Содержание

Глава 1.

Теоретический метод изучения старения……………….……………......…7

1.1. История теоретического метода……………….……………….......7

1.2. Методология познания – смена парадигмы………………….......…12

1.2.1. Три общих метода познания……………………………….....12

1.2.2. Системный подход – современная методология познания…..…....13

1.3. Старение как глобальный феномен……………………………...…14

1.4. Сущностное определение и причина старения…………………...…20

1.5. Единая системная теория старения…………………………...…25

Глава 2.

Математическое моделирование как метод изучения старения…...32

2.1. Теоретическое моделирование старения……………………………32

2.1.1. Значение теоретических моделей для изучения старения………..32

2.1.2. Основные глобальные механизмы старения……………………..34

2.1.3. Моделирование основных глобальных механизмов старения…..…39

2.2. Модели саморегуляции клеточного роста в исследовании старения.49

2.2.1. Самоорганизация клеточных систем как основа эволюции…...…49

2.2.2. Концепция новой регуляторной системы организма………………59

2.2.3. Новая иммуно-регуляторная теория старения……………….....67

Глава 3.

Естественные модели изучения старения……………………………....72

3.1. Соматические заболевания как модели изучения старения………....72

3.2. СХУ – естественная модель старения, исследования средств геропрофилактики…………………………………………………...73

3.3. Использование простейших для моделирования старения……..…....78

3.4. Различные организмы и модели старения……………………….....81

3.5. Рост, развитие и продолжительность жизни………………………87

Глава 4.
Популяционные методы исследования старения…….…….95
4.1. Значение метода наблюдения в геронтологии……..……...95
4.2. Популяционные методы исследования старения……..…95
4.2.1. История и сущность статистических методов в геронтологии...95
4.2.2. Исследование возрастной смертности…….....98
4.2.3. Использование формулы Гомперца……..…..102
4.3. Биологический возраст: понятие и сущность…….....…107

Глава 5.
Генетические методы изучения старения……117
5.1. Направления в генетике старения……..117
5.2. Исследование долгожительства…….119
5.3. Прогерии – наследственное ускоренное старение…….120
5.4. Линии животных и продолжительность жизни……..125
5.5. Нокаут генов и трансгенные мыши……....126
5.5.1. Метод нокаута генов……126
5.5.2. Нокаутные мыши - значение для геронтологии……..127

Глава 6.
Морфологические методы изучения старения……130
6.1. Уровни проявления старения…….…...130
6.2. Морфологические критерии старения……..…..134
6.2.1. Общие проявления старения тканей…….…...134
6.2.2. Общеморфологические методы изучения старения……..….136

Глава 7.
Методы изучения старения клетки……..143
7.1. Общие проявления старения клетки……...……143
7.2. Апоптоз клеток и старение…….……144
7.3. Старение и клточноая пролиферация……..…...…148
7.3.1. Стимуляторы и ингибиторы пролиферации клеток……..……148
7.3.2. Снижение самообновления клеток в старости……..……154
7.3.3. Репликативное старение клеток…….....……156
7.4. Стволовые клетки……...……..162
7.5. Внутриклеточные изменения при старении…….……166

7.5.1. Кислотность внутриклеточной среды……...166
7.5.2. Изменения митохондрий при старении…….....168
7.5.3. Свободный кальций в цитоплазме клеток……...174
7.5.4. Изменения лизосом при старении……....…178
7.5.5. Реактивность клеток и старение……180
7.5.6. Старение ядра клетки……..……...….....189
7.5.7. Мембранный потенциал и старение…….…..……194
7.5.8. Микровязкость мембран клеток…….....…195
7.5.9. Электрокинетические свойства ядер…….……..…199
7.5.10. Методы гистоморфологии……..…202

Глава 8.
Физиологические методы изучения старения…….……...…...211
8.1. Виртуальные приборы для научных исследований……..…211
8.2. Диагностика общего состояния животных……...…216
8.2.1. Общие показатели…….....…216
8.2.2. Физическая сила…….…….……217
8.2.3. Морфологические показатели…….……..……220
8.2.4. Общая реактивность…….……220
8.2.5. Ростовой потенциал тканей…….……223
8.2.6. Методы оценки возрастного остеопороза……..……225
8.2.7. Старение соединительной ткани…….……..……..232
8.2.8. Изменение содержания воды в организме……..……..235
8.2.9. Старение иммунной системы……..……236
8.2.10. Методы парабиоза, удаления, пересадки и подсадки органов.…248
8.3. Другие физиологические показатели……...…251

Глава 9.
Биохимические методы изучения старения……..…253
9.1. Изменения хроматина при старении…….……..…253
9.2. Белковый обмен и ферменты……...…265
9.3. Изменения отдельных белков при старении……...…269
9.4. Углеводный обмен и старение……..…270
9.5. Обмен липидов и старение……..……..…271
9.6. Энергетический обмен и старение…….……..…273
9.7. Антиоксидантная система и старение…….…….……276

Глава 10.
Другие методы изучения старения……..…….……..…295
10.1. Изучение кристаллизации сыворотки крови……295
10.2. Изучение корреляционных связей биомаркеров……..……295
10.3. Скорость распространения пульсовой волны……....…….297
10.4. Неинвазивная оценка старения кожи…….…..297

Заключение…….……299

Приложения……306

Библиография……...…..314

Глава 1.
Теоретический метод изучения старения

1.1. История теоретического метода

Старение живых организмов трудно изучать в рамках одной дисциплины, поэтому исследование этого сложнейшего процесса ведется в разных областях науки: биохимии, молекулярной биологии, генетики, демографии, математики, медицины и социологии [3-5, 17, 18, 28, 30, 36-39, 42, 46-55, 74, 76-83, 100-105, 139, 147, 149, 163, 164].

Общие вопросы биологии старения и особенности проявления старения у различных организмов в эволюции рассмотрены, например, в обзорах [163, 164, 178, 198, 219, 221, 244, 278, 299].

Метод теоретического рассмотрения вопроса является более ранним, чем экспериментальный, и не менее важным, а в ряде случаев даже единственно возможным для получения информации о наиболее общих законах, причинах и сущности явления.

Геронтология изучает возрастную динамику жизнеспособности организма человека, проявления старения на всех иерархических уровнях – от молекул и клеток до систем органов и целостного организма, факторы, оказывающие влияние на жизнеспособность, статистические закономерности, характеризующие возрастные изменения смертности в популяциях и в отдельных группах населения, имеющие те или иные различия связанные с полом, профессией, этническими особенностями и т.п., а также методы диагностики старения целостного организма, его органов, систем, клеток и матболизма и возможности и способы воздействия на старение с целью его замедления и обращения.

Это означает, что геронтология имеет дело со сложными и сверхсложными системами и поэтому не может обходиться без построения соответствующих математических моделей, создаваемых на основе имеющихся знаний, гипотез, достаточно обоснованных допущений и постулатов.

При этом математический аппарат, используемый при построении моделей, весьма разнообразен и включает в себя методы, характерные для физиологических, биохимических, молекулярно-биологических, экологи-

ческих, генетических исследований, А также математического моделирования и теоретических исследований. Этот математический аппарат создавался на протяжении столетий, во многих случаях его формирование происходило под влиянием потребностей именно биологии и более того – при активном участии биологов и врачей.

Применение математики в биологии имеет свою историю, которая показывает как возникал интерес к биологии у самих математиков и как биологи постепенно приходили к выводу, что их дальнейшие серьезные исследования невозможны без использования математических методов [82].

В середине XVIII века начинает быстро развиваться практика измерения различных биологических объектов. В частности, француз И.Буржеля разработал принципы того, как путем измерения определенных показателей экстерьера лошади оценить степень ее пригодности к различным видам использования; одновременно развивается военная антропометрия, с помощью которой проводятся массовые измерения юношей-призывников для отбора среди них гвардейцев и сортировки остальных для несения различных видов воинской службы.

В 1825 г. английский специалист по страхованию жизни Б. Гомперц впервые предложил выведенную им формулу, характеризующую зависимость смертности людей от возраста. Позднее оказалось, что эта формула в достаточной мере применима к любым видам животных, а использованный Гомперцом показатель интенсивность смертности однозначно связан с вероятностью дожития особи до того или иного возраста.

Начиная с 1835 г. появляются работы бельгийского антрополога А.Кетле, посвященные статистическим исследованиям и математическому анализу физических и психических особенностей людей. Под влиянием работ Кетле английский антрополог Ф.Гальтон применил статистические методы при исследовании наследственности и изменчивости, а также разработал методы корреляционного и регрессионного анализа, являющиеся основой современной математической статистики. Ученик Гальтона английский биолог К.Пирсон еще дальше продвинул математическую статистику. Основываясь именно на потребностях биологической науки, он ввел понятие среднего квадратического отклонения, разработал метод проверки достоверности расхождения между ожидаемыми и реально полученными закономерностями и многие другие методы, нашедшие при-

менение не только в биологии, но и в физике, метеорологии, инженерном деле и т.д. Еще раньше, одновременно с началом деятельности Гальтона, австрийским ботаником-монахом Г.Менделем был совершен поистине научный подвиг – открыты статистические закономерности наследования качественных признаков, на которые сначала не обратили внимания, а затем открыли заново через 40 лет, что составило основу классической генетики.

Замечательным вкладом в математическую статистику ознаменовались работы английского генетика Р.Фишера, соединявшего в себе биолога-экспериментатора и математика. Фишер разработал метод дисперсионного анализа и заложил основы методологии математического планирования эксперимента.

В 1926 г. российский генетик С.Четвериков, основываясь на методах математической статистики, заложил основы популяционной генетики.

В настоящее время весь мощный аппарат математической статистики и теории вероятностей используется как в экспериментальной геронтологии, так и при построении геронтологических моделей.

Развитие **теории сложных систем** и применение ее к биологическим объектам происходили вполне независимо от развития и применения вероятностно-статистических методов. Первоначальные системные представления об организме не имели под собой никакой математической основы и отличались метафизичностью. Так, в XVII веке один из основателей теории преформизма швейцарский естествоиспытатель Ш.Бонне писал по поводу устройства организма: «Все части, составляющие тело, настолько непосредственно, многопричинно и многообразно связаны друг с другом в области своих функций, что они неотделимы друг от друга... Артерии предполагают наличие вен, функции как тех, так и других предполагают наличие нервов, они в свою очередь наличие мозга и сердца. Каждое условие порождает целый ряд других условий».

Эти начальные системные представления об организме продолжали развиваться на протяжении всего периода бурного развития описательной биологии. Так, основатель «механики развития» немецкий эмбриолог В.Ру настойчиво продвигал представления о жесткой взаимосвязи и взаимо-лиянии всех элементов развивающегося организма, доказывая, что именно эти взаимовлияния являются движущими силами развития. Процесс развития очень сложен и динамичен – одни структуры сменяются другими,

уровень клеточной дифференцировки непрерывно возрастает, влияние одних клеточных масс на развитие других изменяется под влиянием управляющих воздействий, причем развитие органов и систем происходит отнюдь не синхронно, а своеобразными рывками.

Эти закономерности развития предопределили возможность и эффективность его математического описания с помощью теории графов – раздела математики, отдельными задачами которого занимался еще Л.Эйлер в конце XVIII века. Основная терминология теории графов была разработана лишь к 1936 г. трудами немецкого математика Д.Кенига, и только после этого началось ее бурное развитие и применение, в основном в экономике и организации производства. Для геронтологии перспектива моделирования с помощью теории графов определяется тем, что старение можно полагать естественным этапом онтогенеза, в котором функциональное ослабление одних органов предопределяет функциональное ослабление других, причем, так же как и процесс развития, старение органов и систем происходит неравномерно.

Теорию сложных систем обычно тесно связывают с понятием «кибернетика», обозначающим науку об управлении в технике, обществе и биологии. Ее создали, видимо, в первой половине XIX века практически одновременно французский физик А.Ампер, который под кибернетикой подразумевал науку об управлении государством, и польский философ Б.Трентовский, называвший кибернетикой искусство управления народом. Отсутствие необходимого для развития кибернетики математического аппарата предопределило ее долгое забвение, продолжавшееся больше 100 лет. Только в 1948 году американский математик Н.Винер сделал следующий шаг – сформулировал проблему оптимального управления сложными системами, возродив понятие «кибернетика». В биологии основы кибернетики были заложены и развиты как теория функциональных систем еще до Н.Винера отечественным ученым – академиком П.К.Анохиным.

В 1868 г. английский физик-теоретик Д.Максвелл впервые сформулировал понятие о регуляторе, положив тем самым начало теории автоматического регулирования, которая легла в основу расчета технических управляющих систем и исследования сложных систем в живой и неживой природе. В первой четверти XX века в оригинальных работах русского физиолога А.Белова впервые были описаны отрицательные и положительные обратные связи в биологических системах. Эти связи Белов назы-

вал соответственно «плюс-минус» и «плюс-плюс» взаимодействиями. В дальнейшем выяснилось, что отрицательные обратные связи являются необходимым механизмом стабилизации не только в биологических, но и в любых других системах, а положительные обратные связи – необходимым механизмом развития систем.

В это же время русский врач и философ А.Богданов ввел в науку понятие «уровень организации», рассмотрел связь этого уровня с изменением и усложнением свойств системы, сделал серьезную попытку исследования причин кризисных явлений в системах. Оказалось, что кризисные явления вызваны переходными процессами в системах, причем в течение переходного процесса даже весьма кратковременные изменения в системах могут быть настолько значительными, что вызывают их гибель или приводят к появлению новых систем и новых признаков системы.

В конце 20-х годов XX века итальянский математик В.Вольтерра создал основы математической теории борьбы за существование, явившейся первым и очень существенным вкладом математики в экологию. В дальнейшем эта теория быстро переросла в более широкую «теорию гибели и размножения», в которой применяются как детерминистские, так и вероятностные модели, в том числе так называемые марковские модели.

Все эти работы составили предпосылки для создания общей теории систем. Хотя первая основополагающая работа такого рода была опубликована австрийским биологом Л.Берталанфи в 1950 г., можно считать, что создание общей теории систем и сегодня находится в самом начале предстоящего трудного пути. Тем не менее, многие модели, отображающие отдельные свойства сложных систем, могут формироваться как аналоги моделей технических систем. К таким моделям, в частности, относятся некоторые геронтологические модели, описывающие зависимость вероятности смерти особи от времени, прошедшего с момента ее рождения, средней ожидаемой продолжительности дальнейшей жизни особи от ее возраста и т.п.

1.2. Методология познания – смена парадигмы

1.2.1. Три общих метода познания

Наличие к настоящему времени более 200 теорий старения указывает не только и не столько на отсутствие единой теории, общих взглядов или не изученность причин и сущности старения (как это вульгарно трактуют многие), сколько на методологическое непонимание сути вопроса.

Наука в своем историческом развитии прошла три этапа, каждый из которых характеризуется своей глобальной парадигмой [6, 34, 50].

Первый этап – детерминизм, получивший свое максимальное выражение, видимо, у Лапласа. Согласно крайним его представлениям знание начальных условий однозначно определяет все последующее: знание начальных координат и импульса всех частиц в Начала Мира однозначно определяет картину его до настоящего момента и далее до Конца Мира. Ясно, что главный недостаток такого методического подхода, – это механистичность – все предопределено начальными условиями, нет свободы и неопределенности, собственно, нет места жизни, чувству, разуму, свободе воли и всему реальному разнообразию Мира. Хотя многие геронтологи понимали важность общебиологических законов [23, 44, 45, 56, 73, 75, 90, 97, 124, 135, 137, 140], основное внимание большинства было привлечено к исследованию конкретных механизмов старения, трактуемых как причина.

Стохастическое видение Мира, наиболее выраженное в теории вероятности и квантовой механике, основывалось на признании закона природы, гласящего, что невозможно одновременно и точно определить координату и импульс – принцип неопределенности в квантовой физике. Однако, распространение глобальной стохастичности как метода с микро-уровня на уровень сложных объектов привело к другой крайности – всеобщей непредсказуемости явлений, что также не соответствует положению вещей: вероятность без смысла и цели так же отрицает реальную жизнь, как и механистический детерминизм.

Логическим разрешением двух крайностей явился системный подход, завоевывающий в настоящее время все большую популярность.

1.2.2. Системный подход – современная методология познания

Развитие системного подхода вывело науку из методологического кризиса, причем не отбрасывая достигнутого. Уже одно перечисление его характерных черт, приведенных ниже, показывает огромные потенциальные возможности системного подхода – нового, цельного взгляда на мир:

- это не отдельная дисциплина, как физика или биология, а общий методологический подход,
- единство целого находится в основе рассмотрения,
- важен учет реальности всеобщих и всех взаимосвязей,
- части целого – не обособленные сущности, а единицы членения принципиально иного типа (сущности-во-взаимосвязи),
- рассмотрение вещественной структуры заменяется и дополняется рассмотрением сущностных взаимоотношений структурных частей,
- возможно рассмотрение слабо структурированных систем (например, метаболизма),
- от анализа равновесных состояний ведет к анализу неравновесных, необратимых состояний (сверх)сложных систем,
- показывает, что вне эволюции нет ни сущности, ни смысла ни самой структуры объекта,
- иерархия рассмотрения реально отражает разноуровневую реальную структуру объекта, как на уровне материальном (молекулы – клетки – ткани – органы – системы – организм), так и на уровне абстрактом: сущность – законы – механизмы – проявления,
- сущность явления рассматривается как идеальный закон, определяющий его появление, функционирование и эволюцию в иерархии взаимосвязей целого (как внутри сложной система, так и вне ее – во включении ее надсистему более общего уровня).

В качестве общей схемы в системном анализе различных проблем используется следующая методологическая схема стадий его проведения, из которых наибольшее значение придают третьей и четвертой стадиям, а наиболее важно само осознание наличия проблемы и ее формулировка [34, 50, 82,]:

1) Осознание наличия проблемы и сбор полной информации о ней.

