

УДК 57.011

Теории старения. Неустаревающая тема

П. В. Сергиев^{1,2*}, О. А. Донцова^{1,2}, Г. В. Березкин³

¹Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40

²Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991, Ленинские горы, 1, стр. 3

³ЕСН группа, 123100, Москва, Рочдельская ул., 11/5, стр. 2

*E-mail: petya@genebee.msu.ru

Поступила в редакцию 29.08.2014

РЕФЕРАТ Интерес к теме старения не ослабевает на протяжении многих веков. Хотя современная медицина добилась значительного увеличения средней продолжительности жизни человека, старение остается во многом загадочным и, к сожалению, неизбежным процессом. Мы постарались кратко рассмотреть существующие теории и подходы к изучению старения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА активные формы кислорода, конечные продукты гликирования, накопление не утилизируемых отходов, продолжительность жизни, старение, теломераза.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время существует несколько устоявшихся теорий, объясняющих старение живых организмов, среди которых можно выделить две большие группы. Это теории, считающие старение специальной программой, и теории, полагающие, что старение связано с накоплением в организме тех или иных повреждений. Теории второй группы различаются тем, что предполагают существование различных источников и мишеней этих повреждений. Не обязательно, что одни теории исключают другие. Скорее всего, процесс старения у разных видов может протекать по-разному, а программируемое старение может включать ускоренное повреждение организма или отключение какой-либо системы борьбы с повреждениями. Какого рода повреждения могут вызывать процессы, связанные со старением?

МИТОХОНДРИИ И АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА

Основная функция митохондрий – дыхание, служащее главным источником энергии в клетке. В митохондриях органические вещества окисляются до воды и углекислого газа и синтезируется универсальный переносчик энергии, аденозинтрифосфат (АТФ). Митохондрии окружены двойной мембраной. Внешняя мембрана относительно проницаема для небольших молекул за счет специальных транспортных белков – поринов. Внутренняя мембрана образует складки – кристы, которые увеличивают поверхность мембраны. В процессе дыхания по раз-

ные стороны внутренней мембраны митохондрии формируется градиент концентрации ионов водорода (протонов) и трансмембранный потенциал. За формирование градиента концентрации протонов и трансмембранного потенциала отвечают белковые комплексы дыхательной цепи (I–IV), переносящие электроны от восстановительных эквивалентов – молекул NADH и FADH₂, на кислород. Одновременно с этим энергия окисления NADH и FADH₂ используется для перекачки ионов H⁺ из внутреннего пространства митохондрии (матрикса) в межмембранное пространство (рис. 1). Таким образом, межмембранное пространство митохондрии оказывается заряженным положительно, а матрикс – отрицательно. Запасенная энергия используется для синтеза АТФ другим трансмембранным белковым комплексом – АТФ-синтазой (рис. 2).

Одна из основных химических проблем дыхания – высвобождение слишком большой энергии в процессе окисления органических веществ (преобразованных в восстановительные эквиваленты NADH и FADH₂) кислородом. Задача дыхательной цепи состоит в том, чтобы разбить эту реакцию на небольшие промежуточные реакции, энергию которых легче использовать (превратить в протонный потенциал). Более того, на некоторых участках дыхательной цепи электроны переносятся попарно (как два восстановительных эквивалента), а на некоторых – по одному. На последней стадии восстановления молекулы кислорода до двух молекул воды комплексу

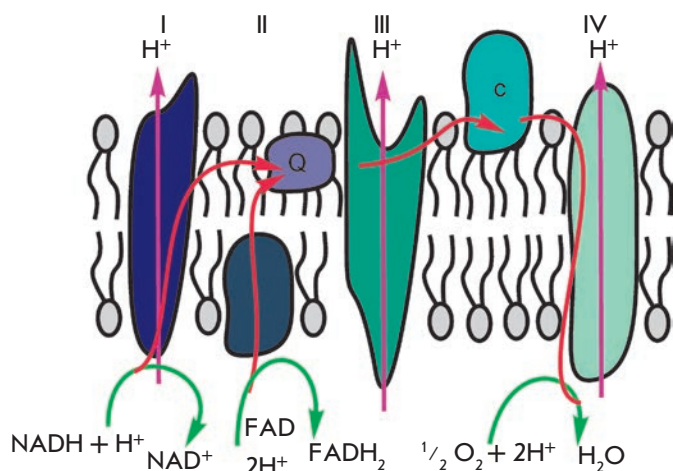


Рис. 1. Дыхательная цепь митохондрии. Показан процесс переноса электронов от NADH и FADH₂ на кислород

цитохром-с-оксидазы необходимо *последовательно* получить *четыре* электрона от восстановленной формы цитохрома с.

В процессе работы молекула кислорода восстанавливается, проходя последовательно через ряд таких промежуточных состояний, как супероксидный радикал (O₂⁻) и пероксид водорода. В большинстве случаев эти молекулы, называемые активными формами кислорода, остаются связанными с цитохром-с-оксидазой до полного превращения кислорода в воду. В отличие от упорядоченного восстановления кислорода цитохром-с-оксидазой, молекулы кислорода могут иногда неупорядоченным, случайным образом взаимодействовать с восстановленными компонентами дыхательной цепи в процессе переноса электронов и превращаться в высокореакционноспособные супероксидные радикалы. Источниками супероксидных радикалов служат в основном комплексы I и III дыхательной цепи. Кроме того, белок р66Shc может генерировать пероксид водорода, используя цитохром с [1, 2]. Короткоживущие активные формы кислорода способны повреждать практически любые биологические молекулы, в первую очередь компоненты митохондрий. Особенно опасны повреждения митохондриальной ДНК, приводящие к мутациям. Дело в том, что митохондрии имеют собственный небольшой геном, доставшийся им в наследство от прародительской бактерии, когда-то поглощенной клеткой предка эукариот. Этот геном кодирует в основном РНК-компоненты аппарата биосинтеза белка митохондрии и несколько компонентов дыхательной цепи. Геном митохондрий человека содержит гены двух рибосомных и 22 транспортных РНК, семи белков,

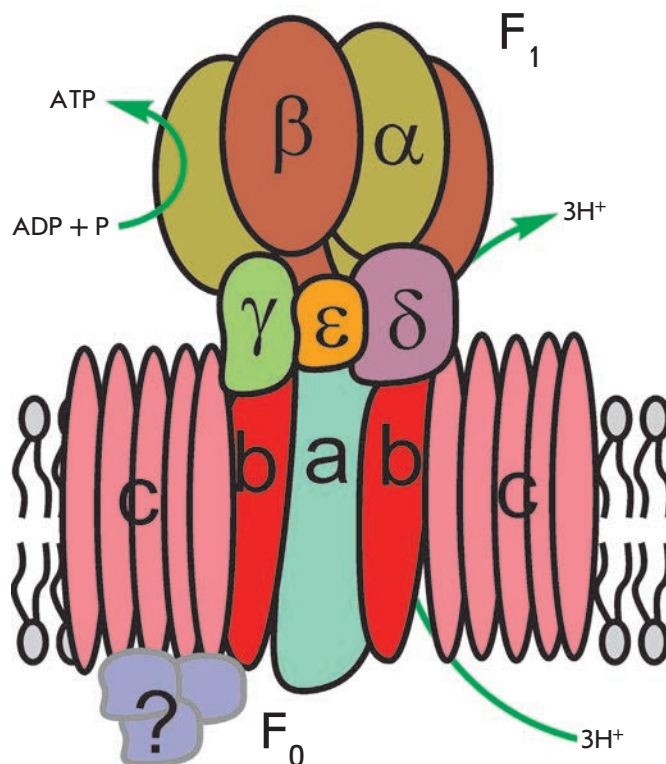


Рис. 2. Схема строения и функционирования АТФ-синтазы

входящих в состав дыхательного комплекса I (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6), одного белка дыхательного комплекса III (CYB), трех белков дыхательного комплекса IV (CO1, CO2, CO3) и двух белков, входящих в состав АТФ-синтазы (АТФ6, АТФ8). Большинство других белков, находящихся в митохондриях, кодируются основным ядерным геномом клетки.

