

УДК 576.385;57.017.6;575.113;612.67

СИСТЕМА ПОЛИ(АДР-РИБОЗИЛ)ИРОВАНИЯ БЕЛКОВ: ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ РАЗВИТИИ, СТАРЕНИИ И ОГРАНИЧЕНИИ КЛЕТОЧНОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ

Обзор

© 2018 Г.А. Шиловский¹, С.И. Шрам², Г.В. Моргунова¹,
А.Н. Хохлов^{1*}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, 119991 Москва, Россия;
электронная почта: khokhlov@mail.bio.msu.ru

² Институт молекулярной генетики РАН, 123182 Москва, Россия

Поступила в редакцию 09.08.17
После доработки 13.09.17

Известно, что с возрастом в организме уменьшается количество делящихся клеток. Средняя скорость деления клеток в тканях и органах сформированного организма резко снижается, что, возможно, является триггером накопления повреждений, приводящих к нарушению целостности генома. Это может быть причиной развития многих возрастных заболеваний и появления фенотипических и физиологических признаков старения. В связи с этим большой интерес вызывает система поли(АДР-рибозил)ирования белков, активируемая в ответ на возникновение различных повреждений ДНК. В обзоре обобщены и проанализированы данные, касающиеся изменений системы поли(АДР-рибозил)ирования в процессе развития, при старении *in vivo* и *in vitro*, а также при ограничении клеточной пролиферации. Особое внимание удалено методическим аспектам определения активности поли(АДР-рибоза)-полимераз (PARP). Анализ соответствующих публикаций и наших собственных данных позволил сделать вывод, что активность PARP в условиях дополнительного внесения свободных концов ДНК (обозначаемая как стимулированная активность PARP) неуклонно снижается с возрастом. В то же время динамика активности PARP, измеряемая в отсутствие дополнительной активации фермента (обозначаемая как нестимулированная активность), такой четкой направленности не имеет: во многих работах приведенные различия статистически недостоверны, хотя точно известно, что при старении число нерепарированных разрывов ДНК неуклонно накапливается. Видимо, в клетке существуют дополнительные системы регуляции, ограничивающие ее способность реагировать на повреждения ДНК. Особенное внимание удалено влиянию пролиферативного статуса клетки на активность PARP. Мы систематизировали и проанализировали данные, касающиеся изменений активности PARP при развитии и старении организма, различий в динамике этой активности при наличии/отсутствии дополнительной ее стимуляции и того, какие клеточные процессы сопряжены с активацией этого фермента. Кроме того, проведено сравнение данных, полученных на различных клеточных моделях старения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: повреждение ДНК, поли(АДР-рибозил)ирование, поли(АДР-рибоза)-полимеразы, стабильность генома, «стационарное старение», репликативное старение, клеточная пролиферация.

В предыдущем нашем обзоре [1] мы уделили внимание системе поли(АДР-рибозил)ирования белков и ее участию в поддержании стабильности генома (репарации повреждений ДНК, предотвращении возникновения хромосомных нарушений и т.п.) и взаимодействию поли(АДР-ри-

боза)-полимеразы-1 (PARP-1) со специфическими белками прогерий. В частности, на основании многочисленных данных, указывающих на важную роль поли(АДР-рибоза)-полимераз (PARP) в реакции организма на повреждение ДНК при воздействии на него повреждающих

Приятные сокращения: DIV – сут *in vitro* (days *in vitro*); PAR – поли(АДР-рибоза) (poly(ADP-ribose)); PARP – поли(АДР-рибоза)-полимеразы (poly(ADP-ribose) polymerases); PARP-1 – поли(АДР-рибоза)-полимераза-1 (poly(ADP-ribose) polymerase 1); PBMC – мононуклеарные лейкоциты периферической крови (peripheral blood mononuclear cells); НСА – нестимулированная активность; ПЖ – продолжительность жизни; СА – стимулированная активность; УКП – удвоение клеточной популяции.

* Адресат для корреспонденции.

факторов, сделали предположение, что PARP-1 может препятствовать процессам опухолеобразования. Особый интерес для изучения PARP представляет тот факт, что ее «позитивная» функция как фермента, вовлеченного в репарацию ДНК, наблюдается в нормальных условиях, в условиях отсутствия патологий. Инактивация и нокаут по PARP приводят к снижению генетической стабильности, большей подверженности развитию опухолей. В случае же развития острых или хронических патологий, в т.ч. воспаления, ишемии и т.п., роль PARP становится «негативной», ее активация ухудшает течение заболевания. Ингибиторы PARP применяются в таких случаях в качестве лекарственных препаратов, уменьшающих длительность и тяжесть патологического процесса. Этот «дуализм» представляется перспективным для разграничения процессов развития возрастных заболеваний и «нормального» старения (*successful aging*). Кроме того, были суммированы и проанализированы данные о роли системы поли(АДФ-рибозил)ирования белков в детерминации продолжительности жизни (ПЖ) (корреляции между максимальной ПЖ и активностью PARP) и о влиянии на ПЖ уровня экспрессии гена, кодирующего белок PARP-1, а также точковых полиморфизмов в этом гене [1].

Настоящая обзорная работа посвящена возрастным изменениям активности PARP и влиянию на нее пролиферативного статуса клеток, а также методологии ее измерения и различным подходам к активации фермента биологически активными веществами (в частности, ДНК-повреждающими агентами и митогенами) *in vivo* и *in vitro*.

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В СИСТЕМЕ ПОЛИ(АДР-РИБОЗИЛ)ИРОВАНИЯ БЕЛКОВ *in vivo*

На рубеже 1990-х годов появились первые публикации о связи PARP со старением. Они были посвящены исследованию роли этих трансфераз в возрастных изменениях хрусталика глаза [2, 3]. Затем был опубликован целый ряд статей, связанных с изучением возрастных изменений активности и экспрессии PARP-1 [4–12].

Перед анализом этих работ хотелось бы упомянуть некоторые методологические проблемы выбора подходов к определению активности PARP в исследованиях разных авторов. В частности, в статьях, касающихся экспериментов на культурах клеток и тканях организма, имеют место значительные разнотечения в использовании термина «активность PARP», а также отсут-

ствуют стандартные общепринятые процедуры ее измерения. Кроме того, существует целый ряд специфических методических проблем, связанных с геронтологическими исследованиями ферментов в целом. Канунго приводит следующий перечень существующих трудностей сравнения возрастных изменений ферментативной активности: применение различных методов ее измерения и выражение данного показателя в разных единицах (на 1 г сырого веса, на 1 г сухого веса, на 1 мг белка или на 1 мг ДНК, тогда как все эти «назематели» могут, как и сама активность фермента, меняться с возрастом); исследование активности ферментов в условиях, далеких от физиологических; существование суточных и иных ритмов активности; различия в гетерогенности когорт исследуемых животных между линиями и лабораториями, а также отсутствие единого мнения о том, животных какого возраста уже можно считать старыми [13]. Дополнительным фактором, влияющим на активность PARP, является пролиферативный статус исследуемой ткани (наличие и доля пролиферирующих клеток) (подробнее об этом см. раздел 2).

Возрастные изменения активности PARP *in vivo*. Внимательное рассмотрение методических аспектов процедур определения активности PARP (и того, что ею обозначают) показало, что все приведенные в геронтологических работах методы сводятся к одному из двух следующих показателей: 1) «стимулированная активность PARP» (СА PARP) – скорость реакции поли(АДР-рибозил)ирования, определяемая в условиях искусственной стимуляции PARP разрывами ДНК, индуцированными тем или иным способом; при этом в условиях насыщения PARP субстратом и избытка разрывов ДНК этот показатель достигает максимальных значений, лимитируемых количеством PARP; 2) «нестимулированная активность PARP» (НСА PARP) – скорость реакции поли(АДР-рибозил)ирования, определяемая в условиях отсутствия искусственной стимуляции PARP разрывами ДНК; при избытке PARP лимитируется количеством разрывов ДНК.

Следует отметить, что практически все приведенные в литературе данные по активности PARP являются результатами не лонгитудинальных, а поперечных исследований, поэтому, хотя мы, следуя сложившейся в литературе традиции, и будем пользоваться термином «изменение активности PARP с возрастом», необходимо подчеркнуть, что корректнее все же было бы говорить о возрастных различиях.

Поскольку PARP-1 – это белок, содержащий цинковые «пальцы», снижение ее ферментативной активности могло бы быть связано с возрастным

увеличением дефицита ионов цинка, возникающим из-за неадекватной диеты и/или нарушения кишечного всасывания у пожилых людей [14]. Действительно, в работе Kunzmann et al. была обнаружена положительная, хоть и слабо выраженная, корреляция между СА PARP и содержанием цинка в мононуклеарных лейкоцитах периферической крови (PBMC) человека ($r^2 = 0,1779$; $p < 0,05$) [15]. Кроме того, авторы выявили уменьшение активности PARP с возрастом в популяции итальянцев ($r^2 = 0,3965$; $p < 0,05$), но не поляков или греков. При этом для объединенной выборки достоверных возрастных изменений выявлено не было. Grube et al. определяли СА PARP в PBMC крысы и человека в широком возрастном диапазоне: 0–100% максимальной ПЖ у крысы (линия BN/BiRj) и 0–85% максимальной ПЖ у человека [6]. В обоих случаях была выявлена обратная зависимость между возрастом и активностью PARP: коэффициенты корреляции равнялись $-0,54$ ($p < 0,001$) и $-0,34$ ($p < 0,005$) для человека и крысы соответственно. При этом снижение максимально достижимой активности PARP в течение жизни у человека и крысы составляло 59 и 39% соответственно. Наиболее существенные различия были выявлены при сравнении активности PARP в PBMC молодых (~30 лет) и старых (~80 лет) людей. Zaremba et al. показали наличие большого индивидуального разброса значений СА PARP в PBMC, а также наличие гендерных различий, в т.ч. обусловленных, как предполагается, различиями в гормональной регуляции [16].