2) Фиксация проблемной ситуации в виде описания.

3) Выработка основных определений.

4) Создание и тестирование концептуальных моделей.

5) Сопоставление результатов моделирования с реальностью.

6) Определение комплекса желательных изменений объекта.

7) Действия по практическому осуществлению этих изменений.

При этом стадии системного анализа в соответствии с самой его сущностью рассматриваются не столько как последовательные временные этапы его осуществления, а скорее как логические моменты, различные существенные взгляды на предмет исследования в целом.

С биологической точки зрения для любого биолога известно и ясно, что продолжительность жизни – эволюционно сформировавшаяся характеристика вида, а конкретные механизмы старения напрямую отражают морфо-функциональные характеристики вида; отсюда влияние на старение сводится к формированию нового вида (!), с новыми морфо-функциональными характеристиками – это однозначно означает исчезновение современного человека как вида, в том числе его современных физических особенностей – это направление имеет ограничения прежде всего морально-этические, чем генно-инженерные.

С точки зрения общей биологии – теории развития жизни, биоэкологии биосферы и т.п., имеется цепочка развития: неживая материя – живая материя (растения) – чувствующая материя (животные) – разумная материя (человек) - …(что далее ?) Ясно, что должна быть следующая ступень развития… Идеал – полный контроль сознания над телом и средой жизни, новая ступень эволюции, обеспечивающая бесконечное развитие человека как уже надбиологического явления (это было понятно уже в глубокой древности, что и послужило формированию психотехник преображения человека в Йоге, Дао, Тантре и пр. и зафиксировано в религиях – «не все умрут, но все изменяться» (*Новый Завет*).

Совершенно ясно, с этих позиций, что представление о решении проблемы старения как консервации отдельного этапа развития (биологической молодости) биологического организма, лишены биологического, да и научного смысла вообще.

Общий вывод: проблема старения – это глобальная, а не частная биологическая, задача, где проблемы этики, общий взгляд на Мир и место Человека в нем, его Предназначения, становятся основными.

1.3. Старение как глобальный феномен

Общая теория старения, как любая общая теория, должна быть создана на высоком уровне абстракции, описывая старение как общее явление мира, а также указывать на наиболее общие механизмы старения и открывать принципиальные пути влияния на них, обязательно доводя рассмотрение до логического завершения; она должна допускать общее математическое представление, выводы из которого не должны противоречить устоявшимся экспериментальным данным о старении, в частности, распределению вероятности возрастной смертности, а также явно указывать на главные физико-химические и биологические механизмы старения [8, 19, 52-54, 211, 221, 287].

Старение представляет собой по существу количественную характеристику соотношения двух глобальных явлений – жизни и смерти, поэтому рассмотрение старения всегда проводилось с учетом представлений о сути самой жизни и не отделимо от биологической формы движения материи в целом. В настоящее время при определении феномена жизни различные авторы сходятся в том, что для жизни как глобального явления присущи как минимум следующие пять свойств:

1. ОБМЕН ВЕЩЕСТВ (а также энергии и информации) с внешней средой.

2. САМООБНОВЛЕНИЕ всех структур жизни на всех уровнях (от метаболизма и клеточного деления до популяций и всей биосферы).

3. ДИСКРЕТНОСТЬ существования в виде индивидуальных живых форм - организмов.

4. ЭВОЛЮЦИЯ форм жизни (в филогенезе - видообразование и в онтогенезе - индивидуальное развитие).

5. РЕАКТИВНОСТЬ – приспособительные реакции организмов на внешние условия в виде явлений раздражимости, возбудимости и у высоко развитых форм - мышления и психики.

Таким образом, старения как первичного, отдельного свойства среди свойств жизни не существует. Однако присутствует свойство дискретности жизни – существование ее в виде отдельных организмов. Именно это свойство и является тем, как увидим ниже, что определяет возможность и необходимость появления старения на уровне отдельного организма.

Возникает вопрос – как соотносится свойство дискретности с другими свойствами жизни. Первая задача (цель) при изучении старения, таким образом, объективно сводится к тому, чтобы понять, в каком отношении старение стоит к процессам самообновления, обмена веществ, формообразования – то есть эволюции, а также реагирования организмов на внешние условия среды.

При такой постановке вопроса, совершенно ясной оказывается важнейшая связь геронтологии с выходящими на первый план для современного общества науками – экологией, теорией сложных систем, самоорганизации и саморазвития, психологией, социологией, эволюционной теорией, проблемами будущего развития человечества, биосферы в целом.

Причиной деградации любых не полностью открытых систем в общем случае является действие второго закона термодинамики, приложимого к любым процессам в мире и направляющего самопроизвольное течение процессов в таких системах в сторону повышения энтропии [54, 79, 82, 200, 261, 287], т.е. хаоса.

Наиболее ясно выраженной ПРИЧИНОЙ СТАРЕНИЯ, таким образом, является второй закон термодинамики, проявление которого для живого обуславливается ДИСКРЕТНОСТЬЮ существования жизни. Именно это глобальное свойство жизни создает ГЛОБАЛЬНОЕ ПРОТИВОРЕЧИЕ, предопределенно ведущее к старению со временем любых, не изменяющихся форм живого. Это противоречие конечности «усилий» частей сохранить свое постоянство и бесконечности разнообразных влияний целого на эти части. Это противоречие – глобальный закон, стимулирующий эволюцию и усложнение, но если какая-либо часть не может постоянно эволюционировать (а любой организм имеет конечные морфофункциональные параметры после достижения взрослого состояния), то развитие старения неизбежно [39, 52, 73].

Если внимательно посмотреть на упомянутые выше свойства жизни (обмен веществ, самообновление, эволюция форм, раздражимость), то мы увидим, что все они как раз и направлены на противодействие энтропии и принципа конечности дискретных форм – главного свойства живого, которое и приводит к старению.

Способ противодействия старению как накоплению хаоса, в общем виде, достаточно хорошо известен – это поступление энергии (а также

вещества и информации) ИЗВНЕ, что дает принципиально значимые эффекты:

- обусловливает не нарастание энтропии в системе, а возможно даже ее снижение при росте и развитии;

- обеспечивает прогрессивную эволюцию (увеличение биомассы и ее усложнение в целом);

- однако не определяет полную сохранения исходных форм (изначальной структуры системы), то есть хотя и обеспечивает прогрессивную эволюцию, но путем развития разнообразия форм, их изменения и смены друг другом.

Таким образом, старение отменяется путем развития, эволюции всех форм, путем перерастания, развития, эволюции систем, а не путем консервирования всех структур (форм, взаимосвязей) на длительный срок. Общим глобальным направлением противодействия старению, исходя из его глобальной причины, является повышение степени открытости системы – организма и обеспечение его дальнейшей эволюции в целом и всех его подсистем в частности. Частные методы воздействуют на отдельные механизмы, синдромы и типы старения и влияют на старение лишь частично – на его отдельные проявления. В этом состоит принципиальная методологическая ошибка многих, занимающихся проблемой старения, причем эта ошибка свойственна механистическому мышлению в целом, сопро-вождая технологическое – «мертвое» развитие цивилизации в настоящее время.

Энтропия и эволюция.

Энтропия и внешняя энергия – две противостоящих силы, ответственных за самоорганизацию и изменение отдельных простых и самых сложных систем, в том числе организмов [200, 261, 287,].

Важно понимать, что реально в сложных системах идут ВСЕ возможные процессы, которые реально и следует учитывать, когда речь идет об очень длительных периодах времени и очень сложных системах. Системный анализ как раз и способен это делать. Реальная схема будет следующая (рисунок 1):

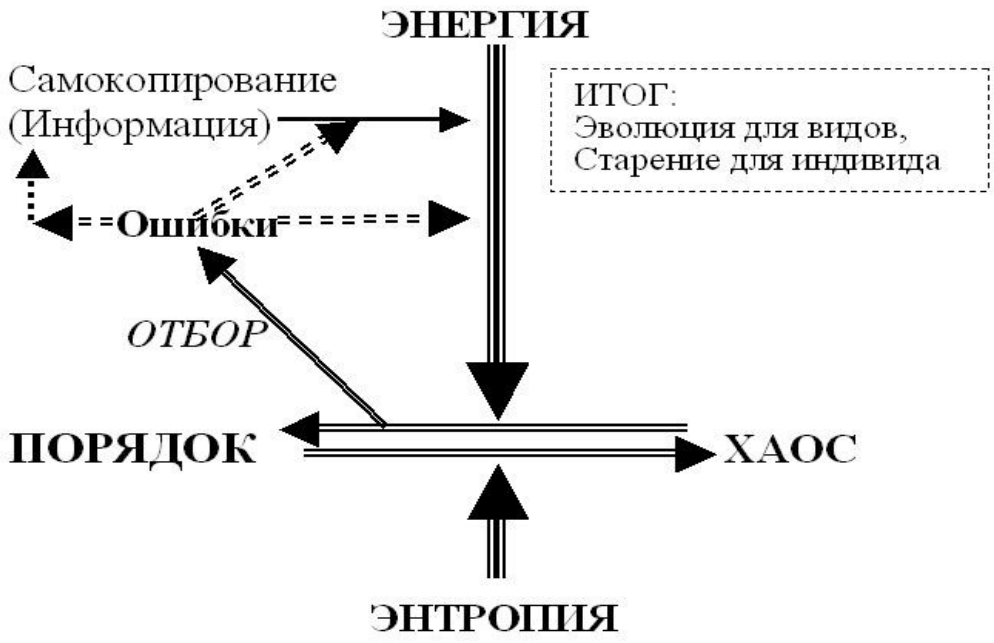


Рисунок 1. Реальные процесса самоорганизации и эволюции систем

Энергия необходима для получения Порядка из Хаоса, но она действует в конкретный условиях, по конкретному плану – на основе информации биологических систем (развитие на основе генетики организма), и путем самокопирования уже имеющихся биомолекул и биоструктур. Энтропия противодействует этому процессу путем случайных процессов, ведущих к ошибкам, которые с неизбежностью проявляются на всех и любых уровнях. Ошибкам противостоит Отбор (естественный отбор для вида и иммунные и другие механизмы внутри организма), однако, отбор также подвержен неизбежным ошибкам и дает лишь материал для эволюции всей системы (организма).

Практически, внутри организма невозможно достичь бесконечной эволюции и усложнения, кроме того, ввиду самого существования организма как отдельной системы, организм принципиально смертен и отбор и эволюция не имеет достаточно времени и необходимости для формирования не стареющего организма в котором ВНУТРИ него и ПОЛНОСТЬЮ компенсируются ВСЕ ошибки и происходит полноценная эволюция и дальнейшее развитие. На деле всегда неизбежно накопление ошибок, прекращение развития и снижение упорядоченности, что и есть старение.

Существуют различные подходы к оценке энтропии сложных систем. Так, метод кристаллизации биологических жидкостей Шабалина, Шатохи-

ной [147, 148] показал высокую чувствительность к различным нарушениям внутреннего состояния организма, а также корреляцию с возрастом (см. главу 10): высыхающая капля сыворотки крови образует единую четкую структуру для молодого здорового организма, которая нарушается, с образованием лакун и вкраплений, при нарушениях внутренней среды. Это наглядно иллюстрирует представления о связи старения с нарушением порядка (нарастанием энтропии): кристалл является символом наивысшего порядка, нарушение кристаллизации вплоть до аморфного состояния – отражение нарастания энтропийных процессов.

Другим подходом является изучение возрастных изменений корреляций различных параметров организма (см. главу 10): в пожилом возрасте снижается число корреляций и их сила, что символизирует распад единой целостной системы на плохо «соединенные» части – что также прямо отражает снижение порядка и единства с возрастом.

Известное с возрастом снижение общего метаболизма, снижение реактивности и устойчивости организма также однозначно можно интерпретировать как снижение «открытости» системы, обновляемости и связи с внешней средой, а это – единственный путь противодействия нарастанию энтропии в отграниченной от внешней среды системе; для клеток это прямо наблюдается как увеличение «загрязнений» в них – липофусцина, тяжелых металлов и пр., а также как увеличение морфологического разнообразия клеток и надклеточных структур с возрастом и т.п.

На биохимическом уровне увеличение энтропии проявляется также – снижением упорядоченности сети метаболизма, снижением уровня обмена макромолекул (репарации ДНК в первую очередь), накоплением «ошибок» (в том числе мутаций), снижением «активной протоплазмы» и т.п. Так, снижение «активной протоплазмы» можно четко измерять как степень склероза и накопления кальция в тканях, снижение дыхания тканей и уровня синтеза белка и ДНК, а также по содержанию общей и внутриклеточной воды и по уровню связанной воды – степени гидратации молекул и т.п.

Таким образом, можно видеть, что общие представления об энтропии как очень абстрактном показателе, прямо выливаются в целый ряд методов, смысл возрастных изменений которых можно четко понять только с учетом теоретических представлений о сущности, смысле и общей причине старения.

1.4. Сущностное определение и причина старения

Методология рассмотрения общих вопросов была известна еще с глубокой древности и четко определена в настоящее время. Ведущий философ-методолог А.Ф.Лосев прямо говорит, что «...сущность (чего либо) трактуется как ПРИНЦИП структуры...".

Таким образом, ясно, что СУЩНОСТЬ или ПРИЧИНА СТАРЕНИЯ может быть выражена только на языке абстракции высокого уровня как объективная закономерность жизни, бытия, как принцип, но вовсе не как процесс, тем более не как конкретный специальный механизм в организме. Сведение принципов к механизмам – главная методологическая ошибка, в том числе в геронтологии, связанная с современной узкой специализацией ученых, что прямо отражается и на их типе мышления. Исходя из выше сказанного достаточно ясно, что при определении термина, сущности и причины старения необходимым и достаточным оказывается определение ПРИНЦИПА старения как явления.

Как ни парадоксально, но сущностное определение глобального явления старения было известно с глубокой древности как «снижение жизненной силы с возрастом». Современное общее определение старения «Старение – снижение общей жизнеспособности с возрастом», фактически никак не отличается. Этого определения оказывается необходимо и достаточно для количественного описания старения и выяснения причины и главных механизмов процесса старения организмов, органов и систем.

В наиболее общем виде жизнеспособность – это поддержание структуры и функции – то есть, сохранение идентичности (информации) сложной системы (организма) во времени.

Самопроизвольное направление изменения информации со временем тесно связано в глобальном смысле с наиболее общим законом Бытия – законом нарастания энтропии, где энтропия и информация связаны между собой следующей формулой:

$$E = A*\mathrm{Ln}W + B \quad (1)$$

где E – энтропия, W – вероятность события, (1)

A и B – коэффициенты.

То есть, «естественная» вероятность направления (био)химических (и любых!) событий во времени ведет к достижению хаоса как наиболее вероятного события (уже не изменяемого), что известно как 2-й закон термодинамики. Механизм такого пути (глобальный механизм действия энтропии) – случайные процессы. Известно, что противостоять хаосу можно лишь ВНЕШНИМ потоком энергии. Этот поток энергии – метаболизм, составляет глубинную основу ЖИЗНИ как биологической формы существования материи.

Связь старения с энтропией – случайными процессами, можно вывести также и формально – из феноменологических формул, предложенных для описания старения.

Первая математическая модель старения была создана около 200 лет тому назад Б. Гомперцом, 1825 [211]. Она до сих пор наиболее точно описывает возрастную динамику смертности человека и, видимо, большинства других организмов. Являясь специалистом по страхованию жизни, Гомперц теоретически вывел практически необходимую для его профессии формулу повышения интенсивности смертности с возрастом, которая до настоящего времени является наиболее общим количественным описанием старения как такового и указывает на экспоненциальное нарастание смертности с возрастом.

Смертность, как «количественную характеристику неспособности противостоять разрушению», Гомперц рассматривал как величину, обратную жизнеспособности – способности противостоять всей совокупности разрушительных процессов. Он предположил, что жизнеспособность во времени снижается пропорционально ей самой в каждый момент (формула 2), что для смертности соответствует экспоненциальному нарастанию с возрастом. Такое неспецифическое повышение уязвимости организма ко всем воздействиям с возрастом и носит название старения как такового.

Сам подход к написанию формулы в настоящее время теоретически понятен: это элементарное дифференциальное уравнение, описывающее, например, радиоактивный распад в физике и иные простые вероятностные процессы. Сущность явления заключается в том, что в каждый момент времени изменение состояния не зависит от предыстории, а только от настоящего состояния системы и носит вероятностный характер.

Понятны и общие механизмы таких процессов – это принципиально вероятностные закономерности, связанные с конечной устойчивостью

любых отграниченных от внешней среды элементов - сложный организм, состоящий из таких элементарных единиц, может со временем их только утрачивать. Главным вопросом является в таком случае природа таких «элементарных единиц жизни».

Еще Гомперц отмечал сходство кривых изменения смертности и энтропии, а В. Перкс (1932) прямо писал, что «неспособность противостоять разрушению имеет ту же природу, что и рассеяние энергии» (то есть, старение эквивалентно увеличению энтропии, которая служит мерой неупорядоченности любой системы). А. Комфорт в своей классической «Биологии старения» пишет о том, что «жизненность» на современном уровне понимания может быть сведена к достаточно конкретному, хотя и не вещественному субстрату – «в настоящее время представляется вполне вероятным, что информация, содержащаяся в клетках, и есть... «биологическая энергия». Таким образом, содержательная интерпретация понятия «жизнеспособности» с самого начала сводилась и сводится в настоящее время не столько к вещественному наполнению, сколько к энергетическому и информационному содержанию («энтелехия» древних) и требует абстрактного мышления.

В соответствии с разрабатываемой Б.Гомперцом моделью, жизнеспособность (X) снижается во времени пропорционально ей самой, что можно отразить следующей простейшей формулой:

$$dX/dt = - k X \qquad (2)$$

где k – коэффициент, X – жизнеспособность, t – время.

