**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ СТАРЕНИЯ**

 ***Метилирование ДНК и старение***

Многие вещи непонятны нам не потому, что

наши понятия слабы, но потому, что эти

вещи не входят в круг наших понятий.

Козьма Прутков. Плоды раздумья

Молекулярные события, определяющие транскрипцию, имеют решающий интерес для геронтологов, поскольку регуляция экспрессии генов коренным образом влияет на старение и старческие изменения. Факторы, влияющие на экспрессию гена, но не прямо вызывающие изменения в генетическом коде, могут играть роль в старении. Одним из них является метилирование ДНК (Catania, Fairweather, 1991; Richardson, 2003). До 5% всех остатков цитозина в ДНК млекопитающих метилировано по 5' позиции с образованием 5-метилцитозина (5мЦ). Это единственное постоянно модифицированное основание в ДНК высших эукариот. Метилирование происходит в обеих нитях ДНК симметрично, и остатки 5мЦ всегда фланкируются остатками гуанина со стороны З'-конца. Метилированные остатки цитозина выполняют различные функции, но что еще более важно, метилирование ДНК вовлечено в регуляцию активности генов. Изменения в метилировании, в частности деметилирование динуклеотидов у позвоночных, связано с изменением уровня транскрипции (Mays-Hoopes, 1989). Возрастное деметилирование ДНК было впервые описано в 1973 г. Б. Ф. Ванюшиным и соавт. (Vanyushin et al., 1973). При этом была обнаружена разница в степени деметилирования в тканях крыс - в ткани мозга оно преобладало над тканью печени. В дальнейшем было обнаружено возрастное снижение 5мЦ в легких и культурах фибробластов кожи, для последних была показана связь деметипирования со снижением возможности к росту в культуре (Wilson, Jones, 1983). Было высказано предположение о том, что возрастное деметилирование предрасполагает клетки к опухолевой трансформации.

В табл. 11 суммированы сведения о генах человека, возрастные нарушения функции которых обусловлены гиперметилиронанием (Yuasa et al., 2002). Аберрантные участки метилирования ДНК размером от 0.5 до нескольких тысяч пар оснований являются существенным механизмом инактивации активности генов и часто наблюдается при раке. Эти участки располагаются вблизи генов, часто они обнаруживаются около промоторных областей широко экспрессирующихся генов. Возрастное гиперметилирование наблюдали в нормальной слизистой оболочке толстой кишки и в ряде других органов, причем хронические воспалительные процессы, например хронический язвенный колит или инфицирование Helicobacter pylori, ассоциированы с избыточным метилированием (Yuasa et al., 2002). Отмечают, что возрастное метилирование увеличивается с возрастом линейно, хотя степень его нарастания может варьировать. Метилирование таких генов репарации ДНК, как hMLH1, MGMT и GSTP1, приводя к их инактивации, может способствовать возрастному накоплению мутаций и, возможно, к ускоренному старению и увеличению риска развития рака.

**Гликозилирование белков и ДНК**

Нуклеиновые кислоты и белки могут быть модифицированы с помощью добавления сахаров к их свободным аминогруппам, что ведет к структурной и функциональной перестройке молекул. Интерес к реакции между глюкозой и белками, известной как реакция Мейяра (Maillard), значительно вырос после того, как стало очевидно, что глюкоза способна ковалентно, без участия ферментов, модифицировать белки в условиях in vivo (Кудинов, 1994). Процесс неферментативного гликозилирования включает несколько этапов: связывание глюкозы со свободными аминогруппами с образованием оснований Шиффа, с последующим их превращением в более стабильные продукты Амадори и затем в конечные продукты глубокого гликозилирования (AGE - advanced glycosylation endproducts). Конечные продукты реакции Мейяра труднорастворимы, устойчивы к протеолитическому расщеплению, весьма активны химически и способны образовывать внутримолекулярные сшивки (например, в коллагене), ковалентно связывать белки, которые вследствие своего быстрого обновления (например, ЛПНП, IgG), а также некоторые другие вещества, имеющие свободные аминогруппы (ДНК, некоторые липиды), химически инактивировать окись азота (NO) (Кудинов, 1994).