Гораздо большее число работ посвящено сравнению НСА PARP в препаратах, полученных из тканей крыс Wistar разного возраста (рисунок). Как уже говорилось выше, этот показатель, по существу, отражает количество разрывов ДНК в образцах, взятых для анализа.

В лаборатории первооткрывателя PARP P. Mandel также изучали возрастные изменения НСА PARP (в статье используется термин «активность PARP») в ядрах эпителиальных клеток хрусталика быка [2, 3]. Эти исследования особенно интересны, т.к. хрусталик является одним из самых известных объектов для моделирования старения и возрастных заболеваний [17]. Авторы показали, что НСА PARP в 6 раз выше у старых быков (113 мес.), чем у молодых (4,5 мес.) [2]. Количество разрывов ДНК у взрослых особей (54 мес.) было лишь незначительно выше, чем у молодых (24 мес.) (на 12,9%; $p < 0,05$). При этом у старых животных (94 мес.), по сравнению с молодыми (24 мес.), наблюдали повышенное (в 2,3 раза; $p < 0,02$) число разрывов ДНК, что выглядит вполне ожидаемым ввиду прямой взаимосвязи между этими показателями. В другом

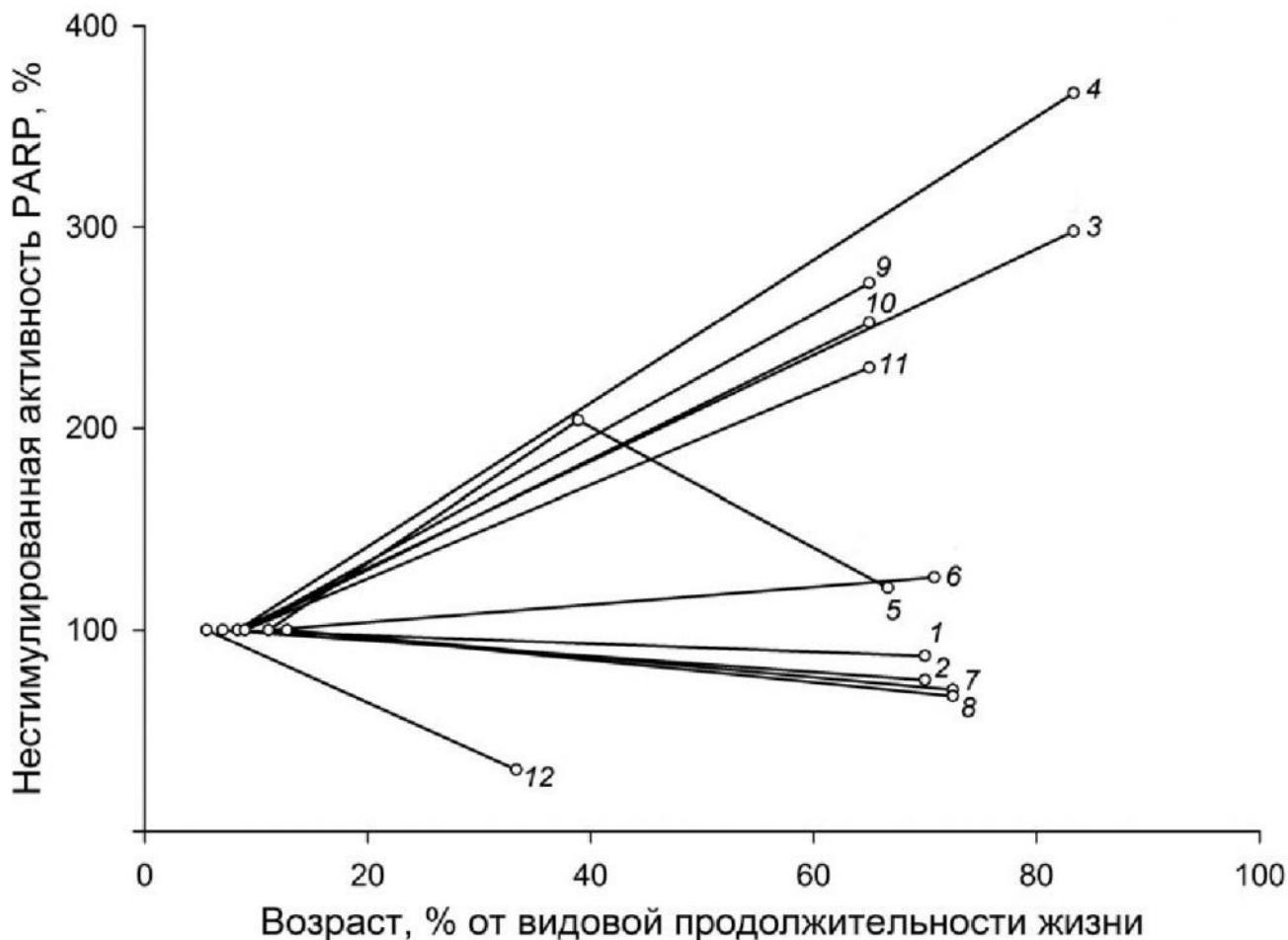
исследовании, проведенном в этой же лаборатории и с использованием тех же подходов, обнаружили значительное увеличение с возрастом НСА PARP в нейронах и астроцитах мозга крыс Wistar [8]. Оказалось, что НСА PARP в нейронах и астроцитах у старых (30 мес.) крыс соответственно в 3,5 и 3,9 раза выше, чем у молодых (3 мес.). При этом у старых животных и уровень повреждений ДНК значительно выше, чем у молодых: в нейронах – в 2,7, а в астроцитах – в 1,3 раза.

Strosznajder et al. провели сравнение НСА PARP в ядрах, полученных из различных отделов мозга молодых (4 мес.), взрослых (14 мес.) и старых (24–27 мес.) крыс Wistar [9]. Достоверные возрастные изменения НСА PARP были обнаружены лишь в гиппокампе: у взрослых крыс она была в 2 раза выше, чем у молодых, а у старых крыс – в 2,1 раза ниже, чем у взрослых ($p < 0,02$). Для НСА PARP в коре головного мозга и мозжечке у молодых и старых крыс достоверных отличий выявлено не было [9]. В еще одной работе этой же группе исследователей не удалось выявить различий в НСА PARP мозга у молодых и старых крыс [18].

Суммируя данные по НСА PARP, показанные на рисунке, можно заметить, что приведенные графики разделяются на две группы: группа, характеризующаяся увеличением НСА PARP с возрастом (как и предполагалось изначально, ведь с возрастом накапливается количество разрывов ДНК в тканях), и группа без такового. Также можно отметить то, что во второй группе в основном находятся ткани с низким пролиферативным индексом, тогда как в верхней части – преимущественно с более высоким. Однако приведенные различия в НСА PARP между тканями с низким и высоким пролиферативным индексом из разных работ меньше, чем различия между таковыми в одной и той же работе. По-видимому, причины этого – методические (приготовление препарата, условия проведения анализа, выбор возраста контрольных и опытных животных).

Одно из объяснений возрастной динамики НСА PARP вытекает из анализа результатов работы Strosznajder et al. [9], где сравнивали НСА PARP не в двух, а в трех возрастных группах: у молодых, взрослых и старых животных. На рисунке видно, что у взрослых животных она повышается, а затем у старых – снижается до характерного для молодых животных уровня. Поскольку количество разрывов ДНК не снижается с возрастом, можно предположить, что ухудшается способность клеток реагировать на повреждения ДНК.

Кроме того, было показано, что в ядерной фракции гиппокампа старых крыс не происхо-



Возрастные изменения нестимулированной активности PARP у крыс Wistar. За 100% принята активность PARP у молодых животных. Представлены данные следующих работ: 1 – Ушакова с соавт. [10], селезенка; 2 – Ушакова с соавт. [10], мозг; 3 – Messripour et al. [8], мозг, нейроны; 4 – Messripour et al. [8], мозг, астроциты; 5 – Strosznajder et al. [9], мозг, кора; 6 – Strosznajder et al. [11], мозг, кора; 7 – Mishra et al. [7], мозг; 8 – Mishra et al. [7], печень; 9 – Braudy et al. [12], печень; 10 – Braudy et al. [12], почки; 11 – Braudy et al. [12], сердце; 12 – Quesada et al. [5], простата

дит увеличения СА PARP в ответ на вызываемый FeCl_2 и аскорбатом сильный окислительный/генотоксический стресс, в то время как у молодых крыс наблюдается существенное повышение этого показателя [11]. Повреждение ДНК алкилирующим агентом *N*-метил-*N'*-нитро-*N*-нитрозогуанидином также вызывало сильное, в 2,6 раза ($p < 0,05$), увеличение уровня поли(ADP-рибозил)ирования белков в гиппокампе молодых, но не старых крыс [11]. Кроме того, было показано, что в гиппокампе амилоидный пептид и *N*-метил-D-аспартат вызывают (видимо, опосредованно) повреждения ДНК, что, в свою очередь, приводит к увеличению активности PARP в коре головного мозга и в гиппокампе молодых (4 мес.) крыс примерно на 80%. Однако препараты не оказывают никакого влияния на этот показатель у старых (24–27 мес.) животных [9].