Эта простейшая формула описывает СЛУЧАЙНЫЕ процессы, например радиоактивный распад.

Рассматривая смертность (μ) как обратную жизнеспособности величину ($\mu = 1/X$), из формулы (2) получают основную формулу (3) старения (Б. Гомперца и У. Мейкема) – с возрастом общая смертность растет экспоненциально:

$$\mu = R_o * \exp(\alpha * t) + A \qquad (3)$$

где: R_o – начальный уровень смертности, α – скорость нарастания смертности, A – коэффициент, характеризующий вклад в смертность внешних влияний (эко-социальные влияния), слабо зависит от возраста.

Качественный вид кривых выживаемости, смертности и дожития, соответствующий представленным выше формулам, соответствует реальным кривым выживаемости различных популяций человека, а также ряда других организмов.

Общей причиной, позволяющей действовать энтропии в любой системе, является принципиальная отграниченность этой системы от внешней, что не позволяет ей полноценно самообновляться и ставит предел ее существованию.

Аналогично, глобальной причиной старения является дискретность существования жизни в виде индивидуальных форм – живых организмов, их принципиальная ограниченность (пределы адаптации всех механизмов гомеостаза) в сравнении с практически бесконечным разнообразием влияний на каждую часть и весь организм всего остального Мира. Количественная и качественная бесконечность влияний всего Мира на любую его часть лишь частично может компенсироваться гомеостазом (противодействием части), что приводит к накоплению некомпенсированных повреждений – это и есть наиболее общий механизм как причина и сущность старения.

Самообновление организма на всех его уровнях не является достаточным фактором противодействия старению, так как сам процесс самообновления не абсолютен и имеет те же случайные механизмы поломок – неизбежно накопление мутаций и не репарируемых повреждений или случайных изменений структур и функций.

Интересны некоторые очевидные и экспериментально и демографически подтверждаемые выводы, однако, иногда парадоксально звучащие. Так из вышесказанного очевидно, что наибольшее абсолютное снижение жизнеспособности можно наблюдать в раннем возрасте, что мы и видим по кривым изменения в онтогенезе абсолютного значения многих физиологических функций. В это время, соответственно, эффективны мероприятия по профилактике старения и удобно проводить экспериментальную проверку геропрофилактических средств.

В то же время, в старости даже небольшие абсолютные изменения жизнеспособности ведут к выраженным изменениям смертности, поэтому в старших возрастах удобно изучать влияния адаптогенов и биостимуляторов, хотя малый жизненный ресурс может и не приводить к повышению качества и количества жизни при их использовании.

Математический анализ теорий старения, основанный на моделировании его сущности – возрастном снижении общей жизнеспособности, оказался удивительно плодотворным и пригодным как для целей теоретических изысканий, так и для практических исследований в популяционной геронтологии. В то же время, общая причина старения проявляется некоторыми общими механизмами старения, которые следует тщательно промоделировать и оценить их вклад в общую картину старения.

Для практических целей необходима разработка сущностных моделей старения, отражающих само существо этого общего для всего живого явления и являющихся как биологически обоснованными, так и биологически содержательными.

Другим подходом к количественной оценке старения, основанным на том же определении – снижении с возрастом общей жизнеспособности, является рассмотрение общей жизнеспособности системы как интеграла жизнеспособности ее частей, что в применении к организму означает – общая жизнеспособность организма складывается из сохранения жизнеспособности (функционального ресурса и взаимосвязей) основных его органов и систем (формула 4).

$$X = x1 + x2 + \ldots + xn \qquad (4)$$

На этом основано определение индивидуального старения как биологического возраста.

Таким образом, использование чисто теоретического рассмотрения дает возможность как получить сущностное определение старения, так и конкретные математические формулы для вычисления старения как для совокупности организмов (популяционная геронтология), так и для индивида (индивидуальный биологический возраст).

1.5. Единая системная теория старения

Старение на современном этапе развития науки должно рассматриваться с достаточно общей методологической точки зрения, поскольку оно объективно принадлежит к феноменам наиболее общего типа – таким, как жизнь и смерть, бытие и сущность развития Природы в целом и т.п.

Современный системный анализ, как методологический подход к старению, позволяет преодолеть изъяны прежних методов изучения этого явления – метафизичность механистического рассмотрения старения, как следствия какого-то конкретного физико-химического процесса или даже жесткой запрограммированности гибели организма, с одной стороны, и чрезмерной общности философских трактовок, не позволяющих сущностно наполнить и предметно анализировать этот процесс, с другой.

Смыкание фундаментальной и практической отраслей человеческой деятельности в настоящее время, реализованное в новой методологии – системном анализе, позволило выработать достаточно полный, общий и конкретно наполненный метод изучения старения как глобального феномена жизни вообще и человеческой жизни в частности.

Системный подход, как методология и метод при рассмотрении процесса старения, включает формулирование глобального закона старения как общего феномена, что является определением старения и формулирует причину старения, которая принципиально должна быть определена достаточно обобщенно.

Определение старения необходимо и достаточно свести к следующему: старение – глобальное снижение жизнеспособности с возрастом (устойчивости ко всем формам повреждений), что ведет к повышению вероятности смерти целостного организма со временем в течение взрослого периода его жизни.

Общая причина старения, в целом, достаточно понятна на современном уровне обобщения – это дискретность существования организмов, ведущая к отграниченности их от внешней среды и приводящая к принципиальной недостаточности вследствие этого любых внутренних (следовательно, ограниченных пределами организма) механизмов самосохранения, при принципиально неограниченном влиянии по качеству, количеству и силе со стороны внешних воздействий всего целостного Мира и его иерархически отдельных частей и проявлений. Это глобальное

противоречие «целого и части» ведет к эволюции и развитию жизни, но включает изменение всех форм, а недостаточность изменчивости на индивидуальном уровне ведет к старению и смерти. Общность морфо-функциональной организации особей конкретного вида придает им и общность сроков жизни, темпов старения и главных для каждого вида механизмов старения.

Важнейшим подходом к анализу при системном рассмотрении является учет **иерархичности** структур реальных сложных систем. При этом системный анализ требует рассмотрения принципов, характерных для каждого иерархического уровня. Такая иерархия рассмотрения при системном анализе отражает не вещественную структуру объекта, что изучают морфологические науки, а иерархию сущностных принципов, отражающих законы функционирования и связи внутри и между структурными уровнями рассматриваемого объекта, который выступает как сложная иерархическая динамическая система. Иерархия рассмотрения старения отражена на таблице 1.

Таблица 1.

Иерархичность рассмотрения старения

Уровень	**Сущность уровня**	**Важность для старения**	**Доступность для воздействий**
Причина старения	Сущностное описание, принцип	Определяет принципиальную возможность влиять на старение	Не доступно по своему существу: идеальная суть причины
Типы старения	Общее описание действия причины как направлений эволюции систем	Определяет конечное число различных типов изменений при старении	Воздействие выступает как описание общих путей влияния на старение
Синдромы старения	Общее описание взаимосвязанных групп изменений	Определяет взаимообусловленные группы изменений при старении	Воздействие описывается как комплексные группы взаимосвязанных методов (анти-синдромное)

Механизмы старения	Конкретные проявления принципов старения	Определяет бесконечное разнообразие конкретных механизмов	Описывается как отдельный метод воздействия на механизмы старения

Видно, что непосредственному влиянию доступны лишь наиболее низкие уровни рассмотрения старения; более высокие носят общий, идеальный характер рассмотрения, что, однако, не отменяет реальности их существования и первичной важности для процесса старения в целом.

Последний уровень анализа старения – **структурный**, и его изучение возможно только при наполнении биологическим содержанием. При таком рассмотрении видно, что первичная причина как принцип проявляется несколькими (в нашем рассмотрении четырьмя) наиболее общими закономерностями – типами старения, присущими всем живым существам.

Эти типы, в свою очередь, формируют ряд взаимосвязанных групп симптомов – синдромы старения, включающие уже конкретные проявления старения на уровне частных механизмов, реализующих старение в зависимости от конкретных условий и частного субстрата – молекулы, клетки, органа и пр.

Системность рассмотрения старения проявляется в том, что в каждом конкретном проявлении, механизме старения можно увидеть все вышеупомянутые четыре уровня – отражение идеальной причины в конкретных условиях; отношение в большей мере к определенному типу старения; закономерную связь на уровне механизмов с другими симптомами – синдромы; и, наконец, собственно конкретное реальное проявление старения для изучаемого явления. Естественно, чем более конкретное и узкое явление мы изучаем, тем более конкретно, но и узко, проявляется причина старения. Для всего организма старение в целом может быть достаточно полно охарактеризовано только с использованием всех четырех иерархических уровней его представления и анализа.

Развиваемая системная теория старения имеет не только важное теоретическое значение, но и имеет важные практические выходы. Так, ясно, что для старения сверхсложных систем, каковыми являются все организмы, причина старения не может реализоваться одним механизмом, поэтому поиски «таблеток от старости» методологически не обоснованы. В то

же время, системный подход требует системности, комплексности, в подходе как к диагностике индивидуального старения, так и к развитию системы профилактик и обращения старения, а также не исключает выявления для конкретных проявлений старения (для старения собственно человека) вполне конкретных первостепенных механизмов или тех направлений, на которые следует воздействовать в первую очередь.

В целом, можно предложить следующую классификацию основных механизмов и проявлений и возможных средств воздействия на старение исходя из предложенных теоретических схем (таблица 2).

Таблица 2.

Базовые механизмы старения и средства воздействия

Базовый механизм	**Неблагоприятные эффекты и следствия старения**	**Средства антистарения**
Системное «загрязнение» организма (неполное выведение экзо и эндогенных токсинов, а также внутрених «отходов» метаболизма)	Токсины и тяжелые металлы в тканях, липофусцин в клетках, камни в печени и почках, рубцы от старых ран и воспалительных процессов, хронические инфекции, холестериновые бляшки на сосудах, не функционирующие белковые комплексы в клетках, явления остеохондроза, увеличение числа мутаций в хромосомах, психические блоки и неразрешенные психологические проблемы и пр.	• Энтеросорбенты, детоксиканты. • Стимуляция органов «очис-тки» (печень, почки, ЖКТ) препаратами и аппаратами • Мануальная терапия • Оптимум питания • Стимуляция обмена веществ (витамины, электро-стимуляция гипоталамуса и др. структур) • Антиоксиданты, доноры – SH • Специальные средства (центрофеноксин и т.п.) • Стимуляция клеточного роста
Снижение количества	Уменьшение количества: нервных клеток; альвеол в	• Механические протезы • Тканевая инженерия

необновляемых элементов организма	легких; нефронов в почках; зубов; клеток – рецепторов слуха и зрения; яйцеклеток; стволовых клеток; снижение объема функций организма.	• Стимуляция регенерации и роста клеток и тканей • Заместительная терапия • Стимуляция оставшихся структур и функций органов
Старение как накопление разнонаправленных повреждений и структур и функций	Увеличение разнообразия морфологии и функции клеток, тканей, органелл. Ухудшение регуляции, дисбаланс в работе основных жизненно важных систем, снижение общей адаптации. Увеличение антигенного разнообразия и аутоиммунизация с возрастом.	• снижение времени самообновления всех структур (клеточные рост и деление), • стимуляция естественного отбора (иммуннитет и др.); • стимуляция функций, что косвенно влияет на самообновление (голодание, физическая и психическая активность, и пр.).
Изменение программ роста и развития	Истощение и нарушение программ роста и развития, прекращение роста (гормон роста), климакс (половые гормоны), снижение иммунитета (гормоны тимуса), дезадапатация (гормоны надпочечников), дисфункция др. гормонов (ДГЭА, инсулин, мелатонин, тироксин, эпифиз и ряд др.).	• Заместительная терапия (пловые и фито-гормоны, СТГ и др.) Стимуляция клеточного самообновления: факторы крови, стволовые клетки и пр., • Иммуностимуляция (гормоны тимуса, трансфер фактор и др.), • Антистрессорные средства и адаптогены, • Активация гипоталамуса и др. структур.

Таким образом, разрабатываемая нами системная сущностная теория старения является наиболее адекватным методом рассмотрения старения в настоящее время, она позволяет анализировать старение на всех уровнях:

уровне общих закономерностей и понятий, а также и на уровне количественного моделирования, уровне сущностного наполнения биологическим материалом. При этом сохраняется общее видение проблемы и целостности организма со всеми его иерархическими уровнями организации и контроля. Эта теория принципиально открыта для развития и позволяет не отвергать уже имеющиеся теории и механизмы старения, а органически вбирать их, рассматривая то место в целостной картине процесса старения, которое они объективно описывают.

В целом, общее представление о старении и методах воздействия на него в общем виде может быть сведено к следующему.

Старение является общим свойством живых и неживых систем и пред-ставляет собой износ, деградацию, снижение порядка, структуры и функ-ции системы. Причиной деградации не полностью открытых систем в общем случае является второй закон термодинамики, изменяющий их состояние в сторону повышения энтропии.

Единственным механизмом противодействия нарастанию энтропии является поступление внешней энергии – «ремонт» системы, который осуществляется в общем случае как замена старых структур на новые; для живой системы – самообновление молекул, клеток и надклеточных структур.

Единственной причиной старения сложной не полностью открытой системы – организма при наличии обновления является недостаточность обновления, которая реализуется двумя основными путями – генетически детерминированная необновляемость ряда структур, которые могут только разрушаться (**стохастический** механизм старения) или снижение со временем скорости самообновления – **регуляторный** механизм старения; в реальном организме оба процесса имеют место и тесно взаимосвязаны.

Регуляторный механизм способен также обеспечить контроль периодов роста, развития и их прекращения (старения) для живой системы. Данный механизм, в свою очередь, снижает свою функцию (стареет) за счет действия на него стохастического механизма – самопроизвольной (или направляемой, например, апоптозом) гибели клеток центров регуляции.

Наиболее важным механизмом регуляторного старения является регуляторное снижение клеточного самообновления – снижение скорости роста и деления клеток. Последний процесс, ввиду регуляторной природы, является наиболее доступным и важным для разработки способов

воздействия на старение живых организмов и включает возможность влияния на центральные, передаточные и периферические регуляторные элементы и сами клетки, что ведет к общему конечному эффекту – повышению ростовых факторов крови для самообновляющихся путем деления клеток внутренних органов, кожи, слизистых и пр.

Необновляющиеся элементы организма могут быть замещены путем механического протезирования или клеточной инженерии, включая клонирование или роботизацию всего организма. Для наиболее ценного в человеке – сознания, возможно сращивание с компьютерными системами и виртуальной реальностью. Перспективным направлением является также генная инженерия с изменением видовых признаков, когда все уровни организации и системы в организме будут являться самообновляемыми, что эквивалентно созданию нового вида.

С древних времен известен также путь взятия под контроль физиологических и регуляторных процессов в организме психическим путем (йога и прочие так называемые духовные психотехники), что, в отличие от выше упомянутых методов противодействия старению, является наиболее гуманистическим методом и является дальнейшим развитием наиболее важного в человеке – его психики.

В итоге воспроизведем классическое определение старения по Фролькису, Мурадян, 1992 [137]: старение – многопричинный разрушительный процесс, вызываемый комплексом регуляторных и стохастических факторов и определяемый генетически детерминированной биологической организацией живой системы.

Это классическое определение старения подчеркивает разрушительную природу старения, включает оба возможных механизма старения, а также подчеркивает значимость генетически детерминированной структуры организма для конкретного выражения старения.

Глава 2.
Математическое моделирование как метод изучения старения

2.1. Теоретическое моделирование старения

2.1.1. Значение теоретических моделей для изучения старения

Моделирование старения является продолжением теоретического метода исследования и обычно основано на теоретических представлениях о сущности и общих механизмах старения как глобального явления. Успешность наиболее общих представлений показана выше на примере формулы Гомперца.

Предложено множество различных подходов для более детального рассмотрения старения исходя из более частных теоретических представлений. Как правило, однако, практическое значение этих подходов весьма мало. Подробно модели старения изложены нами в специальной монографии [82], здесь же будут представлены только наиболее важные собственные данные, прямо имеющие отношение к изучению сущностных механизмов старения, составляющие предлагаемую нами новую иммуно-регуляторную теорию старения и имеющие практическое значение при планировании и проведении экспериментальных геронтологических исследований.

Создание теоретических моделей изучаемого процесса – важнейший элемент познания, поэтому данному вопросу уделяется центральное внимание в любой современной области науки. Геронтология в этом отношении переживает кризис, связанный с тем, что старые принципы создания концептуальных моделей старения, сводившиеся по существу к абсолютизации отдельных наблюдаемых явлений и частных механизмов старения, потерпели крах. Все так называемые теории старения, которых на настоящее время насчитывают более ста, оказались несостоятельными в объяснении фундаментальной основы старения и во многом представляют только исторический интерес.

С другой стороны, ряд чисто математических подходов к моделированию старения не встречает интереса и признания среди биологов, так как даже при самом поверхностном изучении видны биологически не обоснованные и фактически биологически не верные изначальные предпосылки моделей. Так, например, модные экологические и эволюционные математические теории старения, основанные на представлении о «целесообразности старения» как механизма ускоренного обновления вида, игнорируют очевидный факт высокой естественной смертности в дикой природе, когда старые животные фактически отсутствуют в популяции и практически все животные умирают молодыми.

В то же время, существует настоятельная необходимость в четком общем взгляде на явление старения в целом с помощью моделей, позволяющих количественно и содержательно интерпретировать старение организмов. При этом можно видеть, что многие элементы таких моделей уже существует в различных областях биологии.

В настоящее время одной из важнейших задач геронтологии представляется достаточно подробная разработка сущностных моделей старения, отражающих само существо этого общего явления и являющихся биологически обоснованными и биологически содержательными.