Мутации в нескольких компонентах митохондрии могут изменить продолжительность жизни. Самый яркий пример, это инактивация гена COX5, кодирующего пятую субъединицу цитохром-с-оксидазы гриба *Podospora anserina* [3], приведшая к десятикратному увеличению продолжительности жизни. При этом гриб утрачивает способность к нормальному дыханию и переходит на альтернативную схему дыхания, возможную только у представителей ограниченного числа таксономических групп.

Клетки имеют свою систему борьбы с активными формами кислорода. Супероксидный радикал с помощью фермента супероксиддисмутазы (SOD) превращается в гораздо менее вредный пероксид водорода. В клетках человека есть митохондриальная марганецсодержащая супероксиддисмутаза (MnSOD)

и несколько цитоплазматических Cu,Zn-содержащих SOD. Пероксид водорода, который образуется из супероксидного радикала или в ходе других процессов, разлагается с помощью каталазы (CAT), пероксиредоксина (Prx) и глутатионпероксидазы (GPx). Пероксид водорода может самопроизвольно реагировать с ионом железа (II) в ходе так называемой реакции Фентона, в которой образуются высокорекреационноспособные гидроксильные радикалы (ОН), что представляет опасность для клетки.

Роль активных форм кислорода как основного источника повреждений не только самих митохондрий, но и других компонентов клеток при старении была выдвинута Д. Харманом в 1956 г. [4] и до сих пор остается одной из самых популярных. Снижение количества активных форм кислорода с помощью специально сконструированных возобновляемых антиоксидантов легло в основу предложенного В.П. Скулачевым метода борьбы с возрастными заболеваниями [5]. Надо сказать, что в настоящее время идея участия активных форм кислорода в повреждениях, связанных со старением, подверглась, как минимум, ряду модификаций. Изначально считалось, что повреждения митохондрий постепенно приводят к увеличению продукции активных форм кислорода такими дефектными митохондриями и, следовательно, к ускорению процесса старения [6]. Однако оказалось, что большинство дефектов, обнаруживаемых в митохондриях, не повышают продукцию активных форм кислорода, а полностью инактивируют митохондрии, поэтому и возникла теория о токсичности клеток, лишенных функциональных митохондрий, для всего организма [7].

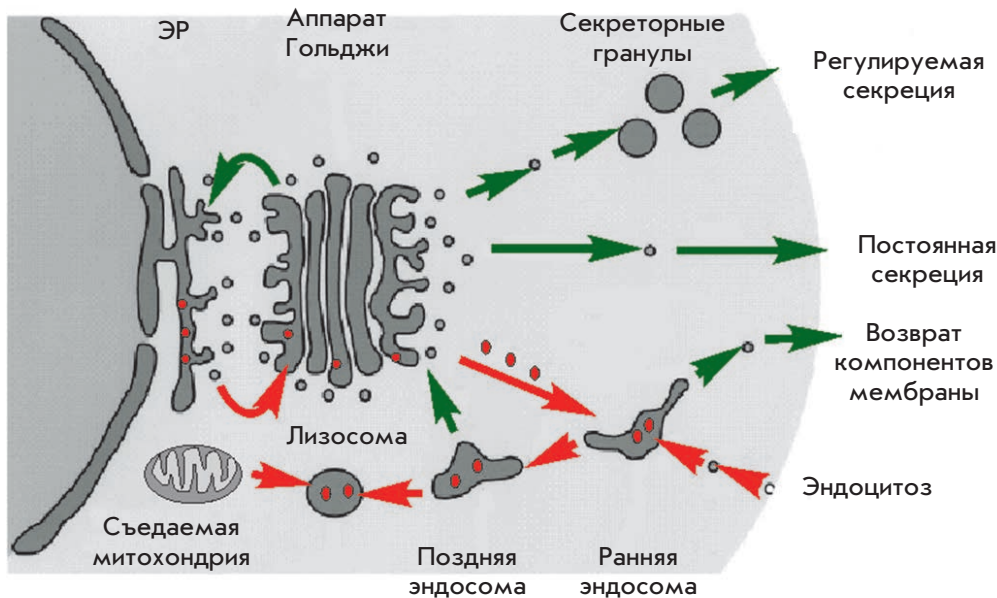
Не все исследователи соглашались с тем, что активные формы кислорода служат основным источником повреждений организма, связанных со старением, а также с отрицательной ролью активных форм кислорода. У многих животных количество активных форм кислорода обратно коррелирует с продолжительностью жизни [8], однако экспериментально показано, что у грызуна *Heterocephalus glaber* (голый землекоп), который отличается исключительно высокой продолжительностью жизни, уровни активных форм кислорода и окислительных повреждений гораздо выше, чем у мыши (*Mus musculus*), живущей намного меньше [9]. Известно, что активные формы кислорода играют важнейшую роль в работе иммунной системы, межклеточном общении и стрессовом ответе (см., например, обзор [10]). Отдельного внимания заслуживает связь системы инактивации активных форм кислорода со старением. Хотя кажется очевидным, что чем лучше работает система защиты от активных форм кислорода, тем выше должна быть продолжительность жизни, на самом деле это

не так. Наоборот, найдена отрицательная корреляция между содержанием ферментов, инактивирующих активные формы кислорода, и продолжительностью жизни у млекопитающих [8]. В то же время искусственное повышение количества ферментов, инактивирующих активные формы кислорода в клетках, привело к увеличению продолжительности жизни. Положительный эффект оказывало введение с помощью генетических манипуляций дополнительного количества каталазы в митохондрии, но не в ядро клеток мышей [11]. Увеличивала продолжительность жизни мухи сверхэкспрессия CuZnSOD [12]. С другой стороны, делеция ряда генов, инактивирующих активные формы кислорода, не влияла на продолжительность жизни нематоды *Caenorhabditis elegans*, а делеция гена *sod-2* даже увеличивала ее [13].

Таким образом, по-видимому, активные формы кислорода могут участвовать в повреждении клеток, в первую очередь митохондрий, при старении, но при этом играть положительную роль в других процессах.

НАКОПЛЕНИЕ НЕУТИЛИЗИРУЕМЫХ ПОБОЧНЫХ ПРОДУКТОВ МЕТАБОЛИЗМА

Следующая теория, объясняющая старение, – накопление различного рода химических веществ, которые не могут быть переработаны организмом. В общем виде эта теория очень хорошо сформулирована в ряде работ В. Гладышева [14, 15], а ее отдельные стороны разбираются в других работах [16]. Предполагается, что вследствие фундаментальной неидеальности химических и, в частности, ферментативных превращений в процессе метаболизма в клетках протекают побочные реакции. Чем более сложен и интенсивен метаболизм, тем больше типов побочных продуктов этих реакций появляется в клетках. Некоторые из этих продуктов легко покидают клетки, а некоторые утилизируются специальными ферментами. Для утилизации каждого побочного продукта должен существовать свой фермент, а возможно, и несколько, что, в свою очередь, еще больше усложняет метаболизм и приводит к еще большему разнообразию побочных продуктов. Различные организмы имеют разные наборы ферментов, разлагающих побочные продукты метаболизма. Как правило, их не слишком много, и они работают только с самыми часто возникающими и самыми токсичными из них. Остальные побочные продукты просто накапливаются в клетках. Единственный и универсальный способ борьбы с такими веществами – их разбавление в процессе клеточного деления. Этот метод успешно работает, но только для клеток, которые делятся. Проблема многоклеточных организмов, таких, как человек, со-



- Ферменты лизосом, «отмеченные» маннозо-6-фосфатом.