Аналогичные результаты были получены Malanga et al., которые показали, что в мозжечке старых (20–27 мес.) крыс снижена способность к активации PARP в ответ на ферментативное расщепление ДНК ДНКазой I (СА PARP) по сравнению с молодыми (2 мес.) животными [19]. При этом НСА PARP в переднем мозгу и мозжечке была практически одинаковой у молодых и старых крыс [19].

В работе Газиева с соавт. исследовали как НСА PARP (в работе – «конститутивная активность PARP»), так и максимальную СА PARP (стимулированный γ -излучением в дозе 10 Гр синтез поли(ADP-рибозы), PAR) в ядерной фракции мозга и селезенки молодых (2 мес.) и старых (29 мес.) крыс [10]. Облучение животных в дозе 10 Гр было достаточным для полной активации PARP (т.е. авторы показали, что это корректная, максимальная СА; это является боль-

шой редкостью для работ по исследованию СА PARP). Оказалось, что НСА PARP в ядрах клеток мозга и селезенки на 13 и 25% ниже у старых крыс, чем у молодых [10]. У молодых крыс максимальная СА PARP в ядрах мозга и селезенки превышала СА PARP у старых в ~2 раза.

Таким образом, одной из возможных причин описанного ранее в литературе феномена снижения у старых особей эффективности репарации повреждений ДНК, вызванных γ -излучением, является снижение способности клетки к поли(АДР-рибозил)ированию ядерных белков [10].

В некоторых других работах было отмечено снижение НСА PARP с возрастом (СА PARP при этом не исследовали). Так, Mishra et al. показали, что НСА PARP в ядрах мозга и печени у старых крыс (110–115 нед.) примерно на 30% ниже, чем у молодых (20 нед.) ($p < 0,001$). При этом наблюдали возрастное снижение степени поли(АДР-рибозил)ирования как гистоновых, так и негистоновых белков [7].

Возрастные изменения, связанные с системой поли(АДР-рибозил)ирования хроматина, были выявлены также Schroder et al., обнаружившими, что НСА PARP (в работе – «активность PARP») во фракции хроматина из экстракта яйцевода старых особей (3–3,5 года) обыкновенного перепела *Coturnix coturnix* в 2 раза меньше, чем у молодых (7–10 мес.) особей [4]. В то же время активность ДНК-токоизомеразы II с возрастом увеличивалась. Авторы предположили, что PARP может играть важную роль в возрастных изменениях активности токоизомеразы II через ее посттрансляционную модификацию [4].

Интересны в связи с этим и результаты, полученные Thakur et al., которые исследовали поли(АДР-рибозил)ирование негистоновых белков в ядрах печени взрослых (14 нед.) и старых (113 нед.) крыс Wistar [20]. Оказалось, что НСА PARP в суммарной фракции негистоновых белков одинакова в обеих группах, хотя спектры PAR-модифицированных белков различаются. Нельзя исключить, что с возрастом могут изменяться не только содержание и активность белков семейства PARP, но и направленность их действия (определяющая спектр PAR-модифицированных белков, длину и разветвленность цепей PAR и т.д.).

Таким образом, при исследовании НСА PARP в препаратах тканей животных разного возраста получены противоречивые результаты (рисунок). В ряде работ было показано, что НСА PARP в ядерной фракции увеличивается с возрастом, что может быть связано с накоплением нерепарированных повреждений ДНК

[12]. В то же время снижение способности клеток старых особей синтезировать PAR в ответ на индукцию таких повреждений (СА PARP) может объясняться уменьшением количества активного фермента, способного взаимодействовать с вновь образующимися разрывами ДНК. Однако в некоторых работах получен противоположный результат – снижение НСА PARP с возрастом (рисунок).

Braidy et al. сравнивали уровни PAR, НСА PARP и содержание внутриклеточного NAD⁺ в печени, сердце, почках и легких самок крыс Wistar в возрасте 3–24 мес., охватывая, таким образом, все возрастные группы (молодые, взрослые и старые) [12]. Было выявлено достоверное увеличение с возрастом НСА PARP во всех органах: в 1,1–1,2 раза ($p < 0,01$) – к 12-месячному возрасту и в 2–2,2 раза ($p < 0,01$) – к 24-месячному по сравнению с 3-месячным. Кроме того, было продемонстрировано накопление с возрастом PAR, существенное снижение внутриклеточного уровня NAD⁺ и увеличение количества повреждений ДНК во всех исследуемых тканях. Авторы предположили, что высокое внутриклеточное содержание NAD⁺ является важным биохимическим фактором, положительно влияющим на ПЖ [12].

Этой же группой была исследована НСА PARP в образцах кожи людей (с неосвещенных участков тела) разного возраста. Было показано, что уровень повреждений ДНК хорошо коррелирует с возрастом как у мужчин ($p = 0,029$; $r = 0,490$), так и у женщин ($p = 0,003$; $r = 0,600$). При этом НСА PARP достоверно увеличивалась с возрастом только у мужчин и при рассмотрении выборки 0–77 лет ($p < 0,0001$; $n = 27$; $r = 0,768$). При ограничении возраста мужчин в выборке постпубертатным периодом, а также у женщин в возрасте 36–76 лет значимых изменений в НСА PARP не было выявлено [21]. Можно полагать, что наличие/отсутствие возрастных корреляций в данном случае сильно зависит от интенсивности роста организма и, соответственно, пролиферативного статуса клеток (см. ниже). Очевидно, что в постнатально-препубертатном периоде рост очень активен, тогда как в постпубертатном периоде, особенно позднем – нет. Таким образом, необходимо констатировать, что имеющихся в настоящее время сведений недостаточно, чтобы объяснить причины снижения с возрастом СА PARP. Из рассмотренных данных следует, что наблюдаемое снижение этого показателя с возрастом (наряду с увеличением количества повреждений ДНК) может приводить к уменьшению способности клетки реагировать на возникающие дефекты ДНК и, как следствие, вызывать различные нарушения в геноме. В свя-

зи с этим логично предположить, что с ростом числа разрывов ДНК в процессе старения уровень поли(ADP-рибозил)ированных белков будет увеличиваться и все возрастающая доля PARP будет в каждый момент времени пребывать в инактивированном состоянии, особенно если учесть возрастное снижение активности поли(ADP-рибоза)-гликогидролазы, как следует из работы Bizec et al. [2]. Нельзя, однако, исключить и существование других способов регуляции активности PARP, например, за счет образования комплексов с другими белками, а также иных посттрансляционных модификаций белков (ацетилирования, фосфорилирования, моно(ADP-рибозил)ирования), в т.ч. и самих PARP.

Возрастные изменения уровня экспрессии PARP-1. Messripour et al. установили, что в мозгу старых (30 мес.) крыс содержание белка PARP-1 почти в 3,5 раза выше, чем у молодых (3 мес.) особей [8]. В другом исследовании сравнение иммунореактивности PARP-1 у молодых (4 мес.) и старых (27 мес.) крыс не выявило различий в экспрессии PARP-1 в гиппокампе и мозжечке, тогда как в коре головного мозга и, в еще большей степени, в стриатуме старых крыс содержание PARP-1 было снижено [1]. В то же время, в работе Malanga et al. не обнаружено существенных различий в количестве белка PARP-1 в мозжечке молодых (2 мес.) и старых (20–27 мес.) крыс [19].

Возрастные изменения содержания PARP-1 у человека выявили O'Valle et al. [22]. С использованием иммуногистохимического анализа они показали, что содержание PARP-1 в почках, предназначенных для пересадки, увеличивается с возрастом донора ($r = 0,408; p = 0,006$) и положительно коррелирует с периодом восстановления функциональной активности (эффективного диуреза) у реципиентов ($r = 0,386; p < 0,01$). При этом возраст доноров варьировал в узких пределах – 53–64,8 лет (средний возраст составил 58,9 года). Таким образом, имеющиеся данные не позволяют в полной мере говорить о наличии четко выраженной возрастной динамики экспрессии PARP-1.