Сущностные модели должны отвечать следующим требованиям:

- четкое представление о биологическом содержании каждого моделируемого элемента;
- четкое представление о биологической значимости получаемых при моделировании результатов;
- четкое представление о месте модели в системной иерархии процессов старения (какая часть более общего процесса описывается);
- учет внешних факторов, принципиально влияющих на моделируемый процесс.

Начальным элементом в таком моделировании должно быть определение исходного термина "старение", о чем мы уже говорили выше. Определение старения как «самопроизвольное возрастное снижение жизнеспособности» необходимо и достаточно в соответствии с методологическими положениями, оно указывает на основной закон и причину старения.

2.1.2. Основные глобальные механизмы старения

Как отмечалось выше, старение в целом может проявляться по 2-м направлениям: как **стохастическое** старение (уменьшение с возрастом необновляемых структурных элементов организма в результате чисто вероятностных механизмов их повреждения), и как регуляторное старение, связанное обычно с ростом и развитием и проявляющееся как снижение скорости процессов обновления любых обновляемых элементов (с определяющим значением для снижения скорости роста и деления клеток). Эти общие направления старения сложных систем для конкретным организмов проявляются практически бесконечным числом конкретным механизмов и проявлений старения, которые, однако, можно сгруппировать, например, в 4 более конкретных общих глобальных механизмов, позволяющих более конкретно подойти к методам воздействия на процесс старения в целом.

1. Системное «загрязнение» организма со временем как следствие принципиальной недостаточности открытости любых частично отграниченных от среды систем, даже если они самообновляются внутри себя;

2. Собственно потеря необновляемых элементов организма – на всех уровнях его организации;

3. **Накопление повреждений и деформаций** («дрейф» любых структурных и функциональных параметров) за счет принципиальной недостаточности сил отбора самообновляемых структур для сохранения только "нужных" структур в пределах данной системы, если информация для самосохранения имеется только внутри системы;

4. **Собственно снижение и** н**еблагоприятные изменения процессов регуляции** (окончание и изменение программ роста, дифференцировки тканей, полового развития, иммунитета и т.п., а также системные изменения регуляции самого различного характера).

Старение как системное «загрязнение» организма

Наиболее общий механизм противостояния энтропии, **поток энергии извне**, осуществляется для всех живых организмов процессами питания и дыхания. Эти процессы не могут быть идеальными, неизбежно должны возникать «отходы производства» – неработоспособные балластные молекулы и эндотоксины, удаление которых из организма также в принципе не

может быть 100%-идеальным процессом, в результате чего «загрязнения» неизбежно накапливаются в организме. Вклад в этот процесс вносят также экзотоксины и просто балластные вещества пищи, вдыхаемого воздуха, можно также сюда отнести и информационные потоки. Результатом данных процессов является накапливающиеся с возрастом загрязнения, под которыми в общем случае необходимо понимать мешающие, не функциональные и токсические элементы различной природы, занимающие все большее место вместо функциональной ткани.

Примерами таких «загрязнений» в широком смысле этого слова могут служить: связанные с жировой тканью токсины и тяжелые металлы; рубцы от старых ран и воспалительных процессов; хронические инфекции; холестериновые бляшки на сосудах; не функционирующие белковые комплексы в клетках, явления остеохондроза; последствия психических травм и неразрешенные психологические проблемы и т.п.

Видимо, данный механизм не является у человека ведущим механизмом старения в целом. Не исключено, однако, что он может вносить существенный вклад на самых поздних этапах жизни. Этот механизм важен, например, для жуков – накопление "загрязнений" в желтом теле критично для них в конце жизни – старение их в значительной мере является самоотравлением.

Старение как потеря не обновляемых элементов

Сформировавшийся организм имеет множество не обновляющихся элементов на всех уровнях:

- уникальные гены,
- неделящиеся клетки (нервные – центров гипоталамуса и др.),
- не регенерирующие структуры органов (альвеолы, нефроны и пр.),
- сами органы (например, зубы).

Потеря этих элементов с возрастом носит вероятностный характер и поэтому в простейшем случае описывается той же формулой, что и потеря общей жизнеспособности. Графики общего старения (смертности) по Гомперцу и смертности, связанной со снижением жизнеспособности за счет потери необновляющихся элементов, таким образом, должны совпадать.

Известно, что потеря альвеол, нефронов с возрастом, достигает 50%, а нервных клеток в гипоталамических регуляторных центрах – 80% (что связывает данный механизм с регуляторным механизмом старения). В

природе механизм старения 2-го типа реализован в полной мере у постмитотических животных (например, у дрозофил), у которых существуют только необновляющиеся структурные единицы – все клетки у них постмитотические и количество данных клеток с возрастом сокращается экспоненциально, строго по формуле Гомперца; смертность дрозофил также подчиняется закону Гомперца [30].

Данный механизм лежит в основе возрастного снижения числа функциональных элементов, но он не может объяснить, например, такого типичного для старения явления, как атрофию тканей, состоящих из постоянно самообновляющихся клеток. Если учесть, что основная часть тканей в организме может самообновляться за счет деления клеток, то можно сделать вывод о недостаточности рассматриваемого механизма для объяснения старения в целом.

Старение как накопление повреждений и деформаций

С возрастом отдельные структуры в организме могут не только гибнуть, но и **изменяться** за счет накапливающихся микро- и макроповреждений или изменять структуру и функцию адаптационно. За счет не идеальности механизмов отбора и самообновления таких структур в организме эти структуры накапливаются с возрастом (увеличение числа старых недееспособных клеток во всех органах и тканях, дистрофии, накопление мутаций в геноме, снижение количества и качества сперматозоидов, накопление склеротических элементов в тканях и т.п.); функции таких структур обычно снижаются. Накопление поврежденных элементов носит вероятностный характер, поэтому снижение с возрастом количества нормальных не поврежденных элементов описывается такой же по виду формулой, что и формула Гомперца для потери общей жизнеспособности.

Главную роль в устранении повреждений играет механизм клеточного деления, поэтому ухудшение этого процесса с возрастом проявляется морфологически в виде самых разнообразных изменений тканей – изменение форм и размеров субъединиц, атрофия, гипертрофия функциональной ткани, замещение на нефункциональные соединительнотканные элементы и пр. Этот механизм является основой наблюдаемого с возрастом повышения морфологического (и функционального) разнообразия на уровне тканей, однако, видимо, он не является главным механизмом старения ни у каких видов.

Старение как изменения процессов регуляции

Рост и развитие – неотъемлемые части жизни. Они всегда регулируются генетической программой, которая реализуется обычно взаимодействием 2-х компонентов на уровне регуляторных центров: стимулирующего и ингибирующего. Нервные регуляторные клетки сосредоточены прежде всего в гипоталамусе, в ядрах которого наблюдается с возрастом гибель до 80% этих клеток; так как в мозге гибель нервных клеток в целом не превышает 10% или даже 5% по разным авторам, то вполне вероятно рассматривать эту гибель как запрограммированные регуляторные изменения, влияющие на целостный организм, определяющие его рост и развитие, а затем, видимо, и старение.

Нами предложена общая модель такой регуляции, заключающаяся в растормаживании стимулирующих клеток при гибели ингибирующих, что определяет рост и развитие, но если гибель затрагивает и стимулирующие регуляторные клетки, то со временем программа развития истощается – развивается регуляторное старение [52-54]. Интересно, что это по существу единственная и очень простая модель, описывающая изменения жизнеспособности (и смертности как количественного критерия старения в целом) во все периоды жизни организма. Последнее наводит на мысль о том, что регуляторным механизмам может принадлежать главная роль в процессе старения организма в целом; тогда как остальные 3 общих механизма старения вносят свой вклад скорее всего в последние годы жизни и на фоне уже развившихся выраженных регуляторных изменений.

Учитывая тот факт, что в организме имеются достаточно длительно живущие неделящиеся нервные клетки в других отделах мозга, можно говорить о принципиальной возможности резкого замедления старения путем замены (трансплантации) быстро гибнущих регуляторных клеток длительно живущими, либо молодыми, снижении их гибели и т.п.

Типичными механизмами регуляторных изменений, связанных со старением у человека являются – окончание роста (гормон роста) и развития (половые гормоны, климакс), инволюция иммунитета (тимус и эпифиз), изменения инсулярной системы (скрытый диабет пожилых) и др., однако, остается главный вопрос – что является основным регуляторным механизмом тесно связанным со старением.

Важнейшим механизмом противостояния старению является, как отмечено выше, клеточное деление, которое одно способно полноценно

противостоять всем четырем общим механизмам старения; его замедление – критично для проявления старения самообновляющихся тканей, которых в организме млекопитающих большинство. Поэтому снижение факторов роста для самообновляющихся клеток и мощности других регуляторных систем клеточного роста (включая истощение и изменение активности стволовых клеток) является по нашему мнению важнейшим механизмом реализации старения у многих видов и у человека в том числе.

Нами в связи с этим была разработана иммуно-регуляторная теория старения (здесь «теория» понимается в узком смысле как важный **механизм** старения), показывающая, что возрастной иммунодефицит (как результат центральных регуляторных изменений) затрагивает и регуляцию клеточного роста соматических тканей, являясь важнейшим механизмом старения млекопитающих и человека [48, 49, 54].

Взаимосвязи четырех главных механизмов старения

Рассмотрение биологического смысла основных механизмов старения приводит к очевидным выводам о том, что данные механизмы с неизбежностью взаимодействуют между собой в целостном организме – влияют друг на друга, взаимопроникают друг в друга:

- *«загрязнение»* снижает устойчивость элементов, увеличивая вероятность их повреждений и гибели, снижает эффективность функционирования, в том числе элементов регуляции в нейро-вегетативных центрах;

- *гибель элементов* снижает эффективность очистки (в т.ч. от поврежденных элементов) и число элементов регуляции;

- *повреждения* действуют как механизм потери и загрязнения (балластными, и плохо функционирующими элементами) и изменяют эффекты регуляции;

- *регуляция,* стимулирующая пролиферацию и обновление, является, по сути, главным механизмом, противостоящим загрязнению («разбавлением» быстро растущей новой биоплазмой), гибели и повреждениям (адаптивными влияниями). В то же время, ухудшение регуляции критично для общей адаптивности и устойчивости организма при старении.

Данная схема может быть математически просчитана и открывает возможности для моделирования и прогнозирования внешних воздействий на основные процессы старения в эксперименте, в том числе для оценки ожидаемой эффективности различных факторов, влияющих на старение.

2.1.3. Моделирование основных глобальных механизмов старения

Важной и не решенной до настоящего времени задачей является моделирование и оценка вклада фундаментальных механизмов старения в общую картину старения и взаимодействия данных механизмов между собой. Под старением мы всегда будем понимать **снижение общей жизнеспособности**. Для отдельных систем организма под их жизнеспособностью будем понимать способность осуществления своей жизненно важной для целостного организма функции (функциональный ресурс).

Механизм 1-й – «системное «загрязнение»

Наиболее общий механизм противостояния энтропии - **поток энергии извне**, что осуществляется для всех живых организмов процессами питания и дыхания.

Через организм проходят потоки вещества, энергии и информации, и часть из них задерживается в организме. Результатом является накапливающиеся с возрастом «загрязнения», под которыми в общем случае необходимо понимать, мешающие, не функциональные и токсические элементы различной природы.

Изменение с возрастом потока вещества и энергии «**P**» через организм можно оценить по уровню метаболизма. Известно, что базальный метаболизм снижается с возрастом, однако, не более чем на 10 % поэтому данными изменениями можно в первом приближении пренебречь и считать интенсивность входного потока в организм постоянной, то есть **P = const**. Если предположить, что, в связи с не идеальностью процессов очистки, определенная часть данного потока (часть метаболитов и посторонних внешних примесей) накапливается в организме – **накопительный механизм старения**, то динамика жизнеспособности будет описываться следующим линейным дифференциальным уравнением (формула 5):

$$dX/dt = -k1*P \qquad (5)$$

где X – жизнеспособность, P – поток вещества и энергии через систему, k1 – коэффициент пропорциональности.

Из уравнения (5) с очевидностью следует, что в результате накопления загрязнений жизнеспособность снижается с возрастом линейно. Расчет динамики смертности μ ($\mu=1/X$ – обратная величина жизнеспособности) показывает (рисунок 2), что при действии данного механизма старения смертность в поздних возрастах растет существенно более интенсивно, чем это наблюдается в природе у млекопитающих.

Поэтому описать старение только данным механизмом не представляется возможным. Видимо, данный механизм не является ведущим механизмом старения в целом. Не исключено, однако, что у человека он может вносить существенный вклад на самых поздних этапах жизни.

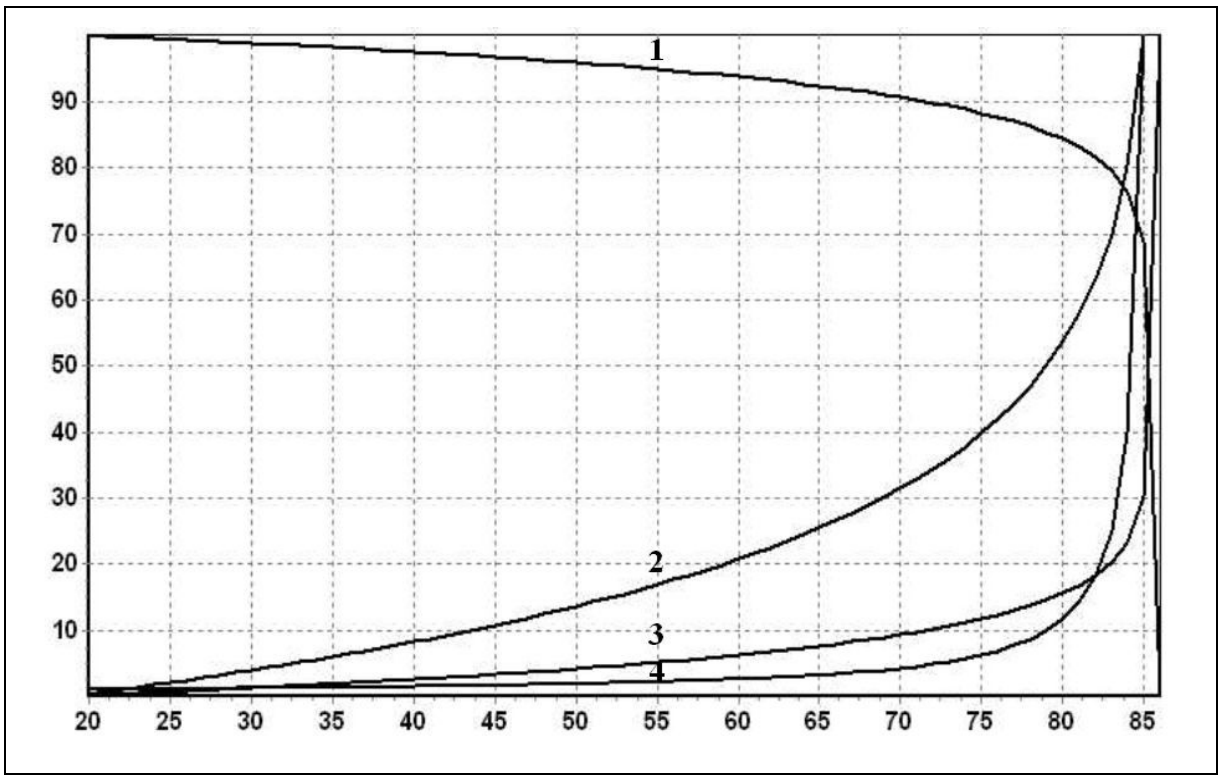


Рисунок 2. Первый глобальный механизм старения – «системное «загрязнение» организма»

По вертикали – значения параметров в условных единицах,

По горизонтали – время в условных единицах.

1 – график дожития,

2 – умершие к данному возрасту,

3 – логарифм интенсивности смертности (масштабирован),

4 – интенсивность смертности (масштабирована),

Механизм 2-й - «потеря не обновляемых элементов»

Полностью сформировавшийся организм имеет множество не обновляющихся элементов на всех уровнях: уникальные гены, не делящиеся клетки (например, нервные, в том числе вегетативных центров мозга), не регенерирующие структуры органов (альвеолы, нефроны и пр.), сами органы (зубы и т.п.).

Потеря этих элементов с возрастом носит вероятностный характер и поэтому в простейшем случае описывается той же по виду формулой (6), что и потеря общей жизнеспособности:

$$dX/dt = -k2*X \qquad (6)$$

где X – количество не обновляющихся элементов организма.

Графики общего старения (смертности) по Гомперцу и смертности, связанной со снижением жизнеспособности за счет потери не обновляющихся элементов, таким образом, совпадают. Потеря альвеол, нефронов с возрастом, достигает 50%, а нервных клеток в гипоталамических регуляторных центрах – 80%. В то же время, изменения, например, жизненной емкости легких (ЖЕЛ) с возрастом происходит не по экспоненте, а по линейному закону, видимо, за счет компенсаторных изменений, уменьшающих скорость снижения функционального ресурса.

В природе 2-й тип старения реализован у постмитотических животных (дрозофилы и др.), у которых существуют только не обновляющиеся структурные единицы и старение которых проходит по формуле Гомперца.

Данный механизм не может объяснить, однако, типичного для старения явления – атрофии тканей из постоянно самообновляющихся клеток. Так как основная часть тканей в организме может самообновляться, этот механизм недостаточен для объяснения старения в целом, хотя и вносит свой вклад в целостный процесс старения организма.

Механизм 3-й - «накопление повреждений и деформаций»

С возрастом отдельные структуры в организме могут не только гибнуть, но и изменяться за счет накапливающихся микро- и макро-повреждений или изменять структуру и функцию адаптационно. За счет не идеальности механизмов отбора и самообновления таких структур в организме эти структуры накапливаются с возрастом (увеличение числа старых

недееспособных клеток во всех органах и тканях, дистрофии, накопление мутаций в геноме, снижение количества и качества сперматозоидов, накопление склеротических элементов в тканях и т.п.).

