоящий момент все исследователи сходятся во мнении, что наиболее вероятным фактором, способствующим возникновению рекомбинаций и ускоренного старения у мутантов дрожжей, является повреждение ДНК при репликации. При нормальном старении вероятной причиной репликационных ошибок следует считать эндогенное оксидативное повреждение ДНК. В итоге возникает генетическая нестабильность — экстрахромосомные кольцевые ДНК или потеря гетерозиготности, что обуславливает репликативное старение (Hoopes et al., 2002; Lesur, Campbell, 2004).

Вышеперечисленные механизмы эволюционно консервативны. Потеря ортолога RecQ5 у нематоды также вызывает появление

чувствительности к повреждению ДНК и укорочение продолжительности жизни (McColl et al., 2005). Мутации генов некоторых геликаз млекопитающих служат причиной частичных прогерий (см. разд. 2.2.2). Частичная потеря функции гена деацетилазы *gri3* у дрозофилы увеличивает продолжительность жизни (Bitterman et al., 2003). У млекопитающих один из гомологов деацетилазы *SIR2* дрожжей — *SIRT6* принимает участие в эксцизионной репарации оснований и поддерживает целостность генома клетки. Его потеря у мышей сопровождается старение-ассоциированным дегенеративным синдромом (Mostoslavsky et al., 2006).

У мышей мутанты, потерявшие функцию супрессора опухолей **BRCA1**, характеризуются высокой эмбриональной летальностью, а также задержкой роста, апоптозом, дефектами репарации ДНК, амплификацией центромер, потерей проверочной точки G_2/M клеточного цикла, геномной нестабильностью. Около 40 % наследственного рака груди связано с мутацией гена *Brcal*. В то же время отсутствие полнофункционального *Brcal* приводит к клеточному старению у мутантных эмбрионов и клеток в культурах, а также к преждевременному старению взрослых мышей. Преждевременное старение мышей проявляется в виде снижения продолжительности жизни, уменьшения отложения жира, остеопороза, атрофии кожи, ослабления заживления ран. Нарушение функции **BRCA1** активизирует *p53*, что отчасти объясняет наблюдаемые фенотипы. Эффекты, вызванные отсутствием *Brcal*, могут быть отменены потерей самого *p53* или его гена-мишени *p21*. Мутантные клетки, избежавшие старения, подвергаются клональной селекции на быструю пролиферацию, у них наблюдаются молекулярные изменения, такие как сверхэкспрессия циклина **D1** и циклина **A**, а также потеря *p53*, что приводит к опухолеобразованию (Cao et al., 2003).

Таким образом, очевидно, что гены, играющие определяющую роль в поддержании стабильности генома, регулируют продолжительность жизни не только клеток дрожжей, но и млекопитающих. Данные механизмы являются эволюционно консервативными.

Исследования, выполненные на мутантных клетках и организмах, лишь продемонстрировали возможную роль генетической нестабильности в старении. Каков главный механизм генетической нестабильности при естественном старении? Жизнеспособность организма обеспечивают мощные процессы самоподдержания и репарации. Например, в каждой клетке человека за день происходит 30—70 тыс. повреждений ДНК. Возникает необходимость в значительных энерготратах на производство ферментов репарации (Wright, Shay, 2005a). В молодых клетках спонтанные повреждения ДНК и их репарация сбалансированы. С возрастом снижается способность к репарации и повреждения накапливаются, вслед-

ствии чего и возникает генетическая нестабильность (Wojda, Witt, 2003).

Наиболее опасным типом повреждения ДНК являются двухцепочечные разрывы. При этом нарушаются сразу обе матрицы, а такое повреждение часто летально для клетки, поскольку восстановление требует сближения гомологичных хромосом и огромных энергозатрат. Двухцепочечные разрывы ДНК происходят в клетке в результате оксидативного энергетического метаболизма, мейоза, репликации ДНК и V(D)J-рекомбинации. Кроме того, они возникают вследствие облучения и других внешних генотоксических воздействий (Espejel et al., 2004). Наконец, в качестве двухцепочечного разрыва воспринимаются критически укороченные и лишённые покрова белков теломеры. Если повреждение ДНК не репарируется в относительно короткий промежуток времени (несколько дней), то клетки подвергаются стресс-индуцированному преждевременному старению либо апоптозу (Naka et al., 2004).

Эукариотические клетки имеют два пути репарации двухцепочечных разрывов — гомологичную рекомбинацию и нехомологичное соединение концов. Последний способ наиболее важен и осуществляется ДНК-зависимой протеинкиназой и комплексом XRCC4/лигазы IV. ДНК-протеинкиназа состоит из гетеродимера Ku86/Ku70 и каталитической субъединицы. Гетеродимер Ku связывается с концами поврежденной ДНК, предотвращая их деградацию и стимулируя репарацию. Было показано, что клетки, дефектные по Ku86 и каталитической субъединице ДНК-зависимой протеинкиназы, проявляют хромосомную нестабильность. Нокаутных мышей по любому из трех компонентов ДНК-протеинкиназного комплекса отличают иммунодефицит и повышенная радиочувствительность. Трансгенные мыши с нарушенной каталитической субъединицей характеризуются низкой продолжительностью жизни и ранним началом связанных со старением патологий по сравнению с животными дикого типа. У них заметно повышается вероятность случаев Т-лимфом и инфекций. Все это можно объяснить с позиции участия каталитической субъединицы ДНК-протеинкиназы в репарации ДНК и поддержании длины теломера (Morgan et al., 1997; Espejel et al., 2004; McColl et al., 2005).

Таким образом, вполне вероятно, что накопление поврежденного ДНК с возрастом может быть связано с наблюдаемым снижением уровня аутоантигенов Ku (Ku70 и Ku86), ДНК-зависимой протеинкиназы и PARP (Salminen et al., 1997). Исследование изменения с возрастом уровня экспрессии белков репарации двухцепочечных разрывов Ku70, Mre11, Sir2, TRF1 и Ku80 в лимфоцитах показало заметное снижение лишь Ku70 и Mre11. Кроме того, экспрессия Ku70 выше у долгожителей (Ju et al., 2006). В гепатоцитах

пожилых крыс удаление УФ-индуцируемых повреждений в активно транскрибируемых участках генома ниже по сравнению с молодыми животными, что предполагает снижение с возрастом в ядре репарации, связанной с транскрипцией (Souza-Pinto et al., 1999). Дефекты репарации и, как следствие, повреждение ДНК могут обуславливать старение путем снижения количества функциональных стволовых клеток. Такие нарушения для гематопозитических клеток наблюдаются у мышей с дефектами генов репарации (*Atr*, *FANCD1*, *MSH2*, *ERCC1*, *Ku80*, *XPD*, *mTERC*) или с гипоморфной аллелью ДНК-лигазы IV. Мыши с мутацией фермента репарации *RAD50*, входящего в состав *MRE11*-комплекса, проявляют гипоплазию костного мозга. При нормальном старении гематопозитические стволовые клетки характеризуются также проявлениями повреждения ДНК (под микроскопом обнаруживаются скопления гистона H2AX). Несмотря на то что такие стволовые клетки не прекращают пролиферировать, они часто подвергаются апоптозу (Sharpless, DePinho, 2007).

Одним из возможных проявлений нестабильности является возрастзависимое изменение экспрессии генов. Транскрипционный профиль фронтального кортекса человека при старении демонстрирует начало изменения транскрипции ряда генов уже после 40 лет. Причем уровень повреждений ДНК (накопление 8-оксогуанина) наиболее заметно увеличивается в промоторах именно тех генов, экспрессия которых снижается с возрастом. Промоторные участки генов особенно уязвимы, так как они содержат GC-богатые последовательности, которые очень чувствительны к оксидативному повреждению и не защищены репарацией, связанной с транскрипцией. Таким образом, большее количество исходных повреждений и более медленная эксцизионная репарация оснований отдельных промоторов могут вносить вклад в оксидативное повреждение генов, приводя к снижению их экспрессии и к дисфункции клеток. Увеличение оксидативного повреждения ДНК в стареющем кортексе сопровождается сверхэкспрессией ферментов эксцизионной репарации 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы и урацил-ДНК-гликозилазы (Lu et al., 2004). Кроме того, в постмитотическом мозгу в 1.5—2 раза усиливается активность ферментов эксцизионной репарации гликозилаз NEIL1 и NEIL2, тогда как уровень мРНК других гликозилаз, например OGG1 и APE1, снижается (Englander, Ma, 2006). Таким образом, при старении имеет место воспроизводимое подавление активности одних генов (в результате нарушений в их промоторах или в рамках адаптивного ответа) при компенсаторной активации других.

Теория соматических мутаций выдвигает на роль главной причины старения накопление устойчивых нарушений генов в сома-

тических клетках, а в качестве важнейшего их источника рассматривает свободные радикалы (Weinert, Timiras, 2003). Действительно, изменения в генетическом материале на уровне генов и хромосом в соматических и половых клетках почти всегда вредные, снижающие приспособленность и здоровье организма. Например, большинство рецессивных мутаций, даже в гетерозиготе, снижает приспособленность у дрозофилы на 1—2 %, причем такие мутации синергетически взаимодействуют, что усугубляет их вред. Накопление генов с отсроченными эффектами увеличивает генетическую нестабильность соматических клеток. С возрастом в клетках организма увеличивается число генных мутаций, событий хромосомных разрывов, транспозиций ДНК, изменений пар оснований микро- и минисателлитных повторов, окислительных повреждений ДНК, нерасхождений хромосом, повреждений митохондриальной ДНК. Одновременно происходит снижение способности репарировать ДНК, эффективности ДНК-полимеразы и уровня рекомбинации, а также количества ловушек свободных радикалов и длины теломер. Теория соматических мутаций подтверждается и тем, что агенты, индуцирующие мутации или повышающие скорость мутирования, также снижают продолжительность жизни (химические и физические мутагены, стрессы, дефекты антиоксидантной защиты, подавление функции опухолесупрессоров) (Woodruff, Thompson, 2003).

Приведем несколько примеров, подтверждающих теорию соматических мутаций. С возрастом увеличивается количество клеток, которые накапливают хромосомные aberrации в результате нарушения репарации в G₂-фазе клеточного цикла. В ряде исследований было показано возрастзависимое увеличение хромосомных потерь — гипоплоидии (преимущественно половых хромосом, X-хромосомы у женщин и Y — у мужчин) и анеуплоидии в периферических лимфоцитах и фибробластах кожи. Кроме того, FISH-анализ интерфазных ядер у человека показал значительное увеличение с возрастом доли анеуплоидных клеток с потерянными аутосомами 1, 4, 6, 8, 10 и 15. Многие из этих хромосом несут гены продолжительности жизни или синдромов преждевременного старения. Вполне возможно, что степень и тип анеуплоидии могут обуславливать влияние дозы таких генов на контроль клеточной пролиферации при старении. Частота анеуплоидии напрямую связана с образованием микроядер. Дисфункции кинетохоры и центромеры способны вызывать отставание целых хромосом или хромосомных фрагментов в анафазе. В результате в телофазе формируются микроядра, обнаруживаемые в цитоплазме дочерних клеток как малые дополнительные ядра. Этот процесс усиливается с возрастом. В результате клетки пожилых инди-

видуумов содержат в 3 раза больше микроядер, чем клетки молодых. В то же время такие клетки редко способны долго поддерживать свою жизнеспособность. Стабильные цитогенетические повреждения накапливаются с возрастом в значительно большей степени: транслокации и инсерции возрастают 10-кратно, другие хромосомные нарушения — дицентрики и ацентрики с возрастом учащаются 3-кратно (Wojda, Witt, 2003). Среди соматических мутаций, происходящих в результате стохастических событий и принимающих участие в старении клеток, выделяют также ретротранспозиции элемента *L1NE-1* (long interspersed nuclear element-1), точечные мутации в микроРНК, сегментные дубликации и неполное доминирование (гаплонедостаточность) (Martin, 2005).

У противников теории соматических мутаций также есть свои аргументы. Например, несмотря на то что рентгеновское облучение снижает продолжительность жизни гаплоидных ос (*Habrobracon*) больше, чем диплоидных, нормальная продолжительность жизни этих двух разновидностей ос одинакова. Это якобы доказывает несущественную роль мутированных соматических генов в старении. Однако у гаплоидных особей во многих тканях отмечены экстрахромосомы, дублирующие важную информацию (полиплоидия) (Woodruff, Thompson, 2003), что не позволяет делать столь глобальные выводы из данного эксперимента.

Согласно теории накопления соматических мутаций, клонирование особей с использованием ядер старых клеток должно вести к снижению продолжительности жизни по сравнению с использованием ядер более молодых клеток (Woodruff, Thompson, 2003). Действительно, мыши и сельскохозяйственные животные, клонированные из соматических клеток, часто имеют сниженную продолжительность жизни и большинство таких животных нездоровы — подвержены пневмониям и нарушениям функции печени (Kato et al., 1998; Ogonuki et al., 2002). Тем не менее в одном из экспериментов мыши, клонировавшиеся путем переноса соматического ядра в течение шести поколений, не проявляли признаков преждевременного старения, оцениваемого по поведенческим параметрам (Wakayama et al, 2000). Возможно, это связано с тем, что у мышей отсутствует репликативное старение. Как обсуждалось в предыдущем разделе, модель клонированных животных дает противоречивые результаты и при оценке роли укорочения теломера в старении организма.

Старение также сопровождается глобальным эпигенетическим сдвигом. Исследование возраст-ассоциированной активации эпигенетически подавляемых генов в тканях стареющих мышей показало, что их на 2 порядка больше, чем соматических мутаций.

Известен сдвиг гетерогенности клеточных популяций в тканях млекопитающих при старении (Martin, 2005). Современная молекулярная генетика указывает на два класса возрастзависимых эпигенетических изменений: метилирование цитозина в CpG-динуклеотидах и ковалентная модификация ДНК-связанных гистонов, в особенности ацетилирование и метилирование. Метилирование цитозина в CpG богатых островках промоторов генов обычно связано с подавлением активности, тогда как ацетилирование гистонов — с генной активацией (Martin, 2005). Наиболее заметным эпигенетическим изменением, сопровождающим старение, является постепенная потеря 5-метилцитозина в регуляторных участках генов и в повторяющихся последовательностях (Бердышев и др., 1967; Ванюшин, Бердышев, 1977; Oakley, Van Zant, 2007). Снижение количества 5-метилцитозина в геномной ДНК наблюдается как в стареющих культурах клеток, так и *in vivo*. Обработка клеточных культур ингибиторами ДНК-метилтрансфераз сокращает продолжительность их жизни по сравнению с контролем. Гипометилирование ведет к фенотипическим проявлениям клеточного старения, сопровождающимся повышенной экспрессией онко-лусупрессоров *p16^{INK4a}* и *p21* (Sun et al., 2004).

Показано, что делеция *PASG* (proliferation associated SNF-2-like gene), гена геликазы SNF2-подобного фактора, способствующего метилированию ДНК, вызывает глобальное гипометилирование, задержку роста и развития и фенотип преждевременного старения. Мыши с данным дефектом отличаются низкой массой тела при рождении, быстро седеют и теряют волосы, имеют слабую прослойку подкожного жира, отличаются предрасположенностью к остеопорозу, кифозу, кахексии и преждевременной гибели. Фибробласты из эмбрионов этих мутантов проявляют фенотип репликативного старения. У них заметно выше экспрессия ассоциированного со старением гена *p16^{INK4a}*, что связано с низкой экспрессией *bmi-1* — негативного регулятора *p16*. Таким образом, не вызывает сомнений, что метилирование ДНК через изменение генной экспрессии задействовано в процессах старения (Sun et al., 2004).

Тогда как молодые монозиготные близнецы практически неотличимы по эпигенетическим маркерам, старые близнецы проявляют значительные вариации. Так, обнаружены глобальные и локус-специфичные различия метилирования ДНК и ацетилирования гистонов. Различия в экспрессии генов у старых пар близнецов в 4 раза больше, чем у молодых (Martin, 2005). В норме одна из X-хромосом в женских соматических клетках инактивирована путем гиперметилирования. С возрастом наблюдается реактивация генов в «выключенной» X-хромосоме (Barbot et al., 2002). Возраст-

зависимое гипометилирование ДНК может вносить вклад в хромосомную нестабильность, вести к активации онкогенов и увеличению частоты опухолей с возрастом. Особенно велика вероятность данных событий в долгоживущих, стволовых, клетках (Oakley, Yan Zant, 2007).

Ретротранспозон *IAP* (intracisternal A-particle), являющийся членом большого семейства строго подавляемых мобильных элементов, активируется с возрастом. Это становится возможным благодаря деметилированию промотора данного транспозона, отмеченному, например, в печени старых мышей. Неконтролируемые перемещения *IAP* могут вызывать дестабилизацию генома, тем более что он представлен в геноме мышей в количестве 1000 копий. Деметилирование также необходимо для индукции эндогенных ретровирусов *MuLV* и *MMTV* у стареющих грызунов. Их инсерция вызывает различные мутации, включая активацию генов-мишеней благодаря энхансерному эффекту. Это может служить причиной эпигенетических и стохастических процессов, таких как включение или выключение различных генов, и вызывать старение клетки (Barbot et al., 2002).

Таким образом, экспоненциальное увеличение количества транспозонов в геноме может быть причиной инактивации существенных генов и приводить к гибели клеточной линии или организма в целом, т. е. транспозоны могут быть причиной старения (Murray, 1990). Корреляция между старением и активностью транспозирующихся элементов проанализирована на разнообразных биологических системах (Nikitin, Shmookler Reis, 1997).

Количество эксцизий элемента *Tc1* на сайт у нематоды *Caenorhabditis elegans* возрастает более чем в 14 раз на протяжении жизни этого организма (Egilmez, Shmookler Reis, 1994). В регуляцию продолжительности жизни особей данного вида вовлечены транспозаза и ретротранспозон-интеграза. Исследования показали, что транспозаза относится к числу генов, чья экспрессия увеличивается при старении, а это может приводить к геномной нестабильности (Hamilton et al., 2006). В то же время гены транспозазы высокоэкспрессированы и у долгоживущих личинок *dauer*, и у мутантов *daf-2*, что должно приводить к общей активации транспозиций. Хотя транспозиции не сопровождаются увеличением продолжительности жизни, а скорее наоборот, у долгоживущих червей они могут быть следствием изменения структуры хроматин, например отклонения от нормы соотношения разных гистоновых белков. У имаго *daf-2* уровень гистонов H2 снижен, а H4 повышен (McElwee et al., 2004).

Соматически активный *D*-элемент значительно снижает продолжительность жизни, половую и физическую активность дроз-

фил. Рекомбинации между повторяющимися последовательностями мобильных элементов в соматических клетках могут вести к перестройкам ДНК. Соматические перемещения Р-элементов у *Drosophila melanogaster* и тягшег-элементов у *D. simulans* значительно снижают продолжительность жизни самцов. У *D. melanogaster* происходит лог-линейное снижение продолжительности жизни с увеличением количества активных Р-элементов. Перемещение даже одного соматически активного Р- или *mariner*-элемента приводит к значительному снижению продолжительности жизни (Woodruff, 1992; Woodruff, Nikitin, 1995; Woodruff et al., 1999). Транспозоны могут участвовать в процессе старения через соматические мутации. Установлено, что по крайней мере два ретротранспозона у дрозофилы (*Copia* и *412*) имеют соматическую активность во взрослых тканях (Driver, McKechnie, 1992). Кроме того, для *Copia* показано значительное повышение с возрастом уровня транспозиций в гаметях (Filatov, Morozova, 1998). Таким образом, индукцию транспозиций можно считать одной из причин возрастной нестабильности генома и клеточного старения.

Таким образом, старение связано со снижением способности поддерживать и репарировать геном соматических клеток. Дестабилизация генома, накопление соматических мутаций и эпигенетических изменений могут обуславливать изменение экспрессии генов, являющееся причиной возрастзависимого нарушения клеточных функций. Кроме того, нестабильность генома может служить причиной увеличения частоты возникновения рака с возрастом.

2.2.2. Синдромы преждевременного старения

Одним из подходов к изучению молекулярных основ старения человека является выяснение причин заболеваний преждевременного старения — так называемых частичных прогерий. В большинстве своем они моногенны, а значит, легко поддаются анализу. К недостаткам данного подхода можно отнести редкость таких заболеваний и то, что иногда их симптомы лишь напоминают свойства нормального старения (Scaffidi et al., 2005). Определенные мутации у человека (табл. 9), вызывающие нарушение стабильности генома, приводят к таким заболеваниям, связанным с признаками преждевременного старения, как синдромы Вернера, Кокейна, Дауна и Хатчинсона—Джилфорда, пигментная ксеродерма, анемия Фалькони, синдромы Ротмунда—Томпсона (RTS), Блума, поломок Ниджмеджена (Nijmegen breakage syndrome —

Таблица 9
 Частичные прогерии (по: Vijg, Suh, 2005; с дополнениями)

| Синдром | Частота встречаемости (на число новорожденных) | Наследование | Возраст начала проявления, лет | Средняя продолжительность жизни, число лет | Гены | Дефект |
|-------------------------|--|-----------------------|--------------------------------|--|---------------------------|---|
| Хатчинсона—Джилфорда | Менее 1 : 1 000 000 | <i>De novo</i> | 2 | 13 | <i>lamin A</i> | Структура ядра, транскрипция, стабильность генома |
| Вернера | Менее 1 : 100 000 | Аутосомно-рецессивное | 25 | 50 | <i>WRN</i> | Репликация и репарация ДНК, функционирование теломер, апоптоз |
| Кокейна | Около 1 : 100 000 | То же | 5 | 20 | <i>CSA, CSB, XPD, XPG</i> | Связанная с транскрипцией эксцизионная репарация |
| Атаксия—телеангиэктазия | Около 1 : 60 000 | » » | 10 | 20 | <i>ATM</i> | Распознавание повреждения ДНК |

NBS), трихотиодистрофия, атаксия—телеангиэктазия и врожденный дискератоз (Woodruff, Thompson, 2003; Carter et al., 2005).

Несмотря на то что прогероидные синдромы характеризуются фенотипами, частично напоминающими ускоренное старение, есть и различия: симптомы при прогериях более выражены и могут появляться в другой последовательности, чем в случае с нормальным старением. Например, рост ногтей замедляется при нормальном старении, тогда как при прогериях с короткими теломерами останавливается полностью. Истончение бровей при старении следует за потерей волос на голове, но, наоборот, предшествует ему при прогериях. Прогероидные синдромы с различными причинами зачастую имеют общие симптомы. Седые волосы, например, являются симптомом синдрома разрывов NBS и прогерии Хатчинсона—Джилфорда. В то же время при синдромах Блума и Кокейна поседения не наблюдается. Нарушение гомологичной репарации двухцепочечных разрывов наряду с потерей остановки в проверочной точке S-фазы приводит при NBS к таким симптомам, как анемия, перепончатые пальцы ног, пятнистая гипопигментация. При прогерии Хатчинсона-Джилфорда дисфункция внутренней стенки клеточного ядра обуславливает отсутствие подкожного жира, атеросклероз и нарушение костей. Две прогерии — RTS и синдром Вернера — имеют в качестве общего симптома остеосаркому. Для трех прогерий — атаксии телеангиэктазии, NBS и синдрома Блума — характерен такой симптом, как пятнистая гипопигментация. Четыре прогерии имеют в качестве общих симптомов атрофию ногтей, облысение и остеопороз (Hofer et al., 2005).

Предполагается, что симптомы, наблюдаемые при прогериях, сопряженных с короткими теломерами (RTS, NBS, прогерия Хатчинсона—Джилфорда, синдром Вернера, атаксия—телеангиэктазия), во многом напоминают нормальное старение (потеря волос, поседение, дистрофия ногтей, снижение костной массы). Вероятно, короткие теломеры вызывают эти симптомы, обуславливая репликативное старение и дисфункцию стволовых клеток (Hofer et al., 2005). Охарактеризуем основные частичные прогерии и молекулярные причины, их вызывающие.

Синдром Вернера — аутосомно-рецессивное заболевание, характеризующееся ранним началом проявления симптомов преждевременного старения кожи, сосудистой и репродуктивной систем, костей (Du et al., 2004). До полового созревания пациенты развиваются нормально. Симптомы старения у них начинают проявляться в ранней зрелости. Уже в молодом возрасте они страдают от катаракт, склеродермальных и дегенеративных сосудистых изменений, диабета и атеросклероза, остеопороза, высокой частоты

ты некоторых видов рака, поселения. Больные преждевременно погибают либо от рака, либо от сердечно-сосудистой патологии. Средняя продолжительность жизни при данном заболевании — 40—50 лет (Kyng et al., 2003; Kurz, 2004; Scaffidi et al., 2005). При близком заболевании — синдроме Блюма у больных отмечены менее выраженные признаки старения — преждевременная менопауза у женщин. Оба синдрома, Вернера и Блюма, характеризуются нестабильностью генома и повышенным риском канцерогенеза, прежде всего возникновения сарком (Du et al., 2004).

Исследование фибробластов больных синдромом Вернера показало снижение их пролиферативной способности и 10-кратное увеличение темпа спонтанных мутаций (Guarente, 1996; Finch, Tanzi, 1997; Sinclair et al., 1998). В лимфоцитах таких больных увеличена частота транслокаций (Sinclair et al., 1998). Клетки пациентов с синдромом Вернера характеризуются длительной S-фазой, дефектной проверочной точкой G₂-фазы клеточного цикла, радиочувствительностью (Adelfalk et al., 2005). Неотъемлемым компонентом патологии данного синдрома являются короткие теломеры (Blasco, 2005). При рождении теломеры соответствуют норме, однако укорачиваются значительно быстрее, чем у здоровых индивидуумов (Kurz, 2004). Фибробласты, полученные от больных с синдромом Вернера, при последовательных пассажах клеточных культур более быстро укорачивают теломеры, чем контроль (Du et al., 2004).

Молекулярная причина синдрома Вернера — единичная мутация в гене *Wrn*, имеющая результатом укорочение аминокислотной последовательности и дисфункцию белка WRN (Kyng et al., 2003). Ген синдрома Вернера у человека локализован в локусе *8p11-12* и кодирует геликазу RecQ-семейства (Jazwinski, 1996; Pennisi, 1996; Adelfalk et al., 2005). В отличие от геликазы синдрома Блюма белок синдрома Вернера содержит еще 3'-5'-экзонуклеазный домен (Du et al., 2004). RecQ 3'-5'-ДНК-геликазы, включая *Sgs1p* дрожжей, а также белки синдромов Вернера (WRN), Блума (BLM) и Ротмунда—Томсона (RTS) у человека, как и ожидалось, принимают участие в поддержании теломер. Например, WRN и BLM взаимодействуют с белком теломерного хроматина TRF2, участвующим в формировании защитных T-петель. Сверхэкспрессия гена *BLM* удлиняет теломеры путем рекомбинации, а комбинирование мутации теломеразы (*Teze*) с *Wrn* и *Blm* у мышей ускоряет дисфункцию теломер (Bitterman et al., 2003; Azam et al., 2006). Благодаря длинным теломерам и сравнительно высокой теломеразной активности мыши с выключенным геном *Wrn* остаются относительно нормальными и не проявляют признаков ускоренного старения. Однако мутации как *Wrn*, так и *Blm* (ген синдрома Блюма)

усиливают патологические проявления у мышей, потерявших ген теломеразной РНК-матрицы *Terc* (Du et al., 2004). Установлено, что основная функция WRN в клетке — реиницирование заблокированных репликационных вилок (Scaffidi et al., 2005). Как уже упоминалось, у дрожжей аналогичная мутация *Sgs1p* вызывает появление повреждений репликационной вилки через спонтанное эндогенное повреждение ДНК и, как следствие, через генетическую нестабильность. Подобный механизм может лежать в основе преждевременного старения при синдромах Вернера, Блума и Ротмунда—Томсона, вызываемых дефектами геликаз (Hoopes et al., 2002). WRN принимает участие и в процессах транскрипции. Общий синтез РНК в фибробластах пациентов с синдромом Вернера составляет 43—90 % от нормы. Таким образом, одной из возможных причин синдрома Вернера является нарушенная экспрессия генов. При исследовании экспрессии 6912 генов в фибробластах показано, что около 6.3 % генов больных синдромом Вернера и старых пациентов значительно отличаются своей экспрессией от клеток молодых доноров. При этом 91 % исследованных генов экспрессируется сходным образом как у старых индивидуумов, так и у больных с синдромом Вернера, 6 % было уникально для нормального старения, 3 % — для синдрома Вернера. Таким образом, следует признать, что синдром Вернера, напоминая отдельными симптомами нормальное старение, вызывается ускорением этого процесса (Kyng et al., 2003).

Наибольшая группа генов, одинаково изменяющих свою экспрессию при старении и у больных синдромом Вернера, связана с процессингом ДНК и РНК. Из них 75 % снижают свою экспрессию. Это касается полипептидов А и J в составе РНК-полимеразы II. Данный фермент транскрибирует огромное количество генов клеточных белков и взаимодействует с разнообразными транскрипционными факторами. Ряд таких транскрипционных факторов характеризуется возрастзависимым спадом активности, среди них фактор Dp-2 (TFDP2) — компонент Drtf1/E2f-комплекса, регулирующего гены белков, определяющих наступление S-фазы клеточного цикла. Снижение экспрессии транскрипционного фактора FOXM1 (HFH-11) наблюдалось ранее и у пациентов с прогерией Хатчинсона—Джилфорда. В обоих случаях подавляется также экспрессия продуктов генов *SMARCA1* и *SMARCB1*, являющихся частью комплекса, открывающего хроматин для облегчения доступа транскрипционной машины к своим мишеням (Kyng et al., 2003).

При синдроме Вернера репрессировано 12 генов, связанных с клеточным ростом. Ослабленная способность отвечать на факторы роста обусловлена снижением экспрессии *BRF2*, кодирующего

ядерный транскрипционный фактор. Ген *CSF3R* кодирует рецептор, трансдуцирующий сигналы, регулирующие пролиферацию, дифференцировку и выживание миелоидных клеток. Его экспрессия также понижается. Редуцируется экспрессия гена рецептора инсулина (*INSR*), инсулиноподобного фактора 2 (*IGF2*) и его рецептора (*IGF2R*), что может определять высокую частоту диабета у больных с синдромом Вернера. Репрессии подвергаются семь генов контроля клеточного цикла и митоза. Напротив, сверхэкспрессируются некоторые онкогены (*NDRG1*, *PIM1*, *RAB11A* и *PIK3CA*) и подавляются опухолесупрессоры (*ST14*, *ST16*, *DKK3*, *BAP1*), что способствует возникновению рака при данном синдроме (Kyng et al., 2003).

При крайне редком заболевании — прогерии Хатчинсона—Джилфорда дети 6-летнего возраста выглядят как пожилые люди и погибают от сильного атеросклероза к 13 годам. Фенотипические признаки данного заболевания включают неспособность к росту, липоатрофию, костные нарушения, маленький клювообразный нос, срезанный подбородок, полную потерю волос, пятнистую гипопигментацию, плотную жесткую кожу. С развитием заболевания сосудистые бляшки становятся проникающими, приводя к сердечным приступам. Дефект обусловлен мутацией гена ламина А (*Lmna*) — структурного белка ядерной оболочки. Мутация при прогерии Хатчинсона—Джилфорда приводит к синтезу укороченной версии белка и соответственно к недостатку уровня ламина А дикого типа. У новорожденных с данным синдромом длина теломера составляет не более половины от таковой у одновозрастного контроля (Kurz, 2004; Scaffidi et al., 2005; Misteli, 2005). Клетки пациентов с этим заболеванием характеризуются генетической нестабильностью (присущей всем синдромам преждевременного старения), у них неэффективно функционирует (привлекается к месту повреждения) ферментная система репарации ДНК (Scaffidi et al., 2005).

По-видимому, молекулярной причиной данного синдрома служат нарушения структуры ядра. Ядро клетки высших организмов — это сложное высокоорганизованное хранилище индивидуальной генетической информации. Типичное ядро содержит особые функциональные области, представленные упорядоченно расположенными хромосомами и белковыми субкомпартаментами, в которых происходят специфические процессы, включая экспрессию генов. В структурной организации ядра важную роль играет ядерная ламина. Она состоит из белков — ламинов А- и В-типов. Эти промежуточные филаментные белки формируют переплетенную сеть, расположенную на периферии ядра и подстилающую ядерную мембрану. Ламина играет регуляторную роль в экспрес-

сии генов, поскольку белки, входящие в ее состав, взаимодействуют с хроматином и могут участвовать в фиксации и организации участков генома в пространстве. Ламина обеспечивает механические и поверхностные свойства ядра и является участком стыковки с периферическим гетерохроматином. Ламины распределены также в нуклеоплазме, где они участвуют в репликации ДНК и транскрипции с участием фермента РНК-полимеразы II. Так, нарушение ядерной ламины, взаимодействующей с хроматином, может приводить к нарушению экспрессии генов (Scaffidi et al., 2005; Shumaker et al., 2006). Прогерия Хатчинсона—Джилфорда сопровождается дефектами в ядерной структуре и функциях: она характеризуется дисморфной поверхностью ядра, увеличением частоты повреждения ДНК, снижением экспрессии ряда ядерных белков, включая гетерохроматиновые белки HP1 и LAP2 (из группы ассоциированных с ламином А белков). В клетках больных прогерией нарушен паттерн модифицированных гистонов: происходит снижение гетерохроматин-специфичного триметилирования Lys9 в гистоне H3 (Scaffidi, Misteli, 2006). Таким образом, ядра клеток больных прогерией Хатчинсона—Джилфорда теряют гетерохроматин. В результате происходит сверхактивация ряда транскриптов, в норме репрессированных, например перичентрического сателлитного повтора III (Shumaker et al., 2006). Коррекция сплайсинга ламина А в клетках пациентов восстанавливает нормальную морфологию ядра, гетерохроматин-специфичную модификацию гистонов, экспрессию ряда дисрегулированных генов (Misteli, 2005).

Другой прогероидный синдром человека — рестриктивная дерматопатия также вызывается дефектом биогенеза ламина А из преламина А, фарнезилированного белка-предшественника. Рестриктивная дерматопатия — летальное перинатальное прогероидное заболевание, характеризующееся задержкой роста, плотной и жесткой кожей, облысением, микрогнатией и другими нарушениями костей. Оно вызывается делецией гена *ZMPSTE24*, кодирующего протеазу, необходимую для эндопротеолитического процессинга преламина А в зрелый ламин (Toth et al., 2005).

Стоит отметить, что, как и в случае с синдромом прогерии Хатчинсона—Джилфорда, клетки больных синдромом Вернера характеризуются деформацией ядер, которая, однако, не связана с нарушением экспрессии ламина А. Возможно, деформация ядра является общим свойством прогероидных клеток (Adelfalk et al., 2005).

Играет ли ламин А роль в естественном старении? Как оказалось, ядра клеток старых индивидуумов имеют нарушения, сходные с дефектами клеток больных прогерией Хатчинсона—Джилфорда, включая изменения в модификации гистонов и высокий

уровень повреждений ДНК. Так, у старых индивидуумов снижаются экспрессия *HP1* и *LAP2*, а также частота гетерохроматин-специфичного триметилирования *Lys9* в гистоне H3. Подобно клеткам больных прогерией, доля ядер с фосфорилированным гистоном H2AX (маркер нерепарированных повреждений ДНК) выше в клетках у старых индивидуумов, чем у молодых. Укороченная форма ламина А, ответственная за фенотип прогерии Хатчинсона—Джилфорда, присутствует в старости и у здоровых индивидуумов. Так же как и у больных, она концентрируется на периферии ядра. По-видимому, p53-зависимая проверочная точка клеточного цикла распознает структурные нарушения ядерной ламины и связывает их с активацией программы старения (Scaffidi, Misteli, 2006).

Эволюционно консервативный механизм эксцизионной репарации нуклеотидов удаляет повреждения, деформирующие спираль ДНК (такие как окислительные повреждения оснований или УФ-индуцированные повреждения) по механизму «разрезания и вставки». Врожденные дефекты эксцизионной репарации нуклеотидов приводят к таким синдромам, как пигментная ксеродерма, синдром Кокейна и трихотиодистрофия (van de Ven et al., 2006).

Пигментная ксеродерма — редкое аутосомно-рецессивное заболевание, характеризуемое гиперчувствительностью к свету, ненормальной пигментацией и предрасположенностью к раку кожи, особенно на подверженных солнечному облучению участках тела. Она вызывается генетическими дефектами раннего этапа эксцизионной репарации нуклеотидов. Существуют семь комплементарных групп генов пигментной ксеродермы (от XPA до XPG). Группа G (*XPG*) кодирует белок, принимающий участие в эксцизионной репарации нуклеотидов. Это кислый белок с молекулярной массой 133 кДа, гомологичный репарационному белку дрожжей *RAD2*. *XPG* имеет структура-специфичную эндонуклеазную активность и функционирует как 3'-нуклеаза в реакции двойного разрезания при эксцизионной репарации нуклеотидов. Гены ксеродермы группы В и D (*XPB*, *XPD*) кодируют субъединицы транскрипционного фактора TFIIH. Мыши с дефицитом *XPG* теряют способность к постнатальному росту и преждевременно погибают. Первичные культуры эмбриональных фибробластов от ХРС-дефицитных мышей подвергаются преждевременному старению и рано накапливают p53. У людей с этим заболеванием (пигментной ксеродермой) имеются различные симптомы от умеренных кожных нарушений до тяжелых ее повреждений (Harada et al., 1999).

Синдром Кокейна — заболевание, связанное с нарушением репарации. Синдром характеризуется неспособностью к постнаталь-

ному росту, короткой продолжительностью жизни и неврологической дисфункцией. Он вызван мутациями в двух генах — *CSA* и *CSB*. Клетки больных чувствительны к ультрафиолету и имеют дефект связанного с транскрипцией механизма эксцизионной репарации нуклеотидов, предназначенного для удаления крупных повреждений транскрибируемых цепей ДНК активных генов (Harada et al., 1999).

У носителей прогерий наравне с ускоренным старением фибробластов и повышенной частотой апоптоза, ассоциированных с нарушениями эксцизионной репарации, в постнатальном периоде отмечается выраженный адаптивный ответ, проявляющийся в изменении энергетического метаболизма, ослаблении соматотропной GH/IGF-1-оси и в расстройстве глюкозного гомеостаза (van de Ven et al., 2006) — таким способом, клетки пытаются скомпенсировать накапливающиеся повреждения.

Наследственные заболевания — врожденный дискератоз (*dyskeratosis congenita*) и атаксия—телеангиэктазия — характеризуются признаками преждевременного старения и короткими теломерами. Врожденный дискератоз существует в двух формах. X-сцепленная форма вызвана мутацией гена белка дискерина, участвующего в процессинге рибосомальной ДНК и в осуществлении функции теломеразы. Аутосомно-доминантная форма вызвана дефектом в гене РНК-компонента теломеразы. Пациенты с врожденным дискератозом имеют низкую активность теломеразы и короткие теломеры; они умирают в ранней зрелости от нарушений в красном костном мозге, рака или легочных осложнений (Kurz, 2004). Некоторые пациенты с врожденным дискератозом характеризуются высокой частотой карцином, что предполагает вклад укорочения теломер в возрастзависимое возникновение рака (Weinert, Timiras, 2003). Пациенты с аутосомно-рецессивным заболеванием атаксией—телеангиэктазией несут мутацию в гене *Atm* (*ataxia teleangiectasia mutated*), кодирующем белок АТМ — главный сенсор повреждения ДНК в клетке. Они страдают от нейрональной дегенерации, преждевременного старения и увеличения частоты неоплазий. *In vitro* клетки таких пациентов ускоренно теряют теломеры вследствие оксидативного повреждения последних (Baskaran et al., 1997; Morgan et al., 1997; Kurz, 2004).

Синдром Дауна вызывается трисомией по 21-й хромосоме. Среди его фенотипов следует отметить раннее начало возрастзависимых патологических изменений и уменьшение продолжительности жизни. В мозгу таких больных обнаруживаются активированные каспаза-3 и каспаза-8, обуславливающие апоптоз нейронов в тех участках, где происходит накопление β-амилоида и нейрофибриллярных бляшек (белок-предшественник амилоида

может быть потенциальным субстратом каспаз). Культивируемые нейроны мышей с трисомией 16-й хромосомы (сходной с 21-й хромосомой человека) имеют меньшую продолжительность жизни, чем нормальные фетальные нейроны и их гибель предотвращается ингибиторами каспаз (Zhang J. et al., 2003).

Таким образом, все известные на данный момент прогерии имеют общее свойство — генетическую нестабильность, заключающуюся в быстром укорочении теломер, накоплении соматических мутаций и эпигенетических изменений (потеря гетерохроматина), возникновении дефектов репликации ДНК и нарушений структуры ядра. Такая дестабилизация обуславливает изменение экспрессии генов, клеточное старение и апоптоз, что и приводит к ускоренному старению организма в целом. Успехи, достигнутые при изучении молекулярных причин прогерий (благодаря их моногенному наследованию), проливают свет на природу «естественного» старения.

2.2.3. p53 — главный хранитель генома

При обнаружении повреждения ДНК клетка активирует проверочные точки, что приводит либо к задержке пролиферации и к репарации повреждений, либо инициирует программируемую гибель для удаления клеток с потенциально вредными мутациями. В противном случае ее потомки станут генетически нестабильными и могут превратиться в раковые клетки. Ключевую роль в проверочной G1-точке клеточного цикла играет транскрипционный фактор p53, действующий как медиатор сигнала от белков, распознающих повреждение ДНК, к нижележащим эффекторам, останавливающим клеточный цикл (Herbig, Sedivy, 2006).

Ген p53 экспрессируется повсеместно, во всех типах клеток, как неактивный латентный транскрипционный фактор, который активируется, только если клетка подвергается различным повреждениям. Главные группы сигналов, которые активируют p53, — это повреждение ДНК (через киназы ATM и Chk), активация онкогенов (через p53-стабилизирующий белок ARF, подавляющий E3-убиквитин-протеинлигазу MDM2, вызывающую деградацию p53) и оксидативный стресс (через повреждение ДНК). Как уже упоминалось в предыдущем разделе, p53-зависимая проверочная точка клеточного цикла сенсорирует также нарушения структуры ядра (Scaffidi, Misteli, 2006). Активация p53 запускает комплекс транскрипционных программ, которые в зависимости от типа клетки и глубины стресса приводят к остановке пролиферации (вре-

менной или перманентной), репарации ДНК или гибели клетки по механизму апоптоза (Garcia-Cao et al., 2002; Pelicci, 2004; Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007). Белок p53 является главным опухолевым супрессором клетки, своеобразным «хранителем» генома, предотвращающим его нестабильность (Pelicci, 2004). Кроме того, среди многочисленных функций p53 следует отметить репликативное старение в ответ на потерю теломера или повреждение ДНК (Weinert, Timiras, 2003). Программа клеточного старения может быть активирована стрессом даже в теломераза-позитивных клетках, например стволовых (стресс-индуцированное старение) (Pelicci, 2004).

Будет ли под действием p53 индуцировано клеточное старение, или же возникает апоптоз — часто зависит от внутриклеточного уровня свободных радикалов. Так, экспрессия активной формы белка протоонкогена RAS может вызывать старение в некоторых первичных культурах фибробластов через повышение уровня активных форм кислорода, сопровождающееся индукцией p53. Добавление антиоксидантов или снижение уровня окружающего кислорода избавляет экспрессирующие RAS клетки от клеточного старения. Белок селадин 1, вовлеченный в метаболизм холестерина, является важным redox-чувствительным посредником между RAS и p53. Выключение гена антиоксидантного фермента (*Sod*) методом РНК-интерференции также индуцирует клеточное старение через активацию p53 (Balaban et al., 2005).

Поскольку старение клеток предотвращает пролиферацию, оно может рассматриваться как механизм подавления опухолеобразования (Campisi, 2005). Действительно, ген *p53* является наиболее часто мутирующим опухолесупрессором в различных типах опухолей (около 50 %). В тех опухолях, в которых p53 не выключен напрямую, нарушено его функционирование, например через мутацию *ARF* (Garcia-Cao et al., 2002).

Каким образом p53 участвует в старении? Белок p53 регулирует скорость старения, в частности, через взаимодействие с продуктами ключевых генов продолжительности жизни. Например, деацетилаза *SIRT1* (см. разд. 3.3), активация которой замедляет старение, регулирует разнообразные белки, включая p53. Деацетилирование подавляет p53-опосредованный апоптоз в ответ на оксидативный стресс и радиацию. Другой важный фактор антистарения клетки — транскрипционный фактор *FOXO3* (см. разд. 3.2) также взаимодействует с p53, особенно в условиях оксидативного стресса (Giannakou, Partridge, 2004). Однако, как оказалось, в ответ на повреждение ДНК p53 подавляет активность *FOXO* (You, Mak, 2005). Белок p53 контролирует также инсулиновый сигналинг (см. разд. 3.1) — уровень рецептора *IGF-1* и активность липид-

протеинфосфатазы **PTEN**, модулирующей трансдукцию сигнала от **IGF** к **Akt** через дефосфорилирование фосфатидилинозитолтрифосфата (Maier et al., 2004). В свою очередь конститутивная активация рецептора **IGF-1** может блокировать **p53**-зависимый апоптоз, индуцированный лишением ростовых факторов. **Akt** также может приводить к задержке **p53**-опосредованного апоптоза (Zhang, Herman, 2002). Наконец, нижележащей мишенью **p53** является ген **p66^{shc}** (Pelicci, 2004). Мыши с делецией гена **p66^{shc}** адапторного белка, необходимого для сигналинга в ответ на появление активных форм кислорода, имеют повышенную устойчивость к **p53**-зависимому апоптозу при УФ-облучении или при обработке пероксидом водорода. Кроме того, для них характерна повышенная продолжительность жизни (Papazoglu, Mills, 2007).

Однако основной механизм **p53**-зависимого старения заключается в ингибировании роста через транскрипционную активацию генов **p21**, **p19** и **p16** — ингибиторов циклин-зависимых киназ (см. разд. 2.1.3) (Cao et al., 2003).

Роль **p53** в клеточном старении доказали ранние эксперименты, проведенные в 80-х годах XX века. При помощи вирусных онкобелков инактивировали **p53** и белок ретинобластомы **Rb** и тем самым увеличивали репликативную продолжительность жизни клеток человека в культуре. Эти данные были воспроизведены множеством других методов, включая антисмысловые олигонуклеотиды к гену **p53** (РНК-интерференция), доминантно-негативные **p53**-мутанты, антитела к белку **p53**, делеционные **p53**-мутанты. Инактивация киназы **Chk2** подавляет активирование **p53** и увеличивает продолжительность жизни фибробластов человека. Выключение генов **p53**, **Rb** или **p21** позволяет клеткам избежать репликативного старения и вступить в фазу продления жизни, заканчивающуюся, однако, вторым пролиферативным барьером — так называемым «кризисом», приводящим к массовой гибели из-за хромосомной нестабильности (Herbig, Sedivy, 2006).

Несмотря на то что в стареющих фибробластах уровень белка **p53** или его мРНК не увеличивается, возрастает степень его фосфорилирования, а следовательно, и транскрипционная и ДНК-связывающая активность. В то же время уровень белка **p21**, основной мишени **p53**, в стареющих клетках значительно повышен, причем он нарастает с числом клеточных делений, что связано с увеличением фракции клеток с высоким уровнем **p21**. Напротив, **p21** не индуцируется в клетках с отсутствием активности **p53** (Herbig, Sedivy, 2006).

Как оказалось, **p53** играет определяющую роль при старении не только пролиферирующих клеток, но и постмитотиче-

ских. По-видимому, здесь идет речь прежде всего о p53-зависимом апоптозе. Например, у постмитотического организма *Drosophila melanogaster* p53 играет важную роль в старении. Подвергшиеся радиации личинки дрозофилы, потерявшие p53, имеют меньше шансов сформировать жизнеспособную особь. Однако экспрессия доминантно-негативных, неспособных связываться с ДНК вариантов p53 в нейронах взрослых особей дрозофил приводит к увеличению медианной и максимальной продолжительности жизни соответственно на 11—26 и 10—16%. Устойчивость к тепловому шоку и голоданию, спонтанная физическая активность и плодовитость у таких мух не отличалась от этих показателей в контроле, хотя устойчивость к индуктору активных форм кислорода параквату возрастала. Поскольку p53 у дрозофилы контролирует в основном стресс-индуцированный апоптоз, снижение его активности может продлевать жизнь путем снижения апоптоза незамещаемых постмитотических клеток (Bauer et al., 2005). Транскрипционный профиль при старении постмитотических скелетных мышц у мышей связан с повышенной активностью p53. Так, например, уровень экспрессии четырех основных медиаторов p53-индуцируемого апоптоза (*puma*, *nox*, *tnfrsf10β* и *Бок*) с возрастом достоверно повышался. Аналогичным образом в мышечной ткани старых мышей возрастает уровень других важных транскрипционных мишеней p53, а именно *p21* и *GADD45a* (Edwards et al., 2007).

Если роль активного p53 в старении клеток можно считать доказанной, то участие p53 в старении организма в целом вызывает бурные дискуссии. Основной вопрос в этом споре: ускоряет или замедляет старение повышенная активность p53?

Различные линии мышей с измененными (сверхактивными) формами p53, например *p53^{+/m}*, *pL53* и *P^{+/+}*, характеризуются ускоренным старением. Эти мыши имеют малую продолжительность жизни, лордокифоз, возрастзависимое снижение массы тела, истончение кожи и костей (Papazoglu, Mills, 2007). Умеренное увеличение активности укороченной версии белка p53 (p44) приводит к парадоксу: наравне со снижением частоты опухолей у мышей происходит снижение продолжительности жизни, вероятно, опосредованное IGF-1-сигналингом (Maier et al., 2004; Campisi, 2005; Gentry, Venkatachalam, 2005). Наблюдения на выборке из более чем 1000 человек старше 85 лет показали: несмотря на то что ослабленный генотип *p53^{Pro/Pro}* увеличивает риск рака по сравнению с генотипом *p53^{Arg/Arg}* в 2.5 раза, он увеличивает выживаемость на 41 %, т. е. p53 защищает от рака ценой снижения продолжительности жизни (Bauer et al., 2005; Papazoglu, Mills, 2007).

Согласно распространенному мнению, эти результаты поддерживают гипотезу антагонистической плейотропии, предсказывающую вредный эффект опухолесупрессорных генов в поздней фазе жизненного цикла, и подтверждают роль p53 в клеточном старении. Однако не все эффекты у мышей этих линий связаны именно с p53, поскольку делеция, приводящая к появлению укороченной версии белка, затрагивает также близлежащие гены, например *Chd3* (кодирует белок, связывающийся с геликазами) и некоторые другие (Gentry, Venkatachalam, 2005).

Наконец, мыши с добавочными копиями гена p53, находящимися под нормальным генетическим контролем экспрессии, характеризуются усиленным ответом на повреждение ДНК (что выражается в усиленной активации мРНК p21 и апоптоза в тимусе) и низкой частотой рака, однако не проявляют признаков ускоренного старения. В результате фенотип ускоренного старения у них обнаруживается только в ответ на стресс. Груз связанных с теломерами повреждений ДНК значительно снижается у мышей «супер p53» на фоне подавления теломеразы по сравнению с делецией теломеразы в клетках с p53 дикого типа. Таким образом, p53 эффективно элиминирует клетки с поврежденными теломерами (Garcia-Cao et al., 2002; Papazoglu, Mills, 2007). Мыши, экспрессирующие лишь 30 % Mdm2 — белка-ингибитора p53, реже заболевают раком, характеризуются повышенным p53-зависимым апоптозом, проявляют ряд возраст-ассоциированных фенотипов (лимфопения и снижение массы тела), но живут не меньше дикого типа (Papazoglu, Mills, 2007). Мыши с усиленной, но нормально регулируемой активностью p53 и его позитивного регулятора ARF (*Cdkn2a*) устойчивы к раку и имеют сниженный уровень возраст-ассоциированных повреждений. Поскольку ARF/p53 сенситивен к старению-ассоциированным повреждениям, не удивительно, что у таких мышей ниже количество окисленных (карбонилированных) белков. Важно подчеркнуть, что медианная продолжительность жизни этих мышей была выше на 16 %. Возможно, что в ответ на возрастзависимое повреждение клетки сверхактивный p53 индуцировал антиокислительную защиту, что способствовало долгожительству (Matheu et al., 2007).

У мышей с мутацией родственного p53 белка p63 (*p63^{+/-}*), регулирующего пролиферацию и дифференцировку, наблюдаются снижение продолжительности жизни и признаки преждевременного старения. Таким образом, роль p63 антагонистична функции белка p53. Дефицит p63, вызванный как в половых, так и в соматических клетках, активизирует повсеместное старение клеток, характеризующееся всеми биомаркерами старения, такими как наличие старение-ассоциированной β-галактозидазы, PML и p16^{INK4a}

(Keyes et al., 2005). Белок p63 участвует в пополнении эпителия в коже через поддержание пула стволовых клеток. Белок DNp63 α (изоформа p63) стимулирует пролиферацию кератиноцитов, выступая в качестве транскрипционного репрессора ингибиторов клеточного цикла p21 и 14-3-3. При выходе из клеточного цикла и индукции дифференцировки клеток эта изоформа перестает накапливаться, высвобождая ингибиторы клеточного цикла. В старении клеток задействованы и другие изоформы p63. Делеция p53 отменяет старение, индуцируемое потерей p63, предполагая взаимодействие между этими белками (Keyes et al., 2005). Белок p53 подавляет определенные изоформы p63 — усиленная активность p53 в ответ на УФ- или у-излучение снижает экспрессию p63 (Pa-pazoglu, Mills, 2007).

Таким образом, подавление функции «гена-контролера» p53 приводит к генетической нестабильности и раку, тогда как его эктопическая сверхактивация может повышать стабильность генома ценой ускоренного клеточного старения. Повышенная активность p53 под нормальным генетическим контролем снижает частоту возникновения рака, не изменяя или слегка повышая продолжительность жизни. Роль p53 в старении также обусловлена его способностью вызывать программированную гибель клетки (апоптоз) в ответ на повреждение ДНК.

2.3. Апоптоз

Многочлеточные организмы наравне с возможностью регенерации и пролиферации тканей приобрели механизмы регуляции роста поврежденных клеток, наиболее важные из которых — апоптоз и клеточное старение. Клеточное старение детально рассмотрено в предыдущих разделах главы. В свою очередь апоптоз играет важную роль в различных физиологических процессах, таких как онтогенетическое развитие (дифференцировка органов и тканей), надзор за вирус-инфицированными клетками, иммунный ответ, элиминирование ненужных или поврежденных клеток в постнатальном периоде, подавление опухолевого роста (Wojda, Witt, 2003; Zhang et al., 2003; Longo et al., 2005). При этом в качестве побочного процесса апоптоз обуславливает старение организма, поскольку приводит к гибели постмитотических, стволовых или подвергшихся репликативному старению клеток и в результате к дегенеративным изменениям в тканях (Keyes et al., 2005).

2.3.1. Молекулярно-генетические механизмы апоптоза

Апоптоз — это активный процесс с характерными морфологическими изменениями, проявляющимися в конденсации хроматина, фрагментации ядерной ДНК, сморщивании клетки, «вспенивании» плазматической мембраны, а также в формировании окруженных мембраной фрагментов (апоптозных телец). На молекулярном уровне происходит активация протеаз (каспаз) и ДНКаз, приводящая к разрушению специфических белков и нарушению целостности хромосом. Затем апоптозные клетки фагоцитируются, что позволяет избежать воспаления (Zhang, Herman, 2002; Zhang J. et al., 2003; Fan et al., 2005).

Апоптоз регулируют два главных механизма (рис. 2): внутренний, в котором центральную роль играет митохондрия, и внешний, в котором стартовой точкой являются рецепторы плазматической мембраны (Зайнуллин, Москалев, 2001; Zhang J. et al., 2003). В обоих механизмах определяющее значение имеет активация каспаз. Каспазы — группа цистеинзависимых аспартат-специфичных протеаз. Первая каспаза (Ced-3) была обнаружена у *Caenorhabditis elegans*. У млекопитающих в настоящий момент известно 14 каспаз. Каспазы-1, 4, 5 и 11 отвечают за регуляцию воспаления, каспаза-14 участвует в дифференцировке кератиноцитов. Остальные каспазы группируются в два субсемейства — инициаторных (апикальных) и эффекторных (исполняющих) — и играют важную роль в апоптозе. В клетке они представлены в виде зимогенов (прокаспаз). При активации каждая молекула каспаз разрезается и высвобождает малую и большую субъединицы. Две большие и две малые формируют тетрамерный активный фермент (Zhang J. et al., 2003; Fan et al., 2005).

При внешнем механизме апоптоза (рис. 2) на поверхности клетки активируется рецептор гибели (например, Fas), который связывается со своим лигандом, что запускает тримеризацию самого рецептора и приводит к присоединению к нему с внутриклеточного конца адапторной молекулы (например, FADD). К такому сигнальному комплексу (DISC) присоединяется прокаспаса-8, и происходит ее активация. Активная каспаза в свою очередь разрезает и активирует эффекторные каспазы, например каспазу-3 (Zhang J. et al., 2003; Fan et al., 2005).

Разнообразные стимулы (оксидативный стресс, повреждение ДНК и ингибирование киназ) могут индуцировать внутренние пути апоптоза (Zhang, Herman, 2002). Во внутреннем механизме (рис. 2) различные апоптоз-индуцирующие сигналы прямо или опосредованно изменяют проницаемость митохондриальной мемб-

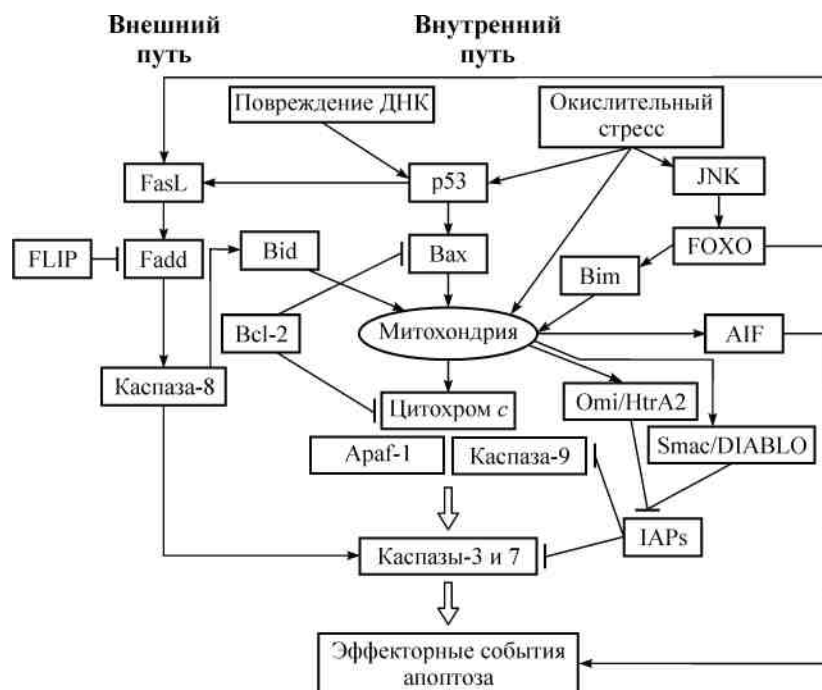


Рис. 2. Внешний и внутренний пути регуляции апоптоза и их взаимодействие.

раны и приводят к высвобождению митохондриальных белков, включая цитохром *c*. В цитоплазме прокаспаса-9, АРАФ-1 и цитохром *c* объединяются в апоптосому. В апоптосоме АТФ-зависимым образом разрезается прокаспаса-9, которая затем активирует нижележащие каспазы (Zhang J. et al., 2003; Fan et al., 2005).

Активированные эффекторные каспазы отвечают за протеолитическую деградацию широкого спектра клеточных белков, что приводит к возникновению апоптотических морфологических изменений (Zhang J. et al., 2003). Например, каспаза-3 может разрезать ингибитор каспаза-активируемой ДНКазы (ICAD), приводя к высвобождению активной ДНКазы (CAD) и межнуклеосомальному расщеплению ядерной ДНК. Каспазы-3 и 7 могут разрезать поли(АДФ-рибозо)полимеразу (PARP) — фермент, вовлеченный в механизмы репарации ДНК. Каспаза-6 расщепляет ламин А, что необходимо для конденсации хроматина и сморщивания ядра при апоптозе.

Существуют и каспазанезависимые пути апоптоза. Апоптоз-индуцирующий фактор (AIF), локализованный в межмембранном

пространстве митохондрий, высвобождаясь, переносится в ядро, где индуцирует апоптоз. Некаспазные протеазы (катепсины, кальпаины, гранзимы и эндонуклеаза G) могут индуцировать апоптоз независимо или совместно с каспазами (Zhang, Herman, 2002; Zhang J. et al., 2003; Fan et al., 2005).

Каждая клетка балансирует между продолжением существования и гибелью. Важную регулирующую роль в принятии решения играют 20 членов семейства Bcl-2. Одни из них обладают антиапоптотной, другие — проапоптотной активностью. Белки семейства Bcl-2 делятся на три подсемейства: собственно Bcl-2 (B-cell leukaemia/lymphoma 2), Bax (Bcl-2-associated X protein) и BH3. Все они влияют на высвобождение из митохондрий цитохрома c и активацию каспазы-9 (Zhang J. et al., 2003).

Как происходит инициация внутреннего апоптотического пути? Критический шаг в этом процессе — перемещение белка Bax из цитоплазмы к внешней митохондриальной мембране, что влечет за собой высвобождение из митохондрий цитохрома c. Затем происходят цитохром-зависимая активация каспаз и разрезание PARP. В нормальных условиях Bax остается в цитоплазме в неактивной форме, связанным с фактором репарации ДНК Ku70. В ответ на повреждение клетки или стресс Ku70 ацетируется ацетилтрансферазами CBP и PCAF, в результате чего взаимодействие между Ku70 и Bax нарушается, что позволяет Bax переместиться к митохондриям и инициировать апоптоз (Cohen et al., 2004).

Очевидно, что организм постоянно подвергается различным стрессам. Было бы губительным, если бы клетка не могла предотвращать инициацию апоптоза при незначительных повреждениях, которые она в состоянии репарировать. Переход клетки к апоптозу определяется тяжестью полученного повреждения и порогом активации апоптоза, заданным концентрациями эндогенных его ингибиторов — IAP. У человека их не менее восьми. IAP локализуются в цитозоле и связываются или с активированными формами эффекторных каспаз (каспаза-3), или с зимогенными формами (прокаспаза-9), ингибируя их функцию. За подавление активности IAP отвечают два белка — Smac/DIABLO и Omi/HtrA2. Присоединяясь к IAP, они приводят к высвобождению связанных каспаз и запускают их активацию. Эти два белка локализованы в межмембранном пространстве митохондрии и высвобождаются в цитозоль при апоптозе. Во внешнем пути есть свои ингибиторы. Эндогенный FLIP (FADD-подобный ICE-ингибирующий белок) может предотвращать активацию каспазы-8 путем блокирования домена гибели FADD. Рецепторы-ловушки, такие как DcR3, не содержащие внутриклеточных доменов гибели, могут улавливать

сигналы гибели (Fas-лиганд) и таким образом предотвращать апоптоз (Zhang, Herman, 2002; Zhang J. et al., 2003; Fan et al., 2005).

Внутренние, внешние и некаспазные пути могут взаимодействовать и регулировать друг друга. При активации внешнего механизма каспаза-8 разрезает Bid — член подсемейства BH3, который в результате транслоцируется в митохондрии и приводит к высвобождению цитохрома *c*. Высвобождение из митохондрий AIF может также зависеть от активации каспаз (Zhang J. et al., 2003; Fan et al., 2005).

После того как мы рассмотрели молекулярно-генетические механизмы апоптоза, перейдем к выяснению их возрастзависимой модификации и анализу вклада самого феномена апоптоза в старение организма.

2.3.2. Роль апоптоза в старении

В начале 80-х годов XX века впервые было высказано предположение о том, что старение может быть следствием плейотропного эффекта группы генов, несущих информацию об апоптозе. С одной стороны, эта программа необходима для развития и функционирования многоклеточного организма, с другой стороны, она делает неизбежной гибель клеток у взрослого организма (Уманский, 1982). Другими словами, дерегуляция контроля апоптоза может являться фактором, лимитирующим скорость старения (Tomei, Umansky, 1998). Возможны два способа участия апоптоза в процессе старения (Warner, 1997; Warner et al., 1997): во-первых, устранение поврежденных стареющих клеток (например, фибробластов и гепатоцитов), которые затем могут быть заменены путем пролиферации, сохраняет тканевой гомеостаз, во-вторых, элиминация постмитотических клеток (например, нейронов, кардиомиоцитов), которые не могут быть заменены, ведет к патологии.

В то же время при старении отдельные типы клеток теряют способность подвергаться апоптозу, что может служить причиной избыточного накопления нефункциональных стареющих клеток, аутоиммунных заболеваний (ревматоидный артрит) или канцерогенеза. Таким образом, частью феномена старения может являться как увеличение чувствительности клеток к апоптозу, так и ее снижение, т. е. тканеспецифическая дерегуляция апоптоза (Зайнуллин и др., 1999; Зайнуллин, Москалев, 2001).

Для одноклеточного организма целесообразность программированной гибели клетки проблематична, поскольку речь идет о феноптозе — уничтожении всего организма. Однако, как оказалось, аналог апоптоза есть и в клетках дрожжей. Дрожжи с возрастом

подвергаются альтруистической программе старения и гибели, запускаемой внешнесредовыми факторами (такими как H_2O_2 , уксусная кислота, растительный антибиотик осмотин, половой феромон дрожжей и этанол). Сверхэкспрессия человеческого Bcl-2 в клетках дрожжей задерживает старение и гибель как клеток дикого типа, так и клеток, потерявших супероксиддисмутазу. Когда проапоптотный белок млекопитающих Bax экспрессируется у *Saccharomyces cerevisiae*, это стимулирует гибель клетки. У *S. cerevisiae* обнаружены даже каспазо-подобные протеазы, вовлеченные в апоптотический каскад (Bitterman et al., 2003; Fabrizio et al., 2005a; Longo et al., 2005).

Зачем нужен одноклеточному организму механизм апоптоза? Возможно, что в условиях перенаселения и недостатка пищевых ресурсов большая часть популяции должна пожертвовать собой ради выживания хотя бы немногих клеток, которые после нормализации внешних условий восстановят популяцию.

Обнаружение апоптотической активности у взрослого постмитотического организма однозначно могло бы свидетельствовать о роли апоптоза в естественном старении, поскольку убыль клеток при отсутствии компенсаторной пролиферации ведет к постепенной дегенерации тканей. Действительно, возрастная динамика активности каспаз и фрагментации ДНК показала, что у имаго дрозофил апоптоз имеет место. Например, постепенным увеличением уровня апоптоза характеризуются мышечные клетки, что соответствует накоплению в них оксидативных повреждений. У старых мух происходит активация апоптоза в жировых клетках. В то же время в нервных клетках дрозофил не происходит изменения уровня апоптоза с возрастом (Zheng et al., 2005a). Экспрессия доминантно-негативной формы p53 (подавляющей апоптоз) дрозофил в нейронах взрослого животного продлевает жизнь. Однако экспрессия антиапоптотных генов (гена ингибитора каспаз бакуловирусного белка p35, гена доминантно-негативного варианта каспазы DRONC, гена ингибитора апоптоза dIAP1) в нервной системе мух не замедляла старения. Либо снижение активности p53 продлевает жизнь не через ингибирование апоптоза нейронов, либо это — каспазанезависимые пути клеточной гибели. Тем не менее экспрессия проапоптотных белков (Grim, Eiger, DRONC) в нервной системе дрозофил приводит к снижению продолжительности жизни. Для сравнения отметим, что экспрессия регуляторов клеточного цикла в этих клетках не влияет на продолжительность жизни (Bauer et al., 2005).

Исследования апоптоза при старении млекопитающих выявили множество примеров возрастзависимой дерегуляции этого процесса и позволили установить некоторые механизмы этого

явления. Была также показана связь программированной гибели клетки с различными старение-ассоциированными заболеваниями. Кроме того, оказалось, что старение многих типов клеток связано с изменением их чувствительности к апоптозу. Как уже упоминалось, эффективный путь, для того чтобы сохранить функциональность ткани и обойти старение, — это запуск программированной гибели поврежденных клеток и замена их новыми здоровыми клетками. Однако с возрастом репликативные способности клеток иссякают, что в комплексе с апоптозом приводит к нарушению тканевого гомеостаза — убыли количества функциональных клеток. Апоптоз неделящихся клеток, таких как нейроны, кардиомиоциты и клетки ретикулярного пигментного эпителия, является ключевой причиной возрастзависимых дегенеративных изменений. Так, например, болезни Альцгеймера и Паркинсона связаны с преждевременной гибелью нейронов, аутоиммунные болезни и рак — с гибелью Т-клеток, саркопения и кардиопатии — с гибелью клеток скелетных мышц и сердца (Zhang J. et al., 2003; Terman et al., 2007).

Анализ экспрессии генов скелетной мышцы старых мышей выявил р53-зависимую активацию ряда проапоптотических генов (Edwards et al., 2007). Сравнение активности некоторых каспаз (каспаза-2, 3, 6, 7, 9) в печени, селезенке и легких молодых (6 месяцев), зрелых (12—14 месяцев) и старых (24—26 месяцев) крыс показало ее достоверное возрастзависимое увеличение, тогда как каспаза-8 не индуцировалась. Кроме того, клетки селезенки и тимуса стареющих крыс проявляют повышенную активность таких проапоптотических белков, как р53 и Вах, а также характеризуются разрезанием PARP, как при апоптозе (Zhang J. et al., 2003). Обнаружились различия экспрессии генов в гипоталамусе и в коре молодых и старых мышей: сверхактивация каспазы-6 и снижение экспрессии белка защиты от гибели клетки **Dad1** у последних. Кроме того, экспрессионные уровни многих АТФаз, включая Na^+/K^+ -АТФазу, Ca^{2+} -АТФазу и H^+ -АТФазу, снижаются в несколько раз, что приводит к нарушению кальциевого сигналинга (росту внутриклеточной концентрации кальция) и может индуцировать апоптоз (Jiang et al., 2001). В гиппокампе мозга крыс активность каспазы-3 была выше у старых (22-месячных) животных, чем у молодых (4-месячных). Другие маркеры апоптоза, такие как цитоплазматический цитохром **c**, разрезание PARP и окрашивание дУТФ в ядре, также свидетельствовали об активации апоптоза (Zhang J. et al., 2003). При старении в коре почек самцов крыс наблюдается усиленная экспрессия мРНК генов, ассоциированных с активной клеточной гибелью: **SGP-2**, генов катепсина-В и тканевой трансглутаминазы (Singhal et al., 1997). Уровень фрагментации ДНК, интерпретируе-

мый как апоптотические изменения, значительно выше в ооцитах старых мышей по сравнению с молодыми и зрелыми особями. Таким образом, апоптоз ооцитов может быть одной из причин снижения плодовитости (Fujino et al., 1996).

Было выявлено, что у человека уровень мРНК каспаз также возрастает у пожилых (70—89 лет) и очень старых (более 90 лет) индивидуумов. У последних преобладают каспазы-1 и 3, а у пожилых — каспаза-8. Первичные эндотелиальные клетки человеческой легочной артерии, подвергающиеся репликативному старению *in vitro*, характеризуются различными апоптотическими маркерами — морфологическими изменениями, снижением уровня Bcl-2 и усилением активности каспазы-3 (Zhang J. et al., 2003). Клетки эндотелия сосудов *in vivo* с возрастом становятся более чувствительными к недостатку факторов роста, что в результате приводит к их гибели по механизму апоптоза (Varani et al., 1995). Старение мегакариоцита, дающего начало тромбоцитам, также завершается его апоптотической гибелью (Zauli et al., 1997).

Одним из механизмов, ответственных за лимфопению и недостаток Т-клеток, является возросший апоптоз. Кроме того, апоптоз макрофагов, спленоцитов и тимоцитов, играющих важную роль в регуляции иммунного ответа, повышается с возрастом (Chrest et al., 1995; Herndon et al., 1997; Mountz et al., 1997; Singhal et al., 1997; Aggarwal, Gupta, 1998). Т-лимфоциты у стареющих людей сверхэкспрессируют каспазы-8 и 3. Эти клетки также характеризуются возросшей экспрессией проапоптотических белков Fas и Fas-лиганда, FADD и Bax, а также сниженной экспрессией антиапоптотического Bcl-2 (Zhang J. et al., 2003). Т-клеточные линии, полученные от людей, страдающих синдромами преждевременного старения, проявляют высокую чувствительность к Fas-опосредованному апоптозу. Повышение экспрессии апоптотического рецептора Fas и его лиганда и снижение экспрессии Bcl-2 происходят в CD4⁺ и в CD8⁺ Т-клетках при старении (по сравнению с молодым контролем). С возрастом в сыворотке крови наблюдается значительное накопление растворимой формы Fas. Экспрессия проапоптотического фактора Bax возрастает в лимфоцитах при старении как на уровне мРНК, так и на уровне белка. Кроме того, с возрастом увеличивается соотношение проапоптотического фактора Bax и антиапоптотического Bcl-x_L, что повышает чувствительность клетки к апоптозу. Стимуляция рецепторного CD3/TCR-комплекса на поверхности тимоцитов антителами более эффективно индуцирует апоптоз клеток у наиболее старых особей. С возрастом также снижается ингибирующее действие цинка на апоптоз.

Таким образом, изменение соотношения про- и антиапоптотических факторов в клетках иммунной системы может быть причиной

иммунного старения в целом (Chrest et al., 1995; Seishima et al., 1996; Herndon et al., 1997; Mountz et al., 1997; Singhal et al., 1997; Aggarwal, Gupta, 1998; Provinciali et al., 1998). Чувствительность полиморфноядерных гранулоцитов к апоптозу при старении возрастает, что также играет немаловажную роль в старческих патологиях, связанных с иммунной системой, таких как рак, инфекционные и аутоиммунные заболевания (Fulop et al., 1997). При старении значительно возрастает продукция TNF макрофагами, Т- и В-клетками. TNF способен индуцировать апоптоз клеток-мишеней в ответ на стимуляцию иммунокомпетентных клеток (Han et al., 1995).

Старение человека ассоциировано с развитием гломерулосклероза и интерстициального фиброза, а также постепенным снижением почечной функции. В областях фиброза наблюдается возрастание апоптоза (Thomas et al., 1998). Апоптоз мезангиальных клеток — звено патогенеза гломерулосклероза почек (Ono, Ono, 1997).

Исследование процесса апоптоза хондроцитов в суставных хрящах мышей и крыс, а также в межпозвонковых дисках при старении человека показало повышение уровня этого типа клеточной гибели, что может увеличивать риск возрастной хрящевой дегенерации (Adams, Horton, 1998; Gruber, Hanley, 1998). Образующие хондроцитами апоптотические тела проявляют функциональные свойства (содержат щелочную фосфатазу, преципитируют кальций), которые могут способствовать кальцификации хряща, наблюдаемой при старении (Hashimoto et al., 1998).

Старение усиливает апоптоз гепатоцитов при нормальных физиологических условиях, что связано с возрастным повышением их чувствительности к программируемой гибели клетки. Возможно, это объясняется сверхэкспрессией Fas. Старение сопровождается увеличением количества TUNEL-окрашиваемых (апоптотических) гепатоцитов (Higami et al., 1997).

В некоторых тканях с возрастом, напротив, происходит снижение чувствительности к апоптозу. В стареющей слизистой толстого кишечника крыс активность каспаз-3, 8, 9 и проапоптотического белка Bak снижена, так же как активность процесса разрезания фермента PARP, однако уровень антиапоптотического белка Bcl-x_L, наоборот, повышен. Это может служить одной из причин увеличения с возрастом частоты рака кишечника (Zhang J. et al., 2003). Возраст-ассоциированное увеличение в толстом кишечнике экспрессии антиапоптотического антигена CD44 также может иметь потенциальное значение в возникновении рака (Englander, 2005). При старении клеток печени наблюдается повышенная экспрессия антиапоптотических белков Mcl1 и Api6, а также шаперонов, что может стимулировать опухолеобразование (Cao et al., 2001). Дав-

но установлено, что стареющие фибробласты приобретают выраженную устойчивость к апоптозу — они теряют способность снижать экспрессию антиапоптозного гена *bcl-2* в ответ на апоптотический сигнал. При этом апоптоз стареющих фибробластов блокирован даже в случае получения инициирующего сигнала. Такое состояние может нарушать функцию соединительной ткани, приводя к накоплению нефункциональных стареющих клеток (Wang et al., 1994; Wang, 1995, 1997; Chang, 1997; Salminen et al., 1997; Warner et al., 1997). Однако в последнее время появились данные, противоречащие нечувствительности фибробластов к апоптозу. При нормальном старении в фибробластах снижается активность четырех негативных регуляторов апоптоза (TIAF1, DAD1, Bcl-2a1 и BECN1), что, напротив, предполагает некоторое повышение их чувствительности к апоптозу. Эта точка зрения подтверждается увеличением экспрессии гена *TNFRSF10β*, кодирующего рецептор фактора некроза опухолей. В то же время при нормальном старении снижается экспрессия двух проапоптозных генов: гена транскрипционного фактора *REQ*, необходимого для индукции апоптоза, и гена *MAPK*-активируемого домена гибели (Kyng et al., 2003).