Была выявлена группа мембранных белков, принадлежащих к суперсемейству иммуноглобулинов, которые выполняют функцию рецепторов для глубоко гликозилированных молекул. AGE-peцепторы обнаружены на фибробластах, Т-лимфоцитах, в почках (мезангиальные клетки), в стенке сосудов (эндотелий и гладкомышечные клетки), в мозге, а также в печени и селезенке, где они выявляются в наибольшем количестве, то есть в тканях, богатых макрофагами. В макрофагах происходит наиболее интенсивное разрушение продуктов реакции Мейяра, при этом происходят активация эндоцитоза и синтез многих регуляторных молекул, в частности инсулинподобного фактора роста (IGF-1) и тромбоцитарныи фактор роста (PDGF), являющихся стимуляторами деления фибробластов, гладкомышечных и мезангиальных клеток (Vlassara et ai., 1994). В табл. 12 приведены сведения об основных процессах, развивающихся при активации рецепторов к конечным продуктам гликозилирования.

Неэнзиматическое гликозилирование биологически важных молекул становится все более важной областью в изучении диабета и процесса нормального старения. Такие моносахара, как Д-глюкоза или Д-галактоза, запускают цепь химических событий, продуцирующую метаболиты, способные создавать ковалентные связи внутри белковых молекул и связывать различные белки между собой. В коллагене, содержащем большое количество глюкозы, было обнаружено увеличение количества связей у пожилых и больных диабетом по сравнению с нормальными людьми (Kohn et ai,, 1984). Такое увеличение количества связей в коллагене снижает его эластичность. Это изменение на молекулярном уровне может являться причиной утолщения базальной мембраны, например в мезангиальном матриксе почек, и может приводить к почечной недостаточности при диабете, а также быть причиной возрастного снижения функции почек. Полагают, что этот механизм играет роль в сужении артерий, уменьшении сосудистого кровотока и снижении гибкости сухожилий.

Гипергликемия способствует образованию конечных продуктов гликозилирования и активных форм кислорода (Кудинов, 1994; Facchini et al., 2000). Было установлено, что гипергликемия способствует накоплению делеций в митохондриальной ДНК и других мутаций в клетках мышечной оболочки сосудов. При нелеченном диабете с высоким уровнем глюкозы наблюдаются многие признаки ускоренного старения, такие как нарушенное заживление ран, катаракта, повреждения сосудов и капилляров и повышенный риск развития рака (Dilman, 1994). Накопление маркера AGE пентозидина ускорено при диабете и рассматривается как адекватный маркер старения (Ulrich, Cerami, 200I). Было показано, что в коллагене кожи коротко- и долгоживущих видов животных уровень маркера гликозилирования пентозидина был обратно пропорционален видовой максимальной продолжительности жизни (Sell et ai., 1996). Ключевая роль механизма передачи сигнала инсулина как фактора, определяющего долголетие, убедительно показана на различных моделях беспозвоночных (Clancy et al., 2001; Tatar et al., 2001).

Одним из нескольких эффективных способов предупреждения старения является снижение калорийности пищи, возможным механизмом влияния такой диеты является снижение концентрации глюкозы в крови и уменьшение неэнзиматического присоединения глюкозы к долгоживущим белкам, например к гемоглобину (Masoro, 2000; Ulrich, Cerami, 2001). Снижение концентрации глюкозы приводит к снижению как гликозилирования белков, так и перекисного окисления липидов. Определяющим негативный эффект гликозилирования является не собственно присоединение глюкозы к долгоживущим белкам, а происходящее вследствие этого обусловленное свободными радикалами их окислительное повреждение. Нуклеотиды и ДНК также подвергаются неэнзиматическому гликозилированию, что приводит к мутациям из-за прямого повреждения ДНК и инактивации систем репарации ошибок рекомбинации. Это также вызывает повышенную ломкость хромосом. В настоящее время изучаются подходы к предупреждению влияния гликозилирования на долгоживущие белки с помощью фармакологических и генетических воздействий. Так, использование аминогуанидина может быть полезным в лечении обусловленных возрастом и диабетом осложнений. Показано, что он предупреждает изменение базальной мембраны, атеросклероз и поражение почек при диабете. Длительное введение мышам и крысам антидиабетических бигуанидов приводило к замедлению старения репродуктивной системы, увеличению продолжительности жизни животных (Dilman, Anisimov, 1980; Anisimov, 1987)

 ***Возраст и частота мутаций***

Все, что может испортиться - портится,

Все, что испортиться не может - портится тоже.