Накопление поврежденных элементов носит вероятностный характер, поэтому снижение с возрастом количества нормальных не поврежденных элементов описывается такой же по виду формулой (7), что и формула Гомперца для потери общей жизнеспособности:

$$dX/dt = -k3*X \qquad (7)$$

Главную роль в устранении повреждений играет механизм клеточного деления. Ухудшение этого процесса с возрастом проявляется морфологически в виде изменения форм и размеров субъединиц, атрофия и функциональная адаптационная гипертрофия ткани, замещение на соединительно-тканные элементы и пр. Он является основой наблюдаемого с возрастом повышения морфологического (и функционального) разнообразия на уровне тканей.

Механизм 4-й – «изменения процессов регуляции»

Рост и развитие – неотъемлемые части жизни. Они всегда регулируются генетической программой, которая реализуется обычно взаимодействием 2-х компонентов на уровне регуляторных центров: стимулирующего и ингибирующего. Основу механизма программного регулирования на этапе формирования организма можно кратко сформулировать так:

- гибель (программная, апоптоз) супрессорных клеток (**S**) ведете к растормаживанию функции стимулирующих (**H**) клеток, продуцирующих некий регуляторный фактор (**F**).

Нервные регуляторные клетки (H и S) сосредоточены обычно в гипоталамусе, в ядрах которого наблюдается с возрастом гибель до 80% этих клеток. Растормаживание стимулирующих клеток дает постоянный растущий градиент регулирующего фактора с максимумом при полной гибели ингибирующей популяции. Такой градиент, например, половых гормонов (конечных реализующих регуляцию факторов для данной функции) ведет к включению полового созревания.

Если предположить, что регуляторные клетки с возрастом изнашиваются, гибнут случайным, вероятностным, образом и не возобновляются,

то легко видеть, что возрастная динамика этих клеток и регуляторного фактора F будет описываться системой линейных дифференциальных уравнений (8):

$$\begin{aligned} dS/dt &= - ks*S; \\ dH/dt &= - kh*H; \\ dF/dt &= kf*(H - S) + C. \end{aligned} \qquad (8)$$

где: **H, S** – стимулирующие и ингибирующие клетки;
F – регуляторный фактор, выделяемый стимулирующими клетками;
kf – коэффициент пропорциональности;
C – константа; **ks, kh** – коэффициенты вероятностной гибели клеток.

Если считать регуляторный фактор **F**, обеспечивающий интегральное функционирование организма как системы, главным фактором жизнеспособности (соответственно смертность как **$\mu = k*1/F$**, где **k** – коэффициент) и предположить, что ингибирующие клетки быстрее разрушаются с возрастом (их функция исчерпывается периодом развития), то, интегрируя систему уравнений (9), получим динамику моделируемых переменных, показывающую очень хорошее качественное соответствие реальной кривой смертности у млекопитающих и человека (рисунок 3).

При этом воспроизводятся все три главные качественные характеристики графика смертности: быстрый спад в раннем возрасте, экспоненциальный подъем в средних и старших возрастах, замедление подъема в позднем старческом возрасте. Это может указывать на **определяющую роль процессов регуляции для старения человека**. Важнейшим фактором, определяющим старение в этом случае, является **скорость гибели «H» клеток.** Учитывая тот факт, что в организме имеются достаточно длительно живущие не делящиеся нервные клетки в других отделах мозга, можно говорить о принципиальной возможности резкого замедления старения путем замены (трансплантации) быстро гибнущих регуляторных клеток длительно живущими, либо молодыми.

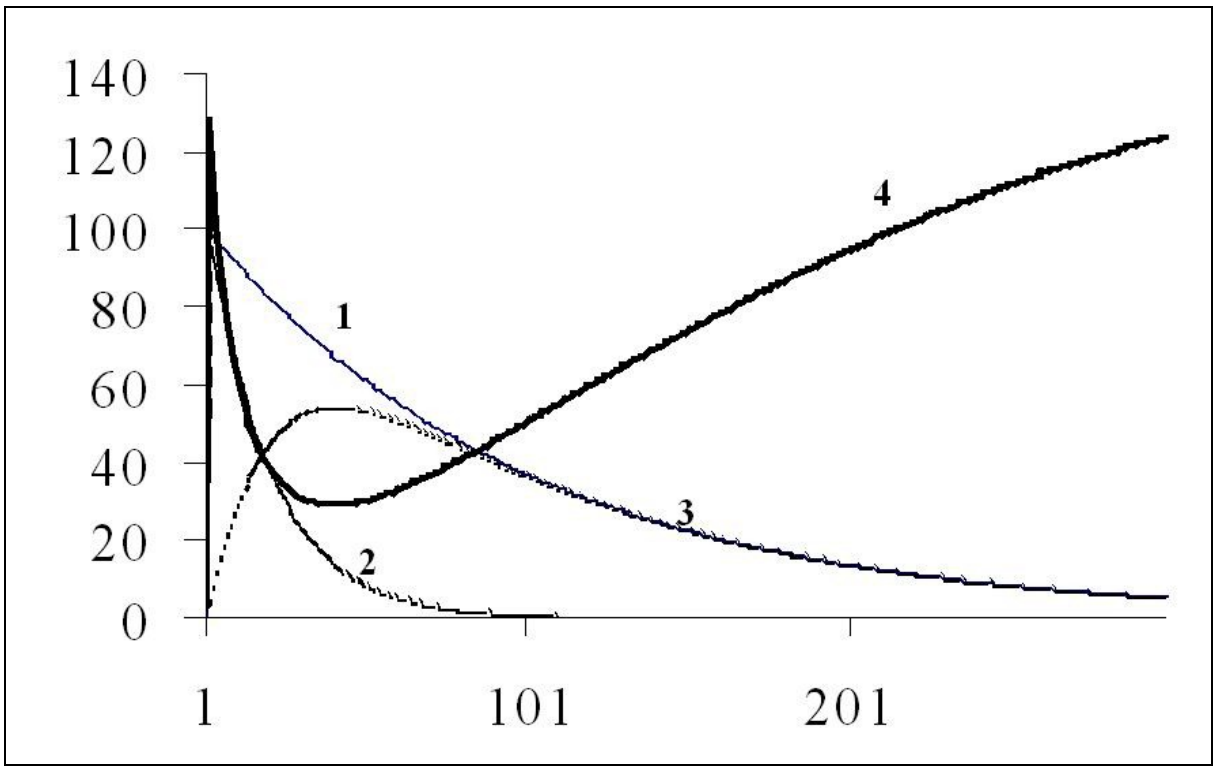


Рисунок 3. Четвертый глобальный механизм старения – регуляторный.
По вертикали – приведенные значения параметров, по горизонтали – время в условных единицах.

1 – количество клеток-стимуляторов (h) для начального h = 100 при спонтанной гибели 1% клеток за единицу времени,

2 – количество клеток-ингибиторов (s) для начального i=100 при спонтанной гибели 5% клеток за единицу времени,

3 – содержание регуляторного фактора (F = h - s),

4 – логарифм смертности: (LgM=Lg(1/(F+10)* 100)*150).

Взаимосвязи главных механизмов старения

Рассмотрение биологического смысла основных механизмов старения приводит к очевидным выводам о том, что данные механизмы с неизбежностью взаимодействуют между собой в целостном организме – влияют друг на друга, взаимопроникают друг в друга:

- *«загрязнение»* снижает устойчивость элементов, увеличивая вероятность их повреждений и гибели, снижает эффективность функционирования, в том числе элементов регуляции в нейро-вегетативных центрах;

- *гибель элементов* снижает эффективность очистки (в т.ч. от поврежденных элементов) и число элементов регуляции;

- *повреждения* действуют как механизм потери и загрязнения (балластными, и плохо функционирующими элементами) и изменяют эффекты регуляции;

- *регуляция,* стимулирующая пролиферацию и обновление, является, по сути, главным механизмом, противостоящим загрязнению («разбавлением» быстро растущей новой биоплазмой), гибели и повреждениям (адаптивными влияниями). В то же время, ухудшение регуляции критично для общей адаптивности и устойчивости организма при старении.

Таким образом, при моделировании взаимодействий между ведущими механизмами старения необходимо учитывать:

- влияние «загрязнения» на гибель элементов, в т.ч. регуляторных клеток;
- влияние повреждений на обновляющиеся, не обновляющиеся и регуляторные элементы,
- обратное влияние регуляторных элементов через клеточное самообновление делением на три первых механизма старения.

Данные требования учтены при построении сущностной модели взаимодействия механизмов старения с помощью следующих представляющихся естественными групп постулатов.

Изменения жизнеспособности **не обновляющихся** структур (клеток, тканей, органелл, органов):

- обратно пропорциональны накопленному «загрязнению»;
- обратно пропорциональны скорости их естественной – случайной гибели;
- обратно пропорциональны скорости их повреждений;
- пропорциональны жизнеспособности обновляющихся структур.

Изменения жизнеспособности **обновляющихся** структур:

- обратно пропорциональны накопленному «загрязнению» (накопленное «загрязнение» обратно пропорциональны скорости деления клеток);
- обратно пропорциональны скорости их естественной – случайной гибели;
- обратно пропорциональны накоплению повреждений (накопленные повреждения обратно пропорциональны скорости деления клеток);

- пропорциональны жизнеспособности обновляющихся структур (в частности, скорость обновления пропорциональная стимулирующему фактору сыворотки крови - «F»).

При учете данных постулатов, некоторые постоянные коэффициенты предыдущих уравнений становятся функциями от жизнеспособностей обновляющихся и не обновляющихся элементов.

Для моделирования жизнеспособности целостного организма удобно представить общую жизнеспособность (**X**) как сумму жизнеспособностей обновляющихся (**X1**) и не обновляющихся (**X2**) элементов: **X = ka*X1 + kb*X2**.

С учетом вышесказанного, будем считать, что: «загрязнение» (коэффициент **k1,** ставший функцией) обратно пропорционально сохраненному ресурсу **X1** и **X2** и пропорционально повреждениям (**k3**); скорости гибели клеток (**km1, km2, km3, km4, kh** и **ks**) пропорциональны уровням повреждений и «загрязнения»; скорость повреждений – вероятностный процесс.

Полные формулы для расчетов интегрированием отдельно для не обновляющихся (**X1**) и обновляющихся (**X2**) элементов показаны ниже (система уравнений (9). В данной системе используются описанные выше обозначения: **k1, P**, **k2, k3, ks, kh, kf, C**. Смысл дополнительно введенных коэффициентов - следующий: **km1, km2, km3, km4 –** коэффициенты, отражающие вероятностную, случайную, гибель элементов по каждому из 4-х общих механизмов старения; **k1_1** – коэффициент обратного влияния имеющегося загрязнения на поток загрязнения; **k1_2** – влияние 2-го механизма старения на поток загрязнения; **kii** – коэффициенты увеличения гибели элементов по **i**-му механизму старения вследствие влияния трех других механизмов старения, включая влияния на регуляторные элементы – **khh** и **kss**; **ki_j –** влияние **j**-го механизма старения на данный (**i**-тый) механизм старения.

Система уравнений: (9)

Первый механизм старения:

$dX1/dt = - k1* P - km1*X1$

$dX2/dt = - k1* P - km1*X2$

$k1(t+1) = k1(t) / (k1\_1*X1 + k1\_2*X2)$

$km1(t+1) =km1(t)+k11*(k1 + k2 + k3 - k4)$

Второй механизм старения:

$dX1/dt = - km2*X1$

$km2(t+1) = km2(t) + k22*(k1 + k3 - k4)$

Третий механизм старения:

$dX1/dt = - k3*X1 - km3*X1$

$dX2/dt = - k3*X2 - km3*X2$

$km3(t+1) = km3(t) + k33*(k1+k2+k3-k4)$

Четвертый механизм старения:

$dX2/dt = k4*F - km4*X2$

$dS/dt = - ks*S$

$dH/dt = - kh*H$

$F = kf*(H - S) + C$

$km4(t+1) = km4(t) + k44*(k1 + km2 + k3)$

$kh(t+1) = kh(t) + khh*(k1 + km2 + k3)$

$ks(t+1) = ks(t) + kss*(k1 + k2 + k3)$

Система уравнений (9) представляет собой систему дифференциально-разностных уравнений, которые решаются методом численного интегрирования на ЭВМ. При моделировании рассчитываются изменения **X1** и **X2** за счет каждого из механизмов старения и эти изменения суммируются, чтобы получить интегральную динамику жизнеспособности и смертности.

Данная модель открывает возможности для моделирования и прогнозирования внешних воздействий на основные процессы старения в эксперименте, в том числе для оценки ожидаемой эффективности различных факторов, сдерживающих старение у человека – геропротекторов.

Для моделирования всех взаимодействующих между собой механизмов старения нами разработана компьютерная система, осуществляющая интегрирование системы уравнений (9) и позволяющая получать графики изменения выживаемости и смертности в зависимости от конкретных значений параметров модели. Модельные эксперименты показали, что наиболее перспективной мишенью для радикального торможения старения и увеличения продолжительности активной жизни с высоким уровнем жизнеспособности являются воздействия на регуляторный механизм

старения – воздействия, осуществляемые за счет стимуляции пролиферации и самообновления регуляторных клеток (рисунок 4).

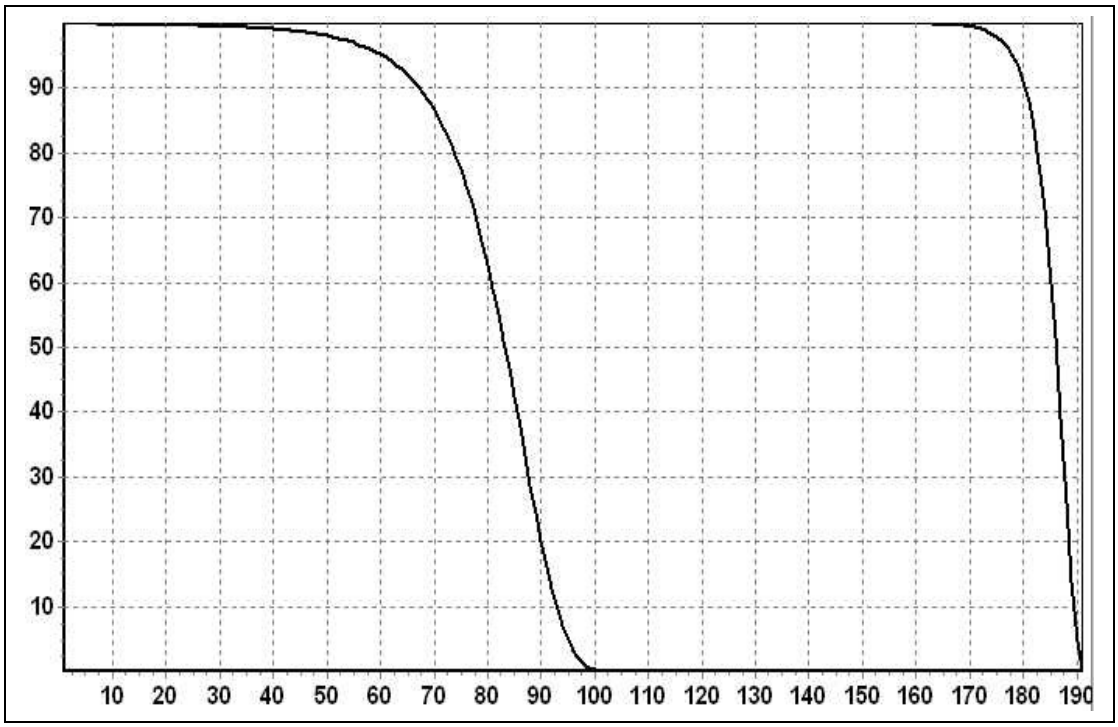


Рисунок 4. Возможности изменения продолжительности жизни при влиянии на четвертый (регуляторный) общий механизм старения (модель). По вертикали – количество доживших до данного возраста в % , по горизонтали – время в условных единицах.

1 – количество доживших при обычных условиях гибели регуляторных клеток,

2 – количество доживших при отсутствии гибели стимулирующей популяции регуляторных клеток.

Доказательством этого могут служить эксперименты по увеличению продолжительности жизни животных путем пересадки гипоталамуса от молодых животных к старым и восстановления таким образом регуляторного потенциала у мышей [10], отмены возрастного климакса у крыс [251] и другие сходные эксперименты.

2.2. Модели саморегуляции клеточного роста в исследовании старения

2.2.1. Самоорганизация клеточных систем как основа эволюции

Нет сомнения, что проблема регуляции клеточного деления и тканевого роста является одной из главнейших как для теории, так и практики современной биологии и медицины. Переход от одноклеточных форм живого к многоклеточным организмам явился важнейшим этапом эволюционного процесса, сущность которого во многом не ясна, однако, несомненно, что такой переход должен быть связан с появлением специальных механизмов, ограничивающих пролиферативные потенции одноклеточных организмов в интересах целостного организма.

Организм современного многоклеточного состоит из значительного числа клеток разного типа, большая часть которых делится или способна к делению.

Такое многообразие пролиферирующих клеток, при условии сохранения целостности организма, может сохраняться лишь как динамическое равновесие с наличием мощных регуляторных механизмов. Уже наиболее общий взгляд на эту проблему показывает, что система регуляции пролиферации тканей целостного организма и система регуляции роста организма может существовать лишь как кибернетическая иерархическая многоуровневая система регуляции.

Формирование такой системы можно рассматривать как результат постоянно усложняющегося филогенетического процесса, на каждом этапе которого формировались свои, законченные для этого уровня, системы регуляции пролиферации. При переходе на новый уровень возникали новые системы, отражающие новые потребности в регуляции пролиферации, которые надстраивались над предыдущими более ранними.