ВЛИЯНИЕ ПРОЛИФЕРАТИВНОГО СТАТУСА КЛЕТКИ НА АКТИВНОСТЬ PARP

Пролиферативный статус и клеточное старение. Известно, что многие параметры, используемые при изучении процессов старения, могут хорошо коррелировать с возрастом организма, но при этом не имеют никакого отношения к увеличению вероятности смерти с возрастом

[23, 24], которое обязательно входит в классическое определение старения живых организмов [25, 26]. Поэтому предлагается проводить геронтологические исследования либо в лонгитудинальных экспериментах, либо в экспериментах на так называемых «сущностных» моделях [27, 28]. Под последними подразумеваются такие модельные системы, в основе которых лежат не просто выявленные в геронтологических исследованиях корреляции (пример – известная модель Хейфлика), а постулируемые авторами конкретные механизмы старения организма. Одной из таких моделей является модель «стационарного старения», предложенная еще 30–40 лет назад [29–31]. Она основана на концепции, согласно которой с возрастом в организме снижается доля делящихся клеток, что способствует накоплению макромолекулярных повреждений и последующему нарушению функционирования органов и тканей, приводящему к увеличению вероятности смерти.

Аналогичные деструктивные изменения накапливаются и в клеточной культуре при ограничении ее пролиферации. Этот процесс был назван «стационарным старением». Предполагается, что рост клеточной культуры и формирование монослоя можно сопоставить с ростом и развитием целого организма [32–34]. В рамках данной концепции было предложено использовать стационарные клеточные культуры для изучения возрастных изменений, происходящих в клетках стареющего организма [24, 26, 28, 31, 35].

Предполагается [27, 31, 35], что оптимальным (в плане замедления старения) является воздействие геропротектором на процесс накопления в клетках повреждений ДНК, инициируемого предотвращением разбавления таких повреждений на уровне всей клеточной популяции (в организме или клеточной культуре) из-за замедления или полного прекращения появления новых клеток. Если же мы действуем геропротектором на этап реализации уже накопленных дефектов ДНК, в результате которой возникают все остальные «старческие» изменения и возрастные болезни, эффективность такого воздействия сильно снижается, ибо оно лишь недолго изменяет скорость старения. Таким образом, различия в ПЖ (в т.ч. видовые) будут определяться, по всей видимости, лишь различиями в программах, формирующих надежность систем (клеток, органов, тканей) данного организма [23].

Влияние пролиферативного статуса клетки на активность PARP. Существует много гипотез запуска деструктивных онтогенетических изменений, ведущих к увеличению вероятности гибели с возрастом (а именно это и является старением) [35, 36]. В качестве возможных причин такого

увеличения называли действие свободных радикалов, накопление соматических мутаций, генетическую запрограммированность и др. [25]. Большинство современных молекулярных генетиков придерживается той точки зрения, что в основе старения живого организма (определенного, по-видимому, деструктивными изменениями клеток) лежит накопление повреждений ДНК, т.к. она является матрицей, с помощью которой можно обновить практически любые элементы клетки [37]. Во многих изученных организмах старение связано с генетической нестабильностью [38]. Кажется весьма вероятным, что повреждения ДНК, вызываемые экзо- и эндогенными агентами, постоянно атакующими геном живых организмов (например, свободными кислородными радикалами, восстанавливающими сахарами, другими физиологическими клеточными метаболитами, канцерогенами окружающей среды или облучением), играют важную роль в запуске процесса старения.

Эта точка зрения подтверждается положительной корреляцией между ПЖ млекопитающих и уровнем репарации ДНК: репарация ДНК более эффективно противодействует накоплению повреждений у долгоживущих видов и, таким образом, у таких видов целостность и стабильность генома могут поддерживаться более эффективно в течение жизни [39], что может являться фактором, определяющим более позднее формирование опухолей у долгоживущих видов по сравнению с короткоживущими [38]. Сравнивая интенсивность метаболизма PAR в пролиферирующих и покоящихся клетках, полученных из опухоли молочной железы мыши [40], Sweigert et al. показали, что как НСА PARP (в статье – «базовая активность PARP»), так и СА PARP не коррелируют ни с выживанием, ни с репарацией разрывов ДНК. Интересно, что СА PARP при активации ДНКазой I в одной из исследуемых линий была в 2 раза выше в пролиферирующих клетках, чем в неделяющихся, тогда как в другой они были примерно равны. В другой серии опытов при активации облучением 50 Гр в одной из исследуемых линий клеток СА была в 2 раза выше в пролиферирующих клетках, чем в неделяющихся, тогда как в другой – в 3,5 раза. Результаты анализа НСА PARP в покоящейся и активно делящейся культурах клеток были не столь однозначными. В одной линии этот показатель в покоящихся клетках был в 2,5 раза ниже, чем в пролиферирующих, тогда как в другой – наоборот, в 3 раза выше, хотя эти линии были изначально получены из одной и той же опухоли. Это еще раз указывает на трудности в интерпретации данных по НСА PARP. При этом пролиферирующие и покоящиеся

клетки не различались по скорости расщепления PAR. Также было показано, что НСА PARP выше в пролиферирующих клетках CV-1 (эпителий почки зелено-мартышки) до достижения состояния сомкнутого монослоя, чем в этих же контактно ингибированных клетках, деление которых не останавливается контактным торможением [41]. Авторы сделали вывод, что одними из самых явных диагностических показателей у опухолевых клеток являются активация PARP-1 и увеличение интенсивности синтеза ДНК [41].

Salminen et al. также показали, что иммортализация клеток вирусом SV40 (т.е. отмена лимита Хейфлика и активация пролиферации) приводит к усилению экспрессии PARP в культуре диплоидных фибробластов человека [42].

Spina Purrello et al. исследовали влияние ряда факторов роста, обладающих митогенной активностью, на НСА PARP в культурах «молодых», «зрелых» и «старых» клеток астроглии крысы, полученных культивированием в течение 30, 90 и 190 сут (DIV; days *in vitro*) соответственно. Показано, что 12-часовая обработка «молодых» клеток инсулиноподобным фактором роста I и основным фактором роста фибробластов, а «старых» клеток – эпидермальным фактором роста, инсулином или основным фактором роста фибробластов приводит к значительному увеличению НСА PARP [43]. В то же время ни один из перечисленных выше факторов роста не вызывал изменения НСА PARP при аналогичном воздействии на «зрелые» клетки.

В работе Tanigawa et al. исследовали влияние ADP-рибозилирования белков на синтез ДНК в ядрах печени куриных эмбрионов и взрослых кур [44]. Был обнаружен интересный факт: в ядрах эмбрионов активация PARP добавлением 5 mM NAD приводила к стимулированию синтеза ДНК, тогда как в ядрах взрослых особей подавляла его. На основании полученных результатов авторы предположили, что в ядрах эмбрионов и взрослых крыс полиг(АДР-рибозил)ированию могут подвергаться белки, по-разному влияющие на репликацию ДНК. Кроме того, Porteous et al. показали, что НСА PARP в недифференцированных эпителиальных клетках нижней части крипты тонкой кишки морской свинки была почти в 10 раз выше, чем в дифференцирующихся созревающих эпителиальных клетках верхней крипты ворсинок [45]. Анализируя результаты по изменению СА и НСА PARP с возрастом, мы хотели бы отметить, что на эти показатели влияют не только уровень экспрессии белков семейства PARP, преимущественно PARP-1 и полиг(АДР-рибоза)-полимеразы-2, но и характер и степень модификации PARP, а так-

же, возможно, и другие факторы. Так, при активации PARP-1 поли(ADP-рибозил)ированию в значительной степени подвергается сам фермент, что приводит к его инактивации и диссоциации комплекса «ДНК–PARP-1».

Роль пролиферативного статуса клеток в изменениях системы поли(ADP-рибозил)ирования белков при развитии организма. Известно, что активность PARP гораздо выше в активном хроматине, т.е. в активно делящихся или дифференцирующихся клетках [44, 46]. Это объясняется более легким доступом различных ферментов, в т.ч. и PARP, к неупакованному хроматину. В результате поли(ADP-рибозил)ирования ядерных белков происходит нарушение их ассоциации с ДНК, что облегчает репликацию последней в S-фазе [13]. Особый интерес вызывают модельные системы, обеспечивающие анализ изменений активности PARP (функционирования системы клеточного поли(ADP-рибозил)ирования) в клетках зародышевого пути и имеющих к ним отношение тканях и органах (семенники, простата, яйцевод и т.п.) в ответ на действие биологически активных веществ (гормонов, митогенов и пр.).

Muller et al. показали, что при стимуляции 35-суточных самок японского перепела (*Coturnix japonica*) эстрогеном происходит увеличение скорости пролиферации и дифференцировки клеток, шестикратное увеличение веса яйцевода, сопровождающееся возрастанием активности ДНК-полимеразы и НСА PARP [47].

Установлено, что в семенниках крыс основным белком-акцептором является специфический гистон H1T [48]. Поли(ADP-рибозил)ирование гистоновых белков было очень низким в изолированных интактных ядрах семенников у 8-суточных животных (в семенных канальцах присутствовали только сперматогонии), значительно увеличивалось к возрасту 16 сут (наблюдается образование пахитенных сперматоцитов) и достигало характерного для взрослых крыс показателей к 32 сут (присутствовали конденсированные сперматиды) [48]. В той же лаборатории показали, что в семенниках 28–130-суточных крыс СА PARP достигает максимума к возрасту 30 сут в тетраплоидных сперматоцитах, а также гаплоидных и диплоидных сперматидах, и затем снижается [49]. При этом максимумы количества и СА PARP наблюдали в тетраплоидных сперматоцитах, которые подвергаются мейотическому делению, в то время как активность поли(ADP-рибоза)-гликогидролазы во всех исследованных половых клетках была одинаковой. Кроме того, максимумы экспрессии PARP-1 и СА PARP в семенниках крыс не совпадали и соответствовали возрасту 60 и 30 сут соответственно [49].