Рис. 3. Транспорт в лизосомы. Показана система везикулярного транспорта клетки. Красными стрелками показаны пути, ведущие в лизосому с поверхности клетки («пища», поступающая извне), из цитоплазмы клетки (например, нефункциональная митохондрия, которую необходимо переработать) и из эндоплазматического ретикулума (ферменты лизосомы)

стоит в том, что множество групп клеток прекращает делиться или делиться очень медленно, но не перестает участвовать в метаболизме. В таких клетках, в число которых входят жизненно важные клетки сердца и головного мозга, накапливаются побочные продукты метаболизма, постепенно начинающие мешать их нормальному функционированию. Основным внутриклеточным побочным продуктом такого рода, возможно, является так называемый липофусцин – сложная смесь веществ, накапливающихся в лизосомах. Лизосомы – это внутриклеточные органеллы, в которых происходит расщепление как питательных веществ, поступающих извне, так и внутриклеточных структур, которые необходимо переработать. Кроме того, в лизосомы поступают пищеварительные ферменты, принадлежащие к классу гидролаз. Эти ферменты транспортируются в лизосому с помощью системы везикулярного транспорта через эндоплазматический ретикулум и аппарат Гольджи. Для того чтобы попасть в лизосомы, лизосомальные гидролазы маркируются специальными ярлыками – остатками маннозо-6-фосфата (рис. 3). Лизосомальные ферменты активируются и работают только при понижении pH (закислении) среды внутри лизосомы. Накопление липофусцина в лизосомах приводит к разбавлению ферментов и препятствует закислению лизосом, что постепенно снижает эффективность работы кислых гидролаз. У разных организмов

имеются различные наборы лизосомальных ферментов, а также ферментов, утилизирующих побочные продукты метаболизма в других частях клетки.

Неутилизируемые побочные продукты метаболизма накапливаются не только внутри, но и вне клетки. Среди внеклеточных продуктов, характерных для человека, можно упомянуть накапливающиеся в кровеносных сосудах бляшки, содержащие холестерин и продукты его окисления, а также полимеризованные фрагменты белков, таких, как β -амилоид в нервной ткани. В состав атеросклеротических бляшек входят липиды, осевшие на стенках кровеносных сосудов. В первую очередь, это окисленные и гликозилированные формы холестерина, но имеются и другие липиды. Основным переносчиком липидов в кровотоке являются липопротеины низкой плотности (LDL), из которых липиды и попадают на стенки сосудов (рис. 4А).

С атеросклеротическими бляшками взаимодействуют клетки иммунной системы – моноциты, превращающиеся в макрофаги. Эти клетки поглощают содержимое бляшек и до определенного момента играют положительную роль. Однако в некоторых случаях сами макрофаги начинают накапливаться в материале бляшек, образуя наполненные липидами пенистые клетки (рис. 4Б). Сравнение полиморфизмов ДНК у столетних французов и в контрольной группе с помощью так называемого полногеномно-

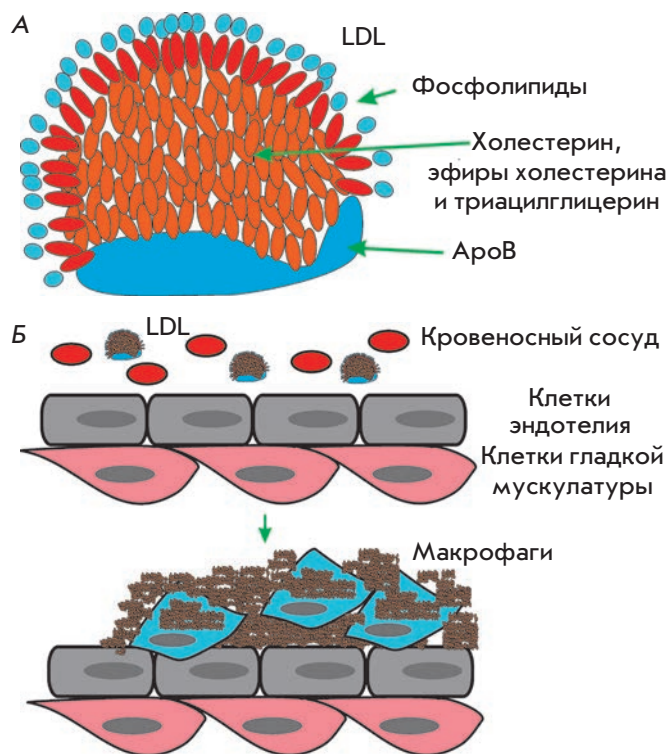


Рис. 4. Схема строения липопротеида низкой плотности (LDL), основного переносчика липидов в кровотоке (А), и формирование атеросклеротической бляшки (Б)

го анализа ассоциаций (GWAS) показало, что один из вариантов ApoE (аллель E2), компонент липопротеинов очень низкой плотности, преобладает в популяции долгожителей, в то время как вариант E4, связанный с повышенным риском атеросклероза, у них практически не встречается [17]. При этом ассоциации полиморфных вариантов основного белкового компонента липопротеинов низкой плотности, ApoB, с долгожительством не обнаружено.

Второй тип токсичных продуктов, накапливающихся преимущественно в нервной ткани, это амилоидные белки. Наиболее известен так называемый β -амилоид, вызывающий болезнь Альцгеймера (см., например, обзор [18]). Он образуется из важного и безобидного белка, называемого предшественником β -амилоида, в результате вырезания центральной части предшественника β - и γ -секретазами (рис. 5). Белок β -амилоида может иметь несколько вариантов пространственной структуры, один из которых, содержащий β -листы, токсичен. Эта токсичность связана с полимеризацией β -амилоида. Более того, полимерная форма β -амилоида способствует переходу структуры мономеров в состояние, необходимое для полимеризации. Полимеризованный β -амилоид

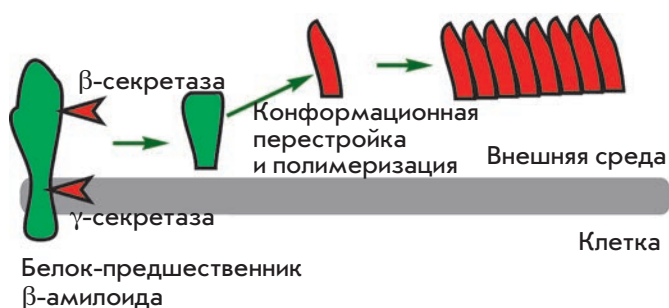


Рис. 5. Образование β -амилоида и его полимеризация

образует сенильные бляшки в головном мозге и вызывает болезнь Альцгеймера. Имеются сведения, что β -амилоид претерпевает самопроизвольные химические превращения, такие, как образование пироглутаминовой кислоты, способствующие образованию токсичной полимеризованной формы [19]. Кроме β -амилоида есть и другие белки и пептиды, способные самопроизвольно полимеризоваться с образованием токсичных нерастворимых структур. Возможно, для этого процесса важна также самопроизвольная химическая модификация белков, что позволяет относить образование подобных структур к побочным продуктам метаболизма.