Для рассмотрения процессов регуляции сложных развивающихся систем в настоящее время существует адекватный теоретический аппарат это теории самоорганизации, разрабатываемые, например, в рамках синергетики и кибернетики. Прежде всего это работы нобелевских лауреатов: И. Пригожина, М.Эйгена и других ученых, работающих в этой области [46, 82, 98, 157, 198, 200, 261, 287, 304].

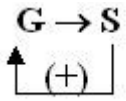
Представляется, что можно выделить следующие уровни регуляции клеточной пролиферации в целостном организме:

1. Внутриклеточный (G_1/S регуляция как выбор альтернативы деление/дифференцировка и Go/G_1 регуляция как отражение функциональной регуляции – потребности в клетках данного типа).
2. Внутритканевой – кейлоны как регуляторы обратной отрицательной связи.
3. Межтканевой – процессы кооперации и симбиоза между разнотипными клетками.
4. Организменный – регуляция роста и развития.

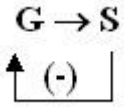
Порядок представления отражает вероятную последовательность возникновения уровней регуляции пролиферации в процессе филогенеза. Исходя из общих кибернетических принципов, разработанных для сложных систем управления, можно представить каким образом могло идти формирование различных уровней регуляции в филогенезе.

Регуляция пролиферации однотипных клеток (кейлонная система)

Не ограниченное ничем клеточное деление пропорционально наличному в каждый момент времени числу клеток – это прямая положительная связь, что, как известно, дает экспоненциальный рост тканевой массы. Фактически, его можно наблюдать лишь на самых ранних стадиях деления эмбриона или в начале роста клеточной культуры низкой плотности. Структурная модель такого процесса для **G** – покоящихся клеток и **S** – клеток в состоянии деления, является элементарной моделью с положительной (+) обратной связью и может быть представлена как простая схема:



Наиболее общий и древний механизм регуляции клеточного роста – **отрицательная (-)** обратная связь, известная как кейлонный механизм. При этом скорость деления обратно пропорциональна достигнутой массе клеток, асимптотически стремящейся к своему пределу. Структура такого процесса, как системы с обратной (-) отрицательной связью, можно представить в виде схемы:



«Клеточный гиперцикл» – основа саморегуляции и самообноовления многоклеточных организмов

Следующий уровень регуляции – взаимодействие клеточных популяций, без чего не мыслима дальнейшая эволюция многоклеточных, то есть, должна возникать система межклеточной регуляции и интеграции организма составленного из разнотипных тканей. Нобелевские работы М. Эйгена, П. Шустера показывают каким образом могли объединиться различные типы клеток с собственными системами регуляции [157, 200]. По определению авторов «гиперцикл – это принцип естественной самоорганизации, обусловливающий интеграцию и согласованную эволюцию системы функционально связанных самореплицирующихся единиц» [157, 200]. Основой теории гиперцикла является доказательство неизбежности формирования в процессе эволюции функциональных связей более высокого порядка между самореплицирующимися единицами – системами более низкого порядка, входящими в единую систему гиперцикла. При таком объединении образуется саморегулирующаяся система более высокого порядка, сохраняющая постоянство взаимоотношений внутри входящих систем. Авторы подчеркивают возможность распространения ее на уровень более высокой организации живого. Системы кейлонной регуляции однородного типа клеток как раз и представляет собой элементарные самореплицирующиеся единицы, формирующие между гиперцикл.

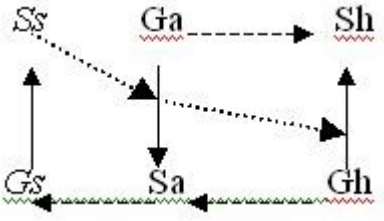


Рисунок 5. Простейший клеточный гиперцикл

В наиболее простом случае конкретная биологическая причина такого объединения – клеточный синергизм, что дает выгоды для обеих взаимодействующих популяций. Но так как это есть механизм положительной обратной связи, то, чтобы не возникало неограниченного роста, необходимы и клеточные популяции ограничивающие размножение клеток

(отрицательная обратная связь): все 3 элемента (регулируемая популяция, хелперная и супрессорная популяция) образуют элементарную саморегулирующуюся единицу из 3-х клеточных популяций (рисунок 5), названную нами КЛЕТОЧНЫЙ ГИПЕРЦИКЛ [46, 54]: популяция соматических клеток (Ga) регулируется стимулирующими (h) и ингибирующими (s) регуляторными популяциями.

Несмотря на простоту описания и большую биологическую значимость, «клеточному гиперциклу» не уделено достойного внимания в литературе. Между тем, концепция клеточного гиперцикла означает области [46, 82, 98, 157, 198, 200, 261, 287, 304].

- новый механизм в эволюции при формировании многоклеточных организмов, что сделало возможным само существование многоклеточных как единого целого;

- принципиально новый уровень регуляции клеточного роста в организме (уровень клеточных популяций), а, значит, и новую систему в организме;

- наличие процессов самоорганизации на данном уровне;

- основу для формирования более высоких уровней регуляции (нейрогуморального) и для опосредованного влияния этих уровней на собственно клеточный рост;

- основу для формирования новой специальной клеточной системы регуляции роста соматических клеток в организме – новой системы в организме [54], которая в свою очередь является основой формирования специальных систем – в том числе системы иммунитета – новая теория формирования иммунитета [48],

- а также новая «имунная теория старения» как истощения системы иммунитета вследствие изменения в регуляторных системах [49, 54].

Эволюция клеточного гиперцикла

Дальнейшее развитие клеточного гиперцикла в филогенезе должно было происходить по общим эволюционным законам – можно теоретически предсказать и экспериментально наблюдать следующие биологические феномены:

- увеличение числа регулируемых единиц,

- специализацию популяций клеток (выделение соматических и регуляторных популяций);

- специализацию регуляторных популяций, ведущую, например, к феномену "памяти" при регенерации органов и тканей, переносимой Т-лимфоцитами [11-13, 49, 54].

- появление функциональной регуляции (появление механизмов Go/G_1 перехода и его регуляции отдельно от G_1/S перехода),

- надстраивание систем регуляции целостного организма (для регуляции роста и развития).

На рисунке 6 показана структура гиперцикла, имеющего Go/G_1 уровень регуляции.

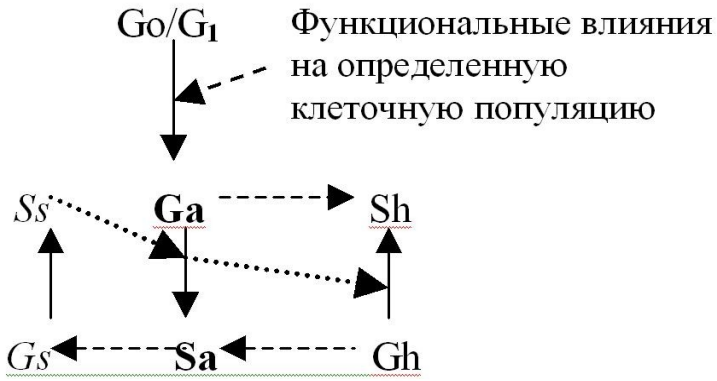


Рисунок 6. Гиперцикл с Go/G_1 уровнем регуляции

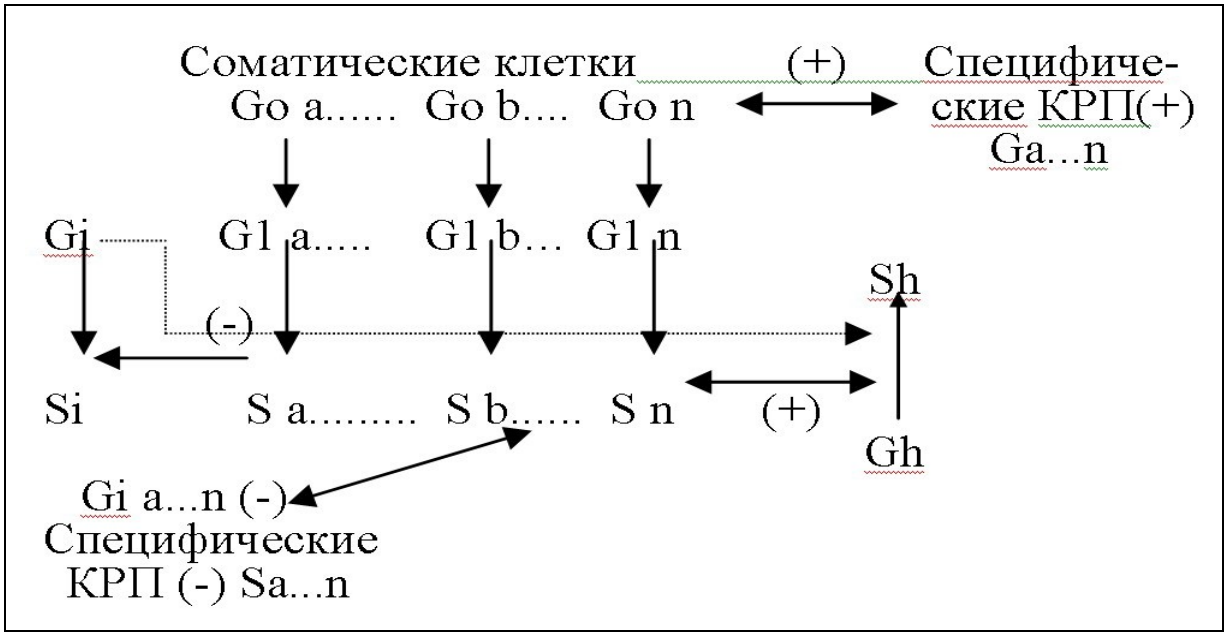


Рисунок 7. Общая полная схема «КРП-системы»

Здесь показана полная система регуляции клеточного роста (назовем ее «КРП система»), представленная регулируемыми соматическими клетками, неспецифическими клетками регуляторами (+) и (-) типа (стимуляторы и ингибиторы) и специфическими КРП для отдельных типов клеток.

Функционирование клеточного гиперцикла

Моделирование на основе данной схемы различных биологических процессов дает исключительно плодотворные результаты. Посмотрим, каким образом будет реагировать такая система на внешнее возмущение, отклоняющее ее от имеющегося баланса.

При включении Go/G_1 перехода (регенерация при повреждении ткани, функциональная нагрузка, модель фармакологически индуцированной искусственной стимуляции [49, 54] такого перехода) будет наблюдаться следующая последовательность биологических реакций: повышение количества G_1 соматических клеток активирует «h» клетки к пролиферации и выделению регуляторных факторов; только затем активируется G_1/S переход соматических клеток и появление активно делящихся соматических клеток активирует «s» клетки, подавляющие избыточную реакцию пролиферации регулируемых соматических клеток. От соотношения h/s клеток зависит интенсивность: репаративной регенерации, уровня фонового самообновления тканей и его снижения с возрастом и пр. Важно, что сам уровень такого соотношения есть функция нейро-гуморального фона, а снижение этого фона с возрастом может полностью объяснить все особенности «старческой» кинетики регенерации, снижение самообновления органов с возрастом и открывает перспективы влияния на эти процессы иммунофармакологическими средствами [46-54].

Фоновая регуляция клеточного гиперцикла

Рост и развитие – неотъемлемые части жизни. Они обычно регулируются генетической программой, которая реализуется обычно взаимодействием 2-х компонентов на уровне регуляторных центров: стимулирующего и ингибирующего (рилизинг-факторы гипоталамуса обычно). Известен основной механизм программного регулирования на этапе формирования организма: гибель (вероятно программная, апоптоз) супрессорных клеток (S) ведете к растормаживанию функции стимулирующих (H) клеток, продуцирующих регуляторный фактор (F).

Нервные регуляторные клетки (H и S) сосредоточены в гипоталамусе, в ядрах которого наблюдается с возрастом гибель до 80% этих клеток. Растормаживание стимулирующих клеток дает постоянный растущий градиент регулирующего фактора с максимумом при полной гибели ингибирующей популяции. Такой градиент, например, половых гормонов (конечных реализующих регуляцию факторов для данной функции) видимо, и ведет к включению полового созревания.

Если предположить, что регуляторные клетки с возрастом изнашиваются, гибнут случайным, вероятностным, образом и не возобновляются, то легко видеть, что возрастная динамика этих клеток и некоторого регуляторного фактора «F», который они коонтролируют, будет описываться системой линейных дифференциальных уравнений (см. выше), показывающих очень хорошее качественное соответствие реальной кривой смертности у млекопитающих и человека. Учитывая тот факт, что в организме имеются достаточно длительно живущие неделящиеся нервные клетки в других отделах мозга, можно говорить о принципиальной возможности резкого замедления старения путем замены (трансплантации) быстро гибнущих регуляторных клеток длительно живущими, либо молодыми, а также использованием ряда других методов влияния на эти процессы регуляции.

Т-клетки: регуляторы роста соматических клеток

Основным вопросом является – какие же именно клетки у современных млекопитающих и человека являются главными в регуляции роста соматических клеток организма. На этот вопрос есть совершенно четкие указания: как теоретические представления, так и экспериментальные данные указывают на преимущественную роль в таких процессах Т-лимфоцитов-регуляторов (хелперов и супрессоров), а именно, их ближайших предшественников, несущих SC антиген (видимо, для неспецифических КРП) и Т-клеток, участвующих в так называемой «сингенной смешанной культуре лимфоцитов», которые реагируют «на свое», а не как иммунные клетки на «чужое» (для специфических КРП).

Действительно, не трудно видеть при анализе требований, вытекающих теоретически из выше разобранных схем, что необходимые свойства, которыми должны обладать такие КРП, совпадают со свойствами регуляторных популяций лимфоцитов (главным образом Т-лимфоцитов).

КРП должны:

- быть подвижными (рециркулировать) в организме,

- иметь рецепторы к «своему», осуществлять распознавание «своего»,

- КРП должны обладать собственной пролиферацией, ускоряющейся в ходе выполнения ими функций регуляции клеточного роста других тканей, регуляция клетками КРП пролиферации должна иметь место для ЛЮБЫХ типов клеток в организме, в том числе лимфоцитов-эффекторов при иммунном ответе и пр.

С другой стороны, имеются в настоящее время факты, указывающие на то, что именно лимфоцитам принадлежит главная роль в регуляции клеточного роста не только иммунных, но и любых иных типов клеток в организме. Эти работы настолько важны, что в свое время были удостоены в СССР авторского свидетельства на открытие и важнейшие работы здесь сделаны российскими учеными [11, 12].

Напомним главные экспериментальные факты из этой области:

- наибольший международный и отечественный резонанс имели работы по переносу лимфоцитами так называемой "РЕГЕНЕРАЦИОННОЙ ИНФОРМАЦИИ": лимфоциты от животных с регенерацией тканей любого типа были способны индуцировать митозы и рост клеток соответствующего типа при сингенном переносе интактным животным [11, 12, 84, 120, 127, 153];
- перенос гиперпластической реакции лимфоцитами возможен для любых тканей и при любых процессах например, при изопротеренол-индуцированной гипертрофии слюнных желез грызунов, при функциональной гиперплазии сердца и др. [49, 54, 120];
- известна регуляция Т-лимфоцитами пролиферации фибробластов в т.ч. выделяемых лимфокинов, специфических для них [14] и других типов клеток [106];
- было показано, что симптомы разрастания костной ткани – остеопетроза, коррегируются переносом лимфоцитов от здоровых животных; более того, паратире/оидный гормон, специфический для остеокластов, действует через Т-лимфоциты, на которых, но не на остеокластах, имеются к нему рецепторы [285];

- показано, что общую задержку роста карликовость мышей можно ликвидировать переносом лимфоцитов от здоровых животных, а на Т-лимфоцитах есть рецепторы к соматотропному гормону и число их выше в период роста животных [86, 88];
- известен парадокс "Nude" мышей, противоречащий теории опухолевого надзора, (опухолевый надзор выдвигался как главный эволюционный фактор становления лимфоидной системы): у бестимусных мышей частота спонтанных и индуцированных опухолей не повышена, а снижена; более того, повышение частоты опухолей у них восстанавливается при переносе лимфоцитов от обычных мышей; у этих же животных снижение регенерации и самообновления тканей (дистрофический синдром) не может быть объяснено только снижением иммунитета и бактериальной инфекцией; у этих же мышей со временем Т-лимфоциты все равно появляются, то есть, роль тимуса играют обычные ткани, также стимулирующие пролиферацию и созревание Т-клеток [86];
- известны факты стимулирования и ингибирования лимфоцитами роста опухолей, не сводящиеся к типичным чисто иммунным феноменам [14, 47, 48, 86, 170, 276];
- при старении снижению клеточного самообновления (физиологической регенерации) предшествует дегенерация тимуса – источника Т-лимфоцитов [14, 22, 86];
- реакция «трансплантат против хозяина» и иные методы, приводящие к инактивации собственных лимфоцитов «хозяина» сопровождаются типичными «неиммунными» симптомами снижением индуцированной регенерации, дистрофией тканей и пр.;
- система Т-клеток-регуляторов гораздо более сложна, чем система Т и В-эффекторов иммунитета, причем Т-клетки иммунной системы распознают чужеродный антиген («чужое») в комплексе со «своим» антигенами главного комплекса гистосовместимости;
- подробно описана и исследована в иммунологии т.н. «сингенная смешанная культура лимфоцитов» – sMLC (сСКЛ), когда Т-клетки преимущественно Т-хелперного и Т-супрессорного (но не киллерного) типов реагируют бурной пролиферацией на СВОИ клетки организма, в том числе на неиммунные клетки; в классической иммунологии эти клетки "лишние" их можно убрать антисыворотками и обычные иммунные реакции не изменятся; в рамках сСКЛ интересны факты появления или повышения

количества Ia рецепторов, на которые реагируют Т-клетки, на неиммунных клетках различных тканей при подготовке их к клеточному делению, в том числе на опухолевых клетках и пр. [254, 276].