Эффекты Чизхояма

Среди современных теорий старения, основанных на предположении, что ДНК является основной мишенью в клетке, доминирует теория соматических мутаций, согласно которой старение является результатом взаимодействия различных эндогенных и экзогенных повреждающих агентов с генетическим материалом клетки и постепенного накопления случайных мутаций в геноме соматических клеток (Morley, 1995; Vijg, 2000; Розенфельд, 2001). Повреждения ядерной и митохондриальной ДНК соматических клеток, такие как точечные мутации, делеции и транслокации, приводят к активации или инактивации специфических генов, вовлеченных в регуляцию клеточного цикла и контроль роста. В табл. 13 приведены данные об интенсивности эндогенных повреждений ДНК клеток млекопитающих.

Накопление с возрастом таких мутаций в различных органах и тканях является основным фактором, определяющим развитие возрастной патологии, включая рак (Bernstein, Bernstein, 199I; Газиев и др., 1994; Vijg, 2000; Vijg, Dolle, 2002). При изучении с помощью FISH-метода хромосомных повреждений (транслокаций и дицентриков) в лимфоцитах доноров и лиц в возрасте от 4 до 85 лет, подвергшихся неконтролируемому облучению в низких дозах за 1- 4 года до исследования, установлено более быстрое увеличение с возрастом стабильных повреждений в хромосомах у облученных людей (Воробцова и др., 1999). Исследование функциональных особенностей хромосом при старении показало, что снижение интенсивности репарации ДНК и повышение частоты мутаций в глубокой старости являются вторичными по отношению к гетерохроматинизации {конденсации эу- и гетерохроматических районов хромосом) (Лежава, 2001).

Представляется весьма существенным вывод о неодинаковой динамике накопления соматических мутаций в различных органах и тканях. На трансгенных мышах, несущих шаттл-вектор LacZ, было установлено, что увеличение частоты соматических мутаций в печени происходит равномерно с рождения до глубокой старости, тогда как в головном мозге она нарастает только от рождения до 4-6 месяцев жизни, а затем не изменяется. Перестройки генома постепенно накапливаются в печени до 27-месячного возраста, после чего их число резко увеличивается. В головном мозге геномные перестройки встречаются значительно реже, и с возрастом их частота не увеличивается (Dolle et al., 2000).

В табл. 14 суммированы результаты изучения возрастной динамики мутаций в различных органах трансгенных мышей различных линий (Оnо et al., 2002). Можно видеть, что частота мутаций увеличивается с возрастом во многих тканях, однако степень этого увеличения существенно варьирует. Наибольшая частота мутаций отмечена в клетках тонкой кишки и мочевого пузыря старых мышей. Важно отметить, что степень возрастного увеличения частоты спонтанных мутаций не коррелирует с пролиферативной активностью тканей. Так, относительно мало мутаций накапливается в коже и яичках, которые содержат быстро пролиферирующие клетки, тогда как в сердце и печени, состоящих из непролиферирующих или мало пролиферирующих клеток, скорость их накопления довольно значительна.

В сердце и тонкой кишке мышей в молодом возрасте характер и спектр мутаций практически идентичен и представлен в основном транзициями ГЦ -> AT и 1-bp делециями, тогда как у старых мышей характер мутаций в этих органах был различен. В тонкой кишке накапливались только точечные мутации, включая ГЦ -> ТА, ГЦ -> ЦГ и AT -> ГЦ трансверсии и ГЦ -> AT транзиции, тогда как в сердце старых мышей около половины всех мутаций было представлено большими геномными перестройками, вовлекающими до 34 сантиморганов хромосомной ДНК Остальные же мутации, аккумулирующиеся в сердце, были представлены транзициями ГЦ -> AT в локусах CpG (Dolle et al., 2000). Наибольшая интенсивность возникновения спонтанных хромосомных повреждений наблюдается в молодом возрасте, а по мере старения темп спонтанного мутагенеза снижается. Интересно, что нокаутные TrpS53-/- мыши, погибающие обычно до возраста 6 месяцев от рака, накапливали мутации в селезенке и в меньшей степени в печени быстрее, чем мыши дикого типа или гетерозиготы (Giese et al., 2002).