Наконец, к побочным продуктам метаболизма в некоторой степени можно отнести белки, подвергшиеся процессу самопроизвольной модификации и сшиванию молекулами сахаров, в основном глюкозы. Процесс гликирования начинается с взаимодействия аминокислотных остатков лизина и альдегидных групп глюкозы (рис. 6), которое приводит к образованию оснований Шиффа. Затем, после перегруппировки двойной C=N-связи, получают так называемые продукты Амадори и, наконец, с помощью нескольких различных механизмов могут образоваться разнообразные конечные продукты гликирования, например глюкозепан.

Главным следствием самопроизвольного гликирования считается нарушение эластичности тканей, что особенно важно для кровеносных сосудов [20]. Кроме того, самопроизвольное гликирование нарушает функции белков. Этот процесс хорошо иллюстрирует концепцию накопления побочных продуктов метаболизма, приводящую к старению. Пока неизвестны ферменты, позволяющие расщеплять продукты гликирования. Избежать самопроизвольного гликирования скорее всего невозможно, поскольку все белки содержат остатки лизина, а глюкоза – один из основных метаболитов всех живых организмов. FAD-зависимые дегликирующие фер-

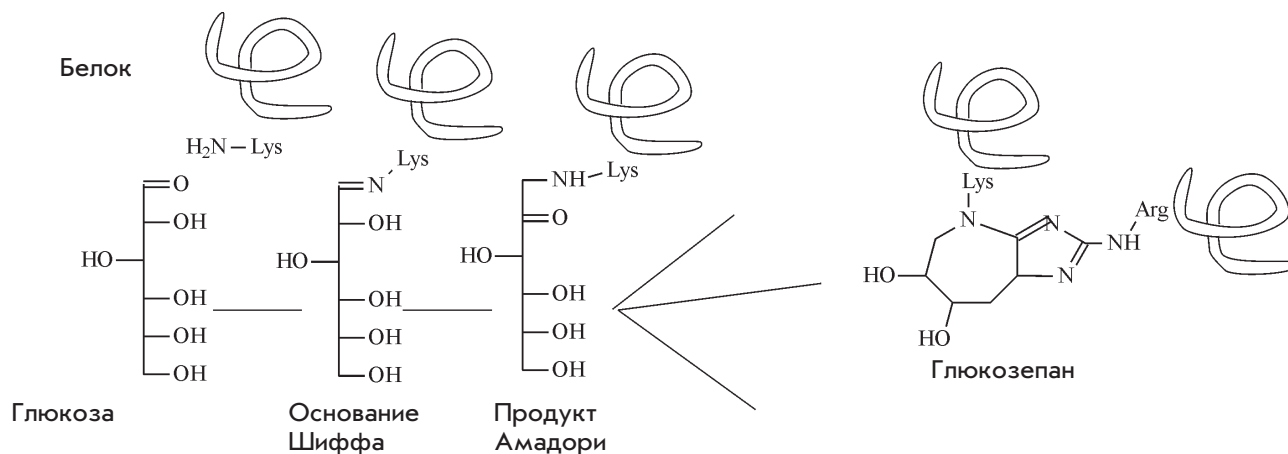


Рис. 6. Самопроизвольное гликирование белков

менты найдены у грибов (амадориаза) и бактерий (фруктозолизин-6-киназа *frlD* и фруктозолизин-6-фосфат-дегликаза *frlB*) [21], но они действуют только на низкомолекулярные вещества – конъюгаты аминокислот с сахарами, и непригодны для дегликирования белков. У позвоночных также найдены ферменты фруктозамин-3-киназа (FNЗК) и сходный с ней белок (FNЗК-РР), способные расщеплять продукты гликирования, но они нуждаются в АТФ и поэтому могут работать только внутри, но не снаружи клеток.

НАРУШЕНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПРОЦЕССОВ ПРИ СТАРЕНИИ

Старение связано не только с накоплением побочных продуктов метаболизма, но и с различного рода нарушениями регуляторных механизмов. Например, известно, что с возрастом часто нарушается баланс между про- и противовоспалительными системами, приводя к развитию хронического воспалительного процесса. Причинная связь между таким воспалением и развитием старческих заболеваний постулируется теорией воспалительного старения Франчески [22]. При этом повышенная склонность к воспалительным реакциям в раннем возрасте, обеспечивающая защиту организма от инфекций, играет отрицательную роль в преклонном возрасте.

Помимо нарушения баланса воспалительной и противовоспалительной реакции, при старении возможно повреждение еще нескольких важных регуляторных систем организма. Так, российский ученый В.М. Дильман выдвинул нейроэндокринную (элевационную) теорию старения [23]. Эта теория опирается на существование в организме саморегулирующихся гомеостатических систем – систем с отрицательной обратной связью, одна из важнейших среди которых – гипоталамо-гипофизарно-над-

почечниковая система. Повышение порога чувствительности гипоталамуса к регуляторным сигналам обратной связи лежит в основе сразу нескольких неблагоприятных возрастных изменений в организме человека, в частности, в выключении репродуктивной функции [24]. Разработка и экспериментальное подтверждение элевационной теории старения являются важнейшим достижением отечественной науки о старении.

ТЕЛОМЕРЫ – БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЧАСЫ КЛЕТКИ

ДНК эукариотических клеток находится в составе хромосом в линейной двухцепочечной форме. Число хромосом у разных видов может варьировать от одной до нескольких сотен. На концах таких линейных молекул есть специальные ДНК-белковые комплексы, называемые теломерами. Теломеры защищают хромосомы от повреждения и слияния. Они позволяют клетке отличать нежелательные случайные двухцепочечные разрывы ДНК, вызванные внешними причинами, например радиацией, от нормальных концов хромосом. Линейное строение хромосом порождает впервые сформулированную А.М. Оловниковым проблему репликации концов ДНК [25], которая заключается в том, что для начала репликации ДНК необходима РНК-затравка (праймер). После репликации праймер удаляется. Удаление праймера приводит к тому, что с каждым делением клетки хромосомы будут немного укорачиваться. Оловников предположил, что в клетке должен существовать особый фермент, удлиняющий теломеры. Через много лет такой фермент, названный теломеразой, был найден экспериментально [26].

Оказалось, что теломераза активна не во всех клетках организма. Клетки, которые могут делиться бесконечно, т.е. половые и стволовые, способны