Из других интересных экспериментально найденных и теоретически ожидаемых следствий, вытекающих из теории о существовании КРП-системы (системы клеточной регуляции пролиферации), можно указать на следующие.

Известно из иммунологии и иммуногенетики рецепторов Т-клеток, что «распознавание чужого» в принципе не отличается от «распознавания своего», причем возможен перевод «своего» в «чужое» (аутоиммунные реакции) и «чужого в свое» (толерантность) в результате прежде всего изменений в регуляторных Т-клетках.

При распознавании Т-зависимых молекулярных антигенов в ходе иммунной реакции "чужое" распознается в комплексе со «своим» собственными антигенами главного комплекса гистосовместимости, которые представлены на «презентирующих» антиген клетках разного типа. Необходимость «презентации» антигена для лимфоцитов Ia-несущими клетками собственного организма объясняется тем, что эволюционно Т-клетки приспособлены к реакции именно на клетки, причем на готовящиеся к пролиферации клетки, а не на молекулы.

Специализированная клеточная система регуляции роста соматических тканей

Исходя из всех выше приведенных фактов, мы предположили, что функция регуляции клеточного роста «своих» клеток является филогенетически более древней и более важной собственно это и есть эволюционная сила, формирующая сложную систему Т-лимфоцитов-регуляторов пролиферации любых клеток, в том числе Т и В-эффекторов иммунитета, которые филогенетически более поздние и более простые. В таком случае, иммунная система только специализировавшаяся в отношении элиминации «чужого» – часть более сложной и общей системы – системы регуляции клеточного роста или «КРП системы» [46, 49, 53, 54].

2.2.2. Концепция новой регуляторной системы организма

Можно сделать некоторые очевидные выводы:

1. Должна существовать на межклеточном уровне специальная система регуляции роста соматических тканей, появившаяся, сложившаяся и усложняющаяся очень рано в эволюции.

2. Элементами такой системы являются КРП – некоторые популяции Т-лимфоцитов (для современных млекопитающих).

3. Элементарные свойства клеток такой системы можно видеть и для иных типов клеток, что позволяет проследить становление такой системы в эволюции (это прежде всего макрофаги и большие гранулярные лимфоциты или Естественные Киллеры – ЕК).

4. Через данную систему осуществляются многие регуляторные влияния иерархически более высокого системного уровня (например, гормонального и еще более иерархически высокого – нервного уровня).

5. Функционирование системы четко описывается и моделируется.

6. Именно необходимость регуляции клеточного роста в сложном организме, а не надзор за опухолями и явилась эволюционной причиной формирования сложной Т-лимфоидной системы, которая в иммунологии рассматривается односторонне как регуляторная система только для иммуноцитов.

7. КРП можно выделять, изучать, влиять на их активность, получать регуляторные специфические и неспецифические факторы и через них влиять на различные физиологические и патологические процессы.

8. КРП-система является особой, ОТДЕЛЬНОЙ от иммунной, системой организма, решающей задачи более общего и важного плана, чем собственно иммунная. Иммунная система может быть сведена к специализировавшейся части КРП-системы.

Осознанное отношение к лимфоцитам-регуляторам роста соматических клеток как к элементам КРП-системы позволило нам получить качественно более значимые результаты как при теоретическом рассмотрении, так и при экспериментальной работе.

В частности, нами были выделены и охарактеризованы такие Т-регуляторы роста различных соматических клеток организма, изучена их кинетика, особенности фенотипа, реакция на некоторые фармакологические

агенты, выделение регуляторных факторов, специфических для соматических клеток и др. [49, 54].

Для планирования экспериментального изучения системы КРП чрезвычайно полезным оказывается теоретическое рассмотрение вероятных закономерностей функционирования системы КРП.

Индукция КРП-системы выход ее из динамического равновесия, исходя из общей схемы, возможна по следующим типам:

1. Регенерационный запуск (Go–G_1 механизм, запускаемый естественными регуляторами той или иной ткани при ее повреждении),

2. Перенос регуляторных клеток (Gh и Gi механизм) искусственный механизм, использованный, например, А.Г. Бабаевой при воспроизведении феномена "переноса регенерационной информации" [11-13],

3. Функционально-гипертрофический запуск (Go–G_1 механизм), например, воспроизводимый Г.Я. Свет-Молдавским с соавторами при изучении пассивного переноса лимфоидными клетками компенсаторной гипертрофии миокарда [120],

4. Экспериментальный фармакологический запуск (Go–G_1 механизм), воспроизведенный, например, нами при изопротеренол-индуцированной гипертрофии слюнных желез грызунов [49, 54],

5. Экспериментальный фармакологический запуск (Gh и Gi механизм по типу пункта 2), также полученный нами на аналогичной модели [49,54],

6. Интерференция при любом клеточном росте (регенерация, опухолевый рост, иммунная реакция) за счет неспецифических КРП (Gh и Gi механизм) неоднократно показанные феномены интерференции процессов роста различных типов клеток, в том числе иммунокомпетентных клеток.

Все эти типы индукции системы КРП сводятся, как нетрудно видеть, всего к двум типам запуска:

а) повышение числа клеток в G_1 состоянии;

б) изменение активности и количества самих КРП клеток.

Исходя из известных свойств Т-лимфоцитов, которым приписывается роль КРП, а также исходя из выше приведенных теоретических схем, можно также ожидать и более частных особенностей функционирования системы КРП, которые действительно наблюдаются во многих типах экспериментов самых различных авторов:

- быстрая (в течение часов и минут) активация КРП/+/,

- это возможно если у КРП/+/ нет Go фазы они должны быть заторможены в G_1/S стадии (филогенетически древний механизм),

- при любом росте соматических клеток идет пролиферация и КРП/+/,

- выделение клетками КРП/+/ регуляторных стимулирующих клеточный рост факторов;

- реакция на «свое» (зависимость эффекта по Н-2 системе главного комплекса гистосовместимости) для неспецифических КРП (филогенетически древний механизм);

- в иммунологии должна быть сингенная смешанная культура лимфоцитов «на свое» (действительно есть лимфоциты участвующие в sMLC);

- поздняя активация КРП/-/ уже после начала пролиферации соматических клеток;

- КРП/-/ должны пролиферировать быстрее чем КРП/+/, видимо, постоянно медленно пролиферировать и увеличивать скорость пролиферации в ходе своей активации;

- КРП/-/ должны выделять регуляторные ингибирующие рост факторы,

- КРП могут мигрировать в организме в ходе активации и функционирования;

- при вторичном ответе должны преобладать специфические КРП/+/ и КРП/-/,

- специфические КРП должны иметь случайный клоновый механизм активации (реагировать не "на свое", а "на все" в том числе "на чужое" они могут быть Н2 не зависимы);

- КРП специфические могут случайно формировать клоны к «чужому», что дает возможность развития иммунитета как специализации системы КРП к антигену,

- в иммунной реакции сохраняются закономерности КРП – реакция «на свое», взаимодействие специфических и неспецифических КРП и другие характерные для системы КРП свойства,

- между различными процессами с клеточной пролиферацией должна быть интерференция (регенерация опухолевый рост иммунитет и другие процессы интерференции),

- при возрастном снижении активности КРП снижается и уровень фонового потенциала роста тканей, но это регуляторный и принципиально обратимый процесс,

- при опухолевом росте активируются КРП/-/ и в меньшей степени /+/,

- так как регуляция опухолевых клеток нарушена, то при опухолевом росте подавляется регенерация, иммунитет и пр., за счет избыточной активации КРП/-/ системы,

- КРП имеет **свои специфические задачи** и формирует **свою специальную систему** в организме, отличную от иммунной и филогенетически более древнюю, решающую более важные задачи, чем иммунная система задачи интеграции многоклеточного сообщества в единый организм, иммунитет появляется как специализация части системы крп в иммунную в ходе реакции "на чужое" (в филогенезе и онтогенезе).

Специфические КРП более четко проявляли свои эффекты при повторных индукциях роста соматических тканей, при этом обнаруживался эффект «памяти» и отличия специфических КРП от неспецифических, например, отсутствие Н-2 ограничения их эффекта [49, 54].

Адсорбцией на активированной сефарозе с привязанными выделенными мембранами тканей можно показать наличие специфических и неспецифических факторов подобного типа [49, 54].

Наконец, КРП бластные клетки пиков, можно исследовать средствами клеточной и молекулярной иммунологии и биологии: изучить их фенотип, дифференцировку, рецепторы, механизмы активации, чувствительность к различным веществам и пр., что и было во многих отношениях сделано выше поименованными авторами.

Свойства лимфоцитов-регуляторов роста соматических тканей

Здесь приведены таблицы первичной оценки свойств КРП /-/ и/+/ специфического и неспецифического типа, полученные рядом перечисленных выше авторов и нами в ходе ряда экспериментов [49-54].

Таблица 3.

Сводная таблица фенотипических свойств КРП /+/ и КРП/-/

N	**СВОЙСТВА**	**КРП /+/ неспецифические**	**КРП /-/ неспецифические**	**КРП /+/ специфические**	**КРП /-/ специфические**
1	Сроки активации	26 часов	20-30 часов	повторная реакция	повторная реакция

2	Состояние в покое	в G_1 состоянии	в S состоянии	в Go ?	в Go ?
3	Характер активации	запуск G_1/S	Активная пролифе-рация	клоновый рост	клоновый рост
4	Чувстви-тельность	к G_1 клет-ки мишени	к S состо-янию	к антигенам тканей	к антигенам тканей
5	Антигены	SC(+) Thy1 (-), Ly1(+)	Thy1, Ly2	больше Ly2	больше Ly2
6	H-2 специ-фичность	есть	есть	не типична	не типична
7	Тканеспеци-фичность	нет	нет	да	да
8	Предше-ственники	замена за 3-4 дня	замена за 24 ч	длительно	длительно
9	Интерфе-ренция	неспецифи-ческое сти-мулирова-ние	неспецифи-ческое ин-гигибиро-вание	Специфи-ческая память	Специфи-ческая память
10	Иммунная память	не типична	не типична	типична	типична

Учитывая значимость снижения потенциала клеточного роста соматических тканей для процессов старения многоклеточных организмов, нами была сформулирована новая иммунная теория старения, указывающая на важную роль в развитии процессов старения возрастного дефицита лимфоцит-зависимой функции регуляции роста соматических тканей.

Таблица 4.

Сводная таблица молекулярно-биологических свойств КРП /+/ и /-/

N	**СВОЙСТВА**	**КРП /+/ неспецифические**	**КРП /-/ неспецифические**
1	Плотность активирован-ных клеток	1.07	1.06
2	Актиномицин Д (синтез РНК)	подавляет	мало эффективен
3	Циклофосфан (синтез	умеренная	высокая

	ДНК)	чувствительность	чувствительность
4	Ингибиторы протеаз	подавляет	мало эффективен
5	Цинк хлорид (кальций – зависимость)	подавляет	подавляет
6	Гидрокортизон – чувствительность	умеренная	высокая
	Простагландины		
7	$ПГЕ_2$		
	Рецепторы	есть	есть
	Эффект на пролиферацию	стимуляция	не влияет (?)
	Синтез факторов регуляции	не влияет (?)	стимуляция
8	$ПГФ_2$альфа:		
	Рецепторы	есть	есть
	Эффект на пролиферацию	подавление	не влияет (?)
	Синтез факторов регуляции	стимуляция(?)	не влияет (?)
	Рецепторы к БАВ:		
9	Серотонин	есть	есть
10	Гистамин	есть (Н1)	есть (Н2)
	Ингибиторы аминооксидаз		
11	иМАО	э ф ф е к т и в е н in vivo	
12	иДАО	э ф ф е к т и в е н in vivo	
13	ДОФА	э ф ф е к т и в е н in vivo	
14	Лимфокейлон	э ф ф е к т и в е н in vivo	
15	Литий хлорид	э ф ф е к т и в е н in vivo	
16	Эффект цАМФ:		
	На ролиферацию	стимуляция	не эффективен (?)
	Рецепторы	перенос в клетку	----------
	Зависимость от		

	ионов кальция:		
	Внеклеточного	не зависит	----------
	Внутриклеточного	зависит	----------
	Зависимость от синтеза белка	зависит	----------
17	Эффект цГМФ:		
	На пролиферацию	не эффективен(?)	стимуляция
	Рецепторы	----------	на мембране
	Зависимость от ионов кальция:	----------	
	Внеклеточного	----------	зависит
	Внутриклеточного	----------	не зависит
	Зависимость от синтеза белка	----------	не зависит

Новая концепция возникновения иммунитета

Из выше сказанного ясно, что данная регуляторная и интегрирующая функция лимфоцитов (регуляция клеточного роста взаимодействующих популяций разнотипных клеток и объединение их в единый организм) является древнейшей и важнейшей функцией, которая и является системообразующей функцией для возникновения и формирования в дальнейшем собственно иммунной системы, как ее понимают классически иммунологи.

К настоящему времени теоретическая иммунология вошла в очередной кризис: все ранее выдвинутые теории возникновения иммунитета получили последовательно нобелевские премии, а затем были оставлены:

- теория об анти-инфекционной функции иммунных клеток;
- теория об «опухолевом надзоре»,
- теория о распознавании «свое-чужое», развиваемая в связи с задачами трансплантологии.

Все эти представления оказались частными задачами для системы иммунитета и не объясняют ключевых вопросов иммунологии:

- древнейшее возникновение иммунитета,
- очень раннее развитие Т-системы лимфоцитов,
- очень высокую сложность регуляторных механизмов Т-лимфоцитов,

- наличие регуляторных механизмов у естественных киллеров – древнейших лимфоидных клеток, и у других иммунных и неиммунных клеток,

- наличие идиотип-анти-идиотипической регуляторной сети,

- необходимость презентации антигена в комплексе с главным комплексом гистосовместимости и антиген-выделения презентирующими клетками специальных стимуляторов, и пр.

Мы в свое время опубликовали в центральном иммунологическом журнале представление о том, что именно регуляция клеточного роста самых различных типов клеток является системо-образующим эволюционным фактором возникновения, становления и развития иммунитета (*Регуляция лимфоцитами клеточной пролиферации - альтернатива теории "противоопухолевого надзора"?// Иммунология. 1989. N. 5. С. 94-96*).

Эти представления органично включают все предыдущие теории как составные частные случаи и объясняют ключевые вопросы иммунной теории: объясняют древнейшее возникновение иммунной системы; объясняет очень раннее выделение ее как системы специализированных клеток, причем функции регуляции передавались, частично сохраняясь, от древнейших клеток (типа естественных киллеров), до эволюционно наиболее молодых; объясняют иерархическую и сложную системы регуляции; просто и ясно объясняют феномен распознавания «свое-чужое» и презентацию «чужого» в комплексе со «своим»: первично регуляторные клетки взаимодействовали не с молекулами, а с клетками, с собственными клетками организма, причем синергически – обмениваясь взаимо-регулирующими влияниями.

Эти представления включают в общую теорию иммунитета и множество известных в иммунобиологии фактов, остающихся на периферии внимания классических иммунологов, так как они не относятся, по их мнению, к собственно иммунным: регуляция клеточного роста и дифференцировки соматических клеток, синдромы дистрофии тканей при иммунной недостаточности и т.п.

Эти представления объясняют все усиливающийся интерес практических врачей к использованию иммунотропных средств не по прямому назначению – для ускорения заживления ран в хирургии, например, и т.п.

2.2.3. Новая иммуно-регуляторная теория старения

После формулировки Ф. Бернетом иммунологической теории старения функции иммунной системы в период старения подверглись пристальному изучению, была показана несомненная связь функций иммунной системы с процессом старения:

- прогрессирующая атрофия тимуса и всей лимфоидной ткани с возрастом,

- снижение предстоящей продолжительности жизни при снижении количества циркулирующих Т-лимфоцитов,

- сходство старческих изменений и процессов, наблюдаемых при ранней тимэктомии и иммунодефицитах иной природы, иммунологические расстройства и нарушения экспрессии антигенов гистосовместимости при прогериях и пр.

Возрастные изменения отмечаются для всех функций системы иммунитета, особенно для Т-системы иммунитета:

- атрофия тимуса, селезенки и лимфоузлов, снижение числа периферических Т-клеток,

- увеличение числа незрелых лимфоцитов вследствие задержки их дифференцировки,

- снижение числа предшественников Т-клеток и выраженное снижение продукции тимических гормонов с диссоциацией в сторону активации Т-супрессорных механизмов, сопровождающейся активацией неспецифических Т-хелперов и Т-супрессоров, что растормаживает аутоиммунные процессы,

- уменьшение разнообразия антигенного репертуара лимфоцитов,

- снижение продукции ИЛ-2 Т-хелперами,

- выраженное снижение способности лимфоцитов активироваться собственными клетками организма снижение так называемой сингенной смешанной культуры лимфоцитов,

- снижение противоопухолевой устойчивости организма и др.

Представления о механизме инволюции тимуса как важнейшем регуляторе процесса старения поддерживается рядом авторов [156, 176, 269].

Наиболее показательными изменениями с возрастам считают [119] следующие.

Наиболее значимо, видимо, изменяется продукция тимических пептидов с возрастом, которые после 40 лет уже практически не обнаруживаются в периферической крови. Это ведет к прогрессирующей возрастной атрофии тимуса, затуханием процесса поставления новых Т-лимфоцитов, способных распознавать новые антигены: снижается количество «наивных» Т-клеток (особенно для CD4+ Т-лимфоцитов – с 56% в 20 лет до 19 в 80 лет) с повышением Т-клеток памяти (для CD4+ Т-лимфоцитов – с 42% в 20 лет до 79% в 80 лет).

Одновременно резко снижается экспрессия CD28+ антигена на поверхности Т-лимфоцитов, который является ко-стимулятором пролиферации при активации лимфоцитов в ходе иммунного ответа антигеном.