Наконец, существуют клетки, чувствительность которых к апоптозу не претерпевает заметных изменений. Это касается человеческих кератиноцитов, подвергающихся клеточному старению *in vitro* (Norsgaard et al., 1996).

Таким образом, в одних типах тканей старение сопровождается повышением уровня апоптотической гибели клетки (нейроны, миоциты, клетки иммунной системы), тогда как в других либо возможна устойчивость к апоптозу (фибробласты, клетки кишечного эпителия), либо изменения отсутствуют (кератиноциты).

По-видимому, гены продолжительности жизни обуславливают долгожительство, в том числе и через регуляцию апоптоза. Тогда как одной из главных причин старения является потеря постмитотических клеток, деацетилаза *SIRT1* сохраняет жизнь таким клеткам. Она деацетилирует белок репарации ДНК *Ku70*, что приводит к удержанию проапоптозного фактора *Bax* в цитоплазме. При обработке клеток резвератролом (агонистом *SIRT1*) или в результате сверхэкспрессии *SIRT1* *Bax*-индуцированный апоптоз подавляется. Экспрессия доминантно-негативного *SIRT1*, напротив, увеличивает чувствительность клеток к *Bax*-опосредованному апоптозу и стимулирует разрезание *PARP* (Cohen et al., 2004). Кроме того, *SIRT1* может связывать и деацетилировать транскрипционный фактор *FOXO*, увеличивая устойчивость клеток млекопитающих к апоптозу, индуцированному повреждением ДНК (Berdichevsky et al., 2006). *SIRT1* также подавляет апоптоз, инду-

цируемый p53. Напротив, мышцы с нокаутом SIRT1 характеризуются гиперацетилизацией p53 и повышенным уровнем апоптоза тимоцитов и сперматогониев (Motta et al., 2004). В то же время регулирующие стерсоустойчивость и старение компоненты инсулин/IGF-1-сигналинга вовлечены в регуляцию апоптоза. Конститутивная активация рецептора IGF-1 у млекопитающих может блокировать p53-зависимый апоптоз, индуцированный лишением ростовых факторов. Протеинкиназа АКТ может напрямую фосфорилировать Bad — проапоптотный член семейства Bcl-2, что приводит к его депонированию в цитоплазме с участием 14-3-3-белков. Данное событие предотвращает связывание Bad с антиапоптотным белком Bcl-x_L и в результате ингибирует Bad-опосредованный апоптоз. АКТ также может фосфорилировать прокаспазу-9, предотвращая ее активацию (Zhang, Herman, 2002).

Гормон эпифиза мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамин) привлекает к себе заслуженное внимание благодаря многим положительным эффектам на биологические системы различной сложности. В частности, широко известны его регуляторное влияние на процессы циркадной ритмичности животных и антиоксидантное действие. В некоторых экспериментах воздействие мелатонина замедляло процессы старения и продлевало жизнь подопытных животных. При старении организма млекопитающих наблюдается постепенное снижение биосинтеза мелатонина, что является следствием уменьшения адренергической иннервации и количества •-адренергических рецепторов на поверхности пинеалоцитов. В то же время известно, что мелатонин обладает выраженным антиапоптотным эффектом. Он повышает экспрессию в нервной ткани Mn- и Cu,Zn-SOD, защищая нейроны от апоптоза, опосредованного активными формами кислорода и накоплением Ca²⁺ (Анисимов, 1997, 2003; Pappolla et al., 1997). Кроме того, мелатонин предотвращает апоптоз тимоцитов, а хроническая обработка мелатонином старых мышей предотвращает возрастзависимую инволюцию тимуса (Sainz et al., 1995; Provinciali et al., 1996).

Стареющие ткани характеризуются состоянием хронического оксидативного стресса, который может являться одной из причин апоптоза. Клеточные ответы на оксидативный стресс регулируются протеинкиназами. Данный вид стресса у млекопитающих индуцирует киназу MST1, которая опосредует гибель нейронов через активацию транскрипционного фактора FOXO (Lehtinen et al., 2006). Еще одним из механизмов ответа на окислительный стресс является активация апоптоз-стимулирующей киназы 1 (ASK1) (Hsieh, Papaconstantinou, 2006). Белок p66 фосфорилируется после обработки оксидантами, участвуя в стресс-индуцированном апоптозе. Мутация в гене p66^{shc} продлевает жизнь мышей примерно

на 30 %. Клетки, полученные от данного мутанта, устойчивы к р53-зависимому апоптозу, возникающему под действием оксидативного стресса (Guarente, Kenyon, 2000; Papazoglu, Mills, 2007). Таким образом, на сегодняшний день известны некоторые возможные механизмы возрастзависимой индукции апоптоза, приводящие к старению.

Не менее интригующие результаты получены при сравнении чувствительности к апоптозу клеток близких долго- и короткоживущих видов. В эндотелии сосудов голого слепыша, самого долгоживущего (до 30 лет) представителя грызунов, только самые большие дозы перекиси водорода способны вызывать апоптоз, а воздействие теплового шока вовсе не приводит к увеличению фрагментации ДНК (маркера апоптоза). В то же время, аналогичные клетки мышей (живут 3 года) характеризуются очень высокой чувствительностью к данным стрессам. В результате межвидовое сравнение показало отрицательную корреляцию между H₂O₂-индуцированным апоптозом и максимальной продолжительностью жизни (Labinsky et al., 2006). Другими словами, долгожительство слепыша может быть обусловлено нечувствительностью его клеток к апоптозу.

Еще одной причиной увеличения уровня апоптоза с возрастом является накопление повреждений ДНК. Как оказалось, клетки с мутацией гена синдрома Вернера *WRN* характеризуются дерегуляцией протеаз апоптоза ICE-семейства и высокой чувствительностью к Fas-индуцированному апоптозу (Wu et al., 1998). У мышей с делецией гена *WRN* многократно возрастает чувствительность к индукторам апоптоза этопозиду и камптотецину (Zhang J. et al., 2003). Потеря целостности теломер вызывает клеточный ответ на повреждение ДНК, который стимулирует р53-зависимую задержку клеточного цикла или апоптоз (Franco et al., 2005). В тканях млекопитающих с возрастом накапливаются мутации мтДНК, что коррелирует с индукцией маркеров апоптоза (эффекторной каспазы-3). Снижение калорийности пищи (см. разд. 4.3), напротив, задерживает накопление мутаций мтДНК и редуцирует опосредованный митохондриями апоптоз, увеличивая продолжительность жизни (Kujoth et al., 2005, 2006).

Старение практически неотделимо от сопровождающих его патологий. Причина многих возрастзависимых дегенеративных заболеваний заключается в избыточной апоптотической гибели. Некоторые авторы (Свердлов, 1998) даже само старение рассматривают как заболевание, при котором разрегулирован апоптоз.

Старение служит ключевым фактором начала болезни Альцгеймера. Лица, страдающие данным заболеванием, характеризуются постепенным снижением познавательных функций. При-

чиной этой нейродегенеративной патологии является нейрональный апоптоз (Paradis et al., 1996; Mattson, 1997; Рогов, 1998). Его уровень в мозгу пациентов с болезнью Альцгеймера в 50 раз выше, чем у контрольных индивидуумов того же возраста. Амилоид β , чьи внеклеточные скопления играют ключевую роль в патогенезе данного заболевания, может индуцировать апоптоз в нейронах *in vitro*. Пресенелины 1 и 2, связанные с ранним началом наследственных вариантов болезни Альцгеймера, также принимают участие в апоптозе нейронов, поскольку повышают их чувствительность к гибели, вызванной лишением трофических факторов или β -амилоидом. Такой вид апоптоза можно блокировать антиоксидантами, а значит, он индуцируется свободными радикалами (Zhang, Herman, 2002). β -Амилоидный пептид снижает концентрацию антиапоптозного белка Bcl-2 и повышает экспрессию проапоптозного гена *bax*. Амилоид является лигандом трансмембранного рецептора нейротрофина с молекулярной массой 75 кДа, который принадлежит к семейству апоптолических рецепторов, генерирующих при активации сигнал гибели клетки (Yaar, Gilchrist, 1997). Механизм старения, связанный с β -амилоидом, возможно, имеет отношение не только к нервной ткани. Экспрессия этого белка значительно возрастает при старении фибробластов в культуре (Adler et al., 1991). Кроме того, меланоциты, подобно нейронам, подвергаются апоптозу с участием β -амилоидного пептида (Yaar, Gilchrist, 1997).

Развитие другого возрастзависимого заболевания — амиотрофического латерального склероза значительно замедляется при введении в клетки ингибитора гена клеточной гибели интерлейкин-1•-конвертирующего фермента (ICE) (Friedlander et al., 1997). Гладкомышечные клетки из атеросклеротических бляшек сосудов человека подвергаются раннему старению и демонстрируют высокий уровень апоптоза (Bennett et al., 1998). Наконец, возрастзависимая ретинальная дегенерация у млекопитающих и *Drosophila* также протекает по механизму апоптоза (Davidson, Steller, 1998).

Болезнь Хантингтона вызывается мутациями, приводящими к образованию триплетных повторов *CAG* в гене Хантингтона. Повторы *CAG* транслируются в токсичный полиглутамат. В результате происходит избирательная гибель нейронов в базальном ганглии. Антиапоптозный белок Хантингтона служит субстратом каспазы-3, а его полиглутаминизированная форма еще более чувствительна к расщеплению каспазами. Клетки с мутантным белком Хантингтона более восприимчивы к апоптозу, индуцированному старение-ассоциированным оксидативным стрессом, чем нормальные клетки (Zhang, Herman, 2002).

Таким образом, не вызывает сомнений, что эктопическая индукция механизмов апоптоза является причиной старение-ассоциированных фенотипов. Однако в последнее время накапливаются результаты, неожиданно свидетельствующие о том, что умеренное повышение чувствительности к апоптозу может стать ключом к антистарению. Так, активация р53-зависимого пути элиминации поврежденных клеток при нормальном генетическом контроле способна приводить к увеличению продолжительности жизни мышей на 16 % (Matheu et al., 2007). Другой известный механизм — JNK-путь также стимулирует апоптоз (Oh et al., 2005). У дрозофилы Jun-N-киназа индуцирует активность транскрипционного фактора FOXO, стимулируя экспрессию ключевого проапоптотического гена *hid* в ответ на повреждение ДНК. В то же время сверхактивация JNK/FOXO-пути увеличивает стрессоустойчивость и продолжительность жизни дрозофил. Аналогично JNK индуцирует FOXO-зависимую экспрессию проапоптотического белка *Bim* в нейронах млекопитающих (Luo et al., 2007). Мыши, лишенные киназы PKB и имеющие повышенный уровень активных FOXO, более чувствительны к индуцированному повреждением апоптозу и генотоксическому стрессу, однако являются долгожителями (Lam et al., 2006).

Как связать стрессоустойчивость и увеличение продолжительности жизни с индукцией апоптоза? Стресс-индуцированный апоптоз под действием JNK/FOXO-сигналинга, например, может служить для элиминации поврежденных клеток, которые в противном случае обуславливают старение организма. Кроме того, эффекты JNK/FOXO-сигналинга могут зависеть от интенсивности воздействия, вызывая апоптотический ответ только в условиях жесткого повреждения клетки, а в более мягких условиях стимулируя экспрессию защитных генов. Активность антиапоптотического EGFR/Akt-сигналинга может изменять порог различения проапоптотической и прорепаративной функции JNK/FOXO-сигналинга (Luo et al., 2007). Наконец, в экспериментах с облучением дрозофил было показано, что при индукции апоптоза у личинок инициирующая каспаза DRONC способна активировать JNK-каскад и индуцировать синтез цитокинов, стимулирующих соседние клетки к компенсаторной пролиферации, приводящей к замещению удаленной поврежденной клетки (Kondo et al., 2006).

В 2003 г. нами было высказано предположение о том, что апоптоз, индуцированный ионизирующей радиацией на предимагинальных стадиях дрозофилы, может выступать в роли механизма антистарения. Данная гипотеза подтверждается нашими экспериментальными данными (см. разд. 4.6). Субпопуляции клеток с более слабой антиоксидантной и репаративной защитой быстрее

подвергаются старению, чем устойчивые клетки, вследствие ускоренного накопления с возрастом оксидативных повреждений, соматических мутаций и хромосомных нарушений. В силу эпигенетических причин и соматического мутагенеза такие ослабленные клетки есть в каждой ткани. Большая доля таких нефункциональных клеток в ткани будет приводить к более быстрому старению организма в целом. В то же время наши эксперименты показали, что элиминация ослабленных клеток (не способных устранить повреждение) в результате индуцированного апоптоза при облучении в малых дозах на ранних стадиях онтогенеза может выступать в качестве механизма антистарения, приводя к увеличению продолжительности жизни и функциональных возможностей организма (например, нервно-мышечной активности) (Moskalev, 2003, 2007; Москалев, 2004).

Таким образом, различные виды возрастзависимой дерегуляции процесса апоптоза присущи множеству типов клеток. Тогда как одни клетки (фибробласты) теряют чувствительность к апоптозу, что переводит их в разряд стареющих или даже предопухолевых, другие (лимфоциты, миоциты, нейроны) становятся высокочувствительными к индукторам апоптоза, что вызывает дегенеративные изменения в соответствующих тканях. Основываясь на приведенных данных литературы, в механизме возрастной дерегуляции апоптоза можно выделить ядерный, митохондриальный и экзогенный (межклеточный) блоки. Ядерный механизм связан с генотоксическим стрессом и с изменением экспрессии и активности ДНКаз апоптоза, транскрипционного фактора p53, а также индуцируемых или репрессируемых им регуляторных белков, принимающих участие в программируемой гибели клетки (таких как катепсин, Bax, Bcl-2). Ядерный механизм возрастной дерегуляции тесным образом связан с митохондриальным, вызываемым окислительным стрессом механизмом, поскольку реализующие его белки (Bax и Bcl-2), а также отчасти продукция свободных радикалов, контролируются p53. Межклеточный механизм обусловлен уменьшением по мере увеличения возраста организма концентрации факторов выживания в окружающей клетку тканевой жидкости (гормональной и цитокиновой природы) и повышением концентрации лигандов так называемых «рецепторов гибели» (Fas-рецептора и рецептора фактора некроза опухолей TNF-R1). Межклеточный механизм также связан с ядерным механизмом, поскольку p53-индуцируемый белок IGFBP-3 способен инактивировать во внеклеточном пространстве цитокины, стимулирующие рост и выживание клетки.

Подводя итог, следует отметить, что изменения регуляции апоптоза приводят к нарушениям на тканевом и системном

уровнях, что служит причиной различных возрастных патологий. На наш взгляд, имеется достаточно доказательств того, что апоптоз является не только процессом, претерпевающим ассоциированное с возрастом изменение своей регуляции, но также одним из центральных механизмов старения целостного организма наряду с генетической нестабильностью и клеточным старением. Однако мы не поддерживаем концепцию фенотоза акад. В. П. Скулачева (1999), поскольку не считаем старение запрограммированным процессом, а скорее результатом плейотропного действия «генов-контролеров», обеспечивающих стабильность генома в ответ на спонтанное накопление повреждений и хронический стресс. При определенных условиях (например, при наличии компенсаторной пролиферации, наиболее активной в молодом возрасте) индуцированный апоптоз может даже способствовать замедлению старения.



Глава 3

ЭНДОГЕННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ

3.1. Инсулин/IGF-сигналинг

Нейроэндокринная теория предполагает, что старение возникает в результате возрастзависимых изменений нервной и эндокринной функций, играющих ключевую роль в координации взаимодействия всех систем организма, а также реактивности при изменении внутренней среды и программировании физиологических ответов на внешнесредовые стимулы. Такие возрастзависимые изменения избирательно влияют на отдельные нейронные и гормональные пути, регулирующие эволюционно значимые функции: репродукцию, рост, развитие, а также выживаемость через адаптацию к стрессу (Weinert, Timiras, 2003). В чем состоит механизм этих возраст-ассоциированных изменений? На этот вопрос, по-видимому, удалось найти ответ В. М. Дильману (1968). Согласно его элевационной теории, старение рассматривается как следствие возрастзависимого повышения порога чувствительности центральной нервной системы к регуляторным гомеостатическим сигналам. Скорость старения может модулироваться сигналами, которые передаются через сенсорное восприятие в нейросекреторную систему (Heininger, 2002). Одна из наиболее изученных и важных регуляторных сетей, контролирующих продолжительность жизни в ответ на внешнесредовые воздействия, была впервые (в этом качестве) обнаружена у *Caenorhabditis elegans*. Она обусловлена сигналингом через рецептор DAF-2 инсулин/инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1) (Baumeister et al., 2006). Геном нематод кодирует всего один инсулиноподобный рецептор DAF-2, гомологичный рецепторам инсулина и IGF позвоночных. Рецептор DAF-2 на 35 % идентичен инсулиновому рецептору человека и на 34 % — рецептору IGF-1 (Cheng et al., 2005). Мутации, снижающие уровень экспрессии гена *daf-2*, приводят к тому, что животные остаются активными и молодыми намного дольше, чем в нор-

ме, при этом они живут в 2 раза дольше. Помимо длительности, такие мутанты имеют высокое «качество жизни» (Guarente, Kenyon, 2000).

Инсулиновый сигналинг, наиболее представленный в нервной ткани нематод, запускается внешнесредовыми стимулами. На продолжительность жизни могут влиять как вкусовые, так и обонятельные нейроны. ASI — это пара хемосенсорных нейронов, контролирующих инсулиновый сигналинг. Их элиминация может увеличивать продолжительность жизни на 50 % (Guarente, Kenyon, 2000; Baumeister et al., 2006). Средовые сигналы, такие как компоненты пищи или феромоны, стимулируют сенсорные нейроны секретировать инсулин/IGF-1-подобный гормон, связывающийся с рецептором и ускоряющий процессы роста, развития и старения (Guarente, Kenyon, 2000).

Повышенные температуры, перенаселение или истощение источников пищи на ранних стадиях развития *C. elegans* приводит к формированию альтернативной третьей стадии личинки — **dauer** (от немецкого слова, означающего «длительный»), специально адаптированной к долговременному выживанию. При возвращении к благоприятным условиям **dauer** выходит из диапаузы, приступает к питанию и продолжает развитие во взрослую особь с нормальной продолжительностью жизни (Klass, Hirsh, 1976; Beckstead, Thummel, 2006). Формирование **dauer** аналогично спорообразованию дрожжей или более мягкому эквиваленту у млекопитающих — зимней спячке (Guarente, Kenyon, 2000). Как оказалось, мутации, снижающие инсулиновый сигналинг, приводят к формированию **dauer** даже при благоприятных внешнесредовых условиях (McElwee et al., 2004).

Таким образом, ингибирование экспрессии гена *daf-2* или других генов инсулин/IGF-пути имеет несколько эффектов (Baumeister et al., 2006):

1) ранняя задержка развития, что отражается на многих биологических процессах, включая метаболизм (запускается альтернативная программа **dauer**);

2) слабые *daf-2*-мутации, которые обходят стадию **dauer**, либо подавление *daf-2*-сигналинга на поздней стадии развития (у температурно-чувствительных мутантов) приводят к увеличению переносимости ряда стрессов;

3) супрессия развития на поздних личиночных стадиях (когда формирование **dauer** уже запущено), например с помощью РНК-интерференции, приводит к увеличению продолжительности жизни.

В общей сложности геном *C. elegans* кодирует 38 инсулиноподобных молекулы, в основном экспрессируемых в нейронах, но также обнаруживаемых и в кишечнике, мышцах, эпидермисе

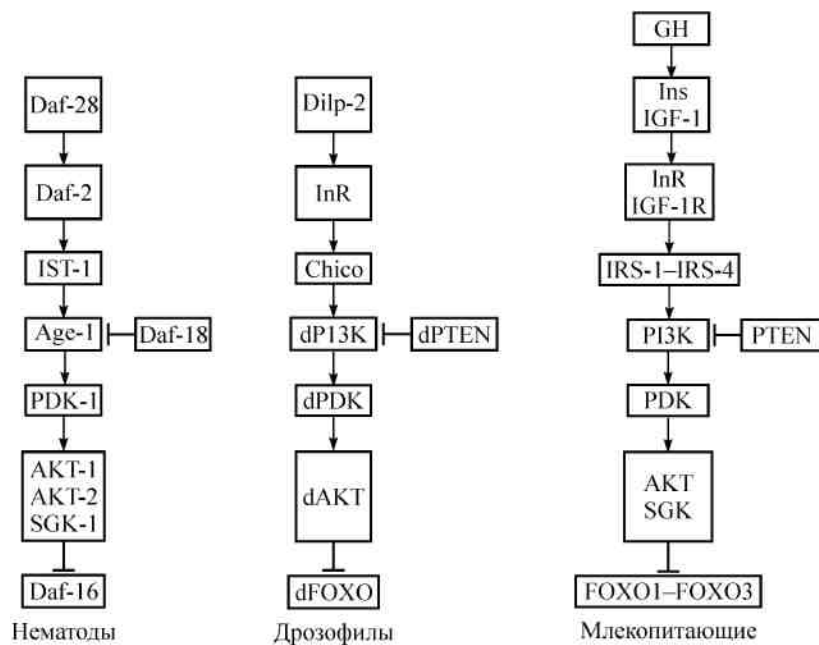


Рис. 3. Механизм инсулинового сигналинга.

и гонадах. Некоторые из них являются агонистами или антагонистами DAF-2. Связывание лиганда-агониста с рецептором DAF-2 активирует фосфоинозитол-3-киназу (PI3K; AGE-1 у *C. elegans*), что приводит к образованию фосфоинозитид-3,4,5-трифосфата (рис. 3). AAP-1, адапторная субъединица AGE-1, потенцирует (усиливает) этот сигнал, тогда как DAF-18 (гомолог PTEN) подавляет его (Baumeister et al., 2006). Субстрат инсулинового рецептора IST-1 также содействует сигналингу между DAF-2/IR и AGE-1/PI3K (Gami, Wolkow, 2006). Главный эффектор PI3K — 3-фосфоинозитид-зависимая киназа 1 (PDK-1) в свою очередь фосфорилирует (активирует) несколько членов семейства киназ AGC, включая киназы AKT-1 и AKT-2 (гомологи Akt/PKB млекопитающих), а также сыворотка- и глюкокортикоид-индуцибельную киназу 1 (SGK-1) (Beckstead, Thummel, 2006). Эти белки формируют мультимерный белковый комплекс, контролирующий статус фосфорилирования транскрипционного фактора DAF-16 — основной мишени инсулин/IGF-пути у нематод. Активный DAF-2-сигналинг фосфорилирует и в результате инактивирует DAF-16, приводя к удержанию этого транскрипционного фактора в цитоплазме (Guarente, Kenyon, 2000; Cheng et al., 2005; Baumeister et al., 2006;

Gami, Wolkow, 2006). Это позволяет протекать нормальным ростовым процессам. В неблагоприятных условиях (повышенные температуры, перенаселение или истощение источников пищи) инсулиновый сигналинг инактивируется и дефосфорилированный DAF-16 перемещается в ядро, где он блокирует рост и запускает формирование dauer или долгожительство (Beckstead, Thummel, 2006). Подробнее роль DAF-16/FOXO в физиологии клетки и старении раскрыта в следующем разделе.

Известно, что у нематод инсулиновый сигналинг в разных тканях может иметь различные эффекты и отвечать на различные сигналы. Однако, по-видимому, ключевая роль принадлежит нейронам. В пользу нервной регуляции старения говорит и тот факт, что продолжительность жизни мутанта *age-1* может быть полностью восстановлена до дикого типа при экспрессии AGE-1 только в нейронах, тогда как экспрессия в мышцах или кишечнике дает незначительный эффект (Morley, Morimoto, 2004; Baumeister et al., 2006). Помимо нервной системы в регуляции продолжительности жизни нематоды важную роль играет кишечник — жировая ткань, являющаяся аналогом печени млекопитающих или жирового тела дрозофил и служащая местом основной активности регулируемого инсулиновым сигналингом транскрипционного фактора DAF-16 (Libina et al., 2003).

Инсулиновый сигналинг регулирует разнообразные функции, включая рост, развитие, плодовитость, метаболический гомеостаз и продолжительность жизни (Broughton et al., 2005). У *C. elegans* мутации в генах рецептора инсулина, субстрата инсулинового рецептора или PI3-киназы, протеинкиназ АКТ и SGK-1 либо сверхэкспрессия транскрипционного фактора DAF-16/FOXO увеличивают продолжительность жизни и замедляют или снижают репродукцию. Снижение экспрессии даже одного из лигандов (*ins-7*) увеличивает продолжительность жизни у нематоды (Broughton et al., 2005). Выключение другого гена инсулинового пептида *ins-11* находится в антагонизме к предыдущей мутации. Следовательно, *ins-11* необходим для увеличения продолжительности жизни, вызванного снижением инсулинового сигналинга. По-видимому, в норме он является антагонистом рецептора DAF-2 (Kawano et al., 2006). Черви со сниженной активностью инсулинового сигналинга характеризуются также более высоким уровнем липидов и повышенной устойчивостью к оксидативному стрессу (Broughton et al., 2005). Нематоды с нарушением АКТ имеют малые размеры, их органы состоят из малого количества клеток, однако они живут долго (Puig et al., 2003).

Вполне вероятно, что механизм влияния инсулинового сигналинга на продолжительность жизни кроется в изменении экспрес-

сии определенных генов. При исследовании экспрессии генов у долгоживущего мутанта *daf-2* (Halaschek-Wiener et al., 2005) наблюдали увеличение (по сравнению с нормальными особями) экспрессии генов семейства *hsp16* (белки теплового шока), генов рибосомальных белков (*rps*, *rpl*, *rpa*) и факторов общего стресс-ответа (*hsp*, *mtl-1*, *gst-1*, *sip-1*), а также снижение транскрипция генов липидного метаболизма. Среди них гены семейства вителлогенина (от *vit-1* до *vit-6*), *fat-2* и др. У мутантов снижен метаболизм нуклеиновых кислот, нарушены регуляция транскрипции, инициация репликации ДНК и синтез структурных белков хромосом. Среди генов этих мутантов выявлены гены гистонов (*his-24*, *41*, *62* и *72*), гистоновых деацетилаз (*hda-1*, *pqn-28*), гены *mcm* (от *mcm-2* до *6*), геликаз (*hel-1* и *cgh-1*) и РНК-связывающих белков (*puf-3*, *5* и *6*). Примерно 59 генов, регулирующих белковый метаболизм, снижают у долгоживущих мутантов *daf-2* свою экспрессию. Они регулируют протеолиз и пептидолиз (например, гены *asp* и *spp*), инициацию (*T27F7.3b* и *E04D5.1*) и элонгацию транскрипции (*eft*, *F17C11.9a* и *Y41E3.10*), шаперонную активность (*cct-1*, *4*, и *6*). На более низком уровне у мутанта *daf-2* также экспрессируются транскрипты, связанные с энергетическим метаболизмом (транспортом электрона и синтезом АТФ), клеточным сигналингом (регуляцией клеточного цикла, сигналингом через G-белки, киназы и фосфотазы), метаболизмом углеводов (гликолизом и глюконеогенезом), и со структурой клетки, особенно с образованием актина (от *act-1* до *act-5*) и тубулина (*tbb-1*, *tbb-2*, *tba-2* и *thg-1*). Таким образом, мутанты *daf-2* характеризуются гипометаболизмом (Halaschek-Wiener et al., 2005). При использовании анализа олигонуклеотидных чипов, среди идентифицированных классов генов, экспрессия которых изменяется сходным образом у личинки *dauer* и у долгоживущих мутантов *daf-2*, оказались известные детерминанты продолжительности жизни — малые белки теплового шока/ α -кристаллины, гены детоксификации. Кроме того, отмечено снижение экспрессии генов, связанных с поглощением пищи, таких как *nhx-2* и *pep-2* (McElwee et al., 2004).

По-видимому, в эффектах инсулинового сигналинга на продолжительность жизни задействованы вторичные гормоны или сигналы. Одним из кандидатов на эту роль является SCL-1, член CRISP-семейства секретлируемых белков. Экспрессия SCL-1 сверхактивируется у мутантов *daf-2* и необходима для увеличения продолжительности их жизни. Помимо этого, регулируемый инсулином транскрипционный фактор DAF-16 контролирует белки, участвующие в синтезе липофильного гормона (Libina et al., 2003).

Инсулиновый сигналинг может контролировать долгожительство, взаимодействуя с известными факторами стрессоустойчи-

вости. Как оказалось, внешние стрессовые воздействия (увеличивающие соотношение АМФ : АТФ) или мутации, снижающие инсулиновый сигналинг, продлевают жизнь через активацию протеинкиназы ААК-2: продолжительность жизни двойного мутанта *daf-2(m577); aak-2(ok524)* не отличается от таковой у *aak-2(ok524)* (Apfeld et al., 2004). Инсулиновый путь взаимодействует также с фактором теплового шока HSF — регулятором экспрессии генов белков теплового шока. По-видимому, это является одной из причин того, что все долгоживущие инсулиновые мутанты проявляют повышенную устойчивость к стрессам, включая тепловой и оксидативный, а также вызванный ультрафиолетом или тяжелыми металлами (McCull et al., 2005). Стрессоустойчивость также во многом обусловлена повышенной активностью каталазы, цитоплазматической (Cu,Zn-SOD) и митохондриальной (Mn-SOD) супероксиддисмутаза. Их экспрессия опосредована транскрипционным фактором DAF-16 (McElwee et al., 2004).

В геноме дрозофилы семь инсулиноподобных пептидов (DILP), которые независимо регулируются на уровне транскрипции в ответ на изменение условий питания, а также тканеспецифическим образом на разных стадиях онтогенеза. Три гена DILP (*dilp2*, *dilp3*, *dilp5*) экспрессируются билатерально симметричными нейросекреторными клетками мозга (инсулин-продуцирующими клетками). Два из них активны исключительно в соматике взрослой мухи (*dilp2* и *dilp3*). Экспрессия *dilp5* отмечена также в яичниках (Broughton et al., 2005). Об эффектах каждого пептида в отдельности известно мало. Однако выяснено, что экспрессия генов *dilp3* и *dilp5* регулируется доступностью питательных веществ, а все семь генов *dilp1—dilp7* стимулируют процессы роста (Tu et al., 2006). Из них DILP2 наиболее напоминает инсулин человека (Wang et al., 2005). У мух с удаленными нейросекреторными клетками имеет место увеличение накопления жира, трегалозы и гликогена, а также увеличение продолжительности жизни (Broughton et al., 2005).

В тканях-мишенях DILP активируют рецептор инсулин/инсулиноподобного фактора роста (InR) (рис. 3). InR трансдуцирует сигнал через Chico — гомолог субстратов 1—4 инсулинового рецептора млекопитающих (IRS-1—IRS-4). Сигнал передается на PI3K и Akt. Фосфатаза dPTEN противодействует активности PI3K и, следовательно, инсулиноподобному сигналингу. Сверхэкспрессия dPTEN в жировом теле мух приводит к увеличению продолжительности жизни на 20 %. Сигналинг инсулина влияет на экспрессию генов через инактивацию транскрипционного фактора dFOXO, являющегося эквивалентом DAF-16 нематод и FOXO3a млекопитающих. AKT фосфорилирует dFOXO, в результате чего

тот остается в цитоплазме и не способен активировать экспрессию своих генов-мишеней. Индукция **dFOXO** при снижении инсулинового сигналинга влияет на рост и продолжительность жизни дрозофил (Landis et al., 2003; Hwangbo et al., 2004; Wang et al., 2005).

Помимо стрессоустойчивости инсулиновый сигналинг дрозофилы контролирует репродукцию. Яичники самок с мутацией рецептора инсулина напоминают таковые в состоянии репродуктивной диапаузы (Tatar, 2004). Гетероаллельный генотип **InR^{p5545}/InR^{E19}** у самок приводит к малым размерам тела, стерильности и удлинению продолжительности жизни на **85 %**. При этом у них наблюдается накопление триглицеридов и **Sod**, снижение синтеза ювенильного гормона. Продолжительность жизни самок возрастает также при мутации гена субстрата инсулинового рецептора **Chico**. Самки-гомозиготы **Chico1/Chico1** живут на **48 %** дольше. Гомозиготные самцы живут меньше, чем самцы дикого типа. Однако гетерозиготы **Chico1/+** обоих полов живут дольше (на **36 %** самки и на **13 %** самцы).

Чем обусловлен данный эффект? Старение дрозофил регулируется **dFOXO**, что доказывается увеличением продолжительности жизни при его сверхэкспрессии в периферическом жировом теле у взрослых мух. Подавление сигналинга инсулина активизирует **dFOXO**, приводя к экспрессии генов стрессоустойчивости. По механизму обратной связи такая активация приводит к снижению экспрессии инсулиноподобного пептида **DILP2**, синтезируемого в нейронах, и к репрессии эндогенного инсулинозависимого сигналинга в периферическом жировом теле (Cheng et al., 2005). Инсулиновый сигналинг у дрозофил, так же как и у нематод, регулируется доступностью пищи. Снижение доли белка или дрожжей в диете мух подавляет сигналинг **InR/PI3K**. В ответ на инсулиновый сигналинг жировое тело дрозофилы модулирует его в периферических тканях путем секреции **dALS** (кислотно-лабильной субъединицы), гомолог которой у млекопитающих формирует тройной комплекс с **IGF-1**, продлевая время полужизни этого лиганда (Kapahi et al., 2004).

Помимо продолжительности жизни **dInR/dPI3K/dAKT**-механизм у дрозофилы регулирует размеры тела (Puig et al., 2003). Он необходим для нормального роста дрозофил. Продление жизни мух с нарушенным инсулиновым сигналингом сопровождается снижением размеров тела и задержкой времени развития. Однако снижение размеров не является необходимым условием долгожительства — гетерозиготы по мутации **Chico** (гена субстрата рецептора инсулина) и особи со сверхэкспрессией **dFOXO** имеют нормальные размеры (Broughton et al., 2005).

Кроме системного действия на продолжительность жизни, рост и репродукцию инсулиновый сигналинг напрямую влияет на возрастзависимую физиологию органов. У стареющих дрозофил описаны постепенные изменения функции сердца с 1-й до 7-й недели жизни. За этот период происходит снижение частоты сердечных сокращений в покое, а стресс-индуцированная сердечная недостаточность нарастает. Эти возрастзависимые изменения отсутствуют у долгоживущих мух со сниженным системным уровнем инсулиноподобных пептидов, а также в случае мутации гена рецептора инсулина *InR* или его субстрата *Chico*. Более того, сверхэкспрессия фосфатазы *dPTEN* или *dFOXO* только в сердце предотвращает спад его работы с возрастом (Wessells et al., 2004).

Имеют ли отношение выявленные у мутантов изменения к приспособленности природных популяций? Имеют ли эти изменения эволюционное значение? Исследования Труди Маккей и соавторов показали, что локус инсулиноподобного рецептора (*InR*) может принимать участие в естественном варьировании продолжительности жизни. Дикие популяции дрозофилы характеризуются обширным полиморфизмом по локусу *InR* (цит. по: Flatt, 2004). Что же касается межвидовых различий по продолжительности жизни, то роль инсулинового сигналинга только начала проясняться. В отличие от дрозофил матки социальных насекомых представляют собой удивительный пример долгожительства. Известно, что плодовые матки пчел живут в 10 раз дольше, чем стерильные рабочие самки, при этом они откладывают до 2000 яиц в день. В отличие от старых рабочих самок уровень экспрессии инсулиноподобного пептида и двух его рецепторов у маток пчел с возрастом снижается, что может быть одной из причин их долгожительства (Corona et al., 2007).

Инсулиновый сигналинг регулирует процессы старения и у млекопитающих, у которых задействованы два пептидных гормона — инсулин и IGF-1. Оба пептида производят эндокринные, паракринные и аутокринные эффекты в различных тканях. Инсулин вырабатывается главным образом β -клетками поджелудочной железы, тогда как IGF-1 — различными клетками тела и прежде всего печени. В большинстве тканей инсулин и IGF-1 стимулируют рост клеток. Циркулирующая глюкоза индуцирует высвобождение инсулина. Секреция IGF-1 запускается многими факторами, включая гипофизарный гормон роста и мышечное сокращение. Связывание инсулина клеточной мишенью стимулирует поглощение глюкозы и глюкозный метаболизм, отчасти через экспрессию генов (Gami, Wolkow, 2006).

У млекопитающих в ответ на связывание лиганда димерный тирозинкиназный рецептор (*InR* или IGF1R) активирует фосфо-

нозитид-3-киназу (PI3K), что приводит к образованию фосфоинозитид-3,4,5-P₃ и фосфоинозитид-3,4-P₂ (рис. 3). Главными эффекторами фосфолипидных продуктов PI3K являются серин-треониновые киназы — АКТ/ПКВ и PDK-1. PDK-1 фосфорилирует и активирует PIP-связывающую киназу АКТ/ПКВ, которая в свою очередь фосфорилирует нижележащие белки-мишени (Gami, Wolkow, 2006).

При развитии многоклеточного организма рост регулируется за счет контроля количества и объема клеток таким образом, что каждый орган достигает определенных пропорций по отношению ко всему организму. Рост тела контролируется скоординированным продвижением клеток по клеточному циклу и регуляцией их выживания и модулируется наличием питательных веществ, факторами роста и температурой. Факторы роста стимулируют деление и выживание клетки путем активации рецептора инсулина, который действует через два главных каскада трансдукции сигнала: уже известный нам PI3K/АКТ и RAS/MAP-киназный. Например, АКТ стимулирует синтез многих белков клетки (и ее рост) через активацию киназы TOR (TOR расшифровывается как «мишень рапамицина»), которая затем фосфорилирует и инактивирует белок, связывающий репрессор трансляции 4EВР. Гипофосфорилированный 4EВР взаимодействует с фактором инициации трансляции eIF4E, ингибируя общий синтез белка в клетке. АКТ также регулирует транскрипцию через фосфорилирование FOXO, подавляющее его активность. В свою очередь FOXO способен транскрипционно активировать d4EВР, подавляя рост клеток (Puig et al., 2003). Интересно отметить, что АКТ активируется не только в ответ на влияние ростовых факторов, таких как инсулин и IGF-1, но и при повреждении ДНК. АКТ является ключевым белком в проверочной точке G₂/M-перехода после повреждения ДНК. Возможно, что активация АКТ под действием γ-радиации контролируется главным образом АТМ посредством фосфорилирования. Этот эффект опосредован через фосфатидилинозитол-3-киназный домен АТМ, специфично фосфорилирующий АКТ (Viniestra et al., 2005).

Белок PTEN является антагонистом фосфатидилинозитол-3-ОН-киназной активности, стимулируя ядерную локализацию эндогенного FOXO и ингибируя функцию TOR (Hwangbo et al., 2004). Кроме того, мутация гена фосфатазы PTEN, антагониста PI3K-пути, представлена в 12—60 % (в зависимости от ткани) опухолей человека (Lam et al., 2006).

Как у нематод и дрозофил, снижение инсулин/IGF-1-сигналинга продлевает жизнь грызунов. У мышей обнаружены долгоживущие карликовые мутанты. Гены *pit-1* и *prop-1* кодируют транскрипционные факторы, регулирующие развитие гипофиза.

Гомозиготность по мутациям этих генов ведет к карликовости *Snell* (*Pit^{dw}/Pit^{dw}*) и *Ames* (*Prop1^{dw}/Prop1^{dw}*), сопровождающимся увеличением продолжительности жизни на 25—65 % по сравнению с диким типом. Клетки таких животных характеризуются устойчивостью к различным стрессам (тепловому, оксидативному). У них также наблюдается дефицит сывороточного гормона роста (GH), тиростимулирующего гормона, пролактина и IGF-1, который секретируется клетками печени после стимуляции GH (рис. 3). Карликовые мыши с искусственно высоким GH, но сниженным на 90 % IGF-1 (мыши с выключенным GH-рецепторсвязывающим белком) живут дольше дикого типа. Таким образом, основное значение для долгожительства имеет снижение IGF-1. У мышей *Snell* дефицит GH приводит к снижению уровня IRS-2 (субстрата инсулинового рецептора-2), активности PI3K и к нарушению связи p85 α с IRS-2. Экспрессия антисмысловой РНК GH в гипофизе, селезенке и тимусе в гомозиготе приводит к снижению продолжительности жизни (на 5—10 %), тогда как гетерозиготы живут на 7—10 % дольше особей дикого типа (Murakami et al., 2003; Cheng et al., 2005). У карликовых мышей *Snell* снижена инициация транскрипции по сравнению с контролем, по-видимому, как следствие нарушения инсулинового и mTOR-сигналинга (Hamilton et al., 2006).

Гетерозиготы по мутации рецептора *IGF-1* живут на 26 % дольше особей дикого типа, тогда как гомозиготность летальна. Мыши, имеющие всего 10 % от нормального уровня IGF-1, живут на 40—55 % дольше. При этом такие мыши не являются карликами, их энергетический метаболизм в норме, так же как физическая активность, частота опухолеобразования, фертильность и питание. У мышей *Igf1r*^{+/-} подавлен MAP-киназный каскад и снижен PI3K/Akt-сигналинг. Полученные от таких мышей фибробласты более устойчивы к оксидативному стрессу, чем контроль. На молекулярном уровне IRS, а также p52- и p66-изоформы Shc (основные субстраты рецептора IGF-1) характеризуются гипофосфорилированием по тирозину. Именно p66^{Shc} опосредует клеточный ответ на оксидативный стресс (Nelson, Padgett, 2003; Maier et al., 2004; Cheng et al., 2005).

IGF-1 циркулирует в организме в комплексе с IGFBP, который увеличивает время его полужизни и модулирует активность (Gatford et al., 1996). В толстом кишечнике при старении двукратно снижается выработка IGFBP-3 (Englander, 2005). Активность IGFBP-4, а также белка, ассоциированного с инсулиноподобным фактором роста 2 (IGF2A), при старении фибробластов в культуре клеток, напротив, увеличивается (Yoon et al., 2004; Hardy et al., 2005). Похожий паттерн экспрессии генов задержки роста (*PTEN*

и *IGFBP-3*), участвующих в инсулиновом сигналинге, проявляется при клеточном старении и при обработке перекисью водорода или этанолом (Pascal et al., 2005).

У мышей отсутствие инсулинового рецептора летально, однако самцы-гетерозиготы живут на 16 % дольше нормальных мышей, а самки-гетерозиготы — на 33 % дольше. При этом гетерозиготы характеризуются нормальными размерами, метаболизмом и фертильностью, но повышенной устойчивостью к оксидативному стрессу (Nelson, Padgett, 2003). Даже выключение гена инсулинового рецептора только лишь в жировой ткани продлевает продолжительность жизни. При этом жировая прослойка уменьшается, теряется нормальное соотношение между лептином плазмы крови и массой тела, т. е. мыши становятся устойчивыми к ожирению (Cheng et al., 2005). Тем не менее нейрон-специфическое нарушение гена инсулинового рецептора у мышей (линия *NIRKO*) приводит к снижению фертильности и ожирению (Broughton et al., 2005).

Инсулин/IGF-1-путь регулирует продолжительность жизни не сам по себе, а посредством большого количества генов, в том числе антимикробных и метаболических, обуславливающих стресс-ответ. Фибробласты, взятые у карликовых мышей *Snell* (характеризующихся низким уровнем инсулинового сигналинга), проявляют устойчивость к различным формам летальных повреждений, таких как ультрафиолет, тепловой шок, индуктор свободных радикалов паракват, перекись водорода, кадмий. Подобная стрессоустойчивость может вести к невосприимчивости к возрастзависимым заболеваниям и, как следствие, к наблюдаемому увеличению продолжительности жизни (Cheng et al., 2005).

Белок *Klotho*, сверхэкспрессия которого приводит к долголетию у мышей, функционирует в качестве циркулирующего гормона, связывающегося с рецептором на клеточной поверхности и подавляющего внутриклеточный сигналинг инсулина и IGF-1. Дефицит *Klotho* приводит к ускоренному старению: уменьшению длительности жизни, бесплодию, задержке роста, гипоактивности, кожной атрофии, преждевременной инволюции тимуса, атеросклерозу, остеопорозу и эмфиземе легких. Данные проявления можно смягчить подавлением инсулин/IGF-1-сигналинга. Таким образом, его ингибирование вносит вклад в эффекты антистарения, вызванные гормоном *Klotho* (Kurosu et al., 2005; Yamamoto et al., 2005). Ген *klotho* кодирует белок с одним трансмембранным доменом. Внеклеточный домен *Klotho* состоит из двух внутренних повторов, *KL1* и *KL2*, имеющих гомологию последовательности аминокислот с α -гликозидазами бактерий и растений (20—40 % идентичности). Однако *Klotho* не проявляет гликозидазной активнос-

ти. Внеклеточный домен белка **Klotho** сбрасывается, секретируется в кровь и связывается с рецепторами на поверхности клеток. Он подавляет фосфорилирование по тирозину рецепторов инсулина/**IGF-1** и его субстратов, снижая их активность и ассоциацию с **PI3**-киназой и ингибируя инсулин/**IGF-1**-сигналинг. В результате **Klotho** активирует транскрипционный фактор **FOXO**, индуцируя марганцевую супероксиддисмутазу (**Mn-SOD**) и обеспечивая устойчивость к оксидативному стрессу (**Kurosu et al., 2005; Yamamoto et al., 2005**). Он обнаруживается в ограниченном числе тканей, прежде всего в дистальных извитых канальцах почек и в хорoidalном сплетении мозга. У человека наличие некоторого **SNP** (полиморфизма одиночных нуклеотидов) по гену *klotho* также ассоциировано с изменением продолжительности жизни, риском болезни коронарной артерии, остеопорозом и инфарктом (**Kurosu et al., 2005; Yamamoto et al., 2005**). Популяционно-генетические исследования человека выявили аллель **KL-VS** гена *klotho*, гетерозиготность по которой увеличивает продолжительность жизни (**Argking et al., 2002**).

Люди, теряющие функцию гена рецептора гормона роста (синдром Ларона), контролирующего инсулиновый сигналинг, характеризуются маленьким ростом, лицевым дисморфизмом, тучностью, низким уровнем глюкозы и **IGF-1** в сыворотке, отсроченным созреванием. До сих пор отмечено около **220** случаев, вызванных **25** различными мутациями с разнообразными фенотипами. Данные об их средней продолжительности жизни отсутствуют. Фрагментарная информация о «маленьких людях» с мутацией гена **PROPI** предполагает, что такие индивидуумы могут быть долгожителями. По крайней мере один из пациентов дожил до **91** года (**Butler et al., 2003**).

Исследования долгожителей, эффектов спорадических мутаций и заболеваний проливает свет на роль инсулин/**IGF-1**-сигналинга в регуляции продолжительности жизни человека. Установлено, что в норме у человека чувствительность к инсулину с возрастом снижается. Резистентность к инсулину является важным фактором риска, связанным с повышенным кровяным давлением, атеросклерозом, ожирением, влияя на заболеваемость, нетрудоспособность и смертность среди лиц пожилого возраста (**Cheng et al., 2005**). Напротив, снижение количества инсулина в плазме крови при одновременном низком уровне глюкозы, отражающее повышенную чувствительность к инсулину, является маркером долголетия (**Broughton et al., 2005; Cheng et al., 2005**). Данные обследования **466** здоровых субъектов в возрасте **28—110** лет показали существенное снижение резистентности к инсулину в возрасте **90—100**-лет. Таким образом, эффективный инсулиновый ответ

увеличивает продолжительность жизни человека. Сравнение параметров старения индивидуумов до 39 и свыше 70 лет, имеющих сходный уровень IGF-1 в крови показал, что пожилые люди с уровнем IGF-1 как у молодых не проявляют возрастзависимого снижения тестостерона в сыворотке крови, худощавы, не страдают увеличением жировой массы (Cheng et al., 2005). Проведены исследования полиморфизма в популяции человека аллелей генов *IGF-1R*, *PI3KCB*, *IRS-1* и *FOXO1A*, принимающих участие в инсулин/IGF-сигналинге. Индивидуумы, несущие по крайней мере одну аллель *A* в локусе *IGF-1R* (*IGF-1R A⁺*), имеют низкий уровень IGF-1 в плазме и наиболее часто представлены среди долгожителей. Более того, комбинация аллели *A* локуса *IGF-1R* и аллели *O* локуса *PI3KCB* (*A⁺T^r*-субъекты) влияет на уровень IGF-1 в плазме крови и на продолжительность жизни, она часто встречается у долгожителей (Cheng et al., 2005).

В то же время вовлечение инсулин/IGF-1-пути в регуляцию продолжительности жизни у млекопитающих выглядит более сложным, чем у низших животных. Повсеместное снижение инсулинового сигналинга у млекопитающих ассоциировано с диабетом, характеризующимся высоким уровнем глюкозы в крови из-за снижения ее поглощения из циркуляции тканями мышц и печени, а также из-за увеличения высвобождения глюкозы в кровь при катаболизме печени гликогена и белков. Диабет II типа приводит к ускоренному появлению возраст-ассоциированных симптомов. Диабет у млекопитающих может быть обусловлен физиологическими нарушениями, невозможными у беспозвоночных, а именно микро- и макрососудистыми повреждениями в результате гипергликемии (Broughton et al., 2005; Cheng et al., 2005). Кроме того, это может быть связано с большим количеством инсулин/IGF-1-рецепторов во множестве органов млекопитающих, а также разделением рецепторов, сигнальных путей и функций инсулина и IGF-1 (Cheng et al., 2005).

Таким образом, инсулиновый сигналинг, стимулирующий рост и развитие, метаболизм и репродукцию, плеiotропно подавляет стрессоустойчивость, обуславливая снижение продолжительности жизни экспериментальных животных. Другими словами, при благоприятных внешнесредовых условиях он перераспределяет энергетические и пластические ресурсы клетки и организма в целом от репаративных путей к процессам роста и размножения. Данная роль консервативна в эволюции от беспозвоночных до млекопитающих. В то же время практическая ценность подавления инсулинового сигналинга для достижения долголетия у млекопитающих сомнительна, поскольку нивелируется патологическими изменениями, связанными с диабетом.

3.2. Транскрипционные факторы DAF-16/FOXO

Успехи генетики старения модельных объектов (нематод, дрозофил, мышей) в последние годы позволили выявить три ключевых механизма регуляции скорости старения: инсулиновый, JNK-киназный и SIRT-деацетилазный. Как оказалось, эти механизмы являются высококонсервативными от нематод (в некоторых случаях от дрожжей) до человека и имеют общую регуляторную мишень — транскрипционные факторы семейства FOXO, определяющие клеточную судьбу (выживание или гибель) в ответ на различные стимулы.

Транскрипционные факторы FOXO представляют собой подсемейство в пределах Forkhead-семейства транскрипционных факторов, характеризующихся консервативным ДНК-связывающим доменом (**forkhead box**, или FOX). Данное семейство у человека включает более 100 белков, классифицируемых от FOXA до FOXR на основе сходства последовательности (Carter, Brunet, 2007). Первый представитель семейства (FOXA) был идентифицирован у дрозофилы как ген, мутация в котором приводит к возникновению избыточных структур головы, подобных вилке. Отсюда и название семейства Forkhead (вилчатая головка). Иногда белки данного семейства называют «winged helix» (крыловидная спираль), поскольку рентгеноструктурный анализ демонстрирует трехмерную структуру с тремя α -спиралями, фланкированными характерными петлями, напоминающими крылья бабочки (Carter, Brunet, 2007). Члены интересующего нас подсемейства «O» (FOXO) характеризуются тем, что они регулируются инсулин/PI3K/AKT-сигналингом. У беспозвоночных известно по одному представителю FOXO: DAF-16 у нематод и dFOXO у дрозофил. У млекопитающих их четыре: FOXO1, 3, 4 и 6 (Carter, Brunet, 2007).

В норме каждая клетка балансирует на грани жизни и смерти и существует лишь до тех пор, пока корректно выполняет свою функцию. Нарушение этого баланса может приводить к избыточной гибели или к накоплению ненужных или даже опасных клеток, т. е. к дефектам развития, нейродегенеративным и аутоиммунным заболеваниям, раку. Как правило, апоптоз подавляется сигналами выживаемости, получаемыми от соседних клеток. Главный сигнал выживаемости возникает при активации PI3K/AKT-механизма, индуцируемого факторами роста. При отсутствии сигналов выживаемости клетки инициируют апоптоз. В ответ на стрессы или токсины клетки также подвергаются апоптозу. Ведущую роль в переключении программ выживания или гибели клетки в ответ

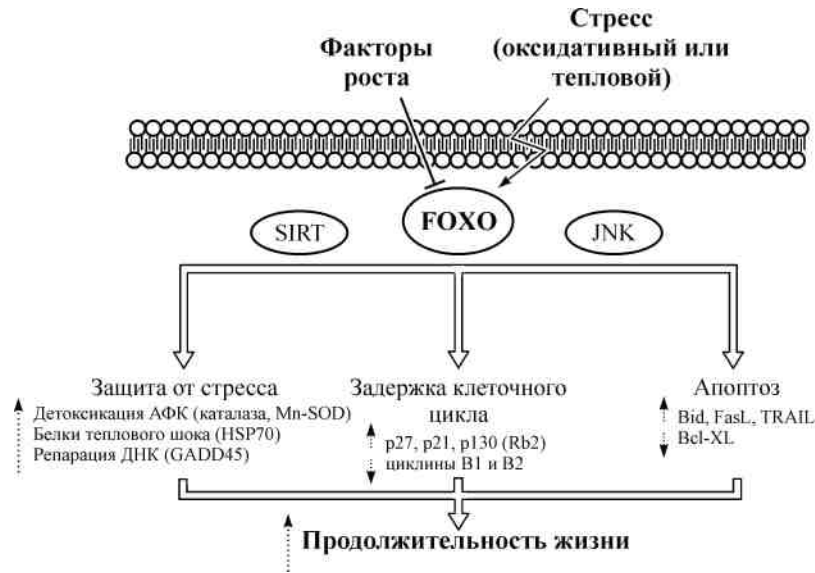


Рис. 4. FOXO-зависимые механизмы у млекопитающих.
Пунктирная стрелка — активация или подавление данных белков в процессе.
Пояснения см. в тексте, разд. 3.2.

на факторы роста отводится транскрипционным факторам FOXO (Liu et al., 2005), которые являются ключевыми регуляторами клеточной судьбы (рис. 4). Через экспрессию генов они контролируют различные и подчас противоположные функции клетки, такие как пролиферация, дифференцировка, апоптоз, репарация ДНК, защита от окислительных повреждений, осуществляемые ею в ответ на гормоны, факторы роста и другие средовые сигналы (Lam et al., 2006). Транскрипционные факторы FOXO играют роль белков супрессии опухолей (Huang, Tindall, 2006). Кроме того, FOXO опосредуют ответ на оксидативный и другие виды стресса, что зачастую связано с увеличением продолжительности жизни (Gianakou, Partridge, 2004).

Функционирование Forkhead-белков в стресс-ответе клетки эволюционно консервативно и обнаруживается уже у примитивных представителей эукариотов. Окислительный стресс у дрожжей регулирует экспрессию генов через транскрипционный комплекс Mcm1/Fkh2/Ndd1. Таким образом, уже у дрожжей Forkhead-белки (Fkh2) вовлечены в задержку клеточного цикла (на стадии G₂/M), индуцированную окислительным стрессом (Shapira et al., 2004).

Как уже обсуждалось в предыдущем разделе, снижение активности инсулинового сигналинга увеличивает продолжительность

жизни у червей, мух, мышей. Как оказалось, данный эффект обусловлен прежде всего снятием инсулинзависимого фосфорилирования (подавления) активности FOXO (Giannakou et al., 2004).

Рассмотрим механизм системной регуляции активности FOXO (DAF-16) у нематод. Рецептор инсулина DAF-2 функционирует первоначально в нервной системе. Мозаики, потерявшие *daf-2* в зародышевых клетках АВ, дающих начало нейронам и эпидермису либо только в нейронах, являются долгожителями. Восстановление экспрессии *daf-2* под действием нейрон-специфического промотера уменьшает продолжительность жизни мутантов *daf-2* до контрольного уровня. Удаление половых клеток также продлевает жизнь, причем это увеличение зависит от накопления DAF-16 в ядрах клеток кишечника. Активность же DAF-16 в нейронах обуславливает, кроме того, увеличение продолжительности жизни мутантов *daf-16(-);daf-2(-)* только на 5—20 %. Однако индукция DAF-16 в кишечнике приводит к продлению жизни уже на 50—60 %. Возможно, что DAF-16 тканеспецифично регулирует нижележащий сигнал или гормон. Поскольку сверхэкспрессия DAF-16 в одной ткани приводит к его сверхрегулированию в другой, то возможно, что это обусловлено подавлением агониста инсулинового рецептора, либо стимулированием его антагониста (Libina et al., 2003).

У дрозофилы отсутствие ростовых факторов (DILP, EGF), обуславливая активацию dFOXO, приводит к индукции двух ключевых звеньев dPI3K/dAkt-механизма: регулятора трансляции d4EBP и рецептора dInR. Индукция d4EBP ведет к ингибированию роста, тогда как активация dInR представляет собой механизм обратной связи (Puig et al., 2003). При обилии пищи у дрозофил секреция DILP осуществляется на высоком уровне и происходит активация dInR-механизма, что приводит к стимуляции роста, отчасти благодаря подавлению dFOXO. Все это способствует росту и развитию. При ограничении питательных веществ секреция DILP снижается и dInR не активируется, а dFOXO остается дефосфорилированным активным ядерным белком. Рост ингибируется отчасти через dFOXO-зависимую активацию ингибитора трансляции d4EBP. В то же время dFOXO сверхактивирует ген *dInR*, в результате чего клетка готовится воспринять сигнал при изменении условий среды и уровня DILP. Если пищи будет недостаточно, то клетка сможет быстро ответить отключением dFOXO (через dAKT-опосредованное фосфорилирование) и стимулированием роста (Puig et al., 2003; Puig, Tjian, 2005). Аналогичная обратная связь имеет место и у млекопитающих: FOXO1 регулирует экспрессию инсулинового рецептора в печени и мышцах (Hwangbo et al., 2004; Puig, Tjian, 2005).

Тканеспецифичность эффектов FOXO, выявленная у нематод, подтверждается и у дрозофил. Постоянная сверхэкспрессия *dFOXO* в жировом теле взрослой особи снижает темп смертности и увеличивает продолжительность жизни независимо от уровня экспрессии инсулиноподобных пептидов в мозгу, в норме подавляющих активность *dFOXO* (Giannakou et al., 2007). Величина эффекта составляет около 20 %. Одновременно происходит увеличение устойчивости к индуктору свободных радикалов параквату. Сверхэкспрессия *dFOXO* в нервной ткани, глии или невролемме взрослого животного не приводит к увеличению продолжительности жизни (Giannakou et al., 2004; Hwangbo et al., 2004). Экспрессия *dFOXO* в раннем развитии личинок дрозофилы вызывает ингибирование роста до тех пор, пока его индукция не прекратится. Сверхэкспрессия *dFOXO* на стадии личинки третьего возраста приводит к формированию взрослых особей малых размеров, что вызвано как уменьшением размера клеток, так и их количества. Изменения в развитии личинок при сверхэкспрессии *dFOXO* фенотипически похожи на эффекты голодания, что предполагает роль *dFOXO* в ответе на недостаток питательных веществ (Kramer et al., 2003).

Каким образом регулируется активность FOXO? У нематод транскрипционный фактор DAF-16 играет ключевую роль в интеграции различных сигналов, индуцируемых стрессом и пищевым статусом животных. В первую очередь сюда относится сигналинг через MAPK-механизм (через JNK-1), инсулин (через DAF-2) и стероид дафахроновую кислоту (через DAF-12). Кроме того, известно генетическое взаимодействие DAF-16 со стресс-индуцируемым фактором теплового шока (HSF-1) и компонентами других механизмов стресс-ответа, например SKN-1 (Baumeister et al., 2006). Еще один корегулятор DAF-16, SMK-1, влияет на процесс старения у нематод путем воздействия на транскрипционную специфичность активности DAF-16. SMK-1 взаимодействует с DAF-16 после перемещения его в ядро. SMK-1 опосредует функции DAF-16 в качестве как транскрипционного активатора, так и репрессора. Ген *smk-1* взаимодействует с DAF-16 для регуляции врожденного иммунитета, ответа на УФ- и оксидативный стресс, но не влияет на температурный стресс-ответ. Последний контролируется DAF-16 при участии HSF-1. SMK-1 необходим для индукции экспрессии DAF-16-активируемых генов антиоксидантной защиты — *sod-3*, *ctl-1* и *lys-8* и репрессии гена клеточного роста *daf-15*. SMK-1 локализован в ядре и высокоэкспрессирован в клетках кишечника взрослой особи и в ряде нейронов. Сверхэкспрессия одного лишь гена *smk-1* не приводит к увеличению продолжительности жизни (Wolff et al., 2006).

Эффективность выполнения функций FOXO у млекопитающих регулируется фосфорилированием, ацетилизацией и убиквитинированием, а также межбелковыми взаимодействиями (Huang, Tindall, 2006). FOXO1, FOXO3a и FOXO4 являются главными субстратами протеинкиназ PKB (AKT) и SGK (сыворотка- и глюкокортикоид-индуцированная протеинкиназа), которые передают PI3K-сигналы. FOXO6 потерял участок PKB-обусловленного фосфорилирования и постоянно находится в ядре (Lam et al., 2006).

В ответ на фосфорилирование под действием PKB и SGK факторы FOXO депонируются в цитоплазме и не могут активировать гены клеточной гибели или остановки деления. Фосфорилирование под действием PKB снижает также ДНК-связывающую активность транскрипционных факторов FOXO и усиливает их деградацию (Greer et al., 2007). Интересно отметить, что, хотя прямое активирование PKB спасает клетки от индукции апоптоза, вызванного лишением цитокинов, но этот антиапоптозный эффект является короткоживущим (до двух суток). Длительная активация PKB, наоборот, вызывает резкое увеличение уровня и активности FOXO3a, приводя к экспрессии его транскрипционных мишеней — проапоптозного *bim* и антипролиферационного *p27^{kip1}*. Каким образом это происходит? Высокий уровень активности PKB увеличивает аэробный гликолиз и активность митохондрий, стимулируя образование активных форм кислорода. Таким образом, дерегулированная активность PKB индуцирует оксидативный стресс, вызывающий сверхактивацию FOXO3a и последующую гибель клетки (van Gorp et al., 2006).

Ингибирование циклинзависимой киназы 2 (CDK2) играет центральную роль в задержке клеточного цикла в ответ на повреждение ДНК. CDK2 специфично фосфорилирует FOXO1 по серину-249 как *in vitro*, так и *in vivo*, что приводит к его локализации в цитоплазме и ингибированию. Это фосфорилирование снимается при повреждении ДНК (разрывах цепочки) через механизм проверочных точек клеточного цикла, зависимый от протеинкиназ Chk1 и Chk2 (Huang et al., 2006). Другие киназы, такие как CK1 (казеинкиназа 1) и DYRK1A (тирозин-фосфорилирующая и регулирующая киназа с двойной специфичностью 1A), также фосфорилируют и ингибируют активность FOXO (Lam et al., 2006). Напротив, сенсор энергетического состояния клетки AMPK фосфорилирует и активирует FOXO3, вызывая увеличение стрессоустойчивости и усиление индукции альтернативных энергетических путей клетки (Greer et al., 2007).

В условиях оксидативного стресса FOXO также фосфорилируется протеинкиназами JNK или MST1, что приводит к его пере-

мещению в ядро и активации (рис. 4) (Lehtinen et al., 2006; Carter, Brunet, 2007).

Другой механизм регуляции FOXO — ацетилирование/деацетилирование. Ацетилазы CBP (CREB-связывающий белок) и p300 являются транскрипционными коактиваторами FOXO (Giannakou, Partridge, 2004; Huang, Tindall, 2006). Взаимодействие между FOXO и p300/CBP снижается в ответ на стимулирование факторами роста (Lam et al., 2006). Стресс приводит к взаимодействию FOXO3 с ацетилазами и к ацетилированию самих FOXO (ультрафиолет — FOXO3, перекись водорода — FOXO4). Ацетилирование FOXO3 усиливает ответ клетки на воздействие перекиси водорода и теплового шока. Тем не менее ассоциация FOXO3 и FOXO4 с деацетилазой SIRT1 также возрастает в условиях оксидативного стресса (Giannakou, Partridge, 2004). В клетках, растущих в нормальных условиях, факторы FOXO, как правило, ацетилированы, однако стресс-сигналы способны менять это состояние. Деацетилазы семейства SIRT являются важными регуляторами транскрипционной активности FOXO в ответ на клеточный стресс (рис. 4). Окислительный стресс стимулирует SIRT1 к связыванию и деацетилированию FOXO3a, что активирует одни гены (которые участвуют в задержке клеточного цикла и регулируют устойчивость к окислительному стрессу), но подавляет другие (проапоптозные гены-мишени). Эта способность SIRT перенаправлять FOXO-зависимые ответы с апоптоза на задержку клеточного цикла и на усиление стрессоустойчивости имеет прямое отношение к долгожительству. SIRT1 также способен активировать FOXO1 и FOXO4, стимулируя задержку клеточного цикла путем индукции экспрессии *p27^{Kip1}* и увеличения уровней антиоксидантного фермента Mn-SOD и фермента репарации GADD45 (индуцируемый ДНК-повреждением белок задержки роста 45) (Lam et al., 2006). Активация стрессом деацетилазы SIRT1 противодействует CBP- и(или) p300-опосредованному ацетилированию FOXO1, 3a и 4 (Huang, Tindall, 2006). SIRT1 способен также деацетилировать (подавлять) сам p300 (Giannakou, Partridge, 2004).

Транскрипционный фактор β-катенин, играющий роль в развитии и самообновлении тканей, напрямую связывается с FOXO, что усиливает транскрипционную активность обоих факторов. Способность β-катенина взаимодействовать с FOXO увеличивается в ответ на оксидативный стресс. Потеря VAR-1, ортолога •-катенина у нематод, снижает способность DAF-16 регулировать экспрессию *sod-3* — эквивалент *Mn-Sod* млекопитающих (Lam et al., 2006). Другие транскрипционные факторы — MYC, NF-κB (ядерный фактор κB), SMAD и p53, также вовлечены в регулирование активности FOXO (Lam et al., 2006). Супрессор опухолей p53 в от

вет на повреждение ДНК подавляет активность FOXO (You, Mak, 2005; Carter, Brunet, 2007). Хорошо известный транскрипционный фактор NF-κB, опосредующий выживаемость клетки, функционально связан с FOXO3a. Оказалось, что киназа IκB (IKK), ингибирующая NF-κB, подавляет и FOXO3a, стимулируя его протеолиз через убиквитин-зависимый протеосомный путь. Как правило, это происходит при воспалении, которое приводит к высвобождению фактора некроза опухолей TNF-β, активирующего киназу IKK-β. В то же время FOXO3a негативно регулирует сам NF-κB, а дефицит FOXO3a приводит к гиперактивации NF-κB и T-клеток (Liu et al., 2005; Huang, Tindall, 2006).

В качестве еще одного способа регуляции функций FOXO можно рассматривать его моноубиквитинирование в условиях оксидативного стресса, что увеличивает его транскрипционную активность. Напротив, полиубиквитинирование приводит к протеосомной деградации (Carter, Brunet, 2007). Кроме участия в уже упоминавшемся выводе FOXO из ядра АКТ-зависимое фосфорилирование играет ключевую роль в протеосомной деградации FOXO1 и FOXO3a. Деградация FOXO1 происходит при его взаимодействии с Skp2 (убиквитин E3-лигазным комплексом), требующем АКТ-специфичного фосфорилирования FOXO1. Анд-рогены также способны запускать протеолитическое разрезание FOXO1 (Huang, Tindall, 2006).

После рассмотрения основных путей регуляции FOXO перейдем к FOXO-зависимым эффектам. Прежде всего, FOXO играют роль транскрипционных факторов, которые, взаимодействуя с консенсусной последовательностью ДНК *GTAAA(C/T)A*, модулируют экспрессию генов-мишеней (Greer et al., 2007).

У нематод DAF-16 контролирует экспрессию более чем 100 антиоксидантных, метаболических, онтогенетических, шаперонных и антимикробных генов (O'Neill, 2004; Balaban et al., 2005; Hansen et al., 2005). Даже эффект удлинения теломер на продолжительность жизни нематод зависит от DAF-16 (Joeng et al., 2004). Однако влияние DAF-16 на продолжительность жизни опосредовано не только активацией транскрипции, но и репрессией. Так, он снижает транскрипцию инсулиноподобных пептидов (Wang et al., 2005). Гены, связанные с ростом и репродукцией, при активации DAF-16 снижают свою активность, тогда как гены стресс-ответа (ген каталазы, *Cu,Zn-Sod* и *Mn-Sod*, гены глутатион-S-трансферазы и факторов теплового шока), напротив, увеличивают свою экспрессию (McElwee et al., 2004; Baumeister et al., 2006). Среди генов метаболизма, индуцируемых DAF-16, имеются ферменты, вовлеченные в митохондриальный транспорт и метаболизм жирных кислот. Например, DAF-16 регулирует глиоксилатный цикл, про-

цесс утилизации жирных кислот в пероксисомах. Таким образом, нематоды переключаются на альтернативные энергетические механизмы, которые, как постулируется, сопровождаются меньшей генерацией свободных радикалов и большей продолжительностью жизни (Balaban et al., 2005).

Транскрипционные факторы семейства FOXO в клетках млекопитающих индуцируют транскрипцию разнообразных генов, таких как гены оксидативного стресс-ответа (*Mn-Sod*, ген каталазы), репарации ДНК (*GADD45*), задержки клеточного цикла (*p27^{Kip1}*) и апоптоза (*bim*, *Fas*-лиганд, *TRAIL*, *IGFBP-1* и *NIP3*) (Giannakou, Partridge, 2004; Huang, Tindall, 2006). FOXO опосредованно подавляет экспрессию антиапоптозного члена Bcl-x_L из Bcl-2-семейства, индуцируя экспрессию Bcl-6 (Huang, Tindall, 2006; Lam et al., 2006). Факторы FOXO регулируют проверочную точку G₁ клеточного цикла, модулируя экспрессию генов ингибитора циклин-зависимых киназ (*p27^{Kip1}*) и фактора p130 (*p130*, или *Rb2*), родственного белку ретинобластоны. В ответ на трансформирующий фактор роста β (TGFβ), FOXO связывают и активируют промотор другого ингибитора циклин-зависимых киназ — *p21^{Waf1/Cip1}*. В то же время фазе G₁ активация FOXO подавляет экспрессию циклинов D1 и D2, непосредственно или опосредованно (через увеличение экспрессии транскрипционного репрессора Bcl-6). Наконец, FOXO вовлечены в регуляцию экспрессии генов циклинов B1 и G2, а также *Cdc25B* (cell division cycle 25B), необходимых для G₂/M-перехода. Факторы FOXO также влияют на переход из M-фазы клеточного цикла в G₁, регулируя экспрессию митотических генов циклина B и *polo*-подобной киназы (*Plk*). Транскрипционные факторы FOXO регулируют и экспрессию некоторых других генов клеточного цикла — гена фосфатазы (*Wip1*) и *EXT1* (Huang, Tindall, 2006).

Кроме задержки клеточного цикла и апоптоза белки FOXO могут способствовать дифференцировке клеток. Например, FOXO3a стимулирует эритроидную дифференцировку путем индукции гена перемещения B-клеток 1 (*BTG1*), который модулирует метилирование аргининов в составе белков. Более того, FOXO3a напрямую подавляет транскрипцию гена *Id1* (ингибитора дифференцировки 1) — супрессора эритроидной дифференцировки через HDAC1-mSin3a (гистон-деацетилазный) комплекс (Lam et al., 2006).

Белки FOXO напрямую контролируют экспрессию гена белка кавеолина-1, что приводит к уменьшению EGF-индуцированного сигналинга (MAP-киназной активности). Кавеолин-1 является главным компонентом микродоменов, локализованных в клеточной мембране и носящих название «ямки» (кавеолы). Внутри ямок кавеолин-1 взаимодействует с рецепторами факторов роста (EGF

и инсулина) и с другими сигнальными молекулами, например РКА (протеинкиназа А), Src-киназа и H-Ras. Через такое взаимодействие активность этих белков подавляется. Сверхэкспрессия кальвеолина-1, индуцируемая перекисью водорода, приводит к задержке клеточного цикла на стадии G₀/G₁ и к преждевременному клеточному старению. Экспрессия кавеолина-1 в стареющих клетках увеличивается и приводит к снижению с возрастом EGF-сигналинга, что затрагивает MAPK-фосфорилирование (Schmidt et al., 2002; van den Heuvel et al., 2005).

Как известно, крупные липопротеиновые частицы и большое количество липопротеинов высокой плотности — характерная черта долгожителей. Гомозиготность аллели **641C** гена **APOC3** связана с благоприятным профилем липопротеинов, здоровой сердечно-сосудистой системой, чувствительностью к инсулину и с долгожительством. В то же время **FOXO1** является одним из регуляторов экспрессии гена **APOC3**. Делеция сайта связывания **FOXO1** в гепатоцитах мыши снимает ингибирующее действие инсулина на экспрессию **APOC3** в печени, а животные, конститутивно экспрессирующие **FOXO1**, имеют гипертриглицеридемию (Atzmon et al., 2006).

Обнаружена значительная избирательная индукция транскриптов **FOXO1** и **FOXO3a** в скелетных мышцах мышей при голодании, причем уже спустя 6 ч после прекращения питания (для сравнения отметим, что заметных изменений экспрессии **FOXO** в печени и почках при голодании не наблюдали). Эта индукция может быть вызвана высокими уровнями глюкокортикоидов в крови. Возможно также, что связанное с голоданием увеличение уровня неэстерифицированных жирных кислот плазмы могло повлиять на уровень экспрессии **FOXO1** через пролифераторно-активируемые рецепторы пероксисом (**PPAR**). Помимо количества самого белка при голодании также возрастает уровень нефосфорилированной (транскрипционно активной) фракции **FOXO1**, что вызвано снижением количества инсулина в крови.

К каким адаптивным реакциям приводит вызванная голодом индукция **FOXO1**? Она обуславливает увеличение уровня **PDK4** (киназы 4 пируватдегидрогеназы) — регулятора поглощения глюкозы мышцами. Сверхэкспрессия **FOXO** индуцирует также гены фосфоенолпируваткарбоксикиназы (**PEPCK**) и глюкозо-6-фосфатазы (**G6P**) — ферментов, являющихся ключевыми глюконеогенными и глюкогенолитическими ферментами, индукция которых ингибируется инсулином в клетках почек и печени (Furuyama et al., 2003). Фактор **FOXO1** вовлечен в дифференцировку жировой ткани и в процесс развития ожирения при богатой жирами диете, поскольку участвует в дифференцировке миобластов и адипоци-

тов и в росте • -клеток поджелудочной железы, играющих центральную роль в регуляции метаболизма глюкозы (Furuyama et al., 2003; Puig, Tjian, 2005). FOXO1 также активирует промотор гена субстрата 2 рецептора инсулина (IRS-2) в условиях голодания. Таким образом, FOXO1 действует как сенсор инсулина, ускоряя ответ на инсулин после каждой еды (Puig, Tjian, 2005).