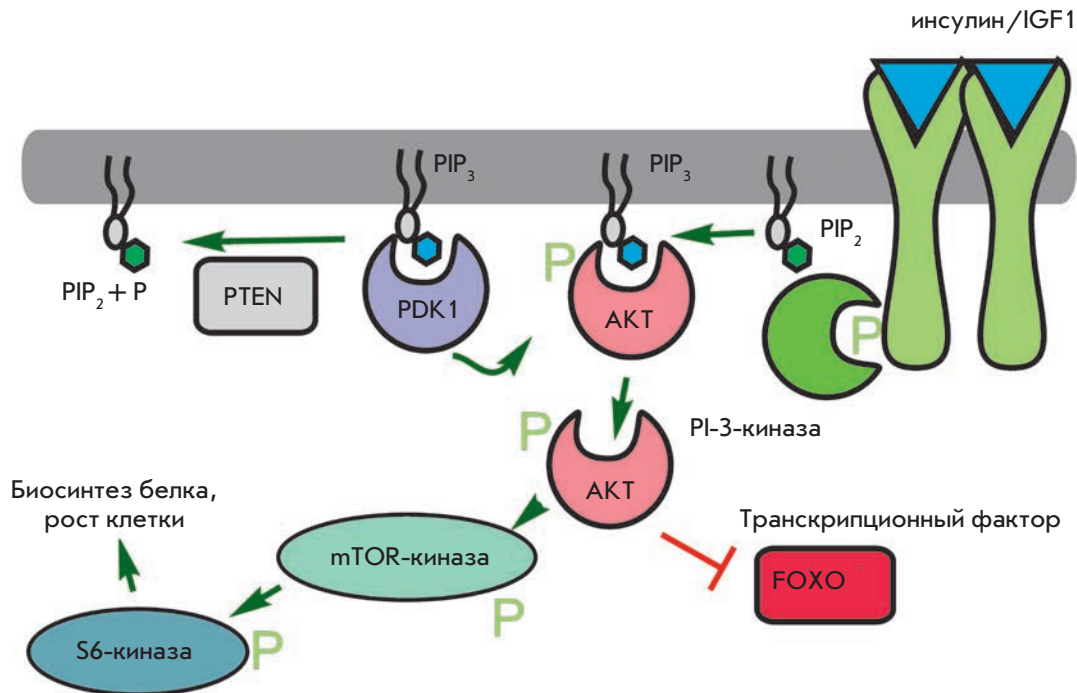


Рис. 7. Упрощенная схема сигнального пути инсулина/инсулиноподобного фактора роста

удлинять свои теломеры с помощью теломеразы. Большинство других клеток организма могут делиться только ограниченное число раз или не делятся вообще. В таких клетках нет активной теломеразы. При делении клеток, лишенных теломеразы, теломеры сокращаются [27]. Это сокращение объясняет ранее открытый феномен ограниченного числа делений соматических клеток в культуре [28]. Таким образом укорочение теломер может считаться своеобразными часами, отсчитывающими время деления клеток. Достаточно заманчивой представляется возможность переноса клеточных биологических часов на весь организм, если предположить, что активация теломеразы в соматических (не половых) клетках может обеспечить неограниченную продолжительность жизни. Тем не менее такой прямолинейный подход чреват большими проблемами. Дело в том, что отключение теломеразы в основной массе клеток многоклеточного организма рассматривается как своеобразный механизм защиты от возникновения раковых опухолей [29]. Даже если клетки приобретут набор мутаций, позволяющий им делиться независимо от путей, ограничивающих деление, в отсутствие теломеразной активности число клеточных делений все равно будет небольшим. Для образования большинства злокачественных опухолей требуются дополнительные мутации, активирующие теломеразу, или мутации, делающие деление нерегулируемым, которые должны возникнуть в небольшой доле клеток с активной теломеразой. Из-за действия этого

механизма раковые клетки возникают не так часто, как в присутствии активной теломеразы во всех клетках. Таким образом, существует своеобразный компромисс между полезным обновлением клеток и возникновением раковых опухолей. Слишком малая доля клеток, имеющих активную теломеразу, привела бы к недостаточному обновлению клеток, тогда как слишком большая увеличила частоту злокачественной трансформации.

БИОЛОГИЧЕСКОЕ ВРЕМЯ И ИНТЕНСИВНОСТЬ МЕТАБОЛИЗМА

Давно известно, что к увеличению продолжительности жизни модельных животных приводит ограничение калорийности питания. Этот эффект был открыт Маккеем в опытах на мышах в тридцатые годы прошлого столетия [30]. С тех пор обнаружили множество мутаций, связанных с интенсивностью метаболизма, которые увеличивают продолжительность жизни модельных организмов. Основные работы на эту тему выполнены на нематоде *C. elegans*, избранном объекте биологии развития. Этот небольшой организм имеет считанное, всегда одно и то же число клеток, причем известна судьба каждой клетки. Некоторые мутации вдвое увеличивают продолжительность жизни *C. elegans* [31], в норме равную 20 дням. Мутации в генах, повышающие продолжительность жизни нематоды, подробно рассмотрены [32]. Подавляющее большинство мутаций, значительно увеличивающих время жизни нематоды, влияет

на интенсивность метаболизма. У нематоды есть специальная программа развития, которая включается в крайне неблагоприятных условиях голодания.

Эта программа, называемая *dauer* (длительный, затяжной), включает замедление метаболизма и развития личинок, а также ограничение питания, не говоря уже о полной остановке полового созревания. В таком состоянии, более всего напоминающем спячку, нематода может пережить периоды недостатка пищи, при этом продолжительность ее жизни значительно увеличится. Поскольку состояние *dauer* в норме вызывается голоданием личинки нематоды, этот путь очень сходен с увеличением продолжительности жизни других модельных организмов при ограничении калорийности рациона. Существенная разница состоит в том, что у более высокоорганизованных организмов нет специальной программы развития организма, связанной с голодом.

Ген *daf-2*, мутация в котором приводит в двукратному увеличению продолжительности жизни нематоды, является гомологом гена рецептора инсулина [33]. Другие мутации, способствующие увеличению продолжительности жизни, также указывают на участие сигнальных путей инсулина и инсулиноподобного фактора роста (IGF1) (рис. 7). Эти сигнальные пути включаются при обилии питательных веществ, в первую очередь глюкозы, приводят к интенсификации метаболизма, способствуют росту и делению клеток. Мутации, увеличивающие продолжительность жизни, встречаются в генах белков, находящихся в разных частях этого сигнального каскада. Фосфоинозит-3-киназа (*age-1*) переносит сигнал от субстрата рецептора инсулина (IRS) на киназы PDK и Akt, которые, в свою очередь, передают его на систему биосинтеза белка и меняют транскрипционную программу клеток при посредничестве фактора транскрипции FOXO (*daf-16*). Еще один важный компонент программы контроля метаболической и ростовой активности – гистондеацетилаза Sir2. Деацетилирование гистонов приводит к «умолчанию» генов. Повышенная экспрессия Sir2 увеличивает продолжительность жизни, а у нематод с делецией этого гена ограничение калорийности рациона перестает влиять на продолжительность жизни [34].

Картированы также несколько генов, мутации в которых увеличивают продолжительность жизни мухи *Drosophila melanogaster* [32]. Анализ этих генов показывает, что в этом случае значительное увеличение продолжительности жизни также связано с мутациями в системе передачи сигнала от инсулина и инсулиноподобного фактора роста, а также с мутациями, затрагивающими интенсивность метаболизма и влияющими непосредственно на цикл Кребса. Практически такой же спектр регуляторных систем

клетки изменяется и при мутациях, увеличивающих продолжительность жизни мышей [32]. Среди генов, влияющих на продолжительность жизни, мы находим также гены системы передачи сигнала от инсулина и инсулиноподобного фактора роста, а также гены, кодирующие компоненты систем ответа на стресс.

Таким образом, анализ мутаций, увеличивающих продолжительность жизни нескольких модельных организмов, приводит нас к концепции биологического времени, которое, по сути, является функцией времени и интенсивности метаболической активности. В полном соответствии с концепцией В. Гладышева и другими теориями старения метаболизм служит основным источником побочных продуктов химических реакций, которые не могут быть переработаны организмом и накапливаются. Чем интенсивнее работает метаболизм, тем быстрее накапливаются токсичные побочные продукты и повреждения. Наоборот, замедление метаболизма, будь то в результате простого ограничения калорийности рациона или мутаций, влияющих на сигнальные пути, чувствительные к избытку питательных веществ, увеличивает продолжительность жизни за счет меньшей скорости накопления токсичных побочных продуктов.