Было установлено, что в нормальных тканях человека накапливаются клонально распространяющиеся мутации митохондриальной ДНК (мтДНК) (Coller et al., 2001; Bodyak et al., 2001; Nekhaeva et al., 2002). Обнаружение делеций мтДНК в мышцах человека, так же как доказательства частичного удвоения мтДНК в тканях пожилых людей (Bodyak et al., 2001), позволяют предполагать важную роль клональной экспансии мутированной мтДНК в возрастном увеличении системного окислительного стресса в целом организме (de Grey, 2000; Khrapko et al., 2003).

***Возраст и репарация ДНК***

Одной из причин накопления повреждений ДНК с возрастом может быть снижение эффективности систем ее репарации. В ряде работ установлена положительная корреляция между продолжительностью жизни вида и скоростью репарации ДНК, поврежденной ультрафиолетовым светом или ионизирующей радиацией (Burkle, 2002). Большой интерес представляют данные о видовых различиях в специфической репарации ДНК, поврежденной алкилирующими агентами, в частности о различиях в скорости удаления из ДНК промутагенного основания О6-метилгуанина. Оказалось, что печень человека примерно в 10 раз быстрее удаляет О6-метилгуанин, чем печень крысы. Значительно быстрее О6-метилгуанин элиминировался также из лимфоцитов и фибробластов человека, чем из аналогичных тканей мыши (Likhachev, 1990). Эти наблюдения позволяют предполагать меньшую чувствительность человека к канцерогенному действию нитрозосоединений.

Другой причиной различий в продолжительности жизни животных разных видов могли бы быть различия в толерантности к молекулярным повреждениям. Ж. А. Медведев (Medvedev, I972) предположил, что повторность генов (множественность копий) может быть важным фактором долголетия, поскольку повреждения уникальных генов более вероятно будут способствовать их суммации и преждевременному старению. Однако R. Cutler (1991) не обнаружил четкой связи между числом повторов генов и долголетием или между избыточностью рибосомальных генов и скоростью старения. Вместе с тем, рассматривая гены, служащие матрицами для синтеза мРНК в мозге человека, коровы и мыши, он нашел, что в среднем избыточность этих генов у человека больше, чем у коровы, а у коровы больше, чем у мыши. Представленные данные позволяют заключить, что у долгоживущих видов механизмы, защищающие генетический аппарат клетки от повреждений, по-видимому, более совершенны, чем у короткоживущих видов.

Большой интерес представляют данные о возрастных изменениях репарации различных типов повреждений ДНК. В исследованиях А. И. Газиева и др. (1981) было показано, что в клетках старых (18-22 мес.) мышей линии А/Не и СЗН/Sn уровень неингибированного оксимочевиной синтеза (репаративный синтез) в 2 раза ниже, чем у молодых (1.5-2 мес.). При облучении мышей разного возраста репаративный синтез увеличивается в 2-3 раза по сравнению с контролем. Авторы установили, что дело не в снижении активности ферментов репарации ДНК, поврежденной радиацией, а в степени доступности для ферментов этих повреждений ДНК в составе хроматина клеток. Об этом же свидетельствует и возрастное снижение релаксируемости нуклеоида ядер печени мышей при сравнении молодых и старых -облученных животных (Газиев и др., 1981). При амплификации фрагментов транскрибируемых (-актин, р53) и нетранскрибируемых (тяжелой цепи иммуноглобулина IgE) генов в ДНК мозга и селезенки у-облученных и необлученных крыс в возрасте 2 и 28 месяцев, было установлено, что степень амплификации фрагментов этих генов в ДНК старых крыс была существенно ниже, чем у молодых крыс. Репарация повреждений ДНК в мозге крыс разного возраста не отличалась в течение 30 мин после облучения (быстрая фаза репарации), но была существенно замедлена в последующие 5 ч (медленная фаза репарации) в мозге старых крыс (Ploskonosova et al., 1999).