Помимо голодания, а также окислительного и теплового стрессов белки FOXO могут играть роль в ответе на гипертонический стресс. Все клетки адаптируются к гипертоническому стрессу через накопление органических осмолитов, что позволяет регулировать свой объем после сморщивания, и через активацию механизмов защиты и репарации индуцированных гипертонией повреждений. Транскрипционные мишени DAF-16 защищают *Caenorhabditis elegans* от чрезмерного гипертонического стресса. Генетическое ингибирование DAF-2 или его нижележащей мишени AGE-1 (фосфатидилинозитол-3-киназа) придает животному устойчивость к обычно летальному гипертоническому шоку DAF-16-зависимым образом. Гипертоническая стрессоустойчивость мутантов *age-1* зависит от активности 14 DAF-16-регулируемых генов, выявленных методом интерференции РНК — это гены белков теплового шока, ферментов синтеза трегалозы и ряд других. DAF-16 активирует экспрессию двух генов *hsp12*, четырех *hsp16*, одного *hsp20* и одного *hsp70*. Уровень трегалозы у мутанта *age-1* увеличен примерно в 2 раза (Lamitina, Strange, 2005)

Несмотря на то что роль FOXO в регуляции ответа на такие клеточные стрессы, как лишение факторов роста и питательных веществ, а также окислительный и температурный стрессы, является достаточно изученной, однако известно мало работ, посвященных исследованию его роли в ответе на действие ионизирующей радиации. Установлено, что FOXO3a играет центральную роль в индукции УФ-радиацией белка задержки роста и репарации ДНК — GADD45A. Показано также, что ионизирующая радиация стимулирует как транскрипционную активность FOXO3a, так и уровень экспрессии этого белка, и индуцирует перемещение FOXO3a в ядро. Ионизирующая радиация FOXO-зависимым образом стимулирует экспрессию апоптоз-индуцирующих белков, таких как Fas-лиганд и взаимодействующий с Bcl-2 медиатор гибели клетки (Bim). Наблюдаемая FOXO3a-зависимая сверхактивация проапоптозных генов и самого апоптоза в клетках, лишенных p53 (конкурента FOXO при генотоксическом стрессе), в ответ на ионизирующую радиацию предполагает наличие нового, p53-независимого, механизма радиационно-индуцированного апоптоза (Yang et al., 2006).

Каким образом факторы FOXO влияют на продолжительность жизни? Они могут модулировать паттерны экспрессии генов в за-

висимости от интенсивности стимулов, активируя стрессоустойчивость при умеренном стрессе, или проапоптозные гены в случае превышения определенного порога интенсивности стресса. FOXO регулируют еще ряд генов в различных типах клеток, вызывая апоптоз в нейронах и лимфоцитах, но стимулируя выживаемость других клеток. Индукция апоптоза приводит к гибели поврежденных или ненормальных клеток, что также полезно для долгожительства организма (Carter, Brunet, 2007).

Кроме того, перед стимуляцией апоптоза клетки быстро мобилизуют защитные механизмы для продления своего существования. Действительно, апоптозные стимулы активируют молекулы, необходимые не только для гибели, но и для выживания. Как оказалось, три различных проапоптозных стимула (сывороточное голодание, митохондриальный токсин и повреждение ДНК этопозидом) обуславливают быструю индукцию молекул выживания нескольких классов, в частности антиапоптозных белков Bcl-2/Bcl-x_L и супероксиддисмутаза (Mn-SOD and Cu,Zn-SOD). Локализованный в митохондриях Hsp60 также активируется и высвобождается из митохондрий в цитозоль в ответ на все три апоптозных стимула. Индукция этих стимулирующих выживаемость молекул способствует индукции проапоптозных молекул, таких как Bim и Bak, или наблюдается до нее. Индукция апоптозными стимулами молекул выживания и гибели происходит на транскрипционном уровне, что предполагает участие транскрипционных факторов. Транскрипционный фактор FOXO3a вовлечен в активацию, по крайней мере, части этих молекул выживаемости (Mn-SOD) и проапоптозных (Bim) молекул. Другие молекулы выживаемости (Cu,Zn-SOD, Bcl-2, Bcl-x_L) и цитохром c также частично регулируются FOXO3a, поскольку их индукция ослабляется доминантно-негативной формой этого транскрипционного фактора либо его делецией или РНК-интерференцией.

Во всех трех системах апоптоза сам ген FOXO3a также сверхактивировался на транскрипционном уровне. Апоптозные стимулы вызывают раннюю активацию митохондрий, характеризующуюся быстрой индукцией связанных с дыханием белков, включая оксидазу цитохрома c и апоцитохром c, причем последний затем быстро импортируется в митохондрию, где участвует в митохондриальном дыхании, приводя к ранней гиперполяризации мембраны, увеличению поглощения кислорода и уровня АТФ. Такие ответы предшествуют выходу голоцитохрома c из митохондрий и приводят к образованию некоторого количества активных форм кислорода. Увеличение концентрации активных форм кислорода обнаруживается на ранних стадиях стимуляции апоптоза любым из трех способов. Молекулы выживания, индуцируемые этим незна-

чительным повышением количества свободных радикалов, защищают клетки от дальнейшего увеличения выработки АФК (Liu et al., 2005). По-видимому, активные формы кислорода выполняют функцию ключевых сигнальных молекул активации FOXO3a и, возможно, других многофункциональных транскрипционных факторов (p53, E2F1, c-MYC, и NF-κB), а также сигнальных молекул (таких как ERK) в транскрипционной активации про- и антиапоптотических молекул в ответ на стимуляцию апоптоза (Liu et al., 2005).

Таким образом, любые апоптотические стимулы вызывают раннюю активацию митохондрий, приводя к быстрому образованию активных форм кислорода, которые в свою очередь индуцируют транскрипционный фактор FOXO3a, одновременно запускающий экспрессию многих генов с про- и антиапоптотической функцией. Эти сигнальные пути активируются сразу же после сенсирования стресса, независимо от его величины. Сила и распределение по времени различных сигналов выживания и гибели определяют конечную судьбу подвергшейся стрессу клетки. Гибель клетки произойдет только в том случае, когда проапоптотические сигналы превзойдут по силе (например, при постоянной стимуляции апоптоза) сигналы выживания или когда последние отсутствуют (Liu et al., 2005).

Еще один из возможных способов участия FOXO в старении млекопитающих — это регуляция функционирования стволовых клеток, играющих ключевую роль в самообновлении тканей. Делеция FOXO3 и FOXO4 в гематопозитических стволовых клетках новорожденных мышей ведет к удвоению числа клеток периферической крови, при этом количество долговременных гематопозитических стволовых клеток, необходимых для поддержания гематопоза, уменьшается. Все это сопровождается повышением выхода клеток из покоящегося состояния и высоким темпом пролиферации, что, по-видимому, связано с нарушением FOXO-зависимой остановки клеточного цикла. В то же время гематопозитические стволовые клетки без FOXO накапливают свободные радикалы и имеют низкий уровень экспрессии антиоксидантных генов. Возможно, что активные формы кислорода являются триггером для выхода гематопозитических стволовых клеток из покоя и для начала их созревания, что может вызываться деактивацией (фосфорилированием) FOXO (Coffer, Burgering, 2007).

Несмотря на несомненное эволюционное сходство FOXO-зависимых механизмов регуляции продолжительности жизни разных животных, роль FOXO в онтогенезе видоспецифична. Тог-

да как черви или мухи без **FOXO** жизнеспособны, **FOXO1**-дефектные мыши гибнут на стадии эмбриона (10-й день) в результате нарушений ангиогенеза. Мутанты **FOXO3** и **FOXO4** жизнеспособны, хотя особи с **FOXO3** характеризуются возрастзависимым бесплодием самок (Carter, Brunet, 2007).

Таким образом, транскрипционные факторы **FOXO** являются ключевыми белками ответа на различные виды стресса и регулируют широкий спектр реакций клетки (изменение метаболизма, задержку клеточного цикла, дифференцировку, апоптоз и старение), что и определяет роль **FOXO**-зависимых механизмов в детерминации продолжительности жизни.

3.3. Сиртуины

Белки семейства **SIR2** (silent information regulator 2), имеющие коллективное название «сиртуины», представляют собой консервативные в эволюции деацетилазы гистонов, модулирующие продолжительность жизни и стресс-ответ у дрожжей, червей, мух и млекопитающих (Fabrizio et al., 2005a; Zhang et al., 2007). Белки **SIR2** обнаруживаются повсеместно, от археобактерий до человека. Согласно аминокислотной последовательности корового домена, принимающего непосредственное участие в деацетилазной активности, семейство **SIR2** классифицируют на пять групп: классы с I по IV и V. Деацетилазы, ответственные за долгожительство, за редким исключением относятся к классу I (Kusama et al., 2006).

У дрожжей **SIR2** необходим для поддержания репликативной продолжительности жизни, а увеличение дозы гена *sir2* замедляет репликативное старение. Дополнительные копии увеличивают продолжительность репликативной жизни на 40 % одновременно со снижением количества рекомбинантной рДНК и уровня накопления экстрахромосомных ДНК-колец. Напротив, делеция *sir2* существенно снижает репликативную продолжительность жизни. В то же время потеря *sir2* наряду с ограничением калорийности и(или) мутациями в дрожжевых гомологах *akt*, *sch9* или *ras* вызывают существенное увеличение хронологической продолжительности жизни. Инактивация **SIR2** вызывает поглощение и катаболизм этанола, а также стимуляцию многих генов стресс-ответа и споруляции. Таким образом, эффект **SIR2** для хронологической и репликативной продолжительности жизни дрожжей противоположен (Fabrizio et al., 2005a).

SIR2 был охарактеризован как регулятор репрессии хроматина (сайленсинга) путем модификации гистонов (Baumeister et al., 2006). Сайленсинг — это процесс, посредством которого целые участки хромосом, охватывающие блоки генов, оказываются транскрипционно неактивными (Guarente, Kenyon, 2000). **SIR2** играет ключевую роль не только в формировании молчащего хроматина, но и в стабильности генома через участие в репарации двухцепочечных разрывов ДНК путем негомологичного соединения концов. Он также стимулирует асимметричное наследование оксидативно поврежденных белков при цитокинезе. Активность **SIR2** необходима материнской клетке дрожжей для удержания карбонилированных белков при делении клетки, предотвращая их распределение в дочерние клетки (Fabrizio et al., 2005a). Наконец, **SIR2** у дрожжей участвует в регуляции митоза и мейоза (Kusama et al., 2006).

SIR2 относится к классу гистоновых деацетилаз, являющихся NAD^+ -зависимыми. Он деацетилирует гистоны **H3** и **H4** (Bitterman et al., 2003). Его сходство с белком **SIRT1** человека предполагает, что он может быть вовлечен в деацетилирование лизиновых остатков белков (Baumeister et al., 2006).

У дрожжей гетерохроматинизация теломер и локусов типа скрещивания на хромосоме **III** зависит от активности комплекса белков **SIR2/3/4**. Вероятно, эти белки служат для минимизации возможности рекомбинации между теломерными повторами (Bitterman et al., 2003). Причинная связь между сайленсингом и старением клеток дрожжей была найдена при идентификации мутации *sir4-42*, перенаправляющей комплекс **SIR2/3/4** с теломер, а также локусов **HM** к участкам генома, кодирующим рибосомальную РНК (рДНК). В норме это происходит в старых материнских клетках. **SIR2** опосредует сайленсинг рДНК даже при отсутствии других **SIR**. Увеличение сайленсинга рДНК под действием **SIR2** увеличивает продолжительность жизни путем снижения рекомбинации и повышения стабильности генома. По количеству **SIR2** на рДНК можно предсказать продолжительность жизни дрожжевой клетки (Guarente et al., 1998; Guarente, Kenyon, 2000). **SIR2** является антагонистом **FOB1** (см. разд. 2.2.1). Делеция *fob1* увеличивает продолжительность жизни, снижая рекомбинацию рДНК и формирование экстрахромосомных кольцевых рДНК (Kaeberlein et al., 2005a, 2005c). Сверхэкспрессия гена **SIR2** на фоне делеции *fob1* не приводит к дальнейшему увеличению продолжительности жизни, что свидетельствует в пользу предположения, что нарушение регуляции экстрахромосомных кольцевых рДНК служит механизмом старения клетки дрожжей (Kaeberlein et al., 2004).

SIR2 способен проявлять активность АДФ-рибозилтрансферазы, использующей NAD^+ в качестве донора. Эта особенность является универсальным свойством данного фермента от бактерий до млекопитающих (Guarente, Kenyon, 2000). Таким образом, деацетилирование под действием **SIR2** происходит в результате реакции, протекающей с потреблением NAD^+ и образованием О-ацетил-АДФ-рибозы и никотинамида. Разложение никотинамида предшествует переносу ацетильной группы. Никотинамид является ингибитором **SIR2**-деацетилирования как *in vitro*, так и *in vivo* (Kaeberlein et al., 2005b, 2005c). Благодаря NAD^+ -зависимости **SIR2** определяет энергетическое и окислительное состояние клетки и изменяет свою активность в соответствии с ним. Механизм синтеза NAD^+ является критичным для активности **SIR2**. Добавочная копия гена синтеза NAD^+ — *npt1* увеличивает продолжительность жизни дрожжей на 60 %, а также вызывает утолщение прителомерных областей и рДНК, притом что сам уровень NAD^+ поддерживается в норме. Ген *pnc1*, кодирующий никотинамидазу, увеличивает репликативную продолжительность жизни дрожжей на 70 % **SIR2**-зависимым способом. Возможно, это механизм, который связывает активность **SIR2** и снижение калорийности питания, являющееся ключевым среди продлевающих жизнь воздействий (Bitterman et al., 2003).

Таким образом, некоторые факты свидетельствуют о связи увеличения продолжительности жизни в ответ на ограничение калорийности пищи с высокой активностью **SIR2** (Cohen et al., 2004; Kaeberlein et al., 2004; Balaban et al., 2005). Однако в случае мутаций генов *sir2* или *npt1* продления жизни посредством ограничения калорийности питания не происходит (Guarente, Kenyon, 2000). Эти данные привели к появлению модели, согласно которой ограничение потребления калорий активирует **SIR2**, что вызывает снижение накопления экстрахромосомных кольцевых рДНК и увеличение продолжительности жизни. Многие предполагают, что долгожительство в результате ограничения калорийности пищи является следствием метаболического сдвига, который имеет результатом увеличение концентрации NAD^+ , служащего субстратом **SIR2**-зависимого деацетилирования гистонов. Однако были предложены еще две конкурирующие модели, по которым **SIR2** индуцируется (Kaeberlein et al., 2004) снижением количества никотинамида (продукта-ингибитора **SIR2**) и истощением клеточного NADH (конкурентного ингибитора **SIR2**). Имеется и диаметрально противоположная точка зрения, согласно которой **SIR2** и ограничение калорийности в клетках дрожжей действуют разными путями. В группе Кеберлейна было показано, что комбинация сверхэкспрессии **SIR2** и ограничение калорийности пищи

приводят к аддитивному эффекту увеличения продолжительности жизни, что соответствует независимым путям (Kaeberlein et al., 2004). Делеция *SIR2* в комбинации с ограничением калорийности и мутациями в механизме сигналинга глюкозы вызывает значительное (6-кратное) увеличение хронологической продолжительности жизни. Механизм такого долгожительства состоит в том, что клетки, потерявшие деацетилазу *SIR2*, активируют фермент *Adh2*, истощающий внеклеточный этанол, в противном случае вызывающий апоптотическую гибель дрожжевой клетки (Fabrizio et al., 2005a).

Итак, каким образом *SIR2* влияет на продолжительность жизни дрожжей? Один из путей состоит в том, что старение запускается постепенным нарушением сайленсинга и генетической дестабилизацией. Второй вариант предполагает *SIR2*-обусловленный ответ клетки на снижение питательных веществ путем репрессии генов, ускоряющих ее старение (Guarente, Kenyon, 2000).

У нематод поиск посттрансляционных модификаторов *DAF-16* позволил идентифицировать белок *SIR-2.1*, являющийся членом сиртуинового семейства NAD^+ -зависимых деацетилаз. Трансгенная экспрессия *sir-2.1* увеличивает продолжительность жизни *Caenorhabditis elegans* на 50 % (Baumeister et al., 2006). Он принадлежит к классу I семейства *SIR2*. Остальные три *SIR2*-подобных белка нематоды, принадлежащих к классам II и IV, не влияют на продолжительность ее жизни (Kusama et al., 2006). У *C. elegans* *SIR-2.1* влияет на продолжительность жизни, по-видимому, двумя разными путями: один из них является *DAF-16*-зависимым, тогда как другой определяется репрессией генов стресс-ответа в эндоплазматической сети (например, гена прионоподобного белка *abu-11*). Последний вариант не требует функции *DAF-16*, однако регулируется растительным фенолом резвератролом (Viswanathan et al., 2005; Baumeister et al., 2006). В то же время, потеря *daf-16* подавляет продление жизни, вызванное сверхэкспрессией гена *SIR-2.1*. Таким образом, *DAF-16* является главной мишенью *SIR-2.1*. По-видимому, *SIR-2.1* действует выше киназы *AGE-1* или одновременно с каноническим сигнальным *DAF-2/AGE-1/АКТ-1*-каскадом. Экспрессия генов белков с *WD*-доменом, скрамблазы, копина, белка фертильности самцов зависит одновременно от *DAF-16* и *SIR-2.1* (Hamilton et al., 2006). Как и *DAF-16*, *SIR-2.1* приводит к увеличению продолжительности жизни через активацию транскрипционного фактора *CEH-18*. Наконец, у нематод, как и у дрожжей, *SIR-2.1* может регулировать продолжительность жизни и путем модификации глобальной или локальной хроматиновой структуры (Hamilton et al., 2006).

Для SIR-2.1-индуцируемой трансактивации DAF-16 необходимы белки 14-3-3. В результате теплового стресса SIR-2.1 может связываться с DAF-16 14-3-3-зависимым образом. В то же время низкий уровень инсулинового сигналинга не стимулирует взаимодействие SIR-2.1/DAF-16. Таким образом, SIR-2.1 и 14-3-3 регулируют активность DAF-16, минуя инсулиновый путь. Это стресс-зависимый механизм активации DAF-16 и долгожительства, совершенно независимый от инсулинового сигналинга. У нематоды в качестве SIR-2.1-связывающих партнеров идентифицированы два 14-3-3-белка, кодируемых генами *fit-2* и *par-5*. Сверхэкспрессия SIR-2.1 увеличивает транскрипцию DAF-16-зависимого гена супероксиддисмутазы *sod-3*. Делеция *fit-2* подавляет SIR-2.1-зависимую стрессоустойчивость и активацию *sod-3*. РНК-интерференция генов *par-5* или *fit-2* блокирует опосредованное SIR-2.1 продление жизни (Berdichevsky et al., 2006). Кроме того, SIR-2.1 необходим для возникновения независимого от инсулинового сигналинга долгожительства в ответ на ограничение диеты (calory restriction) (Wang, Tissenbaum, 2006).

Анализ на основе транспозонов в качестве маркеров локусов количественных признаков, участвующих у нематод в обеспечении гетерогенности популяции по продолжительности жизни, привел к картированию локуса на хромосоме IV. Примерно в этом районе расположена активная копия гена *sir-2.1* (Ayyadevara et al., 2003). Таким образом, SIR-2.1 может участвовать в естественном внутривидовом варьировании продолжительности жизни.

Пять SIR2-подобных белков дрозофил принадлежат к различным классам семейства SIR2: CG5216 (dSIR2, класс Ia), CG5085 (класс Ib), CG3187 (класс II), CG6284 (класс IVa), CG11305 (класс IVb). Наиболее близкий гомолог SIR2 дрожжей — dSIR2 выполняет у дрозофил функцию NAD⁺-зависимой деацетилазы гистонов и участвует в обеспечении эффекта положения и гетерохроматинового сайленсинга (polycomb-зависимого сайленсинга). Продолжительность жизни нулевых мутантов *dSIR2* снижается. Повсеместное подавление экспрессии *dSIR2* и двух SIR2-подобных генов (CG5085 и CG6284) методом интерференции РНК является летальным, тогда как ее подавление только в нейронах снижает продолжительность жизни (Kusama et al., 2006). Напротив, увеличение активности dSIR2 у дрозофилы продлевает жизнь. В высоких концентрациях он обнаруживается в ядрах нейронов, в ядрах и цитоплазме клеток жирового тела. Сверхэкспрессия гена dSIR2 преимущественно в нервной ткани на стадии личинки увеличивает среднюю продолжительность жизни самцов и самок соответственно на 20 и 52 % (Rogina, Helfand, 2004).

У дрозофил эффект низкокалорийного питания, так же как у нематод и дрожжей, связан с экспрессией в нейронах гена деацетилазы *dSIR2*, а снижение активности *dSIR2* подавляет увеличение продолжительности жизни у мух, живущих на обедненной диете (Bauer et al., 2005). Стоит отметить, что транскрипция *SIR2* у долгоживущих мух с мутацией гена другой деацетилазы — *rpdS* и у нормальных мух на низкокалорийной диете увеличивается (Rogina, Helfand, 2004).

У млекопитающих имеются семь членов семейства *SIR2*, однако наиболее близок этому дрожжевому белку фермент *SIRT1* (Giannakou, Partridge, 2004). Экспрессия *SIRT1* индуцируется у крыс под действием ограничения калорийности диеты, так же как в клетках человека, обработанных сывороткой голодных животных. Инсулин и IGF-1 ослабляют этот ответ. Мыши, питающиеся обедненной диетой (60 % обычного питания), характеризуются высокой экспрессией *SIRT1* во многих тканях, включая мозг, висцеральные скопления жировой ткани, почки и печень (Cohen et al., 2004). *SIRT1* у млекопитающих взаимодействует со многими белками, включая транскрипционные факторы, такие как p53, PPAR γ и NF- κ B, и транскрипционные кофакторы, такие как p300 и CBP (рис. 5) (Berdichevsky et al., 2006).

Повышенная активность *SIRT1* через деацетилирование подавляет p53/FOXO/Bax-зависимый апоптоз в клетках млекопитающих в ответ на оксидативный стресс и радиацию (Giannakou, Partridge, 2004; Fabrizio et al., 2005). Коиммунопреципитация показывает, что *SIRT1* и белок репарации ДНК Ku70 способны взаи-

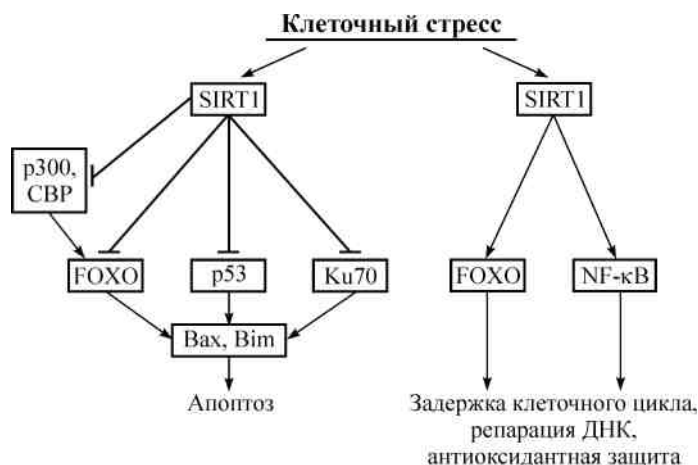


Рис. 5. Роль *SIRT1* в защите клетки млекопитающих от стресса.

модействовать между собой. Сверхэкспрессия гена **SIRT1** снижает уровень ацетилирования **Ku70**, причем именно по тем остаткам лизина, которые важны для связывания **Ku70** с **Bax**. В результате блокируется высвобождение проапоптозного фактора **Bax** из митохондрий, что ингибирует стресс-индуцированную апоптотическую гибель клетки. Действительно, при обработке клеток резвератролом (агонистом **SIRT1**) или в результате сверхэкспрессии **SIRT1** **Bax**-индуцированный апоптоз подавляется (Cohen et al., 2004). **SIRT1** также входит в состав ядерных телец, формируемых белком промиелоцитарной лейкемии (**PML**). Здесь **SIRT1** связывает и деацетилюет **p53**, что подавляет **p53**-зависимую активацию транскрипции. **SIRT1** препятствует **PML**-индуцированному ацетилированию **p53** и избавляет клетки от опосредованного **PML** преждевременного старения.

Таким образом, деацетилаза **SIRT1** является новым репрессором функции **p53**, модулирующим клеточное старение (Langley et al., 2002). Эксперименты на млекопитающих продемонстрировали, что деацетилирование посредством **SIRT1** необходимо для изменения активности транскрипционного фактора **FOXO** (Baumeister et al., 2006). Это приводит как к репрессии, так и к активации транскрипции различных генов-мишеней **FOXO** (Berdichevsky et al., 2006). **SIRT1** локализован в ядре, а в присутствии факторов роста клетки и при отсутствии стресса **FOXO3** находится в цитоплазме. Как уже упоминалось выше (см. разд. 3.2), ассоциация **FOXO3** и 4 с деацетилазой **SIRT1** возрастает в условиях стресса. **SIRT1** деацетилюет **FOXO3** и **FOXO4** NAD^+ -зависимым образом. В клетках, подвергнутых различным стрессам, включая оксидативный, **FOXO3** перемещается в ядро, где он может взаимодействовать с **SIRT1**. **SIRT1**-зависимое деацетилирование **FOXO** подавляет экспрессию генов апоптоза (*bim*, *Fas*-лиганда), однако усиливает экспрессию генов репарации (*GADD45*) и антиоксидантной защиты (*Mn-Sod*). Следовательно, **SIRT1** может увеличивать продолжительность жизни путем изменения опосредуемых **FOXO** эффектов, при этом происходит замена клеточной гибели на клеточное выживание (Giannakou, Partridge, 2004). **SIRT1** подавляет также терминальную дифференцировку делящихся миоцитов, связываясь с **pCAF** — кофактором **myoD**. Таким образом, **SIRT1** содействует выживанию и делению клеток при стрессе или при воздействии сигналов терминальной дифференцировки (Motta et al., 2004).

Как **SIRT1** активируется в ответ на стресс? Сенсор окислительно-восстановительного потенциала клетки млекопитающих — транскрипционный корепрессор **CtBP** при снижении интенсивности гликолиза перестает связываться с **HC1** — ингибитором

транскрипции гена **SIRT1**. По-видимому, CtBP регулируется никотинамидадениндинуклеотидами (NAD⁺ и NADH). Это приводит к снижению репрессии и активации транскрипции гена **SIRT1** и может быть одним из механизмов регуляции **SIRT1** в ответ на ограничение диеты (Zhang et al., 2007).

Мыши с нокаутом **SIRT1** характеризуются фенотипом высокой эмбриональной и постнатальной летальности. Гомозиготы редко выживают, они имеют малые размеры и стерильны. У **SIRT1**-мутантов происходит гиперацетилирование p53 и наблюдается повышенный уровень апоптоза, по крайней мере тимоцитов и сперматогониев (Motta et al., 2004). Умеренная сверхэкспрессия гена **SIRT1** в сердце мыши задерживает возрастзависимое увеличение сердечной гипертрофии, апоптоза и фиброза, сердечной дисфункции и экспрессии маркеров старения. Во взрослом сердце обычных мышей уровень **SIRT1** значительно (в 4—8 раз) возрастает в ответ на повышенное кровяное давление и оксидативный стресс (Alcendor et al., 2007).

Другие представители сиртуинов у млекопитающих, **SIRT2** и **SIRT3**, обладают деацетилазной активностью, но являются цитоплазматическими белками с функциями, отличными от **ySIR2** (Mostoslavsky et al., 2006). **SIRT6** — ядерный белок, связанный с хроматином. Он стимулирует устойчивость к повреждению ДНК и подавляет нестабильность генома в клетках мышей, а также играет роль в эксцизионной репарации оснований. Мыши с дефицитом **SIRT6** имеют малые размеры и в возрасте 2—3 недель проявляют нарушения, включающие лимфопению, потерю подкожного жира, лордокифоз и дефекты метаболизма. Они обычно умирают в возрасте 4 недель. Таким образом, роль **SIRT6** состоит в стимуляции эксцизионной репарации ДНК, а его потеря приводит к нарушениям, подобным наблюдаемым при старение-ассоциированных дегенеративных процессах (Mostoslavsky et al., 2006).

Известен целый ряд малых молекул, изменяющих ферментативную активность сиртуинов. Уже упоминались никотинамид, продукт реакции деацетилирования **SIR2** и NADH, которые служат мощными ингибиторами деацетилазы **SIR2 in vivo**. Однако наибольшее внимание привлекает резвератрол (3,4',5-тригидроксистилбен), который активизирует каталитическую активность **SIR** от дрожжей до млекопитающих (Viswanathan et al., 2005). Этот полифенольный компонент (фитоалексин) из красного вина замедляет старение у эукариотов и является потенциальным миметиком ограничения калорийности пищи. Резвератрол имеет широкий спектр эффектов: проапоптозные, фунгицидные, антиоксидантные. Однако прежде всего он является активатором сиртуинов, что можно рассматривать как механизм его действия в качестве фак-

тора антистарения. Резвератрол служит субстрат-специфическим активатором как **SIR2** у дрожжей, так и **SIRT1** у человека и увеличивает деацетилирование p53 под действием **SIRT1** в 13 раз. Резвератрол умеренно продлевает жизнь дрозофил и нематод в присутствии **SIR2** ортологов (**dSIR2** и **SIR-2.1**). Однако, согласно исследованиям группы Кеберлейна, у дрожжей он не оказывает заметного влияния на активность **SIR2 in vivo**, определяемую по рекомбинации рДНК, по транскрипционному подавлению активности прителомерных генов и по продолжительности жизни (Kaeberlein et al., 2005b).

Каков альтернативный механизм действия резвератрола? Анализ экспрессии генов червей, обработанных этим веществом, показывает транскрипционную индукцию семейства генов, кодирующих прионоподобные глутамин/аспарагин-богатые белки, вовлеченные в стресс-ответ эндоплазматической сети на денатурированные белки. РНК-интерференция **abu-11**, члена этого семейства генов, отменяет продление жизни, вызванное резвератролом, а сверхэкспрессия **abu-11** увеличивает продолжительность жизни трансгенных животных. Таким образом, резвератрол продлевает жизнь через ингибирование **SIR-2.1**-опосредованной репрессии генов стресс-ответа эндоплазматической сети (Viswanathan et al., 2005). Резвератрол вызывает разнообразные биологические эффекты и у позвоночных, включая защиту от ишемии мозга. Он оказывает противоопухолевое и противовоспалительное воздействие *in vitro* и *in vivo*, ингибирует митохондриальные АТФазы у грызунов. У короткоживущей сезонной рыбки **Nothobranchius furzeri** резвератрол, добавляемый в пищу начиная с ранней зрелости, вызывает дозозависимое увеличение медианной и максимальной продолжительности жизни (до 30 %) как у самцов, так и у самок. Наконец, резвератрол задерживает у них угасание локомоторной активности и познавательной деятельности и снижает выраженность нейрофибриллярной дегенерации мозга. Однако анализ траектории смертности этих животных может свидетельствовать о горметическом действии резвератрола: в то время как смертность в раннем возрасте после обработки увеличивается, затем она снижается (Valenzano et al., 2006).

Таким образом, сиртуины, эволюционно консервативные белковые деацетилазы, в ответ на стрессовые воздействия подавляют проапоптозную функцию транскрипционных факторов p53 и FOXO, а также дерепрессируют гены стресс-ответа эндоплазматической сети, способствуя выживаемости клетки и увеличению продолжительности жизни.

3.4. JNK-сигналинг

Из предыдущих разделов следует, что продолжительность жизни непосредственно связана со стресс-ответом. Семейство **c-Jun N-концевых протеинкиназ (JNK)** из подгруппы суперсемейства **МАРК** — часть каскада трансдукции сигнала, активируемого цитокинами (**TNF** и **IL-1**) и внешнесредовыми стрессами. **JNK** активируется в ответ на различные внешнесредовые повреждающие воздействия, включая УФ-облучение, температурный и оксидативный стрессы. **JNK** вовлечена в такие биологические процессы, как развитие, апоптоз, выживаемость клетки и рак (Oh et al., 2005; Wang et al., 2005; Baumeister et al., 2006).

У нематод **JNK**-путь, как и **SIR-2.1**-механизм, регулирует продолжительность жизни независимо от инсулинового сигналинга (Oh et al., 2005). **JNK-1** активирует транскрипционный фактор **DAF-16** при воздействии стрессов (рис. 6) (Baumeister et al., 2006). Он напрямую фосфорилирует **DAF-16**, но в отличие от инсулинового сигналинга **JNK-1** стимулирует перемещение **DAF-16** в ядро (Oh et al., 2005). Активация **JNK**-пути при трансгенной экспрессии **jnk-1** увеличивает толерантность к оксидативному и тепловому стрессам. Кроме того, продолжительность жизни таких животных увеличивается на **40 %**. Этот эффект полностью зависит от функционирования гена **daf-16** (Baumeister et al., 2006).

У дрозофилы каскад митоген-активируемых протеинкиназ состоит из **JNK**-киназ (**JNKK**) **Hemipterous (Hep)** и **JNK Basket (Bsk)** (рис. 6). **Bsk** в свою очередь фосфорилирует транскрипционные факторы семейства **AP-1 (Djun и Dfos)** и **dFOXO**, индуцируя изменение экспрессии генов. Интенсивность и длительность **JNK**-сиг-



Рис. 6. JNK-сигналинг у нематод, дрозофил и млекопитающих.

налинга ослабляется петлей негативной обратной связи, опосредованной одним из его генов-мишеней *puckered (puc)*, который кодирует JNK-специфичную MAPK-фосфатазу. У гетерозигот по мутации *puc* увеличивается базальный уровень JNK-сигналинга, повышаются стрессоустойчивость и продолжительность жизни. Таким образом, активный JNK придает мухам устойчивость к оксидативному стрессу и продлевает жизнь. Увеличение продолжительности жизни дрозофилы под действием JNK требует присутствия dFOXO. JNK является антагонистом инсулинового сигналинга, вызывая перемещение FOXO в ядро и индукцию его мишеней, включая гены остановки роста и защиты от стрессов. Кроме того, JNK и FOXO ограничивают системную активность инсулинового сигналинга, подавляя экспрессию инсулиноподобного лиганда в нейроэндокринных клетках (Wang et al., 2005; Luo et al., 2007).

Из вышесказанного следует, что dFOXO служит точкой объединения инсулинового и JNK-сигналинга. Он интегрирует информацию о внешнесредовых стрессах и запускает соответствующие биологические ответы. В благоприятных условиях среды организм мухи продолжает рост: активен инсулиновый сигналинг, JNK выключен, FOXO подавлен. В неблагоприятных условиях инсулиновый сигналинг либо выключается, либо активируется JNK, приводя к перемещению FOXO в ядро. Индукция таких генов, как *thor* (кодирует eIF4E-связывающий белок), подавляет рост клетки, ограничивая анаболические затраты при неблагоприятных условиях. Другие гены-мишени, например, ген малого белка теплового шока *1(2)efl*, играют непосредственную роль в устранении повреждения, нанесенного внешнесредовыми воздействиями, и предотвращают накопление токсичных белковых агрегатов (Matsumoto, Accili, 2005; Wang et al., 2005). Кроме того, JNK-сигналинг индуцирует FOXO-зависимую экспрессию проапоптозного белка *hid* (head involution defective). Отсюда следует, что регулируемая индукция апоптоза может способствовать увеличению продолжительности жизни (Luo et al., 2007). Подавление экспрессии *dilp2* под действием JNK и FOXO в инсулинпродуцирующих клетках IPCs контролирует рост, метаболизм и стресс-ответ, системно подавляя инсулиновый сигналинг во всех чувствительных тканях, что в конечном итоге активирует FOXO в тканях-мишенях DILP2. Кроме того, стресс- и JNK-опосредованная активация FOXO в периферических тканях может осуществлять обратную связь, сигнализируя в IPC для инициирования системного ответа. Так индукция FOXO, например в жировом теле, переключает сигнал на IPC, вызывая снижение выработки в этих клетках DILP2, что вновь приводит к активации dFOXO в периферических тканях (Matsumoto, Accili, 2005; Wang et al., 2005).

Вероятно, JNK-зависимое модулирование активности инсулинового сигналинга является эволюционно консервативным. Ингибиторное взаимодействие JNK и инсулинового пути у млекопитающих состоит в JNK-опосредованном фосфорилировании и подавлении активности субстрата 1 инсулинового рецептора (IRS-1, гомолог chico дрозофил) или протеинкиназы В (АКТ). Вместе с тем в мышечных клетках происходит прямое фосфорилирование (активирование) FOXO4 в ответ на оксидативный стресс (Oh et al., 2005; Wang et al., 2005). У млекопитающих панкреатические β-клетки снижают выработку инсулина в ответ на опосредованную оксидативным стрессом активацию JNK. Напротив, дефосфорилирование JNK под действием MAPK-фосфатазы 1 индуцирует экспрессию инсулина в этих клетках. Снижение уровня циркулирующего инсулина путем JNK-зависимой активации FOXO может быть общим механизмом, осуществляющим баланс между ростом, метаболизмом, защитой от стресса и репарацией повреждений (Wang et al., 2005).

Как активируется JNK/FOXO-сигналинг в ответ на стресс? Активные формы кислорода, возникающие в результате стресса, индуцируют малую ГТФазу Ral, которая в свою очередь активирует JNK (Lam et al., 2006). Как оказалось, у млекопитающих стресс также приводит к стимуляции активности JNK через выключение инактивирующей ее фосфатазы (Rattan et al., 2004). Далее, при фосфорилировании цитоплазматического FOXO стресс-активируемой JNK, связанный с микротрубочками белок меняет направление ядерно-цитоплазматического перемещения FOXO в ответ на активацию PI3K/PKB (инсулиновый сигналинг), что приводит к накоплению этого транскрипционного фактора в ядре и усиливает транскрипционную активность. Кроме того, JNK фосфорилирует белки 14-3-3, приводя к высвобождению связанного FOXO. Однако способность JNK возвращать FOXO в ядро зависит от одновременной репрессии активности PKB (т. е. от подавления инсулинового сигналинга) (Lam et al., 2006).

Таким образом, JNK-зависимая регуляция FOXO обнаружена в клетках млекопитающих, дрозофил и нематод (рис. 6). Причем данная активация индуцирует апоптоз, повышает устойчивость к оксидативному стрессу и увеличивает продолжительность жизни.

Помимо индукции FOXO роль JNK в ответе на тепловой стресс может быть также обусловлена его способностью фосфорилировать и стабилизировать транскрипционный фактор теплового шока HSF-1 (Rattan et al., 2004).

Меняется ли активность JNK при старении? Поскольку старение метаболически активных тканей подобно хроническому стрессу, в грудных мышцах стареющих мух имеет место активация

JNK-механизма (Girardot et al., 2006). В то же время в клетках млекопитающих способность к активации JNK при старении снижается (Rattan et al., 2004).

Из вышесказанного следует, что JNK-каскад фосфорилирования выполняет эволюционно консервативную (у нематод, дрозофил, млекопитающих) функцию повышения различных форм стрессоустойчивости через активацию FOXO и HSF-1. Как результат, при сверхактивации JNK наблюдается увеличение продолжительности жизни.

3.5. Липофильные гормоны

Гормоны координируют разнообразные онтогенетические и физиологические процессы и регулируют перераспределение метаболических ресурсов между различными органами и стадиями жизненного цикла. Множественность их эффектов огромна и получила название «гормональная плейотропия» (Tu et al., 2006).

Участие эндокринных желез и гормонов в старении впервые предположил основатель эндокринологии Шарль-Эдуар Броун-Секар в 1889 г. А в 1972 г. Миер Пол Пенер доказал, что подваление синтеза сесквитерпеноидного ювенильного гормона саранчи увеличивает продолжительность жизни. Как будет показано далее, теперь известно, что снижение выработки или восприимчивости к ювенильному гормону или 20-гидроксиэкдизону замедляет старение у дрозофил. Эти эффекты имеют параллели у нематод и позвоночных животных (Tu et al., 2006).

В предыдущих разделах подробно рассмотрена роль инсулина/IGF-1 в определении продолжительности жизни: снижение сигналинга инсулиноподобных пептидов увеличивает ее у нематод, дрозофил и грызунов. По-видимому, у нематод и дрозофил старение регулируется также вторичными гормонами, прежде всего липофильной природы, контролируемые инсулиноподобным сигналингом (рис. 7). К липофильным гормонам относят дафахроновую и ретиноевую кислоты, ювенильный и тиреоидные гормоны и стероиды, которые являются ключевыми регуляторами онтогенеза и физиологии взрослого животного. У млекопитающих порядок, в котором действуют гормоны (инсулин и липофильные гормоны), неизвестен, поскольку инсулин, инсулиноподобный фактор-1, гормон роста, стероиды и тиреоидные гормоны взаимозависимы. Так или иначе, но у всех исследованных на этот предмет видов животных эндокринные манипуляции замедляют старение

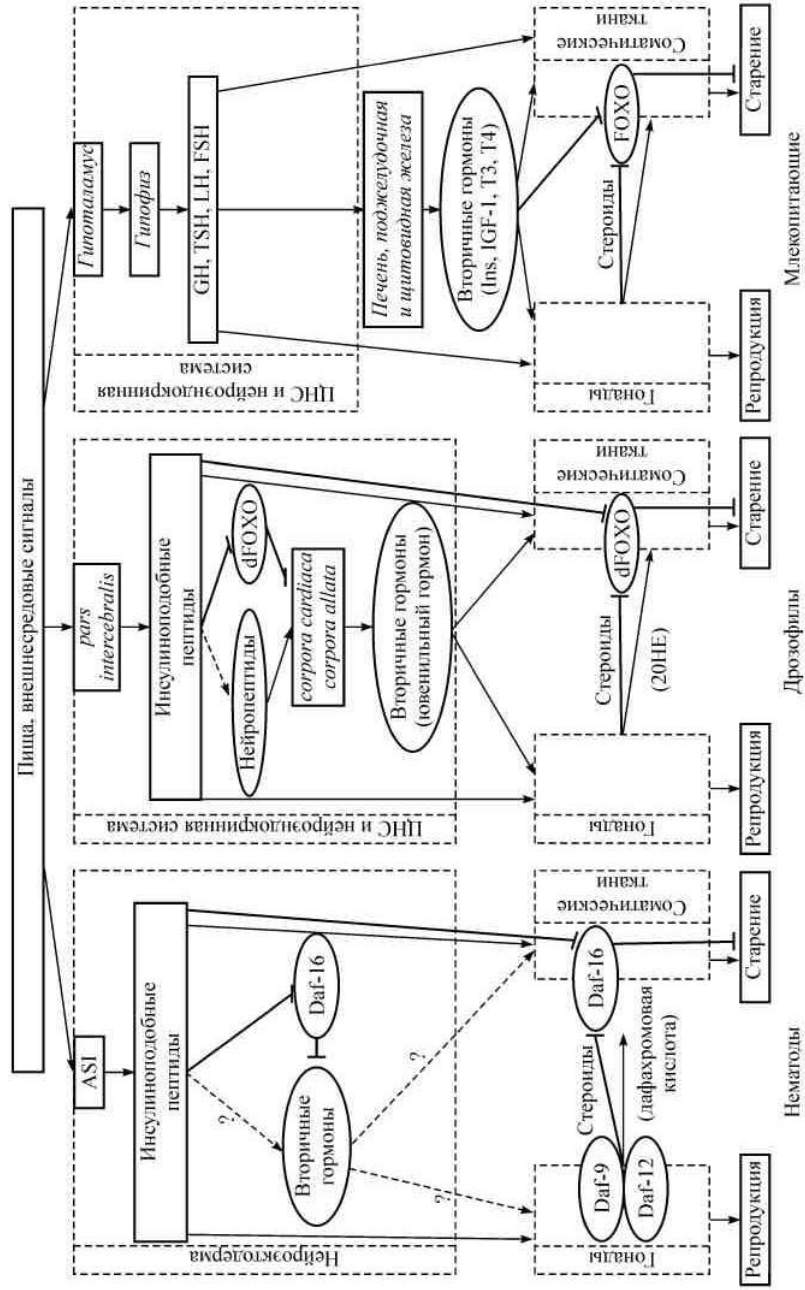


Рис. 7. Нейроэндокринная регуляция репродукции и старения у нематод, дрозофил и мышей.

и повышают стрессоустойчивость (Sullivan, Thummel, 2003; Tatar et al., 2003).

Герминативные клетки нематод продуцируют гормоны, поддерживающие репродуктивное состояние, однако непосредственно или опосредованно ускоряющие старение (Tatar et al., 2003). При микрохирургическом удалении предшественников зародышевой линии клеток либо в случае мутаций *mes-1* (ген кодирует тирозинкиназный рецептор) и *glp-1* (*notch*-рецептор), приводящих к потере половых клеток, наблюдается увеличение продолжительности жизни и активности DAF-16. Животные без половых клеток, как и все долгоживущие мутанты, устойчивы к оксидативному и тепловому стрессам. В то же время соматическая часть гонад снижает активность инсулинового рецептора DAF-2, оказывая действие, противоположное герминативным клеткам (Baumeister et al., 2006).

Чем обусловлен описанный феномен? Известно, что у нематод инсулиновый, TGF- β и серотониновый пути, передающие сигналы из нервной системы к периферическим тканям, объединяются на орфановом ядерном гормональном рецепторе DAF-12, опосредуя либо репродуктивное развитие, либо его задержку в *dauer*-диапаузе. Среди белков, родственных DAF-12, можно выделить рецепторы витамина D, прегнана-X, печеночного-X и андростана, которые связывают стероидные гормоны, являющиеся производными холестерина. При отсутствии гормона белок-корегулятор DIN-1 связывается с DAF-12, стимулируя *dauer*-диапаузу и увеличивая продолжительность жизни. DIN-1 кодирует гомолог человеческого SHARP, корепрессора ядерных рецепторов и транскрипционных факторов. В присутствии стероидного гормона, напротив, транскрипционный комплекс DAF-12 определяет репродуктивное развитие (и короткую жизнь) (Baumeister et al., 2006). Пищевые сигналы, действующие через инсулин/IGF-1 и TGF- β , стимулируют продукцию лиганда DAF-12 путем активации фермента DAF-9. Напротив, при неблагоприятных условиях окружающей среды, функция DAF-9 подавляется и индуцируется личинка *dauer* или долгожительство.

Ген *daf-9* экспрессируется далеко не во всех тканях, а лишь в нервной (в двух нейронах ASI), гиподерме и сперматеке, что согласуется с его эндокринной функцией. Некоторые мутанты по гену *daf-9* живут на 25 % дольше дикого типа. В то же время *daf-9* дает дополнительное увеличение продолжительности жизни у мутантов по гену *daf-2* (гену рецептора инсулина) и действует строго через *daf-12*, т. е. параллельно инсулин/IGF-1-механизму, а его влияние не ограничивается ответом на инсулиновый сигнал (Tatar, et al., 2003). Недавно были описаны лиганды

DAF-12, производные холестерина, — 3-кето-4-холестериновая кислота и 3-кето-7, (5 α)-холестериновая кислота (дафахроновые кислоты). Ген *daf-9* нематоды, по-видимому, участвует в модификации холестерина при биосинтезе стероидных гормонов. Он кодирует цитохром P450, связанный с гидроксилазами жирных кислот и стероидов. Другая мутация, *daf-36*, также блокирует увеличение продолжительности жизни, вызванное удалением половых клеток. Ген *daf-36* кодирует фермент оксигеназу, участвующую в синтезе лиганда DAF-12 (Baumeister et al., 2006; Beckstead, Thummel, 2006; Rottiers et al., 2006). Липофильный стероидный гормон, как и инсулиноподобные пептиды, ускоряет старение в соматических тканях через подавление транскрипционного фактора DAF-16, активирующего транскрипцию ряда антистрессовых регуляторов — белков теплового шока, супероксиддисмутазы и др. Таким образом, удаление половых клеток микрохирургическим путем опосредованно, через подавление сигналинга липофильного гормона, приводит к накоплению DAF-16 в ядрах клеток кишечника, что сопровождается 60%-ным повышением длительности жизни (Baumeister et al., 2006). Подробнее о механизмах влияния половых клеток на процессы старения см. разд. 5.1.

Использование РНК-интерференции позволило выявить гены продолжительности жизни нематод, участвующие в липофильном сигналинге. Ген *maoc-1* кодирует белок с MaoC-подобным дегидратазным доменом, обнаруживаемым в таких ферментах, как, например, эстрадиол-17- α -дегидрогеназы типа IV и α -субъединицы синтазы жирных кислот. Следовательно *maoc-1* может участвовать в синтезе липофильного гормона, влияющего на продолжительность жизни *daf-16*-зависимым образом. Однако он не влияет на продолжительность жизни через герминативный сигналинг и лиганд DAF-12. Другой ген, *ttr-1*, кодирует родственные трансти-ретину белки, которые у позвоночных вовлечены в транспорт ти-реоидных гормонов и ретинола (витамина А) и могут регулировать поглощение тканями свободно циркулирующих гормонов. Ген *ttr-1* может кодировать белок-переносчик липофильного гормона, влияющего на продолжительность жизни. Действительно, он функционирует выше *daf-16* или параллельно с ним и участвует в герминативном пути регуляции продолжительности жизни, генетически взаимодействуя с рецептором стероидного гормона DAF-12. Возможно, что TTR-1 связывает лиганд, активирующий DAF-12, и ограничивает его доступность (Hansen et al., 2005). Анализ генов, сверхактивных как в личинке *dauer*, так и у мутантов по *daf-2*, также выявил индукцию четырех транстиретин-подобных генов (McElwee et al., 2004).

Добавление стероида прегненолона в питательную среду к нематодам, напротив, приводит к увеличению продолжительности их жизни. Более того, уровень прегненолона увеличивается при удалении стволовых герминативных клеток *daf-9*-зависимым образом. Прегненолон также увеличивает продолжительность жизни у мутантов *daf-9* с удаленными половыми клетками, но не влияет на нее в присутствии мутации *daf-12*. Следовательно удаление половых клеток может приводить к долгожительству через стимуляцию синтеза прегненолона (Broué et al., 2007).

Мутация в гене, кодирующем инсулиноподобный рецептор (*InR*) и его субстрат *Chico*, как известно, увеличивает продолжительность жизни дрозофил и подавляет их репродукцию. Однако продление жизни у этих мутантов, вероятно, вторично по отношению к недостатку ювенильного гормона, поскольку синтез последнего незначителен у мутантов *InR*, а обработка аналогом ювенильного гормона инициирует вителлогенез и восстанавливает нормальную продолжительность жизни (Tatar et al., 2003). Таким образом, ювенильный гормон может быть вторичным сигналом инсулин/IGF-механизма. *Pars intercebralis* — главные инсулинпродуцирующие клетки взрослой дрозофилы; инсулиноподобный белок высвобождается в протоцеребрум, около выделяющей нейрогормоны железы *corpora cardiaca*, а затем — в гемолимфу. Поскольку синтез ювенильного гормона насекомых контролируется нейропептидами, инсулин/IGF может воздействовать на ткань, их вырабатывающую, или инсулиноподобный пептид может непосредственно участвовать в стимулировании синтеза ювенильного гормона в железе *corpora allata* (рис. 7). Через любой из этих путей ингибирование инсулинового лиганда или рецептора может снижать синтез ювенильного гормона (Tatar et al., 2003).

Рабочие пчелы живут меньше, чем матки. Но даже среди рабочих особей есть дифференциация по долгожительству, по-видимому, связанная с количеством ювенильного гормона. У рабочих, присматривающих за выводком в улье, уровень ювенильного гормона низкий, тогда как у более короткоживущих пчел-сборщиц — высокий. Уровень ювенильного гормона у виргинных маток возрастает, но затем (после оплодотворения) титр его падает. Каким образом ювенильный гормон может ускорять процесс старения пчел? У перепончатокрылых ювенильный гормон влияет на экспрессию генов *Vg* (ген вителлогенина) и *ILP-1* (ген инсулиноподобного пептида). Под действием ювенильного гормона экспрессия вителлогенина подавляется, тогда как инсулиноподобного пептида — стимулируется. Таким образом, возрастзависимое снижение уровня ювенильного гормона у долгоживущей матки может

вести к высокой продукции антиоксидантного белка вителлогенина и к снижению инсулинового сигналинга, что способствует ее экстраординарному долгожительству. Напротив, высокий уровень ювенильного гормона у рабочих пчел-сборщиц может быть причиной укорочения их жизни (Corona et al., 2007).

Подводя итог вышесказанному, отметим, что существует две конкурирующие точки зрения на взаимоотношения инсулинового пути и ювенильного гормона: согласно первой, инсулиновый сигналинг ускоряет старение через стимуляцию синтеза ювенильного гормона (рис. 7); согласно второй, ювенильный гормон уменьшает продолжительность жизни, стимулируя выработку инсулиноподобного пептида. В настоящее время отдать предпочтение какой-либо одной из этих гипотез не представляется возможным. Нельзя исключить и справедливость обоих предположений одновременно. Наконец, модель еще более усложняется, если принять во внимание взаимодействие инсулина и ювенильного гормона с третьим липофильным гормоном — экдизоном (рис. 7).

Ювенильный гормон регулирует действие экдизона. Баланс между этими двумя гормонами влияет на онтогенез: экдистероиды запускают большинство онтогенетических переходов у дрозофилы (их титр возрастает перед каждой линькой), включая личиночные стадии и метаморфоз. Экдистероиды также регулируют оогенез, вителлогенез и репродукцию. Стероидный гормон экдизон (подобно ювенильному гормону) хорошо известен благодаря своему действию на развитие и продукцию желтка у взрослых насекомых (Kozlova, Thummel, 2000). В то же время экдизон — второй липофильный регулятор старения насекомых.

Стероиды синтезируются благодаря ферменту адренородоксинредуктазе (у дрозофилы это продукт гена *dare*). Этот фермент переносит электроны с NADPH на белок адренородоксин, который в свою очередь отдает их митохондриальной стероидогенной цитохром

P450 гидроксилазе. Экспрессия белка *Dare* сосредоточена в кольцевой железе (*corpus allatum*) личинки. Мутация гена *dare* нарушает процесс линьки, эффекты снимаются только после добавления 20-гидроксиэкдизона. Слабые мутантные аллели *dare* приводят к нарушению поведенческих ответов на обонятельные стимулы и к дегенерации нервной системы имаго (Kozlova, Thummel, 2000). У взрослых мух главным стероидогенным органом является яичник самок (фолликулярные клетки соматического происхождения и питающие клетки) и семенники самцов. В них же наблюдается повышенная экспрессия *dare* (Kozlova, Thummel, 2000; Tu et al., 2006).

Железы синтезируют неактивный предшественник экдизона, активируемый (т. е. конвертируемый в 20-гидроксиэкдизон) уже

в периферических тканях. Поступая в клетку, экдизон связывается со своим ядерным рецептором (EcR). Рецептор экдизона формирует гетеродимерный комплекс с рецептором **Ultraspiracle (USP)**. USP может использовать в качестве лиганда и ювенильный гормон. Такие продукты генов долгожительства, как молекулярные шапероны **Hsp70** и **Hsp90**, а также репрессорный комплекс **Sin3A/Rpd3**, взаимодействуют с EcR/USP. Гетеродимер EcR/USP выступает в роли транскрипционного активатора одних генов и репрессора — других. Не связанный с лигандом гетеродимер EcR/USP выступает в роли транскрипционного репрессора (подобного не связанному с лигандом рецептору ретиноевой кислоты и рецептору тиреоидных гормонов у млекопитающих). Этот эффект рецептора экдизона опосредован корепрессорами **Alien** и **SMRTER**. Последние в свою очередь взаимодействуют с репрессором **Sin3A**, формирующим комплекс с деацетилазой гистонов **Rpd3/HDAC**. USP, подобно его гомологу у позвоночных — X-ретиноидному рецептору, может участвовать в регуляторных процессах самостоятельно, независимо от EcR. Так, он способен гетеродимеризоваться с ядерным рецептором, индуцируемым фактором роста нервов **B (NGFI-B)**. Молекулярные механизмы действия экдистероидов наиболее изучены в начале метаморфоза, когда 20-гидроксиэкдизон, связываясь со своим рецептором, напрямую индуцирует небольшое количество «ранних» генов, таких как **Broad-complex (BR-C)**, **E74** и **E75**. Эти гены «раннего» ответа кодируют транскрипционные факторы, координирующие индукцию большого количества «поздних» генов, ведущих к стадия- и тканеспецифическим биологическим ответам. Рецепторы экдизона играют важную роль в оогенезе и поэтому присутствуют и в герминативных, и в соматических клетках гонад, индуцируя в них ранние гены в результате как аутокринного, так и паракринного действия экдизона (Kozlova, Thummel, 2000; Tatar et al., 2003).

У насекомых качество питания влияет на развитие и репродукцию. Надлежащее питание дает организму энергию и строительный материал для развития и роста, репродукции и поддержания соматических функций. У некоторых насекомых, например у москитов и высших двукрылых, недостаточное питание подавляет развитие яиц через ингибирование *corpus allatum* или непосредственно функции яичников. На примере домашней мухи *Musca domestica* показано, что диета, богатая протеином, является необходимой для инициации синтеза ювенильного гормона и 20-гидроксиэкдизона. У *Drosophila melanogaster* стимулирующей гормональный синтез пищей являются дрожжи. Их потребление вызывает выработку инсулиноподобных пептидов продуцируемыми инсулин клетками мозга, а эти пептиды необходимы

для синтеза вторичных гормонов (ювенильного и экдистероидов). Действительно, потребление дрожжей именно взрослыми мухами (не личинками) стимулирует синтез ювенильного гормона. Взрослые мухи, питающиеся только сахаром и водой, вырабатывают меньше экдистероидов, а потребление дрожжей самками, перенесшими голодание в течение суток, приводит к усилению выработки экдистероидов их яичниками (Tu et al., 2006). У москитов инсулин действует непосредственно на яичники, где он регулирует синтез экдизона. В соответствии с этим механизмом, обилие пищи (крови) стимулирует москитов к размножению. Инсулин также регулирует пролиферацию стволовых герминативных клеток в яичниках дрозофилы. Поскольку яичники дефицитных по ювенильному гормону *InR*-мутантов вырабатывают мало экдистероидов, 20-гидроксиэкдизон может быть производимым гонадами сигналом, посредством которого инсулин и ювенильный гормон влияют на старение (Tatar et al., 2003).

Роль 20-гидроксиэкдизона в старении ясна не до конца. Возможно, что он служит гормональным сигналом старения или регулятором баланса между репродукцией и продолжительностью жизни. Так или иначе, но гетерозиготы дрозофил по гену *Ecr* живут дольше и более стрессоустойчивы, хотя снижения репродукции или физической активности при этом не происходит. Данный эффект наблюдали и у самок, и у самцов. Такой же фенотип имеют мутанты по биосинтезу экдизона (*DTS-3*). Снижение продолжительности жизни до уровня дикого типа (восстановление нормы) у них достигается добавлением в питательную среду 20-гидроксиэкдизона (Simon et al., 2003). Эти результаты согласуются с пониженным уровнем экдистероидов у самок-долгожителей, измеренным на стадии вылупления из куколки, по сравнению с нормальными самками в экспериментах по селекции долгоживущих линий дрозофилы (Tu et al., 2006). Несмотря на то что для некоторых процессов ювенильный гормон и 20-гидроксиэкдизон имеют антагонистические эффекты, очевидно, что оба гормона оказывают позитивное действие на репродукцию насекомых и негативные — на продолжительность их жизни (Tu et al., 2006). Следовательно, повышение стрессоустойчивости вместе с понижением метаболизма и репродукции может быть скоординированным физиологическим состоянием, связанным с замедлением старения (Tatar et al., 2003).

Таким образом, очевидно, что репродуктивный сигналинг, опосредованный липофильными (прежде всего стероидными) гормонами, координирует программу репродукции с интенсивностью старения у нематод и дрозофил (вероятно, и у млекопитающих). Если что-либо (например, недостаток пищи, высокие или низкие

температуры окружающей среды) задержало созревание половых клеток, то животные будут стареть медленнее. В результате животное может оставаться молодым до рождения потомства (Guarente, Kenyon, 2000).

У млекопитающих гормоны коры надпочечников стероидной природы также играют важную роль в метаболизме и старении. Глюкокортикоиды регулируют липидный, белковый и углеводный метаболизм. Минералокортикоиды контролируют водный и электролитный балансы. Дегидроэпиандростерон представляет собой половой гормон, синтез которого снижается при старении. Глюкокортикоиды, так же как другие стероидные гормоны (семенников и яичников), регулируются положительными и отрицательными обратными связями между гормонами-мишенями и их центральными контролирующими органами — гипофизом и гипоталамусом. При старении и в ответ на длительный стресс не только нарушаются эти механизмы обратной связи, но и глюкокортикоиды сами по себе могут оказаться токсичными для нейронов (Тодоров, Тодоров, 2003; Weinert, Timiras, 2003).

Рецептор другого липофильного гормона, тироксина, относится к тому же типу ядерных рецепторов, что и DAF-12 нематоды или EcR дрозофилы. Снижение синтеза гормонов щитовидной железы наравне с подавлением синтеза IGF-1 и инсулина типично для гипофизарных мутантов (отличающихся замедленным старением). Падение уровня тиреоидных гормонов характеризуется гипотермией и задержкой созревания. Вызванный у новорожденных крыс гипотиреоз увеличивает продолжительность жизни. Все это сопровождается снижением утечки свободных радикалов из митохондрий сердца и окислительных повреждений ДНК (Tatar et al., 2003).

У человека рецептор прегнана X (PXR) взаимодействует с транскрипционным фактором FOXO1, контролирующим стрессоустойчивость и долгожительство. FOXO1 является коактиватором PXR (Russell, Kahn, 2007). Другие стероиды млекопитающих, эстрогены и андрогены, подавляют FOXO-зависимую транскрипцию, угнетая стрессоустойчивость (Li et al., 2003; Mazumdar, Kumar, 2003; Lengyel et al., 2007). Подробнее о молекулярных механизмах, обуславливающих взаимодействие половой системы и долгожительства, см. разд. 5.1.

Таким образом, липофильные гормоны (дафахроновая кислота нематоды, ювенильный гормон и экдизон дрозофилы, тиреоидные и стероидные гормоны млекопитающих) служат сигналами, способствующими росту и репродукции, но подавляющими стрессоустойчивость клетки и организма в целом.

3.6. Система детоксификации, протеолиза и автофагии

Основная задача детоксификации — метаболизация ксенобиотиков, приводящая к снижению их активности. В общей сложности в данном процессе участвует около 30 различных генов. Различают две фазы детоксификации: фаза I — модификация, создающая или высвобождающая функциональные группы; фаза II — конъюгация, т. е. присоединение к функциональным группам других групп или молекул. К генам фазы I относятся локализованные в мембране эндоплазматической сети (ЭПС) цитохромы P450, находящиеся в лизосомах и митохондриях N-сульфотрансферазы, ксантиноксидазы, аминоксидазы, эстеразы и гликозилазы. Среди них ключевую роль в осуществлении фазы I играют цитохромы P450. Они относятся к так называемой монооксигеназной системе, основная функция которой — образование в молекуле гидрофильных функциональных групп, делающих ксенобиотик более растворимым, способным к экскреции. К генам фазы II относят гены, кодирующие следующие ферменты: 1) глутатион-трансферазу, активность которой сосредоточена в гиалоплазме и мембранах ЭПС, осуществляющую конъюгацию ксенобиотика с восстановленным глутатионом; 2) уридиндифосфат-глюкуронил-трансферазу, находящуюся в ЭПС и присоединяющую остаток глюкуроновой кислоты; 3) гиалоплазматические сульфотрансферазы, добавляющие к ксенобиотику сульфат (Кулинский, 1999; McElwee et al., 2004). Уменьшение с возрастом количества вырабатываемой энергии отражается на детоксификации поврежденных макромолекул и структур. При старении печени снижается экспрессия генов метаболизма эндобиотиков, что приводит к возраст-зависимому снижению ее функции: это гены ферментов детоксификации фазы I (гены амин-N-сульфотрансферазы, изозимов цитохрома P450) и фазы II (гены глутатион-S-трансферазы η 1) (Cao et al., 2001). В толстом кишечнике при старении экспрессия гена цитохрома P450 4F1, напротив, усиливается (Englander, 2005). В стареющей мышце компенсаторно увеличивается экспрессия гена монооксигеназы *CYP26B1*, участвующей в детоксификации (Zahn et al., 2006).

У долгоживущих генетических моделей происходит активация процессов детоксификации. С использованием анализа олигонуклеотидных чипов у нематод были идентифицированы классы генов, чья экспрессия изменяется сходным образом у личинки *dauer* и у долгоживущих мутантов *daf-2*. Сверхэкспрессии подверглись гены цитохрома P450, короткой цепи дегидрогеназы/ре-

дуктазы, УДФ-глюкуронозилтрансферазы, глутатион-S-трансферазы. Эти гены играют важную роль и в регуляции метаболизма, и в экскреции токсичных эндобиотиков и ксенобиотиков. Гем-содержащие тиоловые белки P450 метаболизируют эндобиотические липофильные субстраты, такие как стероиды, жирные кислоты, простагландины и липофильные ксенобиотики. Функция короткоцепочечных дегидрогеназ/редуктаз заключается в детоксификации ксенобиотиков — в восстановлении карбонильных групп альдегидов и кетонов за счет энергии NADH. УДФ-глюкуронозилтрансферазы, действующие в гладкой ЭПС, подвергают глюкуронидированию (у насекомых — гликозилированию) малые липофильные молекулы, делая их водорастворимыми, что обеспечивает их экскрецию. Субстратами этих ферментов могут быть стероиды и жирные кислоты, ксенобиотики и нежелательные эндобиотики. У имаго *daf-2* наблюдается сверхактивация глутатион-S-трансфераз, функционирующих в цитозоле и катализирующих добавление трипептида глутатиона к эндогенным и ксенобиотичным электрофильным субстратам, которые после этого становятся более растворимыми. Кроме того, этот фермент участвует в детоксификации благодаря своей пероксидазной активности или способности к пассивному связыванию с токсином (McElwee et al., 2004).

Помимо собственно обезвреживания ксенобиотиков рассмотрим роль в старении протеосомальной системы и автофагии. В стареющей клетке имеет место оксидативный стресс (см. разд. 4.1.2). В результате количество оксидативно поврежденных макромолекул увеличивается с возрастом практически у всех исследованных видов и вносит свой вклад в старение (Honda, Honda, 1999; Tavernarakis, Driscoll, 2002; Bayne et al., 2005).

Среди модификаций белков, накапливающихся при старении, наиболее изучено карбонилирование, происходящее при окислении боковых цепей аминокислот и затрагивающее до 30 % белка (Tavernarakis, Driscoll, 2002; Martin, Grotewiel, 2006). Глиоксаль и метилглиоксаль, побочные продукты метаболизма, обуславливают еще один вид повреждений — гликозилирование белков, также играющее важную роль в старении. Белки могут претерпевать и другие модификации: рацемизацию, изомеризацию и дезаминирование, оказывающие умеренное разрушительное воздействие на функцию белков (Tavernarakis, Driscoll, 2002).

Липиды — ключевые компоненты мембран — подвергаются перекисному окислению, приводящему к потере функциональности или к образованию токсичных альдегидов, таких как малоновый диальдегид и гидроксинonenал (Martin, Grotewiel, 2006).

В стареющих клетках животных (от нематод до человека) накапливаются неперевариваемые продукты оксидативной деградации клеточных компонентов, так называемый «липофусцин» (Garrigan et al., 2002). Липофусцин быстрее накапливается у мутантов с ускоренным старением, например у короткоживущих нематод с дефектом гена *aak-2*, участвующего в сенсировании энергетического состояния клетки (Apfeld et al., 2004). Мутация в гене *mev-1*, кодирующем субъединицу митохондриальной сукцинатдегидрогеназы, также ускоряет накопление гранул липофусцина и старение в целом (Guarente, Kenyon, 2000).

Почему модифицированные компоненты клетки накапливаются с возрастом? Причина не только в выработке свободных радикалов. Для выживания важна элиминация повреждений. Например, гомеостаз белков поддерживается следующими процессами: 1) репарацией последовательностей аминокислот метионин-сульфоксидредуктазами; 2) восстановлением конформации белков шаперонами; 3) удаление поврежденных белков; 4) изоляцией таких белков в твердофазные агрегаты (Soti, Csermely, 2007). Аналогично действуют системы метаболизации ксенобиотиков. В то же время рассматриваемые системы имеют ограниченные возможности по детоксификации, которые к тому же снижаются с возрастом и ингибируются неправильно уложенными или агрегированными белками, липофусцином, малоновым диальдегидом (Tavernarakis, Driscoll, 2002). Кроме того, детоксификация — энергозависимый процесс, а выработка энергии с возрастом снижается, что также негативно сказывается на этом процессе (McElwee et al., 2004). Таким образом, наравне с увеличением оксидативного стресса роль главных негативных факторов в старой клетке играют существенное снижение биосинтеза нормальных и ослабление деградации поврежденных макромолекул. Так, снижение биосинтеза и деградации белка — хорошо известное свойство старения от нематод до млекопитающих (Tavernarakis, Driscoll, 2002).

Что касается деградации белков, то известно, что в клетках присутствуют три основные протеолитические системы: протеосомная, лизосомальная и кальпаиновая (кальпаины — это кальцийзависимые протеазы, ответственные за обмен цитоскелетных и мембранных белков) (Rattan et al., 2004). Среди этих систем следует отметить 20S-коровый протеосомный мультикаталитический комплекс, который ответственен за деградацию большинства окисленных, агрегированных или неправильно уложенных белков. Протеосома находится в цитоплазме, ядре или в мембранных структурах и составляет около 1 % всего белка в цитозоле (Rattan et al., 2004).

У стареющих червей дикого типа экспрессия компонентов протеосомы возрастает. По-видимому, это связано с компенсатор-

ным ответом на возрастные дегенеративные изменения. У долгоживущих мутантов *daf-2* с возрастом наблюдаются снижение экспрессии компонентов протеосомы, но высокая экспрессия аспартиловых протеаз (Golden, Melov, 2004). В целом у *daf-2* снижают экспрессию примерно 59 генов, регулирующих белковый метаболизм, в том числе протеолиз и пептидолиз (например, гены *asp* и *spp*) (Halaschek-Wiener et al., 2005). Тем не менее у мутантов *daf-2* активизируется процесс автофагии, деградации и обмена белков внутри лизосомальных автофагосом (Hansen et al., 2005). Когда с пищей поступает мало аминокислот, снижение TOR-сигналинга приводит наравне с долгожительством еще и к сверхактивации автофагии (Walker et al., 2005). Систематический поиск генов *Caenorhabditis elegans* с использованием масштабной РНК-интерференции выявил локусы, подавление экспрессии которых ведет к увеличению продолжительности жизни. Не вызывает удивления, что продукты некоторых из них вовлечены в процессинг и(или) деградацию белков. Эти локусы кодируют три протеазы, убиквитин-лигазу и С-концевую гидролазу убиквитина, удаляющую убиквитин (маркер белков, подлежащих утилизации) из модифицированных белков (Hamilton et al., 2006).

В мышцах грудного отдела тела, т. е. в метаболически активной ткани, у стареющей мухи происходит сверхактивация генов субъединиц протеосомы (Girardot et al., 2006). По другим сведениям, у дрозофилы старение, так же как и оксидативный стресс, сопровождается снижением активности субъединиц протеосомы и других протеаз (41 ген). Снижение экспрессии генов протеаз может быть связано с падением темпов синтеза и обмена белков (Landis et al., 2004). С возрастом у дрозофилы увеличивается экспрессия генов ингибиторов сериновых протеаз и цитохрома P450 (Pletcher et al., 2002). Продолжительность жизни трансгенных мух увеличивает сверхэкспрессия гена карбоксиметилтрансферазы (*pcmt*), участвующей в репарации поврежденных изоаспартиловых остатков белков и метионинсульфоксидредуктазы, репарирующей окисленные метионины (Helfand, Rogina, 2003b).

У млекопитающих доказано возрастзависимое снижение протеосомной функции, наиболее выраженное в отношении пептидил-глутамил-пептидгидролазной активности протеосомы. На уровне мРНК снижается экспрессия $\alpha 2$ - и $\alpha 7$ -субъединиц протеосомы мышей, что предотвращается ограничением калорийности пищи, а 2-мерный электрофорез выявил, кроме того, снижение количества $\alpha 3$ - и $\alpha 5$ -субъединиц. Возрастзависимое уменьшение активности протеосомы может быть вызвано и посттрансляционными модификациями, такими как окисление и гликозилирование (Rattan et al., 2004). В гомогенатах мозга старых мышей проис-

ходит увеличение времени полужизни окисленных нефункциональных белков, накапливаются конъюгаты убиквитина с белком, что может быть обусловлено снижением деградации на протеосомах. При пролиферативном старении фибробластов цитозольная протеосомальная функция также испытывает выраженный спад. Это связано со снижением экспрессии генов **20S**- и **Z**-субъединиц протеосомы, **26S**-субъединиц протеосомного компонента **TBP1** и убиквитин-гиолэстеразы. Кроме того, протеосома напрямую ингибируется липофусцином/цериодом. Накопление окисленных липидов, таких как липофусцин/цериод, может, таким образом, увеличивать количество поврежденных белков (Tavernarakis, Driscoll, 2002). Активность протеосомы снижается с возрастом в мышцах, печени, спинном мозге, сердце и ретине крыс, а также в хрусталике глаз, лимфоцитах и эпидермисе человека (Martin, Grotewiel, 2006). Лизосомальный **HSC73**-специфичный протеолитический механизм также ингибирован в стареющих фибробластах. Накопление липофусцина, представляющего собой агрегат окисленных белков и липидов, влияет на активность лизосом. Другие типичные включения стареющих клеток — сверхагрегированные белки — свидетельствуют о том, что шапероны и протеазы не справляются со своими функциями (Rattan et al., 2004). Анализ локусов количественных признаков, связанных с продолжительностью жизни, в гематопозитических стволовых клетках инбредных мышей показал их корреляцию с экспрессией убиквитин-конъюгирующего фермента **Ube2s** (De Haan, Williams, 2004). Четвертая часть индуцированных при старении печени белков участвует в стресс-ответе, прежде всего окислительном. Сюда относятся шапероны, осуществляющие репарацию поврежденных структурных и функциональных белков, а также стимулирующие убиквитинирование и протеосомную деградацию потенциально токсичных и поврежденных белков, возникающих в результате окислительных или гликоксидативных процессов (Cao et al., 2001). В стареющем кортексе снижается экспрессия нескольких генов, вовлеченных в белковый обмен, таких как гены убиквитин-конъюгирующих ферментов, лизосомального протонного насоса, ферментов **D**-аспартат-**O**-метилтрансферазы и метионин-аденозилтрансферазы **II**, репарирующих поврежденные белки (Lu et al., 2004). Сверхактивация **Smurf2** — гена **E3**-убиквитин-протеинлигазы, запускающей убиквитинирование и протеосомозависимую деградацию белка **SMAD1**, участвующего в **TGF-β**-сигналинге, является последствием изнашивания теломер в фибробластах человека. Активация **SMURF2** в молодых фибробластах приводит к остановке роста, появлению морфологических и биохимических изменений, свойственных старению, включая изменение экспрес-

сии генов. Как оказалось, **SMURF2** использует для индукции фенотипа старения **Rb**- и **p53**-зависимые механизмы (Zhang, Cohen, 2004).

Помимо детоксификации и протеолиза в процессах антистарения важную роль играет автофагия — путь внутрилизосомальной деградации, регулируемый большим семейством генов **ATG**. В клетках млекопитающих различают три формы автофагии: 1) макроавтофагия утилизирует крупные органеллы, заключая их в вакуоли с двухслойной мембраной, называемые автофагосомами; автофагосомы получают кислые гидролазы, объединяясь с поздними эндосомами или лизосомами; 2) при микроавтофагии макромолекулы и малые органеллы попадают в лизосомы через инвагинацию мембраны; 3) автофагия, опосредованная шаперонами, избирательно переваривает белки, характеризующиеся определенной аминокислотной последовательностью (лизин—фенилаланин—глутамат—аргинин—глутамин). Несмотря на то что лизосомальная деградация протекает быстро, она не вполне успешна. Деградация осуществляется одновременно с катализируемой железом пероксидацией, приводящей к медленному накоплению в лизосомах полимерной субстанции липофусцина, не разрушаемого гидролитическими ферментами. В результате стареющие постмитотические клетки накапливают экстрализосомальный «мусор» (дефектные митохондрии и непереваренные белковые агрегаты, не попадающие в лизосомы). Накопление липофусцина приводит к еще большему снижению способности к автофагии (Terman et al., 2007). Мутанты по генам автофагии у дрожжей характеризуются снижением хронологической продолжительности жизни (Kaeberlein et al., 2007). Выключение у нематод экспрессию гена автофагии **bec-1** (гомолог гена **beclin 1** млекопитающих) укорачивает продолжительность жизни мутантов-долгожителей **daf-2(e1370)**. Подавление методом РНК-интерференции других генов автофагии нематод, например, **atg-7** и **atg-12**, также сокращает жизнь как червей дикого типа, так и мутантов **daf-2** (Hars et al., 2007). Уровень автофагии снижается с возрастом и у грызунов (Kaeberlein et al., 2007).