Механизмы повреждений, связанные с нормальным метаболизмом, также взаимосвязаны. В первую очередь, это образование активных форм кислорода, приводящее к окислению компонентов клетки, и гликирование компонентов клетки, связанное с основным метаболитом – глюкозой. Продукты окислительного повреждения и гликирования приводят к отложению липофусцина в лизосомах, снижению эластичности сосудов и способствуют отложению нерастворимых продуктов как на стенках сосудов, так и в нервной ткани.

СТАРЕНИЕ КАК ПРОГРАММА

Хотя многие молекулярные механизмы старения известны и похожи на неизбежное накопление токсичных побочных продуктов метаболизма или вызванных ими повреждений, существуют теории, склонные считать старение программой. Впервые гипотеза программируемого старения была опубликована А. Вейсманом [35]. В последние годы получила широкую известность модификация этой теории, выдвинутая В. Скулачевым [36]. Известна также теория программируемого старения А. Бойко [37]. При этом теории программируемого и самопроизвольного старения часто сходятся в своих молекулярных механизмах.

Какие аргументы выдвигают сторонники теорий программируемого старения? Во-первых, это су-

ществование видов, старение которых происходит внезапно. В этом случае мы определенно имеем дело с программой. Практически всегда такое быстрое старение включается после программы полового размножения. Так, бамбук размножается вегетативно и может расти 15–20 лет без видимых признаков старения. Однако после цветения и созревания семян он быстро вянет, давая таким образом возможность семенам порости. Наиболее известный пример быстрого старения – лосось. Тихоокеанские лососи заходят из моря в реки, где нерестятся, после чего у них значительно повышается уровень глюкозы, жирных кислот и холестерина, усиливается работа надпочечников, и они погибают. Пример отмены этой программы открыт российским биологом В.В. Зюгановым [38]. Личинка моллюска жемчужницы, паразитирующая на лососе, отменяет программу ускоренного старения для того, чтобы иметь возможность созреть. Хотя отмена программы старения лосося не бесспорна [39], не вызывает сомнений сам факт ускоренного запрограммированного старения. Известно еще несколько примеров очевидной программы смерти, чаще всего связанной с размножением, в том числе гибель самцов австралийской сумчатой мыши [40], поденок после размножения и откусывание головы самца самкой богомола после копуляции. Эти события явно носят характер запрограммированной гибели, однако их связь со старением не всегда очевидна. Тем не менее эти примеры иллюстрируют возможность существования программ, разрушительных для индивида, ради выживания популяции. В своей теории старения В. Скулачев [36] постулирует, что старение млекопитающих – это такая же разрушительная программа, только развивается она не так стремительно и реализуется через продукцию активных форм кислорода и гибель митохондрий.

Достаточно очевидно, что среднее время жизни у представителей определенного вида животных так или иначе запрограммировано в геноме. Тем не менее различные теории расходятся в том, является ли старение целью или «побочным результатом» генетических программ. Например, согласно широко известной теории расходуемой сомы Т. Кирквуда [41], старение – это компромисс в распределении ограниченных ресурсов между поддержанием и восстановлением тканей индивида и другими процессами, способствующими выживанию вида. Проявление этого компромисса наблюдается, например, при сравнении средней продолжительности жизни сходных видов животных, имеющих различную вероятность гибели от хищников. Когда вероятность гибели велика, замедление старения не дает тех эволюционных преимуществ, которые может дать, например, быстрое размножение. Согласно теории А. Бойко [37],

старение – это приобретенная программа. Предки многоклеточных животных и многие таксономические группы живущих ныне многоклеточных лишены этой программы. Старение, как таковое, закодировано в геноме как путь развития организма, включающий образование невозобновляемых, так называемых постмитотических тканей. Клетки этих тканей не делятся сами и не могут пополняться из запаса стволовых клеток. В таком виде теория Бойко интегрирует теорию накопления побочных продуктов метаболизма В. Гладышева [15] и является достаточно стройной.

ОПЫТ СРАВНИТЕЛЬНОЙ ГЕНОМИКИ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ

Программа старения явно или неявно задана в геноме, теоретически ее можно выявить, сравнивая геномы стареющих и не стареющих организмов. При этом организмы должны быть достаточно сходными, чтобы их геномы содержали минимальное число различий, не связанных со старением. Даже сравнение индивидуальных геномов одного вида, полученных от долгожителей и контрольной группы, не всегда информативно. Опубликовано достаточно много работ, в которых анализируются ассоциации между продолжительностью жизни и мутациями (полиморфными вариантами) генов, основная проблема которых – их статистическая значимость. Современные исследования такого рода включают в себя анализ нескольких тысяч образцов ДНК как в контрольной группе, так и в группе долгожителей. Пока только один ген, *APOE*, показал ассоциацию с долголетием со статистической значимостью $p < 5 \times 10^{-8}$ [42]. Среди ассоциаций, обладающих меньшей значимостью, можно назвать компоненты сигнального пути инсулина/IGF1 (*AKT1*, *AKT3*, *FOXO4*, *IGF2*, *INS*, *PIK3CA*, *SGK*, *SGK2*, *YWHAG*) и теломеразы (*POT1*) [43]. Гены, мутации в которых ассоциированы с долгой жизнью, подробно рассмотрены в недавнем обзоре Ньюман [44].

Сравнение геномов долгоживущих представителей одного вида и контрольной выборки позволяет выявлять гены, влияющие на продолжительность жизни, но имеет ряд особенностей. Положительной стороной подобного подхода является использование больших выборок индивидов с очень сходными геномами. Это позволяет с достаточно большой статистической значимостью выявлять мутации, которые влияют на изучаемый признак, и отличать их от случайных мутаций. В геноме человека размером 2.9×10^9 нуклеотидов содержится несколько миллионов индивидуальных вариабельных (полиморфных) участков [45]. С помощью таких инструментов, как микрочипы, стало возможным анализировать до 1 000 000 по-

добных участков у каждого индивида. Именно из-за столь большого числа различий статистически значимыми считают различия при $p < 10^{-8}$. Тем не менее основной недостаток анализа геномов с целью поиска генов, ассоциированных с долгожительством человека, – не слишком большая вариабельность продолжительности жизни. Сравнивая геномы разных видов, можно, теоретически, выявлять гены, связанные с гораздо большим (в разы) увеличением продолжительности жизни. Продолжительность жизни животных может отличаться до 10 000 раз. Так коловратки живут несколько дней, а гренландский кит до 200 лет. Сравнение геномов видов с различной продолжительностью жизни связано с дополнительными трудностями. Даже у представителей одного вида геномы имеют миллионы различий. Геномы разных видов отличаются настолько, что их довольно сложно, если вообще возможно, сравнивать.

Только у организмов, разительно отличающихся как строением, так и размерами тела, продолжительность жизни может отличаться в 10 000 раз. Сравнивать геномы коловратки и кита в поисках генов, регулирующих продолжительность жизни, достаточно бесперспективно. Вообще, размеры тела сказываются на продолжительности жизни очень сильно [46].

Разумным подходом к генетическому анализу продолжительности жизни может служить сравнение филогенетически близких видов сходных размеров, имеющих различную продолжительность жизни. Так, среди небольших млекопитающих у летучих мышей продолжительность жизни больше, а у сумчатых меньше, чем ожидаемая. Птицы и летучие мыши живут в среднем дольше, чем наземные животные сходного размера. Скорее всего, это связано с меньшим эволюционным давлением со стороны хищников. Гибель в раннем возрасте препятствует отбору генетически детерминированных долгожителей, когда же давления со стороны хищников нет, отбор работает в пользу долгоживущих особей.