но [49]. Авторы считают, что система поли(ADP-рибозил)ирования белков во время сперматогенеза находится под контролем нескольких регуляторных механизмов.

Показано, что в ядерной фракции мозга крыс Sprague-Dawley НСА PARP максимальна у плода и постепенно снижается по мере развития эмбриона [50]. Авторы предположили, что НСА PARP снижается при замедлении пролиферации и возрастает у новорожденных при активации дифференцировки клеток мозга.

В кардиомиоцитах крысы НСА PARP у 90-суточных животных ниже, чем у 5-суточных [51]. Наблюданное снижение НСА PARP может объясняться не «постарением» кардиомиоцитов (90-суточных крыс можно отнести скорее к молодым особям), а изменением их пролиферативного статуса в процессе постнатального развития организма (см. далее).

Таким образом, можно предположить, что в раннем периоде развития организма, когда после рождения замедляется скорость роста организма и, соответственно, средняя митотическая активность клеток. После этого СА PARP, отражающая общую способность клетки к поли(ADP-рибозил)ированию, будет лишь снижаться. НСА PARP также снижается, что, как мы предполагаем, отражает снижение доступности ДНК для PARP вследствие ее компактизации, а также меньшую интенсивность клеточного метаболизма в уже сформировавшемся организме и снижение уровня транскрипции. Затем, уже в покоящихся клетках, НСА какое-то время будет повышаться, но на этот раз не вследствие функциональных перестроек в ДНК, а из-за возрастных или патологических процессов, вызывающих повышение уровня повреждений ДНК. Накопление таких повреждений будет вызывать увеличение НСА лишь до определенного момента вследствие того, что общая способность к поли(ADP-рибозил)ированию, как было отмечено выше, с возрастом снижается.

СИСТЕМА ПОЛИ(ADP-РИБОЗИЛ)ИРОВАНИЯ В РАЗЛИЧНЫХ МОДЕЛЯХ КЛЕТОЧНОГО СТАРЕНИЯ

Что же касается исследований на клеточных культурах, то, действительно, в популяциях интенсивно пролиферирующих клеток (в т.ч. и трансформированных) не наблюдается накопления деструктивных повреждений. Это может объясняться тем, что даже если в быстро делящихся клетках в результате действия радикалов, иных химических агентов или просто теплового

движения молекул и образуются какие-либо повреждения структуры ДНК, то либо они устраняются в процессе репликативной репарации, либо клетки с несовместимыми с жизнью повреждениями просто гибнут, а популяция постоянно пополняется молодыми, не имеющими повреждений клетками [34]. В связи с этим среднее число повреждений ДНК в клеточной популяции (в расчете на одну клетку) не меняется. Из этого можно заключить, что сигналом к накоплению деструктивных повреждений в клеточной популяции, в т.ч. и повреждений ДНК, является ограничение скорости пролиферации. Видимо, эта ситуация адекватна тому, что происходит в стареющем организме (уменьшение количества делящихся клеток и ухудшение питания клеток в целом) [24].

Широко применяемая модель Хейфлика [52], основанная на истощении митотического потенциала культуры клеток приблизительно за 50 пассажей (для диплоидных фибробластов человека), видимо, не столь точно отражает положение дел в целом организме. Так, доля делящихся клеток в организме не очень велика. Кроме того, организм не гибнет от исчерпания митотического потенциала и уменьшения скорости пролиферации клеток, тогда как по Хейфлику «состарившейся» считается популяция культивируемых клеток, не способная за определенный промежуток времени (две недели) удвоить свою численность. Сопоставление результатов, полученных на моделях репликативного и «стационарного» старения, может существенно увеличивать наши знания о механизмах клеточного старения в целом. Так, например, у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* средняя репликативная ПЖ составляет ~15 делений [53], однако уже после завершения первых двух-трех клеточных циклов у материнских клеток снижается резистентность к некоторым типам стресса: тепловому шоку и солевому стрессу [54]. Это, видимо, связано с тем, что клетки, совершившие четыре и более деления, в меньшей степени способны к перестройке своих защитных систем, чем новообразованные материнские клетки с репликативным «возрастом» два-три деления [55].

Однако дрожжевые клетки, переведенные в стационарное состояние иммобилизацией в специальной системе, обеспечивающей полноценное питание, перестраивали свой фенотип и экспрессию генов, становясь более устойчивыми к стрессу, и сохраняли жизнеспособность >95% в течение 17 сут [56]. В то же время в отсутствие такой системы (при обычном «хронологическом старении» [57, 58]), клетки гибнут, видимо, не только от постепенного накопления внутренних повреждений, но и от стресса, вызы-

ванного закислением среды продуктами метаболизма, хотя второй фактор вряд ли является решающим в данном феномене [58].

Изменения в системе поли(ADP-рибозил)ирования белков при репликативном старении клеток в культуре. В «стационарно стареющих» клетках, как и в организме, ограничение пролиферации является, как мы уже отмечали, не причиной гибели клетки, а лишь триггером накопления различного рода повреждений [24]. Видимо, накопление нерепарированных повреждений ДНК, которое, как было показано, имеет место в первую очередь в неделящихся клетках, играет основополагающую роль в старении [59]. Повреждения могут быть самыми разнообразными: сшивки ДНК-белок, депуринизация, замена одного основания другим, деметилирование и т.д. [13, 60, 61]. Одним из наиболее серьезных повреждений являются разрывы нитей ДНК. Ферменты репарации хуже работают в старых клетках, чем в молодых, что приводит к нарушениям структуры и, соответственно, к ухудшению функционального состояния ДНК.

Dell'Orco et al. исследовали изменения НСА PARP и СА PARP в ходе старения «по Хейфлику» в пермеабилизованных диплоидных фибробластах человека, полученных из легких плода (штамм IMR-91) и крайней плоти новорожденных (штамм CF3). В обоих клеточных штаммах количество клеток на поздних пассажах (60–80% от максимального числа удвоений клеточной популяции, УКП) снижалось на 30–60% по сравнению с таковым на ранних пассажах (менее 60% от максимального числа УКП) [62]. СА PARP (стимулированная ДНКазой I) не зависела от клеточной линии и числа УКП, из чего авторы сделали вывод об отсутствии «возрастных» изменений уровня белка PARP-1 [62]. Однако это утверждение противоречит результатам Salminen et al., которые показали, что содержание PARP-1 катастрофически снижается на поздних пассажах в культуре диплоидных фибробластов человека [42]. Для устранения этого противоречия необходимо проведение дополнительных исследований, в которых измерялись бы оба параметра одновременно. Представляется наиболее вероятным, что активация PARP ДНКазой I в экспериментах Dell'Orco et al. имела некие методические погрешности. Это является еще одним аргументом в пользу применения для активации PARP двунитевых олигонуклеотидов в качестве источника свободных концов ДНК.

Изменения в системе поли(ADP-рибозил)ирования белков при «стационарном старении» культивируемых клеток. Как уже говорилось, при замедлении пролиферации активность PARP (а

значит, и способность реагировать на разрывы ДНК) изменяется. Эти данные особенно важны в свете того, что и при старении «по Хейфлику», и при «стационарном старении» появление «сеснесцентного» фенотипа связано с ограничением пролиферации. Поскольку популяции постмитотических или очень медленно размножающихся клеток неизбежно образуются в процессе развития и именно их наличие в организме является триггером процесса старения, то последний можно считать просто «побочным продуктом» программы развития [27, 63]. В работе Zaniolo et al. сравнивали СА PARP и экспрессию PARP-1 в ядерных фракциях до и через определенное время после достижения монослоя в первичных культурах эпителиальных клеток роговицы кролика (RCEC) и человека (HCEC), кератиноцитов кожи человека (HDK) эндотелиальных клеток из пупочной вены человека (HUVEC), гладкомышечных клеток из пупочной вены человека (HVSNC) и клеток пигментного эпителия сетчатки глаза кролика (RPE) [64]. Все клетки выращивали до состояния субмонослоя (~70% монослоя) или монослоя (100%-ный моносвой), после чего культивировали в течение 2, 4, 5, 15 сут (5% CO₂, 37 °C). При длительном пребывании в состоянии покоя после достижения состояния монослоя во всех исследованных типах культур клеток СА PARP снижалась в 2–12 раз. Кроме того, наблюдалось значительное снижение уровня белка PARP-1 после достижения монослоя.

Аналогичные результаты были получены ранее Salminen et al. на культурах диплоидных фибробластов человека [42]. Авторы наблюдали существенное уменьшение уровня белка PARP-1 при переходе клеток в состояние покоя на ранних пассажах. Было показано, что это снижение не было связано с усилением апоптоза или активацией протеолитических ферментов, расщепляющих PARP-1.