В то время как пролиферирующие клетки способны «разбавлять» неперевариваемые макромолекулы и органеллы новыми, долгоживущие постмитотические клетки делают это с трудом. Таким образом, в результате недостаточного переваривания окисленных макромолекул и органелл посредством автофагии и других переваривающих систем кардиомиоциты, нейроны и ретикулярные пигментные эпителиальные клетки постепенно накапливают биологический «мусор», в том числе уже упоминавшийся липофусцин, дефектные митохондрии и другие органеллы, а так-

же аберрантные белки, часто формирующие агрегаты (агресомы). Накопление липофусцина препятствует автофагическому митохондриальному обмену, стимулируя накопление постаревших митохондрий, которые плохо вырабатывают АТФ, но образуют все большее количество активных форм кислорода. Оксидативный стресс далее стимулирует повреждение митохондрий и лизосом, снижая способность к адаптации, запуская митохондриальные и лизосомальные проапоптозные пути, последнее приводит к гибели клетки (Terman et al., 2007).

Подводя итоги следует сказать, что возрастзависимое снижение эффективности систем детоксификации, протеолиза и автофагии приводит к накоплению вредных молекул, отработанных белковых и липидных агрегатов и нефункциональных органелл. Подобный «мусор» в свою очередь нарушает нормальные клеточные процессы и еще больше ингибирует детоксификацию и автофагию. Возникает порочный круг. Сверхактивация компонентов этих защитных систем методами молекулярной генетики вызывает увеличение продолжительности жизни.

Глава 4 СТАРЕНИЕ И СТРЕСС

Стресс — это внезапное изменение, индуцирующее повреждения на молекулярном, клеточном и организменном уровнях. Однако стресс также вызывает адаптивный ответ, который обычно компенсирует его. Такая способность носит название «стрессоустойчивость». Полезный эффект умеренного стресса заключается в том, что он позволяет организму справиться с последующим более жестким стрессом. В случае умеренного стресса с отсутствием явных повреждений такой феномен называется «гормезис». Если же повреждение перевешивает адаптацию, то это приводит к функциональному спаду и так называемому «дистрессу» (Soti, Csermely, 2007).

Положительная корреляция продолжительности жизни и стрессоустойчивости, впервые выявленная у долгоживущих мутантов нематод, предполагает, что способность распознавать и отвечать на внешнесредовые вызовы важна для регулирования продолжительности жизни (Morley, Morimoto, 2004). Активация стресс-ответа на любой стимул индуцирует перекрестную толерантность к множеству стресс-факторов. В то же время устойчивость к любому физическому стрессу коррелирует с продолжительностью жизни у многих, если не у всех, видов живых существ (Soti, Csermely, 2007). Например, окислительное повреждение ускоряет старение, тогда как устойчивость к данному виду повреждения удлиняет жизнь. Поэтому все долгоживущие мутанты *Caenorhabditis elegans* устойчивы к окислительному повреждению (Guarente, Kenyon, 2000).

4.1. Окислительный стресс

4.1.1. Теория интенсивности жизнедеятельности

В начале XX века (в 1908 г.) немецкий физиолог Макс Рубнер провел серию исследований филогенетических аспектов старения. Он показал, что у некоторых видов существует обратная корреляция между продолжительностью жизни и темпом метаболизма, а также прямая зависимость долгожительства от размеров тела (цит. по: Sapolsky, 2004). Так, живущая 2 года крыса имеет в покое частоту сердечных сокращений 400 ударов в минуту, а слон, доживающий до 60 лет, — 35 ударов (Speakman, 2005).

В 20-х годах XX века Раймонд Пирл использовал дрозофилу, чтобы показать, что продолжительность жизни является наследуемым признаком (Pearl et al., 1923). Эксперименты Пирла привели к возникновению теории «интенсивности жизнедеятельности» (*rate-of-living*), ставшей впоследствии теорией оксидативного стресса. В 1928 г. Пирл распространил свою теорию на теплокровных, у которых он наблюдал прямую корреляцию между размером тела и продолжительностью жизни, и обратную — между продолжительностью жизни и темпом метаболизма (Pearl, 1928). Для Пирла был неясен точный механизм, связывающий метаболизм и старение. Он предполагал, что некие клеточные элементы расходуются пропорционально общему темпу метаболизма. Когда эти неизвестные жизненные элементы истощаются, наступает гибель (Balaban et al., 2005).

Основываясь на взглядах предшественников, Денхам Харман предложил «свободнорадикальную теорию» старения (Harman, 1956). Эта теория в целом соответствовала ранее высказывавшимся представлениям, предполагавшим корреляцию между темпом метаболизма и продолжительностью жизни. Кроме того, теория Хармана постулировала, что старение и ассоциированные с ним дегенеративные заболевания возникают благодаря повреждающему действию свободных радикалов на различные компоненты клетки. Его концепция вызывала ожесточенное противодействие до тех пор, пока Маккорд и Фридович не открыли фермент супероксиддисмутазу (McCord, Fridovich, 1969). Существование внутриклеточного фермента, очищающего от супероксида, стало важным свидетельством в пользу того, что клетка постоянно вырабатывает свободные радикалы. Харман предположил, что причиной возникновения старение-индуцирующих свободных радикалов, вероятно, служит «взаимодействие дыхатель-

ных ферментов, вовлеченных в прямую утилизацию молекулярного кислорода» (цит. по: Balaban et al., 2005).

Позднее внимание сместилось от межвидовых различий к изучению взаимосвязи сбоев метаболического гомеостаза и ускоренного старения. Гипотеза «износа» привела к появлению парадигмы, согласно которой дистресс может ускорять старение. Например, многократные перегрузки системы гомеостаза глюкозы могут приводить к диабету II типа, а также к старению через неферментативное образование гликозилированных белков. Пролонгированная глубокая эмоциональная депрессия увеличивает риск сердечных заболеваний. Поиск механизмов таких феноменов привел к обоснованию связей между гормонами стресса и выработкой свободных радикалов (Sapolsky, 2004).

Большой вклад в исследование проблем свободнорадикального старения и в разработку методов его замедления (геропротекторов и антиоксидантов) внесли отечественные ученые — акад. Н. М. Эммануэль (см.: Эммануэль, 1981), Л. К. Обухова (1975), Е. Б. Бурлакова (Бурлакова, Молочкина, 1973), В. Х. Хавинсон (Хавинсон и др., 2003) и В. Н. Анисимов (2003).

4.1.2. Свободные радикалы и старение

Теперь мы знаем, что клетки постоянно вырабатывают свободные радикалы. При физиологических условиях около 0.2 % общего потребляемого кислорода уходит на их генерирование, которое осуществляется во многих компартментах клетки и при участии многих ферментов. Важный вклад в этот процесс вносят белки плазматической мембраны (принадлежащие к семейству NADPH-оксидаз), липидный метаболизм в пероксисомах, активность различных цитозольных ферментов (таких как циклооксигеназы). Однако наиболее значителен вклад митохондрий — около 90 %. Образование активных форм кислорода в митохондриях является следствием окислительного фосфорилирования — процесса, использующего контролируемое окисление NADH или FADH для запасания потенциальной энергии протонов ($\Delta\Psi$) во внутренней мембране митохондрий. Эта потенциальная энергия в свою очередь используется для фосфорилирования АДФ через F₁-F₀-АТФазу. В нескольких местах цепи цитохромов электроны, получаемые от NADH или FADH, могут напрямую реагировать с кислородом или другими акцепторами электрона и генерировать свободные радикалы. Ранее эти события рассматривали как побочную реакцию, однако теперь убеждены, что митохондриальные активные формы кислорода играют большую роль в раз-

личных redox-зависимых сигнальных процессах. Вполне вероятно также, что они служат механизмом «часов старения» (Turrens, 2003; Balaban et al., 2005).

Два главных участка генерации активных форм кислорода — комплексы I и III электротранспортной цепи, где происходят большие изменения потенциальной энергии электронов, связанные с восстановлением кислорода. Экспериментальные манипуляции, увеличивающие окислительно-восстановительный потенциал в комплексах I или III, повышают темп выработки активных форм кислорода. Участок I является мультисубъединичным комплексом, состоящим из 46 белков с общей молекулярной массой 1 МДа и по крайней мере из одного связанного флавинонуклеотида и 8 железосерных групп. Как железосерные, так и флавинонуклеотидные группы участвуют в выработке активных форм кислорода (Balaban et al., 2005). Здесь возникает одна треть общего количества митохондриальных свободных радикалов. Кроме того, они образуются глицерол-3-фосфатдегидрогеназой, продуцирующей активные формы кислорода на цитозольную сторону митохондриальной мембраны (Miwa et al., 2004). В комплексе III O_2^- образуется посредством восстановленного убисемихинона либо на внутренней, либо на внешней поверхности мембраны. Этап терминального окисления на цитохром *c* оксидазе в интактной системе не вносит существенного вклада в образование активных форм кислорода (Turrens, 2003; Balaban et al., 2005).

Как известно, увеличение темпов образования активных форм кислорода или снижение каталитической детоксификации их в результате снижения антиоксидантной защиты вызывает структурные модификации в ДНК, белках и липидах (Bayne et al., 2005; Ferguson et al., 2005). Накопление оксидативных повреждений с возрастом может происходить через увеличение образования свободных радикалов, а также через снижение антиоксидантной способности и репарации оксидативных повреждений, деградации окисленных макромолекул, либо через комбинацию этих механизмов (Martin, Grotewiel, 2006).

Супероксиддисмутаза, локализованная в митохондриях, превращает O_2^- в перекись водорода, которая в свою очередь распадается под действием митохондриальных пероксидаз или диффундирует в цитозоль. Перекись водорода может быстро диффундировать через клеточные мембраны и подвергаться расщеплению до высокоактивного гидроксил-радикала, способного вызывать оксидативные повреждения разнообразных макромолекул (Bayne et al., 2005; Ferguson et al., 2005). Открытие супероксиддисмутазы было важным шагом в обосновании роли митохондрий в выработке свободных радикалов и H_2O_2 (McCord, Fridovich, 1969). Существует

два внутриклеточных фермента с активностью супероксиддисмутазы: SOD2 (Mn-зависимый фермент в матриксе митохондрий) и SOD1 (Cu,Zn-содержащий фермент цитозоля). Оба фермента превращают O_2^- в перекись водорода, которая затем деактивируется или каталазой до воды и кислорода, или различными глутатион-пероксидазами до восстановленного глутатиона и воды. Пероксиредоксины представляют собой еще одно семейство важных перехватчиков свободных радикалов в митохондриях. Супероксид, который не был немедленно деактивирован, напрямую взаимодействует с окисленным цитохромом *c* или цитохром-оксидазой. Эта эффективная система утилизации приводит к тому, что количество свободных радикалов, выходящих из митохондрий, гораздо меньше генерируемого (Хавинсон и др., 2003; Balaban et al., 2005).

Трипептид γ -глутамил-цистеинил-глицин, известный также как глутатион (GSH), — многосторонний биологический восстановитель. GSH синтезируется в результате последовательного действия двух ферментов: глутамат-цистеинлигазы, катализирующей первый шаг синтеза *de novo*, и глутаматсинтазы, связывающей глицин с γ -глутамил-цистеином для формирования глутатиона. Последний осуществляет множество физиологических функций, исполняя роль субстрата ферментативного восстановления пероксидов и конъюгата ксенобиотиков для облегчения их экспорта из клетки, а также участвуя в транспорте аминокислот, тиолировании/детиолировании белков и поддержании клеточного окислительно-восстановительного статуса (Orr et al., 2005). Повышение продукции активных форм кислорода вызывает сдвиг в окислительно-восстановительном статусе клетки, который определяется количеством и соотношением взаимозаменяемых форм окислительно-восстановительных пар, таких как дисульфиды GSH, цистеин, тиоредоксин, NAD(P)H и NAD(P)⁺. Концентрация глутатиона в клетке на 2—3 порядка выше, чем любого другого антиоксиданта. Он является главным детерминантом и индикатором общего окислительно-восстановительного статуса. Однако концентрация GSH зависит от нескольких факторов, в том числе от наличия предшественников и от темпов синтеза и окисления. Концентрация метионина может также влиять на состояние глутатиона, поскольку он является предшественником в биосинтезе цистеина (Rebrin et al., 2004). Окисление GSH, цистеина и метионина — наиболее ранние клеточные ответы на увеличение выработки активных форм кислорода. Последствием увеличения продукции свободных радикалов является обратимое окисление белковых цистеинил-тиолов, приводящее к формированию смешанных протеин-глутатионил-дисульфидов с GSH и его метабо-

литами (протеин-цистеинилом и протеин-цистеинил-глицином). Тиолирование потенциально служит регулирующим механизмом активации/инактивации белков, вовлеченных в разнообразные функции, такие как трансдукция сигнала, активация генов и ферментов (Rebrin et al., 2004).

Темпы образования митохондриями свободных радикалов, супероксид-анион радикала (O_2^-) и перекиси водорода (H_2O_2) увеличиваются с возрастом и отрицательно коррелируют с максимальной продолжительностью жизни, по крайней мере у млекопитающих и насекомых (Bayne et al., 2005). Прямые эксперименты по влиянию окислителей на скорость старения в целом подтверждают теорию Хармана. Например, мухи, обработанные паракватом (реагентом, вызывающим оксидативный стресс), характеризуются нарушениями циклов сон : бодрствование, сходными с наблюдаемыми при старении (Koh et al., 2006). У дрозофилы старение и оксидативный стресс-ответ одинаково сверхэкспрессируют гены биосинтеза пуринов, белков теплового шока, антиоксидантов и гены врожденного иммунного ответа. При этом одинаково подавляется активность субъединиц протеасомы и других протеаз (41 ген), щелочных фосфатаз (8 генов) и триацилглицероловых липаз (4 гена). В конечном счете при старении и оксидативном кислородном стрессе перекрывается экспрессия 38 % генов (Landis et al., 2004). Дефект митохондриального фермента β -субъединицы сукцинатдегидрогеназы у дрозофилы обуславливает гиперчувствительность к кислороду и появление признаков прогероидного синдрома (раннее начало смертности и преждевременное угасание поведенческих реакций). Все эти нарушения являются следствием повышенной выработки митохондриями H_2O_2 (Walker et al., 2006a).

Возрастзависимое увеличение содержания оксидативно поврежденных нуклеиновых кислот, белков и липидов отмечено в различных тканях у многих видов животных. В мозгу человека и других млекопитающих старение ассоциировано с увеличением окислительного повреждения как митохондриальной, так и ядерной ДНК, причем в митохондриальной ДНК уровень повреждений значительно выше, поскольку она ближе к основному источнику образования свободных радикалов. Оксидативное повреждение ядерной ДНК обуславливает возникновение разрывов цепей, способных вызвать гибель клетки или мутации, нарушающие синтез белков и приводящие к клеточной дисфункции (Martin, Grotewiel, 2006).

Высокое потребление кислорода постмитотическими клетками повышает риск накопления оксидативных повреждений ДНК, особенно в промоторных областях генов нейронов. Промоторные

участки генов особенно уязвимы, так как они содержат **GC**-богатые последовательности, которые очень чувствительны к повреждению и не защищены эксцизионной репарацией. Основным модифицированным основанием является 8-оксо-2'-деоксигуанозин. Повреждение ДНК наблюдалось также и в экзонах, но в меньшей степени, чем в промоторах. Стабильно экспрессируемые и сверхэкспрессируемые гены стареющего кортекса демонстрируют небольшое число повреждений ДНК в своей промоторной области. Напротив, большинство генов с возрастзависимым снижением регуляции имеют значительно большее число повреждений. Таким образом, повреждение ДНК может снижать экспрессию наиболее уязвимых генов, вовлеченных в обучение, память и нейрональное выживание, инициируя программу старения мозга, начинающегося у человека после 40 лет (Lu et al., 2004; Englander, Ma, 2006).

Белки получают оксидативные повреждения аминокислот и кофакторов. Остатки метионина особенно чувствительны к окислению активными формами кислорода, образуя метионин-S- и метионин-R-сульфоксиды (Koc et al., 2004). Ключевой митохондриальной мишенью оксидативного повреждения служит фермент аконитаза (Bitterman et al., 2003). До одной трети белков мозга у пожилых индивидуумов оксидативно повреждены, а их функционирование снижается (Fraser et al., 2005). У мышей возрастзависимое снижение способности к скоординированным движениям также связано с окислением белков в мозжечке (Martin, Grotewiel, 2006). Оксидативное повреждение белков увеличивается с возрастом у дрозофилы, в гепатоцитах крыс, в мозгу собаки, в хрусталике глаза человека. Карбонилирование белков в гепатоцитах крыс и хрусталике человека свидетельствует о том, что у старого организма около 30 % общего белка клетки может быть оксидативно поврежденным, по крайней мере в некоторых тканях (Martin, Grotewiel, 2006). Одна из эволюционных теорий старения предполагает, что симметрично делящиеся организмы не стареют. Однако это противоречит экспериментальным данным. Иммунофлуоресцентный анализ на наличие карбонилированных белков в симметрично делящихся клетках дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* демонстрирует постепенное накопление со временем таких белков. При делении окисленные белки распределяются между двумя дочерними клетками. Тем не менее количество молодых клеток (т. е. содержащих мало окисленных белков) остается достаточно большим, чтобы обеспечить выживание популяции (Minois et al., 2006).

Карбонилирование возникает через прямое окисление определенных боковых цепей аминокислот и оксидативно-индуцирован-

ного разложение пептидов. В норме такая модификация метит ферменты для деградации цитозольными нейтральными щелочными протеазами или протеосомой. Однако темп белкового обмена с возрастом снижается, что может приводить к накоплению поврежденных белков в стареющей клетке (Tavernarakis, Driscoll, 2002).

Липиды являются важным повсеместным компонентом биологических мембран, и их модификация окислительными процессами может влиять на текучесть и проницаемость мембран и инактивировать мембраносвязанные белки, обуславливая эффекты старения. Окислительные повреждения липидов возникают при автокаталитических реакциях перекисного окисления. Фосфолипиды в наиболее метаболически активных тканях, таких как печень, в особенности фосфолипиды митохондриальных мембран как наиболее близкие к месту образования активных форм кислорода, подвергаются наибольшему риску повреждения. Чувствительность мембран к перекисному окислению липидов зависит от их качественного состава. Так, мембраны с большим количеством полиненасыщенных жирных кислот и особенно ω 3-полиненасыщенных жирных кислот (докозагексаеновой кислоты) особенно подвержены оксидативному стрессу (Andziak, Buffenstein, 2006; Martin, Grotewiel, 2006). Пероксиды распадаются до цитотоксичных альдегидов, таких как малоновый диальдегид и 4-гидроксиноненал. Накопление 4-гидроксиноненала увеличивается с возрастом в некоторых тканях дрозофилы, а уровень малонового диальдегида и конъюгированного с гидроксиноненалом коллагена возрастает при старении крыс (Martin, Grotewiel, 2006).

Состав мембран изменяется при ограничении диеты, при этом происходит снижение накопления повреждений липидов (Andziak, Buffenstein, 2006). Клеточное окружение влияет на окисление липидов, модулируя количество повреждений. Переходные металлы, такие как железо, инициируют реакцию Фентона, сопровождающуюся образованием высокоактивных гидроксил- и алкоксил-радикалов. Возрастзависимые изменения внутриклеточной концентрации железа могут влиять на скорость окислительных процессов и на накопление повреждений. Действительно, увеличение концентрации железа с возрастом коррелирует с увеличением оксидативных повреждений у крыс и мышей. Однако результаты исследований возраст-ассоциированных изменений количества поврежденных липидов противоречивы и зависят от ткани и вида, что даже привело к заключению о том, что постепенное окислительное повреждение липидов не является интегральным показателем старения организма (Andziak, Buffenstein, 2006).

Признаком старения у нематод и других животных служит аутофлуоресценция клеток в результате лизосомального накопления липофусцина — неперевариваемого продукта оксидативной деградации и автофагоцитоза клеточных компонентов (Garigan et al., 2002).

Оксидативный стресс влияет на выживание клеток и гомеостаз. Он запускает изменение экспрессии генов, приводящее либо к клеточному старению, либо к апоптозу, либо к восстановлению клетки (Lehtinen et al., 2006). Преждевременное старение клеток в культуре индуцируется оксидативным стрессом (Hardy et al., 2005). Одним из механизмов этого явления может быть образование одноцепочечных разрывов в теломерной ДНК (Kurz, 2004). У здоровых женщин предклимактерического возраста, имеющих детей с хроническими заболеваниями, оксидативный стресс и длина теломер зависели от длительности болезни детей (от 1 до 12 лет) (Sapolsky, 2004). Снижение концентрации окружающего кислорода значительно увеличивает продолжительность жизни первичных клеток в культуре. Сходное увеличение достигается пополнением уровня антиоксидантов. Например, увеличение уровня активности супероксиддисмутазы продлевает жизнь первичных фибробластов, а также снижает темпы укорочения теломер. Напротив, выключение *Sod* методом РНК-интерференции индуцирует клеточное старение через активацию p53 (Balaban et al., 2005). У мух с доминантно-негативной, т. е. не способной связываться с ДНК, формой p53, экспрессируемой в нейронах, устойчивость к индуктору активных форм кислорода параквату возрастала, так же как и продолжительность жизни (Bauer et al., 2005). Как уже говорилось ранее, белок p53 в ответ на повреждение ДНК индуцирует транскрипцию *p21* гена-ингибитора циклин-зависимых киназ, приводящего к необратимой остановке клеточного цикла. Сверхактивация *p21* повышает уровни активных форм кислорода как в нормальных, так и в опухолевых клетках, причем пропорционально уровню p21. Ингибитор свободных радикалов NAC подавляет окрашивание p21-экспрессирующих клеток на старение-ассоциированную β-галактозидазу и защищает их от необратимой остановки роста, индуцированной p21. Еще один p53-индуцируемый ген — *PIG3* приводит к индукции свободных радикалов (Macip et al., 2002).

Генетические модификации, увеличивающие продолжительность жизни модельных животных, зачастую повышают их устойчивость к окислительному стрессу.

При хронологическом старении дрожжей важная роль принадлежит цитоплазматическим и митохондриальным супероксиддисмутазам (гены *Sod1* и *Sod2*; сверхэкспрессия обоих генов прод-

леват хронологическое выживание на 30 %). Экспрессия гена антиапоптозного белка человека **Bcl-2** у дрожжей препятствует развитию дефектов у мутантов по *sod* и увеличивает выживание клеток дикого типа (предполагается, что гибель старых дрожжевых клеток протекает по пути апоптоза) (Bitterman et al., 2003). Выключение генов дрожжей *sch9* и *cyr1* приводит к 3- и 2-кратному увеличению продолжительности жизни, а также к устойчивости к оксидативному стрессу. Оба гена участвуют в каскадах, подавляющих активность транскрипционных факторов, контролирующих ген *Sod2* (Bitterman et al., 2003; Fabrizio et al., 2005). Окисленные метионины в составе белков репарируются антиоксидантными ферментами — Met-S-SO-редуктазой (*MsrA*) и Met-R-SO-редуктазой (*MsrB*). У дрожжей присутствует по одному гену *MsrA* и *MsrB*. Делеция *MsrA* у дрожжей укорачивает продолжительность жизни на 26 %, а сверхэкспрессия — увеличивает на 25 % (Koc et al., 2004). При нормальных условиях оксидативно поврежденные белки, накапливающиеся в стареющих клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, в отличие от *Schizosaccharomyces pombe* распределяются между материнской и дочерней клетками асимметрично. Такой защиты дочерней клетки не наблюдается у мутантов *Sir2*; отсюда предполагается, что эта деацетилаза может быть важна для защиты клетки от последствий оксидативного повреждения (Balaban et al., 2005).

Мутации, приводящие к снижению инсулинового сигналинга и к долгожительству нематод (*daf-2*), уменьшают количество карбонилированных (окисленных) белков (Baumeister et al., 2006). У мутантов наблюдается снижение экспрессии компонентов электротранспортной цепи митохондрий (Golden, Melov, 2004). Личинка *dauer* и долгоживущие взрослые особи мутантов *daf-2* и *age-1* имеют повышенную активность каталазы, цитоплазматической Cu,Zn-SOD, митохондриальной Mn-SOD (ген *sod-3*) и глутатион-S-трансферазы. Эта экспрессия опосредована транскрипционным фактором DAF-16 (McElwee et al., 2004). Известно, что удаление половых клеток у нематод продлевает жизнь. Оказалось, что животные с удаленными половыми клетками также имеют повышенную устойчивость к оксидативному стрессу (Arantes-Oliveira et al., 2002).

Лабораторная селекция самок дрозофилы на позднюю репродукцию привела к созданию ряда долгоживущих линий. Многие из них имеют повышенную устойчивость к оксидативному стрессу (Martin, Grotewiel, 2006). Удаление в мозгу дрозофилы медианных нейросекреторных клеток, синтезирующих инсулиноподобные пептиды, приводит к устойчивости к оксидативному стрессу (Broughton et al., 2005). Продлевающая жизнь мутация

в гене рецептора инсулина *InR* у дрозофилы способствует повышенной экспрессии супероксиддисмутазы (Cheng et al., 2005). Аналогично мутация субстрата инсулинового рецептора *Chico* увеличивает как общую активность фермента *Sod*, так и продолжительность жизни (Landis et al., 2003). Гетерозиготы по мутации гена рецептора другого гормона, экдизона, также имеют повышенную устойчивость к оксидативному стрессу (Simon et al., 2003). Долгоживущая линия дрозофил *methuselah (mth)* характеризуется увеличением продолжительности жизни на 35 %, а также устойчивостью к оксидантам. Продукт этого гена принадлежит к мембранным рецепторам подсемейства секретринов, сопряженных с ГТФ-связывающими белками (GPCR). Эти рецепторы с семью трансмембранными доменами, модулируют большое количество сигнальных путей. Лиганды *Mth* кодируются у дрозофилы геном *stunted*, дающим два сплайсинговых варианта белка, содержащих их по 56 и 60 аминокислот (А и В). Эти белки соответствуют в субъединице F1F0-АТФ-синтазы электронотранспортной цепи. Однако остается вопрос, как предполагаемый митохондриальный белок может служить лигандом рецептора клеточной поверхности? Мутация гена, кодирующего эти лиганды, увеличивает как продолжительность жизни, так и устойчивость к оксидативному стрессу (Helfand, Rogina, 2003a; Cvejic et al., 2004; Balaban et al., 2005). Эктопическая экспрессия *d4E-VP* у мух с отсутствием *dFOXO* восстанавливает их устойчивость к оксидативному стрессу до контрольного уровня. *d4E-VP* контролирует белок *eIF4E*, связывающий 5' кэп молекулы мРНК и регулирующий биосинтез белка (Tettweiler et al., 2005).

Отсутствие *Sod1* у дрозофилы увеличивает спонтанное повреждение генома как в соматических, так и в половых клетках. Определенные мутации с дефектами репарации ДНК, в том числе двойная мутация *mei-9^a mei-41^{DS}* (Woodruff et al., 2004), оставаясь толерантными у *Sod1^r*-мух, приводят к высокой смертности при введении в генетическое окружение гомозиготы с отсутствием *Sod1*. Сверхэкспрессия *MsrA*, преимущественно в нервной системе, продлевает жизнь дрозофилы на 70 % (Koc et al., 2004).

Сверхэкспрессия каталазы в сочетании с *Sod* (либо только *Sod*) увеличивает продолжительность жизни дрозофилы, так же как сверхэкспрессия гена карбоксиметилтрансферазы белков (*pcmt*), участвующей в репарации поврежденных изоаспартиловых остатков и метионинсульфоксидредуктазы, репарирующей окисленные метионины (Helfand, Rogina, 2003b). У дрозофилы сверхэкспрессия *Cu,Zn-Sod* только лишь в мотонейронах продлевает жизнь на 40—50 % без изменения уровня метаболизма или фертильности (Guarente, Kenyon, 2000). Однако данный эффект, по-видимо-

му, был обусловлен неблагоприятным генетическим окружением контрольной линии (Rand et al., 2006). В другом эксперименте проверка эффектов сверхэкспрессии человеческого *Sod* на различном генетическом фоне, в том числе у долгоживущих диких линий дрозофилы, продемонстрировала выраженные генотип- и пол-специфичные эффекты, хотя в среднем продолжительность жизни все же увеличивалась. Таким образом, продление жизни у линий со сверхактивацией *Sod* не является эффектом лишь генетического фона — здесь налицо эпистатическое взаимодействие *Sod* с другими генами, влияющее на выраженность эффектов (Spencer et al., 2003).

Истощение запасов глутатиона, индуцированное L-бутионин-SR-сульфоксимином (ингибитором активности глутамат-цистеинлигазы), усиливает уязвимость к оксидативным повреждениям. В некоторых тканях количество глутатиона и их способность поддерживать его постоянный уровень при оксидативном стрессе имеют тенденцию к снижению с возрастом. На примере домовых мухи показано, что у молодых особей глутамат-цистеинлигаза имеет более высокую аффинность к своим субстратам, чем у старых (Orr et al., 2005). Соотношение GSH/GSSG и содержание метионина при старении дрозофилы также снижаются, а содержание белковой смеси дисульфидов — увеличивается (Rebrin et al., 2004). Сверхэкспрессия гена глутамат-цистеинлигазы в нервной системе мух увеличивает среднюю и максимальную продолжительность жизни на 50 %, не влияя на уровень потребления кислорода. Повсеместная ее сверхэкспрессия продлевает жизнь только на 24 %. Таким образом, усиление глутатионовой биосинтетической активности, особенно в нейрональной ткани, замедляет старение, что подтверждает гипотезу оксидативного стресса как ключевого фактора старения (Orr et al., 2005).

Муши, сверхэкспрессирующие ген белка теплового шока *Hsp22* в мотонейронах, дольше поддерживают высокую локомоторную активность. У них также повышена устойчивость к оксидативному повреждению, вызванному паракватом (Morrow et al., 2004).

Мыши-гетерозиготы с мутацией рецептора инсулиноподобного фактора роста IGF-1, как известно, живут дольше, а их фибробласты более устойчивы к оксидативному стрессу, чем контрольные (Cheng et al., 2005). Самки-гетерозиготы по инсулиновому рецептору также обладают повышенной устойчивостью к оксидативному стрессу (Nelson, Padgett, 2003). У мышей, как известно, сверхэкспрессия гена *klotho* подавляет старение и увеличивает продолжительность жизни через подавление инсулинового сигналинга и FOXO-зависимую индукцию Mn-SOD (Yamamoto et al., 2005). Нарушения в гене *p66^{shc}*, кодирующем адапторный

белок для ряда рецепторов клеточной поверхности, включая рецептор инсулина, продлевают жизнь мышей и увеличивают их устойчивость к оксидативному стрессу. Клетки таких мутантов характеризуются снижением базального и стресс-индуцируемого уровней свободных радикалов. Есть свидетельства, указывающие на то, что p66^{shc} регулирует у млекопитающих активность FOXO, а это в свою очередь увеличивает активность каталазы и супероксиддисмутазы (Balaban et al., 2005; Papazoglu, Mills, 2007). Сигналинг p53-p66Shc вовлечен в распространение проапоптозного оксидативного сигнала (Pelicci, 2004). Делеция гена *MsrA* у мышей снижает продолжительность жизни на 40 % (Koc et al., 2004). Трансгенные мыши со сверхэкспрессией гена человеческой каталазы в пероксисомах, ядре или митохондриях живут, напротив, на 5 месяцев дольше контроля. У них замедляется развитие кардиопатологии и катаракты, снижается образование окислительных повреждений и митохондриальных делеций, уменьшаются выработка H₂O₂ и H₂O₂-индуцированная инактивация аконитазы (Schriner et al., 2005). С другой стороны, мыши, гетерозиготные по митохондриальной супероксиддисмутазе, характеризуются значительным уровнем повреждения ядерной ДНК и высокой частотой опухолеобразования (Balaban et al., 2005).

Среди млекопитающих виды с большей продолжительностью жизни обычно вырабатывают и накапливают меньше окисленных липидов (например, мембранных ω-3-полиненасыщенных жирных кислот), чем короткоживущие, в результате они меньше подвержены перекисному окислению (Andziak, Buffenstein, 2006).

Представители группы столетних индивидуумов у человека проявляют наравне с низкой резистентностью к инсулину меньшую степень оксидативного стресса (Cheng et al., 2005). Напротив, недостаточная детоксификация радикалов обуславливает ряд возрастзависимых заболеваний, например болезни Паркинсона и Альцгеймера, а также ишемическо-реперфузионные повреждения при инсульте (Baumeister et al., 2006; Walker et al., 2006a).

Каким образом регулируется ответ клетки на оксидативный стресс и как он связан со старением? Ключевую роль в этом процессе отводят протеинкиназам и транскрипционным факторам. Протеинкиназа Ste20, которая у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* опосредует H₂O₂-индуцируемую гибель клеток, у млекопитающих представлена Ste20-подобными киназами MST1 и MST2. В нейронах млекопитающих оксидативный стресс активирует MST1-киназу, которая в свою очередь фосфорилирует FOXO3, что подавляет способность последнего взаимодействовать с белками 14-3-3 в цитоплазме и способствует его перемещению в ядро. Активация FOXO3 приводит к запуску апоптоза нейронов через актива-

цию транскрипции гена *bim*, кодирующего BH3-белок, напрямую вовлеченный в клеточную гибель. Выключение MST1 снижает индуцируемую перекисью водорода экспрессию *bim*. Hippo, у дрозофилы, ортолог MST1 также играет важную роль в апоптозе. Кроме того, выключение CST-1, ортолога MST1 у *Caenorhabditis elegans*, укорачивает продолжительность жизни и ускоряет старение тканей, тогда как сверхэкспрессия *cst-1* стимулирует продолжительность жизни и задерживает старение через фосфорилирование DAF-16, ведущее к активации антистрессовых белков, например Hsp12.6 (Lehtinen et al., 2006).

Связь стресс-сигналинга и продолжительности жизни обосновывается еще и тем, что JNK-зависимый путь регуляции долгожительства стимулируется клеточным стрессом, подавляя токсичность внутриклеточных активных форм кислорода. У нематод активация JNK при трансгенной сверхэкспрессии гена *jnk-1* наравне с продолжительностью жизни увеличивает *daf-16*-зависимым образом толерантность к оксидативному стрессу (Baumeister et al., 2006). У *Caenorhabditis elegans* при оксидативном стрессе DAF-16 может также активироваться и p38-МАР-киназой SEK-1. Кроме того, корегулятором DAF-16, контролирующим его антиоксидантную роль, является белок SMK-1, способствующий сверхактивации генов антиоксидантных ферментов митохондриальной супероксиддисмутазы и каталазы. Однако сверхэкспрессия одного лишь *smk-1* не приводит к увеличению продолжительности жизни (Wolff et al., 2006). Ответ на оксидативный стресс у червей опосредуется активацией (и ядерной локализацией) белка SKN-1, родственного NF-E2-факторам стресс-ответа млекопитающих — Nrf1 и Nrf2. SKN-1 индуцируется в условиях оксидативного стресса, и его индукция продлевает жизнь нематоды (Baumeister et al., 2006). Наконец, активизация JNK-сигналинга снижает оксидативные повреждения и увеличивает продолжительность жизни дрозофилы (Balaban et al., 2005; Baumeister et al., 2006; Gami, Wolkow, 2006).

Таким образом, у червей, мух и мышей генетические изменения, повышающие активность FOXO, увеличивают устойчивость к оксидативным повреждениям через FOXO-зависимую транскрипцию разнообразных генов, участвующих в стресс-ответе, например *Mn-Sod* (Giannakou, Partridge, 2004; Wang et al., 2005). По-видимому, деацетилаза млекопитающих SIRT1 также защищает клетки от прямого оксидативного стресса (Balaban et al., 2005). Кстати сказать, при оксидативном стрессе увеличивается ассоциация SIRT1 с FOXO3 и FOXO4 (Wang, Tissenbaum, 2006). SIRT1 может стимулировать способность FOXO индуцировать задержку клеточного цикла, возможно, предоставляя клетке больше времени на репарацию ДНК и детоксификацию свободных радикалов

(Giannakou, Partridge, 2004). Возраст-ассоциированное увеличение концентрации активных форм кислорода может также приводить к индукции p38 MAPK стресс-ответа через накопление окисленной формы тиоредоксина, активирующего киназу ASK1 (Hsieh, Papaconstantinou, 2006).

Индукция стресс-активируемых киназ и транскрипционных факторов приводит к изменению паттерна экспрессии генов. Таким образом, старение нередко сопровождается компенсаторной активацией генов, участвующих в устранении последствий оксидативного стресса.

Примерно четверть индуцированных при старении печени белков участвует в оксидативном стресс-ответе, прежде всего это шапероны (Cao et al., 2001). В стареющей ретине сверхэкспрессируют фермент фосфатидилсериндекарбоксилаза (расположенный во внутренней мембране митохондрий и участвующий в биосинтезе фосфолипидов). Возможно, это компенсаторная реакция на оксидативное повреждение мембран (Carter et al., 2005). В скелетных мышцах обезьян старение изменяет экспрессию 300 (4.2 %) генов. Происходит скоординированная индукция генов ответа на оксидативный стресс, включая *Hsp70*, *ORP150* (ген, кодирующий кислородрегулируемый белок с молекулярной массой 150 кДа) и *p65* (ген субъединицы NF-κB) (Kayo et al., 2001). При старении в кортексе человека обнаруживается сверхэкспрессия ферментов эксцизионной репарации 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы и урацил-ДНК-гликозилазы (Lu et al., 2004). Активность гликозилаз NEIL1 и NEIL2 в постмитотическом мозгу усиливается в 1.5— 2 раза (Englander, Ma, 2006). Обнаружено значительное увеличение с возрастом активности гликозилазы/AP-лиазы (mtODE), нацеленной на 8-оксогуанин в митохондриях (Souza-Pinto et al., 1999). Экспрессия и ферментативная активность сульфоксидредуктаз А и В, катализирующих репарацию оксидативных повреждений метиониновых остатков, снижается с возрастом в мозгу, печени и почках крыс, так же как при репликативном старении фибробластов человека в культуре (Martin, Grotewiel, 2006).

Вполне закономерно, что в ряде исследований удалось показать благотворное влияние на процессы старения различных синтетических и природных антиоксидантов или индукторов антиоксидантных ферментов. Антиоксиданты в пище защищают от возрастзависимого снижения поведенческих реакций у крыс. Фармакологические антиоксиданты (витамин Е) снижают количество оксидативно поврежденных белков, липидов и ДНК у мышей. Аналогичная защита обнаружена у мух, получающих 4-фенилбутират — ингибитор гистоновых ацетилаз, усиливающий устойчивость к оксидативному стрессу (Cook-Wiensa, Grotewiel, 2002;

Goddeeris et al., 2003; Martin, Grotewiel, 2006). Ограничение калорийности питания также снижает концентрацию 8-гидрокси-десоксигуанозина в ДНК и дитиозинового перекрестного сшивки белков в сердце мышей и предотвращает перестройки митохондриального генома (Lee et al., 2002).

В итоге следует отметить, что свободнорадикальная теория подтверждается следующими фактами (Giorgio et al., 2007):

1) аэробные организмы постоянно образуют токсичные активные формы кислорода;

2) клетки накапливают со временем окислительные повреждения (окислительный стресс);

3) активные формы кислорода способны вызывать клеточное старение и апоптоз;

4) активные формы кислорода, клеточное старение и апоптоз неразрывно связаны с возраст-ассоциированными дегенеративными заболеваниями.

Несмотря на множество фактов, свидетельствующих в пользу свободнорадикальной теории, остаются открытыми следующие фундаментальные вопросы (Balaban et al., 2005):

Что управляет взаимосвязью между общим темпом метаболизма и выработкой активных форм кислорода?

Какие наиболее важные внутриклеточные мишени свободных радикалов и как окислительные модификации этих мишеней влияют на продолжительность жизни?

4.1.3. Несоответствия свободнорадикальной теории

Теория интенсивности жизнедеятельности в современной интерпретации предсказывает, что увеличение уровня метаболизма приводит к повышенной генерации свободных радикалов и, таким образом, к снижению продолжительности жизни. Однако возникает вопрос: возможна ли обратная ситуация, когда мутации, приводящие к долгожительству, обеспечиваются снижением метаболической активности, и не будет ли это слишком большой ценой за продление жизни? Доказано, что ограничение калорийности пищи или снижение инсулинового сигналинга, продлевающие жизнь, не приводят к серьезному снижению скорости метаболизма (Rand et al., 2006). В экспериментах по генетической селекции долгоживущих линий дрозофилы продолжительность жизни возрастает без снижения метаболической активности (Landis et al., 2003). К тому же у дрозофилы скорость метаболизма и уровень активных форм кислорода с возрастом вообще не меняются (Rand et al., 2006).

Кроме того, существуют аутбредные линии мышей с высокой интенсивностью метаболизма и потребления кислорода, но более долгоживущие по сравнению с теми, чья интенсивность метаболизма ниже. Дело в том, что у таких долгожителей отмечается увеличение степени метаболического расщепления в митохондриях. Это означает возможность уменьшения выработки свободных радикалов даже в условиях возросшего потребления кислорода путем снижения мембранного потенциала митохондрий (Balaban et al., 2005). Увеличение утечки протонов через электрон-транспортную цепь снижает мембранный потенциал, вызывая уменьшение протонной движущей силы, что приводит к снижению накопления QH и выработки свободных радикалов (Fridell et al., 2005).

Семейство митохондриальных расщепляющих белков (UCP) состоит из пяти членов высококонсервативных митохондриальных белков-переносчиков, присутствующих у всех эукариотов. Эти переносчики находятся во внутренней мембране митохондрий и позволяют протонам перетекать в матрикс, нарушая, таким образом, электрохимический градиент, генерируемый дыхательной цепью. В результате снижаются мембранный потенциал митохондрий и соотношение АДФ/О, а темп дыхания и метаболизма вырастает. В дополнение к расщепляющей активности каждый UCP приводит еще и к уникальным физиологическим последствиям, зависящим от ткани, в которой он экспрессируется. Экспрессия человеческого hUCP2 во взрослых нейронах дрозофил увеличивает продолжительность жизни в среднем на 11 и 28 % у самцов и самок соответственно. Мыши с дефицитом UCP1, активным исключительно в бурой жировой ткани (ответственной за выработку тепла), чувствительны к холоду. Более широко экспрессирующийся ген UCP2 негативно регулирует секрецию инсулина в β -клетках поджелудочной железы и защищает нейроны от судорог. Ген UCP3 экспрессируется в мышцах и бурой жировой ткани и вовлечен в контроль за массой тела и в метаболизм жирных кислот. Умеренная сверхэкспрессия генов как UCP2, так и UCP3 приводит к формированию мышей с худощавым фенотипом (Fridell et al., 2005).

Существуют и более явные несоответствия свободнорадикальной теории старения. Например, бактерии, сверхэкспрессирующие *Fe-Sod* или *Mn-Sod*, неожиданно оказались более чувствительными к индуктору свободных радикалов параквату (Giorgio et al., 2007). Сверхэкспрессия *Sod1* — гена антиокислительного фермента у дрожжей не влияет на репликативную продолжительность жизни, а в случае *Sod2* даже снижает ее. При этом делеция любого из этих генов значительно снижает продолжительность жизни, прежде всего хронологическую. Таким образом, усиление

антиоксидантной способности не является предпосылкой долгожительства у дрожжей (Kaeberlein et al., 2005a). Так, при этом изменения экспрессии генов оксидативного стресс-ответа в стареющих клетках дрожжей не происходит (Koc et al., 2004). Неожиданно оказывалось, что мухи, содержащие дополнительные копии трансгенов *Mn-SOD* и митохондриальной каталазы, т. е. с усиленной митохондриальной защитой от активных форм кислорода, живут меньше (примерно на 30 %). Следовательно, почти полное удаление митохондриальных O_2^- и H_2O_2 было даже более опасным, чем они сами по себе, либо сверхэкспрессия антиоксидантных ферментов имеет токсичное действие, приводя к дисфункции митохондрий (Bayne et al., 2005). Несмотря на то что сверхэкспрессия *Sod* у дрозофилы продлевает жизнь, данный эффект зависит от генетического окружения линии. Сверхэкспрессия гена каталазы в митохондриях мышей также продлевает жизнь, но проявляет значительное варьирование между реципрокными сверхэкспрес-сирруемыми конструктами. Таким образом, хотя снижение уровня активных форм кислорода иногда увеличивает продолжительность жизни, проявление этого эффекта зависит от генетического окружения (Spencer et al., 2003; Rand et al., 2006).

У дрозофилы снижение калорийности пищи увеличивает продолжительность жизни, но существенных расхождений с контролем уровня митохондриальных свободных радикалов не наблюдали. Сверхэкспрессия гена митохондриальной адениннуклеотид-трансферазы значительно снижает выход свободных радикалов за счет уменьшения мембранного потенциала, но продолжительность жизни таких мух не отличается от контрольной (Miwa et al., 2004). Следовательно, эффект самого универсального (от дрожжей до млекопитающих) способа замедления старения — уменьшения калорийности пищи — не связан со снижением выработки свободных радикалов, которое в свою очередь зачастую не сопровождается увеличением долгожительства.

Гены, участвующие в ответе на оксидативный стресс и обуславливающие изменение продолжительности жизни в экспериментах молекулярных геронтологов, не проявляют сегрегационного варьирования в естественных популяциях: например, гены каталазы (*Cat*), *Rosy (ry)*, и *Sod*. Быть может, это связано с давлением отбора, отмечающим такие варианты. Таким образом, они не играют важной роли в формировании продолжительности жизни в естественных популяциях, а также в индивидуальных различиях продолжительности жизни (Flatt, 2004). Однако следует отметить, что в эксперименте Ванг с соавторами (Wang et al., 2006) QTL выживаемости после окислительного стресса (повышенного содержания кислорода в воздухе) были обнаружены на обеих аутосомах

дрозофилы. Они перекрываются с обнаруженными в предыдущих экспериментах локусами долгожительства (**22A-33F**, **42B-47E**, **86D-87A**); небольшая часть из них зависела от пола и плотности взрослых особей на среде.

Как уже упоминалось, у дрозофил при старении и при окислительном стрессе перекрывается экспрессия лишь **38 %** генов. В результате, между старением и окислительным стрессом рано ставится знак равенства. Уникальным для старения следует считать воспроизводимое снижение экспрессии генов энергетического метаболизма, среди которых гены окислительного фосфорилирования (**42** гена), синтеза АТФ (**9**), цикла трикарбоновых кислот (**13**). Это может быть связано с наблюдаемой потерей с возрастом нормальных и функциональных митохондрий. Старение характеризуется существенной индукцией генов антимикробных пептидов (в **5—100** раз). Окислительный стресс выявил достоверное, но менее выраженное (в **2—5** раз) их увеличение (Landis et al., 2004).

Исследования показали, что у общественных насекомых повышенная экспрессия антиоксидантов также не является необходимой для возникновения долгожительства. У муравья *Lasius niger* короткоживущие самцы (живут несколько дней) имеют значительно более высокий уровень экспрессии *Sod1*, чем матка (живет до **28** лет) и рабочие (живут **1—2** года). Последние практически не различаются между собой по уровню экспрессии этого фермента. Аналогичные результаты получены для медовой пчелы: анализ **8** антиоксидантных генов (в том числе *Cu,Zn-Sod*, *Mn-Sod* и гена каталазы) в разных частях тела маток и рабочих пчел в разных возрастных группах не выявил различий. Более того, у маток, отличающихся исключительным долгожительством, нет генов, кодирующих функциональные внеклеточные пероксидазы (Parker et al., 2004; Corona, Robinson, 2006; Keller, Jemielity, 2006). Однако следует отметить, что у них была выявлена очень высокая активность гена вителлогенина. Это желточный гликопротеин с молекулярной массой **180** кДа, синтезируемый в клетках жирового тела и выделяющийся в гемолимфу, откуда он поглощается развивающимися ооцитами. Продукт этого гена защищает пчел от окислительного агента параквата, индуцирующего образование активных форм кислорода. По-видимому, вителлогенин принимает на себя основной удар окислительного стресса, выступая, таким образом, в роли антиоксиданта, что может способствовать увеличению продолжительности жизни (Seehuus et al., 2006; Corona et al., 2007).

Клеточные культуры млекопитающих со сверхэкспрессией *Cu,Zn-Sod* страдают от повышенного перекисного окисления липидов и гиперчувствительности к окислительному стрессу (Giorgio et al., 2007). Мыши, гетерозиготные по мутации *Sod2*, имеют

снижение активности фермента в различных тканях на 30—80 % и не отличаются по средней или максимальной продолжительности жизни от дикого типа, хотя частота рака у них выше (Trifunovic et al., 2005). Снижение активности Mn-SOD на 50 % приводит к увеличению повреждения как ядерной, так и митохондриальной ДНК (т. е. к увеличению количества 8-оксо-2-деоксигуанозина) во всех тканях тела мыши и к повышению частоты рака, но не ведет к уменьшению продолжительности жизни; эти особи также не отличаются от особей дикого типа по частоте возникновения катаракт и по характеру иммунного ответа и формирования гликоксидативных продуктов — карбоксиметиллизина и пентозидина в коллагене кожи (Remmen et al., 2003). Аналогичным образом, двойные мутанты мышей по двум митохондриальным антиоксидантным ферментам *Sod2*^{+/-}/*Gpx1*^{+/-} живут нормальное время, хотя обладают повышенной чувствительностью к окислительному стрессу (Trifunovic et al., 2005). У мышей с мутациями *Sod2*^{+/-} и *Gpx4*^{+/-} также не наблюдается преждевременной индукции р53-зависимой транскрипционной программы старения (Edwards et al., 2007).

Обобщение, предполагаемое теорией интенсивности жизнедеятельности, опровергается еще и тем, что летающие птицы и летучие мыши характеризуются непропорционально долгой жизнью (по сравнению с нелетающими членами классов сходного размера), поскольку они имеют высокую скорость метаболизма и, как следствие, должны были бы иметь большую подверженность окислительным повреждениям. Справедливости ради надо отметить, что есть сведения, согласно которым у птиц вырабатывается меньше свободных радикалов на поглощенную молекулу кислорода. Такие птицы, как канарейки, голуби, волнистые попугайчики и скворцы, имеют лучшую устойчивость к окислительным повреждениям, чем короткоживущие лабораторные грызуны. Культуры клеток птиц более устойчивы к оксидативному стрессу, и эта устойчивость основана на активации транскрипции (Holmes, Ottinger, 2003).

Однако есть и более парадоксальные исключения. Голые слепыши (*Heterocephalus glaber*, Bathyergidae) — это мелкие подземные грызуны (35 г), живущие в неволе до 30 лет. Данный рекорд принадлежит самцу, прожившему более 28.3 лет при стандартных лабораторных условиях. Этот результат тем более впечатляет, что лабораторные гипероксичные атмосферные условия не являются физиологичными для данного вида, обитающего под землей. Слепыши живут на порядок дольше, чем можно предположить при размерах их тела и интенсивности метаболизма, основываясь на аллометрическом уравнении Протеро и Юргенса. Коэффициент продолжительности жизни (соотношение предсказанной по массе

тела и реальной продолжительности жизни) данных животных сопоставим с наблюдаемым у человека и превышает таковой только у определенных видов летучих мышей. Он живет дольше даже таких долгоживущих и более массивных грызунов, как дикобразы, белки и бобры. Впечатляющая продолжительность жизни голых слепышей сопровождается отсутствием связанных с возрастом физиологических модификаций, наблюдаемых у многих других млекопитающих. Кроме того, слепыши сохраняют репродуктивную способность до третьего десятилетия жизни. Низкая внешняя интенсивность смертности, связанная с существованием в защищенном подземном местообитании, может приводить к эволюции физиологических и биохимических механизмов, стимулирующих самоподдержание соматки и продление плодовитости у данного грызуна (Andziak, Buffenstein, 2006; Andziak et al., 2006). При этом антиоксидантный статус слепыша вовсе не превосходит таковой у мышей, живущих на порядок меньше. Слепыши характеризуются очень низкой активностью клеточной глутатионовой пероксидазы без компенсаторной сверхактивации других ферментов антиокислительной защиты. Практически полное отсутствие ферментативной защиты от перекиси водорода увеличивает вероятность оксидативного стресса и делает их чувствительными к возраст-зависимым изменениям окислительных факторов, таких как внутриклеточный уровень железа (Andziak, Buffenstein, 2006). Как результат, у слепышей в 10 раз выше уровень перекисного окисления липидов *in vivo*, в 2 раза — повреждений липидов (малондиальдегид и изопростаны), в 2—8 раз больше повреждений ДНК (8-оксогуанина) и 1.5—2 раза — повреждений белка (карбонилы) в моче и различных тканях, чем у мышей того же биологического возраста (Andziak et al., 2006).

Рассматривая роль свободных радикалов в старении и особенно методы борьбы с ними, следует иметь в виду, что свободные радикалы необходимы клетке для нормального ее функционирования. Активные формы кислорода участвуют в redox-зависимой регуляции различных функций клетки, таких как энергетический метаболизм, апоптоз, ответ на стресс или ростовые сигналы. Однако не все они выполняют сигнальную роль. В отличие от OH^- или O_2^- , перекись водорода (H_2O_2) способна проникать через мембрану, растворима, менее реактивна и существует дольше. Внутриклеточный уровень H_2O_2 в норме регулируется различными факторами роста: EGF, PDGF, NGF, инсулином. H_2O_2 ингибирует ключевые фосфатазы, вовлеченные в снижение трансдукции сигнала от активированных рецепторов факторов роста. H_2O_2 выполняет функцию сигнальной молекулы благодаря своей способности вызывать обратимые модификации белков. Она окисляет

цистеиниловый тиол с образованием дисульфидных мостиков и сульфениламидных связей, индуцирует глутатионилирование цистеиновых остатков или сульфоксидацию метиониновых остатков в составе различных мишеней, среди которых транскрипционный фактор **Pap1** и киназа **Sty1** дрожжей, а также ариламин-N-ацетилтрансфераза **1**, индоламин-2,3-диоксигеназа, фосфорилаза **A2**, малые связанные с убиквитином модификаторы, фосфатазы (**PTP1B**, **PTEN**, **LMW-PTP**, **FAK**, **SHP2**, **CDC25**), цитоплазматические и митохондриальные пероксиредоксины, аннексин **A2**, **HSF-1**, аконитаза, α -кетоглутарат дегидрогеназа, субъединицы комплекса **I** дыхательной цепи млекопитающих.

В настоящее время функциональная значимость таких модификаций доказана лишь для некоторых из этих белков, например для фосфатаз, и предполагается для транскрипционного фактора **NF- κ B**. Обратимость вызванных изменений обеспечивают ферменты — глутаредоксины и сульфиредоксины, что может предполагать регуляторную роль подобных модификаций (**Giorgio et al., 2007**). Более того, перекись водорода влияет на экспрессию по крайней мере **80** различных генов, включая компоненты митоз-активирующих протеинкиназ и сигнального пути ядерного фактора **κ B**. Следовательно, контролируемое образование перекиси водорода в клетке играет положительную физиологическую роль. В то же время, металл-катализируемое расщепление H_2O_2 до OH^- приводит к окислительному повреждению липидов, белков и ДНК (**Bayne et al., 2005**). Замедление развития нематод с низким уровнем свободных радикалов может служить еще одним подтверждением того, что цитоплазматические активные формы кислорода влияют на развитие не как деструктивные элементы, а как специфичные сигнальные молекулы. По-видимому, они являются нижележащими эффекторами малой ГТФазы **Ras**, модулирующей сигналы развития (**Felkai et al., 1999; Balaban et al., 2005**).

Таким образом, старение, по всей видимости, не связано с глобальным снижением антиоксидантной способности, а ключевыми механизмами оксидативного повреждения при старении являются увеличение выработки активных форм кислорода митохондриями, снижение репарации оксидативных повреждений белков и ДНК и уменьшение деградации окисленных белков протеосомой (**Martin, Grotewiel, 2006**). Хотя очевидно, что оксидативное повреждение играет важную роль при старении, однако не представляется возможным, чтобы оно было единственной его причиной, поскольку степень увеличения продолжительности жизни, связанная с манипуляциями над уровнем оксидативного повреждения, намного скромнее результатов действия специфичных мутаций в генах долгожительства (**Guarente, Kenyon, 2000**).

4.1.4. Митохондриальная теория старения

Один-два миллиарда лет назад произошло внедрение в архея-подобную клетку эубактерии, эволюционировавшей в митохондрию. Постепенно ответственность за ее репликацию и поддержание перешла к клетке-хозяину. На данный момент из тысяч белков, составляющих митохондрию, только небольшое количество все еще кодируется митохондриальной ДНК (мтДНК человека кодирует всего 37 генов). Несмотря на то что клетка способна вырабатывать энергию независимо от митохондрий (в процессе гликолиза), на них была возложена большая часть ответственности за энергобезопасность, что обусловило возможность возникновения в эволюции энергозатратных нервных и мышечных клеток, т. е. мозга и сердца (Balaban et al., 2005). Митохондрия — главный источник клеточного АТФ. Кроме того, она играет ключевую роль в •-окислении жирных кислот, биосинтезе фосфолипидов, кальциевом сигналинге и апоптозе (Kujoth et al., 2005). Однако вторгшаяся эубактерия медленно убивает своего хозяина, вырабатывая потенциально опасные активные формы кислорода. Митохондрии также являются первым компартментом клетки, повреждаемым этими радикалами (Felkai et al., 1999; Balaban et al., 2005).

Начиная с Денхама Хармана многие исследователи отводят митохондриям важную роль в старении (Harman, 1972). В 1980 г. Мигель (цит. по: Vina et al., 2005) развил данную теорию, обозначив митохондрии одновременно как источник свободных радикалов и как мишень окислительного повреждения стареющей клетки. В современном виде митохондриальная теория старения была предложена Линнаном (Linnane et al., 1989). Согласно этой теории, накопление митохондриальных мутаций в течение всей жизни вносит важный вклад в постепенное снижение клеточной биоэнергетической способности, ассоциированной со старением и нейродегенеративными заболеваниями, такими как болезнь Альцгеймера и Паркинсона. Эти мутации возникают как следствие образования деструктивных свободных радикалов при окислительном метаболизме (Korpelainen, 1999).

Стареющие клетки характеризуются дисфункцией митохондрий. Генетический аспект старения митохондрий контролируется мтДНК, ядерными генами, а также взаимодействием ядерной и мтДНК (Rand et al., 2006). Анализ мутационного паттерна мтДНК осложняется тем, что клетки содержат смесь мутантной и нормальной мтДНК и при каждом делении нормальные и мутантные гены перераспределяются между дочерними клетками, по-видимому, случайным образом (Korpelainen, 1999). О том, что при нормальном старении целостность митохондрий с возрастом сни-

жается, говорит возрастзависимое увеличение уровня поврежденных мтДНК. В различных тканях грызунов, макак-резусов и людей мтДНК накапливает с возрастом замены оснований и делеции. Более того, по механизму клональной экспансии данные дефекты распространяются по всей клетке (гомоплазмия) (Kujoth et al., 2007). В такой постмитотической ткани, как мозг, повреждение, оцениваемое по биомаркеру 8-оксо-2'-деоксигуанозину, в митохондриях в 3 раза выше, чем в ядерной ДНК. Причины различий, возможно, кроются в близости митохондриальной ДНК к источнику оксидантов и в отсутствии гистоновой защиты. В настоящее время показано также возрастзависимое накопление точечных мутаций в участках контроля репликации мтДНК (Zhang, Herman, 2002; Balaban et al., 2005). Герминативные мутации мтДНК у пациентов с митохондриальными заболеваниями приводят к преждевременному появлению признаков старения (Korpelainen, 1999). Точечные мутации и делеции мтДНК накапливаются при старении в различных тканях у человека, обезьян и грызунов. Эти мутации неравномерно распределены и накапливаются клонально, в определенных клетках, вызывая мозаичный паттерн дисфункций дыхательной цепи в таких тканях, как сердце, скелетные мышцы и мозг (Trifunovic et al., 2004). У дрозофилы данный вид накапливаемых с возрастом повреждений отмечается в тораксе с большей частотой по сравнению с брюшным или головным отделом тела, что говорит о тканеспецифичности данного процесса (прежде всего в мышечной ткани) (Yui et al., 2003). У человека накопление делеций мтДНК наиболее активно протекает в нервной и мышечной тканях. Варьирование числа делеций для одной ткани у людей одного возраста меньше, чем между разными тканями одного организма (Cortopassi et al., 1992). О роли митохондрий в старении может свидетельствовать и тот факт, что снижение калорийности пищи, увеличивающее продолжительность жизни многих модельных объектов, задерживает накопление мутаций мтДНК и редуцирует опосредованный митохондриями апоптоз (Kujoth et al., 2005). Существует точка зрения, согласно которой дефектные митохондрии стареющих клеток вступают в порочный круг — они вырабатывают свободные радикалы, индуцирующие дополнительное повреждение мтДНК и ферментов митохондрий, которые в свою очередь дают начало еще большему количеству активных форм кислорода (Hutter et al., 2004). Мыши, гомозиготные по мутации гена *PolgA* — каталитической субъединицы мтДНК-полимеразы, кодируемой в ядре, характеризуются нарушением способности к коррекции ошибок вновь синтезируемой мтДНК. У них в 3—5 раз выше уровень точечных мутаций и делетированной мтДНК. При этом происходит снижение продолжительности жиз-

ни, сопровождающееся преждевременным началом связанных со старением нарушений, таких как потеря массы тела и подкожного жира, облысение, кифоз, остеопороз, анемия, снижение фертильности и увеличение сердца. По-видимому, это связано с падением активности дыхательной цепи и выработки АТФ, причем прежде всего в сердце, что само по себе может являться причиной ускоренного старения (Trifunovic et al., 2004; Balaban et al., 2005). Однако стоит отметить, что накопление мутаций мтДНК не сопровождается увеличением оксидативного стресса (т. е. количества окисленных оснований РНК и ДНК и темпов перекисного окисления липидов) или дефектами клеточной пролиферации, уровень образования активных форм кислорода также находился в норме, что противоречит концепции порочного круга. Мутации в мтДНК коррелируют с индукцией маркеров апоптоза (активацией эффекторной каспазы-3), особенно в тканях, характеризующихся быстрой заменой клеток. Уровень маркеров апоптоза также возрастает при старении нормальных мышечных. Таким образом, накопление мутаций мтДНК, стимулирующее апоптоз, может служить одним из механизмов старения млекопитающих (Kujoth et al., 2005; Trifunovic et al., 2005).

Старые митохондрии имеют измененную морфологию и продуцируют больше оксидантов и меньше АТФ. Морфологические изменения старых митохондрий, по крайней мере у дрозофил, выражаются в реорганизации митохондриальных крист (Balaban et al., 2005). Так, например, нарушения в митохондриях с возрастом приводят к тому, что у летающих насекомых происходит снижение как частоты взмахов крыльев, так и способности к продолжительному полету. Как известно, благодаря присутствию трахеоларных впаиваний, ткани насекомых получают воздух непосредственно из атмосферы, что обуславливает в них более высокие концентрации кислорода, чем в тканях млекопитающих. Митохондрии, выделенные у насекомых, вырабатывают O_2^- и H_2O_2 также на относительно высоком уровне. Поэтому дыхательная способность митохондрий дрозофилы значительно снижается с возрастом, как и активность оксидазы цитохрома *c* (комплекс IV), что может быть причиной упоминавшегося выше порочного круга. Действительно, экспериментальное ингибирование активности комплекса IV увеличивает выработку H_2O_2 (Ferguson et al., 2005).

С возрастом у многих организмов репрессируются гены компонентов митохондриальной дыхательной цепи, АТФ-синтазного комплекса и цикла Кребса, а также АТФ-зависимого активного транспорта (включая транспорт ионов, питательных веществ и транзиттеров). Репрессия генов оксидативного метаболизма и

глобальные изменения паттерна экспрессии начинаются в ранней зрелости, задолго до начала функциональных нарушений (McCarroll et al., 2004; Girardot et al., 2006). Как у нематод, так и у дрозофил происходит примерно 2-кратное снижение функции большого количества генов, вовлеченных в синтез АТФ и в митохондриальное дыхание (Balaban et al., 2005). У млекопитающих при старении мозга снижают свою активность железосерный белок Риске и НАДН-дегидрогеназа (Blalock et al., 2003). В стареющей двенадцатиперстной кишке (энергозависимом органе) происходит снижение экспрессии субъединиц Va и VIa оксидазы цитохрома c и АТФ-синтазы • (Englander, 2005). Наиболее выраженные изменения функций митохондрий у млекопитающих выявлены в тканях с высокой митохондриальной функцией. В печени, мышцах и в мозгу активность электронотранспортных комплексов I, III и IV снижается с возрастом, тогда как функция комплекса II остается по большей части неизменной. В стареющих постмитотических тканях (мышцах и нейронах) *in situ* выявляются также дефекты цитохром c-оксидазы. Аналогичные, но менее выраженные возрастзависимые изменения затрагивают и ткани с изначально низкой активностью митохондрий, хотя пролиферирующие клетки в отличие от постмитотических вырабатывают большую часть энергии за счет гликолиза (Hutter et al., 2004). Возрастзависимое снижение выработки энергии приводит к угнетению таких энергозависимых процессов, обеспечивающих стрессоустойчивость и долгожительство, как детоксификация вредных метаболитов и репарация ДНК и белков.

Мутации, затрагивающие различные аспекты функционирования митохондрий, способны существенным образом влиять на продолжительность жизни. Например, механизмы взаимодействия митохондрий и ядра управляют старением дрожжей. Делеция мтДНК увеличивает продолжительность жизни материнской клетки. Это увеличение зависит от гена *rtg2*, сигнализирующего в ядро о дисфункции митохондрий по механизму ретроградной регуляции. Ретроградный механизм приводит к изменению паттерна экспрессии ядерных генов и в конечном итоге увеличивает продолжительность жизни клетки. Есть предположение, что у нематод продукт гена *clk-1* «докладывает» ядру о состоянии метаболизма митохондрий, вынуждая ядерные гены устанавливать корректный уровень поведения, развития и старения (Guarente, Kenyon, 2000). Мутация *isp-1* у нематод в гене компонента (кодирующего железосерный белок Риске) комплекса III дыхательной цепи приводит к замедлению развития и снижению потребления кислорода, а также к долгожительству. Скрининг на основе РНК-интерференции у червей показал, что снижение уровня активности различ-

ных компонентов дыхательной цепи (комплексов I, III, IV или V) также ведет к увеличению продолжительности жизни. Около 15 % из общего пула генов долгожительства у нематод регулируют активность митохондрий: это гены компонентов электронотранспортной цепи, митохондриальных переносчиков, рибосомальных субъединиц митохондрий. Несмотря на долгожительство, такие мутанты имеют измененную морфологию митохондрий, значительное снижение потребления кислорода и стационарный уровень АТФ (Balaban et al., 2005). Полный скрининг генома нематод с помощью РНК-интерференции выявил 89 генов, инактивация которых продлевает жизнь на 5—70 %. Среди вновь открытых генов продолжительности жизни 25 % участвуют в различных аспектах метаболизма (углеводный и спиртовый метаболизм, цикл Кребса, окислительное фосфорилирование, метаболизм пуринов). Возможно, что инактивация этих ферментов снижает скорость генерации энергии (наподобие снижения калорийности питания), подавляя не только продукцию АТФ, но и образование свободных радикалов.

Кроме компонентов системы окислительного фосфорилирования в регулирование продолжительности жизни вовлечены ферменты углеводного метаболизма (например, УРФ-глюкозо-1-фосфат-уридилтрансфераза) и цикла трикарбоновых кислот (аконитатгидратаза, изоцитратдегидрогеназа), поставляющие топливо для окислительного фосфорилирования (Hamilton et al., 2006). Ингибирование митохондриального дыхания или синтеза АТФ — это *daf-16*-независимый механизм увеличения продолжительности жизни нематоды. В другом эксперименте подавление активности генов методом РНК-интерференции привело к увеличению продолжительности жизни и к выявлению 12 генов, кодирующих компоненты дыхательной цепи митохондрий. Мутантные животные характеризовались малыми размерами тела, замедлением движения и питания. Однако у животных с подавлением генов *nuo-5* (НАДН-убихиноноксидоредуктаза) и *cchl-1* (цитохром *c* гем-лиаза) размеры тела были в норме, однако продолжительность жизни также увеличивалась (Hansen et al., 2005). Напротив, мутация *Mev-1* у нематод, связанная с нарушением субъединицы фермента сукцинатдегидрогеназы, входящего в состав комплекса II электронотранспортной цепи, приводит к структурным нарушениям в митохондриях (снижает сукцинат-цитохром *c* редуктазную активность), вызывая увеличение выработки активных форм кислорода и повышение уровня повреждений ядерной ДНК, что приводит к снижению длительности жизни (Felkai et al., 1999).

Удаление убихинона из диеты червей продлевает жизнь на 60 %. Мутация в гене фермента выработки убихинона (кофермен-

та Q) *clk-1* замедляет развитие и приводит к долгожительству, обуславливая дефицит дыхания, зависящего от комплекса I, и снижая цитоплазматический уровень свободных радикалов. Сверхэкспрессия *clk-1*, напротив, увеличивает активность митохондрий и уменьшает продолжительность жизни (Felkai et al., 1999; Balaban et al., 2005).

Возросшее количество генов-кандидатов, регулирующих продолжительность жизни, требует исследования их полиморфизма в популяциях дикого типа. Одним из таких кандидатов является мтДНК, отдельные гаплотипы которой ассоциируются с варьированием продолжительности жизни. Как оказалось, у дрозофилы влияние мтДНК гаплотипов на продолжительность жизни в большей мере зависит от ядерного генетического фона (митохондриально-ядерный эпистаз), чем собственно от мтДНК. Это естественно, ведь более 90 % митохондриальных белков кодируется в ядре (Rand et al., 2006).

В митохондриях стареющих клеток существенно возрастает олигомицин-ингибируемое дыхание, что указывает на низкое сопряжение электронного транспорта с фосфорилированием (Hutter et al., 2004). Причинами рассогласования являются окислительное повреждение митохондриальной мембраны, активация митохондриальных пор проницаемости и неспецифическая утечка протонов (Hutter et al., 2004). Предотвращающий утечку кардиолипин (бисфосфатидилглицерол внутренней мембраны митохондрий) очень чувствителен к окислительному повреждению. Он также участвует в регуляции активности ряда митохондриальных белков, таких как АДФ/АТФ-переносчик, переносчик фосфата, митохондриальная АТФ-синтаза (Zhang, Herman, 2002). Экспрессия α -субъединицы митохондриальной F1 АТФ-синтазы, сопрягающей окислительное фосфорилирование с синтезом АТФ, значительно снижается в стареющем кортексе млекопитающих. Искусственное снижение активности гена F1 АТФ-синтазы α с помощью РНК-интерференции достоверно увеличивало повреждение промоторов генов, репрессируемых при старении. Эффект нокаута F1 АТФ-синтазы частично смягчался антиоксидантом — витамином E (Lu et al., 2004). Такая дисфункция митохондрий снижает уровень клеточной энергии. Стареющие фибробласты человека имеют более высокое соотношение АМФ : АТФ, чем молодые клетки (Apfeld et al., 2004). Это результат не только ослабления сопряжения в митохондриях, но и активизации гликолиза, а также возраст-ассоциированного окислительного повреждения адениннуклеотидтранслоказы, являющейся частью митохондриальной поры, которая служит критическим регулятором апоптоза (Zhang, Herman, 2002; Hutter et al., 2004).

Предполагается, что организм активно распознает изменения энергетического уровня и отвечает подстройкой продолжительности жизни. АМПК (АМФ-активируемая протеинкиназа) принадлежит к консервативному семейству протеинкиназ, которые функционируют как энергетические сенсоры, координируя ответ на стрессы, понижающие энергетический уровень. АМПК представляет собой гетеротримерный комплекс, состоящий из каталитической α -субъединицы и регуляторных β - и γ -субъединиц. АМПК активируется АМФ и ингибируется АТФ по аллостерическому механизму. Таким образом, АМПК является сенсором низкого энергетического уровня и становится активной, когда соотношение АМФ : АТФ принимает высокие значения. У нематод АМФ-зависимая активация α -субъединицы ААК-2 увеличивает продолжительность жизни. Импульс высокой температуры (внешний стресс), снижающий энергетический уровень, увеличивает продолжительность жизни и уменьшает фертильность *aak-2*-зависимым образом. Гены *aak-2* и *daf-16 (FOXO)* функционируют параллельно, опосредуя продление жизни у мутантов по инсулиноподобному рецептору. Когда у грызунов наличие энергии лимитировано, функция АМПК восстанавливает нормальный уровень энергии, стимулируя поглощение глюкозы скелетными мышцами, гликолиз в сердце и пищевое поведение через регуляцию гипоталамуса (Apfeld et al., 2004). Один из механизмов возникновения АМПК-эффектов у млекопитающих — регуляция активности FOXO3 через фосфорилирование, что приводит к транскрипции генов репарации (*GADD45a*) и антиоксидантной защиты (ген альдегиддегидрогеназы *3A1*, гены металлотионеинов *Mt1/2* и *GST*), а также к активации вторичных энергетических путей клетки. Кроме того, АМПК регулирует метаболизм и рост клетки путем фосфорилирования ацетил-КоА-карбоксилазы, комплекса 2 туберозного склероза и $p27^{KIP1}$, а также транскрипцию генов — через фосфорилирование p53 (Greer et al., 2007). Известно, что в сердце крыс инсулин предотвращает активацию АМПК в ответ на снижение энергетического уровня после ишемии или аноксии. Эта схема может быть эволюционно консервативной и позволять животным оптимально использовать энергетические ресурсы в ранней зрелости, что способствует успеху размножения (Apfeld et al., 2004).

Межвидовое сравнение показало, что гены электронотранспортной цепи снижают экспрессию с возрастом у человека, мышей и дрозофил. Это вступает в кажущееся противоречие с увеличением продолжительности жизни у мутантов нематод, дефектных по аналогичным генам. Уже упоминался ген, кодирующий NADH-дегидрогеназу (*NDUFA10*), — один из генов, проявляю-

щих наибольшее снижение экспрессии с возрастом у человека. В то же время подавление его ортолога у нематод (*K04G7.4*) приводит к наибольшему эффекту продления жизни. Данное противоречие исчезает, если предположить, что снижение экспрессии генов электронотранспортной цепи в старости может быть полезным компенсаторным механизмом, продлевающим жизнь (Zahn et al., 2006).

Митохондрии играют ключевую роль в процессах старения, будучи главным источником свободных радикалов и индукторов апоптоза. Кроме того, их основная функция — синтез АТФ претерпевает возрастзависимый спад. Вместе с тем не удалось подтвердить гипотезу порочного круга, согласно которой свободные радикалы повреждают мтДНК, что приводит к еще большей их выработке. Однако, хотя мутации мтДНК не увеличивают образования активных форм кислорода, они вызывают снижение биоэнергетической способности, что подрывает такие энергозависимые клеточные процессы, как репарация ДНК, протеолитическая активность и детоксификация ксенобиотиков.

4.2. Воспаление и инфекции

Среди стрессов, влияющих на продолжительность жизни, можно выделить воздействие инфекционных микроорганизмов. Нормальные иммунные реакции, врожденные и приобретенные, позволяют относительно быстро справляться с большинством инфекций. Однако иммунитет с возрастом теряет эффективность, что повышает вероятность гибели от инфекционных заболеваний или рака. Как вторжение микроорганизмов, так и клеточное старение способны вызывать воспалительные реакции, пытающиеся справиться с повреждением.

Микроорганизмы играют важную роль в детерминации продолжительности жизни. Например, основная причина гибели нематод — размножение в глотке и кишечнике животных полученных с пищей бактерий. Подавление пролиферации бактерий продлевает жизнь нематод на 30—40 % (Garigan et al., 2002). Кишечник человека колонизирован 500 видами бактерий, а взрослый человек несет в 10 раз больше клеток микроорганизмов, чем своих собственных. Гибель от таких инфекций, как пневмония, грипп, нефрит и сепсис, занимает четвертое место среди главных причин смерти у людей свыше 65 лет (Тодоров, Тодоров, 2003; Troemel et al., 2006).