Можно выделить несколько видов млекопитающих, которые могут служить хорошим примером видов-долгожителей, имеющих короткоживущих собратьев. Наиболее известен грызун *H. glaber* (голый землекоп), продолжительность жизни которого может превышать 30 лет, что в 9 раз больше, чем у родственной ему мыши. Голый землекоп – норное животное, обитающее в Африке. Это единственное по-настоящему общественное высшее животное, наподобие муравьев или пчел. В подземной колонии, из которой грызуны никогда не выходят на поверхность, имеется одна так называемая королева, которая узурпирует возможность размножаться. Остальные особи, рабочие и солдаты, кормят ко-

ролеву и защищают колонию от соседних колоний или змей, основного природного врага голого землекопа. Голый землекоп нечувствителен к холоду и боли, он обитает в удущливой атмосфере, содержащей только 8% кислорода и 25% углекислого газа. Известно, что у этого грызуна не образуются злокачественные опухоли, смертность не возрастает с возрастом, т.е. практически отсутствует старение как таковое. Нуклеотидная последовательность генома голого землекопа, определенная группой В. Гладышева [47], содержит 22561 ген, причем в процессе эволюции этот грызун приобрел 750 и потерял 320 генов. В геноме голого землекопа найдены также 244 псевдогена, т.е. гена, испорченных мутациями. Среди утраченных генов выделяются группы генов, ассоциированных с рибосомами и биосинтезом нуклеотидов, обонянием, зрением, сперматогенезом и, возможно, убиквитинированием, т.е. маркированием белков для деградации. Среди белков, специфически представленных в геноме голого землекопа, – два компонента теломер или теломеразы, TERP1 и TERF1. В 39 белках голого землекопа найдено 45 позиций, занимаемых аминокислотами, которые не встречаются в этих положениях у других млекопитающих. В число этих белков входят компоненты аппарата копирования и поддержания целостности ДНК, CCNE1, APEX1, RFC1, TOP2A. Кроме того, уникальные замены найдены в генах системы поддержания температуры тела (UCP1) и зрения (CRYGS). В геноме *H. glaber* обнаружены 1.87 млн полиморфных участков. Столь низкая частота полиморфных участков более характерна для человека, чем для крысы и мыши, родственных голому землекопу. Сравнение 33 генов, экспрессия которых меняется в головном мозге человека при старении, с соответствующими генами голого землекопа показало, что экспрессия 32 из них не изменяется. Среди этих генов – *CYP46A1*, участвующий в обмене холестерина и образовании амилоидных бляшек, и *SMAD3*, кодирующий фактор транскрипции, который замедляет деление клеток и участвует в канцерогенезе. У голого землекопа нарушен механизм синтеза мелатонина, что так же, как и у мыши с искусственно инактивированной мелатониновой системой, коррелирует с пониженной активностью сигнального пути инсулина/IGF1. Результатом адаптации к пониженному содержанию кислорода стали, по-видимому, мутации в факторе, индуцированном гипоксией (HIF1 α), и во взаимодействующем с ним белке VHL. Анализ генома *H. glaber* представляет интересный пример поиска генов, обуславливающих долголетие.

Другим долгоживущим млекопитающим, геном которого был изучен в лаборатории В. Гладышева [48], стала летучая мышь, ночница Брандта. Как уже

упоминалось выше, летучие мыши имеют уникально большую продолжительность жизни по сравнению с млекопитающими сходных размеров. Продолжительность жизни ночницы Брандта превышает 40 лет, что при весе 4–8 г делает ее абсолютным рекордсменом по нарушению правила «чем больше вес, тем больше продолжительность жизни». У этого ночного насекомоядного животного идентифицировано 22 256 генов при общем размере генома 2×10^9 нуклеотидов, а также 194 псевдогена. Обнаружено, что 67 генных семейств значительно увеличились, а 44 сократились. Среди увеличенных семейств можно обратить внимание на гены, связанные с иммунитетом. В ходе эволюции ночница приобрела 349 и потеряла 98 генов. Некоторые гены можно отнести к системам эхолокации, адаптации зрения к сумеречному свету и спячке. Среди изменений генома, отвечающих, возможно, за долголетие, отмечают мутации в генах рецепторов гормона роста (GHR) и инсулиноподобного фактора роста (IGF1R). Мутации в гене *IGF1R* (*daf-2*) найдены у долгоживущих мутантов нематоды *C. elegans*. Изучение экспрессии генов пути инсулина/IGF1, таких, как *FOXO1*, у ночницы Брандта показало, что экспрессия этих генов изменяется, как у долгоживущей мутантной мыши, и характерна для замедленного метаболизма.

МОРСКИЕ ЕЖИ КАК ОБЪЕКТ СРАВНИТЕЛЬНОЙ ГЕНОМИКИ ДОЛГОЛЕТИЯ

Морские ежи относятся к типу иглокожих, принадлежащих, как и хордовые, к группе вторичноротых (Deuterostomia). При этом между иглокожими и хордовыми больше сходства, чем между любой из этих групп и такими первичноротыми, как членистоногие или моллюски. Взрослые морские ежи имеют выраженную пятилучевую симметрию. Тело морских ежей помещено в кальцитный панцирь округлой формы, состоящий из чередующихся рядов пластин и также имеющий пятилучевую симметрию. Ротовое отверстие расположено внизу тела, а анальное наверху. Снаружи морской еж защищен подвижными иглами, прикрепленными к телу и приводимыми в движение особыми мышцами. Морские ежи привлекали внимание ученых как объект биологии развития. Яйцеклетки и сперматозоиды морские ежи выпускают в воду и их легко получать в лабораторных условиях. Оплодотворение происходит прямо в морской воде, и сразу же начинается деление клетки. Вторая волна интереса к этим животным связана с открытием удивительного долголетия некоторых видов морских ежей. *Strongylocentrotus franciscanus*, или красный морской еж, населяет прибрежную зону тихоокеанского побережья США в районе

холодного калифорнийского течения. Опубликованы доказательства выдающегося долголетия этого вида. Инъекция тетрациклина приводит к включению тетрациклина в известковый панцирь морского ежа. Сбор и анализ морских ежей через год после мечения позволяет оценить годовое увеличение их диаметра в зависимости от исходного размера. Оказалось, что период быстрого роста красного морского ежа переходит в фазу очень медленного роста [49].

Математический анализ распределения морских ежей по размерам позволил определить максимальную продолжительность жизни *S. franciscanus*. Оказалось, что наиболее крупные экземпляры доживают до «преклонного» возраста, превышающего, по меньшей мере, 100 лет. Дополнительное подтверждение получено с помощью анализа распределения изотопа ^{14}C в кальцитном материале зубов *S. franciscanus*. Повышенное содержание данного изотопа в мировом океане, обусловленное проведением открытых ядерных испытаний в пятидесятые годы прошлого столетия, позволило измерить среднюю скорость роста зубов морского ежа за большой период наблюдения, составивший несколько десятков лет [50]. Обе работы [49, 50] показали, что *S. franciscanus* живет более 100 лет. Следует отметить, что не все морские ежи характеризуются таким долголетием. Тихоокеанский морской еж меньшего размера, *S. purpuratus*, имеющий сходные с *S. franciscanus* места обитания, также характеризуется значительной, хотя и меньшей продолжительностью жизни – около 50 лет. В то же время карибский морской еж *Lytechinus variegatus* живет всего 3–4 года [51]. Столь значительные различия в продолжительности жизни близких видов делает их перспективным объектом для поиска генов, связанных с продолжительностью жизни.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Практически все популярные теории старения сходятся в том, что оно проявляется как накопление повреждений. Наиболее признанным источником повреждений служат активные формы кислорода, но существуют и другие типы повреждений, связанных со старением, такие, как амилоиды, продукты гликирования, липофусцин и др. Существующие теории расходятся в том, насколько накопление этих вредных продуктов запрограммировано в геноме, и является ли такое «программирование» именно программой самоубийства или просто неизбежной расплатой за дополнительные эволюционные преимущества. Помимо собственно повреждений, важна скорость их накопления, обусловленная общей интенсивностью метаболизма. Наиболее значительные