Было показано, что радиационная повреждаемость ДНК стволовых клеток кишечного эпителия мышей разных линий и возраста примерно одинакова, однако скорость репарации этих повреждений с возрастом снижается. Способность диплоидных фибробластов человека к репарации индуцированных -излучением однонитевых разрывов ДНК достоверно снижается с увеличением возраста донора (Anisimov, 1987). В ряде работ оценивалось влияние возраста донора на интенсивность внепланового синтеза ДНК в клетках человека, подвергнутых in vitro УФ-облучению. В. Lambert et a). (1979) нашли отрицательную корреляцию между возрастом и величиной внепланового синтеза ДНК (ВСД) в лейкоцитах периферической крови 58 здоровых субъектов 13-94 лет. Авторы отметили сильные индивидуальные колебания величины ВСД Было обнаружено также ослабление индуцированного УФ-светом репаративного синтеза в лимфоцитах человека с возрастом и в глубокой старости. Было установлено, что с возрастом донора существенно увеличивается накопление разрывов в ДНК фибробластов человека при кратковременном воздействии низкочастотного электромагнитного поля (50 Гц, 1 мТ), что свидетельствует о возрастном снижении эффективности репарации ДНК, поврежденной этим воздействием (Ivancsits et aL, 2003). В табл. 15 суммированы данные о влиянии возраста на эффективность репарации ДНК при различных типах повреждений. Можно видеть, что репарация ДНК зависит как от вида животных, типа повреждающего агента и вызываемого им повреждения, так и от ткани мишени.

Большинство повреждений ДНК репарируется, но не все. Так, у крыс происходит 105 окислительных повреждений ДНК в день в расчете на клетку. Когда скорость репарации не достигает скорости индукции повреждений, происходит увеличение спонтанных повреждений ДНК с возрастом (Vijg, 2000). Точная оценка способности организма восстанавливать специфические повреждения затруднена и часто бывает ошибочной, В большинстве исследований возможного снижения репаративной активности ДНК с возрастом были использованы способы, с помощью которых оценивается фаза синтеза ДНК при эксцизионной репарации. Главный вывод из этих работ, выполненных преимущественно на культуре клеток, состоит в том, что эффективность репаративных систем ДНК не снижается с возрастом (Likhachev, 1990). Однако нельзя исключить, что при старении репарационные системы ДНК становятся более подвержены ошибкам, приводящим к усилению индукции мутаций (Anisimov et al., 1993; Vijg, 2000). В любом случае определенная степень несовершенства является главной чертой системы репарации ДНК, на что указывало фактическое накопление как повреждений ДНК, так и изменение последовательности ДНК.

***Изменения структуры и функции генов при старении***

При старении может изменяться не только структура генов, но и направление их функционирования. С возрастом в соматических клетках накапливаются не только мутации, но и хромосомные перестройки (Vijg. 2000; Vijg, Dolle, 2002). Полагают, что изменения хроматина могут играть главную роль в связанных с возрастом изменениях регуляции экспрессии генов (Medvedev, 1984). С увеличением возраста не отмечено изменений стехиометрии большинства гистонов, однако имеются сообщения ой изменениях подвида гистона H1 (Medvedev, 1984). Ацетилирование гистонов, которое предположительно изменяет взаимодействие гистон-ДНК и делает ДНК белее доступной, снижается по мере старения на 30-70 %. Важную роль в увеличении продолжительности жизни, как это показано в опытах на дрожжах и С. elegans, играют деацетилазы гистонов, в частности SIR2 и RPD3 (Chang, Min, 2002).

В последние годы было опубликовано несколько обзорных работ, в которых обсуждается влияние возраста на транскрипцию и трансляцию. Установлено, что в целом транскрипционная активность клетки при старении организма снижается. Однако уровень общей РНК остается постоянным за счет снижения скорости обновления РНК. В большинстве исследований была найдена хорошая корреляция между связанными с возрастом изменениями уровней видов мРНК и уровнем белка (или энзиматической активностью), обусловленным различными видами мРНК. Это было показано на печени крыс в отношении альбумина, альфа(2)-глобулина и супероксиддисмутазы и каталазы. Связанное с возрастом уменьшение индукции митогенами мРНК интерлейкина 2 (ИЛ-2) в лимфоцитах грызунов и человека соответствует возрастному снижению биологической активности этих двух интерлейкинов (Roy et al., 2002).