Однако есть и обратная сторона медали. Бактерии могут положительно влиять на приспособленность и продолжительность жизни хозяина. Инфузория *Paramecium*, культивируемая в стерильных условиях, стареет быстрее, что можно оценить по накоплению фрагментированной ДНК. Для развития *Caenorhabditis elegans* и москитов стерильные условия вредны, но для увеличения продолжительности их жизни полезны. Дрозофилы в стерильных условиях развиваются более медленно. Особи дрозофил, зараженные вирулентными линиями *Wolbachia*, живут мало, тогда как при заражении неvirulentными линиями мухи живут дольше, чем контрольные. Термиты с дисбактериозом живут не долго, что можно объяснить их образом питания. У млекопитающих умеренное стимулирование иммунной системы способствует долгожительству и препятствует аутоиммунным реакциям (Brummel et al., 2004).

Иммунная система имеет несколько важных функций. Она должна контролировать и элиминировать чужеродные организмы и вещества, опознавая и при этом сберегая от разрушения молекулы (клетки и ткани) от самой себя. У многих людей старческого возраста иммуностарение характеризуется снижением устойчивости к инфекционным заболеваниям и защиты против рака, а также появлением неспособности распознавать свои структуры (аутоиммунные патологии). Различные иммунные ответы по-разному меняются с возрастом. У человека тимус — один из наиболее важных иммунных органов. Он играет роль в селекции и созревании Т-клеток и в выработке пептидных гормонов (цитокинов). Тимус достигает пика своих размеров и функции при половом созревании, а затем involюирует. Его involюцию можно интерпретировать с точки зрения баланса между утратой пользы от тимуса в зрелости (поскольку репертуар Т-клеток был утвержден) и затратами на поддержание этого органа. Другие функции иммунитета, например активность нескольких типов лимфоцитов (естественных киллеров, дендритных клеток, макрофагов) и системы комплемента, хорошо представлены даже у здоровых столетних индивидуумов (Weinert, Timiras, 2003).

Тем не менее возрастзависимый спад иммунитета можно считать доказанным. Старые нематоды и мухи более чувствительны к инфекции, и их ткани не препятствуют размножению бактерий. Присутствие в среде бактерий в 1-ю неделю жизни имаго увеличивает продолжительность жизни на 30—35 %, тогда как в дальней-шем они приводят к ее укорочению (Brummel et al., 2004). Другой пример — пищеварительная система человека, испытывающая, подобно другим органам, негативное влияние старения, в процессе которого меняется ее морфология и функция, включая сниже-242

ние иммунитета (Englander, 2005). Возрастзависимые изменения иммунитета проявляются в нарушении функционирования клеток иммунной системы и приводят к увеличению степени подверженности пожилых индивидуумов инфекциям и раку (Martin, Grotwiel, 2006). В свою очередь стареющие клетки путем индукции или стимулирования хронического локального воспаления могут вносить вклад в возрастзависимую патологию, нарушая целостность и функции тканей (Papazoglu, Mills, 2007). Действительно, остановка клеточной пролиферации (клеточное старение) сопровождается секрецией в ткань протеаз и цитокинов воспаления (Rodwell et al., 2004). Например, стареющие фибробласты кожи человека сверхэкспрессируют такие гены воспаления, как *CD36* (предполагаемый ген переключения G_0/G_1 у лимфоцитов), хемокин (С-Х-С мотив) лиганд 6, ген устойчивости к миксовирусу (*MXI*) (Yoon et al., 2004). Состояние клеточного старения по спектру экспрессированных генов напоминает воспалительный процесс при заживлении раны (Yoon et al., 2004).

Существенное возрастзависимое увеличение активности генов иммунитета наблюдается у мышей, червей и мух (Brummel et al., 2004). У стареющих мух, или у подвергшихся стрессу в результате воздействия 100%-ной концентрации кислорода, сверхэкспрессированы гены врожденного иммунного ответа: гены мечниковина, дефензина, аттакина А и *PGRP-LC*. В то время как старение характеризуется существенной индукцией генов антимикробных пептидов (в 5—100 раз), окислительный стресс выявил достоверное, но менее выраженное (2—5 раз) увеличение их активности (Landis et al., 2004). С возрастом дрософил увеличивается экспрессия ингибиторов сериновых протеаз и антибактериальных белков; среди последних — белки, распознающие бактериальные пептидогликаны, какропины, аттакины, дефензин и *Relish* (Pletcher et al., 2002). Все эти изменения могут отражать возрастзависимое увеличение груза патогенов, вызванное снижением функционирования иммунной системы или нарушением других защитных барьеров, таких как выстилка кишечника или трахеол у беспозвоночных. Действительно, старые дрософилы менее способны подавлять рост *Escherichia coli*. Возможна и прямая стимуляция механизмов иммунного ответа активными формами кислорода и белками теплового шока, наподобие NF-κB-пути у млекопитающих (Landis et al., 2004). Тем более что у дрософилы NF-κB-подобный активатор транскрипции *Dorsal*, подавляющий ген старения *methuselah*, наравне со стрессоустойчивостью контролирует и врожденный иммунитет (Kim et al., 2006), а некоторые гены иммунного ответа, регулируемые транскрипционными факторами NF-κB/*Relish/Dorsal*, значительно индуцируются при старении дрософил (Landis et al., 2003).

Исследование экспрессии генов методом ДНК-чипов в гиппокампе стареющих млекопитающих продемонстрировало активацию генов, ответственных за воспаление (Blalock et al., 2003). Анализ экспрессии генов стареющего мозга мышей выявил изменения, четверть которых соответствуют генам воспалительного ответа. Активируются гены фактора миграции микроглии и макрофагов (*Mps1*) и рецептора, опосредующего механизм активации микроглии *Cd40l*. Также индуцируются гены *Lyzc* и *B2m* (кодирующие лизоцим С и \bullet 2-микроглобулин) — маркеры воспаления в центральной нервной системе человека. Наблюдается индукция генов каскада системы комплемента (C4, C1qa, C1qb и C1qc), являющейся частью гуморальной иммунной системы воспаления и цитолиза (Lee C. et al., 2000). Сверхэкспрессия генов компонента системы комплемента C4, как оказалось, является универсальным молекулярным маркером стареющего мозга (Carter et al., 2005). Анализ экспрессии генов клеток печени мышей показал, что старение сопровождается сверхактивацией факторов воспаления — лизоцима, участвующего в активации макрофагов и \bullet -цепи компонента комплемента C1q (белка, экспрессирующегося в макрофагах). Макрофаги принимают участие во многих заболеваниях печени, включая цирроз, гепатит, сепсис и повреждение эндотоксинами (Cao et al., 2001). В скелетных мышцах обезьян 8 % генов, меняющих экспрессию при старении, связаны с воспалительной/иммунной функцией, в том числе гены хитотриозидазы, секретлируемой активированными макрофагами, гены В-клеток (гены лиганда CD40, иммуноглобулина М, фактора созревания В-клеток), гены белков воспаления (гранулина, фактора воспаления при аллотрансплантации-1, нейтрофин-активирующего пептида 78, лейкотриен C4-синтазы) (Каюо et al., 2001). При старении фронтального кортекса человека также активируются гены воспалительного и иммунного ответов, например фактор некроза опухолей TNF- β (Lu et al., 2004). Часть генов, изменяющих экспрессию с возрастом в коре и в центральной части почки человека, соответствует иммунному ответу (Rodwell et al., 2004).

В свою очередь ограничение калорийности питания подавляет гены воспаления, отсрочивая начало аутоиммунных и воспалительных заболеваний у мышей, однако при этом снижается активность врожденного иммунитета (Cao et al., 2001; Lee et al., 2002). Как и ограниченная диета, дополнительное потребление антиоксидантов подавляет старение иммунной системы. При этом усиливается фагоцитирующая активность макрофагов и нейтрофилов, активность естественных киллеров, пролиферация лимфоидных клеток в ответ на стимуляцию митогенами (Martin, Grotewiel, 2006).

Генетическая конституция также играет определенную роль в процессе старения (Brummel et al., 2004). У нематод долгоживущие мутанты по инсулиновому сигналингу являются более устойчивыми к инфекции и характеризуются экспрессией антибактериальных пептидов (Brummel et al., 2004; Golden, Melov, 2004; McElwee et al., 2004). Антибактериальные гены активируются транскрипционным фактором DAF-16, контролируемым инсулиновым сигналингом (O'Neill, 2004; Baumeister et al., 2006). Наравне с DAF-2/DAF-16-инсулиновым сигналингом, кишечный врожденный иммунитет у *Caenorhabditis elegans* контролируется РМК-1 (p38 митоз-активированной протеинкиназой). Потеря функции гена этого белка усиливает чувствительность к патогенам, тогда как потеря функции *daf-2*, напротив, усиливает устойчивость к ним. Хотя устойчивость к патогенам и долгожительность мутантов *daf-2* требует активности РМК-1, анализ ДНК-чипов показал, что гены, активируемые РМК-1 и DAF-16, практически не перекрываются. РМК-1 контролирует экспрессию таких антимикробных генов, как гены лектинов С-типа, ShK-токсинов и CUB-подобные гены. РМК-1 позитивно регулирует как базальную, так и индуцируемую инфекцией экспрессию генов ответа на патогены. DAF-16, напротив, даже подавляет транскрипцию ряда генов врожденного иммунитета (CUB-подобных генов) (Troemel et al., 2006).

Аполипопротеиноподобный белок вителлогенин является одним из немногих известных факторов, обуславливающих долгожительность маток общественных насекомых по сравнению с рабочими особями. Помимо антиоксидантной активности и половой функции этот белок обладает иммуномодулирующей активностью (Atzmon et al., 2006). Среди генов соматического поддержания у маток также сверхэкспрессированы гены гомологов ингибитора сериновых протеиназ (обуславливающих иммунный ответ через защиту от микробных протеиназ и от коагуляции гемолимфы) и ген гомолога гистона H2A (играющего защитную роль в структуре хроматина и в иммунном ответе у многих видов животных) (Graff et al., 2007).

У мышей инсулин/IGF-1-путь регулирует продолжительность жизни также путем изменения экспрессии большого числа генов, в том числе генов стресс-ответа и антимикробных генов (Cheng et al., 2005). Напротив, мыши, нокаутные по каталитической субъединице ДНК протеинкиназного комплекса или по Ku70-Ku80-компонентам, получают иммунодефицит и ускоренное старение. Это можно объяснить с позиции участия ДНК-протеинкиназы в репарации ДНК и поддержании длины теломер (Espejel et al., 2004; McColl et al., 2005). Как уже упоминалось, у мышей выключение гена *Terc* ведет к постепенному укорочению теломер в поколениях

вплоть до критического укорочения в третьей генерации, что обуславливает развитие прогероидного синдрома, сопровождаемого среди прочих симптомов иммуностарением (Franco et al., 2005).

Поскольку активность стволовых клеток необходима для восполнения потерь дифференцированных клеток в пролиферирующих тканях, их старение приводит к нарушению тканевого гомеостаза и старению всего организма. Эта гипотеза подтверждается тем фактом, что функция врожденного иммунитета, зависящая от активности кроветворных стволовых клеток и клеток-предшественниц, снижается у стареющих индивидуумов и что стареющие кроветворные стволовые клетки проявляют сниженную способность к дифференцировке в В-клеточный клон (Geiger et al., 2005). Таким образом, стресс-индуцированное клеточное старение может быть одной из главных причин иммуностарения.

Подводя итог, следует отметить, что эффективность иммунитета снижается с возрастом, а это делает пожилой организм более восприимчивым к различным инфекциям. В то же время сами по себе возрастзависимое накопление спонтанных повреждений и старение клеток являются причинами воспаления в большинстве тканей.

4.3. Ограничение диеты

Вероятнее всего, старение возникло у одноклеточных организмов как адаптация к стационарной фазе роста при недостатке питательных ресурсов. Действительно, процессы утилизации энергии и метаболизма глюкозы в клетке изменяются при старении посредством регуляторных механизмов, принимающих участие в глобальном ответе на глюкозное голодание, на оксидативный стресс, а также играющих роль в стационарной фазе выживания. Кроме того, при «старении» бактериальных культур в условиях недостатка «топлива» выявляются элементарные свойства клеток стареющего организма: гипометаболизм, повышенное запасание энергии, оксидативный стресс, экспрессия белков теплового шока и дефектная репарация ДНК, приводящая к мутагенезу (Heininger, 2002). Чрезмерное снижение потребления пищи (голодание) укорачивает жизнь. Умеренное ограничение диеты, напротив, увеличивает продолжительность жизни у многих видов организмов (Partridge et al., 2005a). По-видимому, нервная система животных, воспринимая извне сигнал о недостатке пищи, запускает адаптационную программу стресс-ответа, приводящую

к повышению экономичности метаболизма и стрессоустойчивости, что обуславливает долгожительство. Ключевую роль в восприятии таких сигналов играет обоняние.

Обоняние — древняя сенсорная система, представленная у всех организмов от бактерий до человека (Libert et al., 2007). Нематода способна определять запах и вкус многих растворимых и летучих компонентов. Снижение сенсорного восприятия обонятельных стимулов увеличивает продолжительность жизни на 50 % (Guarente, Kenyon, 2000). *Caenorhabditis elegans* воспринимает внешнесредовые сигналы о наличии пищи через ресничные сенсорные нейроны, локализованные преимущественно в сенсорных органах на голове (амфиды) и хвосте (фазмиды). Мутации, вызывающие дефекты сенсорных ресничек, включая их отсутствие (*daf-19*), делецию среднего и дистального сегментов (*che-2*, *che-13*, *osm-1*, *osm-5* и *osm-6*), а также наличие редуцированных сегментов (*che-3*, *che-11* и *daf-10*), увеличивают продолжительность жизни. Мутация гена *tax-4* α -субъединицы канала, связанного с циклическими нуклеотидами, не влияет на структуру сенсорных ресничек, однако она также увеличивает продолжительность жизни. По-видимому, данный ген задействован непосредственно в сенсорной трансдукции (Apfeld, Kenyon, 1999). Поскольку двойные мутанты транскрипционного фактора *daf-16* и любого из пяти исследованных генов (*osm-3*, *osm-5*, *daf-10*, *daf-19* и *tax-4*) характеризуются заметным снижением долгожительства, хотя полной отмены продления жизни не происходит, *daf-16* может функционировать ниже сенсорного сигнала, регулирующего продолжительность жизни (Apfeld, Kenyon, 1999). Напротив, мутанты по термотаксису (*ttx-1*) имели нормальную продолжительность жизни. Сигнал, влияющий на продолжительность жизни, по-видимому, является субстанцией, которую животные могут обонять или ощущать на вкус. Это может быть *dauer*-феромон, сигнализирующий о перенаселенности, а также вещества, отражающие наличие пищи. Изученные мутации не оказывают влияния на пищеводобывающее поведение, т. е. эффект нельзя объяснить снижением калорийности питания. Скорость развития и размеры тела также не изменялись (Apfeld, Kenyon, 1999). Способность размножаться не меняется, иногда такие животные дают даже больше потомства (Guarente, Kenyon, 2000).

В ответ на стимулы из окружающей среды, такие как компоненты пищи или феромоны, сенсорные нейроны запускают секрецию инсулин/IGF-1-подобного гормона, связывающегося с рецептором DAF-2 и ускоряющего процессы роста и старения. Когда сенсорная перцепция не стимулируется, гормон не секретруется и уровень активности DAF-2 снижается (Guarente, Kenyon,

2000). У нематоды три взаимодействующих с инсулиновым сигналингом гена — *pep-2* (ген транспортера дипептидов), *skn-1* (ген транскрипционного фактора) и *daf-7* (ген гомолога трансформирующего фактора •) — экспрессируются в сенсорных нейронах ASI — в паре хемосенсорных нейронов, вовлеченных в контроль за входом в стадию dauer, в целом контролируруемую инсулиновым сигналингом. Хотя экспрессия *daf-7* ограничивается двумя ASI-нейронами, *pep-2* и *skn-1* экспрессируются также и в кишечнике (Baumeister et al., 2006).

Удаление медианных нейросекреторных клеток в мозгу дрозофилы, синтезирующих инсулиноподобные пептиды, приводит к увеличению медианной и максимальной продолжительности жизни и устойчивости к оксидативному стрессу и голоданию. Одновременно наблюдается повышение голодного уровня глюкозы в гемолимфе взрослых животных, наподобие того, как это происходит при диабете у млекопитающих. Такие животные характеризуются повышенным накоплением липидов и углеводов, сниженной плодовитостью и пониженной переносимостью жары и холода (Broughton et al., 2005). Воздействие на дрозофил выделенными из пищи (дрожжевой пасты) одорантами модулирует продолжительность жизни и отменяет эффекты продления жизни ограничением питания. Мутация в обонятельном рецепторе *Or83b* приводит к сильным обонятельным дефектам, изменяя метаболизм, усиливая стрессоустойчивость и продлевая жизнь. Одоранты дрожжей не влияют на продолжительность жизни мух, если они находятся на полном питании (Libert et al., 2007).

У млекопитающих сигналы о текущем состоянии питания и о составе тела, такие как лептин и резистин, интегрируются в гипоталамусе, модулирующем потребление пищи, эндокринную функцию и гомеостаз метаболитов. При этом может подавляться выработка IGF-1 и инсулина (Tatar et al., 2003).

В 1911 г. профессор Санкт-Петербургского университета Е. А. Шульц обнаружил, что недоедавшие нематоды жили существенно больше своих собратьев, получавших обычный корм (цит. по: Анисимов, 2003). В первой половине XX века Раймондом Пирлом, обнаружившим эффект ограничения калорийности питания у домашних животных, была предложена теория «интенсивности жизнедеятельности» (Pearl, 1928). Он предположил, что метаболизм определяет продолжительность жизни: чем ниже уровень метаболизма, тем дольше организм живет (Shaw, 2004). В 1935 году Клив МакКей открыл, что ограничение калорийности питания, не приводящее к голоданию, продлевает жизнь крыс (McCay et al., 1939). Для достижения данного эффекта калорийность снижают до 60—70 % от обычной для данного вида живот-

ных (Guarente, Kenyon, 2000). С тех пор подобные результаты были получены на всех исследованных с данной целью видах (Bitterman et al., 2003). Увеличение продолжительности жизни при ограниченное диете достигает 50 % у различных организмов: приматов, собак, грызунов, рыб, нематод, дрозофил, дафний, пауков и дрожжей. Некоторые данные свидетельствует об оздоравливающим эффекте ограничения диеты у человека (Guarente, Kenyon, 2000; Mair et al., 2005; Baumeister et al., 2006).

У млекопитающих ограничение калорийности пищи может не только значительно увеличивать продолжительность жизни, но и задерживает начало множества возрастзависимых заболеваний, включая рак, атеросклероз и диабет (Cohen et al., 2004). Снижение калорийности замедляет темпы старения, задерживает возрастзависимое снижение психомоторной функции и пространственной памяти, а также потерю дендритных отростков в мозгу (Lee C. et al., 2000). Ограничение уровня потребления калорий в скелетных мышцах грызунов замедляет некоторые возрастзависимые физиологические и биохимические изменения, включая стационарный уровень оксидативного повреждения липидов, ДНК и белков (Kayo et al., 2001). В жировом теле дрозофилы также замедляется возрастзависимое образование маркера перекисного окисления липидов — 4-гидрокси-2-ноненала (Zheng et al., 2005b). Снижение калорийности пищи задерживает накопление мутаций в мтДНК и редуцирует опосредованный митохондриями апоптоз (Kujoth et al., 2005). В целом с возрастом темп белкового обмена снижается, что может приводить к накоплению поврежденных белков в стареющей клетке, однако у животных, находящихся на низкокалорийной диете, белковый обмен поддерживается на высоком уровне (Tavernarakis, Driscoll, 2002). Кроме того, в этих условиях подавляется старение иммунной системы: усиливается фагоцитирующая активность макрофагов и нейтрофилов, повышается активность естественных киллеров, возрастает пролиферация лимфоидных клеток в ответ на стимуляцию митогенами (Martin, Grotewiel, 2006). Все эти изменения тесно связаны с перестройкой паттерна экспрессии генов.

У нематод ограниченная диета запускает скоординированный транскрипционный ответ, ингибируя активность множества генов, укорачивающих продолжительность жизни, например генов метилирования макромолекул (Hansen et al., 2005). У самок дрозофилы ограничение калорийности диеты задерживает начало старческой смертности и увеличивает среднюю и максимальную продолжительность жизни примерно в 2 раза, что сопровождается замедлением развития нормальных возрастзависимых изменений на транскрипционном уровне, снижением активности генов кле-

точного роста, метаболизма и репродукции, белков репарации и репликации ДНК, генов контроля клеточного цикла, конденсации и сегрегации хромосом, а также гена старения *methuselah* (Pletcher et al., 2002). У мышей увеличение экспрессии маркеров старения клетки — *p16^{INK4A}* и *ARF* в почках, яичниках и сердце ослабляется снижением калорийности пищи (Krishnamurthy et al., 2004). Таким образом, в то время как старение связано со специфическими изменениями транскрипции генов во многих тканях, ограничение потребления калорий задерживает большинство из этих возрастзависимых изменений.

Ограничение калорийности питания млекопитающих в зрелом возрасте приводит к активации генов цитоскелета и к снижению экспрессии генов митохондриальной биоэнергетики (Kayo et al., 2001). Кроме того, ограничение количества потребляемых калорий подавляет гены воспаления, отсрочивая начало аутоиммунных и воспалительных заболеваний у мышей; при этом снижается экспрессия некоторых шаперонов и стимулируется детоксицирующая функция печени (Cao et al., 2001). В общей сложности, старение приводит к изменению экспрессии 712 генов в скелетных мышцах мышей. Ограничение калорийности пищи полностью или частично отменяет 87 % этих изменений. В то же время ограничение диеты подавляет p53-зависимый апоптоз стареющих постмитотических клеток (Edwards et al., 2007). Снижение калорийности в среднем возрасте ингибирует 19 % возрастзависимых изменений экспрессии генов сердечной мышцы. Оно приводит к сохранению метаболизма жирных кислот, к снижению эндогенного повреждения ДНК (8-гидроксидеоксигуанозина) и белка (дитиозинового перекрестных сшивок), к подавлению активности врожденного иммунитета, модуляции апоптоза, реорганизации цитоскелета (Lee et al., 2002).

Когда перспективы оставить потомство малы, а вероятность выживания потомства низка, долговременный репродуктивный успех можно гарантировать, лишь снизив репродуктивный выход (Partridge et al., 2005a). Поэтому ответ на ограничение калорийности питания имеет явное селективное значение, он позволяет животным отсрочить репродукцию до тех пор, пока пища не станет доступной. Однако, если качество питания нормализуется, такие животные смогут дать потомство даже тогда, когда хорошо питающийся контроль уже вступил в пострепродуктивный период (Guarente, Kenyon, 2000). Существование «программы продолжительности жизни» в условиях голодания позволяет организму превысить его нормальную продолжительность жизни путем вступления в «режим поддержания», связанный с такими изменениями, как гипометаболизм, высокая стрессоустойчивость и низкая пло-



Рис. 8. Связь ограничения калорий, метаболизма и продолжительности жизни (по: Walker et al., 2005).

довитость либо ее отсутствие. Описанные в предыдущей главе мутации долгожительства влияют на эту программу таким образом, что особи переходят в режим поддержания независимо от внешнесредовых условий (Longo et al., 2005).

Механизм такого способа удлинения жизни окончательно не выяснен. Одна из гипотез предполагает замедление метаболизма (рис. 8) и, как следствие, снижение образования токсичных активных форм кислорода, что приводит к замедлению старения (Guarente, Kenyon, 2000). Таким образом, эта точка зрения развивает теорию «интенсивности жизнедеятельности» Пирла.

Действительно, приматы, в течение нескольких лет содержащиеся на низкокалорийной диете, характеризовались снижением температуры тела на 0.5 °С. Кратковременное (в течение месяца) уменьшение калорийности питания привело к еще большему снижению температуры — на 1 °С, что свидетельствует о переходе к энергосберегающему режиму метаболизма (Lane et al., 1996). Однако, хотя снижение калорийности пищи увеличивает продолжительность жизни дрозофил, существенных отличий по сравнению с контрольными животными в скорости метаболизма или в уровне

митохондриальных свободных радикалов не наблюдали (Miwa et al., 2004; Rand et al., 2006). У *Caenorhabditis elegans* измерение уровня метаболизма (потребление кислорода и выделение тепла) не показало прямой взаимосвязи между снижением метаболизма и образованием свободных радикалов. Так, мутации *eat-2* в никотиновом ацетилхолиновом рецепторе приводят к появлению признаков ограничения калорийности, но не снижают метаболизма (Baumeister et al., 2006). Мутанты *eat-2* характеризуются даже повышенным метаболизмом по сравнению с диким типом (Walker et al., 2005). Летучие мыши имеют уровень метаболизма, подобный грызунам, хотя живут в 10 раз дольше. Мутации в отдельных генах у дрожжей, нематод, дрозофил и мышей также могут увеличивать продолжительность жизни, не снижая уровня метаболизма. Таким образом, уровень метаболизма может объяснять индивидуальные особенности старения особи или вида, но его влияние легко преодолевается эволюционной дивергенцией (грызуны и летучие мыши) либо даже мутацией в одном гене (Guarente, Kenyon, 2000).

Согласно старой парадигме, ограничение диеты часто рассматривают как ограничение калорийности, а не количества определенных питательных веществ. У грызунов такое предположение обосновывается следующими наблюдениями (Mair et al., 2005): ограничение поступления калорий без снижения поступления белков приводит к долгожительству, при этом дальнейшего увеличения продолжительности жизни не наблюдается у крыс, питающихся одинаковой по калорийности пищей, в которой мало либо жиров, либо минеральных компонентов.

Однако у дрозофилы продление жизни при ограничении диеты не сопровождается снижением поступления калорий. Мухи, питающиеся средой с одинаковой калорийностью, но с разным компонентным составом, заметно различаются по продолжительности жизни. Хотя снижение концентрации дрожжей или сахара в питательном среде снижает смертность и продлевает жизнь, дрожжи обуславливают гораздо больший эффект, чем сахар. Таким образом, у дрозофилы снижение уровня потребления липидов и белков дает больший эффект, чем снижение потребления сахара. Кроме того, отсюда следует, что количество потребленных калорий не является ключевым фактором снижения интенсивности смертности у данного вида (Mair et al., 2005). Крысы, получающие обедненную белком низкокалорийную диету, также характеризуются долгожительством. Более того, снижение содержания одной только аминокислоты метионина увеличивает продолжительность жизни как мышей, так и крыс (Mair et al., 2005).

Различное влияние компонентов пищи может быть связано с разными путями сенсирования питательных веществ, основан-

ными на гомологах **SIR2** и **RPD3**, а также на инсулин/IGF- или TOR-сигналинге (Mair et al., 2005), приводящих к индукции транскрипционных факторов стрессоустойчивости — **Msn2/4** у дрожжей и **DAF-16/FOXO** у многоклеточных животных (Fabrizio et al., 2005a). Таким образом, увеличение продолжительности жизни путем ограничения количества потребляемой пищи — следствие активного клеточного ответа на низкоинтенсивный стресс, а не механического снижения уровня метаболизма и свободных радикалов (Bitterman et al., 2003).

Рассмотрим основные молекулярно-генетические механизмы влияния ограниченной диеты на продолжительность жизни.

Ограничение калорийности питания увеличивает как хронологическую, так и репликативную продолжительность жизни дрожжей (Fabrizio et al., 2005a). Клетки дрожжей, растущие на глюкозе, вступают в постдиауксическую фазу и поддерживают высокий темп метаболизма большую часть жизни. Инкубация в воде, напротив, вызывает вступление в долгоживущую стационарную фазу с низким метаболизмом. Этот эффект достигается простым снижением уровня глюкозы в среде. Переключение с фазы роста на постдиауксическую либо на стационарную фазу сопровождается индукцией многих генов стрессоустойчивости (Fabrizio et al., 2005b). Ограничение количества калорий приводит к активизации NAD^+ -зависимой ацетилазы **SIR2**. При этом дрожжевые клетки переключаются с гликолиза на аэробную утилизацию глюкозы в митохондриях и увеличивают потребление кислорода (Balaban et al., 2005). Как известно из гл. 3, **SIR2** сенсорирует энергетическое и окислительное состояние клетки благодаря NAD^+ -зависимости. NAD^+ ингибирует **SIR2**. Таким способом обилие пищи выключает **SIR2**-зависимый путь стрессоустойчивости (Bitterman et al., 2003).

Резвератрол (малая молекула, содержащаяся в красном вине) замедляет старение дрожжей и является потенциальным миметиком ограничения калорийности пищи. Он служит также активатором сиртуинов, что может быть механизмом его действия как фактора антистарения (Kaeberlein et al., 2005c). Соединения, активирующие сиртуины, замедляют старение сходным образом с тем, как это происходит при ограничении калорийности пищи (Wood et al., 2004). Однако есть вероятность, что резвератрол копирует сверхэкспрессию сиртуинов, но его эффект не обусловлен прямым действием на них (Valenzano et al., 2006). Еще одна ацетилаза, **RPD3**, определяет взаимосвязь продолжительности жизни и ограничения калорийности — снижение ее активности продлевает жизнь (Rogina, Helfand, 2004).

У дрожжей существует также **SIR2**-независимый путь ответа на низкокалорийное питание (Kaeberlein et al., 2004c). Это TOR- и

SCH9-механизмы. Анализ **564** делеционных мутантов дрожжей выявил **10** генных делеций, увеличивающих репликативную продолжительность жизни. Шесть из них соответствует генам, кодирующим компоненты ответа на присутствие питательных веществ и прежде всего **TOR**- и **SCH9**-сигналинга. Ограничение числа калорий в случае *tor1Δ*- и *sch9Δ*-клеток далее не увеличивает продолжительности их жизни, что говорит об участии данных видов сигналинга в ответе на уменьшение количества пищи (Kaeberlein et al., 2005c). В клетках дрожжей выключение генов *sch9* (гена серин-треониновой протеинкиназы) или *cyr1* (гена аденилатциклазы, необходимой для стимулирования цАМФ-зависимой протеинкиназы) приводит к 3- и 2-кратному увеличению продолжительности жизни соответственно, а также к устойчивости к стрессам. Оба белка контролируют сигналинг глюкозы и других питательных веществ, стимулируют рост и гликолиз, накопление гликогена и глюконеогенез (Bitterman et al., 2003). **SIR2** блокирует долгожительство, индуцируемое мутациями в гене *sch9* или в генах компонентов **Ras/Cyr1/PKA**-пути (Guarente, Kenyon, 2000; Fabrizio et al., 2005). Протеинкиназа **A (PKA)**, отвечающая на наличие питательных веществ, также модулирует репликативное старение дрожжей. Мутации **PKA** увеличивают репликативную продолжительность жизни (Kaeberlein et al., 2005c).

TOR-белки высоко консервативны от дрожжей до человека и в ответ на наличие питательных веществ регулируют многие клеточные процессы: размер клетки, автофагию, биогенез рибосом и трансляцию, метаболизм углеводов и аминокислот, стресс-ответ и организацию актинового цитоскелета (рис. 9). У дрожжей два **TOR**-белка (**TOR1** и **TOR2**). Делеция *Tor2* летальна. Делеция *Tor1* увеличивает среднюю и максимальную репликативную продолжительность жизни на **20 %**. Известны следующие нижележащие мишени **TOR**: **Ure2**, регулирующий активность азот-респонсивного транскрипционного фактора **Gln3**, и **Rom2**, предполагаемый активатор протеинкиназы **C**. Делеция ряда генов, трансктивируемых **TOR**, увеличивает продолжительность жизни: это ген *YBR238C* с невыясненной функцией, а также гены *RPL31A* и *RPL6B*, кодирующие компоненты большой субъединицы рибосомы (Kaeberlein et al., 2005a, 2005b). **TOR**-сигналинг подавляет автофагию, необходимую для продления жизни дрожжей и нематод и для противодействия старению у млекопитающих (Kaeberlein et al., 2007). Удаление аспарагина или глутамина из питательной среды, так же как фармакологическое ингибирование **TOR**-сигналинга, значительно увеличивает хронологическую продолжительность жизни дрожжей. В результате клетки накапливают углеводы и становятся более стрессоустойчивыми, что кор-



Рис. 9. Современные представления о роли ограничения диеты в продлении жизни.

релирует с перемещением транскрипционного фактора *Msn2* в ядро (Powers et al., 2006). TOR действует выше и параллельно с PKA, тогда как SCH9 выполняет свои функции параллельно как PKA, так и с TOR. Киназы TOR, PKA и SCH9 регулируют экспрессию общих нижележащих мишеней, включая белки рибосом — *Rpl31a* и *Rpl6b*. Таким образом, ограничение калорийности питания у дрожжей увеличивает продолжительность жизни через сеть сигналинга от питательных веществ до рибосом (Kaeberlein et al., 2005a).

Еще одна мутация дрожжей, происходящая в гене *hxx2*, кодирующем киназу, фосфорилирующую поступающую в клетку глюкозу (до глюкозо-6-фосфата, субстрата гликолиза), существенно увеличивает репликативную продолжительность жизни (Bitterman et al., 2003). Делеция этого гена снижает доступность глюкозы для гликолиза (Kaeberlein et al., 2004). Кодированная этим геном киназа также уменьшает активность генов дыхания, глюконеогенеза и глиоксилатного цикла в процессе так называемой «глюкозной репрессии» (Bitterman et al., 2003).

Доступность пищи влияет на продолжительность жизни нематод посредством двух механизмов, взаимодействующих с *daf-2* (геном инсулинового сигналинга) (Gami, Wolkow, 2006). У *Caenorhabditis elegans* ацетилаза *sir-2.1* (гомолог *sir2* дрожжей) служит главным регулятором ответа клетки на ограничение калорийности пищи, модулируя активность DAF-16 и стимулируя долгожительство (Gami, Wolkow, 2006). Присутствие дополнительных копий гена *sir-2.1* или веществ-агонистов данного фермента, например

резвератрола, приводит к долгожительству червей (Cohen et al., 2004).

Второй механизм — TOR-сигналинг является центральным регулятором роста клеток в ответ на присутствие питательных веществ. Он контролирует иницирование трансляции и синтез на рибосомах, а также деградацию белков и автофагию как часть механизма, сенсорирующего аминокислоты. Частично активность TOR опосредуется рибосомальной киназой *S6* (Baumeister et al., 2006). У нематод РНК-интерференция гена *iff-1*, гомолога фактора инициации трансляции eIF-5A, увеличивает продолжительность жизни (Hamilton et al., 2006). Следовательно, у нематод, как и у дрожжей, подавление тотального биосинтеза белка в условиях стресса позволяет экономить ресурсы для обеспечения стрессоустойчивости и долгожительства.

Мутация в *let-363* (гомологе *tor* у нематод) имеет результатом задержку развития *dauer*. Снижение активности гена *let-363* под действием РНК-интерференции увеличивает продолжительность жизни, при этом не снижая активности митохондрий (Baumeister et al., 2006). LET-363 вместе с RAPTOR (DAF-15), ассоциированным с регуляторным белком TOR, взаимодействуют при формировании стадии *dauer*. В TOR-сигналинге задействованы инсулинзависимые и независимые механизмы (Baumeister et al., 2006). Ген *daf-15*, кодирующий RAPTOR-подобную субъединицу метаболического регулятора TOR, является нижележащей мишенью DAF-16 при индукции стадии *dauer*. Мутация в *daf-15* вызывает необратимое *dauer*-подобное состояние личинки. Однако слабые аллели *daf-15* приводят к увеличению продолжительности жизни без остановки развития. Экспрессия *daf-15* значительно снижается у долгоживущих мутантов *daf-2*. Таким образом, TOR и DAF-2/IGF могут взаимодействовать при осуществлении контроля за продолжительностью жизни. По-видимому, TOR функционирует ниже или параллельно DAF-16 (Vellai et al., 2003; Walker et al., 2005; Gami, Wolkow, 2006). Как у личинки *dauer*, так и у мутантов *daf-2* снижена экспрессия генов *nhx-2* и *pep-2*, связанных с поглощением пищи (McElwee et al., 2004). Гомеостаз аминокислот, за который отвечает TOR, вероятно, контролируется активностью транспортеров аминокислот и кишечным транспортером дипептидов PEP-2 (гомолог hPEPT1 человека). Экспрессия генов DAF-15 и PEP-2 негативно регулируется инсулиновым сигналингом. Делеция *pep-2* усиливает фенотипическое проявление *let-363(RNAi)*. Ген *pep-2*, возможно, действует выше TOR. Кроме того, в то время как мутация в *pep-2* сама по себе не влияет на продолжительность жизни, она значительно усиливает эффект увеличения продолжительности жизни у мутанта *daf-2(e1370)*,

при этом повышая устойчивость к оксидативному стрессу, вызванному паракватом. Это подтверждает мнение, согласно которому TOR действует или ниже инсулинового сигналинга, или параллельно ему, передавая сигнал о наличии питательных веществ на инсулиновый путь (Baumeister et al., 2006).

Благодаря подавлению TOR и активации DAF-16/FOXO нематоды переключаются на альтернативные энергетические механизмы (рис. 9). Хотя ограничение энерготрат увеличивает продолжительность жизни многих организмов, однако остается вопрос: как продолжительность жизни связана с энергетическим уровнем? Показано, что сенсором, связывающим продолжительность жизни с информацией об энергетическом уровне и с инсулиновым сигналингом, может является ААК-2 — α -субъединица протеинкиназы АМПК (Apfeld et al., 2004). Средовые стрессы, увеличивающие соотношение АМФ : АТФ, продлевают жизнь через активацию *aak-2*. У мутантов с дефектом гена *aak-2* продолжительность жизни снижается на 12 % и ускоряется накопление с возрастом липофусцина, при этом они нормально двигаются и питаются. Трансгенные животные с высокой дозой гена *aak-2*, напротив, живут на 13 % дольше контроля (Apfeld et al., 2004). Опухолесупрессорная киназа LKB1 активирует АМПК путем прямого фосфорилирования. Мутация *par-4(it47ts)* в гене гомолога LKB1 у нематод частично подавляет продление жизни у мутанта *daf-2(e1368)*. Вполне вероятно, что PAR-4 активирует ААК-2, а это может приводить к увеличению продолжительности жизни (Apfeld et al., 2004).

При снижении количества пищи у дрозофилы продолжительность жизни сначала увеличивается, а затем снижается (голодание) (Partridge et al., 2005). К долгожительству приводит снижение доли дрожжей или сахара в диете (Helfand, Rogina, 2003a; Min, Tatar, 2006). Быстрое (в течение 48 ч) переключение темпов смертности при изменении состава пищи присуще только дрожжевой составляющей, сахар не приводит к таким резким изменениям. Вредный эффект избытка сахара проявляет себя уже в ранней зрелости (Mair et al., 2005). У мух эффект низкокалорийного питания на продолжительность жизни связан с экспрессией деацетилазы dSIR2 в нейронах, а снижение активности dSIR2 подавляет увеличение продолжительности жизни при недостатке калорий. Экспрессия доминантно-негативного конструкта *p53* у дрозофилы не увеличивает более продолжительность жизни мух, подвергшихся ограничению калорийности питания. Возможно, *p53* является компонентом механизма влияния ограничения калорийности на долгоительство (Bauer et al., 2005). Транскрипция *dSIR2* у долгоживущих мух с мутацией *rpd3* и у долгоживущих нормаль-

ных мух, развивающихся на низкокалорийной диете, увеличивается (Rogina, Helfand, 2004).

У дрозофил ограничение калорийности питания не увеличивает продолжительность жизни мутантов по инсулин/IGF-пути. Таким образом, ограничение калорийности питания не только снижает метаболический уровень и внутриклеточный гомеостаз сахаров и аминокислот, но также непосредственно воздействует на инсулин/IGF-сигналинг (Baumeister et al., 2006). Снижение количества белка или дрожжей в диете мух подавляет InR/PI3K-сигналинг (Kapahi et al., 2004). Этот факт не вызывает удивления, поскольку инсулиновый сигналинг играет ключевую роль в регуляции метаболизма. У мух долгоживущие мутанты с дефектами инсулинового сигналинга или удаленными нейросекреторными клетками характеризуются высоким содержанием липидов, трегалозы и гликогена (Broughton et al., 2005).

Ответ на ограничение диеты у самок дрозофилы более выражен, чем у самцов, что, возможно, связано с половыми различиями систем распознавания питательных веществ, например инсулинового сигналинга (Davies et al., 2005). У самок данная процедура сопровождается снижением яйцепродукции (Helfand, Rogina, 2003a). Более того, подавление экспрессии генов при репродуктивном старении самок и при снижении калорийности пищи имеет схожий паттерн (Girardot et al., 2006). Однако более выраженный ответ на снижение калорийности у самок не может быть объяснен снижением яйцепродукции, поскольку имеет место и у стерильных самок (Partridge et al., 2005).

Сенсорным органом наличия питательных веществ у дрозофилы является жировое тело, использующее TOR-сигналинг для выработки гормонального сигнала, модулирующего инсулиновый сигналинг и рост в периферических тканях (Kapahi et al., 2004). Недостаток аминокислот в пище активирует dTOR-механизм в жировом теле личинки. Это приводит к запуску сигнала о голодании, который подавляет InR/PI3K-механизм в периферических тканях. Подавление этого механизма инактивирует dAKT, не способную больше фосфорилировать и инактивировать dFOXO, что усиливает транскрипцию гена d4E-BP (Tettweiler et al., 2005). Активность белка 4E-BP у дрозофилы критична для выживания в условиях ограничения диеты. 4E-BP репрессирует белок eIF4E, связывающий 5'-кэп мРНК и отвечающий за инициацию трансляции. 4E-BP является нижележащей мишенью фосфатидилинозитол-3-киназного (PI3K) сигналинга. Активация PI3K-механизма у дрозофилы подавляет как экспрессию гена d4E-BP, так и активность самого d4E-BP-белка. Напротив, транскрипционный фактор dFOXO активирует транскрипцию гена d4E-BP. Так подавляется

5'-кэп-зависимая трансляция в голодающей клетке, однако сохраняется синтез отдельных белков по 5'-кэп-независимому пути, через сайты внутреннего рибосомного входа (Tettweiler et al., 2005).

Ингибирование TOR-сигналинга продлевает жизнь мух. У дрозофилы гомологи человеческих генов *Tsc1 (Hamartin)* и *Tsc2 (tuberin)* вместе ингибируют TOR, который опосредует сигналинг, инициацию трансляции и рост клетки. Сверхэкспрессия *dTsc1* и *dTsc2* либо доминантно-негативных форм *dTOR* или *dS6K* хотя бы в жировом теле приводит к долгожительству (Kapahi et al., 2004). Воздействие TOR на инициацию трансляции опосредуется активацией киназы S6. Она фосфорилирует рибосомальный белок S6, что сопровождается сверхрегуляцией класса мРНК, содержащих олигопиримидиновый участок в сайте транскрипционного старта. Это так называемый участок 5'TOP. Порядка 200 генов, большинство из которых кодируют компоненты аппарата трансляции, включая белки рибосом и факторы элонгации, имеют эту последовательность, что соответствует примерно 20 % общей клеточной мРНК. Мухи, гомозиготные по мутации *dS6K*, имеют задержку в развитии и снижение размеров тела, однако сверхэкспрессия гена доминантно-негативной формы данного белка, как уже говорилось, увеличивает продолжительность жизни (Kapahi et al., 2004). Таким образом, аминокислоты активируют dS6K через TOR, чему препятствуют высокие концентрации dTsc1 и dTsc2. Данный механизм параллелен инсулиновому сигналингу, но связан с ним (Kapahi et al., 2004). TOR-сигналинг и инсулиновый путь взаимодействуют друг с другом на различных уровнях (рис. 9). Недостаток аминокислот в пище блокирует инсулин-индуцированное фосфорилирование S6K. Личинка дрозофилы, потерявшая активность S6K или TOR, имеет повышенный уровень активности протеинкиназы B, что демонстрирует отрицательную обратную связь между обоими механизмами (Baumeister et al., 2006). Tsc1, Tsc2, TOR и S6-киназа являются регуляторами роста и размеров тела параллельно инсулиновому сигналингу, отчасти с ним перекрываясь (Kapahi et al., 2004).

Долгоживущий мутант дрозофилы *methuselah* также имеет повышенную устойчивость к голоданию. В режиме ограничения питания средняя и максимальная продолжительность жизни дрозофилы увеличивается 2-кратно, а уровень транскрипта *mth* падает (Kim et al., 2006).

Высказывалось предположение, что высокие концентрации питательных веществ вызывают у дрозофилы усиленную пролиферацию бактерий, что увеличивает смертность мух независимо от качества пищи. Однако добавление тетрациклина не привело к существенному изменению продолжительности жизни (Mair et al., 2005).

Снижение калорийности питания увеличивает на 35—40 % продолжительность жизни грызунов. Оно сопровождается снижением уровня инсулина, глюкозы и IGF-1, накоплением жира, повышением иммунитета и антиоксидантной защиты (Cheng et al., 2005). У грызунов с ограниченной калорийностью диеты уровень инсулина и IGF-1 соответственно в 8.0 и 1.4 раза ниже по сравнению с контролем (Cohen et al., 2004). У грызунов ограничение количества калорий снижает выработку активных форм кислорода в изолированных препаратах митохондрий и накопление оксидативных повреждений. Однако оно приводит к сложному комплексу и других изменений (Weinert, Timiras, 2003). Как оказалось, обработка клеточных культур сывороткой животных, подвергшихся уменьшению калорийности питания, вызывает снижение пролиферации и усиливает переносимость стрессов через экспрессию генов стресс-ответа (Cheng et al., 2005). Такие клетки менее чувствительны к Вах-индуцированному апоптозу (Cohen et al., 2004). Добавление в эту сыворотку инсулина и IGF-1 частично восстанавливает фенотип пролиферации и стресс-ответа, наблюдаемый при добавлении в культуру клеток сыворотки животных, питающихся вволю. По-видимому, именно сниженный уровень инсулина и IGF-1 вносит вклад в эффекты низкокалорийного питания (Cheng et al., 2005). При снижении уровня инсулин/IGF-сигналинга активируется транскрипционный фактор FOXO. Его гены-мишени, такие как *перск*, контролируют глюконеогенез, запуская выработку глюкозы в печени при голодании (Motta et al., 2004).

Инсулин — не единственный регулятор ответа на ограничение диеты млекопитающих. Карликовые мыши-долгожители *Prop1^{df}*, у которых подавлен инсулин/IGF-сигналинг, в условиях ограничения калорийности питания живут дольше, чем обычные мыши на той же диете, что предполагает по крайней мере частичную независимость данных механизмов (Tatar et al., 2003). Однако паттерны экспрессии генов в печени мышей, содержащихся на ограниченной диете, и карликовых мышей во многом перекрываются. Это свидетельствует об общих нижележащих механизмах двух параллельных путей регуляции (Walker et al., 2005).

В ответ на ограничение диеты SIRT1 деацетилюет Ku70 — белок репарации ДНК, блокируя вход проапоптотического фактора Вах в митохондрии и тем самым ингибируя стресс-индуцированную апоптотическую гибель клетки. Таким образом, ограничение калорийности пищи увеличивает продолжительность жизни через индукцию SIRT1 и стимулирование длительной выживаемости незамещаемых клеток. Как известно, потеря клеток обуславливает различные возрастзависимые заболевания, включая нейродегенерацию, дегенерацию сетчатки и сердечно-сосудистые заболевания.

Грызуны, подвергшиеся низкокалорийной диете, обычно менее склонны к стресс-индуцированному апоптозу (Cohen et al., 2004). Подавление механизма распознавания глюкозы у человека ведет к накоплению жира, что защищает организм от голодания, задерживает размножение и увеличивает шансы выжить при ограничении ресурсов пищи (Bitterman et al., 2003). Одна из немногих моногенных причин ожирения у человека, связанная с мутацией гена *tubby*, также вызывает резистентность к инсулину, бесплодие и прогрессирующий нейросенсорный дефицит. Делеция ортолога *tubby* у нематод (*tub-1*), приводит к повышенному накоплению триглицеридов. Мутация в этом гене способна продлевать жизнь на 20 %, причем данный эффект зависит от функции транскрипционного фактора DAF-16 (Baumeister et al., 2006). Следовательно, у эукариотов, включая и человека, снижение количества потребляемой пищи приводит к включению программы запасаения (жиров у многоклеточных животных и гликогена у дрожжей).

Считается, что человек менее подвержен влиянию ограничения калорийности питания на продолжительность жизни благодаря своей высокой метаболической стабильности (способности клеток поддерживать соотношение критических метаболитов при стрессе). Грызуны характеризуются ранним половым созреванием, ограниченной репродуктивной продолжительностью жизни, малыми размерами, большим числом потомков; периоды обильности пищи для них сменяются длинными периодами голода, вспышки численности — снижением ее. Человек пошел по другому пути — для него характерны поздняя сексуальность, малое число потомков, длинный репродуктивный период. Как следствие, эволюция сделала людей более стрессоустойчивыми по сравнению с грызунами (Shaw, 2004). Однако полезные эффекты снижения калорийности для здоровья человека неоднократно подтверждены. Например, несмотря на то что чувствительность к инсулину в периферических тканях-мишенях снижается в старости, она может улучшаться при ограничении калорийности питания (Weinert, Timiras, 2003).

Подводя итоги, следует отметить, что ограничение диеты является наиболее универсальным стрессом, вызывающим увеличение продолжительности жизни (гормезис) и снижение накопления биомаркеров старения у всех изученных на этот предмет организмов. В то же время, умеренное его воздействие не приводит к таким вредным эффектам как повреждение ДНК (в отличие от радиации и окислительного стресса) или денатурация белка (тепловой стресс), хотя несколько снижает иммунную и репродуктивную функции. К молекулярным механизмам влияния низкокалорийной диеты на скорость старения следует отнести

подавление инсулинового (снижение поступления углеводов) и TOR-сигналинга (аминокислотное голодание), активацию сиртуинов и FOXO, уменьшение интенсивности метаболизма (продукции свободных радикалов).

4.4. Температурный стресс

Еще в 1916 г. Леб и Нортроп показали взаимосвязь между продолжительностью жизни дрозофил и окружающей температурой (Loeb, Northrop, 1916). У дрозофил варьирование окружающей температуры влияет на сам процесс старения, меняя наклон кривой смертности. Кроме того, оно воздействует на возрастзависимое изменение фертильности и физической активности (геотаксис) (Helfand, Rogina, 2003a). Предполагают, что продление жизни у холоднокровных животных (нематод и дрозофил) при снижении окружающей температуры обусловлено изменением темпа метаболизма и отражает прямую связь между метаболизмом и старением (Balaban et al., 2005). Данное предположение основано на теории «интенсивности жизнедеятельности» (Helfand, Rogina, 2003a).

Черви *Caenorhabditis elegans* дикого типа живут и стареют медленнее при более низких температурах. Нематоды, вылупившиеся при 15 °С, живут значительно дольше, чем вылупившиеся при 20 °С (Huang et al., 2004). Если эмбрион на стадии двух клеток переместить из высокой или низкой температуры в умеренную, то он сразу приспособливает темпы развития к новой температуре. Мутанты *clk-1* не способны к такой подстройке — они подвергаются эмбриогенезу только согласно исходной температуре. Мутация в гене *clk* замедляет темп многих процессов у *C. elegans*, таких как клеточное деление, питание и дефекация. Кроме того, продолжительность взрослой жизни увеличивается на 15—30 % (Guarente, Kenyon, 2000). Таким образом, ген *clk-1* может играть важную роль в изменении метаболизма в ответ на смену температурного режима.

У дрозофилы снижение окружающей температуры до 18 °С удваивает продолжительность жизни, непосредственно влияя на уровень метаболизма и изменяя такие возрастзависимые физиологические маркеры, как подвижность и репродукция. У молодых мух снижение окружающей температуры до 11 °С индуцирует состояние репродуктивной диапаузы. Самки останавливают развитие яиц на превителлогенной стадии. Как самки, так и самцы мо-

гут оставаться в этом состоянии 9—11 недель; после потепления они вновь становятся репродуктивно активными и имеют нормальную продолжительность жизни. Это состояние напоминает стадию *dauer* у нематоды *C. elegans* (Helfand, Rogina, 2003).

У теплокровных животных помимо перепадов внешней температуры определяющую роль в старении играет модификация температуры тела. Приматы, получавшие низкокалорийную пищу в течение 6 лет, характеризовались снижением температуры тела на 0.5 °С, что свидетельствует о переходе к энергосберегающему режиму метаболизма (Lane et al., 1996). Карликовые мыши с мутацией рецептора гормона роста живут дольше, при этом они имеют пониженную температуру тела (Guarente, Kenyon, 2000). Трансгенные мыши, у которых сверхактивирован ген расщепляющего белка 2 в терморцепторных нейронах гипоталамуса, характеризуются локальным повышением гипоталамической температуры и, как следствие, регуляторным снижением внутренней температуры тела на 0.5 °С. В результате такой модификации происходит увеличение медианной продолжительности жизни самцов и самок соответственно на 12 и 20 %. Следовательно, снижение температуры тела может продлевать жизнь теплокровных позвоночных независимо от ограничения калорийности пищи (Conti et al., 2006).

В то же время, умеренное воздействие стресс-факторов, таких как кратковременный тепловой шок и холодовой стресс, значительно продлевают жизнь модельных животных (Helfand, Rogina, 2003a). Рассмотрим более подробно роль теплового шока в модификации скорости старения.

4.4.1. Тепловой стресс

Поскольку старение — результат нарушения репаративных механизмов, предлагаются различные подходы для их стимуляции. В качестве одного из таких путей рассматривается гормезис, который можно индуцировать, подвергнув клетки и организм в целом умеренному стрессу. Старение характеризуется снижением адаптивных способностей из-за прогрессирующего нарушения гомеодинамики. Поэтому если клетки или организмы подвергнуть кратковременному стрессу, стимулирующему экспрессию генов стресс-ответа и усиливающему механизмы поддержания жизнедеятельности и репарации, то это приведет к эффектам антистарения и стимуляции долгожительства (Rattan et al., 2004).

Увеличение продолжительности жизни в результате индуцированного мутагенеза часто сопровождается повышением стресс-

соустойчивости, в том числе к температурному стрессу (McColl et al., 2005). В ряде случаев увеличиваются все виды устойчивости, иногда повышается устойчивость лишь к одному из видов стрессов. Кроме того, разные виды стресса способны индуцировать устойчивость друг к другу, что говорит об общности механизмов стресс-ответа.

Однако общность механизмов стресс-ответа не означает их идентичность. Например, устойчивость к оксидативному стрессу не всегда сопровождается толерантностью к тепловому шоку или генотоксическим агентам. Три новых мутанта *Caenorhabditis elegans*, устойчивых к индуктору супероксиданиона параквату (метил виологену), — *mev-5*, *mev-6* и *mev-7* — не проявляли устойчивости к тепловому шоку или УФ и долгожительству (Fujii et al., 2005). Экспрессия доминантно-негативных вариантов p53 в нейронах дрозofilы придает им устойчивость к оксидативному стрессу и способствует увеличению продолжительности жизни мух, но не затрагивает устойчивости к тепловому шоку (Bauer et al., 2005).

Каковы механизмы термоустойчивости? У дрожжей выключение генов *sch9* и *cyr1* приводит как к увеличению продолжительности жизни, так и к устойчивости к тепловому стрессу. С чем это связано? Установлено, что CYR1 взаимодействует с транскрипционными факторами ответа на стресс — Msn2 и Msn4, а SCH9 — с протеинкиназой Rim15, регулирующей транскрипционный фактор Gis1, контролирующей экспрессию генов белков теплового шока Hsp26 и Hsp12. Белок SCH9 на 48 % идентичен белкам АКТ-1 и АКТ-2 у *C. elegans*, которые также регулируют продолжительность жизни и диапаузу, находясь в цепочке регуляторов ниже гомолога инсулинового рецептора DAF-2 (Bitterman et al., 2003).

Обработка *C. elegans*, на ранних стадиях развития импульсом высокой температуры (2 ч при 35 °C) продлевает жизнь червей (Apfeld et al., 2004). Кроме того, при неблагоприятных условиях среды (например, при высокой окружающей температуре) развивающаяся личинка нематоды формирует долгоживущую непитающуюся стрессоустойчивую форму — личинку dauer. В состоянии диапаузы личинка может выживать более 3 месяцев, после чего возобновляет развитие, если условия сменятся на благоприятные. Напротив, взрослая нематода *Caenorhabditis elegans* умирает от старости спустя всего 2—3 недели. Многие мутации, например снижающие инсулиновый сигналинг (*daf-2* и *age-1*), приводят к формированию dauer даже при благоприятных внешнесредовых условиях (McElwee et al., 2004). У нематоды *C. elegans* старение и тепловой стресс имеют сходные механизмы: долгоживущие мутанты термоустойчивы, а мягкий тепловой стресс увеличивает продолжительность жизни (McCarroll et al., 2004). Так, известно,

что у нематоды мутанты с нарушенным инсулиновым сигналингом устойчивы к тепловому стрессу (Guarente, Kenyon, 2000). Сверхэкспрессия гена тирозинкиназы *tkr-1* увеличивает продолжительность жизни нематод на 60 %, не влияя на скорость развития и фертильность, но вызывая устойчивость к тепловому шоку и ультрафиолету (Guarente, Kenyon, 2000). Известно также, что нематоды с более длинными теломерами более устойчивы к тепловому стрессу (Joeng et al., 2004). У данного объекта продолжительность жизни имеет сильную положительную корреляцию с термоустойчивостью (r достигает 0.8—0.9), большую, чем с устойчивостью к пероксиду водорода и параквату ($r = 0.7$) или к УФ ($r = 0.2$) (Shmookler Reis et al., 2006).

Отдельные долгоживущие мутанты дрозофил также имеют высокую термоустойчивость. Например, мутация *methuselah* увеличивает среднюю продолжительность жизни и придает устойчивость к различным стрессам, в том числе и к высокой температуре (Guarente, Kenyon, 2000).

Что касается механизмов термоустойчивости, то известно, что при тепловом стрессе у нематоды происходит перемещение транскрипционного фактора DAF-16 в ядро. Такое перемещение зависит от DAF-18 (гомолога фосфатазы PTEN), это в свою очередь предполагает, что данное повреждающее воздействие может сенсироваться через подавление инсулинового сигналинга (Wang et al., 2005). Кроме того, при тепловом стрессе деацетилаза SIR-2.1 может связываться с DAF-16 14-3-3-зависимым образом и модифицировать его активность. Белки 14-3-3 являются высококонсервативными малыми кислыми протеинами, связывающими фосфосериновые и фосфотреониновые остатки. Взаимодействуя со своими партнерами, белки 14-3-3 регулируют ключевые биологические процессы, такие как клеточный цикл, апоптоз и транскрипция. Они влияют на свои мишени многими путями, включая активацию или ингибирование белков через изменение их субклеточной локализации или структуры (Berdichevsky et al., 2006). Наконец, тепловой шок не влияет на продолжительность жизни (не увеличивает ее) мутанта нематоды по уже известному нам гену *aak-2*. Таким образом, увеличение соотношения АМФ : АТФ после температурного стресса в свою очередь увеличивает активность субъединицы АМФ-активируемой протеинкиназы ААК-2 и, следовательно, продолжительность жизни. Одновременно снижается фертильность. Поскольку увеличение уровня АМФ : АТФ происходит на ранней стадии развития, молекулярная память о стрессе может быть опосредована фосфорилированием ААК-2 нижележащих мишеней. Причем ААК-2 влияет на продолжительность жизни *daf-16*-независимым образом (Apfeld et al., 2004).

Фибробласты карликовых мышей *Snell* более устойчивы к различным факторам, вызывающим стресс, таким как УФ, тяжелые металлы (Cd), H₂O₂, паракват и тепловой шок (Hsieh, Papaconstantinou, 2006). Повторяющийся умеренный тепловой стресс оказывает горметический эффект на рост и различные клеточно-биохимические характеристики фибробластов человеческой кожи, стареющих в культуре, в том числе на сохранение профиля белков стресс-ответа, на снижение накопления оксидативно поврежденных и гликозилированных белков, на улучшение устойчивости клеток к другим стрессам и антиоксидантной способности. При этом не происходит увеличения числа удвоений их клеточной популяции в культуре (Rattan et al., 2004).

Если рассматривать механизмы термоустойчивости у млекопитающих, то тепловой стресс приводит к активации N-концевой киназы c-Jun (JNK), митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK) p38 и киназы, регулируемой внеклеточными сигналами (ERK). Эти киназы далее фосфорилируют свои субстраты — транскрипционные факторы, другие протеинкиназы, фосфоорилазы и белки, ассоциированные с цитоскелетом. При тепловом шоке ERK активируется через автофосфорилирование рецептора эпидермального фактора роста (EGF), не зависящее от связывания самого EGF. Активация JNK происходит через инактивацию фосфатазы, подавляющей функцию JNK. Что касается случая с p38, то вышележащая MAPK-киназа-киназа (Ask1) высвобождается при тепловом шоке от ингибитора GSTM-1 (глутатион-S-трансферазы Mu1-1). Эти киназы влияют на активность белков теплового шока: JNK способна фосфорилировать и стабилизировать транскрипционный фактор теплового шока (HSF-1); p38 фосфорилирует MAPK APK2, а последняя в свою очередь фосфорилирует Hsp27, влияющий на динамику в клетке белка цитоскелета актина (Rattan et al., 2004). Оказалось, что обработка клеточных культур млекопитающих сывороткой животных, подвергшихся воздействию снижения калорийности питания, подавляет пролиферацию и усиливает переносимость теплового шока. Добавление инсулина и IGF-1 снимает этот эффект. По-видимому, основной вклад в рассматриваемый эффект вносит именно низкий уровень инсулина и IGF-1 (Cheng et al., 2005). Кроме того, у млекопитающих в ответ на воздействие теплового шока усиливается ацетилирование (активация) транскрипционного фактора FOXO3 (Giannakou, Partridge, 2004). Наконец, умеренный тепловой шок увеличивает протеосомальную активность, что связано с увеличением количества активатора протеосомы 11S и может способствовать долговечности организма (Rattan et al., 2004).

Таким образом, становится очевидным, что повышенная устойчивость к стрессу коррелирует с долгожительством. Однако это имеет место не во всех случаях. Например, долгоживущие мухи, лишённые нейросекреторных клеток, вырабатывающих инсулиноподобные пептиды, более чувствительны к жаре и к холоду, чем контроль. Следовательно, высокая устойчивость к термальному стрессу не является единственно необходимой для увеличения длительности жизни. Одна из возможных причин снижения термотолерантности у таких мутантов — это низкая концентрация у них циркулирующей трегалозы. Трегалоза у дрозофилы играет роль в защите от аноксии путем предотвращения агрегации белков. Аналогичным образом у дрожжей она принимает участие в формировании стрессоустойчивой стационарной фазы жизненного цикла (Broughton et al., 2005).

4.4.2. Белки теплового шока

В предыдущем разделе подробно рассмотрены регуляторные механизмы термоустойчивости. Какие эффекторные пути они контролируют? Гипертермальный стресс активирует высококонсервативную в эволюции программу быстрой перестройки метаболизма клетки и синтеза специфического набора так называемых «белков теплового шока». Среди них наиболее представлены белки с молекулярной массой 25, 70, 90 и 110 кДа (Hunt et al., 2004). Некоторые главные шапероны (Hsp70, Hsp90, малые Hsp) присутствуют в очень высоких концентрациях даже в интактной клетке (1—5 % общего белка), что свидетельствует об их важной роли в поддержании конформационного гомеостаза белков (Soti, Csermely, 2007). Максимальный уровень индуцированной экспрессии генов наблюдается для Hsp70. Данное семейство белков отличается наибольшей консервативностью последовательности в эволюционном ряду от *Escherichia coli* до человека. Они предотвращают нарушение нормальных клеточных процессов, митоза и мейоза, или повреждения клетки внешними стрессами. Нарушение индукции этих белков коррелирует с потерей термоустойчивости (Hunt et al., 2004) и не только. Индукция белков теплового шока — один из первичных защитных механизмов в условиях стресса. Воздействие на клетки и организмы высокой температуры, ограничения калорийности питания, физической нагрузки, окислительного и осмотического стресса, тяжелых металлов, ингибиторов протеосомы, аналогов аминокислот, этанола, истощения глутатиона, кальциевых ионофоров и метаболических ядов индуцирует стресс-ответ, приводящий к транскрипции и трансляции

ции белков теплового шока (Tavernarakis, Driscoll, 2002; Rattan et al., 2004).

Стресс-ответ в клетке регулируется на транскрипционном, трансляционном и посттрансляционном уровнях, и важная роль в нем отведена белкам теплового шока (шаперонам). Они обладают различными формами активности: 1) участвуют в сворачивании полипептидных цепей; 2) стимулируют перемещение белков через различные компартменты клетки; 3) модулируют активность белков через стабилизацию и(или) созревание функционально компетентной конформации, маскируют умеренные мутации на конформационном уровне; 4) стимулируют объединение/разъединение мультисубъединиц белковых комплексов; 5) участвуют в рефолдинге неправильно уложенных белков; 6) защищают белки от агрегации; 7) способствуют деградации чрезмерно поврежденных белков; 8) защищают белки от агрегации; 9) инактивируют поврежденные белки, собирая их в агрегаты; 10) растворяют белковые агрегаты для рефолдинга или деградации; 11) совместно с шаперонами регулируют в клетке сигнальные сети; 12) ингибируют апоптоз на разных его стадиях (например, возле плазматической мембраны проапоптозный белок FADD ингибируется Hsp27, а JNK — Hsp70; в митохондриях MPT ингибируется Hsp90, цитохром *c* — Hsp70 и Hsp27, APAF-1 — Hsp90 и Hsp70; активность каспазы-3 подавляется Hsp70 и Hsp27) (Tavernarakis, Driscoll, 2002; Morrow et al., 2004; Rattan et al., 2004; Soti, Csermely, 2007).

Каким образом активируются Hsp? Внеклеточные стресс-факторы физической, химической и биологической природы и внутриклеточные сигналы от денатурированных и агрегированных белков инициируют серию событий, начинающихся с трансдукции сигнала, с последующей активацией и транслокацией в ядро транскрипционных факторов теплового шока (HSF), затем происходит связывание HSF с ДНК, сопровождающееся инициацией транскрипции и трансляции белков теплового шока (Rattan et al., 2004). Рассматривая механизм более детально, следует отметить, что при протеолитическом поражении, каковым является тепловой шок, неправильно уложенные белки оттитровывают HSF-1 из ингибиторного шаперонного комплекса, что приводит к его тримеризации. Этот комплекс фосфорилируется и перемещается в ядро, где связывается с последовательностями элементов теплового шока генов *Hsp* (Soti, Csermely, 2007).

На модели *Caenorhabditis elegans* было показано, что транскрипционный фактор теплового шока (HSF-1) модулирует эффекты инсулинового сигналинга и выступает в качестве нижележащего эффектора DAF-2, в свою очередь регулирующего транскрипционный фактор DAF-16. Снижение экспрессии HSF-1 путем

интерференции РНК подавляет продолжительность жизни мутантов по инсулиновому сигналингу. Фактор **HSF-1** индуцируется в ответ на тепловой шок; он контролирует гены ответа на стресс, ответственные за увеличение продолжительности жизни, такие как малые белки теплового шока. Последние, со своей стороны, замедляют старение путем предотвращения агрегации белков. Снижение методом РНК-интерференции уровня малых белков теплового шока уменьшает продолжительность жизни мутантов *daf-2*. В свою очередь **DAF-16** также активирует гены стресс-ответа, включая малые белки теплового шока **Mtl-1** и **Hsp12.6** (Coffer, 2003; Baumeister et al., 2006; Wolff et al., 2006). Тот факт, что гены белков теплового шока являются мишенями **DAF-16**, предполагает возможность взаимодействия **DAF-16** и **HSF-1** на их промоторах (Gami, Wolkow, 2006). Действительно, промоторы **Hsp** имеют последовательности для связывания обоих транскрипционных факторов (Coffer, 2003). У нематод мутация гена фактора теплового шока **HSF-1** приводит к ускоренной дегенерации тканей (преждевременному старению) (Garigan et al., 2002). Напротив, сверхэкспрессия гена **HSF** продлевает жизнь нематоды (McColl et al., 2005). Ген долгоживущего мутанта нематоды *ddl-1* кодирует мутантный белок, в норме связывающий фактор теплового шока **HSB-1**, негативно регулирующий активность **HSF-1**. Таким образом, ген *ddl-1* дикого типа может ингибировать долгожительность, снижая активность **HSF-1** (Hansen et al., 2005). **HSF-1** также необходим для температура-индуцированного формирования стрессоустойчивой личинки *dauer* (Morley, Morimoto, 2004).

Адекватный ответ на тепловой шок позволяет клетке пережить неблагоприятные условия и даже повысить свою устойчивость к последующим стрессам. Неэффективный или нарушенный ответ приводит к ненормальному росту и развитию, старению и апоптозу (Rattan et al., 2004). Рассмотрим экспериментальные данные, свидетельствующие о роли белков теплового шока в долгожительстве у различных модельных животных.

Мутация гена *age-1*, отвечающего за передачу инсулинового сигнала нематоды, приводит к активации транскрипционного фактора теплового шока **HSF-1** и к последующему синтезу **Hsp** (McEelwee et al., 2004). В одном из экспериментов сравнение экспрессионных профилей при старении нематод дикого типа и долгоживущей линии *daf-2* не выявило отличий в возрастной динамике экспрессии генов **Hsp**. В обеих линиях наблюдался пик экспрессии в среднем возрасте с последующим снижением в старости (Golden, Melov, 2004). Согласно другой работе, гены *hsp16*-подобных белков теплового шока все же сверхэкспрессируются у мутантов *daf-2* по сравнению с одновозрастным контролем. Однако при этом сни-

жается транскрипция генов семейства ДНК-связывающих белков холодового шока (*cey-1, 2* и *4*) и некоторых других белков теплового шока (*hsp1* и *3, sip-1, dnj-29, T05E11.3*). Авторы предполагают наличие связи между снижением их экспрессии и низким уровнем продукции свободных радикалов, а следовательно, и стрессом (Halaschek-Wiener et al., 2005). Еще в одном эксперименте снижение инсулинового сигналинга стимулировало выработку малых белков теплового шока семейства α -кристаллинов (*Hsp12s, Hsp16s, sip-1* и *Hsp43*) (McElwee et al., 2004). Наконец, у личинки *dauer* и *daf-2*-мутантов сходным образом изменяется экспрессия α -кристаллинов (McElwee et al., 2004), что может свидетельствовать об их роли в обеспечении долговечности. По крайней мере, особую роль *hsp16* в долгожительстве подтверждают результаты, согласно которым внедрение нематодам дополнительных копий этого гена привело к *daf-16*-зависимому увеличению термотолерантности и продолжительности жизни (McColl et al., 2005).

У нематоды митохондриальный белок теплового шока *Hsp6* (*Hsp70F*) участвует в поступлении метаболитов в митохондрии, играя важную роль в биогенезе и выработке энергии. Подавление его активности у взрослых животных приводит к уменьшению продолжительности жизни и подвижности, к дефектам оогенеза и к раннему накоплению липофусцина. При этом имеет место снижение уровней белков *ATP-2, Hsp60* и *CLK-1*, что нарушает морфологию митохондрий и уменьшает количество вырабатываемой АТФ. Таким образом, подавление активности *Hsp6* вызывает раннее старение (прогерия-подобный фенотип). У дикого типа количество *Hsp6* в клетке значительно снижается в финальной стадии старения. Увеличение экспрессии *Hsp6*, напротив, продлевает жизнь нематод (Kimura et al., 2006).

У дрозофилы сверхэкспрессия митохондриального белка теплового шока *Hsp22* в нервной системе усиливает устойчивость к оксидативному стрессу и замедляет старение локомоторной функции (Martin, Grotewiel, 2006). Повсеместная или избирательная сверхактивация этого белка в мотонейронах приводит к увеличению средней продолжительности жизни на 30 %. Как и следовало ожидать, у таких мух повышена устойчивость к термальному стрессу. Трансгенная экспрессия *Hsp23*, другого малого цитоплазматического белка теплового шока дрозофилы, приводит к увеличению средней продолжительности жизни на 15 %. К аналогичному эффекту приводит повсеместная сверхэкспрессия гена цитоплазматического белка *Hsp26* (Morrow et al., 2004). Сверхэкспрессия гена *hsp27* также позитивно влияет на продолжительность жизни и устойчивость к тепловому шоку (Poirier, Seroude, 2005). Активация *FOXO* у дрозофилы ведет к продлению жизни.

Как оказалось, одним из генов-мишеней FOXO является *I(2)efl* — ген малого белка теплового шока и ген, играющий непосредственную роль в предотвращении накопления токсичных агрегатов белков (Wang et al., 2005). У мутантов дрозофилы по каталазе и Cu,Zn-SOD при старении уменьшается время индукции гена *hsp70*, что предполагает его участие в ответе на оксидативный стресс (Landis et al., 2004). Таким образом, белки теплового шока играют роль не только в термоустойчивости, но и в реакции на другие стрессовые воздействия.

Муши-долгожители, гетерозиготные по мутации гена рецептора экдизона, имеют повышенную устойчивость к оксидативному и тепловому стрессам и к голоданию (Simon et al., 2003). В то же время сам рецептор экдизона для своего функционирования требует наличия молекулярных шаперонов Hsp70 и Hsp90 (Tatar et al., 2003). Сверхэкспрессия гена ДНК-метилтрансферазы *dDnmt2* продлевает жизнь дрозофилы. По-видимому, метилаза влияет на продолжительность жизни через изменение экспрессии различных генов. В частности, отмечено 3-кратное увеличение активности генов малых белков теплового шока — *hsp22* (митохондрии), *hsp23* и *hsp26* (цитоплазма) (Lin et al., 2005). Уровень мРНК-генов белков теплового шока в клетках стареющей дрозофилы возрастает (Morrow et al., 2004). У старых или подвергшихся гипероксии мух выявлено повышение экспрессии генов *hsp70*, *hsp22* и *hsp23*. Это изменение требует наличия особых элементов теплового шока (HSEs) в промоторах этих генов (Landis et al., 2004). Более того, начало сверхактивации генов *hsp22* и *hsp23* у линий дрозофилы, отселектированных на высокую продолжительность жизни, соответствует уже ранней зрелости (Morrow et al., 2004). По всей видимости, индукция генов белков теплового шока служит ключевым компенсаторным механизмом в стареющей клетке.

Таким образом, исследования, проведенные на животных с индуцированными мутациями белков теплового шока, выявили способность этих белков влиять на долгожительство. Однако остается вопрос: насколько адаптивны эти эффекты и играют ли они роль в естественных популяциях? Анализ локусов количественных признаков в популяциях дрозофилы убедительно доказывает, что кластер белков теплового шока *hsp22—hsp28* определяет генетическую вариацию по продолжительности жизни (Flatt, 2004).

Некоторые данные, касающиеся роли белков теплового шока в старении, были получены у млекопитающих. Так, при исследовании генов в гиппокампе мышей, экспрессия которых различается у линий с ускоренным и с отсроченным старением, было выявлено, что эти гены вовлечены в ответ на тепловой шок: они кодируют белки Hsp70.5 (глюкозо-регулируемый белок), Hsp1B и Hsp2 (Car-

ter et al., 2005). Транскрипционный профиль фронтального кортекса человека при старении демонстрирует, что после 40 лет происходит увеличение экспрессии таких генов стресс-ответа, как гены Hsp70 и α -кристаллинов (Lu et al., 2004). В стареющих фибробластах человека также наблюдается индукция белков стресс-ответа Hsp70 и Hsp27, тогда как базальный уровень Hsp90, напротив, снижается. В то же время последний служит модулятором HSF-1, который в результате исчезновения Hsp90 начинает стимулировать транскрипцию других белков теплового шока (Rattan et al., 2004). Ген *mortalin-2* — один из генов, снижение экспрессии которых с возрастом является, по-видимому, причиной функционального спада в работе почек. Этот ген кодирует Hsp70, сверхэкспрессия гена которого в фибробластах человека продлевает жизнь клеток *in vitro* (Rodwell et al., 2004). Кроме того, выключение *mthsp70* в раковых клетках человека вызывает остановку роста опухоли, а у пациентов с болезнью Паркинсона количество белка Mthsp70 существенно снижено (Kimura et al., 2006). Малый белок теплового шока млекопитающих Hsp27 ингибирует опосредованную цитохромом *c* активацию каспаз и защищает клетку от апоптоза, что тоже может способствовать долголетию (Morrow et al., 2004).