В уже упоминавшейся выше работе Spina Purrello et al. изучали влияние 36-часовой депривации сыворотки на НСА PARP в первичной культуре астроцитов головного мозга крыс, находящихся на разных стадиях роста: «молодых» («30-DIV»), «зрелых» («90-DIV») и «старых» («190-DIV») [43]. В качестве маркеров «возраста» клеток использовали белки цитоскелета: виментин, содержащийся преимущественно в незрелых астроцитах, и глиальный фибрillлярный кислый белок, составляющий основную массу белков промежуточных филаментов в зрелых астроцитах. В «молодой» культуре («30-DIV») наблюдали преимущественно экспрессию виментина, тогда как в культурах «90-DIV» и «190-DIV» – глиального фибрillлярного кислого белка. В «старых»

клетках («190-DIV») обнаруживали характерные морфологические изменения, указывающие на дегенеративные процессы в культуре. НСА PARP была сильно увеличена в «старых» клетках («190-DIV») по сравнению с этим показателем для клеток «90-DIV», что явно указывает на накопление повреждений ДНК с «возрастом».

Мы изучали изменение НСА и СА PARP на разных стадиях «стационарного старения» культуры трансформированных фибробластоподобных клеток китайского хомячка линии B11dii-FAF28, т.е. при остановке ее роста и дальнейшем пребывании в стационарной фазе при культивировании без замены среды [65]. После 9–10 сут культивирования клеток как СА, так и НСА PARP снижались практически до нуля. Так, снижение СА в 2,5 раза наблюдалось после 5 сут культивирования, т.е. после перехода культуры в стационарную фазу роста. К 10-суточному «возрасту» СА PARP снижалась почти в 10 раз, а к 13-суточному уже достоверно не обнаруживалась [65]. При этом число живых (не окрашивающихся трипановым синим) клеток снижалось лишь чуть ниже 50%. Таким образом, как в экспериментах *in vivo* (см. ранее), так и на модели «стационарного старения» клеток было продемонстрировано, что СА PARP снижается с возрастом.

Кроме того, нами было показано, что в культуре клеток китайского хомячка происходит уменьшение количества прикрепленных клеток, а среди удерживающихся на ростовой поверхности увеличивается процентное содержание мертвых, выявляемых методом окрашивания трипановым синим (с 3% на 5-е сут до 50% после 10 сут культивирования). Кроме того, наблюдалось изменение состояния культуральной среды: снижался pH, появлялся дебрис. Такие «экзогенные» процессы могут играть заметную роль в старении, хотя их роль и не стоит переоценивать. Ранее мы показали, что с увеличением «возраста» культуральной среды (0–24 сут) при «стационарном старении» происходит снижение на 30–40% ее способности стимулировать пролиферацию «молодых» клеток. Это не может целиком объяснить явление «стационарного старения», т.к. даже для самой «старой» (24 сут) среды индекс мечения (вычисляемый как процент клеток, ядра которых метятся за время пребывания в среде с [³H]-тимидином) составил 65%, тогда как для «молодой» (3 сут) – 100% [66]. На основании полученных результатов был сделан вывод о том, что в основе феномена «стационарного старения» культивируемых клеток лежат именно внутренние факторы.

Суммируя полученные нами и имеющиеся в литературе данные, можно предположить, что активность PARP и жизнеспособность клеточ-

ной культуры – это два тесно связанных между собой параметра. Снижение жизнеспособности клеточной культуры с «возрастом» сопровождается активизацией процессов клеточной гибели, которые могут вызывать снижение активности PARP. И наоборот – постепенное повышение уровня поли(АДР-рибозил)ирования белков, вызванное увеличением уровня повреждения ДНК, может приводить к снижению жизнеспособности клетки путем регуляции активности факторов, вовлеченных в процессы транскрипции, а также усиления сигналов, запускающих процессы гибели клетки.

Как уже говорилось ранее, со снижением скорости пролиферации происходит накопление дефектов биологических макромолекул, в т.ч. и ДНК. Идея о повреждении ДНК как главной причине деградации организма с возрастом лежит в основе многих концепций старения, в частности, свободнорадикальной теории Хармана [67]. В этой связи ряд авторов обратил внимание на то, что нагрузка на системы, выступающие в качестве своеобразных «сенсоров» повреждений ДНК, также повышается с возрастом, и для их корректной работы требуется увеличение их количества или активности [68, 69]. К таким «сенсорам» повреждений ДНК, безусловно, относится и система поли(АДР-рибозил)ирования. Как следует из опубликованных в литературе данных, одной из причин накопления макромолекулярных повреждений в клетке может быть снижение активности ферментов, отвечающих за расщепление PAR, что, в свою очередь, приводит к накоплению поли(АДФ-рибозил)ированных белков, включая и сами PARP. В этой связи накопление PAR-модифицированных белков сопутствует старению.

Таким образом, складывается впечатление, что активность PARP коррелирует как с видовой ПЖ (с обнаружения чего и начались активные исследования PARP), так и с возрастом животных, а также с длительностью культивирования клеток при «стационарном» и репликативном старении. Однако говорить о какой-либо существенной связи между поли(АДФ-рибозил)ированием и механизмами, лежащими в основе возрастного увеличения вероятности гибели, преждевременно, тогда как участие его в механизмах непосредственно клеточной гибели в настоящий момент очевидно. В то же время накоплено много данных, свидетельствующих о том, что активация PARP усиливает тяжесть заболевания при самых различных патологиях (ишемический инсульт, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, сахарный диабет, псориаз и др.) [70–72].

В целом, в ранний период жизни, наблюдается снижение СА PARP, что сопровождается за-

медлением пролиферации и активацией процессов дифференцировки клеток. При действии митогенов НСА PARP увеличивается (по СА PARP недостаточно данных). Таким образом, активность PARP в клетке как *in vivo*, так и *in vitro*, вероятно, регулируется не только действием внешних и внутренних ДНК-повреждающих агентов, но и факторами, влияющими на пролиферацию, включая межклеточные взаимодействия и действие митогенов. В процессе старения организма СА PARP неуклонно падает. Можно предположить, что накопление атомодифицированной PARP является одной из причин такого снижения. Это ухудшает способность PARP реагировать на вновь возникающие повреждения ДНК и приводит к уменьшению эффективности reparации этих повреждений. С этой точки зрения определение в стареющих биологических системах активности PARP, отслеживающих появление разрывов ДНК, в качестве возможного показателя способности клеток к нормальному функционированию, представляется весьма информативным. Что касается НСА PARP, то при ограничении пролиферации она снижается, видимо, вследствие компактизации хроматина и уменьшения доли доступной для PARP ДНК, а затем растет до определенного уровня из-за накопления повреждений ДНК в процессе старения. Это сопровождается накоплением с возрастом поли(АДФ-рибозил)ированных белков (включая и сами PARP), функционирование которых вследствие такой модификации частично или полностью нарушено.

Однако затем «цена» реагирования на повреждения ДНК становится «непомерно высокой» для клеток стареющего организма (т.к. при этом затрачивается большое количество NAD и ATP). Вследствие этого клетка постепенно утрачивает свою способность к синтезу PAR (видимо, не только за счет снижения экспрессии ферmenta, но и за счет перевода его в неактивную форму с помощью различных посттрансляционных модификаций и, возможно, уменьшения активности ферментов, расщепляющих этот полимер). Это косвенно подтверждается тем фактом, что СА PARP (т.е. фактически общее количество способного к активации ферmenta) неуклонно снижается с возрастом как *in vitro*, так и *in vivo*. Соответственно, данные о «возрастных» изменениях СА и НСА PARP на моделях репликативного и «стационарного» старения могут свидетельствовать в пользу того, что сходные изменения в клетках стареющего организма определяются, по крайней мере частично, изменением пролиферативного статуса клеток, а не, например, генетической программой старения.