***Роль окислительного стресса в старении***

Ваша теория и солидна, и остроумна.

Впрочем, вcе теории стоят одна другой.

Воланд

(А. Булгаков. Мастер и Маргарита)

Одной из наиболее плодотворно развивающихся в последние годы фундаментальных теорий является свободнорадикальная теория старения, практически одновременно выдвинутая в 1956 г. D. Harman (Harman, 1994) и в 1958 г. Н. М Эмануэлем (Эмануэль, 1975; Emanuel, 1985) (рис. 5, 6). Эта теория объясняет не только механизм старения, но и широкий круг связанных с ним патологических процессов (сердечно-сосудистые заболевания, возрастные иммунодепрессия и дисфункция мозга, катаракта, рак и некоторые другие).

Согласно этой теории, продуцируемые главным образом в митохондриях клеток молекулы супероксида (О-2), Н2О2, гидроксильного радикала (НО) и, возможно, синглетного кислорода (О2) повреждают клеточные макромолекулы (ДНК, белки, липиды) (Cutler, 1991; Harman, 1994; Barja, 2002). Полагают, что активные формы кислорода вызывают повреждения мембран, коллагена, ДНК, хроматина, структурных белков и участвуют в регуляции внутриклеточного уровня кальция и т. д. (Гусев, Панченко, 1997; Papa, Skulachev, 1997; Кольтовер, 1998; Skulachev, 1999, 2001; Barja, 2002). Подсчитано, что за 70 лет жизни человека организм производит около 1 т радикалов кислорода, хотя только 2-5 % вдыхаемого с воздухом кислорода превращается в его токсические радикалы. В клетке крысы может возникать до 104 вызванных активными формами кислорода повреждений ДНК в день {Ames ct al., 1993) и при постоянных условиях до 10 % молекул белка могут иметь карбонильные модификации. Подавляющее большинство из них нейтрализуется еще до того, как успеют повредить те или иные компоненты клетки. Так, из каждого миллиона образующихся супероксидных радикалов от ферментной защиты ускользает не более четырех. К основным эндогенным факторам антиоксидантной защиты организма относятся некоторые ферменты и витамины (табл. 16).

Показано, что видовая продолжительность жизни прямо коррелирует с активностью супероксиддисмутазы (СОД), содержанием -каротина, -токоферола и мочевой кислоты в сыворотке крови (Cutler, 1991). Более того, у долгоживущих линий D. melanogaster экспрессия СОД, каталазы, глютатионредуктазы и ксантиндегидрогеназы была достоверно большей, чем у короткоживущих линий мух (Arkind et al., 1996). Выявлена положительная корреляция между продолжительностью жизни млекопитающих и резистентностью их клеток к окислительному стрессу, вызываемому различными агентами (Kapahi et al., 1999).

Установлена высокая корреляция между активностью основного обмена, активностью СОД и максимальной продолжительностью жизни у животных 14 видов, включая человека. В этой связи интересно наблюдение, что при повышении температуры происходит усиление образования 8-оксигуанина в ДНК, что свидетельствует о том, что нагревание может усиливать окислительный стресс, повышая уровень активных форм кислорода (Bruskov et al., 2002). Выявлено существенное накопление с возрастом продуктов окислительного повреждения белков свободными радикалами, генерируемыми нейтрофилами (Pleshakova et al., 1998; Плешакова и др., 2000). Однако при лонгитудинальном исследовании экскреции с мочой продуктов окислительного повреждения ДНК 8-оксигуанина (8-ОНГ) и его дезоксирибуноклеозида (8-ОНдГ) у мышей и крыс обнаружено снижение их величины с возрастом (Обухова и др., 1997), что может отражать снижение эффективности их репарации, поскольку при этом увеличивается их содержание в ДНК печени, почек и желудка (Ames, 1989). У крыс OXYS с ускоренным старением выявлены дисфункция митохондрий и нарушения поведения, свойственные нейродегенеративным заболеваниям (Колосова и др., 2001).