изменения продолжительности жизни модельных организмов оказались связанными с мутациями, модулирующими именно интенсивность метаболизма. Кроме анализа модельных организмов, продуктивным может оказаться сравнительный анализ геномов

животных-долгожителей и родственных короткоживущих видов. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке ЕСН группы и РФФ (грант № 14-24-00061).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Giorgio M., Migliaccio E., Orsini F., Paolucci D., Moroni M., Contursi C., Pelliccia G., Luzi L., Minucci S., Marcaccio M., et al. // *Cell*. 2005. V. 122. P. 221–233.
2. Skulachev V.P. // *IUBMB Life*. 2000. V. 49. P. 177–180.
3. Dufour E., Boulay J., Rincheval V., Sainsard-Chanet A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. P. 4138–4143.
4. Harman D. // *J. Gerontol.* 1956. V. 11. P. 298–300.
5. Скулачев В.П. // *Биохимия*. 2007. Т. 72. С. 1700–1714.
6. Harman D. // *J. Am. Geriatr. Soc.* 1972. V. 20. P. 145–147.
7. de Grey A.D. // *Bioessays*. 1997. V. 19. P. 161–166.
8. Barja G. // *Free Radic. Biol. Med.* 2002. V. 33. P. 1167–1172.
9. Andziak B., O'Connor T.P., Qi W., DeWaal E.M., Pierce A., Chaudhuri A.R., van Remmen H., Buffenstein R. // *Aging Cell*. 2006. V. 5. P. 463–471.
10. Labunskyy V.M., Gladyshev V.N. // *Antioxid. Redox Signal.* 2013. V. 19. P. 1362–1372.
11. Schirner S.E., Linford N.J., Martin G.M., Treuting P., Ogburn C.E., Emond M., Coskun P.E., Ladiges W., Wolf N., van Remmen H., et al. // *Science*. 2005. V. 308. P. 1909–1911.
12. Sun J., Tower J. // *Mol. Cell Biol.* 1999. V. 19. P. 216–228.
13. van Raamsdonk J.M., Hekimi S. // *PLoS Genet.* 2009. V. 5. P. e1000361.
14. Gladyshev V.N. // *Bioessays*. 2012. V. 34. P. 925–929.
15. Gladyshev V.N. // *Trends Genet.* 2013. V. 29. P. 506–512.
16. Brunk U.T., Terman A. // *Eur. J. Biochem.* 2002. V. 269. P. 1996–2002.
17. Schachter F., Faure-Delanef L., Guenot F., Rouger H., Froguel P., Lesueur-Ginot L., Cohen D. // *Nat. Genet.* 1994. V. 6. P. 29–32.
18. Huang Y., Mucke L. // *Cell*. 2012. V. 148. P. 1204–1222.
19. Russo C., Violani E., Salis S., Venezia V., Dolcini V., Damonte G., Benatti U., D'Arrigo C., Patrone E., Carlo P., et al. // *J. Neurochem.* 2002. V. 82. P. 1480–1489.
20. Sell D.R., Monnier V.M. // *Gerontology*. 2012. V. 58. P. 227–237.
21. Monnier V.M., Sell D.R. // *Rejuvenation Res.* 2006. V. 9. P. 264–273.
22. Franceschi C., Bonafe M., Valensin S. // *Vaccine*. 2000. V. 18. P. 1717–1720.
23. Dilman V.M. // *Lancet*. 1971. V. 1. P. 1211–1219.
24. Dilman V.M., Anisimov V.N. // *Exp. Gerontol.* 1979. V. 14. P. 161–174.
25. Оловников А.М. // *ДАН СССР*. 1971. Т. 201. С. 1496–1499.
26. Greider C.W., Blackburn E.H. // *Cell*. 1985. V. 43. P. 405–413.
27. Harley C.B., Futcher A.B., Greider C.W. // *Nature*. 1990. V. 345. P. 458–460.
28. Hayflick L., Moorhead P.S. // *Exp. Cell Res.* 1961. V. 25. P. 585–621.
29. Kim N.W., Piatyszek M.A., Prowse K.R., Harley C.B., West M.D., Ho P.L., Coviello G.M., Wright W.E., Weinrich S.L., Shay J.W. // *Science*. 1994. V. 266. P. 2011–2015.
30. McCay C.M., Crowell M.F., Maynard L.A. // *Nutrition*. 1989. V. 5. P. 155–171. Discussion 172.
31. Kenyon C., Chang J., Gensch E., Rudner A., Tabtiang R. // *Nature*. 1993. V. 366. P. 461–464.
32. Анисимов В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения. СПб.: Наука, 2008. 481 с.
33. Finch C.E., Ruvkun G. // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2001. V. 2. P. 435–462.
34. Tissenbaum H.A., Guarente L. // *Nature*. 2001. V. 410. P. 227–230.
35. Weismann A. Ueber die Dauer des Lebens, ein Vortrag. Jena: G. Fischer, 1882. 94 p.
36. Скулачев В.П. // *Биохимия*. 2012. Т. 77. С. 827–846.
37. Бойко А.Г. // *Журн. общей биологии*. 2007. V. 68. P. 35–51.
38. Зюганов В.В. // *Докл. АН*. 2005. V. 403. P. 434–441.
39. Попов И.Ю. // *Успехи геронтол.* 2009. Т. 22. С. 596–604.
40. Fisher D.O., Double M.C., Blomberg S.P., Jennions M.D., Cockburn A. // *Nature*. 2006. V. 444. P. 89–92.
41. Kirkwood T.B.L. // *Nature*. 1977. V. 270. P. 301–304.
42. Brooks-Wilson A.R. // *Hum. Genet.* 2013. V. 132. P. 1323–1338.
43. Deelen J., Uh H.W., Monajemi R., van Heemst D., Thijssen P.E., Bohringer S., van den Akker E.B., de Craen A.J., Rivadeneira F., Uitterlinden A.G., et al. // *Age (Dordr.)*. 2013. V. 35. P. 235–249.
44. Newman A.B., Murabito J.M. // *Epidemiol. Rev.* 2013. V. 35. P. 181–197.
45. Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W., Li P.W., Mural R.J., Sutton G.G., Smith H.O., Yandell M., Evans C.A., Holt R.A., et al. // *Science*. 2001. V. 291. P. 1304–1351.
46. Austad S.N. // *Mech. Ageing Dev.* 2005. V. 126. P. 43–49.
47. Kim E.B., Fang X., Fushan A.A., Huang Z., Lobanov A.V., Han L., Marino S.M., Sun X., Turanov A.A., Yang P., et al. // *Nature*. 2011. V. 479. P. 223–227.
48. Seim I., Fang X., Xiong Z., Lobanov A.V., Huang Z., Ma S., Feng Y., Turanov A.A., Zhu Y., Lenz T.L., et al. // *Nat. Commun.* 2013. V. 4. P. 2212.
49. Ebert T.A. // *Exp. Gerontol.* 2008. V. 43. P. 734–738.
50. Ebert T.A., Southon J.R. // *Fish. Bull.* 2003. V. 101. P. 915–922.
51. Francis N., Gregg T., Owen R., Ebert T., Bodnar A. // *FEBS Lett.* 2006. V. 580. P. 4713–4717.