Сходство изменений системы поли(АДФ-рибозил)ирования при старении и ограничении клеточной пролиферации (как *in vivo*, так и в модельных системах) может служить еще одним доказательством жизнеспособности концепции, согласно которой ограничение пролиферации является главной причиной накопления в клетках макромолекулярных возрастных изменений, в дальнейшем через цепь различных событий,

приводящих к увеличению вероятности смерти организма, т.е. к старению [27, 73]. Однако надо также иметь в виду, что сам процесс ограничения пролиферации, даже вне связи с последующим накоплением макромолекулярных повреждений, может приводить к изменениям состояния клеток (интенсивности метаболизма и т.д.), что, в свою очередь, может влиять на параметры системы поли(АДФ-рибозил)ирования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Shilovsky, G.A., Khokhlov, A.N., and Shram, S.I. (2013) The protein poly(ADP-ribosylation) system: Its role in genome stability and lifespan determination, *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 433–444.
- Bizec, J.C., Klethi, J., and Mandel, P. (1989) Regulation of protein adenosine diphosphate ribosylation in bovine lens during aging, *Ophthalmic Res.*, **21**, 175–183.
- Mandel, P. (1991) ADP-ribosylation: approach to molecular basis of aging, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **296**, 329–343.
- Schroder, H.C., Steffen, R., Wenger, R., Ugarkovic, D., and Muller, W.E. (1989) Age-dependent increase of DNA topoisomerase II activity in quail oviduct; modulation of the nuclear matrix-associated enzyme activity by protein phosphorylation and poly(ADP-ribosylation), *Mutat. Res.*, **219**, 283–294.
- Quesada, P., Faraone-Mennella, M.R., Jones, R., Malanga, M., and Farina, B. (1990) ADP-ribosylation of nuclear proteins in rat ventral prostate during ageing, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **170**, 900–907.
- Grube, K., and Burkle, A. (1992) Poly(ADP-ribose) polymerase in mononuclear leukocytes of 13 mammalian species correlates with species-specific life span, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 11759–11763.
- Mishra, S.K., and Das, B.R. (1992) (ADP-ribosylation) pattern of chromosomal proteins during ageing, *Cell. Mol. Biol.*, **38**, 457–462.
- Messripour, M., Weltin, D., Rastegar, A., Ciesielski, L., Kopp, P., Chabert, M.D., and Mandel, P. (1994) Age-associated changes of rat brain neuronal and astroglial poly(ADP-ribose) polymerase activity, *J. Neurochem.*, **62**, 502–506.
- Strosznajder, J.B., Jesko, H., and Strosznajder, R.P. (2000b) Age-related alteration of poly(ADP-ribose) polymerase activity in different parts of the brain, *Acta Biochim. Pol.*, **47**, 331–337.
- Ушакова Т.Е., Плосконосова И.И., Гуляева Н.А., Рассказова Е.А., Газиев А.И. (2004) АДФ-рибозилирование белков в ядрах и митохондриях из тканей крыс разного возраста после воздействия γ -излучения, *Радиц. биол. радиоэкол.*, **44**, 509–525.
- Strosznajder, R.P., Jesko, H., and Adamczyk, A. (2005) Effect of aging and oxidative/genotoxic stress on poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity in rat brain, *Acta Biochim. Pol.*, **52**, 909–914.
- Braidy, N., Guillemin, G.J., Mansour, H., Chan-Ling, T., Poljak, A., and Grant, R. (2011) Age related changes in NAD⁺ metabolism oxidative stress and Sirt1 activity in Wistar rats, *PLoS One*, **6**, 191–194.
- Kanungo, M. (1980) *Biochemistry of Aging*, Academic Press, London.
- Mocchegiani, E. (2007) Zinc and ageing: third Zincage conference, *Immun. Ageing*, **4**, 5.
- Kunzmann, A., Dedoussis, G., Jajte, J., Malavolta, M., Mocchegiani, E., and Burkle, A. (2008) Effect of zinc on cellular poly(ADP-ribosylation) capacity, *Exp. Gerontol.*, **43**, 409–414.
- Zaremba, T., Thomas, H.D., Cole, M., Coulthard, S.A., Plummer, E.R., and Curtin, N.J. (2011) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) pharmacogenetics, activity and expression analysis in cancer patients and healthy volunteers, *Biochem. J.*, **436**, 671–679.
- Краснов М.С., Гурмизов Е.П., Ямкова В.П., Гундорова Р.А., Ямков И.А. (2005) Исследование влияния регуляторного белка, выделенного из хрусталика глаза быка, на катарктогенез у крыс *in vitro*, *Вестн. офтальмол.*, **121**, 37–39.
- Strosznajder, J.B., Jesko, H., and Strosznajder, R.P. (2000a) Effect of amyloid beta peptide on poly(ADP-ribose) polymerase activity in adult and aged rat hippocampus, *Acta Biochim. Pol.*, **47**, 847–854.
- Malanga, M., Romano, M., Ferone, A., Petrella, A., Monti, G., Jones, R., Limatola, E., and Farina, B. (2005) Misregulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity and cell type-specific loss of poly(ADP-ribose) synthesis in the cerebellum of aged rats, *J. Neurochem.*, **93**, 1000–1009.
- Thakur, M.K., and Prasad, S. (1990) ADP-ribosylation of HMG proteins and its modulation by different effectors in the liver of aging rats, *Mech. Ageing Dev.*, **53**, 91–100.
- Massudi, H., Grant, R., Braidy, N., Guest, J., Farnsworth, B., and Guillemin, G.J. (2012) Age-associated changes in oxidative stress and NAD⁺ metabolism in human tissue, *PLoS One*, **7**, e42357.
- O'Valle, F., Del Moral, R.G., Benitez, M.C., Martin-Oliva, D., Gomez-Morales, M., Aguilar, D., Aneiros-Fernandez, J., Hernandez-Cortes, P., Osuna, A., Moreso, F., Seron, D., Oliver, F.J., and Del Moral, R.G. (2004) Correlation of morphological findings with functional reserve in the aging donor: role of the poly (ADP-ribose) polymerase, *Transplant. Proc.*, **36**, 733–735.
- Khokhlov, A.N. (2010b) From Carrel to Hayflick and back, or what we got from the 100-year cytogerontological studies, *Biophysics*, **55**, 859–864.
- Khokhlov, A.N., and Morgunova, G.V. (2017) Testing of geroprotectors in experiments on cell cultures: pros and cons, in *Anti-aging Drugs: From Basic Research to Clinical Practice*, RSC Drug Discovery (Vaiserman, A.M., ed.), Royal Society of Chemistry, pp. 53–74.
- Comfort, A. (1979) *The Biology of Senescence*, Churchill Livingstone, Edinburgh and London.
- Khokhlov, A.N. (2010a) Does aging need an own program or the existing development program is more than enough, *Russ. J. Gen. Chem.*, **80**, 1507–1513.
- Khokhlov, A.N. (2013b) Impairment of regeneration in aging: appropriateness or stochastics? *Biogerontology*, **14**, 703–708.