Было установлено, что с возрастом происходит снижение общей антиокислительной и антирадикальной активности крови у людей (Anisimov et al., 2001). У людей старческого возраста (83-85 лет) и долгожителей (90-105 лет) выявлено повышение уровня продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в липопротсинах низкой плотности (ЛНП) и сниженной устойчивостью ЛНК к окислению по сравнению со здоровыми людьми в возрасте 36-59 лет (Шабалин и др., 2002).

В пользу свободнорадикальной теории старения говорят эксперименты, в которых трансгенные линии D. melanogaster с дополнительными копиями генов, обеспечивающих избыточную активность СОД и каталазы, жили на 20-37 % дольше контрольных мух, тогда как мухи с избыточными копиями генов лишь одного из этих ферментов антиокислительной защиты таким эффектом не обладали (Оrr, Sohal, 1994), Трансгенные дрозофилы с избыточной экспрессией гена SOD1 в мотонейронах жили на 40 % дольше и были значительно устойчивее к окислительному стрессу, чем мухи, не имевшие этого гена (Parkes et al., 1998). Витамин Е, мелатонин, хелатные агенты и некоторые синтетические антиоксиданты увеличивали продолжительность жизни не только дрозофил, но и лабораторных мышей и крыс (Обухова, Эмануэль, 1983; Harman, 1994; Rciter, 1995; Газиев и др., 1997; Anisimov et al., 2001) (см. главу 9). На модели экспериментальной мозговой ишемии установлено, что применение карнозина существенно уменьшает смертность и улучшает функцию мозга у крыс. При ишемии сердца карнозин защищает кардиомиоциты от повреждения и улучшает сократимость сердечной мышцы. В механизме защитного действия карнозина важную роль играют его антиоксидантная активность, способность защищать мембраны, образовывать комплексы с переходными металлами и регулировать функцию макрофагов (Болдырев, 1998).

У гомозиготных мышей, с выключенным геном Prdx1, кодирующим небольшие антиокислительные белки пероксиредоксины, содержащие каталитические остатки цистеина и использующие тиоредоксин как донор электронов, было отмечено существенное укорочение продолжительности жизни по сравнению с контролем дикого типа, сопровождавшееся увеличением частоты развития новообразований (Neumann et ai., 2003). Поскольку частота опухолей увеличивалась также и у гетерозиготов Prdx1+/- авторы полагают, что этот ген может являться антионкогеном. В этой же работе было показано, что эмбриональные фибробласты мышей Prdx1-/- имеют сниженный пролиферативный потенциал in vitro и повышенную чувствительность к окислительному повреждению ДНК.

Однако то обстоятельство, что продукты взаимодействия АФК с макромолекулами постоянно обнаруживаются в органах и тканях организма, свидетельствует о том, что системы антиоксидантной защиты недостаточно эффективны и что клетки постоянно подвергаются окислительному стрессу. Противодействие ему может играть существенную роль в механизме геропротекторного действия эндогенных и экзогенных антиоксидантов (см. главу 9).

В последние годы получила развитие так называемая митохондриальная теория старения, в основе которой лежат два предположения (Linnane et al., 1989):

Во-первых, предполагается, что мутации митохондриальной ДНК (мтДНК) накапливаются с возрастом и могут достигать значительной частоты. Однако само по себе это предположение не может объяснить роль мтДНК в старении, поскольку каждая клетка содержит несколько митохондриальных геномов. Случайный мутагенез будет приводить к формированию смеси различных типов мутантных и дикого типа молекул. Необходим специальный механизм, который сможет обеспечить создание достаточно высокой концентрации фенотипически значимых мутантов, способных преодолеть фенотипический порог (Khrapko et ab, 2003; Kraytsberg etal., 2003).