Каков механизм влияния белков теплового шока на старение и продолжительность жизни? При старении клетки накапливают неправильно уложенные белки. Белки теплового шока (шапероны) предотвращают их агрегацию и способствуют их правильному свертыванию или деградации (Coffer, 2003). Например, проявляющееся в старческом возрасте нейродегенеративное заболевание — болезнь Хантингтона вызывается экспансией триплетов *CAG* (кодирующих полиглутаминовые остатки в белке Хантингтона), что способствует формированию больших токсичных белковых агрегатов. У нематод с мутацией *daf-2* образование подобных агрегатов замедляется, а при подавлении генов малых белков теплового шока — ускоряется. Возрастзависимая агрегация полиглутаминовых белков также подавляется у долгоживущего *age-1*-мутанта нематод (Coffer, 2003; Morley, Morimoto, 2004). Наибольшую опасность представляет накопление подобного рода повреждений в постмитотических клетках нервной системы (при делении клеток вновь синтезируемые белки как бы разбавляют необратимо поврежденные). В пользу нейральной регуляции старения говорит тот факт (см. гл. 3), что продолжительность жизни мутанта *age-1* может быть полностью восстановлена до дикого типа (уменьшена) при экспрессии нормальной копии гена *age-1* только в нейронах, но не в мышцах или кишечнике. Как оказалось, сверхэкспрессия гена белка HSF-1 дает практически идентичный эффект как в нейрональных, так и в мышечных клетках.

Таким образом, регуляторные сигналы инсулинового сигналинга в нервной системе могут объединяться на HSF-1 и молекулярных шаперонах в других тканях тела, регулируя продолжительность жизни целостного организма (Morley, Morimoto, 2004). Умеренный термальный стресс может дополнительно активировать механизмы защиты от эндогенного биохимического стресса, связанного с накоплением неправильно уложенных или агрегированных белков, и тем самым замедлять старение.

4.5. Нарушение светового режима

Продолжительность жизни имеет высокую пластичность на внутривидовом уровне, поскольку она зависит от внешних экологических факторов, прежде всего от температуры и обилия пищи, а также от генотипических особенностей индивидуумов. Помимо вышперечисленных экологических факторов в жизни животных важную роль играет и световой режим. Однако его вклад в регуляцию продолжительности жизни изучен слабо. Существует несколько точек зрения на механизмы этого влияния.

1. Свет влияет на циркадианные ритмы животных. Известно, что вся жизнедеятельность животных периодична: существуют суточные, сезонные и годовые ритмы роста, размножения и линек. Внешние факторы, регулирующие эти процессы, — это суточные и годовые колебания интенсивности освещенности. Наиболее точным сигналом для животных служит периодичность освещения — соотношение длительности дня и ночи (Потапенко, 1996). Это соотношение обеспечивает функционирование биологических часов или ритмов (Конев, Волотовский, 1979). Многие организмы (от одноклеточных нейроспор и цианобактерий до млекопитающих) могут использовать длину дня и ночи для регуляции циклов активности, морфологических изменений, репродукции и развития (Биологические ритмы, 1984; Kondratov, 2007). Циркадианные ритмы регулируют локомоторную активность, циклы сон/бодрствования, секрецию гормонов и сохраняются даже в условиях постоянной темноты (Kondratov, 2007).

Возрастзависимые изменения циркадианных механизмов вносят вклад в различные патологии, связанные со старением. Более того, у ряда циркадианных мутантов (*BMAL1* и *Per1,2* у млекопитающих, *Period* и *Cycle* у дрозофил) наблюдается преждевременное старение. Ключевые циркадианные белки животных — *BMAL1* и *PERIOD* — играют непосредственную роль в контроле

старения через участие в регуляции метаболизма, в генотоксическом и оксидативном стрессах (Kondratov et al., 2006; Kondratov, 2007). Сравнение продолжительности жизни дрозофил, культивируемых при трех разных режимах светового цикла (24, 21 и 27 ч с равным соотношением свет/темнота) показало, что мухи в условиях 24-часового цикла живут дольше, чем при других условиях (Pittendrigh, Minis, 1972). Известно также, что увеличение длины светового дня уменьшает продолжительность жизни животных, причем как насекомых, так и млекопитающих (Massie, Whitney, 1991; Massie et al., 1993; Li, Xu, 1997; Sheeba et al., 2000; Majercak, 2002; Anisimov et al., 2004; Москалев и др., 2006). Следовательно, снижение продолжительности жизни при постоянном освещении или при удлинении цикла день/ночь может быть обусловлено десинхронизацией внутренних часов. Традиционно считается, что в результате таких изменений возникает рассогласование метаболических процессов, приводящее к ускорению старения (Kondratov, 2007).

2. Увеличение длины светового дня благоприятно сказывается на плодовитости. Согласно эволюционной теории старения, высокая плодовитость находится в антагонизме с продолжительностью жизни в силу затратности процесса размножения, т. е. перераспределения ограниченных энергетических и пластических ресурсов от репарации и поддержания жизнеспособности к производству половых продуктов (Kirkwood, 1977). У репродуцирующихся самок дрозофилы темп старения выше при круглосуточном освещении по сравнению с темнотой. Таким образом, снижение продолжительности жизни на свету может быть обусловлено повышением плодовитости. В условиях постоянной темноты плодовитость самок и частота спаривания самцов с самками, напротив, снижаются, что сопровождается увеличением продолжительности жизни (Sheeba et al., 2000). Однако есть вероятность того, что речь идет о так называемой «ложной корреляции»: не плодовитость на свету ускоряет старение, а свет и увеличивает плодовитость, и снижает продолжительность жизни, причем эти процессы не зависят друг от друга. Об этом свидетельствуют наши данные: несмотря на то что у линии с мутацией гена *mus209* (участвующего у дрозофилы в эксцизионной репарации ДНК) при полудневном освещении яйцепродукция самок возрастала (рис. 10, *a*), продолжительность жизни у них также увеличивалась (рис. 10, *б*).

В связи с этим интересно отметить, что у нематоды независимость регуляции продолжительности жизни и плодовитости, осуществляемой под действием такого эндогенного фактора, как рецептор инсулина, является установленным фактом (Giannakou et al., 2004).

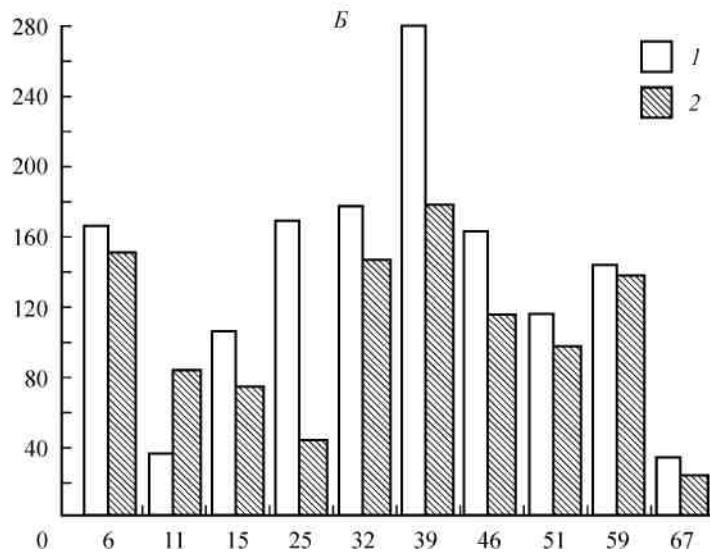
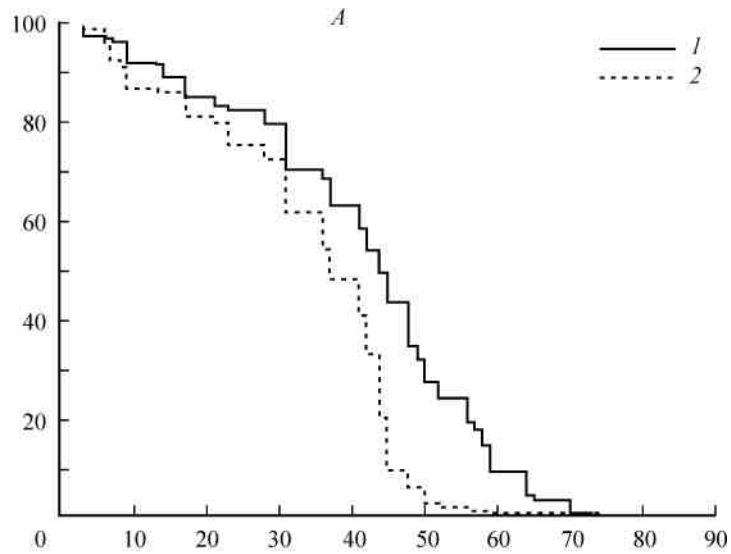


Рис. 10. Кривые выживаемости (А) и яйцепродукция (Б) линии дрозофилы *mus209*.

По оси абсцисс — возраст, сутки; по оси ординат — выживаемость, %; Б — число штук яиц на самку, шт. Освещение (А и Б): 1 — 24 ч; 2 — 0 ч.

3. Продолжительность жизни при увеличении длины светового дня уменьшается не только у самок, но и у самцов дрозофилы. Возможно, это связано с большей частотой спаривания самцов с самками, с большей физической активностью (Massie, Whitney, 1991). Отсюда возникло предположение, согласно которому сокращение продолжительности жизни, наблюдаемое при увеличении длины светового дня, — это своего рода плата за повышение активности животных. Вероятно, вследствие увеличения двигательной активности и изменения температуры тела животного происходит повышение уровня метаболизма и соответственно выработки сопутствующих ему побочных продуктов — свободных радикалов (Sheeba et al., 2002). Изменения физической активности в экспериментах действительно влияют на продолжительность жизни. Принудительное снижение физической активности домашних мух увеличивает продолжительность их жизни. Нейрологические мутанты дрозофилы с дефектом K^+ -каналов (*Hyperkinetic Shaker*) характеризуются высокой физической активностью и малой продолжительностью жизни (Helfand, Inouye, 2002; Helfand, Rogina, 2003a). Увеличение длины светового дня — стресс для организма, борьба с которым требует дополнительных метаболических затрат. Проведенные нами исследования также показали, что мутанты дрозофилы с низкой способностью к детоксификации свободных радикалов и к устранению повреждения ДНК характеризуются более выраженной разницей между продолжительностью жизни в темноте и на свету по сравнению с линией дикого типа (рис. 11) (Москалев и др., 2006).

Близкая точка зрения предполагает, что наблюдаемое в условиях постоянного освещения снижение продолжительности жизни у лабораторных животных может быть результатом уменьшения длительности отдыха, или сна (Sheeba et al., 2002). По крайней мере, другой внешний экологический фактор — температура в экспериментах на дрозофиле влияла на продолжительность жизни не через изменение общего уровня активности и количество сна (*sleep amount*), что вступает в противоречие с данной гипотезой. При повышении температуры имел место более прерывистый сон, какой наблюдается и при нормальном старении дрозофил и млекопитающих. Таким образом, изменение циклов сон/бодрствование является скорее следствием, чем причиной старения (Koh et al., 2006). Вполне вероятно, что это относится и к влиянию на продолжительность жизни различных режимов освещения.

На наш взгляд, описанные выше предположения о механизмах влияния длины светового дня на продолжительность жизни (нарушение нормальных циркадных ритмов, увеличение плодовитости или физической активности) не могут полностью объяснить

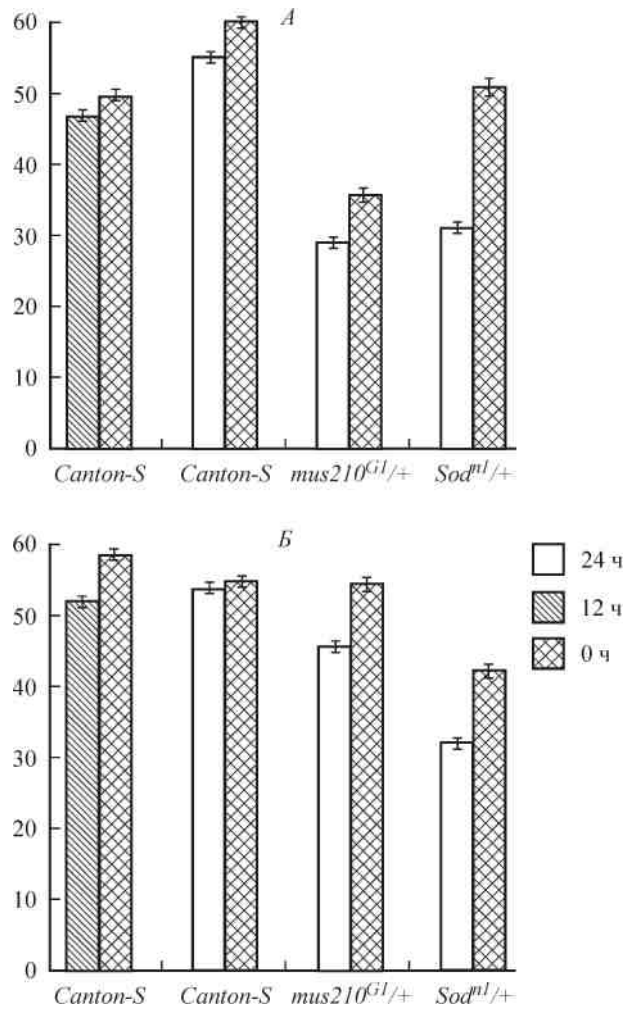


Рис. 11. Средняя продолжительность жизни самцов (А) и самок (Б) исследованных линий дрозофил при различных режимах освещения (по: Москалев и др., 2006).

По горизонтали — обозначение линии дрозофилы; по вертикали — возраст, сутки. *Canton-S* — линия дикого типа; *Sod^{M1/+}* — гетерозигота по мутации с потерей функции гена супероксиддисмутазы (*Sod*); *mus210^{G1/+}* — гетерозигота по мутации фермента эксцизионной репарации нуклеотидов.

это явление, поскольку имеются противоречащие им факты: 1) изменение циклов сон/бодрствование — не причина, а следствие старения; 2) увеличение плодовитости на свету не всегда сопровождается снижением продолжительности жизни. Наконец, в геронтологии сугубо механистическая метаболическая парадигма вытесняется регуляторной, связанной с адаптивными гормональными перестройками.

4. Возможный четвертый механизм влияния светового режима на продолжительность жизни связан с таким явлением, как диапауза. Многие животные прибегают к различным формам диапаузы, чтобы выдержать внешнесредовые трудности, что позволяет им дожить до улучшения условий и вернуться затем к нормальной репродуктивной жизни (Beckstead, Thummel, 2006).

Приведем несколько примеров. В ответ на осеннее уменьшение длины светового дня бабочка-монарх (*Danaus plexippus*) вступает в состояние репродуктивной диапаузы, при этом ее соматическая физиология остается высокоактивной. В таком состоянии взрослые особи выживают 5—6 месяцев и путешествуют через весь континент, а затем возвращаются на родину. Напротив, не находящиеся в диапаузе взрослые особи летней популяции живут менее 6 недель. Значительной продолжительности жизни диапаузных бабочек-данаид способствует физиологическое состояние замедленного старения, регулируемое нейроэндокринно. Это состояние обусловлено подавлением у зимующих мигрирующих взрослых особей ювенильного гормона. Хирургическое удаление *corpus allata* — нейроэндокринной ткани, вырабатывающей ювенильный гормон, снижает темп смертности этих бабочек. Взрослые особи, обработанные ювенильным гормоном, напротив, характеризуются возросшей смертностью (Tatar, 2004).

У диких видов рода *Drosophila* короткая фотофаза индуцирует настоящую взрослую репродуктивную диапаузу наподобие той, что встречается у бабочек-данаид. В ответ на прохладную погоду с короткой фотофазой *D. triauraria* из Северной Японии, имеющая несколько генераций в году, вступает в диапаузу и переживает в таком состоянии зиму. Характеризующаяся одной генерацией *D. littoralis* из Финляндии отвечает на подобные стимулы сходным образом. При этом у мух, прошедших эту стадию, значительно снижается темп смертности (скорость старения). Следовательно, фотопериод-индуцированная диапауза замедляет старение у эндемичных по температуре видов дрозофилы (Tatar, 2004).

Наши данные (рис. 11) также свидетельствуют в пользу той точки зрения, что не увеличение длины светового дня ускоряет старение, а его укорочение индуцирует замедленное старение: у линии дрозофилы дикого типа увеличение длины светового дня

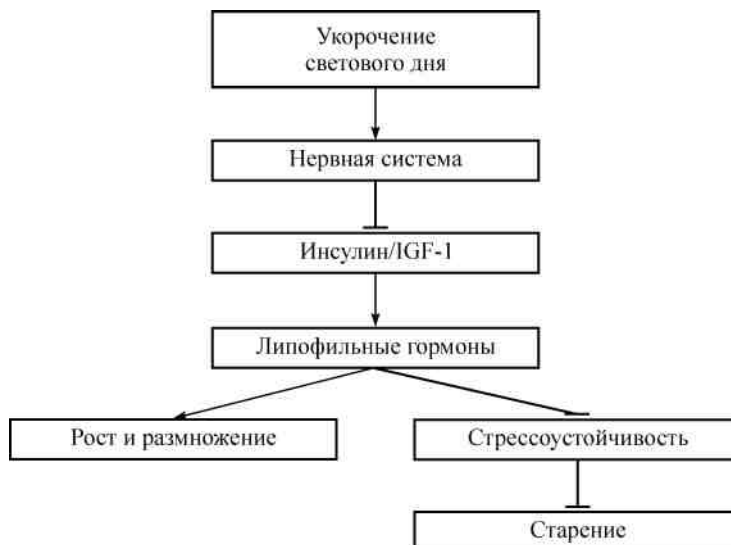


Рис. 12. Механизм системного воздействия светового режима на репродукцию и продолжительность жизни через нейро-эндокринную регуляцию.

с 12 до 24 ч не сопровождалось дальнейшим сокращением продолжительности жизни, тогда как темнота приводила к значительному ее продлению (рис. 11).

Каким образом уменьшение длины светового дня связано с замедлением старения и увеличением продолжительности жизни? Продолжительность жизни находится в прямой зависимости от стрессоустойчивости (рис. 12). Вырабатываемые в нервной системе животных в ответ на благоприятные внешние стимулы (запах и вкус пищи, оптимальные температуры и нормальный фотопериод) инсулин/IGF-1-пептиды стимулируют в эндокринной системе выработку вторичных гормонов липофильной природы (дафахроновой кислоты у нематод, ювенильного гормона и экдизона у насекомых, тиреоидных гормонов у млекопитающих), которые запускают в тканях-мишенях процессы роста и деления клеток, стимулируют функцию гонад, в то же время подавляя стресс-ответ и ускоряя старение (см. гл. 3). В ответ на ухудшение внешних условий (возможно, и при укорочении длины светового дня, предвещающем скорое наступление холодов) у животных подавляется активность инсулин/IGF-1-сигналинга и вторичных гормонов. В результате происходит угнетение процессов роста и размножения, но деблокируются процессы стресс-ответа. Активируются транскрипционные факторы семейства FOXO, запускающие эксп-

рессию генов ферментов детоксификации свободных радикалов и репарации ДНК, белков теплового шока и ингибиторов циклинзависимых киназ, угнетающих клеточный рост и деление (Baumeister et al., 2006; Giannakou, Partridge, 2004; Huang, Tindall, 2006). Клетка становится более устойчивой к стрессам, лучше справляется со спонтанными повреждениями, что снижает скорость старения организма в целом.

4.6. Воздействие ионизирующей радиации

На протяжении всей истории жизни на Земле ионизирующая радиация в низких дозах выступает в качестве одного из средовых факторов, влияя на скорость эволюционных процессов. В результате аварии на Чернобыльской АЭС, деятельности химкомбината «Маяк», испытаний ядерного оружия и аварии на атомной станции «Три Майл Айленд» значительные территории подверглись радиоактивному загрязнению, живая природа оказалась под дополнительным воздействием хронического облучения в малых дозах. Несмотря на то что облучение низкой интенсивности не приводит к соматической гибели организма, оно способно модифицировать клеточно-тканевые процессы (вызывать образование свободных радикалов, разрывы ДНК, клеточное старение, апоптоз и компенсаторную пролиферацию), что в конечном итоге приводит к изменению такого комплексного показателя приспособленности, как продолжительность жизни. Длительность жизни является наиболее комплексным из подверженных влиянию радиации признаков, и ее изменение относится к отдаленным последствиям облучения (Москалев, 2004).

Изучение данной проблемы ведется с середины XX века. Изначально доказано, что большие дозы облучения приводят к преждевременному старению (Воробцова, 1963; Sacher, 1963). У большинства исследованных нами линий дрозофилы с дефектами репарации, у линии дикого типа и у мутантов по генам апоптоза (*th^{5C8}*, *dArk*) острое облучение в большой дозе (10 и 30 Гр) также снижает продолжительность жизни и размах ее изменчивости, а также активность мух по тесту на восхождение (*climbing assay*) (Москалев, 2004). В ряде исследований уменьшение продолжительности жизни в ответ на облучение наблюдается и при относительно малых дозах. Исследование зависимости доза-ответ при облучении самок мышей линии *B6C3F1* для дозах 0.1, 0.48 и 0.95 Гр в возрасте 7 дней показало укорочение жиз-280

ни и увеличение вероятности канцерогенеза. Облучение в дозах 0.48 и 0.95 Гр вызвало снижение продолжительности жизни на 6.2 и 10.2 % соответственно. Облучение в дозе 0.1 Гр также привело к небольшому (на 1.6 %) укорочению жизни (Sasaki, Fukuda, 2006).

Снижение продолжительности жизни при облучении обусловлено, прежде всего повреждением молекулы ДНК. Так, например, рентгеновское облучение снижает продолжительность жизни гаплоидных ос (*Habrobracon*) больше, чем диплоидных (Woodruff, Thompson, 2003). Таким образом, уменьшение продолжительности жизни в ответ на облучение может быть результатом стресс-индуцированного преждевременного старения клеток. Как известно, клеточное старение можно преждевременно индуцировать ДНК-повреждающими агентами (ионизирующей радиацией, оксидативным стрессом, хемотерапией) и избыточными митогенными стимулами, например активацией онкогенов (Keyes et al., 2005). Изменения нормальных фибробластов в ответ на облучение внешне похожи на стресс-индуцированное естественное старение и сопровождаются увеличением размеров клеток и их уплощением (Naka et al., 2004). Как облученная, так и стареющая клетки теряют способность удваивать ДНК и блокируются в G1/S-фазе клеточного цикла (Chang, 1997; Crompton, 1997). Кроме того, повреждение ДНК при облучении в дозе 1 Гр приводит к стресс-индуцированному старению стволовых клеток (к появлению соответствующих биомаркеров) (Geiger et al., 2005).

Как запускается старение клеток в ответ на облучение? При воздействии ионизирующей радиации (повреждении ДНК) киназа АТМ фосфорилирует (активирует) Chk2, которая в свою очередь индуцирует функцию p53 и BRCA1 или представителей семейства CDC25-фосфатаз. В результате индуцируются проверочные точки и задержка клеточного цикла в G1-, S- или G₂/M-фазах. Как известно (см. гл. 2), старение клеток также связано с фосфорилированием Chk2 и очаговым накоплением γ -H2AX — посредника АТМ-регулируемого сигналинга, активируемого двуцепочечными разрывами ДНК (Gire et al., 2004). Вместе с тем, облучение, как и клеточное старение, сопровождается фосфорилированием митоген-активируемой протеинкиназы p38 (p38 MAPK), опосредующей сигналинг, ведущий к старению клетки. Еще одной общей характеристикой является накопление ингибиторов циклинзависимых киназ p21 и p16, а также последующее прекращение синтеза ДНК и появление окрашивания на β -галактозидазу (Naka et al., 2004). Кроме того, индуцированная активность p53 в ответ на воздействие γ -излучения подавляет экспрессию p63, отсрочивающего старение клетки (Papazoglu, Mills, 2007). Та-

ким образом, сходство между клеточным старением и эффектами радиации имеет место и на биохимическом уровне.

Стареющие клетки перестают участвовать в процессах тканевой репарации (к которой следует отнести пролиферацию, дифференцировку, апоптоз), что снижает функциональные свойства ткани и стрессоустойчивость организма, увеличивая при этом вероятность гибели особи. Такие клетки, как правило, дисфункциональны (секретируют металлопротеиназы, разрушающие внеклеточный матрикс, факторы роста эпителия, воспалительные цитокины) и могут активно разрушать структуру нормальной ткани и вызывать воспалительные реакции (Campisi, 2005).

Неблагоприятные эффекты малых доз ионизирующей радиации для продолжительности жизни, помимо клеточного старения могут модифицироваться такими специфическими для них реакциями, как «эффект свидетеля», апоптоз, гиперчувствительность клеток в G₂/M-фазе клеточного цикла (т. е. активно пролиферирующих клеток), геномная нестабильность (Limoli et al., 1998; Short et al., 2003). Помимо непосредственного повреждения молекулы ДНК радиация (и другие стрессы) может дестабилизировать геном через активацию мобильных генетических элементов. Действительно, транспозоны способны индуцироваться различными стрессорными воздействиями (Васильева и др., 1997). Ретротранспозоны *Ty5-1*, накапливающиеся в субтеломерной области хромосом *Saccharomyces cerevisiae*, активируются в ответ на стресс и индуцируют повреждения ДНК (Voytas, 1996). У нематод промоторы генов транспозазы богаты элементами связывания белков теплового шока, что может обуславливать их роль в стресс-ответе (McElwee et al., 2004). В эмбрионах дрозофилы, имеющих соматически активную Р-транспозазу, частота эксцизий Р-элемента возрастает с дозой у-облучения в диапазоне от 5 до 35 сГр (Handler, Gomez, 1997). Активация ионизирующим облучением ретротранспозона *LINE-1* в клетках млекопитающих приводит к запуску механизмов запрограммированной клеточной гибели (апоптозу) (Servomaa, Rytomaa, 1990).

Организмы, живущие в аэробных условиях, вынуждены были приобрести эффективные клеточные механизмы детоксификации активных форм кислорода — антиокислительные ферменты и соединения (Miura, 2004). Миллиарды клеток организма подвергаются бомбардировке естественной ионизирующей радиацией, часть которой исходит от эндогенной естественной радиоактивности, составляющей 9 кБк. Практически все клетки тела ежегодно испытывают хотя бы одно событие радиационного поражения, многие — несколько раз (Cameron, 2005). Ионизирующая радиация — это оксидативный и генотоксический стресс одновременно.

Следовательно, эволюция должна была выработать эффективные способы защиты от малых доз облучения. Поэтому не вызывает удивления тот факт, что рентгеновское и γ -излучение в малых и средних дозах иногда увеличивает продолжительность жизни разных модельных объектов (насекомых, мышей и крыс). Это так называемый «радиационный гормезис», т. е. стресс-ответ с позитивными последствиями, превышающими повреждающее действие. Значение такого эффекта, как правило, невелико и составляет 10—20 % (Le Bourg et al., 2000; Upton, 2001; Rattan et al., 2004).

Например, облучение дрозофил в дозе 50—75 сГр на стадии эмбриона приводит к увеличению продолжительности жизни и к повышенной устойчивости к разрывам ДНК (Vaiserman, Voitenko, 2003). Воздействие ионизирующей радиации на самцов мышей линии *C57BL* в дозе 50 сГр в возрасте 7 дней привело к увеличению продолжительности жизни (Maisin et al., 1996). Хроническое облучение мышей в дозах 70 и 140 мЗв/год увеличивало продолжительность жизни на 22.6 %; воздействие в дозе 100—800 мЗв/год продлеvalo жизнь по крайней мере на 20 % (Parsons, 2002).

По результатам исследования здоровья и продолжительности жизни британских радиологов за 100 лет (1897—1997 гг.), среди тех, кто выбрал данную профессию до 1920 г., наблюдали увеличение риска возникновения рака на 75 %, что связано с большими величинами полученных доз. Однако смерть, не связанная с раком, в этой группе была ниже на 14 %. Лица, ставшие радиологами после 1920 г., также отличались снижением нераковой смертности на 14 % и общей смертности — на 8 %. Изучение продолжительности жизни у британских радиологов, работавших в 1955—1979 гг., выявило снижение уровня их смертности от нераковых заболеваний на 36 % по сравнению с контролем (Cameron, 2003). Данные обследований сотрудников предприятий, имеющих дело с ионизирующей радиацией, свидетельствуют о значительном снижении у них уровня смертности от не связанных с раком причин. Рабочие заводов ядерных подводных лодок, получившие наибольшую накопленную дозу, имели снижение уровня смертности от рака на 15 %, не связанной с раком смертности — на 31, общей смертности — на 24 % по сравнению с необлученными рабочими тех же предприятий. В одной из таких работ эффект увеличения продолжительности жизни составил примерно 3 года. Сравнение уровня заболеваемости раком в областях США с самым высоким естественным фоном показало его снижение на 15 % (Cameron, 2005). Аналогичные данные получены для популяций человека в Китае и Индии, постоянно проживающих на территориях с повышенным в десятки раз естественным радиационным фоном (Parsons, 1999).

Зачастую этот эффект связывают со снижением темпов смертности от инфекций и других неопухолевых заболеваний в первой половине жизни при остающихся неизменными частотах возникновения опухолей и той же максимальной продолжительности жизни. Малые дозы радиации стимулируют иммунитет и пролиферацию, индуцируют репарацию ДНК, подавляют функцию гонад (Upton, 2001). Таким образом, увеличение продолжительности жизни в результате хронического облучения может быть объяснено стабильной активацией механизмов клеточной защиты, противодействующих повреждению (Weinert, Timiras, 2003).

В наших экспериментах на дрозофиле наблюдается существенное повышение медианной и максимальной продолжительностей жизни в результате облучения в диапазоне средних доз (Москалев, 2004). Представляется ли возможным объяснить эти результаты лишь активацией репарации ДНК? Из анализа явления адаптивного ответа мы знаем, что стимуляция репарации длится всего несколько часов (Пелевина и др., 1999). В наших экспериментах облучение проводили только на предимагинальных стадиях, а эффект наблюдали спустя месяцы. Более того, эффект небольшого увеличения продолжительности жизни иногда отмечается даже у линий дрозофилы с нарушениями репаративной способности (Москалев, Зайнуллин, 2004).

Считается, что одной из причин так называемого «программирования» (процесса, вследствие которого воздействие факторов среды на критических стадиях раннего онтогенеза может определять состояние здоровья на последующих стадиях жизни) может быть ферментативный «импринтинг», когда воздействие определенных индукторов в раннем онтогенезе приводит к долговременным изменениям экспрессии индуцированных генов (Вайсерман и др., 2000). В основе самого «импринтинга» могут лежать индуцированные эпигенетические изменения (обычно ассоциируемые с генетической нестабильностью), в том числе транспозиции мобильных генетических элементов и изменение степени метилирования ДНК и гистонов. Экспериментально установлено, что следствием «импринтинга» определенных ферментов может быть как уменьшение, так и увеличение продолжительности жизни. Например, вследствие ферментативного «импринтинга» под действием фенобарбитала, влияющего на микросомальные монооксигеназы печени крыс, средняя продолжительность жизни самок увеличилась на 17.5 % по сравнению с соответствующим показателем для контрольных животных (Вайсерман и др., 2000).

Однако даже явление ферментативного «импринтинга», на наш взгляд, не в состоянии объяснить отмеченные нами эффекты, например межлинейные отличия влияния малых доз радиации

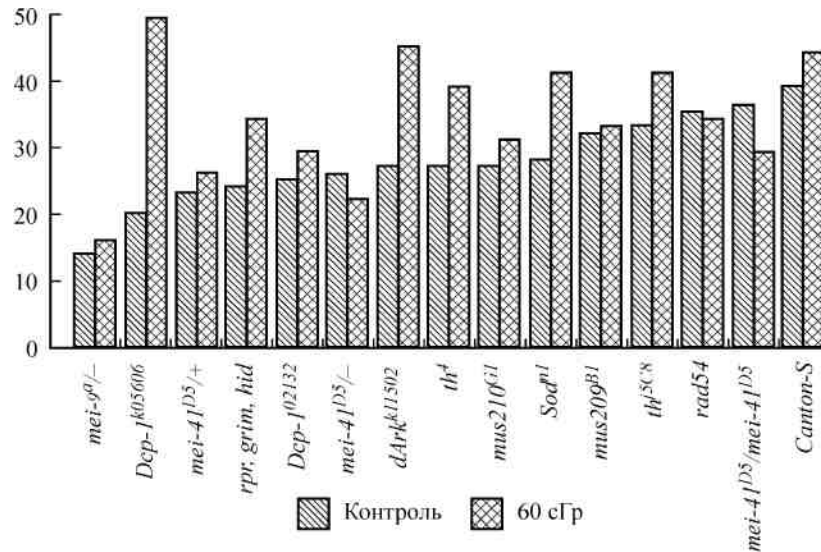


Рис. 13. Медианная продолжительность жизни линий дрозофилы с deregulating апоптоза (мутациями генов *grim*, *hid*, *reaper* (*rpr*), *Dcp-1*, *dArk*, *th*, разные аллели), мутациями генов репарации (*rad54*, *mus210*, *mus209*, *mei-9*, *mei-41*, разные аллели) и антиоксидантной защиты (*Sod*) и линии дикого типа (*Canton-S*) после хронического облучения малыми дозами ионизирующей радиации (по: Москалев, 2004).

По горизонтали — обозначение линии дрозофилы; по вертикали — возраст, сутки.

у линий с разной чувствительностью к индукции апоптоза и с дефектами репарации и антиоксидантной защиты (рис. 13). К тому же само явление ферментативного «импринтинга» пока отмечено лишь для действия факторов химической природы, но не для радиации (Москалев, 2004).

По-видимому, радиационный гормезис — эволюционная адаптация, возникшая как метаболический ответ на внешнесредовые стрессы, из которых на долю радиации приходится лишь небольшая часть. Гормезис служит частью генерализованного стресс-ответа (Parsons, 2002). Таким образом, ответ на вопрос о причинах гормезиса следует искать среди механизмов общей стрессоустойчивости клетки и организма (к генотоксическому, окислительному и температурному стрессам). Не вызывает сомнений, что умеренные генотоксический и окислительный стрессы, вызванные ионизирующей радиацией в малых дозах, по-видимому, стимулируют на клеточном уровне компенсаторные механизмы, хорошо известные современным геронтологам. Вполне вероятно, что это — кон-

сервативные в эволюции (обнаруживаемые у дрожжей, нематод, дрозофил, млекопитающих и человека) стресс-индуцируемые механизмы (подавление сигналинга инсулин/IGF-факторов роста, активация JNK-киназ и SIRT-деацетилаз), каждый из которых в конечном итоге приводит к активации транскрипционных факторов FOXO.

Возможный кандидат, претендующий на регуляторную роль в радиационном гормезисе, — деацетилаза SIRT1, которая деацетилирует разнообразные белки, включая p53 и FOXO. Такое деацетилирование подавляет p53- и FOXO-опосредованный апоптоз в ответ на облучение (Giannakou, Partridge, 2004; Motta et al., 2004). При воздействии γ -радиации SIRT1 усиливает репарационную способность клетки. Эктопическая экспрессия SIRT1 стимулирует репарацию разрывов ДНК, вызванных облучением. Напротив, РНК-интерференция SIRT1 снижает репарацию. Возможным механизмом данного эффекта является деацетилирование репарационного белка Ku70 (Jeong et al., 2007). Киназа JNK также фосфорилирует и активирует FOXO в ответ на оксидативный стресс и УФ-облучение (Luo et al., 2007).

Ключевая роль FOXO-зависимого механизма в радиационном гормезисе имеет следующие подтверждения:

1) данный механизм запускается ионизирующей радиацией, оксидативным и тепловым стрессом (Giannakou, Partridge, 2004; Yang et al., 2006);

2) мутации у нематод, дрозофил и мышей, сопровождающиеся сверхактивацией FOXO, JNK или SIRT, приводят к долгожительству (Giannakou, Partridge, 2004; Matsumoto, Accili, 2005; Oh et al., 2005);

3) эти же мутанты характеризуются устойчивостью к оксидативному и тепловому стрессам;

4) FOXO трансактивирует антиоксидантные белки, ферменты репарации, белки теплового шока и тканевой репарации (апоптоза) (Giannakou, Partridge, 2004; Huang, Tindall, 2006; Lam et al., 2006).

SIRT1, JNK и FOXO, индуцируемые радиацией в малых дозах, модифицируют активность эшелонов клеточно-тканевой защиты — антиоксидантной системы, репарации ДНК и шаперонов, кроме того, они регулируют апоптоз нерепарированных клеток. Индуцируя механизмы стресс-ответа, клетка может перейти на новый уровень защиты; при этом она лучше справляется с последующими спонтанными и индуцированными повреждениями. Необходимым шагом такого перехода являются радиационно-индуцированные эпигенетические изменения, ведущие к ферментативному импринтингу. Активация деацетилазы гисто-

нов **SIRT1** может принимать непосредственное участие в этом процессе.

Действительно, факторы устойчивости к генотоксическому стрессу, играющие важную роль в естественном старении, определяют также радиационную устойчивость и стабильность генома. Как показывает образование скоплений γ -H2AX, даже малая доза равная 1 мГр, способна вызывать образование двухцепочечных разрывов ДНК и обуславливать привлечение к месту повреждения ферментов репарации (Miura, 2004). Облучение клеток карциномы легких человека малыми дозам γ -радиации усиливает темп репарации тимингликола — одной и основных форм поврежденных оснований (Souza-Pinto et al., 1999). Подвергшиеся облучению личинки дрозофилы, у которых отсутствует p53, имеют меньше шансов сформировать жизнеспособную особь (Bauer et al., 2005). Но-каутные мыши по любому из трех компонентов ДНК-протеин-киназного комплекса имеют повышенную радиочувствительность (Espejel et al., 2004). В то же время даже однократное облучение мышей в малых дозах предотвращает увеличение спонтанного уровня цитогенетических повреждений при старении животных спустя 12 месяцев после воздействия (Заичкина и др., 2003).

Одним из эффекторных путей FOXO-зависимого стресс-ответа является индукция белков теплового шока. Играют ли они роль в радиационном ответе? В естественных популяциях уровни белков теплового шока отражают эволюционную адаптацию к периодам экстремального стресса, особенно к температурным возмущениям (Parsons, 2002). Однако индукция гена *hsp70* в клетках яичника китайского хомячка на уровне мРНК может вызываться и γ -радиацией (Sierra-Rivera et al., 1993). У мышей белки теплового шока Hsp70.1 и Hsp70.3 индуцируются как эндогенными, так и экзогенными стрессорными воздействиями. Нулевые мутации в этих генах приводят к появлению нестабильности генома, усиливающейся тепловым стрессом, поскольку такие клетки характеризуются более высокой частотой объединения хромосомных концов. Ионизирующая радиация в клетках с выключенной функцией *Hsp70.1* и *Hsp70.3* приводит к большему числу хромосомных aberrаций, радиорезистентному синтезу ДНК (признак нестабильности генома), а также к увеличению доли гибнущих клеток и уровня онкогенной трансформации по сравнению с контрольными клетками. Тепловой шок, предваряющий воздействие ионизирующей радиации, еще более увеличивает частоту гибели клеток и их трансформаций, а также повреждения хромосом в фазе S. Таким образом, Hsp70.1 и Hsp70.3 играют важную роль в поддержании стабильности генома в условиях радиационного стресса (Hunt et al., 2004).

Фибробласты мышей с нокаутной мутацией *Hsf-1* или с нормальной активностью данного транскрипционного фактора подвергли воздействию теплового шока в присутствии кверцитина (ингибитора HSF-1) или без него, а затем — большой дозы облучения (4—6 Гр). Предобработка тепловым шоком, увеличивающая активность белков теплового шока, повышала выживаемость облученных клеток дикого типа. Данный эффект подавлялся кверцитином и отсутствовал в клетках с нокаутом *Hsf-1*. Сверхэкспрессия *Hsf-1*, *Hsp70* или *Hsp27* увеличивала радиорезистентность клеток даже при отсутствии предваряющего теплового шока (Kubakov et al., 2006). Термоустойчивый клон радиационно-индуцированной фиброкарциномы характеризуется адаптивным ответом, тогда как сама фиброкарцинома его не проявляет. После трансфекции индуцибельного *Hsp70* в клетки нетермоустойчивой фиброкарциномы они тоже стали проявлять адаптивный ответ, сопровождающийся активацией протеинкиназы С (PKC). Трансфекция *Hsp70* в эмбриональные клетки мыши также сделала их радиоустойчивыми, а предобработка клеток ингибиторами PKC привела к исчезновению такой радиоустойчивости (Park et al., 2000).

Каков механизм участия *Hsp70* в радиационном гормезисе? Стресс-индуцибельный *Hsp70B* стимулирует эксцизионную репарацию оснований (активность урацилгликозилазы). Эксцизионная репарация в облученных клетках лейкемии индуцируется предобработкой экзогенным рекомбинантным *Hsp70*. Воздействие малыми интерферирующими РНК, ингибирующими синтез *Hsp70*, напротив, снижает репарацию. Аналогичным образом меняется и выживаемость клеток (Bases, 2006). *Hsp70* связывается (помимо уже упоминавшейся PKC) с апурин/апиримидинэндонуклеазой и усиливает специфическую эндонуклеазную активность HAP1, участвуя таким образом, в репарации повреждений ДНК. *Hsp70* также взаимодействует с субъединицей теломеразы TERT и с ключевыми регуляторами клеточного цикла — p53, Cdk4, pRb, p27/Kip1, cMyc, Wee-1 (Hunt et al., 2004).

Кроме индукции белков теплового шока к FOXO-зависимым горметическим эффектам в ответ на облучение можно отнести индукцию временной задержки клеточного цикла, необходимую для репарации ДНК и переключение клетки с биосинтеза белков клеточного роста на преимущественную трансляцию мРНК стресс-белков. Облучение, как и ряд других стрессов, приводит к активации кэпнезависимого пути трансляции через сайты внутреннего рибосомного входа. Данный эффект опосредован индукцией 4EВР, FOXO-зависимого ингибитора 5'-кэп мРНК-связывающего белка eIF4E (Tettweiler et al., 2005). Кроме того (см. гл. 3), FOXO стимулирует экспрессию белка репарации ДНК (GADD45),

ингибитора циклинзависимых киназ (p27), антиоксидантных ферментов (SOD, каталазы).

Важную роль при действии малых доз радиации на ранних стадиях развития, по-видимому, играет элиминация (апоптоз) чувствительных к старению клонов клеток со слабой антиоксидантной и репаративной способностью, т. е. тех клеток, которые будут быстрее стареть. Это подтверждается (рис. 13) более выраженным радиационным гормезисом по продолжительности жизни у мутантов дрозофилы по апоптозу (Moskalev, 2003, 2007; Москалев, Зайнуллин, 2004). Клетки, не справившиеся с повреждением и погибающие на ранних стадиях развития организма, быстро замещаются за счет пролиферации устойчивых соседних клеток — это так называемая «апоптоз-индуцируемая компенсаторная пролиферация». Дело в том, что погибающие клетки выделяют цитокины, стимулирующие пролиферацию соседних клеток (Kondo et al., 2006).

Проблема наследования продолжительности жизни потомков, родители которых были подвергнуты облучению, является одной из слабо разработанных в радиационной генетике и биологии старения, а влияние малых доз практически не исследовано с этой точки зрения. Теоретический аспект данной проблемы очевиден: он касается выяснения роли наследственного аппарата при формировании такого важного индивидуального и популяционного показателя, как продолжительность жизни. В связи с возросшей антропогенной нагрузкой на экосистемы повысилось и практическое значение подобных исследований (Измайлов и др., 1990).

Нами установлено, что динамика медианной продолжительности жизни двух необлученных линий дрозофилы дикого типа, *Canton-S* и *Oregon-R spa*, различается. У необлученной гетерогенной линии *Canton-S* можно выделить высокоамплитудные циклические колебания с периодом, равным примерно четырем поколениям, не совпадающие по фазе с колебаниями у инбредной линии *Oregon-R spa* (рис. 14). Характер изменения медианной продолжительности жизни в поколениях в условиях хронического облучения зависел от уровня генетической гетерогенности. В условиях хронического облучения в поколениях у лабораторной линии дикого типа *Canton-S* с пятого поколения циклические колебания исчезают, а значения медианной продолжительности жизни выходят на плато. Таким образом, хроническое облучение приводит к нарушению естественной циклической динамики средней продолжительности жизни гетерогенных линий дрозофил, открытой в конце 80-х годов XX века Ф. Линтцем (Lints et al., 1989) и Д. М. Измайловым (Измайлов и др., 1990). После 11-го поколения облучения наблюдается тенденция к увеличению продолжи-

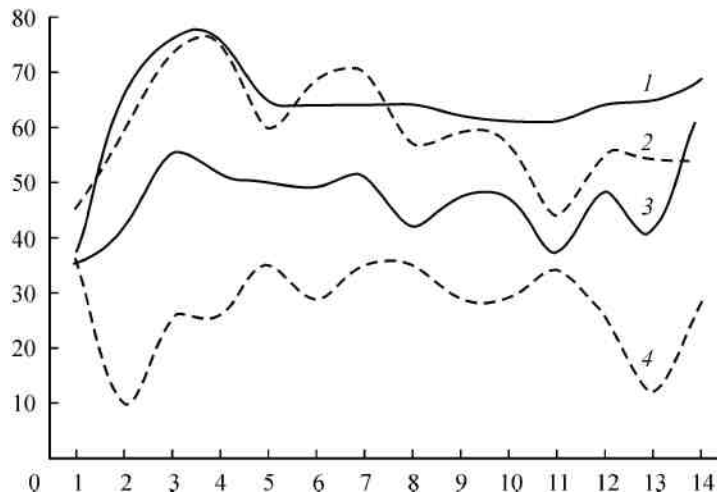


Рис. 14. Динамика медианной продолжительности жизни гетерогенной (*Canton-S*) и изогенной (*Oregon-R*) линий дикого типа дрозофилы в течение 14-ти поколений хронического облучения и в контроле (по: Москалев, Зайнуллин, 2006).


По оси абсцисс — номер поколения облучения; по оси ординат — возраст, сутки. 1 — облученная линия *Canton-S* (60 сГр на поколение); 2 — контроль линии *Canton-S*; 3 — облученная линия *Oregon-R* (60 сГр на поколение); 4 — контроль, линия *Oregon-R*.

тельности жизни. В результате хронического облучения практически во всех поколениях у лабораторной линии *Oregon-R spa* происходит увеличение медианной продолжительности жизни по сравнению с необлученным контролем. Это может свидетельствовать о положительном влиянии на продолжительность жизни радиационно-индуцированного увеличения уровня генетической гетерогенности по сравнению с необлученной изогенной популяцией.

Поскольку экспериментальные воздействия осуществляют на высокоинбредных популяциях модельных животных, гормезис вследствие отмены инбредной депрессии может накладывать свой отпечаток на результаты, что важно учитывать при планировании экспериментов (Москалев, Зайнуллин, 2006).

Таким образом, в данном разделе представлен обзор достижений в области генетических исследований влияния ионизирующей радиации на продолжительность жизни. Высказано предположение, что эффекты снижения продолжительности жизни в результате воздействия ионизирующей радиации могут быть обусловлены индукцией генов, участвующих в клеточном старении

(p38, p53, p21, p16). Увеличение продолжительности жизни, наблюдаемое при облучении в малых и средних дозах, по-видимому, связано со стресс-индуцированной активностью транскрипционных факторов семейства FOXO, которые в зависимости от глубины окислительного или генотоксического стресса активируют гены стрессоустойчивости (**Mn-Sod**, ген каталазы, **GADD45, p27, HSP70**), обуславливающие остановку роста, запуск репарации, а также усиление антиоксидантной защиты, и гены апоптоза (**Bim, FasL, Bcl-6**). Как индукция стрессоустойчивости, так и апоптоз поврежденной клетки могут замедлять процессы старения организма. В поколениях, подвергшихся хроническому облучению, увеличение продолжительности жизни может быть обусловлено снятием инбридинговой депрессии в популяциях лабораторных животных.



Глава 5 РЕПРОДУКТИВНАЯ СИСТЕМА И СТАРЕНИЕ

5.1. Антагонизм репродукции и долгожительства

Гипотетический организм, «демон Дарвина», начинает репродукцию при рождении и продолжает оставлять потомство всю свою долгую жизнь. Естественный отбор способствует такой одновременной максимизации репродукции и продолжительности жизни, поскольку это приводит к увеличению генетического вклада особи в следующее поколение. Однако в реальном мире эти два признака часто демонстрируют обратную взаимосвязь друг с другом (Partridge et al., 2005a). Только в мире, где ресурсы неограниченны, гибель особей не является необходимой. Неограниченный рост биомассы бактериальной культуры на 14-й день превысит биомассу всех форм жизни на земле. Спустя 200 поколений количество бактерий уже превысило бы число атомов во вселенной. Репродукция ведет организмы к постоянному обгону количества доступных ресурсов. Следовательно, элиминация избыточных особей-предшественников и их конкуренция за пищу дают эволюционное преимущество для генов их потомков (Heininger, 2002). Старение (в виде репродуктивного старения) появляется уже у асимметрично делящихся одноклеточных организмов, таких как некоторые прокариоты (например, *Caulobacter crescentus*) и одноклеточные эукариоты, в качестве адаптации к стационарной фазе роста и размножения при недостатке пищевых ресурсов (Heininger, 2002).

В современной геронтологии взаимосвязь продолжительности жизни и репродукции рассматривается с двух позиций: 1) ограниченная продолжительность жизни — это прямая «цена за репродукцию», отвод ограниченных ресурсов (белков, липидов, энергии) от соматического роста и поддержания жизнеспособности данной особи (Patel et al., 2002); 2) продолжительность жизни мо-

дифицируется молекулярными сигналами, продуцируемыми гонадами (Hsin, Kenyon, 1999).

Обратная зависимость между репродукцией и продолжительностью жизни подразумевается эволюционными теориями старения — теорией антагонистической плейотропии (генетический компромисс) и теорией отработанной сомы (метаболический компромисс) (Williams, 1957; Kirkwood, 1977) и доказывается многочисленными экспериментами. В середине XX века Мейнард Смит впервые показал связь репродукции и продолжительности жизни у дрозофилы и наблюдал компромисс приспособленности и долгожительства (Smith, 1958). Кроме того, существование в природе видов, являющихся или «г-стратегами» (высокая плодовитость и короткая продолжительность жизни), или «К-стратегами» (небольшое потомство и долгожительство), наглядно демонстрирует эволюционную роль такого антагонизма (Muller et al., 2001). В данный момент экспериментально подтверждено, что репродукция оплачивается снижением выживаемости. Например, виргинные самки средиземноморской мухи живут значительно дольше, чем скрещивающиеся. Самки дрозофилы с высоким темпом яйцепродукции (в результате как внешнесредовых, так и генетических манипуляций) имеют сниженную продолжительность жизни по сравнению с контролем (Davies et al., 2005).

Так называемая «цена за репродукцию» состоит из затрат на яйцепродукцию и на само скрещивание. Так, у самок отмечена значительная «цена» самого спаривания, возникающая в результате восприятия вместе с семенной жидкостью «полового пептида», угнетающе действующего на их приспособленность. Для самцов цена за репродукцию возникает преимущественно в результате активности, связанной со скрещиванием, например при ухаживании и копуляции (Davies et al., 2005). Подробнее этот аспект проблемы будет освещен в разд. 5.2.

Темп смертности дрозофил резко возрастает в начале старения, но несколько замедляется в старости. Вполне вероятно, что старение эволюционировало как результат повреждающего действия ранней репродукции, что сопровождалось ускорением смертности в начале репродукции с последующим ее замедлением после пика размножения. Известно, что у линий дрозофилы с поздней репродукцией продолжительность жизни всегда выше, чем у линий с ранней репродукцией. Доминантная мутация *ovo^{DI}* останавливает оогенез на стадии 4. Скрещивание самцов с данной мутацией с самками линий, отселектированных на раннюю («молодая» линия) и позднюю («старая» линия) репродукцию, привело к исчезновению различий в смертности между этими линиями. Мутация *ovo^{DI}* вызвала продление жизни, более выраженное у «моло-

дой» линии, чем у «старой», как и предполагает гипотеза о роли ранней плодовитости в определении смертности (Sgro, Partridge, 1999). Анализ взаимодействия между возрастным паттерном яйцепродукции и смертностью самок средиземноморской мухи (*Ceratitis capitata*) показал, что индивидуальная гибель связана с динамикой траектории яйцепродукции. В выборке из 531 мухи каждая особь имела характерную динамику изменения скорости откладки яиц с возрастом, предопределяющую индивидуальную скорость репродуктивного истощения, по которой можно было предсказывать смертность. Чем больше был остающийся репродуктивный потенциал, тем ниже последующая смертность (Muller et al., 2001).

По-видимому, «цена за репродукцию» наиболее выражена при неблагоприятных условиях существования вида, когда в полной мере проявляются генетический и метаболический компромиссы приспособленности. В отличие от постоянного давления на популяцию неблагоприятных факторов среды, приводящего у короткоживущих видов к отбору в пользу максимальной ранней репродукции и ускоренному старению, умеренные стрессовые воздействия (пищевой, температурный, окислительный, осмотический и генотоксический стрессы) могут вызывать гормезис — увеличение продолжительности жизни. Однако зачастую такое увеличение сопровождается состоянием диапаузы, т. е. снижения или остановки репродукции.

Так, уже упоминавшаяся бабочка-монарх характеризуется исключительной долговечностью перезимовывающих мигрантов, которые пребывают в состоянии репродуктивной диапаузы вследствие подавления синтеза ювенильного гормона (Herman, Tatar, 2001). В ответ на понижение температуры окружающей среды и короткую фотофазу дрозофила также вступает в поверхностную репродуктивную диапаузу, приводящую к задержке оогенеза и замедлению старения (Tatar, 2004). Ограничение диеты увеличивает продолжительность жизни у большинства организмов. Единичные мутации, например в инсулин/IGF-1-сигналинге, контролирующем рост и метаболизм, также способны продлевать жизнь у эволюционно далеких организмов, таких как нематоды, дрозофилы и грызуны. Наряду с долгожительством снижение инсулинового сигналинга и ограничение диеты могут уменьшать, задерживать или отменять способность оставлять потомство у дрозофил, нематод, крыс и мышей (Partridge et al., 2005a). Таким образом, в условиях низкой вероятности выживания потомства ресурсы организма перераспределяются в пользу переживания неблагоприятных условий.

Регуляторные пути фертильности и старения тесно связаны. Исследования механизмов, регулирующих продолжительность

жизни, привели к идентификации эндокринных сигнальных каскадов, контролируемых как старение, так и плодовитость. Сигналинг инсулина является одним из таких путей. У нематоды *Caenorhabditis elegans* он влияет на фертильность и старение антагонистическим образом. При благоприятных условиях и обилии пищи выработка инсулина активизирует процессы роста и размножения, одновременно подавляя стрессоустойчивость и снижая длительность жизни (Seehuus et al., 2006). У *C. elegans* снижение активности вителлогенин-кодирующих генов *vit-2* и *vit-5* (регулируемых рецептором *Daf-2* желточных белков) увеличивает продолжительность жизни (Seehuus et al., 2006). Возможно, что инсулиноподобные сигналы регулируют старение нематод через вторичные сигналы — стероиды (Tatar, 2004). При этом снижение функционирования *DAF-2* (инсулиноподобного рецептора) с помощью РНК-интерференции на стадии личинки влияет только на плодовитость взрослой особи, тогда как подавление этого рецептора на взрослой стадии изменяет только продолжительность жизни. Следовательно, можно сделать вывод, что плодовитость и продолжительность жизни у нематод регулируется инсулиновым сигналингом независимо друг от друга (Giannakou et al., 2004). У нематод спаривание снижает продолжительность жизни гермафродитов вдвое. Хотя данный эффект не зависит от гена *daf-2*, но он опосредован *daf-16* (подавляемым инсулиновым сигналингом транскрипционным фактором семейства FOXO) (Gems, Riddle, 2000).

У *Drosophila melanogaster* инсулиновый путь также увеличивает репродуктивную способность взрослых особей, обеспечивая рост яичников при развитии личинки и снижение продолжительности жизни взрослых самок (Seehuus et al., 2006). Яичники мутантных по инсулиновому пути самок дрозофилы напоминают таковые в состоянии репродуктивной диапаузы. Велика вероятность того, что мутация рецептора инсулина увеличивает продолжительность жизни через механизм, подобный диапаузе и основанный на подавлении ювенильного гормона. Действительно, обработка *InR*-мутантов аналогом ювенильного гормона возобновляет оогенез и восстанавливает нормальную продолжительность жизни. Кроме того, *corpus allata* мутантных мух (у мутантов с нарушением как рецептора инсулина — *InR*, так и его субстрата — *Chico*) вырабатывает меньше ювенильного гормона (около 70 % от наблюдаемой у дикого типа), при этом размеры самой железы соответствуют норме. По-видимому, инсулиновый сигналинг напрямую регулирует нейроэндокринную активацию *corpus allata*, синтез и секрецию ювенильного гормона (Tatar, 2004).

Таким образом, у дрозофилы ювенильный гормон является частью инсулинового механизма. Он антагонистически регулирует экспрессию гена *vitellogenin* (предшественника желточного белка) и продолжительность жизни. У мух ювенильный гормон увеличивает репродукцию самок, снижает устойчивость к оксидативному стрессу и укорачивает продолжительность жизни. Напротив, лишение дрозофил инсулинсинтезирующих клеток снижает фертильность, увеличивает устойчивость к оксидативному стрессу и увеличивает продолжительность жизни. Инсулиновые пептиды дрозофилы проходят через медиальный секреторный нейрон в *corpus cardiacum*, проецирующийся в вырабатывающий ювенильный гормон *corpus allatum*. Следовательно, гонадотропный сигналинг ювенильного гормона, контролируемый инсулином, регулирует устойчивость к окислительному стрессу и продолжительность жизни дрозофилы (Seehuus et al., 2006). У дрозофил сверхэкспрессия *dFOXO* в жировом теле взрослой мухи (эквивалент печени и белой жировой ткани млекопитающих) приводит к 20—50%-ному увеличению продолжительности жизни и к 50%-ному снижению плодовитости (количества отложенных яиц на самку). Влияния на продолжительность жизни у самцов не наблюдали (Giannakou et al., 2004). Из вышесказанного следует, что FOXO подавляет рост и размножение, но увеличивает стрессоустойчивость, а значит, и продолжительность жизни.

Как оказалось, гормоны, задействованные в размножение млекопитающих и человека, могут оказывать непосредственное регулирующее действие на FOXO. В зернистых клетках развивающегося яичника фолликуло-стимулирующий гормон (FSH) индуцирует фосфорилирование FOXO1 и его выход из ядра, подавляя транскрипторные эффекты (Cunningham et al., 2003). Эстроген индуцирует p21-активированную киназу 1 (Pak1), которая в свою очередь фосфорилирует и инактивирует FOXO1 PI3K-независимым образом (Mazumdar, Kumar, 2003). В ответ на действие эстрогена происходит также фосфорилирование и активация Akt/PKB, что вызывает PI3K-зависимое подавление FOXO1 (Lengyel et al., 2007). Активация рецептора андрогена также приводит к ингибированию FOXO1. Данная репрессия обусловлена непосредственным белок-белковым взаимодействием между FOXO1 и андрогеновым рецептором (Li et al., 2003). В свою очередь FOXO3a является ключевым активатором транскрипции гена α -рецептора эстрогена (*ER α*) (Guo, Sonenshein, 2004). FOXO3a формирует комплекс с FOXM1 для усиления FOXM1-зависимой транскрипционной активности экспрессии ER α (Madureira et al., 2006). FOXO1 увеличивает транскрипцию ER α через эстроген-респонсивные элементы. Напротив, ER α подавляет FOXO1-опосредо-

ванную трансактивацию через инсулин-респонсивную последовательность (Schoor et al., 2001). Следовательно, половые гормоны выключают FOXO при благоприятных для роста и размножения условиях среды, что снижает стрессоустойчивость и ускоряет старение организма. В то же время FOXO (наравне с увеличением стрессоустойчивости при неблагоприятных условиях среды) подготавливает клетки к более быстрому восприятию сигналов роста и размножения, когда условия станут вновь благоприятными.

Таким образом, условия окружающей среды (через естественный отбор в популяции или соматический стресс-ответ на уровне индивидуума) регулируют плодовитость и продолжительность жизни антагонистическим образом. В одних условиях стимулируется репродукция, но ускоряется старение, тогда как в других — увеличивается продолжительность жизни, но происходит подавление размножения. Другим важным аспектом проблемы следует считать изучение молекулярных механизмов влияния гонад на скорость старения.

Согласно распространенной точке зрения, репродукция сама по себе, или процессы, делающие ее возможной, напрямую наносят соматические повреждения (Partridge et al., 2005a). В 90-х годах XX века появились экспериментальные данные, указывающие на молекулярные механизмы участия герминативных клеток в формировании потенциала продолжительности жизни. Вскрылись факты, свидетельствующие о том, что при потере сперматогенеза круглыми червями *Caenorhabditis elegans* продолжительность их жизни увеличивается на 65 % (van Voorhies, 1992). Гибель герминативных клеток-предшественниц Z2 и Z3 увеличивает продолжительность жизни нематоды на 60 %, а также повышает устойчивость к окислительному стрессу. Это увеличение — не результат стерильности или отсутствия затрат на репродукцию, поскольку удаление целостной репродуктивной системы (герминативной линии и соматических гонад) не влияет на продолжительность жизни нематод. Скорее изменение продолжительности жизни индуцируется пролиферирующими стволовыми половыми клетками. Возможно, что стволовые половые клетки влияют на продолжительность жизни через воздействие на выработку стероидных гормонов (Guarente, Kenyon, 2000; Arantes-Oliveira et al., 2002). Для того чтобы животные, лишённые половых клеток, жили дольше, чем в норме, необходим ген, кодирующий DAF-12 — ядерный гормональный рецептор, и ген, кодирующий DAF-16 — транскрипционный фактор из семейства Forkhead. Подобный эффект воспроизводится генетически: мутанты *mes-1(bn7)*, теряющие половые клетки, являются долгоживущими, так же как и аналогичные *glp-1(q158)*-мутанты. Ген *glp-1* кодирует рецептор сигнала

пролиферации половых клеток, который вырабатывается клетками дистального конца соматической гонады. У *glp-1(q158)*-мутантов стволовые клетки **Z2** и **Z3** генерируют лишь небольшое число половых клеток, которые затем вступают в мейоз и дифференцируются как спермии. У обоих мутантов увеличение продолжительности жизни подавляется отсутствием *daf-16* и удалением клеток-предшественниц соматических гонад (Arantes-Oliveira et al., 2002).

Уменьшение продолжительности жизни вызывают только стволовые половые клетки — ни спермии, ни ооциты для этого не требуются. У нематоды, являющейся гермафродитным организмом, мутанты *fem-3(e1996)*, не продуцирующие спермии и развивающиеся как самки, имеют нормальную продолжительность жизни. Другие мутанты — *fog-1(q180)*, *fog-2(q71)* и *fog-3(q470)* — также живут обычное время. Мутанты *daz-1(tj3)*, предшественники ооцитов которых подвергаются апоптозу на стадии профазы мейоза, живут не дольше дикого типа (Arantes-Oliveira et al., 2002).

Таким образом, именно пролиферация половых клеток оказывает влияние на продолжительность жизни. Сверхпролиферация половых клеток укорачивает жизнь, а ее отсутствие — удлиняет. Механизм данного воздействия заключается в изменении продукции липофильного (стероидного) гормона, который служит лигандом ядерного рецептора **DAF-12**, у взрослых нематод регулирующим ядерную локализацию **DAF-16** в соматических тканях вне гонад (Arantes-Oliveira et al., 2002). Удаление половых клеток увеличивает продолжительность жизни, запуская транспортировку в ядро и активацию транскрипционного фактора **DAF-16/FOXO** в кишечнике. Репродуктивная система взаимодействует с кишечником через сигналинг липофильного гормона (Berman, Kenyon, 2006).

Логично предположить, что гены, отвечающие за синтез липофильного гормона, также будут влиять на продолжительность жизни. Мутации гена *daf-36* блокируют увеличение продолжительности жизни, вызванное потерей половых клеток. Ген *daf-36* кодирует гомолог Риске-подобных оксигеназ, участвующий в стероидогенезе и катализирующий первый шаг образования липофильного гормона — превращение холестерина в 7-дегидрохолестерин. Экспрессия **DAF-36** наиболее обширна в кишечнике — главной жирозапасающей ткани нематод. Далее гормональные предшественники из кишечника модифицируются в периферийных тканях, экспрессирующей другой фермент — **DAF-9** (Beckstead, Thummel, 2006; Rottiers et al., 2006). Белок **DAF-9** играет роль 3-кетостерол-26-монооксигеназы, модифицирующей 3-кетостеролы в лиганды рецептора **DAF-12** (D^4 -дафахроновую и D^7 -да-

фахроновую кислоты) (Beckstead, Thummel, 2006). Удаление половых клеток может приводить к долгожительству через стимуляцию *daf-9*-зависимого синтеза стероида прегненолона (Broué et al., 2007). Ген *daf-9* экспрессируется в эндокринных клетках в ряде тканей: гиподерме, сперматеке, специализированной паре клеток в головном ганглии (Beckstead, Thummel, 2006). Недостаток холестерина в пище имитирует мутации *daf-9* и *daf-12* (Beckstead, Thummel, 2006). При своем развитии личинки *daf-9* и *daf-12* интегрируют сигналы от инсулин/IGF-1-пути, опосредуя образование *dauer*. Следовательно, DAF-12 контролирует выбор между репродуктивным ростом и диапаузой *dauer*, возникающей при неблагоприятных условиях среды (Gerisch et al., 2007). В неблагоприятных условиях DAF-9 неактивен, в результате чего не связанный с лигандом DAF-12 останавливает репродуктивный рост. Соглашаясь с классической моделью регуляции ядерного рецептора, D⁴-дафахроновая кислота блокирует взаимодействие DAF-12 с его корепрессором DIN-1, значительно усиливая способность DAF-12 связывать коактиваторы и активировать экспрессию генов (Beckstead, Thummel, 2006). Ген *kri-1* кодирует консервативный белок с анкириновыми повторами, постоянно экспрессируемый в глотке и кишечнике на постэмбриональных стадиях. Ген *kri-1* (подобно *daf-9* и *daf-12*) подавляет увеличение продолжительности жизни, связанное с потерей половых клеток, но не влияет на продолжительность жизни животных дикого типа. Он действует независимо от DAF-2. При отсутствии половых клеток DAF-16 в кишечнике перемещается из цитоплазмы в ядро, что обеспечивает увеличение продолжительности жизни, а ген *kri-1* необходим для такого перемещения (Beckstead, Thummel, 2006).

Интересно отметить, что сигнал от клеток зародышевой линии подавляет не только продолжительность жизни, но и рост у шести видов нематод. Удаление предшественников половых клеток методом лазерного воздействия приводит к формированию гигантских особей. Стерильные мутанты также характеризуются гигантизмом. Тогда как сигнал продолжительности жизни зависит от активности DAF-16, сигнал ростовой репрессии не зависит ни от данного фактора, ни от белка DBL-1 (гомолога белка трансформирующего фактора роста), определяющего рост у нематоды. Следовательно, механизмы роста и продолжительности жизни у нематод различны (Patel et al., 2002).

Таким образом, повышенная репродукция у различных организмов часто ассоциирована со снижением продолжительности жизни, что может быть объяснено «ценой за репродукцию» и сигналингом герминативной ткани. Значит ли это, что обратная зависимость между репродукцией и продолжительностью жизни

должна быть облигатной? Нет, не значит, поскольку существуют возможности разъединения этих двух признаков (Barnes et al., 2006).

У *Drosophila melanogaster* в отличие от нематод, у которых удаление стволовых половых клеток увеличивает продолжительность жизни червей-гермафродитов, продолжительность жизни стерильных самок уменьшается. Исследования продолжительности жизни у мутантов *germ cell-less* и *tudor*, потерявших пролиферирующие герминативные клетки, показали снижение продолжительности жизни самок по сравнению с контролем, что противоречит теории «цены за репродукцию». У самцов потеря половых клеток либо не вызывает изменений, либо слегка увеличивает продолжительность жизни. Барнс с соавторами (Barnes et al., 2006) делают преждевременный вывод о том, что обнаруженные прежде на нематодах механизмы не распространяются на дрозофил и другие объекты. Однако вполне возможно, что речь идет о плейотропном действии данных мутаций. Кроме того, поскольку у нематод нет самок (либо самцы, либо гермафродиты, совмещающие гонады самцов и самок), подобный эффект у них нельзя было наблюдать.

В норме самки дрозофилы живут дольше самцов, однако в дисгенных скрещиваниях, имеющих результатом стерильность потомков, бесплодные самцы живут дольше самок (Konag, Bozcuk, 1995). Использование гибридного дисгенеза позволило нам проанализировать продолжительность жизни стерильных самцов и самок дрозофилы, избегая плейотропного влияния мутаций, влияющих на плодовитость. Нами было показано, что стерильные самцы дрозофил, так же как и нематод, живут дольше плодовитых. Однако стерильные самки, как и в работе Барнса с соавторами (Barnes et al., 2006), жили меньше. Это позволило нам выдвинуть предположение, что нормальные гонады самцов выделяют сигнал, снижающий продолжительность их жизни (возможно, что он гомологичен липофильному гормону нематод), тогда как гонады самок выделяют сигнал, продлевающий их жизнь. Кроме того, сравнение максимальной продолжительности жизни стерильных самцов и самок, оцененной как время гибели 90 % популяции, свидетельствует о ее выравнивании, тогда как плодовитые самки живут заметно дольше плодовитых самцов (рис. 15) (Шапошников, Москалев, 2007).

Противоречат теории «цены за репродукцию» и результаты изучения особенностей жизни замбийского слепыша (*Cryptomys ansellii*). У данного животного спаривание позволяет задержать старение. Слепыши живут семьями, в которых спаривается только пара-прародительница, а их потомки не спариваются. Ока-

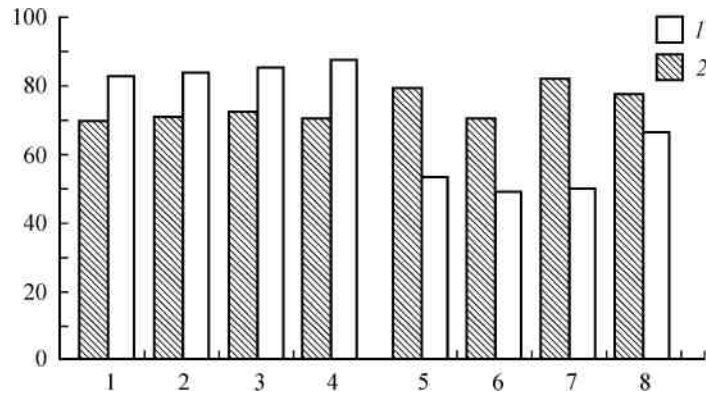


Рис. 15. Время 90%-ной смертности стерильных (1) и плодовитых (2) особей *Drosophila melanogaster* (по: Шапошников, Москалев, 2007).

По горизонтали — варианты эксперимента (1—4 — самки, 5—8 — самцы); по вертикали — возраст, сутки.

залось, что спаривающаяся пара живет примерно в 2 раза дольше (на 20 лет), чем их «помощники». Показано, что такое различие в продолжительности жизни не связано с социальным статусом особи, внутренними биологическими свойствами или загруженностью работой (Dammann, Burda, 2006).

Существует достаточное число видов с низкой смертностью от внешних причин (защищенные от хищников животные). Как и следует из эволюционной теории старения, такие виды характеризуются высоким долгожительством. Это позволило даже отнести некоторых из них к нестареющим видам. В то же время у этих видов интенсивность размножения после полового созревания с возрастом снижается незначительно или остается на одном уровне. Другой известный пример — общественные насекомые (пчелы, осы, термиты, муравьи). Самки общественных насекомых потеряли отрицательную корреляционную связь между плодовитостью и старением, наблюдающуюся у одиночных видов. Так, медовые пчелы имеют две формы самок: долгоживущую репродуктивную матку, физиологически предназначенную для откладки яиц и факультативно стерильных рабочих, проявляющих гибкий паттерн продолжительности жизни. Матка может продуцировать более 1500 яиц ежедневно и при этом жить 1—5 лет. Рабочие пчелы могут доживать до 10 месяцев, однако обычно живут 4—6 недель. Малая продолжительность жизни у них возникает при неблагоприятных условиях, поскольку рабочие пчелы переключаются с гнездовой активности на добывание пищи спустя 2—3 недели после начала взрослой жизни и в норме живут

1—3 недели при активном кормодобывании. Кормодобывание, очевидно, связано с высокими рисками гибели (Seehuus et al., 2006). Старение пчел может быть обусловлено влиянием ювенильного гормона и гена вителлогенина — предшественника желточного белка. Траектории развития маток и рабочих пчел расходятся на стадии личинки путем эндокринного переключения (Seehuus et al., 2006). Большая продолжительность жизни маток общественных насекомых по сравнению с рабочими предсказывается эволюционными теориями старения: матка полностью защищена от внешней смертности благодаря гнезду и солдатам, а также ухаживающим за ней рабочим, что позволило увеличить время репродуктивной жизни и замедлить старение (Jemielity et al., 2005).

Таким образом, эволюционные теории старения (теория антагонистической плейотропии и отработанной сомы) и экспериментальные работы свидетельствуют в пользу антагонистических взаимоотношений продолжительности жизни и интенсивности размножения. По-видимому, это обусловлено двумя причинами: действием на соматические клетки липофильных гормонов, выделяемых герминативными тканями, и перераспределением имеющихся в ограниченном количестве энергетических и пластических ресурсов на нужды размножения в ущерб репарационным процессам.

5.2. Продолжительность жизни и взаимодействие полов

Оптимальная репродуктивная схема для самки может не быть оптимальной для ее партнера, и самцы, следовательно, должны регулировать репродуктивный темп самок. Благодаря такому «половому конфликту», коэволюция самцов и самок может, кроме всего прочего, способствовать эволюции старения (Maklakov et al., 2005). Так, на примере популяций жуков фасолевых зерновок (*Acanthoscelides obtectus*), селективируемых в течение более 100 поколений на раннюю или позднюю репродукцию, было показано, что самцы влияют на старение самок в своих генетических интересах. «Поздние» (отселектированные на позднюю репродукцию) самцы замедляют старение и увеличивают продолжительность жизни самок по сравнению с «ранними» самцами (Maklakov et al., 2005). У многих видов животных самцы увеличивают свою приспособленность путем манипулирования самками, иног-

да даже ценой снижения их выживаемости и приспособленности (Baer, Schmid-Hempel, 2005). Наравне с механическими манипуляциями, такими как охрана партнера или физическое повреждение самок, на приспособленность и выживаемость самок влияют биохимические компоненты желез самцов, которые действуют как антифродизиаки, индуцируя оогенез и ускоряя темп яйцекладки, или даже производят токсичный эффект (Baer, Schmid-Hempel, 2005). У насекомых самцы снижают смертность самок при отборе на монандрию (одномужество). Это можно интерпретировать как не прямое влияние снижения токсичности семенной жидкости при отсутствии конкуренции среди самцов (Maklakov et al., 2005). Самцы могут снижать жизнеспособность самок также через соматическую несовместимость в виде иммунной реакции и воспаления при взаимодействии с партнером либо через перенос заболеваний (Korner, Schmid-Hempel, 2003).

Действительно, частые спаривания у дрозофилы снижают продолжительность жизни самок и их репродуктивный успех. Данная «цена за репродукцию» опосредуется белками Acp эякулята самцов, вырабатываемыми придаточными железами. Половой пептид Acp70A снижает восприимчивость самок к последующим самцам, стимулирует яйцепродукцию в первых скрещиваниях виргинных самок, гарантирует более эффективное хранение спермы и таким образом обуславливает конкурентный успех самца, первым оплодотворившим самку. В эксперименте, в котором самки постоянно подвергались скрещиваниям с трансгенными самцами без половых пептидов, они имели более высокую приспособленность и больший репродуктивный успех, чем контрольные самки (Wigby, Chapman, 2005). Механизм действия Acp70A состоит в том, что, передаваясь от самца к самке, он стимулирует синтез ювенильного гормона, активизирующего размножение, но снижающего продолжительность жизни (Flatt, 2004). Интересно отметить, что у самих самцов половой пептид Acp70A, а также другой белок вспомогательных желез Acp26A, участвуют в индивидуальной генетической вариации по продолжительности жизни. Известно также, что ген Acp62F прямо влияет на старение, тогда как два других белка вспомогательных желез (Mst57dc и Acp36DE) изменяют свою экспрессию при старении, то есть являются старение-ассоциированными (Flatt, 2004).