28. Khokhlov, A.N., Klebanov, A.A., Karmushakov, A.F., Shilovsky, G.A., Nasonov, M.M., and Morgunova, G.V. (2014) Testing of geroprotectors in experiments on cell cultures: choosing the correct model system, *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.*, **69**, 10–14.
29. Dell'Orco, R.T. (1975) The use of arrested populations of human diploid fibroblasts for the study of senescence *in vitro*, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **53**, 41–49.
30. Ворсанова С.Г. (1977) Стационарные клеточные популяции как модель старения, в сб. *Геронтология и гериатрия, 1977. Ежегодник*, Ин-т геронтологии, Киев, с. 118–123.
31. Хохлов А.Н. (1988) Пролиферация и старение, в сер. «Общие проблемы физико-химической биологии» (*Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР*), Т. 9, ВИНТИ, Москва.
32. Petrov, Yu.P., and Tsupkina, N.V. (2013) Growth characteristics of CHO cells in culture, *Cell Tiss. Biol.*, **7**, 72–78.
33. Khokhlov, A.N. (2013d) Decline in regeneration during aging: appropriateness or stochastics? *Russ. J. Dev. Biol.*, **44**, 336–341.
34. Khokhlov, A.N. (2014) On the immortal hydra. Again, *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.*, **69**, 153–157.
35. Khokhlov, A.N. (2013a) Does aging need its own program, or is the program of development quite sufficient for it? Stationary cell cultures as a tool to search for anti-aging factors, *Curr. Aging Sci.*, **6**, 14–20.
36. Wei L., Li Y., He, J., and Khokhlov, A.N. (2012) Teaching the cell biology of aging at the Harbin Institute of Technology and Moscow State University, *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.*, **67**, 13–16.
37. Morgunova, G.V., Klebanov, A.A., and Khokhlov, A.N. (2016) Some remarks on the relationship between autophagy, cell aging, and cell proliferation restriction, *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.*, **71**, 207–211.
38. Burkle, A., Muller, M., Wolf, I., and Kupper, J.-H. (1994) Poly(ADP-ribose) polymerase activity in intact or permeabilized leukocytes from mammalian species of different longevity, *Mol. Cell. Biochem.*, **138**, 85–90.
39. Hart, R.W., and Setlow, R.B. (1974) Correlation between deoxyribonucleic acid excision-repair and life-span in a number of mammalian species, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 2169–2173.
40. Sweigert, S.E., Marston, J.M., and Dethlefsen, L.A. (1990) Poly(ADP-ribose) metabolism in proliferating versus quiescent cells and its relationship to their radiation responses, *Int. J. Radiat. Biol.*, **58**, 111–123.
41. Kun, E., Kirsten, E., Bauer, P.I., and Ordahl, C.P. (2006) Quantitative correlation between cellular proliferation and nuclear poly (ADP-ribose) polymerase (PARP-1), *Int. J. Mol. Med.*, **17**, 293–300.
42. Salminen, A., Helenius, M., Lahtinen, T., Korhonen, P., Tapiola, T., Soininen, H., and Solovyan, V. (1997) Down-regulation of Ku autoantigen, DNA-dependent protein kinase, and poly(ADP-ribose) polymerase during cellular senescence, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **38**, 712–716.
43. Spina Purrello, V., Cormaci, G., Denaro, L., Reale, S., Costa, A., Lalicata, C., Sabbatini, M., Marchetti, B., and Avola, R. (2002) Effect of growth factors on nuclear and mitochondrial ADP-ribosylation processes during astroglial cell development and aging in culture, *Mech. Ageing Dev.*, **123**, 511–520.
44. Tanigawa, Y., Kawamura, M., Kitamura, A., and Shimoyama, M. (1978) Suppression and stimulation of DNA synthesis by ADP-ribosylation of nuclear proteins from adult hen and chick embryo liver, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **81**, 1278–1285.
45. Porteous, J.W., Furneaux, H.M., Pearson, C.K., Lake, C.M., and Morrison, A. (1979) Poly(adenosine diphosphate ribose) synthetase activity in nuclei of dividing and of non-dividing but differentiating intestinal epithelial cells, *Biochem. J.*, **180**, 455–461.
46. Rastl, E., and Swetly, P. (1978) Expression of poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase activity in erythroleukemic mouse cells during cell cycle and erythropoietic differentiation, *J. Biol. Chem.*, **253**, 4333–4340.
47. Muller, W.E., Totsuka, A., Nusser, I., Obermeier, J., Rhode, H.J., and Zahn, R.K. (1974) Poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase in quail oviduct. Changes during estrogen and progesterone induction, *Nucleic Acids Res.*, **1**, 1317–1327.
48. Quesada, P., Farina, B., and Jones, R. (1989) Poly(ADP-ribosylation) of nuclear proteins in rat testis correlates with active spermatogenesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1007**, 167–175.
49. Quesada, P., Atorino, L., Cardone, A., Ciarcia, G., and Farina, B. (1996) Poly(ADP-ribosyl)ation system in rat germinal cells at different stages of differentiation, *Exp. Cell Res.*, **226**, 183–190.
50. Shambaugh, G.E., III, Koehler, R.R., and Radosevich, J.A. (1988) Developmental pattern of poly (ADP-ribose) synthetase and NAD glycohydrolase in the brain of the fetal and neonatal rat, *Neurochem. Res.*, **13**, 973–981.
51. Jackowski, G., and Kun, E. (1981) Age-dependent variation of rates of polyadenosine-diphosphoribose synthesis by cardiocyte nuclei and the lack of correlation of enzymatic activity with macromolecular size distribution of DNA, *J. Biol. Chem.*, **256**, 3667–3670.
52. Hayflick, L. (1976) The cell biology of human aging, *N. Engl. J. Med.*, **295**, 1302–1308.
53. Kennedy, B.K., Austriaco, N.R., Jr., and Guarante, L. (1994) Daughter cells of *Saccharomyces cerevisiae* from old mothers display a reduced life span, *J. Cell Biol.*, **127**, 1985–1993.
54. Knorre, D.A., Kulemzina, I.A., Sorokin, M.I., Kochmak, S.A., Bocharova N.A., Sokolov, S.S., and Severin, F.F. (2010) Sir2-dependent daughter-to-mother transport of the damaged proteins in yeast is required to prevent high stress sensitivity of the daughters, *Cell Cycle*, **9**, 4501–4505.
55. Sorokin, M.I., Knorre, D.A., and Severin, F.F. (2014) Early manifestations of replicative aging in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Microb. Cell*, **1**, 37–42.
56. Nagarajan, S., Kruckeberg, A.L., Schmidt, K.H., Kroll, E., Hamilton, M., McInerney, K., Summers, R., Taylor, T., and Rosenzweig, F. (2014) Uncoupling reproduction from metabolism extends chronological lifespan in yeast, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 1538–1547.
57. Chen, Q., Ding, Q., and Keller, J.N. (2005) The stationary phase model of aging in yeast for the study of oxidative stress and age-related neurodegeneration, *Biogerontology*, **6**, 1–13.
58. Morgunova, G.V., Klebanov, A.A., Marotta, F., and Khokhlov, A.N. (2017) Culture medium pH and stationary phase/chronological aging of different cells, *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.*, **72**, 47–51.
59. Gensler, H.L., and Bernstein, H. (1981) DNA damage as the primary cause of aging, *Q. Rev. Biol.*, **56**, 279–303.
60. Хохлов А.Н., Кирнос М.Д., Ванюшин Б.Ф. (1988) Уровень метилирования ДНК и «стационарное старение» культивируемых клеток, *Изв. АН СССР. Сер. Биол.*, **3**, 476–478.
61. Vilenchik, M.M., Khokhlov, A.N., and Grinberg, K.N. (1981) Study of spontaneous DNA lesions and DNA repair in human diploid fibroblasts aged *in vitro* and *in vivo*, *Stud. Biophys.*, **85**, 53–54.
62. Dell'Orco, R.T., and Anderson, L.E. (1991) Decline of poly(ADP-ribosyl)ation during *in vitro* senescence in human diploid fibroblasts, *J. Cell. Physiol.*, **146**, 216–221.
63. Holliday, R. (2007) *Aging: The Paradox of Life: Why We Age*, Springer, Dordrecht.

64. Zaniolo, K., Rufiange, A., Leclerc, S., Desnoyers, S., and Guerin, S.L. (2005) Regulation of the PARP-1 gene expression by the transcription factors Sp1 and Sp3 is under the influence of cell density in primary cultured cells, *Biochem. J.*, **389**, 423–433.
65. Shram, S.I., Shilovsky, G.A., and Khokhlov, A.N. (2006) Poly(ADP-ribose)-polymerase-1 and aging: experimental study of possible relationship on stationary cell cultures, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **141**, 628–632.
66. Хохлов А.Н., Прохоров Л.Ю., Акимов С.С., Шиловский Г.А., Щеглова М.В., Сорока А.Е. (2005) «Стационарное старение» клеточных культур: попытка оценки влияния «возраста» среды, *Цитология*, **47**, 318–322.
67. Harman, D. (1956) Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry, *J. Gerontol.*, **11**, 298–300.
68. Акифьев А.П., Потапенко А.И. (2001) Ядерный генетический материал как инициальный субстрат старения животных, *Генетика*, **37**, 1445–1458.
69. Анисимов В.Н. (2008) *Молекулярные и физиологические механизмы старения*, Наука, СПб.
70. D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I., and Poirier, G.G. (1999) Poly(ADP-ribosylation) reactions in the regulation of nuclear functions, *Biochem. J.*, **342**, 249–268.
71. Cuzzocrea, S., McDonald, M.C., Mazzon, E., Dugo, L., Serraino, I., Threadgill, M., Caputi, A.P., and Thiemermann, C. (2002) Effects of 5-aminoisoquinolinone, a water-soluble, potent inhibitor of the activity of poly(ADP-ribose) polymerase, in a rodent model of lung injury, *Biochem. Pharmacol.*, **63**, 293–304.
72. Rouleau, M., Patel, A., Hendzel, M.J., Kaufmann, S.H., and Poirier, G.G. (2010) PARP inhibition: PARP1 and beyond, *Nat. Rev. Cancer*, **10**, 293–301.
73. Khokhlov, A.N. (2013c) Evolution of the term «cellular senescence» and its impact on the current cytogerontological research, *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.*, **68**, 158–161.

PROTEIN POLY(ADP-RIBOSYL)ATION SYSTEM: CHANGES IN DEVELOPMENT AND AGING AS WELL AS DUE TO CELL PROLIFERATION RESTRICTION

**G. A. Shilovsky¹, S. I. Shram², G. V. Morgunova¹,
and A. N. Khokhlov^{1*}**

¹ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology,
119991 Moscow, Russia; E-mail: khokhlov@mail.bio.msu.ru

² Institute of Molecular Genetics, Russian Academy
of Sciences, 123182 Moscow, Russia

Received August 9, 2017
Revision received September 13, 2017

The number of dividing cells in an organism decreases with age. The average rate of cell divisions in various tissues and organs of the whole organism sharply decreases, which is probably a trigger for the accumulation of damage leading to breaking of genome integrity. This can lead to the development of many age-related diseases and the appearance of phenotypic and physiological signs of aging. Because of this, the protein poly(ADP-ribosylation) system, which is activated in response to the appearance of various DNA damages, is of great interest. This review summarizes and analyzes data on changes in the poly(ADP-ribosylation) system during development, *in vivo* and *in vitro* aging, and due to cell proliferation restriction. Special attention is given to methodological aspects of determining the activity poly(ADP-ribose) polymerases (PARP). Analysis of relevant publications and our own data led us to the conclusion that PARP activity under conditions of addition of free DNA ends (in this review referred to as stimulated PARP activity) steadily decreases with age. At the same time, the dynamics of PARP activity, measured in the absence of additional enzyme activation (in this review referred to as unstimulated activity), does not have such a clear trend: in many studies, the presented differences are statistically non-significant, although it is precisely known that with aging the number of unrepaired DNA damages steadily increases. Apparently, the cell has additional regulatory systems that limit its own ability to respond to DNA damage. Special attention is given to the effect of the proliferative status of the cell on PARP activity. We systematized and analyzed data on changes in PARP activity during development and aging of the organism, as well as on the differences in the dynamics of this activity in the presence/absence of additional stimulation and on what cellular processes are associated with the activation of this enzyme. In addition, the data obtained using different cellular aging models are compared.

Keywords: DNA damage, poly(ADP-ribosylation), poly(ADP-ribose) polymerases, genome stability, stationary phase aging, replicative aging, cell proliferation