Во-вторых, предполагается, что мутации мтДНК распределяются таким образом, что каждая клетка содержит одну мутацию или главным образом один тип мутаций. При этом мутация может полностью реализовать свою потенциальную возможность нарушить физиологию клетки и тем самым быть активно вовлеченной в процесс старения. Хотя прямых доказательств того, что мутации в мтДНК вызывают значимые для старения эффекты, еще мало (за исключением, пожалуй, саркопении), исследования самого последнего времени полностью подтвердили оба упомянутых предположения, тем самым укрепив митохондриально-мутационную теорию старения (de Grey, 2002; Kraytsberg et al., 2003). При экстраполяции кривой экспоненциального накопления повреждений мтДНК (как точечных мугаций, так и делеций) до уровня 100 % в клетках сердца человека дает оценку 129 лет. Повреждения мтДК приводят к нарушению дыхания митохондрий, что увеличивает образование АФК и соответственно новым повреждениям мтДНК.

Было убедительно показано, что у пластинчатых грибов Роdospora anserina старение обусловлено нестабильностью митохондриальной ДНК, а именно накоплением кольцевой многомерной молекулы ДНК, называемой senДНК {Dufour et al., 2000). Авторы установили, что инактивация ядерного гена СОХ5, кодирующего субъединицу V комплекса цитохром с оксидазы приводит у этих грибов к использованию альтернативного дыхательного пути и уменьшению продукции АФК, что сопровождается существенным увеличением продолжительности жизни, ассоциированным со стабилизацией митохондриальной хромосомы. Более того, эта мутация предотвращает накопление senДНК в митохондриях.

Сторонники митохондриальной теории старения полагают, что в основе старения лежит прогрессивная потеря функции митохондрий в различных тканях организма (Gershon, 1999; Salvoli et al., 2001). В пользу такой точки зрения свидетельствуют следующие данные:

- накопление в митохондриальной ДНК (мтДНК) больших делеций и точковых мутаций в тканях пожилых индивидуумов и уменьшение количества копий;

- снижение с возрастом активности ферментов, обеспечивающих перенос электронов в дыхательной цепи, в лимфоцитах, скелектных мышцах и кардиомиоцитах;

- как следствие этих процессов - увеличение продукции АКФ и прогрессивное перекисное окисление липидов и белков мембран;

- изменения морфологической структуры митохондрий и снижение мембранного потенциала митохондрий, обеспечивающего энергию для синтеза АТФ;

- клетки молодых крыс быстро стареют и подвергаются дегенерации, когда в них с помощью микроинъекции вводят митохондрии из фибробластов старых крыс;

- установлена обратная корреляция между продукцией перекиси водорода, митохондриями и максимальной продолжительностью жизни вида.

Наследуемая по материнской линии мтДНК реплицируется в течение всей жизни организма как в пролиферирующих, так и в постмитотических клетках, что в конечном счете приводит к тому, что частота мутаций мтДНК во много раз превышает таковую в ядерной ДНК. В значительной мере это обусловлено неэффективностью систем репарации ДНК и близостью к митохондриальной мембране, где генерируются АФК. Возрастные нарушения дыхания митохондрий выявлены не только в нормальных тканях, но и у лиц с нейродегенеративными заболеваниями - болезнью Альцгеймера, болезнью Паркинсона, хореей Хантингтона, двигательных расстройствах, миопатии скелетных и сердечной мышцы и др. (James, Murphy, 2002; Troen, 2003). Эти заболевания характеризуются также высокой частотой мутаций в мтДНК. Имеются данные об ассоциации апоптоза с фрагментацией мтДНК.

Наследуемый полиморфизм митохондриальнои ДНК ассоциирован со старением и долголетием: гаплотип J гораздо чаще встречается у столетних мужчин северной Италии, чем у молодых (De Benedicts et ai., 1999). Интересно, что этот же митохондриальный гаплотип в высокой степени экспрессируется при многих комплексных заболеваниях, давая пример антагонистической плейотропии, то есть гена или генов, которые, неблагоприятным образом сказываясь в молодом возрасте, оказывают благоприятное действие в пожилом возрасте, обеспечивая благополучное старение. Картину делают еще более сложной данные о том, что частоты полиморфизмов мтДНК в популяциях пожилых людей в Италии, Ирландии и Японии существенно различаются (Ross et aL, 2001).