У шмеля *Bombus terrestris* даже при отсутствии переноса компонентов мужских желез в эякуляте и поведенческих составляющих влияния самца на самку сперма сама по себе влияет на особенности жизненного цикла самки, такие как продолжительность жизни, приспособленность и успех зимней спячки. Много раз обсеменная матка имеет меньшую продолжительность жизни и

более низкую приспособленность по сравнению с однократно обсемененными. Сперма некоторых самцов более вредна для маток, чем других (Baer, Schmid-Hempel, 2005). Однако *B. terrestris* относится к видам, у которых скрещивание обычно происходит однократно и интересы самцов и самок должны быть более-менее конвергентными, поэтому эти данные не могут быть объяснены с точки зрения конкуренции самцов (Korner, Schmid-Hempel, 2003). С теоретической точки зрения, наблюдаемые эффекты могут быть результатом переноса половых пептидов, адгезированных на хвосте спермия. Кроме того, если сохранение спермы (самка перепончатокрылого хранит ее всю жизнь) само по себе имеет «цену» для жизнеспособности, то большие эякуляты или повторные инсеминации будут приводить к большему количеству спермы в сперматеке и тем самым влиять на приспособленность самки. Тем не менее многократно обсемененные самки живут примерно одинаковое время при разном числе обсеменений (Baer, Schmid-Hempel, 2005).

Взаимодействие полов при определении продолжительности жизни может проявляться и в так называемом «материнском эффекте», который представлен двумя составляющими: хромосомным (X-сцепленным) и цитоплазматическим наследованием. Рецессивные X-сцепленные вредные мутации, передающиеся от матерей сыновьям и дочерям, будут влиять прежде всего на продолжительность жизни мужского потомства, поскольку оно гемизиготно (Stindl, 2004). У жуков — четырехпятнистых зерновок (*Callosobruchus maculatus*) материнский эффект оказывает большее влияние на продолжительность жизни самцов, чем самок. При этом материнский эффект на продолжительность жизни самцов был основан на хромосомном наследовании, цитоплазматический вклад был незначительным. При этом выявлено существенное доминирование аллелей долгожительства у самок, но не у самцов (Fox et al., 2004).

Материнский генетический компонент продолжительности жизни человека может быть связан с наследуемыми по материнской линии особенностями митохондриального генома (цитоплазматическое наследование). Предложенная Линнаном митохондриальная теория старения (см. разд. 4.1) предполагает, что постепенное соматическое накопление митохондриальных мутаций определяет последующее снижение клеточной биоэнергетической способности, вызывающее старение (Linnane et al., 1989). Следовательно, наследственные дефекты мтДНК могут влиять на продолжительность жизни потомства. Действительно, наследуемость долгожительства в парах мать—ребенок у человека достоверно выше, чем отец—ребенок. Эти данные согласуются с предполо-

жением о вкладе мтДНК ооцитов в регулирование продолжительности жизни потомков (Korpelainen, 1999).

Таким образом, наравне с рассмотренными в предыдущем разделе причинами отрицательной взаимосвязи долгожительства и репродукции, имеет место «цена за репродукцию», основанная на взаимодействии полов (затраты на ухаживание и спаривание, физическое повреждение при копуляциях, перенос инфекций и других вредных субстанций, например полового пептида у насекомых). На продолжительность жизни, прежде всего самцов, большое влияние оказывает так называемый материнский генетический эффект, складывающийся из X-сцепленного наследования и цитоплазматического (митохондриального) наследования.

5.3. Половой диморфизм продолжительности жизни

У многих видов животных самцы живут достоверно меньше самок (Smith, 1989). Например, у линии крыс *Wistar* самки в среднем живут на 14 % дольше. Примерно так же обстоит дело с человеческой популяцией. В Европе мужчины живут в среднем 73.7 лет, а женщины — 83.8 (Vina et al., 2005). В настоящий момент средняя мировая продолжительность жизни женщин на 7 лет больше, чем мужчин. В старости число мужчин уменьшается быстрее, чем число женщин, в том числе из-за склонности представителей мужского пола к риску и нездоровому образу жизни (Aviv et al., 2005). Однако эволюционная консервативность различий продолжительности жизни между полами свидетельствует в пользу не социальной, а биологической обусловленности полового диморфизма для продолжительности жизни.

Является ли в данном случае биологический компонент результатом зависимых от пола гормональных различий? Преобладает идея, особенно в среде специалистов по сердечно-сосудистой патологии, что ключевая роль в разрыве продолжительности жизни между мужчинами и женщинами принадлежит эстрогену — стероидному гормону яичников. Он оказывает защитное действие на женский организм, тогда как андрогены вовлечены в увеличение рисков сердечно-сосудистых заболеваний (Aviv et al., 2005). Действительно, эстрогены *in vitro* выступают в роли антиоксидантов. Однако при своей низкой концентрации в плазме и организме в целом они вряд ли непосредственно оказывают такое влияние *in vivo*. Тем не менее эстрогены обуславливают выра-

женный антиоксидантный эффект. После оварэктомии выработка H_2O_2 митохондриями вырастает на 50 %. Это можно предотвратить введением эстрадиола. Так, инкубирование клеток, содержащих эстрогеновый рецептор MCF7, с эстрадиолом значительно снижает скорость выработки H_2O_2 . Добавление одновременно эстрадиола и модулятора эстрогенового рецептора тамоксифена не приводит к изменению выработки H_2O_2 . Таким образом, антиоксидантный эффект эстрогена опосредован его рецептором (Vina et al., 2005). Оказалось, что митохондрии самок вырабатывают примерно половину от количества H_2O_2 , наблюдаемого у самцов. По-видимому, это связано с тем, что самки имеют более высокую активность супероксиддисмутазы и глутатионовой пероксидазы, поскольку эстрогены, связываясь со своими рецепторами, индуцируют митоз-активируемые протеинкиназы (MAP) и ядерный транскрипционный фактор NF- κ B, запускающие транскрипцию антиокислительных ферментов. Доказано, что содержащиеся в сое фитостерины имитируют защитный эффект эстрадиола по тому же сигнальному пути (Vina et al., 2005).

Известно, что инсулиновый сигналинг контролирует скорость старения (см. разд. 3.1). Изменение продолжительности жизни в ответ на ограничение диеты у самок дрозофилы было более выраженным, чем у самцов. Возможно, это связано с половыми различиями систем распознавания питательных веществ, например инсулин/IGF-1-сигналинга (Davies et al., 2005). Действительно, у самцов овец концентрация соматотропина, IGF-1 и IGFBP-3 в плазме крови выше, чем у самок. Соматотропиновая ось важна для контроля за ростом и метаболизмом, кроме того, продукция IGF-1 и IGFBP-3 усиливается соматотропином. IGF циркулирует в комплексе с IGFBP, который увеличивает время его полужизни и модулирует активность (Gatford et al., 1996). Как известно, эти гормоны ускоряют не только рост и метаболизм, но и старение, поскольку подавляют активность транскрипционного фактора FOXO. Следовательно, увеличение у самцов концентрации IGF-1, а также регулирующих его белков и гормонов может быть причиной более низкой продолжительности их жизни по сравнению с самками.

Одно из популярных объяснений различий продолжительности жизни между полами состоит в том, что гетерогаметный пол живет меньше гомогаметного, поскольку рецессивные X-сцепленные вредные мутации, как уже упоминалось, будут негативно влиять на продолжительность жизни гетерогаметного пола. Действительно, даже у нематоды *Caenorhabditis elegans*, у которой нет самок, самцы (X0) живут меньше, чем гермафродиты (XX) (Gems, Riddle, 2000). Аналогичная ситуация наблюдается у насе-

комых и млекопитающих (Smith, 1989). Интересно, что у птиц самки являются гетерогаметным полом и их взрослая смертность выше, чем у самцов (Liker, Szekely, 2005).

Мужчины — гетерогаметный пол, несущий Y-хромосому вместо второй X-хромосомы. У нормальных женщин одна из X-хромосом стохастическим образом инактивируется в раннем эмбриогенезе, так что в неактивной X-хромосоме экспрессируется не более 25 % генов. Новорожденные девочки имеют две популяции соматических клеток с примерным соотношением 50 : 50, проявляя сбалансированный мозаицизм в отношении инактивации X-хромосомы. С возрастом соотношение меняется. Это разбалансированное распределение инактивации X-хромосомы в соматических клетках взрослых женщин вызвано двумя главными обстоятельствами: X-сцепленные генетические заболевания (такие как врожденный дискератоз) и само по себе старение. В женских соматических клетках происходит селекция, т. е. замещение клеток с активной X-хромосомой от одного родителя на клетки с активной X-хромосомой от другого, при этом преимущество получают X-хромосомы с более длинными теломерами (Aviv et al., 2005).

Длина теломер высоконаследуема, обратно пропорционально коррелирует с возрастом и выше у взрослых женщин, чем у мужчин, хотя равнозначна у новорожденных мальчиков и девочек. Средняя длина теломер у взрослых женщин на 240 пар нуклеотидов (пн) длиннее, чем у мужчин, что соответствует примерно восьми «теломерным годам» (скорость укорочения составляет примерно 30 пн в год). Наследуемость длины теломер имеет X-сцепленный компонент. Большая длина теломер, наблюдаемая у женщин, может быть обусловлена как действием эстрогена, так и вышеописанной селекцией соматических клеток. Эстроген снижает оксидативный стресс, ускоряющий разрушение теломер, и стимулирует транскрипцию теломеразы. Благодаря X-сцепленному фактору наследования длины теломер у женщин две субпопуляции соматических клеток при старении будут перестраиваться в пользу клеток с более длинными теломерами. Такие теломеры в клетках женщин в конечном итоге могут обуславливать большую продолжительность их жизни (Aviv et al., 2005). Различие в длине теломер взрослых женщин и мужчин может быть также связано с тем, что мужчины обычно выше, чем женщины: большие размеры тела требуют большего числа удвоений клеток и больших затрат на регенерацию тканей, т. е. репликативная история мужских клеток длиннее, чем женских, что неизбежно ведет к истощению регенерационного потенциала и к более раннему началу возраст-ассоциированных заболеваний, особенно у крупных мужчин (Stindl, 2004).

У муравья *Lasius niger* соматические ткани короткоживущих самцов имеют значительно более короткие теломеры, чем клетки долгоживущих маток и относительно долгоживущих рабочих самок. Эти различия устанавливаются в период раннего личиночного развития. Рабочие самки имеют такие же теломеры, что и матки (Jemielity et al., 2007).

Генетические факторы влияют на выживаемость у здоровых людей в глубокой старости пол-специфическим образом. Так как локусы долгожительства мужчин и женщин различаются, исключение составляет лишь локус *APOE*. У женщин определяющую роль в долговечности играют четыре локуса: *APOE*, *HSP90•*, *HSP70-1* и *mtDNA*. Тогда как у мужчин их пять: *AP0A4*, *AP0A1*, *SIRT3*, *TH* и *APOE*. Таким образом, у мужчин генетическая варибельность играет более значимую роль для их продолжительности жизни, чем у женщин. Это соответствует и демографическим данным. В странах Северной Европы увеличение числа 90—100-летних индивидуумов в связи с улучшением качества медицинской помощи больше касается женщин, чем мужчин. Соотношение женщин и мужчин в этом сегменте популяции постоянно возрастает в пользу женского пола (Passarino et al., 2006).

С теоретической точки зрения, увеличенная постменопаузная продолжительность жизни женщин эволюционно могла возникнуть как «эффект бабушки», т. е. как вклад пострепродуктивных самок в выживание их детей и внуков. Однако исследования на обезьянах не подтвердили существование данного эффекта, обнаружив корреляцию продолжительность жизни старых самок не с родственниками, а только с поздними ее потомками. Селективное значение пострепродуктивной части жизненного цикла спорно само по себе. Изучение рыбок-гуппи, живущих в условиях давления хищников и характеризующихся высокой смертностью, показало, что они созревают в более раннем возрасте, но при этом имеют более длинную жизнь. Как оказалось, у них наблюдается высокая репродуктивная продолжительность жизни (от начала до конца репродукции), вносящая наибольший вклад в приспособленность, но не пострепродуктивная. Таким образом, пострепродуктивная продолжительность жизни, по-видимому, является случайным дополнением на конце жизненного цикла, тогда как различия в продолжительности жизни эволюционировали в ответ на отбор именно по репродуктивной продолжительности жизни, вносящей основной вклад в приспособленность (Reznick et al., 2006).

Таким образом, у большинства видов животных гомогаметный пол живет дольше гетерогаметного. У насекомых и млекопитающих гомогаметный пол — самки, которые живут дольше сам-

цов. Напротив, у птиц и рептилий — самцы, у нематод — гермафродиты. Помимо эффекта дозы X-сцепленных генов, половой диморфизм продолжительности жизни может быть обусловлен либо более длинными теломерами самок, либо более эффективной антиоксидантной защитой их клеток. Наконец, существует экспериментально не подтвержденное предположение, что у позвоночных животных самки, которые принимают непосредственное участие в выхаживании потомства, живут дольше в результате «эффекта бабушки».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на то что история генетики старения и продолжительности жизни ведет свое начало от создателей эволюционных теорий старения (т. е. с середины XX века), истинный расцвет данного направления геронтологии наступил в 90-х годах, когда были открыты ключевые гены, мутации в которых продлевают жизнь: *age-1*, *daf-2* и *daf-16* у нематод, *sir-2* у дрожжей, *mth* у дрозофил, *p66* и *klotho* у млекопитающих. Этот расцвет продолжается и по сей день. В настоящее время число «геронтогенов» исчисляется десятками. Оказалось также, что многие из них в различных аллельных вариантах участвуют в естественном популяционном варьировании продолжительности жизни.

Современные достижения генетики старения и долголетия сдвинули с мертвой точки решение многих проблем геронтологии, таких как вопросы клеточного старения и продолжительности жизни, взаимодействия старения и стресса, репродукции и старения. В связи с этим не кажется удивительной смена некоторых парадигм в геронтологии.

Как оказалось, ограничение диеты продлевает жизнь не столько через снижение калорийности пищи, сколько через индукцию стресс-ответа, т. е. через активацию сиртуинов и подавление инсулинового и TOR-сигналинга, что приводит к разблокированию транскрипционных факторов семейства FOXO и к остановке клеточного роста, но стимулирует синтез антиоксидантных и репаративных белков, белков теплового шока.

Наибольшей ревизии подверглась свободнорадикальная теория старения. Большинство долгоживущих мутантов не отличается выраженным снижением уровня метаболизма, причем, увеличение продолжительности жизни возможно даже на фоне его интенсификации (при активации митохондриальных расщепляющих

белков). Несмотря на то что сверхактивация генов антиоксидантных ферментов иногда продлевает жизнь лабораторных животных, а подавление их активности вызывает стресс-индуцированное старение клетки, прямые эксперименты показали, что антиоксидантные ферменты не отвечают за естественную межвидовую вариацию продолжительности жизни. Фармакологические антиоксиданты замедляют старение прежде всего не за счет перехвата свободных радикалов, а путем активации ферментов стресс-ответа. Снижение с возрастом экспрессии компонентов электронотранспортной цепи митохондрий не является причиной старения, а может быть компенсаторным проявлением механизма антистарения. Увеличение продолжительности жизни у мутантов модельных организмов нельзя объяснить одной лишь активацией антиоксидантной защиты, так как ее вклад недостаточен и является дополнительным по отношению к вкладу белков теплового шока, репарации ДНК, иммунного ответа. Не подтверждается и гипотеза митохондриального порочного круга, поскольку мутации мтДНК не сопровождаются усилением выработки свободных радикалов.

Потерпела фиаско теория «катастрофы ошибок». В старении основную роль играют не мутантные белки и даже не соматический мутагенез, а эпигенетические изменения (деметилирование оснований ДНК и гистонов). Как правило, старение не сопровождается стохастической разбалансировкой систем регуляции. Напротив, с возрастом наблюдается воспроизводимое тканеспецифическое изменение активности генов.

Ранние исследователи, имевшие дело с большими дозами стрессоров, делали вывод об их исключительно негативном для продолжительности жизни действии. Однако в настоящий момент очевидно, что умеренные стрессовые воздействия (температура) могут увеличивать продолжительность жизни путем активации SIRT-, JNK- и FOXO-зависимых механизмов стресс-ответа, представляющие собой компенсаторные реакции на уровне клетки и ткани (рис. 16). На наш взгляд, вполне вероятно, что все эти механизмы могут служить одной из причин часто наблюдаемого гормонального дисбаланса при облучении малыми дозами ионизирующей радиации. Аналогичным образом подавление инсулинового сигналинга, возможно, обуславливает эффект увеличения продолжительности жизни животных в темноте по сравнению с содержанием на свету. Эволюционные теории старения (антагонистической плеiotропии и распределенной сомы) постулировали обратную корреляцию между интенсивностью размножения и длительностью жизни. Однако показано, что антагонизм репродукции и продолжительности жизни в меньшей мере обусловлен затратами на про-



Рис. 16. Взаимодействие клеточного старения и компенсаторных механизмов на клеточном и тканевом уровне.

изводство половых продуктов и в большей — активным сигналом от делящихся половых клеток и соматической части гонад. Некоторые мутации, приводящие к долгожительству, не сопровождаются снижением репродукции.

Человек имеет очень короткие теломеры даже по сравнению с другими приматами, поэтому репликативное старение для него актуально. Наравне с репликативным старением клеток спонтанные повреждения и эпигенетические перестройки обуславливают теломернезависимое стресс-индуцированное старение, наиболее пагубно сказывающееся на функционировании стволовых клеток, имеющих активную теломеразу. Клетки мышей в норме не подвергаются репликативному старению вовсе, однако имеют большую чувствительность к стресс-индуцированному износу, чем клетки человека.

В экспериментах не обнаружены специализированные гены старения, но выявлены десятки консервативных в эволюции генов продолжительности жизни, контролирующих рост, развитие, размножение и стрессоустойчивость, затрагивающих скорость старения лишь косвенно.

На данном этапе стало очевидным, что ключевыми молекулярно-клеточными механизмами старения организма являются генетическая нестабильность, репликативное и стресс-индуцированное клеточное старение и апоптоз. Различные виды возрастзависимой и индуцируемой дестабилизации генома (потеря теломерных

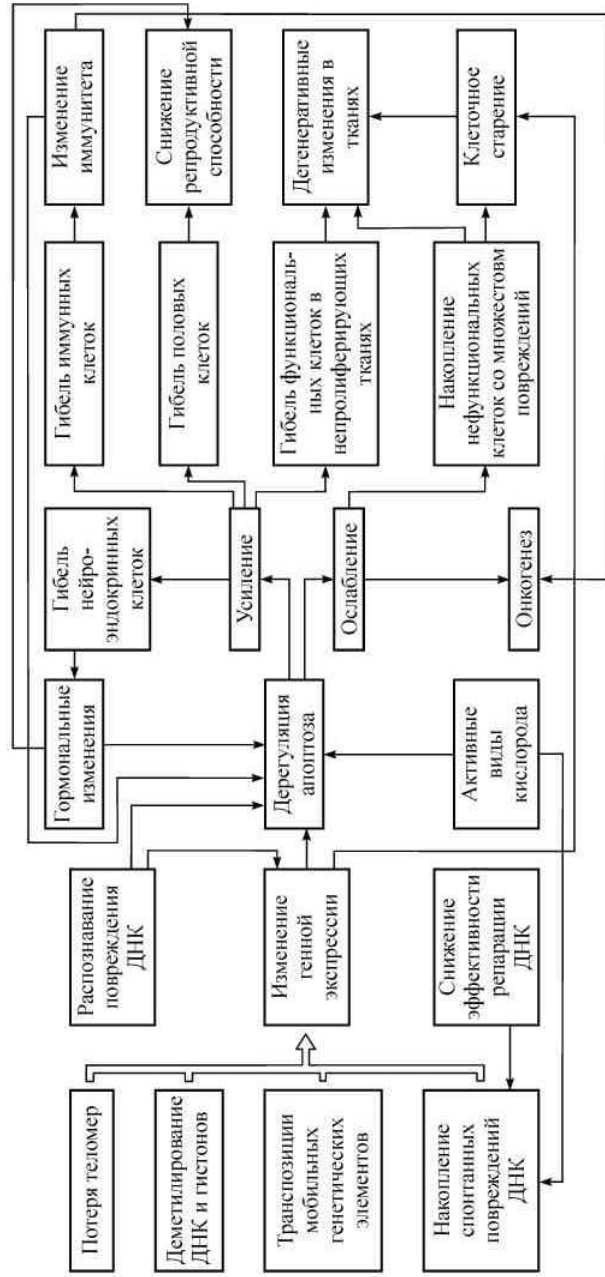


Рис. 17. Участие процессов генетической нестабильности и апоптоза в старении организма.

концов хромосом; накопление замен нуклеотидов, делеций и аберраций; изменение степени метилирования ДНК и гистонов и уровня транспозиций мобильных генетических элементов) приводят к изменению экспрессии различных генов, контролирующих клеточный метаболизм и репарацию ДНК и белков (рис. 17). Накопленные с возрастом нарушения могут либо затрагивать локусы генов, отвечающих за функционирование систем клеточной защиты (в частности, регуляцию апоптоза), либо напрямую (по эпигенетическим механизмам) индуцировать апоптоз. При этом процесс запрограммированной гибели клетки может быть как усилен, так и ослаблен в зависимости от типа клетки и ткани. Элиминация множества разных типов клеток, особенно со слабой пролиферативной активностью (которая к тому же снижается с возрастом, как в случае, например, иммунных и эндокринных клеток) либо с отсутствием делений (как в случае нервных и мышечных клеток), приводит к стойким функциональным изменениям в организме. Многие из них рассматриваются как симптомы старения: гормональные и иммунные сдвиги, дегенеративные заболевания нервной и мышечной систем, снижение репродуктивной способности. Если процесс апоптоза с возрастом ослаблен (например, у фибробластов), то это приводит к накоплению стареющих клеток с множеством повреждений, плохо справляющихся со своими функциями и активно разрушающих окружающую ткань (выделяя протеазы, цитокины, индукторы воспаления). Ингибирование апоптоза таких клеток повышает риск опухолеобразования и аутоиммунных заболеваний (рис. 17).

Тем не менее, зная ответы на некоторые вопросы, мы находимся в самом начале пути. Мы еще слабо представляем себе, почему одни виды стареют быстро, а другие — медленно либо вовсе не стареют. Знание функций так называемых «геронтогенов», влияющих на скорость старения, поможет не только продлевать при необходимости жизнь, но и сделать ее более качественной, лишённой возрастзависимых патологий.

СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ

| | |
|-------------------------------|--|
| Гормезис | — стимулирующий эффект малых доз воздействия, оказывающего токсичный эффект в больших дозах. |
| Доминантно-негативная мутация | — приводит к образованию бессмысленного белка, который в ряде случаев способен снижать активность нормальной версии белка. |
| Иммортализация клетки | — устранение лимита клеточных делений, отсутствие репликативного старения. |
| Инбредная депрессия | — снижение жизнеспособности потомства в результате выхода в гомозиготу вредных аллелей. |
| Коиммунопреципитация | — соосаждение белков с использованием антител, показывает наличие непосредственного взаимодействия между изучаемыми белками. |
| Пролиферация | — образование новых клеток. |
| Репликативное старение | — необратимое блокирование деления клетки. |
| РНК-интерференция | — специфическое ингибирование одноцепочечных молекул РНК с помощью процесса, запускаемого двухцепочечной РНК; в экспериментах используется для выключения активности нужного гена. |
| Сайленсинг | — процесс, в результате которого целые участки хромосом, охватывающие блоки генов, оказываются транскрипционно неактивными. |
| Секвенирование ДНК | — определение ее первичной нуклеотидной последовательности. |

| | |
|-------------------------|--|
| Сигналинг | цепь событий, запускаемых цитокином или гормоном. |
| Экспрессионный микрочип | прикрепленные к мембране олигонуклеотидные последовательности, соответствующие мРНК генов, экспрессия которых количественно анализируется. |
| QTL-анализ | позиционное картирование локализации генов, детерминирующих количественные признаки. |

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

| | |
|-------|--|
| АДФ | — аденозиндифосфат |
| АМФ | — аденозинмонофосфат |
| АТФ | — аденозинтрифосфат |
| АФК | — активные формы кислорода |
| БТШ | — белки теплового шока |
| УФ | — ультрафиолет |
| ЦНС | — центральная нервная система |
| ЭПС | — эндоплазматическая сеть |
| AMPK | — АМФ-активируемая протеинкиназа |
| CDK | — циклинзависимая киназа |
| EGF | — эпидермальный фактор роста |
| FAD | — флавинадениндуклеотид |
| FISH | — флуоресцентная гибридизация <i>in situ</i> |
| GH | — гормон роста |
| GSH | — глутатион |
| GST | — глутатион-S-трансфераза |
| HR | — гормон роста |
| HSF | — транскрипционный фактор теплового шока |
| Hsp | — белок теплового шока |
| IAP | — белки-ингибиторы апоптоза |
| IGF-1 | — инсулиноподобный фактор роста 1 |
| IPC | — инсулин-продуцирующая клетка |
| IH | — ювенильный гормон |
| JNK | — c-Jun N-концевая протеинкиназа |
| MAPK | — митоген-активируемая протеинкиназа |
| NAD | — никотинамидадениндуклеотид |
| NBS | — синдром разрывов Ниджмеджена |
| PARP | — поли(АДФ-рибозо)полимераза |
| PCNA | — ядерный антиген пролиферирующих клеток |
| PI3K | — фосфатидилинозитол-3-киназа |
| QTL | — локусы количественных признаков |

RTS — синдром Ротмунда-Томсона
SA- β -gal — старение-ассоциированная β -галактозидаза
SIPS — стресс-индуцированное преждевременное старение
SNP — полиморфизм одиночных нуклеотидов
SOD — супероксиддисмутаза
TNF — фактор некроза опухолей

ЛИТЕРАТУРА

- Акифьев А. П., Потапенко А. И., Рудаковская Е. Г.** Ионизирующие излучения и 5-бром-2'-дезоксисуридин как инструменты анализа фундаментального механизма старения животных // Радиационная биология. Радиоэкология. **1997**. Т. 37, №4. С. 613—620.
- Анисимов В. Н.** Физиологические функции эпифиза (геронтологический аспект) // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. **1997**. Т. 83, № 8. С. 1—13.
- Анисимов В. Н.** Молекулярные и физиологические механизмы старения. СПб.: Наука, **2003**. 468 с.
- Бердышев Г. Д., Коротаев Г. К., Боярских Г. В., Ванюшин Б. Ф.** Нуклеотидный состав ДНК и РНК соматических тканей горбуши и его изменение в течение нереста // Биохимия. **1967**. Т. 32. С. 988—993.
- Биологические ритмы** / Под ред. Ю. М. Ашоффа: В 2-х томах. М.: Мир, **1984**. Т. 2. 262 с.
- Бойко А. Г.** Дифференцировка клеток радиальной глии в астроциты — вероятный механизм старения млекопитающих // Журн. общ. биологии. **2007**. Т. 68, № 1. С. 35—51.
- Бурлакова Е. Б., Молочкина Е. М.** Изменение антиоксидативной активности липидов печени мышей при экспериментальном карцерогенезе // Биофизика. **1973**. Т. 18, № 2. С. 293—298.
- Вайсерман А. М., Кошель Н. М., Войтенко В. П.** Влияние рентгеновского облучения в раннем онтогенезе на жизнеспособность и продолжительность жизни *Drosophila melanogaster* // Проблемы старения и долголетия. **2000**. Т. 9, № 1. С. 33—42.
- Ванюшин Б. Ф., Бердышев Г. Д.** Молекулярно-генетические механизмы старения. М.: Медицина, **1977**. 295 с.
- Васильева Л. А., Ратнер В. А., Бубенщикова Е. В.** Стрессовая индукция транспозиций ретротранспозонов дрозофилы: реальность явления, характерные особенности и возможная роль в быстрой эволюции // Генетика. **1997**. Т. 33, № 8. С. 1083—1093.

Воробцова И. Е. Сравнительное изучение радиочувствительности различных линий *Drosophila melanogaster* // Докл. ДАН СССР. 1963. Т. 153, N4. С. 943—946.

Гаврилов Л. А., Гаврилова Н. С. Биология продолжительности жизни. Количественные аспекты. М.: Наука, 1991. 280 с.

Дильман В. М. Старение, климакс и рак. Л.: Медицина, 1968. 378 с.

Заичкина С. И., Розанова О. М., Клоков Д. Ю., Аптикаева Г. Ф., Ахмадиева А. Х., Смирнова Е. Н. Малые дозы радиации снижают уровень спонтанного и γ -индуцированного хромосомного мутагенеза в клетках костного мозга мышей *in vivo* // Радиационная биология. Радиоэкология. 2003. Т. 43, N 2. С. 153—155.

Зайнуллин В. Г., Москалев А. А. Роль генетической нестабильности в старении клетки // Генетика. 2000. Т. 36, N 8. С. 1013—1016.

Зайнуллин В. Г., Москалев А. А. Роль апоптоза в возрастных патологиях // Онтогенез. 2001. Т. 32, N 4. С. 245—251.

Зайнуллин В. Г., Москалев А. А., Шапошников М. В., Таскаев А. И. Современные аспекты радиобиологии *Drosophila melanogaster*. Апоптоз и старение // Радиационная биология. Радиоэкология. 1999. Т. 39, N1. С. 49—57.

Измайлов Д. М., Обухова Л. К., Окладнова О. В., Акифьев А. П. Продолжительность жизни *Drosophila melanogaster* в ряду поколений после однократного воздействия ионизирующей радиации // Докл. АН СССР. 1990. Т. 313, N 3. С. 718—722.

Конев С. В., Вологовский И. Д. Фотобиология. Минск: Изд-во Белорус. гос. ун-та, 1979. 378 с.

Кулинский В. И. Обезвреживание ксенобиотиков // Соросовский образовательный журнал. 1999. N 1. С. 8—12.

Москалев А. А. Радиационно-индуцированное изменение продолжительности жизни *Drosophila melanogaster*. Сыктывкар: Изд-во Коми НЦ РАН, 2004. 104 с.

Москалев А. А., Зайнуллин В. Г. Возрастная динамика активности имаго после хронического облучения личинок у линий дрозофилы с нарушениями регуляции апоптоза // Генетика. 2004. Т. 40, N 2. С. 277—281.

Москалев А. А., Зайнуллин В. Г. Продолжительность жизни в поколениях хронического облучения у изогенных и гетерогенных линий дрозофилы дикого типа // Радиационная биология. Радиоэкология. 2006. Т. 46, N 4. С. 436—440.

Москалев А. А., Шосталь О. А., Зайнуллин В. Г. Генетические аспекты влияния различных режимов освещения на продолжительность жизни дрозофилы // Успехи геронтологии. 2006. Вып. 18. С. 55—58.

Обухова Л. К. Химические геропротекторы и проблема увеличения продолжительности жизни // Успехи химии. 1975. Т. 44, N 3. С. 1914—1925.

Оловников А. М. Принцип маргинотомии в матричном синтезе полинуклеотидов // Докл. ДАН СССР. 1971. Т. 201, N 6. С. 1496—1499.

Оловников А. М. Редумера как недостающее звено в понимании старения человека // Клиническая геронтология. 2005. N 1. С. 50—69.

Пелевина И. И., Афанасьев Г. Г., Алешенко А. В., Готлиб В. Я., Курнешова Л. Е., Носкин В. А., Носкин Л. А., Семенова Л. П., Серебряный А. М. Радиоиндуцированный адаптивный ответ у детей и влияние на него внешних и внутренних факторов // *Радиационная биология. Радиоэкология.* 1999. Т. 39, N 1. С. 106—112.

Потапенко А. Я. Действие света на человека и животных // *Сороковский образовательный журнал.* 1996. N 10. С. 13—15

Рогаев Е. И. Пресенилины: обнаружение и характеристика генов болезни Альцгеймера // *Молекулярная биология.* 1998. Т. 32, N 1. С. 71—83.

Свердлов Е. Д. Очерки современной молекулярной генетики. Очерк 7. Болезни генома и новая молекулярная генетика. Ч. 1 // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 1998. N 1. С. 3—29.

Скулачев В. П. Феноптоз: запрограммированная смерть организма // *Биохимия.* 1999. Т. 64, N 12. С. 1418—1426.

Тодоров И. Н., Тодоров Г. И. Стресс, старение и их биохимическая коррекция. М.: Наука, 2003. 480 с.

Уманский С. Р. Генетическая программа клеточной гибели: гипотеза и некоторые приложения (трансформация, канцерогенез, старение) // *Успехи современной биологии.* 1982. Т. 93, вып. 1. С. 139—148.

Фролькис В. В. Адаптационно-регуляторная теория возрастного развития // *Изв. РАН. Сер. биол.* 1992. N 4. С. 631—634.

Хавинсон В. Х., Баринов В. А., Арутюнян А. В., Малинин В. В. Свободнорадикальное окисление и старение. СПб.: Наука, 2003. 327 с.

Хесин Р. Б. Непостоянство генома. М.: Наука, 1984. 472 с.

Шапошников М. В., Москалев А. А. Влияние дисгенной стерильности на половой диморфизм по продолжительности жизни у *Drosophila melanogaster* // *Успехи геронтологии.* 2007. Вып. 20, N 1. С. 40—46.

Эмануэль Н. М. Антиоксиданты в пролонгировании жизни. Биология старения. Л.: Наука, 1982. 569 с.

Adams C. S., Horton W. E. Chondrocyte apoptosis increases with age in the articular cartilage of adult animals // *J. Anat. Rec.* 1998. Vol. 250, N 4. P. 418—425.

Adelfalk C., Scherthan H., Hirsch-Kauffmann M., Schweiger M. Nuclear deformation characterizes Werner syndrome cells // *Cell Biol. Intern.* 2005. Vol. 29. P. 1032—1037.

Adler M. J., Coronel C., Shelton E., Seegmiller J. E., Dewji N. N. Increased gene expression of Alzheimer disease P-amyloid precursor protein in senescent cultured fibroblasts // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1991. Vol. 81, N 1. P. 16—20.

Aggarwal S., Gupta S. Increased apoptosis of T cell subsets in aging humans: altered expression of Fas (CD95), Fas ligand, Bcl-2, and Bax // *Immunology.* 1998. Vol. 60, N 4. P. 1627—1637.

Alcendor R. R., Gao S., Zhai P., Zablocki D., Holle E., Yu X., Tian B., Wagner T., Vatner S. F., Sadoshima J. Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart // *Circ. Res.* 2007. Vol. 100, N 10. P. 1512—1521.

Anderson D. J., Apanius V. Actuarial and reproductive senescence in a long-lived seabird: preliminary evidence // *Exp. Gerontol.* 2003. Vol. 38. P. 757—760.

Andziak B., Buffenstein R. Disparate patterns of age-related changes in lipid peroxidation in long-lived naked mole-rats and shorter-lived mice // *Aging Cell.* 2006. Vol. 5. P. 525—532.

Andziak B., O'Connor T. P., Qi W., DeWaal E. M., Pierce A., Chaudhuri A. R., Remmen H. V., Buffenstein R. High oxidative damage levels in the longest-living rodent, the naked mole-rat // *Aging Cell.* 2006. Vol. 5. P. 463—471.

Anisimov V. N., Baturin D. A., Popovich I. G., Zabezhinski M. A., Manton K. G., Semenchenko A. V., Yashin A. I. Effect of exposure to light-at-night on life span and spontaneous carcinogenesis in female CBA mice // *Intern. J. Cancer.* 2004. Vol. 111. P. 475—479.

Apfeld J., Kenyon C. Regulation of lifespan by sensory perception in *Caenorhabditis elegans* // *Nature.* 1999. Vol. 402. P. 804—809.

Apfeld J., O'Connor G., McDonagh T., DiStefano P. S., Curtis R. The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in *C. elegans* // *Genes and Develop.* 2004. Vol. 18. P. 3004—3009.

Arantes-Oliveira N., Apfeld J., Dillin A., Kenyon C. Regulation of life-span by germ-line stem cells in *Caenorhabditis elegans* // *Science.* 2002. Vol. 295. P. 502—505.

Arking D. E., Krebsova A., Milan Macek S., Milan Macek J., Arking A., Mian I. S., Fried L., Hamosh A., Dey S., McIntosh I., Dietz H. C. Association of human aging with a functional variant of *klotho* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2002. Vol. 99, N 2. P. 856—861.

Atzmon G., Rincon M., Schechter C. B., Shuldiner A. R., Lip-ton R. B., Bergman A., Barzilai N. Lipoprotein genotype and conserved pathway for exceptional longevity in humans // *PLoS Biol.* 2006. Vol. 4, N 4. P. 562—569.

Aviv A., Shay J., Christensen K., Wright W. The longevity gender gap: are telomeres the explanation? // *Sci. Ageing Knowl. Environm.* 2005. Vol. 2005, N 23. P. 16.

Ayyadevara S., Ayyadevara R., Vertino A., Galecki A., Thaden J. J., Reis R. J. S. Genetic loci modulating fitness and life span in *Caenorhabditis elegans*: categorical trait interval mapping in CL2a X Bergerac-BO recombinant-inbred worms // *Genetics.* 2003. Vol. 163. P. 557—570.

Azam M., Lee J. Y., Abraham V., Chanoux R., Schoenly K. A., Johnson F. B. Evidence that the *S. cerevisiae* Sgs1 protein facilitates recombinational repair of telomeres during senescence // *Nucl. Acids Res.* 2006. Vol. 34, N 2. P. 506—516.

Baer B., Schmid-Hempel P. Sperm influences female hibernation success, survival and fitness in the bumble-bee *Bombus terrestris* // *Proc. Roy. Soc. London B.* 2005. Vol. 272. P. 319—323.

Bailey S. M., Murnane J. P. Telomeres, chromosome instability and cancer // *Nucl. Acids Res.* 2006. Vol. 34, N 8. P. 2408—2417.

Balaban R. S., Nemoto S., Finkel T. Mitochondria, oxidants and aging // *Cell.* 2005. Vol. 120. P. 483—495.

- Barbot W., Dupressoir A., Lazar V., Heidmann T. Epigenetic regulation of an IAP retrotransposon in the aging mouse: progressive demethylation and de-silencing of the element by its repetitive induction // *Nucl. Acids Res.* 2002. Vol. 30, N 11. P. 2365—2373.
- Barnes A. I., Boone J. M., Jacobson J., Partridge L., Chapman T. No extension of lifespan by ablation of germ line in *Drosophila II* *Proc. Biol. Sci.* 2006. Vol. 273, N 1589. P. 939—947.
- Barton A. Some aspects of cell division in *Saccharomyces cerevisiae II* *J. Gen. Microbiol.* 1950. Vol. 4. P. 84—86.
- Bases R. Heat shock protein 70 enhanced deoxyribonucleic acid base excision repair in human leukemic cells after ionizing radiation // *Cell Stress and Chaperones.* 2006. Vol. 11, N 3. P. 240—249.
- Baskaran R., Wood L. D., Whitaker L. L., Canman C. E., Morgan S. E., Xu Y., Barlow C., Baltimore D., Wynshaw-Boris A., Kas-tan M. B., Wang J. Y. Ataxia telangiectasia mutant protein activates c-Abl tyrosine kinase in response to ionising radiation // *Nature.* 1997. Vol. 387. P. 516—519.
- Bauer J. H., Poon P. C., Glatt-Deeley H., Abrams J. M., Helfand S. L. Neuronal expression of p53 dominant-negative proteins in adult *Drosophila melanogaster* extends life span // *Current Biol.* 2005. Vol. 15. P. 2063—2068.
- Baumeister R., Schafitzel E., Hertweck M. Endocrine signaling in *Caenorhabditis elegans* controls stress response and longevity // *J. Endocrinol.* 2006. Vol. 190. P. 191—202.
- Baur J. A., Zou Y., Shay J. W., Wright W. E. Telomere position effect in human cells // *Science.* 2001. Vol. 292. P. 2075—2077.
- Bayne A.-C. E. V., Mockett R. J., Orr W. C., Sohal R. S. Enhanced catabolism of mitochondrial superoxide/hydrogen peroxide and aging in transgenic *Drosophila II* *Biochem. J.* 2005. Vol. 391. P. 277—284.
- Beckstead R. B., Thummel C. S. Indicted: worms caught using steroids // *Cell.* 2006. Vol. 124. P. 1137—1140.
- Bennett M. R., Macdonald K., Chan S. W., Boyle J. J., Weiss-berg P. L. Cooperative interactions between RB and p53 regulate cell proliferation, cell senescence, and apoptosis in human vascular smooth muscle cells from atherosclerotic plaques // *Circ. Res.* 1998. Vol. 82, N 6. P. 704—712.
- Berdichevsky A., Viswanathan M., Horvitz H. R., Guarente L. *C. elegans* SIR-2.1 interacts with 14-3-3 proteins to activate DAF-16 and extend life span // *Cell.* 2006. Vol. 125. P. 1165—1177.
- Berman J. R., Kenyon C. Germ-cell loss extends *C. elegans* life span through regulation of DAF-16 by kri-1 and lipophilic-hormone signaling // *Cell.* 2006. Vol. 124. P. 1055—1068.
- Bitterman K. J., Medvedik O., Sinclair D. A. Longevity regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: linking metabolism, genome stability and heterochromatin // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2003. Vol. 67, N 3. P. 376—399.
- Blackburn E. H., Gall J. G. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena II* *J. Mol. Biol.* 1978. Vol. 120. P. 33—53.
- Blalock E. M., Chen K.-C., Sharrow K., Herman J. P., Porter N. M., Foster T. C., Landfield P. W. Gene microarrays in hippocampal aging: sta-

tistical profiling identifies novel processes correlated with cognitive impairment // *J. Neurosci.* 2003. Vol. 23, N 9. P. 3807—3819.

Blasco M. A. Mice with bad ends: mouse models for the study of telomeres and telomerase in cancer and aging // *EMBO J.* 2005. Vol. 24. P. 1095—1103.

Bodnar A. G., Ouellette M., Frolkis M., Holt S. E., Chiu C. P., Morin G. B., Harley C. B., Shay J. W., Lichtsteiner S., Wright W. E. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells // *Science.* 1998. Vol. 279. P. 349—352.

Bonafe M., Barbieri M., Marchegiani F., Olivieri F., Ragno E., Giampieri C., Mugianesi E., Centurelli M., Franceschi C., Paolisso G. Polymorphic variants of insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor and phosphoinositide 3-kinase genes affect IGF-I plasma levels and human longevity: cues for an evolutionarily conserved mechanism of life span control // *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 2003. Vol. 88, N 7. P. 3299—3304.

Bowles J. Shattered: Medawar's test tubes and their enduring legacy of chaos // *Med. Hypotheses.* 2000. Vol. 54, N 2. P. 326—339.

Brack C, Ackermann R., Shikama N., Thuring E., Labuhn M. *Drosophila* as a model system for molecular gerontology // *Molecular gerontology* / Ed. T. Rattan. New York: Plenum Press, 1996. P. 151—176.

Bracken A. P., Kleine-Kohlbrecher D., Dietrich N., Pasini D., Gargiulo G., Beekman C., Theilgaard-Mönch K., Minucci S., Porse B. T., Marine J.-C., Hansen K. H., Helin K. The polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells // *Genes and Develop.* 2007. Vol. 21. P. 525—530.

Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans II* *Genetics.* 1974. Vol. 77, N 1. P. 71—94.

Bronikowski A. M., Alberts S. C., Altmann J., Packer C, Carey K. D., Tatar M. The aging baboon: Comparative demography in a non-human primate // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2002. Vol. 99, N 14. P. 9591—9595.

Broué F., Liere F., Kenyon C, Baulieu E.-E. A steroid hormone that extends the lifespan of *Caenorhabditis elegans II* *Aging Cell.* 2007. Vol. 6. P. 87—94.

Broughton S. J., Piper M. D. W., Ikeya T., Bass T. M., Jacobson J., Driege Y., Martinez P., Hafen E., Withers D. J., Leivers S. J., Partridge L. Longer lifespan, altered metabolism, and stress resistance in *Drosophila* from ablation of cells making insulin-like ligands // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2005. Vol. 102, N 8. P. 3105—3110.

Brummel T., Ching A., Seroude L., Simon A. F., Benzer S. *Drosophila* lifespan enhancement by exogenous bacteria // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2004. Vol. 101, N 35. P. 12974—12979.

Butler R. N., Austad S. N., Barzilai N., Braun A., Helfand S., Larsen P. L., McCormick A. M., Perls T. T., Shuldiner A. R., Sprott R. L., Warner H. R. Longevity genes: from primitive organisms to humans // *J. Gerontol. Biol. Sci. Med. Sci.* 2003. Vol. 58A, N 7. P. 581—584.

Cameron J. R. Longevity is the most appropriate measure of health effects of radiation // *Radiology.* 2003. Vol. 229. P. 14—15.

Cameron J. R. Moderate dose rate ionizing radiation increases longevity // *Brit. J. Radiol.* 2005. Vol. 78. P. 11—13.

- Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors // *Cell*. 2005. Vol. 120. P. 513—522.
- Campisi J., d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells // *Nature Rev.* 2007. Vol. 8. P. 729—740.
- Cao L., Li W., Kim S., Brodie S. G., Deng C.-X. Senescence, aging, and malignant transformation mediated by p53 in mice lacking the *Brcal* full-length isoform // *Genes and Develop.* 2003. Vol. 17. P. 201—213.
- Cao S. X., Dhahbi J. M., Mote P. L., Spindler S. R. Genomic profiling of short- and long-term caloric restriction effects in the liver of aging mice // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2001. Vol. 98, N 19. P. 10630—10635.
- Carrel A., Ebeling A. H. Age and multiplication of fibroblasts // *J. Exp. Med.* 1921. Vol. 34. P. 599—606.
- Carter M. E., Brunet A. FOXO transcription factors // *Curr. Biol.* 2007. Vol. 17, N 4. P. 113—114.
- Carter T. A., Greenhall J. A., Yoshida S., Fuchs S., Helton R., Swaroop A., Lockhart D. J., Barlow C. Mechanisms of aging in senescence-accelerated mice // *Genome Biol.* 2005. Vol. 6, N 6. P. 1—17.
- Chai W., Shay J. W., Wright W. E. Human telomeres maintain their overhang length at senescence // *Mol. Cell. Biol.* 2005. Vol. 25, N 6. P. 2158—2168.
- Chang Z. F. Regulatory mechanisms of replication growth limits in cellular senescence // *J. Formos. Med. Assoc.* 1997. Vol. 96, N 10. P. 784—791.
- Charlesworth B. Evolution in age-structured populations. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1994. 320 p.
- Chavous D. A., Jackson F. R., O'Connor C. M. Extension of the *Drosophila* lifespan by overexpression of a protein repair methyltransferase // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2001. Vol. 98, N 26. P. 14 814—14 818.
- Cheng C.-L., Gao T.-Q., Wang Z., Li D.-D. Role of insulin/insulin-like growth factor 1 signaling pathway in longevity // *World J. Gastroenterol.* 2005. Vol. 11, N 13. P. 1891—1895.
- Choudhury A. R., Ju Z., Djojotubroto M. W., Schienke A., Lechel A., Schaezlein S., Jiang H., Stepczynska A., Wang C., Buer J., Lee H.-W., Zglinicki T. V., Ganser A., Schirmacher P., Nakauchi H., Rudolph K. L. Cdkn1a deletion improves stem cell function and lifespan of mice with dysfunctional telomeres without accelerating cancer formation // *Nature Genet.* 2007. Vol. 39, N 1. P. 99—105.
- Chrest F. J., Buchholz M. A., Kim Y. H., Kwon T. K., Nordin A. A. Anti-CD3-induced apoptosis in T-cells from young and old mice // *Cytometry*. 1995. Vol. 20, N 1. P. 33—42.
- Clarke J. M., Smith M. J. The genetics and cytology of *Drosophila* subobscura. XI. Hybrid vigor and longevity // *J. Genet.* 1955. Vol. 53. P. 172—180.
- Coffer P. OutFOXing the grim reaper: novel mechanisms regulating longevity by Forkhead transcription factors // *Sci. STKE*. 2003. Vol. 201. P. 1—4.
- Coffer P. J., Burgering B. M. T. Stressed marrow: FoxOs stem tumour growth // *Nature Cell Biol.* 2007. Vol. 9, N 3. P. 251—253.
- Cohen H. Y., Miller C., Bitterman K. J., Wall N. R., Hekking B., Kessler B., Howitz K. T., Gorospe M., Cabo R. D., Sinclair D. A. Calorie

restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase // *Science*. 2004. Vol. 305. P. 390—392.

Conboy I. M., Conboy M. J., Wagers A. J., Girma E. R., Weissman I. L., Rando T. A. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment // *Nature*. 2005. Vol. 433. P. 760—764.

Conti B., Sanchez-Alavez M., Winsky-Sommerer R., Morale M., Lucero J., Brownell S., Fabre V., Huitron-Resendiz S., Henriksen S., Zorrilla E., de Lecea L., Bartfai T. Transgenic mice with a reduced core body temperature have an increased life span // *Science*. 2006. Vol. 314. P. 825—828.

Cook-Wiens E., Grotewiel M. S. Dissociation between functional senescence and oxidative stress resistance in *Drosophila* // *Exp. Gerontol.* 2002. Vol. 37. P. 1345—1355.

Corona M., Robinson G. E. Genes of the antioxidant system of the honey bee: annotation and phylogeny // *Insect Mol. Biol.* 2006. Vol. 15, N 5. P. 687—701.

Corona M., Velarde R. A., Remolina S., Moran-Lauter A., Wang Y., Hughes K. A., Robinson G. E. Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2007. Vol. 104, N 17. P. 7128—7133.

Cortopassi G. A., Shibata D., Soong N.-W., Arnheim N. A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1992. Vol. 89. P. 7370—7374.

Cristofalo V. J., Allen R. G., Pignolo R. J., Martin B. G., Beck J. C. Relationship between donor age and the replicative lifespan of human cells in culture: A reevaluation // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1998. Vol. 95. P. 614—619.

Crompton N. E. Telomeres, senescence and cellular radiation response // *Cell. Mol. Life Sci.* 1997. Vol. 53, N 7. P. 568—575.

Cunningham M. A., Zhu Q., Unterman T. G., Hammond J. M. Follicle-stimulating hormone promotes nuclear exclusion of the Forkhead transcription factor FoxO1a via phosphatidylinositol 3-kinase in porcine granulosa cells // *Endocrinology*. 2003. Vol. 12. P. 5585—5594.

Curran S. P., Ruvkun G. Lifespan regulation by evolutionarily conserved genes essential for viability // *PLoS Genet.* 2007. Vol. 3, N 4. P. 479—487.

Cvejic S., Zhu Z., Felice S. J., Berman Y., Huang X.-Y. The endogenous ligand stunted of the GPCR methuselah extends lifespan in *Drosophila* // *Nature Cell Biol.* 2004. Vol. 6, N 6. P. 540—546.

Dammann P., Burda H. Sexual activity and reproduction delay ageing in a mammal // *Curr. Biol.* 2006. Vol. 16, N 4. P. 117—118.

Davidson F. F., Steller H. Blocking apoptosis prevents blindness in *Drosophila* retinal degeneration mutants // *Nature*. 1998. Vol. 391. P. 587—591.

Davies S., Kattel R., Bhatia B., Petherwick A., Chapman T. The effect of diet, sex and mating status on longevity in Mediterranean fruit flies (*Ceratitidis capitata*), Diptera: Tephritidae // *Exp. Gerontol.* 2005. Vol. 40. P. 784—792.

De Haan G., Williams R. W. A genetic and genomic approach to identify longevity genes in mice // *Mech. Ageing Develop.* 2004. Vol. 126, N 1. P. 133—138.

- De Luca M., Roshina N. V., Geiger-Thornsberry G. L., Lyman R. F., Pasyukova E. G., Mackay T. F. C. Dopa decarboxylase (*Ddc*) affects variation in *Drosophila* longevity // *Nature Genet.* 2003. Vol. 34, N 4. P. 429—433.
- 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. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1995. Vol. 92. P. 9363—9367.
- D'mello N. P., Childress A. M., Franklin D. S., Kale S. P., Pinswadi C, Jazwinski S. M. Cloning and characterization of LAG1, a longevity-assurance gene in yeast // *J. Biol. Chem.* 1994. Vol. 269, N 22. P. 15451—15459.
- Dobzhansky T. Biology, molecular and organismic // *Amer. Zool.* 1964. Vol. 4. P. 443—452.
- Driver C. J., McKechnie S. W. Transposable elements as a factor in the aging of *Drosophila melanogaster* // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1992. Vol. 673. P. 83—91.
- Du X., Shen J., Kugan N., Furth E. E., Lombard D. B., Cheung C, Pak S., Luo G., Pignolo R. J., DePinho R. A., Guarente L., Johnson F. B. Telomere shortening exposes functions for the mouse Werner and Bloom syndrome genes // *Mol. Cell. Biol.* 2004. Vol. 24, N 19. P. 8437—8446.
- Economos A. C, Lints F. A. Developmental temperature and life-span in *Drosophila melanogaster*. 1. Constant developmental temperature — evidence for physiological adaptation in a wide temperature-range // *Gerontology.* 1986. Vol. 32. P. 18—27.
- Edwards M. G., Anderson R. M., Yuan M., Kendzierski C. M., Weindruch R., Prolla T. A. Gene expression profiling of aging reveals activation of a p53-mediated transcriptional program // *BMC Genomics.* 2007. Vol. 8. P. 1—13.
- Egilmez N. K., Jazwinski S. M. Evidence for the involvement of a cytoplasmic factor in the aging of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *J. Bacteriol.* 1989. Vol. 171. P. 37—42.
- Egilmez N. K., Shmookler Reis R. J. Age-dependent somatic excision of transposable element Tc1 in *Caenorhabditis elegans* // *Mutat. Res.* 1994. Vol. 316, N 1. P. 17—24.
- Englander E. W. Gene expression changes reveal patterns of aging in the rat digestive tract // *Ageing Res. Revs.* 2005. Vol. 4. P. 564—578.
- Englander E. W., Ma H. Differential modulation of base excision repair activities during brain ontogeny: Implications for repair of transcribed DNA // *Mech. Ageing Develop.* 2006. Vol. 127. P. 64—69.
- Espejel S., Martin M., Klatt P., Martin-Caballero J., Flores J. M., Blasco M. A. A. Shorter telomeres, accelerated ageing and increased lymphoma in DNA-PKcs-deficient mice // *EMBO Reports.* 2004. Vol. 5, N 5. P. 503—509.
- Evason K., Huang C, Yamben I., Covey D. F., Kornfeld K. Anticonvulsant medications extend worm life-span // *Science.* 2005. Vol. 307. P. 258—262.
- Fabrizio P., Gattazzo C, Battistella L., Wei M., Cheng C, McGrew K., Longo V. D. Sir2 blocks extreme life-span extension // *Cell.* 2005a. Vol. 123. P. 655—667.

- Fabrizio P., Li L., Longo V. D. Analysis of gene expression profile in yeast aging chronologically // *Mech. Ageing Develop.* 2005b. Vol. 126, N 1. P. 11—16.
- Fan T. J., Han L. H., Cong R. S., Liang J. Caspase family proteases and apoptosis // *Acta Bioch. Biophys. Sinica.* 2005. Vol. 37, N 11. P. 719—727.
- Felkai S., Ewbank J. J., Lemieux J., Labbé J.-C., Brown G. G., Hekimi S. CLK-1 controls respiration, behavior and aging in the nematode *Caenorhabditis elegans* // *EMBO J.* 1999. Vol. 18, N7. P. 1783—1792.
- Ferguson M., Mockett R. J., Shen Y., Orr W. C., Sohal R. S. Age-associated decline in mitochondrial respiration and electron transport in *Drosophila melanogaster* // *Biochem. J.* 2005. Vol. 390. P. 501—511.
- Filatov D. A., Morozova T. V., Pasyukova E. G. Age dependence of the copia transposition rate is positively associated with copia transcript abundance in a *Drosophila melanogaster* isogenic line // *Mol. Gen. Genet.* 1998. Vol. 258, N 6. P. 646—654.
- Finch C. E. Variations in senescence and longevity include the possibility of negligible senescence // *J. Gerontol. Biol. Sci.* 1998. Vol. 53A P. 235—239.
- Finch C. E., Tanzi R. E. Genetics of aging // *Science.* 1997. Vol. 278. P. 407—411.
- Fisher R. A. The genetical theory of natural selection. Oxford: Clarendon Press, 1930. 145 p.
- Flatt T. Assessing natural variation in genes affecting *Drosophila* lifespan // *Mech. Ageing Develop.* 2004. Vol. 125. P. 155—159.
- Fox C. W., Czesak M. E., Wallin W. G. Complex genetic architecture of population differences in adult lifespan of a beetle: nonadditive inheritance, gender differences, body size and a large maternal effect // *J. Evol. Biol.* 2004. Vol. 17. P. 1007—1017.
- Franco S., Canela A., Klatt P., Blasco M. A. Effectors of mammalian telomere dysfunction: a comparative transcriptome analysis using mouse models // *Carcinogenesis.* 2005. Vol. 26, N 9. P. 1613—1626.
- Fraser H. B., Khaitovich P., Plotkin J. B., Paabo S., Eisen M. B. Aging and gene expression in the primate brain // *Plos Biol.* 2005. Vol. 3, N 9. P. 274.
- Fridell Y.-W. C., Sánchez-Bianco A., Silvia B. A., Helfand S. L. Targeted expression of the human uncoupling protein 2 (hUCP2) to adult neurons extends life span in the fly // *Cell Metabol.* 2005. Vol. 1. P. 145—152.
- Friedlander R. M., Brown R. H., Gagliardini V., Wang J., Yuan J. Inhibition of ICE slows ALS mice // *Nature.* 1997. Vol. 388. P. 31.
- Friedman D. B., Johnson T. E. A mutation in the *age-1* gene in *Caenorhabditis elegans* lengthens life and reduces hermaphrodite fertility // *Genetics.* 1988. Vol. 118. P. 75—86.
- Fujii M., Tanaka N., Miki K., Hossain M. N., Endoh M., Ayusawa D. Uncoupling of longevity and paraquat resistance in mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans* // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2005. Vol. 69, N 10. P. 2015—2018.

- Fujino Y., Ozaki K., Yamamasu S., Ito F., Matsuoka I., Hayashi E., Nakamura H., Ogita S., Sato E., Inoue M. DNA fragmentation of oocytes in aged mice // *Hum. Reproduct.* 1996. Vol. 11, N 7. P. 1480—1483.
- Fulop T. jr., Fouquet C., Allaire P., Perrin N., Lacombe G., Stan-kova J., Rola-Pleszczynski M., Gagne D., Wagner J. R., Khalil A., Dupuis G. Changes in apoptosis of human polymorphonuclear granulocytes with aging // *Mech. Ageing Develop.* 1997. Vol. 96, N 1—3. P. 15—34.
- Furuyama T., Kitayama K., Yamashita H., Mori N. Forkhead transcription factor FOXO1 (FKHR)-dependent induction of PDK4 gene expression in skeletal muscle during energy deprivation // *Biochem. J.* 2003. Vol. 375. P. 365—371.
- Gami M. S., Wolkow C. A. Studies of *Caenorhabditis elegans* DAF-2/insulin signaling reveal targets for pharmacological manipulation of lifespan // *Ageing Cell.* 2006. Vol. 5. P. 31—37.
- Garcia-Cao I., Garcia-Cao M., Martin-Caballero J., M.Criado L., Klatt P., M.Flores J., Weill J.-C, A. Blasco M., Serrano M. «Super p53» mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally // *EMBO J.* 2002. Vol. 21, N 22. P. 6225—6235.
- Garigan D., Hsu A.-L., Fraser A. G., Kamath R. S., Ahringer J., Kenyon C. Genetic analysis of tissue aging in *Caenorhabditis elegans*: A role for heat-shock factor and bacterial proliferation // *Genetics.* 2002. Vol. 161. P. 1101—1112.
- Gatford K. L., Fletcher T. P., Clarke I. J., Owens P. C, Quinn K. J., Walton P. E., Grant P. A., Hosking B. J., Egan A. R., Ponnampalam E. N. Sexual dimorphism of circulating somatotropin, insulin-like growth factor I and II, insulin-like growth factor binding proteins, and insulin: relationships to growth rate and carcass characteristics in growing lambs // *J. Anim. Sci.* 1996. Vol. 74. P. 1314—1325.
- Gavrilov L. A., Gavrilova N. S. Evolutionary theories of aging and longevity // *Sci. World J.* 2002. Vol. 2. P. 339—356.
- Gavrilova N. S., Gavrilov L. A., Evdokushkina G. N., Semyono-va V. G., Gavrilova A. L., Evdokushkina N. N., Kushnareva Yu. E., Kro-utko V. N., Andreyev A. Yu. Evolution, mutations and human longevity: European royal and noble families//*Hum. Biol.* 1998. Vol. 70. P. 799—804.
- Geiger H., Rennebeck G., Zant G. V. Regulation of hematopoietic stem cell aging *in vivo* by a distinct genetic element // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2005. Vol. 102, N 14. P. 5102—5107.
- Gems D., Riddle D. L. Genetic, behavioral and environmental determinants of male longevity in *Caenorhabditis elegans II* *Genetics.* 2000. Vol. 154. P. 1597—1610.
- Gentry A., Venkatachalam S. Complicating the role of p53 in aging // *Ageing Cell.* 2005. Vol. 4. P. 157—160.
- Gerisch B., Rottiers V., Li D., Motola D. L., Cummins C. L., Leh-rach H., Mangelsdorf D. J., Antebi A. A bile acid-like steroid modulates *Caenorhabditis elegans* lifespan through nuclear receptor signaling // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2007. Vol. 104, N 12. P. 5014—5019.
- Giannakou M. E., Goss M., Junger M. A., Hafen E., Leivers S. J., Partridge L. Long-lived *Drosophila* with overexpressed dFOXO in adult fat body // *Science.* 2004. Vol. 305. P. 361.

Giannakou M. E., Goss M., Jacobson J., Vinti G., Leivers S. J., Partridge L. Dynamics of the action of dFOXO on adult mortality in *Drosophila* // *Aging Cell*. 2007. Vol. 6. P. 429—438.

Giannakou M. E., Partridge L. The interaction between FOXO and SIRT1: tipping the balance towards survival // *Trends Cell Biol*. 2004. Vol. 14, N 8. P. 408—412.

Giorgio M., Trinei M., Migliaccio E., Pelicci P. G. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of aging signals? // *Nature Rev*. 2007. Vol. 8. P. 722—728.

Girardot F., Lasbleiz C, Monnier V., Tricoire H. Specific age related signatures in *Drosophila* body parts transcriptome // *BMC Genomics*. 2006. Vol. 7. P. 69.

Gire V., Roux P., Wynford-Thomas D., Brondello J. M., Dulic V. DNA damage checkpoint kinase Chk2 triggers replicative senescence // *EMBO J*. 2004. Vol. 23. P. 2554—2563.

Goddeeris M. M., Cook-Wiens E., Horton W. J., Wolf H., Stoltz-fus J. R., Borrusch M., Grotewiel M. S. Delayed behavioural aging and altered mortality in *Drosophila* p integrin mutants // *Aging Cell*. 2003. Vol. 2. P. 257—264.

Golden T. R., Melov S. Microarray analysis of gene expression with age in individual nematodes // *Aging Cell*. 2004. Vol. 3. P. 111—124.

Gompertz B. On the nature of the function expressive of the law of human mortality, and on a new mode of determining the value of life contingencies // *Phil. Trans. Roy. Soc. London*. 1825. Vol. 123. P. 513—585.

Gonzalez B. M. Experimental studies on the duration of life. VIII. The influence upon duration of life of certain mutant genes of *Drosophila melanogaster* // *Amer. Natur*. 1923. Vol. 57. P. 289—325.

Graff J., Jemielity S., Parker J. D., Parker K. M., Keller L. Differential gene expression between adult queens and workers in the ant *Lasius niger* // *Mol. Ecol*. 2007. Vol. 16. P. 675—683.

Greer E. L., Oskoui P. R., Banko M. R., Maniar J. M., Gygi M. P., Gygi S. P., Brunet A. The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor // *J. Biol. Chem*. 2007. Vol. 282, N 41. P. 30 107—30 119.

Greider C. W., Blackburn E. H. Identification of a specific telomere terminal transferase enzyme with two kinds of primer specificity // *Cell*. 1985. Vol. 51. P. 405—413.

Gruber H. E., Hanley E. N. jr. Analysis of aging and degeneration of the human intervertebral disc. Comparison of surgical specimens with normal controls // *Spine*. 1998. Vol. 23, N 7. P. 751—757.

Guarente L. Do changes in chromosomes cause aging? // *Cell*. 1996. Vol. 86, N 1. P. 9—12.

Guarente L., Kenyon C. Genetic pathways that regulate ageing in model organisms // *Nature*. 2000. Vol. 409. P. 255—262.

Guarente L., Ruvkun G., Amasino R. Aging, life span, and senescence // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1998. Vol. 95. P. 11 034—11 036.

Guo S., Sonenshein G. E. Forkhead box transcription factor FOXO3a regulates estrogen receptor alpha expression and is repressed by the

her-2/neu/phosphatidylinositol 3-kinase/akt signaling pathway // *Mol. Cell. Biol.* 2004. Vol. 24, N 19. P. 8681—8690.

Halaschek-Wiener J., Khattra J. S., McKay S., Pouzyrev A., Stott J. M., Yang G. S., Holt R. A., Jones S. J. M., Marra M. A., Brooks-Wilson A. R., Riddle D. L. Analysis of long-lived *C. elegans daf-2* mutants using serial analysis of gene expression // *Genome Res.* 2005. Vol. 15. P. 603—615.

Hamilton B., Dong Y., Shindo M., Liu W., Odell I., Ruvkun G., Lee S. S. A systematic RNAi screen for longevity genes in *C. elegans II* *Genes and Develop.* 2006. Vol. 19. P. 1544—1555.

Han D., Hosokawa T., Aoike A., Kawai K. Age-related enhancement of tumor necrosis factor (TNF) production in mice // *Mech. Ageing Develop.* 1995. Vol. 84, N 1. P. 39—54.

Handler A. M., Gomez S. P. P element excision in *Drosophila* is stimulated by gamma-irradiation in transient embryonic assays // *Genet. Res.* 1997. Vol. 70, N 1. P. 75—78.

Hansen M., Hsu A.-L., Dillin A., Kenyon C. New genes tied to endocrine, metabolic, and dietary regulation of lifespan from a *Caenorhabditis elegans* genomic RNAi screen // *PLoS Biol.* 2005. Vol. 1, N 1. P. 119—128.

Harada Y.-N., Shiomi N., Koike M., Ikawa M., Okabe M., Hirota S., Kitamura Y., Kitagawa M., Matsunaga T., Nikaido O., Shiomi T. Postnatal growth failure, short life span, and early onset of cellular senescence and subsequent immortalization in mice lacking the *Xeroderma Pigmentosum Group G* gene // *Mol. Cell. Biol.* 1999. Vol. 19, N 3. P. 2366—2372.

Hardy K., Mansfield L., Mackay A., Benvenuti S., Ismail S., Arora P., O'Hare M. J., Jat P. S. Transcriptional networks and cellular senescence in human mammary fibroblasts // *Mol. Biol. Cell.* 2005. Vol. 16. P. 943—953.

Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry // *J. Gerontol.* 1956 Vol. 11, N 3. P. 298—300.

Harman D. The biologic clock: the mitochondria? // *J. Amer. Geriatr. Soc.* 1972. Vol. 20. P. 145—147.

Hars E. S., Qi H., Ryazanov A. G., Jin S., Cai L., Hu C, Liu L. F. Autophagy regulates ageing in *C. elegans II* *Autophagy.* 2007. Vol. 3, N 2. P. 93—95.

Hashimoto S., Ochs R. L., Rosen F., Quach J., McCabe G., Solan J., Seegmiller J. E., Terkeltaub R., Lotz M. Chondrocyte-derived apoptotic bodies and calcification of articular cartilage // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1998. Vol. 95, N 6. P. 3094—3099.

Hayflick L., Moorhead P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains // *Exp. Cell Res.* 1961. Vol. 25. P. 585—621.

Heininger K. Aging is a deprivation syndrome driven by a germ-soma conflict // *Ageing Res. Revs.* 2002. Vol. 1, N 3. P. 481—536.

Helfand S. L., Inouye S. K. Rejuvenating views of the ageing process // *Natura Rev. Genet.* 2002. Vol. 3. P. 149—153.

Helfand S. L., Rogina B. Genetics of aging in the fruit fly, *Drosophila melanogaster II* *Annu. Rev. Genet.* 2003a. Vol. 37. P. 329—348.

Helfand S. L., Rogina B. Molecular genetics of aging in the fly: is this the end of the beginning? // *BioEssays.* 2003b. Vol. 25. P. 134—141.

- Herbig U., Sedivy J. M. Regulation of growth arrest in senescence: telomere damage is not the end of the story // *Mech. Ageing Develop.* 2006. Vol. 127. P. 16—24.
- Herman W. S., Tatar M. Juvenile hormone regulation of longevity in the migratory monarch butterfly // *Proc. Roy. Soc. London B.* 2001. Vol. 268. P. 2509—2514.
- Herndon F. J., Hsu H. C., Mountz J. D. Increased apoptosis of CD45RO- T cells with aging // *Mech. Ageing Develop.* 1997. Vol. 94, N 1—3. P. 123—134.
- Higami Y., Shimokawa I., Tomita M., Okimoto T., Koji T., Kobayashi N., Ikeda T. Aging accelerates but life-long dietary restriction suppresses apoptosis-related Fas expression on hepatocytes // *Amer. J. Pathol.* 1997. Vol. 151, N 3. P. 659—663.
- Hofer A. C., Tran R. T., Aziz O. Z., Wright W., Novelli G., Shay J., Lewis M. Shared phenotypes among segmental progeroid syndromes suggest underlying pathways of aging // *J. Gerontol.: Biol. Sci.* 2005. Vol. 60A, N 1. P. 10—20.
- Holmes D. J., Ottinger M. A. Birds as long-lived animal models for the study of aging // *Exp. Gerontol.* 2003. Vol. 38. P. 1365—1375.
- Honda Y., Honda S. The daf-2 gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans* // *FASEB J.* 1999. Vol. 13. P. 1385—1393.
- Hoopes L. L. M., Budd M., Choe W., Weitao T., Campbell J. L. Mutations in DNA replication genes reduce yeast life span // *Mol. Cell. Biol.* 2002. Vol. 22, N 12. P. 4136—4146.
- Hsieh C.-C., Papaconstantinou J. Thioredoxin-ASK1 complex levels regulate ROS-mediated p38 MAPK pathway activity in livers of aged and long-lived Snell dwarf mice // *FASEB J.* 2006. Vol. 20, N 2. P. 259—268.
- Hsin H., Kenyon C. Signals from the reproductive system regulate the lifespan of *C. elegans* // *Nature.* 1999. Vol. 399. P. 362—366.
- Huang C., Xiong C., Kornfeld K. Measurements of age-related changes of physiological processes that predict lifespan of *Caenorhabditis elegans* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2004. Vol. 101, N 21. P. 8084—8089.
- Huang H., Regan K. M., Lou Z., Chen J., Tindall D. J. CDK2-dependent phosphorylation of FOXO1 as an apoptotic response to DNA damage // *Science.* 2006. Vol. 314. P. 294—297.
- Huang H., Tindall D. J. FOXO factors: a matter of life and death // *Future Oncol.* 2006. Vol. 2, N 1. P. 83—89.
- Hughes K. A. The inbreeding decline and average dominance of genes affecting male life-history characters in *Drosophila melanogaster* // *Genet. Res.* 1995. Vol. 65. P. 41—52.
- Hughes K. A., Alipaz J. A., Drnevich J. M., Reynolds R. M. A test of evolutionary theories of aging // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2002. Vol. 99, N 22. P. 14 286—14 291.
- Hunt C. R., Dix D. J., Sharma G. G., Pandita R. K., Gupta A., Funk M., Pandita T. K. Genomic instability and enhanced radiosensitivity in Hsp70.1- and Hsp70.3-deficient mice // *Mol. Cell. Biol.* 2004. Vol. 24, N 2. P. 899—911.

- Hutter E., Renner K., Pfister G., Stockl P., Jansen-Durr P., Gnai-ger E. Senescence-associated changes in respiration and oxidative phosphorylation in primary human fibroblasts // *Biochem. J.* 2004. Vol. 380. P. 919—928.
- Hwangbo D. S., Gersham B., Tu M.-P., Palmer M., Tatar M. *Drosophila* dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body // *Nature.* 2004. Vol. 429. P. 562—566.
- Jazwinski S. M. Longevity, genes, and aging // *Science.* 1996. Vol. 273. P. 54—59.
- Jemielity S., Chapuisat M., Parker J. D., Keller L. Long live the queen: studying aging in social insects // *Age.* 2005. Vol. 27. P. 241—248.
- Jemielity S., Kimura M., Parker K. M., Parker J. D., Cao X., Aviv A., Keller L. Short telomeres in short-lived males: what are the molecular and evolutionary causes? // *Aging Cell.* 2007. Vol. 6. P. 225—233.
- Jeong J., Juhn K., Lee H., Kim S.-H., Min B.-H., Lee K.-M., Cho M.-H., Park G.-H., Lee K.-H. SIRT1 promotes DNA repair activity and deacetylation of Ku70 // *Exp. Mol. Med.* 2007. Vol. 39, N 1. P. 8—13.
- Jiang C. H., Tsien J. Z., Schultz P. G., Hu Y. The effects of aging on gene expression in the hypothalamus and cortex of mice // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2001. Vol. 98, N 4. P. 1930—1934.
- Joeng K. S., Song E. J., Lee K.-J., Lee J. Long lifespan in worms with long telomeric DNA // *Nature Genet.* 2004. Vol. 36, N 6. P. 607—611.
- Johnson T. E. Increased life-span of age-1 mutants in *Caenorhabditis elegans* and lower Gompertz rate of aging // *Science.* 1990. Vol. 249. P. 908—912.
- Ju Y.-J., Lee K.-H., Park J.-E., Yi Y.-S., Yun M.-Y., Ham Y.-H., Kim T.-J., Choi H. M., Han G. J., Lee J.-H., Lee J., Han J. S., Lee K.-M., Park G.-H. Decreased expression of DNA repair proteins Ku70 and Mre11 is associated with aging and may contribute to the cellular senescence // *Exp. Mol. Med.* 2006. Vol. 38, N 6. P. 686—693.
- Kabakov A. E., Malyutina Y. V., Latchman D. S. Hsf1-mediated stress response can transiently enhance cellular radioresistance // *Radiat. Res.* 2006. Vol. 165, N 4. P. 410—423.
- Kaerberlein M., Burtner C. R., Kennedy B. K. Recent developments in yeast aging // *PLoS Genet.* 2007. Vol. 3, N 5. P. 655—660.
- Kaerberlein M., Kirkland K. T., Fields S., Kennedy B. K. Sir2-independent life span extension by calorie restriction in yeast // *PLoS Biol.* 2004. Vol. 2, N 9. P. 1381—1387.
- Kaerberlein M., Kirkland K. T., Fields S., Kennedy B. K. Genes determining yeast replicative life span in a long-lived genetic background // *Mech. Ageing Develop.* 2005a. Vol. 126. P. 491—504.
- Kaerberlein M., McDonagh T., Heltweg B., Hixon J., Westman E. A., Caldwell S. D., Napper A., Curtis R., DiStefano P. S., Fields S., Bedalov A., Kennedy B. K. Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol // *J. Biol. Chem.* 2005b. Vol. 280, N 17. P. 17 038—17 045.
- Kaerberlein M., Powers R. W., Steffen K. K., Westman E. A., Hu D., Dang N., Kerr E. O., Kirkland K. T., Fields S., Kennedy B. K. Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients // *Science.* 2005c. Vol. 310. P. 1193—1196.

Kapahi P., Zid B. M., Harper T., Koslover D., Sapin V., Benzer S. Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway // *Curr. Biol.* 2004. Vol. 14. P. 885—890.

Karasik D., Demissie S., Cupples A., Kiel D. P. Disentangling the genetic determinants of human aging: biological age as an alternative to the use of survival measures // *J. Gerontol.: Biol. Sci. Med. Sci.* 2005. Vol. 60A, N 5. P. 574—587.

Kato Y., Tani T., Sotomaru Y., Kurokawa K., Kato J., Doguchi H., Yasue H., Tsunoda Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult // *Science.* 1998. Vol. 282. P. 2095—2098.

Katsnelson A. Aging on the clock // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 172, N 3. P. 327.

Kawano T., Nagatomo R., Kimura Y., Gengyo-Ando K., Mitani S. Disruption of *ins-11*, a *Caenorhabditis elegans* insulin-like gene, and phenotypic analyses of the gene-disrupted animal // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2006. Vol. 70, N 12. P. 3084—3087.

Kayo T., Allison D. B., Weindruch R., Prolla T. A. Influences of aging and caloric restriction on the transcriptional profile of skeletal muscle from rhesus monkeys // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2001. Vol. 98, N 9. P. 5093—5098.

Keller L., Jemielity S. Social insects as a model to study the molecular basis of ageing // *Exp. Gerontol.* 2006. Vol. 41. P. 553—556.

Kennedy B. K., Austriaco N. R., Zhang J., Guarente L. Mutation in the silencing gene *SIR4* can delay aging in *S. cerevisiae* // *Cell.* 1995. Vol. 80, N 3. P. 485—496.

Kenyon C., Chang J., Gensch E., Rudner A., Tabtiang R. *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type // *Nature.* 1993. Vol. 366. P. 461—464.

Keyes W. M., Wu Y., Vogel H., Guo X., Lowe S. W., Mills A. A. p63 Deficiency activates a program of cellular senescence and leads to accelerated aging // *Genes and Develop.* 2005. Vol. 19. P. 1986—1999.

Kim H., Kim J., Lee Y., Yang J., Han K. Transcriptional regulation of the Methuselah gene by dorsal protein in *Drosophila melanogaster* // *Molecules and Cells.* 2006. Vol. 21, N 2. P. 261—268.

Kim H. K., Kim Y. K., Song I.-H., Baek S.-H., Lee S.-R., Kim J. H., Kim J.-R. Down-regulation of a Forkhead transcription factor, FOXO3a, accelerates cellular senescence in human dermal fibroblasts // *J. Gerontol.: Biol. Sci.* 2005. Vol. 60A, N 1. P. 1—7.

Kimura K., Tanaka N., Nakamura N., Takano S., Ohkuma S. Knock-down of mitochondrial heat shock protein 70 promotes progeria-like phenotypes in *C. elegans* // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 282, N 8. P. 5910—5918.

Kirkwood T. B. Evolution of ageing // *Nature.* 1977. Vol. 270. P. 301—304.

Klass M., Hirsh D. I. Non-ageing developmental variant of *Caenorhabditis elegans* // *Nature.* 1976. Vol. 260, N 5551. P. 523—525.

Koc A., Gasch A. P., Rutherford J. C., Kim H.-Y., Gladyshev V. N. Methionine sulfoxide reductase regulation of yeast lifespan reveals reactive

- oxygen species-dependent and -independent components of aging // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2004. Vol. 101, N 21. P. 7999—8004.
- Koh K., Evans J. M., Hendricks J. C., Sehgal A. A *Drosophila* model for age-associated changes in sleep:wake cycles // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2006. Vol. 103, N 37. P. 13843—13847.
- Konag T., Bozcuk A. N. The effect of hybrid dysgenesis on life span of *Drosophila* // Age. 1995. Vol. 18. P. 19—23.
- Kondo S., Senoo-Matsuda N., Hiromi Y., Miura M. DRONC coordinates cell death and compensatory proliferation // Mol. Cell. Biol. 2006. Vol. 26, N 19. P. 7258—7268.
- Kondratov R. V. A role of the circadian system and circadian proteins in aging // Ageing Res. Rev. 2007. Vol. 6. P. 12—27.
- Kondratov R. V., Kondratova A. A., Gorbacheva V. Y., Vykhovnets O. V., Antoch M. P. Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock // Genes and Develop. 2006. Vol. 20. P. 1868—1873.
- Korner P., Schmid-Hempel P. Effects of sperm on female longevity in the bumble-bee *Bombus terrestris* L. // Proc. Roy. Soc. London B (Suppl.). 2003. Vol. 270. P. 227—229.
- Korpelainen H. Genetic maternal effects on human life span through the inheritance of mitochondrial DNA // Hum. Hered. 1999. Vol. 49. P. 183—185.
- Kozlova T., Thummel C. S. Steroid regulation of postembryonic development and reproduction in *Drosophila II* Trends Endocrinol. Metabol. 2000. Vol. 11, N 7. P. 276—280.
- Kramer J. M., Davidge J. T., Lockyer J. M., Staveley B. E. Expression of *Drosophila* FOXO regulates growth and can phenocopy starvation // BMC Develop. Biol. 2003. Vol. 3, N 5. P. 1—14.
- Krishnamurthy J., Torrice C, Ramsey M. R., Kovalev G. I., Al-Regaiey K, Su L., Sharpless N. E. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging // J. Clin. Investigat. 2004. Vol. 114, N 9. P. 1299—1307.
- Kujoth G. C, Bradshaw P. C, Haroon S., Prolla T. A. The role of mitochondrial DNA mutations in mammalian aging // PLoS Genet. 2007. Vol. 3, N 2. P. 161—173.
- Kujoth G. C, Hiona A., Pugh T. D., Someya S., Panzer K, Wohlge-muth S. E., Hofer T., Seo A. Y., Sullivan R., Jobling W. A., Morrow J. D., Remmen H. V., Sedivy J. M., Yamasoba T., Tanokura M., Weindruch R., Leeuwenburgh C, Prolla T. A. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging // Science. 2005. Vol. 309. P. 481—484.
- Kujoth G. C, Leeuwenburgh C, Prolla T. A. Mitochondrial DNA mutations and apoptosis in mammalian aging // Cancer Res. 2006. Vol. 66, N 15. P. 7386—7389.
- Kurosu H., Yamamoto M., Clark J. D., Pastor J. V., Nandi A., Gurnani P., McGuinness O. P., Chikuda H., Yamaguchi M., Kawaguchi H., Shimomura I., Takayama Y., Herz J., Kahn C. R., Rosenblatt K. P., Kuro-o M. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho // Science. 2005. Vol. 309. P. 1829—1833.
- Kurz D. J. Telomere biology in cardiovascular disease // Kardiovaskuläre Medizin. 2004. Vol. 7. P. 433—442.

- Kusama S., Ueda R., Sutla T., Nishihara S., Matsuura E. T. Involvement of *Drosophila* Sir2-like genes in the regulation of life span // *Genes Genet. Syst.* 2006. Vol. 81. P. 341—348.
- Kyng K. J., May A., Kelvraa S., Bohr V. A. Gene expression profiling in Werner syndrome closely resembles that of normal aging // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2003. Vol. 100, N 21. P. 12 259—12 264.
- Labinskyy N., Csiszar A., Orosz Z., Smith K., Rivera A., Buffenstein R., Ungvari Z. Comparison of endothelial function, O₂ and H₂O₂ production, and vascular oxidative stress resistance between the longest-living rodent, the naked mole rat, and mice // *Amer. J. Physiol.: Heart. Circ. Physiol.* 2006. Vol. 291. P. 2698—2704.
- Lam E. W.-F., Francis R. E., Petkovic M. FOXO transcription factors: key regulators of cell fate // *Biochem. Soc. Transact.* 2006. Vol. 34, N 5. P. 722—726.
- Lamitina S. T., Strange K. Transcriptional targets of DAF-16 insulin signaling pathway protect *C. elegans* from extreme hypertonic stress // *Amer. J. Physiol.* 2005. Vol. 288. P. 467—474.
- Lamming D. W., Latorre-Esteves M., Medvedik O., Wong S. N., Tsang F. A., Wang C., Lin S. J., Sinclair D. A. HST2 mediates SIR2-independent life-span extension by calorie restriction // *Science.* 2005. Vol. 309. P. 1861—1864.
- Landis G. N., Abdueva D., Skvortsov D., Yang J., Rabin B. E., Carrick J., Tavaré S., Tower J. Similar gene expression patterns characterize aging and oxidative stress in *Drosophila melanogaster* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2004. Vol. 101, N 20. P. 7663—7668.
- Landis G., Bhole D., Lu L., Tower J. High-frequency generation of conditional mutations affecting *Drosophila melanogaster* development and life span // *Genetics.* 2001. Vol. 158. P. 1167—1176.
- Landis G. N., Bhole D., Tower J. A search for doxycycline-dependent mutations that increase *Drosophila melanogaster* life span identifies the *VhaSFD*, *Sugar baby*, *filamin*, *fwd* and *Cct1* genes // *Genome Biol.* 2003. Vol. 4. P. 1—14.
- Lane M. A., Baert D. J., Rumlert W. V., Weindruch R., Ingram D. K., Tilmont E. M., Cutler R. G., Roth G. S. Calorie restriction lowers body temperature in rhesus monkeys, consistent with a postulated anti-aging mechanism in rodents // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1996. Vol. 93. P. 4159—4164.
- Langley E., Pearson M., Faretta M., Bauer U.-M., Frye R. A., Minucci S., Pelicci P. G., Kouzarides T. Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence // *EMBO J.* 2002. Vol. 21, N 10. P. 2383—2396.
- LeBel C, Wellinger R. J. Telomeres: what's new at your end? // *J. Cell Sci.* 2005. Vol. 118, N 13. P. 2785—2788.
- Le Bourg E. Oxidative stress, aging and longevity in *Drosophila melanogaster* // *FEBS Lett.* 2001. Vol. 498. P. 183—186.
- Le Bourg E., Minois N., Bullens P., Baret P. A mild stress due to hypergravity exposure at young age increases longevity in *Drosophila melanogaster* males // *Biogerontology.* 2000. Vol. 1, N2. P. 145—155.

- Lee C.-K., Weindruch R., Prolla T. A. Gene-expression profile of the ageing brain in mice // *Nature Genet.* 2000. Vol. 25. P. 294—297.
- Lee C.-K., Allison D. B., Brand J., Weindruch R., Prolla T. A. Transcriptional profiles associated with aging and middle age-onset caloric restriction in mouse hearts // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2002. Vol. 99, N23. P. 14 988—14 993.
- Lee D. W., Zhang K., Ning Z.-Q., Raabe E. H., Tintner S., Wieland R., Wilkins B. J., Kim J. M., Blough R. I., Arceci R. J. Proliferation-associated SNF2-like gene (PASG): A SNF2 family member altered in leukemia1 // *Cancer Res.* 2000. Vol. 60. P. 3612—3622.
- Lehtinen M. K., Yuan Z., Boag P. R., Yang Y., Villné J., Becker E. B. E., DiBacco S., Iglesia N., Gygi S., Blackwell T. K., Bonni A. A conserved MST-FOXO signaling pathway mediates oxidative-stress responses and extends life span // *Cell.* 2006. Vol. 125. P. 987—1001.
- Lengyel F., Vértés Z., Kovács K. A., Környei J. L., Siimegi B., Vértés M. Effect of estrogen and inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase on Akt and FOXO1 in rat uterus // *Steroids.* 2007. Vol. 72, N 5. P. 422—428.
- Lesur I., Campbell J. L. The transcriptome of prematurely aging yeast cells is similar to that of telomerase-deficient cells // *Mol. Biol. Cell.* 2004. Vol. 15. P. 1297—1312.
- Li J. C., Xu F. Influences of light—dark shifting on the immune system, tumor growth and life span of rats, mice and fruit flies as well as on the counteraction of melatonin // *Biol. Signals.* 1997. Vol. 6. P. 77—89.
- Li P., Lee H., Guo S., Unterman T. G., Jenster G., Bai W. AKT-independent protection of prostate cancer cells from apoptosis mediated through complex formation between the androgen receptor and FKHR // *Mol. Cell. Biol.* 2003. Vol. 23, N 1. P. 104—118.
- Libert S., Zwiener J., Chu X., van Voorhies W., Roman G., Pletcher S. D. Regulation of *Drosophila* life span by olfaction and food-derived odors // *Science.* 2007. Vol. 315, N 5815. P. 1133—1137.
- Libina N., Berman J. R., Kenyon C. Tissue-specific activities of *C. elegans* DAF-16 in the regulation of lifespan // *Cell.* 2003. Vol. 115. P. 489—502.
- Liker A., Szekely T. Mortality costs of sexual selection and parental care in natural populations of birds // *Evolution.* 2005. Vol. 59, N 4. P. 890—897.
- Limoli C. L., Hartmann A., Shephard L., Yang C. R., Boothman D. A., Bartholomew J., Morgan W. F. Apoptosis, reproductive failure, and oxidative stress in Chinese hamster ovary cells with compromised genomic integrity // *Cancer Res.* 1998. Vol. 58, N 16. P. 3712—3718.
- Lin M.-J., Tang L.-Y., Reddy M. N., Shen C.-K. J. DNA methyltransferase gene *dDnmt1* and longevity of *Drosophila II* *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280, N 2. P. 861—864.
- Lin S. J., Defossez P. A., Guarente L. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae II* *Science.* 2000. Vol. 289. P. 2126—2128.
- Lin Y. J., Seroude L., Benzer S. Extended life-span and stress resistance in the *Drosophila* mutant *methuselah II* *Science.* 1998. Vol. 282. P. 943—946.

- Linnane A. W., Marzuki S., Ozawa T., Tanaka M. Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases // *Lancet*. 1989. Vol. 1, N 8639. P. 642—645.
- Linnen C, Tatar M., Promislow D. Cultural artifacts: a comparison of senescence in natural, laboratory-adapted and artificially selected lines of *Drosophila melanogaster* // *Evol. Ecol. Res.* 2001. Vol. 3. P. 877—888.
- Lints F. A., Lints C. V., Bullens P., Bourgois M., Delince J. Unexplained variations in life span of the *Oregon-R* strain of *Drosophila melanogaster* over a four-year period // *Exp. Gerontol.* 1989. Vol. 24. P. 265—271.
- Lithgow G. J., White T. M., Melov S., Johnson T. E. Thermotolerance and extended life-span conferred by single-gene mutations and induced by thermal stress // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1995. Vol. 92. P. 7540—7544.
- Liu J.-W., Chandra D., Rudd M. D., Butler A. P., Pallotta V., Brown D., Coffey P. J., Tang D. G. Induction of pro-survival molecules by apoptotic stimuli: involvement of FOXO3a and ROS // *Oncogene*. 2005. Vol. 24. P. 2020—2031.
- Loeb J., Northrop J. H. Is there a temperature coefficient for the duration of life? // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1916. Vol. 2. P. 456—457.
- Longo V. D., Mitteldorf J., Skulachev V. P. Programmed and altruistic ageing // *Nature Rev.* 2005. Vol. 6. P. 866—872.
- Lu T., Pan Y., Kao S.-Y., Li C, Kohane I., Chan J., Yankner B. A. Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain // *Nature*. 2004. Vol. 429. P. 883—891.
- Luckinbill L. S., Clare M. J. Selection for life span in *Drosophila melanogaster* // *Heredity*. 1985. Vol. 55. P. 9—18.
- Luo X., Puig O., Hyun J., Bohmann D., Jasper H. Foxo and Fos regulate the decision between cell death and survival in response to UV irradiation // *EMBO J.* 2007. Vol. 26. P. 380—390.
- Macip S., Igarashi M., Fang L., Chen A., Pan Z.-Q., Lee S. W., Aaronson S. A. Inhibition of p21-mediated ROS accumulation can rescue p21-induced senescence // *EMBO J.* 2002. Vol. 21, N 9. P. 2180—2188.
- Madureira P. A., Varshochi R., Constantinidou D., Francis R. E., Coombes R. C, Yao K.-M., Lam E. W.-F. The Forkhead box M1 protein regulates the transcription of the estrogen receptor α in breast cancer cells // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281, N 35. P. 25167—25176.
- Magalhaes J. P. D., Cabral J. A. S., Magalhaes D. The influence of genes on the aging process of mice: a statistical assessment of the genetics of aging // *Genetics*. 2005. Vol. 169. P. 265—274.
- Maier B., Gluba W., Bernier B., Turner T., Mohammad K., Guise T., Sutherland A., Thorner M., Scrabble H. Modulation of mammalian life span by the short isoform of p53 // *Genes and Develop.* 2004. Vol. 18. P. 306—319.
- Mair W., Piper M. D. W., Partridge L. Calories do not explain extension of life span by dietary restriction in *Drosophila* // *PLoS Biol.* 2005. Vol. 3, N 7. P. 1—7.
- Maisin J. R., Gerber G. B., Vankerkom J., Wamhersie A. Survival and diseases in *C57BL* mice exposed to X-rays or 3.1 MeV neutrons at an age of 7 or 21 days // *Radial. Res.* 1996. Vol. 146. P. 453—460.

- Majercak J. M. The effects of light and temperature on the *Drosophila* circadian clock // Dis. Abstr. Internat. 2002. Vol. 62, N 1. P. 98.
- Maklakov A. A., Kremer N., Arnqvist G. Adaptive male effects on female ageing in seed beetles // Proc. Roy. Soc. London B. 2005. Vol. 272. P. 2485—2489.
- Martin G. M. Epigenetic drift in aging identical twins // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2005. Vol. 102, N 30. P. 10 413—10 414.
- Martin G. M., Austad S. N., Johnson T. E. Genetic analysis of ageing: role of oxidative damage and environmental stresses // Nature Genet. 1996. Vol. 13, N 1. P. 25—34.
- Martin G. M., Bergman A., Barzilai N. Genetic determinants of human health span and life span: progress and new opportunities // PLoS Genet. 2007. Vol. 3, N 7. P. 1121—1130.
- Martin I., Grotewiel M. S. Oxidative damage and age-related functional declines // Mech. Ageing Develop. 2006. Vol. 127. P. 411—423.
- Martin J. A., Buckwalter J. A. Telomere erosion and senescence in human articular cartilage chondrocytes // J. Gerontol.: Biol. Sci. Med. Sci. 2001. Vol. 56A, N 4. P. 172—179.
- Mason J. M., Ransom J., Konev A. Y. A deficiency screen for dominant suppressors of telomeric silencing in *Drosophila II* Genetics. 2004. Vol. 168. P. 1353—1370.
- Massie H. R., Aiello V. R., Williams T. R. Influence of photosensitizers and light on the life span of *Drosophila II* Mech. Ageing Develop. 1993. Vol. 68, N 1—3. P. 175—182.
- Massie H. R., Whitney S. J. Preliminary evidence for photochemical ageing in *Drosophila II* Mech. Ageing Develop. 1991. Vol. 58, N 1 — P. 37—48.
- Matheu A., Maraver A., Klatt P., Flores I., Garcia-Cao I., Borrás C., Flores J. M., Vina J., Blasco M. A., Serrano M. Delayed ageing through damage protection by the Arf/p53 pathway // Nature. 2007. Vol. 448. P. 375—380.
- Matsumoto M., Accili D. All roads lead to FOXO // Cell Metabol. 2005. Vol. 1. P. 215—216.
- Mattson M. P. Cellular actions of p-amiloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives // Physiol. Rev. 1997. Vol. 77, N 4. P. 1081—1132.
- Mazumdar A., Kumar R. Estrogen regulation of Pak1 and FKHR pathways in breast cancer cells // FEBS Lett. 2003. Vol. 535. P. 6—10.
- McCarroll S. A., Murphy C. T., Zou S., Pletcher S. D., Chin C.-S., Jan Y. N., Kenyon C., Bargmann C. I., Li H. Comparing genomic expression patterns across species identifies shared transcriptional profile in aging // Nature Genet. 2004. Vol. 36. P. 197—204.
- McCay C. M., Maynard L. A., Sperling G., Barnes L. L. Retarded growth, life span, ultimate body size and age changes in the albino rat after feeding diets restricted in calories // J. Nutrition. 1939. Vol. 18. P. 1—13.
- McClintock B. The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays* // Genetics. 1941. Vol. 41. P. 234—282.
- McColl G., Vantipalli M. C., Lithgow G. J. *C. elegans* ortholog of mammalian *Ku70* interacts with insulin-like signaling to modulate stress resistance and life span // FASEB J. 2005. Vol. 19, N 12. P. 1716—1718.

McCord J. M., Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocypre) // J. Biol. Chem. 1969. Vol. 244. P. 6049—6055.

McElwee J. J., Schuster E., Blanc E., Thomas J. H., Gems D. Shared transcriptional signature in *Caenorhabditis elegans* Dauer larvae and long-lived *daf-2* mutants implicates detoxification system in longevity assurance // J. Biol. Chem. 2004. Vol. 279, N 43. P. 44 533—44 543.

Medawar P. B. Old age and natural death // Modern Quarterly. 1946. Vol. 2. P. 30—49.

Medawar P. B. An unsolved problem of biology. London: Lewis a. Co, 1952. 24 p.

Melk A., Ramassar V., Helms L. M. H., Moore R., Rayner D., Soles K., Halloran P. F. Telomere shortening in kidneys with age // J. Amer. Soc. Nephrol. 2000. Vol. 11. P. 444—453.

Migliaccio E., Giorgio M., Mele S., Pelicci G., Reboldi P., Pandolfi P. P., Lanfrancione L., Pelicci G. The *p66^{shc}* adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals // Nature. 1999. V. 402. P. 309—313.

Miller R. A. A position paper on longevity genes // Sci. Ageing Knowl. Environm. 2001. Vol. 2001, N 9. P. 6.

Min K.-J., Tatar M. *Drosophila* diet restriction in practice: do flies consume fewer nutrients? // Mech. Ageing Develop. 2006. Vol. 127. P. 93—96.

Minois N., Frajnt M., Dolling M., Lagona F., Schmid M., Kuchenhoff H., Gampe J., Vaupel J. W. Symmetrically dividing cells of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* do age // Biogerontology. 2006. Vol. 7. P. 261—267.

Misteli P. S. Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson—Gilford progeria syndrome // Nat. Med. 2005. Vol. 11, N 4. P. 440—445.

Miura Y. Oxidative stress, radiation-adaptive responses and aging // J. Radiat. Res. 2004. Vol. 45, N 3. P. 357—372.

Miwa S., Riyahi K., Partridge L., Brand M. D. Lack of correlation between mitochondrial reactive oxygen species production and life span in *Drosophila II* Ann. N. Y. Acad. Sci. 2004. Vol. 1019. P. 388—391.

Mooijaart S. P., Brandt B. W., Baldal E. A., Pijpe J., Kuningas M., Beekman M., Zwaan B. J., Slagboom P. E., Westendorp R. G. J., Hemst D. V. *C. elegans* DAF-12, nuclear hormone receptors and human longevity and disease at old age // Ageing Res. Revs. 2005. Vol. 4. P. 351—371.

Morgan S. E., Lovly C, Pandita T. K., Shiloh Y., Kastan M. B. Fragments of ATM which have dominant-negative or complementing activity // Mol. Cell. Biol. 1997. Vol. 17, N 4. P. 2020—2029.

Morley J. F., Morimoto R. I. Regulation of longevity in *Caenorhabditis elegans* by heat shock factor and molecular chaperones // Mol. Biol. Cell. 2004. Vol. 15. P. 657—664.

Morrow G., Battistini S., Zhang P., Tanguay R. M. Decreased lifespan in the absence of expression of the mitochondrial small heat shock protein Hsp22 in *Drosophila II* J. Biol. Chem. 2004. Vol. 279, N 42. P. 43 382—43 385.

- Morrow G., Samson M., Michaud S., Tanguay R. M. Overexpression of the small mitochondrial Hsp22 extends *Drosophila* life span and increases resistance to oxidative stress // *FASEB J.* 2004. Vol. 18, N3. P. 598—599.
- Mortimer R. K., Johnston J. R. Life span of individual yeast cells // *Nature.* 1959. Vol. 183. P. 1751—1752.
- Moskalev A. A. Investigation of the relationship of radio-induced apoptosis of *Drosophila* larvae nervous system and the ageing of imago nervous system // Protection of the environment from the effects of ionizing radiation: Contribut. Papers Intern. Conf. Stockholm (Sweden), 2003. P. 80—86.
- Moskalev A. Radiation-induced life span alteration of *Drosophila* lines with genotype differences // *Biogerontology.* 2007. Vol. 8, N 5. P. 499—504.
- Mostoslavsky R., Chua K. F., Lombard D. B., Pang W. W., Fischer M. R., Gellon L., Liu P., Mostoslavsky G., Franco S., Murphy M. M., Mills K. D., Patel P., Hsu J. T., Hong A. L., Ford E., Cheng H.-L., Kennedy C., Nunez N., Bronson R., Frendewey D., Auerbach W., Valenzuela D., Karow M., Hottiger M. O., Hursting S., Barrett J. C., Guarente L., Mulligan R., Demple B., Yancopoulos G. D., Alt F. W. Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6 // *Cell.* 2006. Vol. 124. P. 315—329.
- Motta M. C., Divecha N., Lemieux M., Kamel C., Chen D., Gu W., Bultsma Y., McBurney M., Guarente L. Mammalian SIRT1 represses Forkhead transcription factors // *Cell.* 2004. Vol. 116. P. 551—563.
- Mountz J. D., Wu J., Zhou T., Hsu H. C. Cell death and longevity: implications of Fas-mediated apoptosis in T-cell senescence // *Immunol. Rev.* 1997. Vol. 160. P. 19—30.
- Muller H. J. The remaking of chromosomes // *Collecting Net.* 1938. Vol. 8. P. 182—195.
- Muller H.-G., Carey J. R., Wu D., Liedo P., Vaupel J. W. Reproductive potential predicts longevity of female Mediterranean fruit flies // *Proc. Roy. Soc. London B.* 2001. Vol. 268. P. 445—450.
- Murakami S., Johnson T. E. A genetic pathway conferring life extension and resistance to UV stress in *Caenorhabditis elegans II* *Genetics.* 1996. Vol. 143, N 3. P. 1207—1218.
- Murakami S., Salmon A., Miller R. A. Multiplex stress resistance in cells from long-lived dwarf mice//*FASEB J.* 2003. Vol. 17, N 11. P. 1565—1566.
- Murray V. Are transposons a cause of ageing? // *Mutat. Res.* 1990. Vol. 237, N 2. P. 59—63.
- Naka K., Tachibana A., Ikeda K., Motoyama N. Stress-induced premature senescence in hTERT-expressing ataxia telangiectasia fibroblasts // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279, N 3. P. 2030—2037.
- Nelson D. W., Padgett R. W. Insulin worms its way into the spotlight // *Genes and Develop.* 2003. Vol. 17. P. 813—818.
- Nikitin A. G., Shmookler Reis R. J. Role of transposable elements in age-related genomic instability // *Genet. Res.* 1997. Vol. 69, N 3. P. 183—195.
- Ning Y., Xu J.-f., Li Y., Chavez L., Riethman H. C., Lansdorp P. M., Weng N.-p. Telomere length and the expression of natural telomeric genes

in human fibroblasts // *Hum. Mol. Genet.* 2003. Vol. 12, N 11. P. 1329—1336.

Norsgaard H., Clark B. F., Rattan S. I. Distinction between differentiation and senescence and the absence of increased apoptosis in human keratinocytes undergoing cellular aging *in vitro* // *Exp. Gerontol.* 1996. Vol. 31. P. 563—570.

Oakley E. J., Van Zant G. Unraveling the complex regulation of stem cells: implications for aging and cancer // *Leukemia.* 2007. Vol. 21, N4. P. 612—621.

Ogonuki N., Inoue K., Yamamoto Y., Noguchi Y., Tanemura K., Suzuki O., Nakayama H., Doi K., Ohtomo Y., Satoh M., Nishida A., Ogura A. Early death of mice cloned from somatic cells // *Nature Genet.* 2002. Vol. 30, N 3. P. 253—254.

Oh S. W., Mukhopadhyay A., Svrzikapa N., Jiang F., Davis R. J., Tissenbaum H. A. JNK regulates lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating nuclear translocation of Forkhead transcription factor/DAF-16 // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2005. Vol. 102, N 12. P. 4494—4499.

Olovnikov A. M. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon // *J. Theor. Biol.* 1973. Vol. 41, N 1. P. 181—190.

Olsen A., Vantipalli M. C., Lithgow G. J. Checkpoint proteins control survival of the postmitotic cells in *Caenorhabditis elegans* // *Science.* 2006. Vol. 312. P. 1381—1385.

O'Neill B. In Methuselah's mould // *PLoS Biol.* 2004. Vol.2, N 1. P. 14—17.

Ono H., Ono Y. Nephrosclerosis and hypertension // *Med. Clin. North Amer.* 1997. Vol. 81, N 6. P. 1273—1288.

Orr W. C., Radyuk S. N., Prabhudesai L., Toroser D., Benes J. J., Luchak J. M., Mockett R. J., Rebrin I., Hubbard J. G., Sohal R. S. Overexpression of glutamate-cysteine ligase extends life span in *Drosophila melanogaster* // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280, N 45. P. 37 331—37 338.

Orr W. C., Sohal R. S. Does overexpression of Cu,Zn-SOD extend life span in *Drosophila melanogaster*? // *Exp. Gerontol.* 2003. Vol. 38. P. 227—230.

Papazoglu C, Mills A. A. p53: At the crossroad between cancer and ageing // *J. Pathol.* 2007. Vol. 211. P. 124—133.

Pappolla M. A., Sos M., Omar R. A., Bick R. J., Hickson-Bick D. L., Reiter R. J., Efthimiopoulos S., Robakis N. K. Melatonin prevents death of neuroblastoma cells exposed to the Alzheimer amyloid peptide // *J. Neurosci.* 1997. Vol. 17, N 5. P. 1683—1690.

Paradis E., Douillard H., Koutroumanis M., Goodyer C, LeBlanc A. Amyloid P peptide of Alzheimer's disease downregulates Bcl-2 and upregulates Bax expression in human neurons // *J. Neurosci.* 1996. Vol. 16, N 23. P. 7533—7539.

Park P. U., Defossez P. A., Guarente L. Effects of mutations in DNA repair genes on formation of ribosomal DNA circles and life span in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Cell. Biol.* 1999. Vol. 19, N5. P. 3848—3856.

Park S. H., Lee S. J., Chung H. Y., Kim T. H., Cho C. K., Yoo S. Y., Lee Y. S. Inducible heat-shock protein 70 is involved in the radioadaptive response // *Radiat. Res.* 2000. Vol. 153, N 3. P. 318—326.

Parker J. D., Parker K. M., Sohal B. H., Sohal R. S., Keller L. Decreased expression of Cu—Zn superoxide dismutase 1 in ants with extreme lifespan // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2004. Vol. 101, N 10. P. 3486—3489.

Parsons P. A. Low level exposure to ionizing radiation: do ecological and evolutionary considerations imply phantom risks? // *Perspect. Biol. Med.* 1999. Vol. 43, N 1. P. 57—68.

Parsons P. A. Radiation hormesis: challenging LNT theory via ecological and evolutionary considerations // *Health Physics.* 2002. Vol. 82, N 4. P. 513—516.

Partridge L., Gems D. Mechanisms of ageing: public or private? // *Nature Rev. Genet.* 2002. Vol. 3. P. 165—175.

Partridge L., Gems D., Withers D. J. Sex and death: what is the connection? // *Cell.* 2005a. Vol. 120. P. 461—472.

Partridge L., Pletcher S. D., Mair W. Dietary restriction, mortality trajectories, risk and damage // *Mech. Ageing Develop.* 2005b. Vol. 126. P. 35—41.

Pascal T., Debacq-Chainiaux F., Chretien A., Bastin C., Dabee A.-F., Bertholet V., Remade J., Toussaint O. Comparison of replicative senescence and stress-induced premature senescence combining differential display and low-density DNA arrays // *FEBS Lett.* 2005. Vol. 579. P. 3651—3659.

Passarino G., Montesanto A., Dato S., Giordano S., Domma F., Mart V., Feraco E., Benedictis G. D. Sex and age specificity of susceptibility genes modulating survival at old age // *Hum. Hered.*, 2006. Vol. 62. P. 213—220.

Patel M. N., Knight C. G., Karageorgi C., Leroi A. M. Evolution of germ-line signals that regulate growth and aging in nematodes // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2002. Vol. 99, N 2. P. 769—774.

Patil C. K., Mian S., Campisi J. The thorny path linking cellular senescence to organismal aging // *Mech. Ageing Develop.* 2005. Vol. 126. P. 1040—1045.

Pearl R. The rate of living being an account of some experimental studies on the biology of life duration. London: Univ. London Press, 1928. 185 p.

Pearl R., Parker S. L., Gonzalez B. M. Experimental studies on the duration of life. VII. The Mendelian inheritance of duration of life in crosses of wild type and quintuple stocks of *D. m. II* *Amer. Natur.* 1923. Vol. 57. P. 153—192.

Pedram M., Sprung C. N., Gao Q., Lo A. W. I., Reynolds G. E., Murnane J. P. Telomere position effect and silencing of transgenes near telomeres in the mouse // *Mol. Cell. Biol.* 2006. Vol. 26, N 5. P. 1865—1878.

Pellicci P. G. Do tumor-suppressive mechanisms contribute to organism aging by inducing stem cell senescence? // *J. Clin. Invest.* 2004. Vol. 113. P. 4—7.

Pennisi E. Premature aging gene discovered // *Science.* 1996. Vol. 272. P. 193—194.

- Pittendrigh C. S., Minis D. H. Circadian systems: longevity as a function of circadian resonance in *Drosophila melanogaster* II Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1972. Vol. 69, N 6. P. 1537—1539.
- Pletcher S. D., Macdonald S. J., Marguerie R., Certa U., Stearns S. C., Goldstein D. B., Partridge A. L. Genome-wide transcript profiles in aging and calorically restricted *Drosophila melanogaster* II Curr. Biol. 2002. Vol. 12. P. 712—723.
- Poirier L., Seroude L. Genetic approaches to study aging in *Drosophila melanogaster* II Age. 2005. Vol. 27. P. 165—182.
- Powers R. W., Kaerberlein M., Caldwell S. D., Kennedy B. K., Fields S. Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling // Genes and Develop. 2006. Vol. 20. P. 174—184.
- Provinciali M., Di Stefano G., Bulian D., Tibaldi A., Fabris N. Effect of melatonin and pineal grafting on thymocyte apoptosis in aging mice // Mech. Ageing Develop. 1996. Vol. 90, N 1. P. 1—19.
- Provinciali M., Di Stefano G., Stronati S. Flow cytometric analysis of CD3/TCR complex, zinc, and glucocorticoid-mediated regulation of apoptosis and cell cycle distribution in thymocytes from old mice // Cytometry. 1998. Vol. 32, N 1. P. 1—8.
- Puig O., Marr M. T., Ruhf M. L., Tjian R. Control of cell number by *Drosophila* FOXO: downstream and feedback regulation of the insulin receptor pathway // Genes and Develop. 2003. Vol. 17. P. 2006—2020.
- Puig O., Tjian R. Transcriptional feedback control of insulin receptor by dFOXO/FOXO1 // Genes and Develop. 2005. Vol. 19. P. 2435—2446.
- Puig O., Tjian R. Nutrient availability and growth. Regulation of insulin signaling by dFOXO/FOXO1 // Cell cycle. 2006. Vol. 5, N 5. P. 503—505.
- Raices M., Maruyama H., Dillin A., Karlseder J. Uncoupling of longevity and telomere length in *C. elegans* II PLoS Genet. 2005. Vol. 1, N 3. P. 295—301.
- Rand D. M., Fry A., Sheldahl L. Nuclear-mitochondrial epistasis and *Drosophila* aging: introgression of *Drosophila simulans* mtDNA modifies longevity in *D. melanogaster* nuclear backgrounds // Genetics. 2006. Vol. 172. P. 329—341.
- Rattan S. I. S., Gonzalez-Dosal R., Nielsen E. R., Kraft D. C., Weibel J., Kahns S. Slowing down aging from within: mechanistic aspects of anti-aging hormetic effects of mild heat stress on human cells // Acta Biochim. Polonica. 2004. Vol. 51, N 2. P. 481—492.
- Rea S. L., Wu D., Cypser J. R., Vaupel J. W., Johnson T. E. A stress-sensitive reporter predicts longevity in isogenic populations of *Caenorhabditis elegans* II Nature Genet. 2005. Vol. P. 1—5.
- Rebrin I., Bayne A. C., Mockett R. J., Orr W. C., Sohal R. S. Free amino thiols, glutathione redox state and protein mixed disulphides in aging *Drosophila melanogaster* II Biochem. J. 2004. Vol. 382. P. 131—136.
- Remmen H. V., Ikeno Y., Hamilton M., Pahlavani M., Wolf N., Thorpe S. R., Alderson N. L., Baynes J. W., Epstein C. J., Huang T.-T., Nelson J., Strong R., Richardson A. Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging // Physiol. Genomics. 2003. Vol. 16. P. 29—37.

- Reznick D., Bryant M., Holmes D. The evolution of senescence and post-reproductive lifespan in guppies (*Poecilia reticulata*) // PLoS Biol. 2006. Vol. 4, N 1. P. 136—143.
- Rheinwald J. G., Hahn W. C., Ramsey M. R., Wu J. Y., Guo Z., Tsao H., Luca M. D., Catricala C., O'Toole K. M. A two-stage, p16^{INK4A}- and p53-dependent keratinocyte senescence mechanism that limits replicative potential independent of telomere status // Mol. Cell. Biol. 2002. Vol. 22, N 14. P. 5157—5172.
- Riethman H., Ambrosini A., Castaneda C., Finklestein J., Hu X.-L., Mudunuri U., Paul S., Wei J. Mapping and initial analysis of human subtelomeric sequence assemblies // Genome Res. 2004. Vol. 14. P. 18—28.
- Rodwell G. E. J., Sonu R., Zahn J. M., Lund J., Wilhelmy J., Wang L., Xiao W., Mindrinos M., Crane E., Segal E., Myers B. D., Brooks J. D., Davis R. W., Higgins J., Owen A. B., Kim S. K. A transcriptional profile of aging in the human kidney // PLoS Biol. 2004. Vol. 2, N 12. P. 2191—2201.
- Rogina B., Helfand S. L. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2004. Vol. 101, N 45. P. 15 998—16 003.
- Rose M. R., Charlesworth B. Genetics of life history in *Drosophila melanogaster*. II. Exploratory selection experiments // Genetics. 1981. Vol. 97. P. 187—196.
- Rottiers V., Motola D. L., Gerisch B., Cummins C. L., Nishiwaki K., Mangelsdorf D. J., Antebi A. Hormonal control of *C. elegans* Dauer formation and life span by a rieske-like oxygenase // Develop. Cell. 2006. Vol. 10. P. 1—10.
- Rueppell O., Amdam G. V., Page R. E. jr., Carey J. R. From genes to societies // Sci. Ageing Knowl. Environm. 2004. Vol. 2004, N 5. P. 1—11.
- Russell S. J., Kahn C. R. Endocrine regulation of ageing // Nature Rev. 2007. Vol. 8. P. 681—691.
- Sacher G. A. Effects of X-rays on the survival of *Drosophila* imagoes // Physiol. Zool. 1963. Vol. 36. P. 295—311.
- Sainz R. M., Mayo J. C., Uria H., Kotler M., Antolin I., Rodriguez C., Menendez-Pelaez A. The pineal neurohormone melatonin prevents *in vivo* and *in vitro* apoptosis in thymocytes // J. Pineal. Res. 1995. Vol. 19, N4. P. 178—188.
- Salminen A., Helenius M., Lahtinen T., Korhonen P., Tapiola T., Soininen H., Solovyan V. Down-regulation of Ku autoantigen, DNA-dependent protein kinase, and poly (ADP-ribose) polymerase during cellular senescence // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1997. Vol. 238, N 3. P. 712—716.
- Sapolsky R. M. Organismal stress and telomeric aging: An unexpected connection // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2004. Vol. 101, N 50. P. 17 323—17 324.
- Sasaki S., Fukuda N. Dose-response relationship for life-shortening and carcinogenesis in mice irradiated at day 7 postnatal age with dose range below 1 Gy of gamma rays // J. Radiat. Res. 2006. Vol. 47. P. 135—145.
- Satyanarayana A., Wiemann S. U., Buer J., Lauber J., Dittmar K. E. J., Stefeld T. W., Blasco M. A., Manns M. P., Rudolph K. L. Telomere shortening impairs organ regeneration by inhibiting cell cycle

re-entry of a subpopulation of cells // EMBO J. 2003. Vol.22, N15. P. 4003—4013.

Scaffidi P., Gordon L., Misteli T. The cell nucleus and aging: tantalizing clues and hopeful promises // PLoSBiol. 2005. Vol. 3, N 11. P. 1855—1859.

Scaffidi P., Misteli T. Lamin A-dependent nuclear defects in human aging // Science. 2006. Vol. 312. P. 1059—1063.

Schmidt M., Fernandez de Mattos S., van der Horst A., Klompmaaker R., Kops G. J., Lam E. W., Burgering B. M., Medema R. H. Cell cycle inhibition by FOXO Forkhead transcription factors involves downregulation of cyclin D // Mol. Cell. Biol. 2002. Vol. 22, N 22. P. 7842—7852.

Schmidt P. S., Duvernell D. D., Eanes W. F. Adaptive evolution of a candidate gene for aging in *Drosophila II* Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2000. Vol. 97, N 20. P. 10 861—10 865.

Schneider E. L., Mitsui Y. The relationship between *in vitro* cellular aging and *in vivo* human age // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1976. Vol. 73, N 10. P. 3584—3588.

Schoenmaker M., de Craen A. J. M., de Meijer P. H. E. M., Beekman M., Blauw G. J., Slagboom E., Westendorp R. G. J. Evidence of genetic enrichment for exceptional survival using a family approach: the Leiden longevity study // Europ. J. Hum. Genet. 2006. Vol. 14. P. 79—84.

Schriner S. E., Linford N. J., Martin G. M., Treuting P., Ogburn C. E., Emond M., Coskun P. E., Ladiges W., Wolf N., Remmen H. V., Wallace D. C., Rabinovitch P. S. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria // Science. 2005. Vol. 308. P. 1909—1911.

Schuur E. R., Loktev A. V., Sharma M., Sun Z., Roth R. A., Weigel A. R. J. Ligand-dependent interaction of estrogen receptor- α with members of the Forkhead transcription factor family // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276, N 36. P. 33 554—33 560.

Seehuus S.-C., Norberg K., Gimsa U., Krekling T., Amdam G. V. Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2006. Vol. 103, N 4. P. 962—967.

Seishima M., Takemura M., Saito K., Sano H., Minatoguchi S., Fujiwara H., Hachiya T., Noma A. Highly sensitive ELISA for soluble Fas in serum: increased soluble Fas in the elderly // Clin. Chem. 1996. Vol. 42, N 12. P. 1911—1914.

Seong K. H., Ogashiwa T., Matsuo T., Fuyama Y., Aigaki T. Application of the gene search system to screen for longevity genes in *Drosophila II* Biogerontology. 2001a. Vol. 2, N 3. P. 209—217.

Seong K. H., Matsuo T., Fuyama Y., Aigaki T. Neural-specific overexpression of *Drosophila plenty* of SH3s (DPOSH) extends the longevity of adult flies // Biogerontology. 2001b. Vol. 2, N 4. P. 271—281.

Servomaa K., Rytomaa T. UV light and ionizing radiations cause programmed death of rat chlorleukemia cells by inducing retropositions of a mobile DNA element (L1Rn) // Intern. J. Radiat. Biol. 1990. Vol. 57, N2. P. 331—343.

Sgro C. M., Partridge L. A delayed wave of death from reproduction in *Drosophila II* Science. 1999. Vol. 286. P. 2521—2524.

- Shapira M., Segal E., Botstein D. Disruption of yeast Forkhead-associated cell cycle transcription by oxidative stress // *Mol. Biol. Cell.* 2004. Vol. 15. P. 5659—5669.
- Sharpless N. E., DePinho R. A. How stem cells age and why this makes us grow old // *Nature Rev.* 2007. Vol. 8. P. 703—713.
- Shaw J. A new theory on longevity // *Harvard Mag.* 2004. Vol. 107, N 2. P. 17—18.
- Shay J. W., Wright W. E. Hayflick, his limit, and cellular ageing // *Nature Rev.* 2000. Vol. 1. P. 72—76.
- Shay J. W., Wright W. E. Telomeres are double-strand DNA breaks hidden from DNA damage responses // *Mol. Cell.* 2004. Vol. 14, N 4. P. 420—421.
- Shay J. W., Wright W. E. Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase // *Carcinogenesis.* 2005. Vol. 26, N 5. P. 867—874.
- Sheeba V., Chandrashekar M. K., Joshi A., Sharma V. K. Developmental plasticity of the locomotor activity rhythm of *Drosophila melanogaster* // *J. Insect Physiol.* 2002. Vol. 48, N 1. P. 25—32.
- Sheeba V., Sharma V. K., Shubha K., Chandrashekar M. K., Joshi A. The effect of different light regimes on adult life span in *Drosophila melanogaster* is partly mediated through reproductive output // *J. Biol. Rhythms.* 2000. Vol. 15, N 5. P. 380—392.
- Shmookler Reis R. J., Kang P., Ayyadevara S. Quantitative trait loci define genes and pathways underlying genetic variation in longevity // *Exp. Gerontol.* 2006. Vol. 41. P. 1046—1054.
- Short S., Woodcock M., Marples B., Joiner M. C. Effects of cell cycle phase on low-dose hyper-radiosensitivity // *Intern. J. Radiat. Biol.* 2003. Vol. 79, N 2. P. 99—105.
- Shumaker D. K., Dechat T., Kohlmaier A., Adam S. A., Bozovsky M. R., Erdos M. R., Eriksson M., Goldman A. E., Khuon S., Collins F. S., Jenuwein T., Goldman R. D. Mutant nuclear lamin A leads to progressive alterations of epigenetic control in premature aging // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2006. Vol. 103, N 23. P. 8703—8708.
- Sierra-Rivera E., Voorhees G. J., Freeman M. L. Gamma irradiation increases Hsp-70 in Chinese hamster ovary cells // *Radiat Res.* 1993. Vol. 135, N 1. P. 40—45.
- Simon A. F., Liang D. T., Krantz D. E. Differential decline in behavioral performance of *Drosophila melanogaster* with age // *Mech. Ageing Develop.* 2006. Vol. 127, N 7. P. 647—651.
- Simon A. F., Shih C., Mack A., Benzer S. Steroid control of longevity in *Drosophila melanogaster* // *Science.* 2003. Vol. 299. P. 1407—1410.
- Sinclair D. A., Guarente L. Extrachromosomal rDNA circles — a cause of aging in yeast // *Cell.* 1997. Vol. 91, N 7. P. 1033—1042.
- Sinclair D., Mills K., Guarente L. Aging in *Saccharomyces cerevisiae* // *Annu. Rev. Microbiol.* 1998. Vol. 52. P. 533—560.
- Singhal P. C., Reddy K., Franki N., Sanwal V., Kapasi A., Gibbons N., Mattana J., Valderrama E. Age and sex modulate renal expression of SGP-2 and transglutaminase and apoptosis of splenocytes, thymocytes, and macrophages // *J. Invest. Med.* 1997. Vol. 45, N 9. P. 567—575.

- Smith D. W. Is greater female longevity a general finding among animals? // *Biol. Revs. Cambridge Phil. Soc.* 1989. Vol. 64, N 1. P. 1—12.
- Smith J. M. The effects of temperature and of egg laying on the longevity of *Drosophila subobscura* II J. Exp. Biol. 1958. Vol. 35. P. 832—842.
- Snoke M. S., Promislow D. E. L. Quantitative genetic tests of recent senescence theory: age-specific mortality and male fertility in *Drosophila melanogaster* II *Heredity*. 2003. Vol. 91. P. 546—556.
- Soti C., Csermely P. Protein stress and stress proteins: implications in aging and disease // *J. Biosci.* 2007. Vol. 32, N 3. P. 511—515.
- Souza-Pinto N. C., Croteau D. L., Hudson E. K., Hansford R. G., Bohr V. A. Age-associated increase in 8-oxo-deoxyguanosine glycosylase/AP lyase activity in rat mitochondria // *Nucl. Acids Res.* 1999. Vol. 27, N 8. P. 1935—1942.
- Speakman J. R. Body size, energy metabolism and lifespan // *J. Exp. Biol.* 2005. Vol. 208. P. 1717—1730.
- Spencer C. C., Howell C. E., Wright A. R., Promislow D. E. L. Testing an «aging gene» in long-lived *Drosophila* strains: increased longevity depends on sex and genetic background // *Aging Cell*. 2003. Vol. 2. P. 123—130.
- Stearns S. C., Ackermann M., Doebeli M., Kaiser M. Experimental evolution of aging, growth, and reproduction in fruitflies // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2000. Vol. 97, N 7. P. 3309—3313.
- Stindl R. Tying it all together: telomeres, sexual size dimorphism and the gender gap in life expectancy // *Med. Hypotheses*. 2004. Vol. 62. P. 151—154.
- Sullivan A. A., Thummel C. S. Temporal profiles of nuclear receptor gene expression reveal coordinate transcriptional responses during *Drosophila* development // *Mol. Endocrinol.* 2003. Vol. 17, N 11. P. 2125—2137.
- Sun L.-Q., Lee D. W., Zhang Q., Xiao W., Raabe E. H., Meeker A., Miao D., Huso D. L., Arceci R. J. Growth retardation and premature aging phenotypes in mice with disruption of the SNF2-like gene, *PASGII* *Genes and Develop.* 2004. Vol. 18. P. 1035—1046.
- Swindell W. R., Bouzat J. L. Inbreeding depression and male survivorship in *Drosophila*: implications for senescence theory // *Genetics*. 2006. Vol. 172, N 1. P. 317—327.
- Szutorisz H., Lingner J., Cuthbert A. P., Trott D. A., Newbold R. F., Nabholz M. A chromosome 3-encoded repressor of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene controls the state of hTERT chromatin // *Cancer Res.* 2003. Vol. 63. P. 689—695.
- Tahoe N. M. A., Mokhtarzadeh A., Curtsinger J. W. Age-related RNA decline in adult *Drosophila melanogaster* II *J. Gerontol.* 2004. Vol. 59. P. 896—901.
- Tatar M. The neuroendocrine regulation of *Drosophila* aging // *Exp. Gerontol.* 2004. Vol. 39. P. 1745—1750.
- Tatar M., Bartke A., Antebi A. The endocrine regulation of aging by insulin-like signals // *Science*. 2003. Vol. 299. P. 1346—1351.
- Tavernarakis N., Driscoll M. Caloric restriction and lifespan: a role for protein turnover? // *Mech. Ageing Develop.* 2002. Vol. 123. P. 215—229.
- Terman A., Gustafsson B., Brunk U. T. Autophagy, organelles and ageing // *J. Pathol.* 2007. Vol. 211. P. 134—143.

- Terzibasi E., Valenzano D. R., Cellerino A. The short-lived fish *Nothobranchius furzeri* as a new model system for aging studies // *Exp. Gerontol.* 2007. Vol. 42. P. 81—89.
- Tettweiler G., Miron M., Jenkins M., Sonenberg N., Lasko P. F. Starvation and oxidative stress resistance in *Drosophila* are mediated through the eIF4E-binding protein, d4E-BP // *Genes and Develop.* 2005. Vol. 19. P. 1840—1843.
- Thomas S. E., Anderson S., Gordon K. L., Oyama T. T., Shankland S. J., Johnson R. J. Tubulointerstitial disease in aging: evidence for underlying peritubular capillary damage, a potential role for renal ischemia // *J. Amer. Soc. Nephrol.* 1998. Vol. 9, N 2. P. 231—242.
- Toivonen J. M., Walker G. A., Martinez-Diaz P., Bjedov I., Driegen Y., Jacobs H. T., Gems D., Partridge L. No influence of *indy* on lifespan in *Drosophila* after correction for genetic and cytoplasmic background effects // *PLoS Genet.* 2007. Vol. 3, N 6. P. 973—983.
- Tomei L. D., Umansky S. R. Aging and apoptosis control // *Neurol. Clin.* 1998. Vol. 16, N 3. P. 735—745.
- Toth J. I., Yang S. H., Qiao X., Beigneux A. P., Gelb M. H., Moulson C. L., Miner J. H., Young S. G., Fong L. G. Blocking protein farnesyltransferase improves nuclear shape in fibroblasts from humans with progeroid syndromes // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2005. Vol. 102, N36. P. 12 873—12 878.
- Tower J. Aging mechanisms in fruit flies // *BioEssays.* 1996. Vol. 18, N 10. P. 799—807.
- Trifunovic A., Hansson A., Wredenberg A., Rovio A. T., Dufour E., Khvorostov I., Spelbrink J. N., Wibom R., Jacobs H. T., Larsson N.-G. Somatic mtDNA mutations cause aging phenotypes without affecting reactive oxygen species production // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2005. Vol. 102, N 50. P. 17 993—17 998.
- Trifunovic A., Wredenberg A., Falkenberg M., Spelbrink J. N., Rovio A. T., Bruder C. E., Bohlooly-Y M., Gidlof S. G., Oldfors A., Wibom R., Tornell J., Jacobs H. T., Larsson N.-G. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase // *Nature.* 2004. Vol. 429. P. 417—423.
- Troemel E. R., Chu S. W., Reinke V., Lee S. S., Ausubel F. M., Kim D. H. p38 MAPK regulates expression of immune response genes and contributes to longevity in *C. elegans* // *PLoS Genet.* 2006. Vol. 2, N 11. P. 1725—1739.
- Trougakos I. P., Saridaki A., Panayotou G., Gonos E. S. Identification of differentially expressed proteins in senescent human embryonic fibroblasts // *Mech. Ageing Develop.* 2006. Vol. 127. P. 88—92.
- Tu M.-P., Flatt T., Tatar M. Juvenile and steroid hormones in *Drosophila melanogaster* longevity // *Handbook of the biology of aging.* Amsterdam: Acad. Press, 2006. P. 407—440.
- Turrens J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species // *J. Physiol.* 2003. Vol. 552, N 2. P. 335—344.
- Upton A. C. Radiation hormesis: data and interpretations // *Crit. Revs. Toxicol.* 2001. Vol. 31, N 4—5. P. 681—695.

- Vaiserman A. M., Voitenko V. P. Early programming of adult longevity: demographic and experimental studies // *J. Anti-aging Med.* 2003. Vol. 6, N 1. P. 1—7.
- Valenzano D. R., Terzibas E., Genade T., Cattaneo A., Domenici L., Cellerino A. Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate // *Curr. Biol.* 2006. Vol. 16. P. 296—300.
- van de Ven M., Andressoo J. O., Holcomb V. B., von Lindern M., Jong W. M., De Zeeuw C. I., Suh Y., Hasty P., Hoeijmakers J. H., van der Horst G. T., Mitchell J. R. Adaptive stress response in segmental progeria resembles long-lived dwarfism and calorie restriction in mice // *PLoS Genet.* 2006. Vol. 2, N 12. P. 2013—2025.
- van den Heuvel A. P., Schulze A., Burgering B. M. Direct control of caveolin-1 expression by FOXO transcription factors // *Biochem. J.* 2005. Vol. 385. P. 795—802.
- van Gorp A. G. M., Pomeranz K. M., Birkenkamp K. U., Hui R. C.-Y., Lam E. W.-F., Coffey P. J. Chronic protein kinase B (PKB/c-Akt) activation leads to apoptosis induced by oxidative stress-mediated FOXO3A transcriptional up-regulation // *Cancer Res.* 2006. Vol. 66. P. 10 760—10 769.
- van Voorhies W. A. Production of sperm reduces nematode lifespan // *Nature.* 1992. Vol. 360. P. 456—458.
- Varani J., Dame M. K., Taylor C. G., Sarma V., Merino R., Kunkel R. G., Nunez G., Dixit V. M. Age-dependent injury in human umbilical vein endothelial cells: relationship to apoptosis and correlation with a lack of A20 expression // *Lab. Invest.* 1995. Vol. 73, N 6. P. 851—858.
- Vaupel J. W., Baudisch A., Dolling M., Roach D. A., Gampe J. The case for negative senescence // *Theor. Population Biol.* 2004. Vol. 65. P. 339—351.
- Vaziri H., Benchimol S. Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span // *Curr. Biol.* 1998. Vol. 8, N 5. P. 279—282.
- Vellai T., Takacs-Vellai K., Zhang Y., Kovacs A. L., Orosz L., Miller F. Influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans* // *Nature.* 2003. Vol. 426. P. 620.
- Vermeulen C. J., Bijlsma R. Characterization of conditionally expressed mutants affecting age-specific survival in inbred lines of *Drosophila melanogaster*: lethal conditions and temperature-sensitive periods // *Genetics.* 2004. Vol. 167. P. 1241—1248.
- Vijg J. Aging of the genome. The dual role of DNA in life and death. Oxford: Oxford Univ. Press, 2007. 384 p.
- Vijg J., Suh Y. Genetics of longevity and aging // *Annu. Rev. Med.* 2005. Vol. 56. P. 193—212.
- Vina J., Borrás C, Gambini J., Sastre J., Pallardo F. V. Why females live longer than males? Importance of the upregulation of longevity-associated genes by oestrogenic compounds // *FEBS Lett.* 2005. Vol. 579. P. 2541—2545.
- Viniegua J. G., Martínez N., Modirassari P., Losa J. H., Parada Cobos C, Lobo V. J., Luquero C. I., Alvarez-Vallina L., Ramon-y-Cajal S.,

- Rojas J. M., Sanchez-Prieto R. Full activation of PKB/Akt in response to insulin or ionizing radiation is mediated through ATM // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280, N 6. P. 4029—4036.
- Viswanathan M., Kim S. K., Berdichevsky A., Guarente L. A role for SIR-2.1 regulation of ER stress response genes in determining *C. elegans* life span // *Develop. Cell.* 2005. Vol. 9. P. 605—615.
- Voytas D. F. Retroelements in genome organization // *Science.* 1996. Vol. 274. P. 737—738.
- Wakayama T., Shinkai Y., Tamashiro K. L. K., Niida H., Blanchard D. C., Blanchard R. J., Ogura A., Tanemura K., Tachibana M., Perry A. C. F., Colgan D. F., Mombaerts P., Yanagimachi R. Ageing: cloning of mice to six generations // *Nature.* 2000. Vol. 407. P. 318—319.
- Walker D. W., Hajek P., Muffat J., Knoepfle D., Cornelison S., Attardi G., Benzer S. Hypersensitivity to oxygen and shortened lifespan in a *Drosophila* mitochondrial complex II mutant // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2006a. Vol. 103, N 44. P. 16 382—16 387.
- Walker D. W., Muffat J., Rundel C., Benzer S. Overexpression of a *Drosophila* homolog of apolipoprotein D leads to increased stress resistance and extended lifespan // *Curr. Biol.* 2006b. Vol. 16. P. 674—679.
- Walker G., Houthoofd K., Vanfleteren J. R., Gems D. Dietary restriction in *C. elegans*: From rate-of-living effects to nutrient sensing pathways // *Mech. Ageing Develop.* 2005. Vol. 126. P. 929—937.
- Walter M. F., Biessmann M. R., Benitez C., Török T., Mason J. M., Biessmann H. Effects of telomere length in *Drosophila melanogaster* on life span, fecundity, and fertility // *Chromosoma.* 2006. Vol. 116, N 1. P. 41—51.
- Wang E. Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved. // *Cancer Res.* 1995. Vol. 55, N 11. P. 2284—2292.
- Wang E. Regulation of apoptosis resistance and ontogeny of age-dependent diseases // *Exp. Gerontol.* 1997. Vol. 32. P. 471—484.
- Wang E., Lee M. J., Pandey S. Control of fibroblast senescence and activation of programmed cell death // *J. Cell. Biochem.* 1994. Vol. 54, N 4. P. 432—439.
- Wang M. C., Bohmann D., Jasper H. JNK signaling confers tolerance to oxidative stress and extends lifespan in *Drosophila II* // *Develop. Cell.* 2003. Vol. 5, N 5. P. 811—816.
- Wang M. C., Bohmann D., Jasper H. JNK extends life span and limits growth by antagonizing cellular and organism-wide responses to insulin signaling // *Cell.* 2005. Vol. 121. P. 115—125.
- Wang Y., Tissenbaum H. A. Overlapping and distinct functions for a *Caenorhabditis elegans* SIR2 and DAF-16/FOXO // *Mech. Ageing Develop.* 2006. Vol. 127. P. 48—56.
- Wang Y., Pot D., Kachman S. D., Nuzhdin S. V., Harshman L. G. A quantitative trait locus analysis of natural genetic variation for *Drosophila melanogaster* oxidative stress survival // *J. Heredity.* 2006. Vol. 97, N 4. P. 355—366.
- Warner H. R. Aging and regulation of apoptosis // *Curr. Top. Cell. Regul.* 1997. Vol. 35. P. 107—121.

- Warner H. R., Hodes R. J., Pocinki K. What does cell death have to do with aging? // *J. Amer. Geriatr. Soc.* 1997. Vol. 45, N 9. P. 1140—1146.
- Wattiaux J. M. Cumulative parental age effects in *Drosophila subobscura* // *Evolution*. 1968. Vol. 22. P. 406—421.
- Weinert B. T., Timiras P. S. Physiology of aging. Invited review: theories of aging // *J. Appl. Physiol.* 2003. Vol. 95. P. 1706—1716.
- Weinstein B. S., Ciszek D. The reserve-capacity hypothesis: evolutionary origins and modern implications of the trade-off between tumor-suppression and tissue-repair // *Exp. Gerontol.* 2002. Vol. 37. P. 615—627.
- Weismann A. *Essays upon heredity and kindred biological problems*. Oxford: Clarendon Press, 1889. Vol. 1. 455 p.
- Wessells R. J., Fitzgerald E., Cypser J. R., Tatar M., Bodmer R. Insulin regulation of heart function in aging fruit flies // *Nature Genet.* 2004. Vol. 36, N 12. P. 1275—1281.
- Wigby S., Chapman T. Sex peptide causes mating costs in female *Drosophila melanogaster* // *Curr. Biol.* 2005. Vol. 15. P. 316—321.
- Wilkinson G. S., South J. M. Life history, ecology and longevity in bats // *Aging Cell.* 2002. Vol. 1. P. 124—131.
- Williams G. C. Pleiotropy, natural selection and the evolution of senescence // *Evolution*. 1957. Vol. 11. P. 398—411.
- Wilson R. H., Morgan T. J., Mackay T. F. C. High-resolution mapping of quantitative trait loci affecting increased life span in *Drosophila melanogaster* // *Genetics*. 2006. Vol. 173. P. 1455—1463.
- Wodinsky J. Hormonal inhibition of feeding and death in octopus: control by optic gland secretion // *Science*. 1977. Vol. 198. P. 948—951.
- Wojda A., Witt M. Manifestations of ageing at the cytogenetic level // *J. Appl. Genet.* 2003. Vol. 44, N 3. P. 383—399.
- Wolff S., Ma H., Burch D., Maciel G. A., Hunter T., Dillin A. SMK-1, an essential regulator of DAF-16-mediated longevity // *Cell*. 2006. Vol. 124. P. 1039—1053.
- Wood J. G., Rogina B., Lavu S., Howitz K., Helfand S. L., Tatar M., Sinclair D. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans // *Nature*. 2004. Vol. 430. P. 686—689.
- Woodruff R. C. Transposable DNA elements and life history traits. I. Transposition of P DNA elements in somatic cells reduces the lifespan of *Drosophila melanogaster* // *Genetica*. 1992. Vol. 86, N 1—3. P. 143—154.
- Woodruff R. C., Nikitin A. G. P DNA element movement in somatic cell reduces lifespan in *Drosophila melanogaster*: evidence in support of the somatic mutation theory of aging // *Mutat. Res.* 1995. Vol. 338, N 1. P. 35—42.
- Woodruff R. C., Phillips J. P., Hilliker A. J. Increased spontaneous DNA damage in Cu,Zn superoxide dismutase (*SOD1*) deficient *Drosophila* // *Genome*. 2004. Vol. 47. P. 1029—1035.
- Woodruff R. C., Thompson J. N. jr. The role of somatic and germline mutations in aging and a mutation interaction model of aging // *J. Anti-aging Med.* 2003. Vol. 6, N 1. P. 29—39.
- Woodruff R. C., Thompson J. N. jr., Barker J. S. F., Huai H. Transposable DNA elements and life history traits. II. Transposition of P DNA elements in somatic cells reduces fitness, mating activity and locomotion

- of *Drosophila melanogaster* // *Genetica*. 1999. Vol. 107. P. 261—269.
- Wright W. E., Shay J. W. Telomere biology in aging and cancer // *J. Amer. Geriatr. Soc.* 2005a. Vol. 53, N 9. P. S292—S294.
- Wright W. E., Shay J. W. Telomere-binding factors and general DNA repair // *Nature Genet.* 2005b. Vol. 37. P. 116—118.
- Wu J., He J., Mountz J. D. Effect of age and apoptosis on the mouse homologue of the huWRN gene // *Mech. Ageing Develop.* 1998. Vol. 103, N 1. P. 27—44.
- Xu J., Yang X. Will cloned animals suffer premature aging — the story at the end of clones' chromosomes // *Reproductive Biol. Endocrinol.* 2003. Vol. 1. P. 105—110.
- Yaar M., Gilchrist B. A. Human melanocytes as a model system for studies of Alzheimer disease // *Arch. Dermatol.* 1997. Vol. 133, N 10. P. 1287—1291.
- Yamamoto M., Clark J. D., Pastor J. V., Gurnani P., Nandi A., Kurosu H., Miyoshi M., Ogawa Y., Castrillon D. H., Rosenblatt K. P., Kuro-o M. Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone Klotho // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280, N 45. P. 38 029—38 034.
- Yang J.-Y., Xia W., Хи M. C.-T. Ionizing radiation activates expression of FOXO3a, Fas ligand, and Bim, and induces cell apoptosis // *Intern. J. Oncol.* 2006. Vol. 2006, N 29. P. 643—648.
- Yoon I. K., Kim H. K., Kim Y. K., Song I.-H., Kim W., Kim S., Baek S.-H., Kim J. H., Kim J.-R. Exploration of replicative senescence-associated genes in human dermal fibroblasts by cDNA microarray technology // *Exp. Gerontol.* 2004. Vol. 39. P. 1369—1378.
- You H., Мак Т. W. Crosstalk between p53 and FOXO transcription factors // *Cell Cycle.* 2005. Vol. 4, N 1. P. 37—38.
- Yui R., Ohno Y., Matsuura E. Accumulation of deleted mitochondrial DNA in aging *Drosophila melanogaster* // *Genes Genet. Syst.* 2003. Vol. 78, N 3. P. 245—251.
- Zahn J. M., Sonu R., Vogel H., Crane E., Mazan-Mamczarz K., Rabkin R., Davis R. W., Becker K. G., Owen A. B., Kim S. K. Transcriptional profiling of aging in human muscle reveals a common aging signature // *PLoS Genet.* 2006. Vol. 2, N 7. P. 1058—1069.
- Zauli G., Vitale M., Falcieri E., Gibellini D., Bassini A., Celeghini C., Columbaro M., Capitani S. *In vitro* senescence and apoptotic cell death of human megakaryocytes // *Blood.* 1997. Vol. 90, N 6. P. 2234—2243.
- Zhang H., Cohen S. N. *Smurf2* up-regulation activates telomere-dependent senescence // *Genes and Develop.* 2004. Vol. 18. P. 3028—3040.
- Zhang H., Pan K.-H., Cohen S. N. Senescence-specific gene expression fingerprints reveal cell-type-dependent physical clustering of up-regulated chromosomal loci // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2003. Vol. 100, N6. P. 3251—3256.
- Zhang J.-H., Zhang Y., Herman B. Caspases, apoptosis and aging // *Ageing Res. Revs.* 2003. Vol. 2. P. 357—366.
- Zhang Q., Wang S.-Y., Fleuriel C., Leprince D., Rocheleau J. V., Piston D. W., Goodman R. H. Metabolic regulation of SIRT1 transcription via

a HIC1:CtBP corepressor complex // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2007. Vol. 104, N 3. P. 829—833.

Zhang Y., Herman B. Ageing and apoptosis // Mech. Ageing Develop. 2002. Vol. 123. P. 245—260.

Zheng J., Edelman S. W., Tharmarajah G., Walker D. W., Pletcher S. D., Seroude L. Differential patterns of apoptosis in response to aging in *Drosophila II* Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2005a. Vol. 102, N 34. P. 12 085—12 088.

Zheng J., Mutcherson R. II, Helfand S. L. Calorie restriction delays lipid oxidative damage in *Drosophila melanogaster II* Aging Cell. 2005b. Vol. 4. P. 209—216.

Zou S., Meadows S., Sharp L., Jan L. Y., Jan Y. N. Genome-wide study of aging and oxidative stress response in *Drosophila melanogaster II* Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2000. Vol. 97, N 25. P. 13 726—13 731.

Zou Y., Sfeir A., Gryaznov S. M., Shay J. W., Wright W. E. Does a sentinel or a subset of short telomeres determine replicative senescence? // Mol. Biol. Cell. 2004. Vol. 15. P. 3709—3718.

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | Стр. |
|---|------|
| Введение | |
| Глава 1. Введение в генетику старения | |
| 1.1. Эволюционная генетика старения | |
| 1.1.1. Эволюционные взгляды на природу старения | |
| 1.1.2. Межвидовые различия продолжительности жизни | |
| 1.1.3. Внутривидовые различия продолжительности жизни | |
| 1.2. Генетика продолжительности жизни | |
| 1.3. Объекты генетики продолжительности жизни и старения | |
| 1.3.1. Дрожжи | |
| 1.3.2. Нематоды | |
| 1.3.3. Дрозофила | |
| 1.3.4. Мыши | |
| 1.3.5. Человек | |
| Глава 2. Механизмы старения | |
| 2.1. Клеточное старение | |
| 2.1.1. Репликативное и стресс-индуцированное старение клеток | |
| 2.1.2. Теломеры и теломераза | |
| 2.1.3. Гены репликативного и стресс-индуцированного клеточного старения | |
| 2.1.4. Взаимосвязь старения клетки и организма . . . | |
| 2.2. Генетическая нестабильность | |
| 2.2.1. Постоянство генома и старение | |
| 2.2.2. Синдромы преждевременного старения . . . | |
| 2.2.3. p53 — главный хранитель генома | |
| 2.3. Апоптоз | |
| 2.3.1. Молекулярно-генетические механизмы апоптоза | |
| 2.3.2. Роль апоптоза в старении | |

| | |
|---|-------|
| Глава 3. Эндогенная регуляция продолжительности жизни | |
| 3.1. Инсулин/IGF-сигналинг | |
| 3.2. Транскрипционные факторы DAF-16/FOXO | |
| 3.3. Сиртуины | |
| 3.4. JNK-сигналинг | |
| 3.5. Липофильные гормоны | |
| 3.6. Системы детоксификации, протеолиза и автофагии | |
| Глава 4. Старение и стресс | |
| 4.1. Окислительный стресс | |
| 4.1.1. Теория интенсивности жизнедеятельности | .. |
| 4.1.2. Свободные радикалы и старение | |
| 4.1.3. Несоответствия свободнорадикальной теории | |
| 4.1.4. Митохондриальная теория старения | |
| 4.2. Воспаление и инфекции | |
| 4.3. Ограничение диеты | |
| 4.4. Температурный стресс | |
| 4.4.1. Тепловой стресс | |
| 4.4.2. Белки теплового шока | |
| 4.5. Нарушение светового режима | |
| 4.6. Воздействие ионизирующей радиации | |
| Глава 5. Репродуктивная система и старение | |
| 5.1. Антагонизм репродукции и долгожительства | ... |
| 5.2. Продолжительность жизни и взаимодействие полов | |
| 5.3. Половой диморфизм продолжительности жизни | ... |
| Заключение | |
| Литература | |
| Список принятых сокращений | |
| Словарь терминов | |

CONTENTS

| | Page |
|--|------|
| Introduction | |
| Chapter 1. Introduction to genetics of aging | |
| 1.1. Evolution genetics of aging | |
| 1.1.1. Evolution points of view on aging nature | |
| 1.1.2. Interspecies differences of life span | |
| 1.1.3. Intraspecific differences of life span | |
| 1.2. Genetics of life span | |
| 1.3. Objects of life span and aging genetics | |
| 1.3.1. Yeasts | |
| 1.3.2. Round worm | |
| 1.3.3. Drosophila | |
| 1.3.4. Mice | |
| 1.3.5. Human | |
| Chapter 2. Mechanisms of aging | |
| 2.1. Cellular senescence | |
| 2.1.1. Replicative and stress-induced cell senescence . | |
| 2.1.2. Telomeres and telomerase | |
| 2.1.3. Genes of replicative and stress-induced cell senescence | |
| 2.1.4. Interplay between cell and organism aging . . . | |
| 2.2. Genomic instability | |
| 2.2.1. Genome stability and aging | |
| 2.2.2. Syndroms of premature aging | |
| 2.2.3. p53 — guardian of the genome | |
| 2.3. Apoptosis | |
| 2.3.1. Molecular-genetics mechanisms of apoptosis . . | |
| 2.3.2. The apoptosis role in aging | |
| Chapter 3. Endogenous regulation of life span | |
| 3.1. Insulin/IGF signalling | |
| 3.2. Transcription factors DAF-16/FOXO | |

| | |
|---|--|
| 3.3. Sirtuins | |
| 3.4. JNK signalling | |
| 3.5. Lipophilic hormones | |
| 3.6. System of detoxification, proteolysis and autophagy .. | |
| Chapter 4. Aging and stress | |
| 4.1. Oxidative stress | |
| 4.1.1. Rate of living theory | |
| 4.1.2. Free radicals and aging | |
| 4.1.3. Discrepancy of free radical theory | |
| 4.1.4. Mitochondrion theory of aging | |
| 4.2. Inflammation and infection | |
| 4.3. Diet limitation | |
| 4.4. Temperature stress | |
| 4.4.1. Heat stress and aging | |
| 4.4.2. Heat shock proteins | |
| 4.5. Light irregularities | |
| 4.6. Ionizing radiation influence | |
| Chapter 5. Reproductive system and aging | |
| 5.1. Antagonism between reproduction and longevity . . . | |
| 5.2. Life span and interconnection between sexes | |
| 5.3. Sex dimorphism of life span | |
| Conclusions | |
| References | |
| List of abbreviations | |
| Glossary | |

Научное издание

М о с к а л е в Алексей Александрович

СТАРЕНИЕ И ГЕНЫ

*Утверждено к печати Институтом биологии Коми научного центра
Уральского отделения Российской академии наук*

Редактор издательства *Л. С. Евстигнеева*

Художник *Е. В. Кудина*

Технический редактор *О. В. Новикова*

Корректор

Компьютерная верстка *О. В. Никитиной*

Лицензия ИД N 02980 от 06 октября 2000 г.

Сдано в набор 00.00.00. Подписано к печати 15.09.08.

Формат 60 X 90 1/16. Бумага офсетная. Гарнитура Таймс.

Печать офсетная. Усл. печ. л. 22.5. Уч.-изд. л. 23.3. Тираж экз.

Тип. зак. N 3456. С 191

Санкт-Петербургская издательская фирма «Наука» РАН

199034, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, 1

E-mail: main@nauka.nw.ru

Internet: www.naukaspb.spb.ru

Первая Академическая типография «Наука»

199034, Санкт-Петербург, 9 линия, 12



МОСКАЛЕВ Алексей Александрович – доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник Института биологии Коми НЦ УрО РАН, профессор Сыктывкарского государственного университета, заместитель председателя Сыктывкарского отделения Геронтологического общества РАН.

Родился в г. Сыктывкаре 05.11.1976 г., в 1999 г. окончил Сыктывкарский гос. университет, защитил кандидатскую (2001) и докторскую (2004) диссертации в Совете по радиобиологии при Московском государственном университете им. М. В. Ломоносова.

Научные интересы связаны с изучением влияния малых доз ионизирующей радиации, термального стресса, светового режима и пола на продолжительность жизни *Drosophila melanogaster*, а также с изучением радиационно-индуцированных возрастзависимых изменений на молекулярном и генетическом уровнях у мышевидных грызунов. Цель исследований – поиск ключевых механизмов старения и «антистарения», генов продолжительности жизни и радиоадаптации.

Автор и соавтор 115 научных работ в области радиационной биологии, радиационной генетики, биogerонтологии и экологии, в том числе двух монографий.

ISBN 978-5-02-026314-7



9785020263147

Санкт-Петербург «НАУКА»