С возрастом снижается общее соотношение лимфоцитов и нейтрофилов, а также абсолютное содержание CD4+ и CD8+ клеток, как и В-лимфоцитов, тогда как количество NK (естественных киллеров, с фенотипом CD16+CD56+CD57+) повышается (функциональная активность последних, однако, даже несколько снижается, таким образом, страдает качество этих клеток).

С возрастом закономерно повышается аутоиммунные компонент, антитела против ДНК и тироглобулина, иммуноглобулины крови и изменяются CD4+CD25+ Т-лимфоциты, регулирующие аутоиммунные реакции.

Закономерно повышается содержание провоспалительных лимфокинов: ИЛ-6 и ФНО-альфа, которые даже стали называть «лимфокинами старения». Повышается также содержание в крови М-КСФ, онкостатина, фактора стволовых клеток (лиганл c-kit молекулы важной для процессов активации и пролиферации лимфоцитов).

Снижается с возрастом содержание в крови ИЛ-2, ИЛ-10, ИЛ-11 и ИЛ-13, а также ИЛ-7, который ответственен за атрофию тимуса.

С возрастом повышается чувствительность лимфоцитов к апоптозу, снижается способность к активации и пролиферации, а также полноценной дифференцировке.

Интересно, что тестостерон и эстрогены способны прямо индуцировать атрофию тимуса, видимо, без участия кортикостероидов, что связывает процессы окончания роста и развития и полового созревания с окончанием формирования иммунитета и началом его инволюции.

Все эти данные подробно описывают возрастные изменения иммунного ответа, но до сих пор, однако, не удавалось теоретически связать

два возрастных процесса – прогрессирующую лимфоидную дистрофию с возрастом и прогрессирующее снижение самообновления тканей иного типа как известный главный механизм старения самообновляющихся тканей в старости.

Известно, что такое снижение самообновления разнообразных тканей с возрастом сопровождается по неясным причинам развитием генерализованного G_1/S блока для процессов пролиферации: увеличивается число готовых к пролиферации, но не получивших дальнейшего стимула для этого процесса клеток.

В то же время, в иммунологии хорошо известен такой G_1/S блок, типичный для лимфоцитовэффекторов старых животных, но в иммунологии хорошо изучена многими авторами и причина его – дисбалланс функций Т-лимфоцитов-регуляторов, заключающийся в снижении общего числа Т-регуляторов и повышении доли Т-ингибиторов.

Эти данные, наряду с известным резким снижением sMLC (реакция пролиферации Т-лимфоцитов при контакте с собственными клетками организма) в старости, корреспондируют с выше разобранными представлениями о системе КРП в организме.

Исходя из всего этого, нами была разработана **новая лимфоидная регуляторная теория старения.**

Основные ее положения могут быть сведены к следующему:

1. Ведущим механизмом старения соматических тканей является снижение их клеточного самообновления.

2. Снижение потенциала клеточного роста соматических тканей при старении определяется изменениями в системе лимфоидной регуляции пролиферации соматических клеток.

3. Сущностью изменений КРП в старости является увеличение доли КРП ингибиторов и абсолютное снижение общего числа КРП.

4. Нарушение соотношения КРП стимулирующего и ингибирующего типов ведет к снижению скорости продвижения соматических клеток из фазы G_1 в S, формируя G_1/S блок в тканях старых животных.

5. Прогрессирующее снижение пролиферативной активности клеток соматических тканей ведет к увеличению доли "старых" клеток, при этом "старческие" изменения являются результатом проявления нормальных

свойств таких, углубившихся в состояние дифференцировки, клеток с длительным периодом жизни.

6. Так как в тканях всегда идут процессы замещения молодыми клетками, наряду с процессами старения формируются процессы приспособления, гипертрофии и пр.

7. Изменения системы КРП являются результатом продолжения действия регуляторов ограничения роста организма после того, как рост закончен, при участии гипоталамо-гипофизарной системы и тимуса.

Нами показана возможность восстанавливать ростовые потенции тканей старых мышей некоторыми иммунотропными препаратами, особый интерес представляет возможность восстановления ростового потенциала тканей старых мышей сывороткой крови от молодых животных [49, 54].

Можно, таким образом, полагать, что при старении резко снижается функция Т-лимфоцитов КРП-системы как результат изменений в регуляторных системах организма. Мы обнаружили ряд таких данных экспериментально и показали возможность реактивации и быстрого восстановления потенциала роста клеток при воздействии на клетки КРП-системы [49, 54].

Предлагаемая новая иммунная теория, таким образом, имеет не только теоретический интерес, но и позволяет использовать весь потенциал иммунофармакологии для противодействия одному из важнейших механизмов старения снижению с возрастом клеточного самообновления у многоклеточных, в том числе у млекопитающих и человека.

Приведенные методы теоретического исследования и моделирования старения показывают мощные возможности этих методов познания и их необходимость использования при изучении феномена старения, так как многие вопросы старения как глобального феномена могут быть поняты и изучены только на абстрактном уровне теоретического знания. Моделирование позволяет проверить такое теоретизирование и приблизить теорию к практическим исследованиям. Для теоретических исследований выше разобранного плана нами разработана компьютерная модель – «МОДЕЛИРОВАНИЕ СТАРЕНИЯ» (рисунок 9). Система позволяет:

- Моделировать причину старения (снижение общей жизнеспособности) и ее противоположную величину – смертность,
- Моделировать основные механизмы старения,

• Вычислять демографические показатели старения (дожитие, смертность, интенсивность смертности и его логарифм),

• Вычислять коэффициенты формулы Гомперца-Мейкема и проводить все типы расчетов с формулой, а также строить графики по формуле,

• Моделировать совокупность, вазимовлияния механизмов старения,

• Моделировать внешние влияния на кривые выживаемости и смертности, прогнозировать их изменение при изменении механизмов старения,

• Моделировать иерархию регуляции клеточного роста (кейлоны – межклеточные взаимодействия – клеточный гиперцикл (межпопуляционная регуляция) – функциональная регуляция – центральная нервно-гуморальная регуляция),

• Моделировать изменения регуляции и влияние на старение,

• Прогнозировать изменение продолжительности жизни и кривых старения при влиянии на механизмы старения, на процессы регуляции клеточного роста и на центральные регуляторные центры.

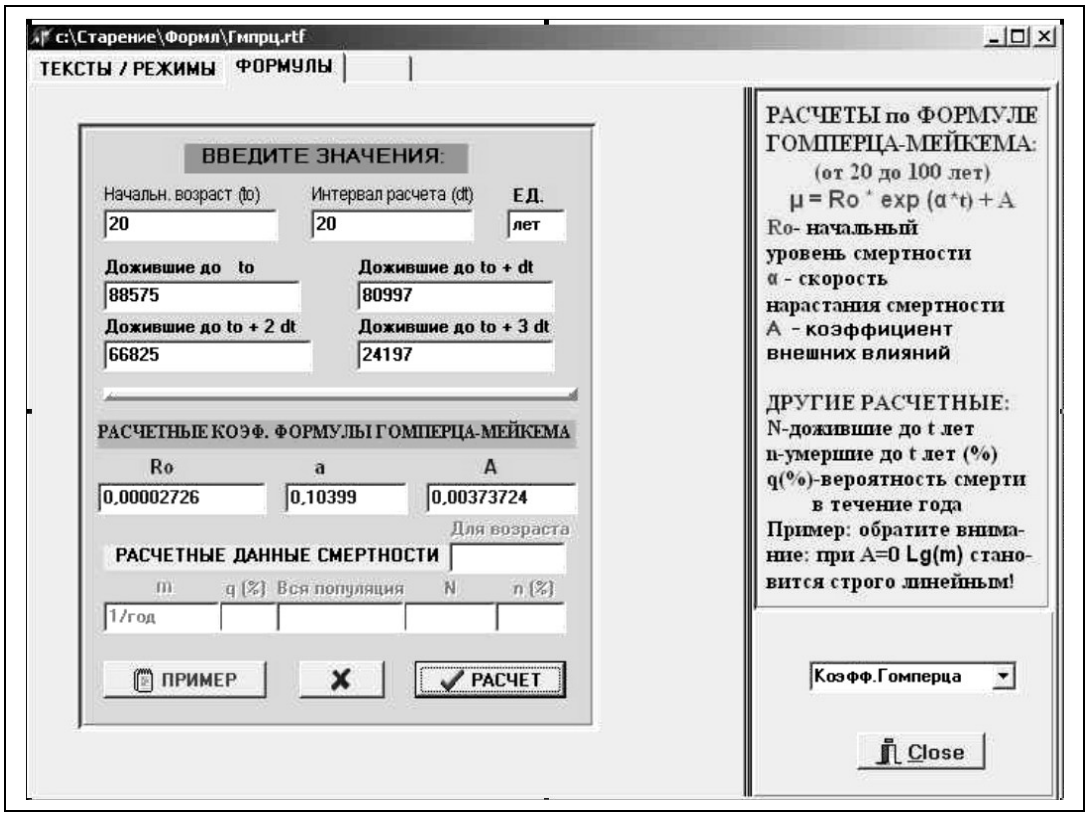


Рисунок 8. Окно расчета параметров старения по формуле Гомперца-Мэйкема компьютерной программы «Моделирование старения»

Глава 3.
Естественные модели изучения старения

3.1. Соматические заболевания как модели изучения старения

Расстройства тех или иных функций может проявляться не только как результат генных нарушений, но и как обычные заболевания различной природы. Сходство проявлений старения с симптомами тех или иных заболеваний послужило основанием для использования опыта медицины для поиска средств воздействия на старение и исследования механизмов старения. Наиболее подробно, видимо, уделил внимание этому известный геронтолог И. Пархон в своей классической «Возрастной биологии». Им описаны проявления преждевременного старения при заболеваниях ряда внутренних органов и гормональных расстройствах, а также показана возможность обратимости этих процессов.

Так, при заболеваниях желудочно-кишечного тракта с нарушением процессов всасывания в течение нескольких лет было отмечено: снижение эластичности кожи, морщины, седые волосы, общие явления атрофии органов и тканей и явления авитаминоза.

Описаны явления гипотрофии, общей слабости, кожные нарушения при поражении передней и задней долей гипофиза.

Типичные проявления раннего постарения: общий вид, атрофия кожи и органов, поседение, снижение половой функции являются следствием повышенной функции щитовидной железы; а при пониженной функции – снижение обмена веществ, что также типично для старения.

Нарушения функции коркового вещества надпочечников ведет к типичным проявлениям раннего полового и общего развития, включая психические особенности и ожирение.

Отмечены старческие проявления при поражении нервной системы, в том числе быстрое постарение при психических травмах и пр.

Наибольший интерес в данных наблюдениях представляет развитие сходных со старением симптомов и возможность их обращения при ликвидации заболевания, а также принципы их синдромной и симптоматической коррекции, которые могут быть перенесены на обычное старение. На

основе этих наблюдений давно предложены методы воздействия на старение, сохранившие свое значение вплоть до настоящего времени: введение анаболиков для повышения анаболизма и ликвидации гипотрофии при старении, использование витаминотерапии и заместительной ферментной терапии, заместительная гормонотерапия при климаксе и остеопорозе, введение гормонов щитовидной железы, терапия половыми гормонами, ДГЭА и гормоном роста, введение мелатонина и эпифизарного гормона и пр.

Известны также попытки сравнить симптомы при старении и стрессе – имеется целый ряд симптомов, сходных для обоих состояний [67]: изменение баланса положительных и отрицательных эмоций, неравномерность возбудимости различных структур лимбической системы и гипоталамуса, изменение соотношений тонуса различных отделов вегетативной нервной системы, повышение концентрации адреналина, АДГ, АКТГ и кортизола в крови, снижение концентрации половых гормонов, Т4, Т3 гормонов щитовидной железы, уменьшение инсулиновой активности крови, повышение концентрации эндорфина, мет- и лейэнкефалинов, свободнорадикальное повреждение мембран, внутриклеточное накопление Ca^{2+}, иммунодепрессия, снижение толерантности к углеводам, гиперхолестеринемия, гипертензивные реакции, снижение или нарушение функций сердца, легких, микроциркуляторные нарушения и гиперкоагуляция. Нами предложено использовать синдром хронической усталости как естественную модель старения [114].

3.2. СХУ – естественная модель старения, исследования средств геропрофилактики

Термин «синдром хронической усталости» (СХУ) был предложен в 1988 г. G. Holmes. По симптоматике СХУ напоминает астению, неврастению, астению переутомления, другие неспецифические расстройства, за которыми он часто и скрывается. Однако особенности его течения вынудили исследователей отделить СХУ от других заболеваний в отдельную нозологическую форму. В настоящее время СХУ посвящено значительное число работ и имеется ряд обзоров [7, 69, 114, 238, 315].

Ведущее значение в развитии СХУ и хронизации процесса принадлежит, видимо, расстройствам нейро-иммунных механизмов адаптации у

генетически предрасположенных лиц. К агентам, индуцирующим такие нарушения, относят прежде всего вирусы: вирус герпеса, вирусы Коксаки А и В, энтеровирусы. Нарушения клеточного иммунитета, прежде всего натуральных киллеров, рассматривают как типичное проявление последствий вирусной инфекции. Нарушения обмена серотонина – «гормона сна», а также, как показали многие исследователи, играющего важную роль, вместе с дофамином, в регуляции иммунитета, могут объяснить некоторые психо-эмоциональные изменения (астено-депрессивные и тревожно-фобические синдромы), как и нарушения сна, отмечаемые в 95% случаев у больных СХУ. Считают также, что нарушения серотонин- и норадреналин-эргической иннервации нейронов пирамидного тракта могут вызывать симптомы мышечной слабости и утомляемости, преходящие неврологические симптомы, как в случае миалгического энцефаломиелита, относимого в настоящего времени к СХУ как одному из его вариантов.

То, что СХУ относят в настоящее время к социально-стрессовым расстройствам и частая скрываемость СХУ за астеническими, неврастеническими, психастеническими расстройствами, ясно указывает на важнейшее значение эмоционально-психических нагрузок в патогенезе СХУ.

Считают, что при СХУ резко повышается количество CD4+ популяции Т-клеток и В-клеток (субпопуляции CD20+ и CD5+), уменьшается количество Т-клеток с фенотипом CD8+. Обнаруживают при СХУ также антиядерные антитела и ревматоидный фактор в низких концентрациях без клинических признаков ревматоидного артрита, а также повышение титров криоглобулинов у 8% больных СХУ и холодовых агглютининов.

Считают, что для постановки диагноза СХУ требуется наличие одного "большого" симптома и не менее 6 "малых".

К большому симптомокомплексу относят длительную усталость по неизвестной причине, не проходящую после отдыха, и снижение более чем на 50% двигательного режима.

К малым симптомам относят мышечный дискомфорт, лихорадку, болезненность лимфоузлов, артралгии, снижение памяти и депрессию.

Собственно лабораторных тестов, специфических для СХУ, нет.

В Клинике неврозов и пограничных состояний Челябинской областной клинической психоневрологической больницы N 1 за 3 года наблюдалось в общей сложности более 100 пациентов, которым был установлен диагноз «Синдром хронической усталости» [91, 114, 52]. Было отмечено,

что данный синдром наблюдается в настоящее время со значительной частотой и закономерностью в основном среди нескольких групп населения, которые предлагается относить в группу риска:

1. Ликвидаторы аварии на ЧАЭС и лица, длительно проживающие в местах экологических бедствий и радиационных катастроф.

2. Постоперационные больные (во многих случаях перенесшие онкологические заболевания).

3. Больные с хроническими воспалительными заболеваниями, часто не диагносцированными до момента обращения по поводу собственно синдрома хронической усталости.

4. Бизнесмены и лица, занимающиеся длительной интенсивной однообразной работой, связанной с выраженными стрессами, высокой ответственностью и мало подвижным образом жизни.

Общий комплекс лечения включал:

1. Дозированный режим отдыха и физической нагрузки, включающий прежде всего пешеходные прогулки по окружающей клинику территории от 2-х до 5-ти часов ежедневно (с перерывами).

2. Витаминотерапию - главным образом витаминами группы В: В1 - 1- 3 мг, В6 - 2 - 4 мг, В12 - 500 мкг ежедневно в течение 10-15 дней и витамин С 3- 5 мг в/м или в/в на 40% глюкозе 10 - 15 инъекций на курс.

3. Небольшие дозы дневных транквилизаторов (рудатель, мезапам).

4. Водные процедуры - кислородные ванны и душ Шарко.

5. Аутогенную тренировку на расслабление мышц, общую и психическую релаксацию.

6. Ноотропные препараты или церебролизин в заключительную фазу долечивания.

В качестве оригинальных методов патогенетического воздействия на синдром хронической усталости использовали следующие средства:

1. Разгрузочно-диетическая терапия (РДТ)в виде дозированного краткосрочного голодания.

2. Очищенная на установках типа "Изумруд" экологически чистая электро-активированная вода в количестве 1-1,5 литра в день.

3. Новый фито-гомеопатический иммунокорректор "Сандра" от 4-х до 6 таблеток в день в среднем в течение всего курса лечения (кроме периода голодания).

Обязательным условием для пациентов было применение в конце восстановительного периода средних доз ноотропила внутривенно или внутримышечно.

Хороший эффект оказывал также церебролизин в дозах по 5 мл в/в ежедневно всего 10 инъекций. У 20% больных с выраженными депрессивными симптомами применялись ежедневно небольшие дозы антидепрессантов - амитриптилин 25-50 мг в сутки.

Примененная комплексная терапия была эффективна в разных группах - от 50 до 85% пациентов.

Отмечалось быстрое, в течение 7-10 дней улучшение общего состояния. Наблюдалось четкое уменьшение астенической симптоматики, уменьшение болезненных ощущений в суставах, проходили головные боли, поднималось настроение. В результате проведенной терапии у пациентов нормализовался сон, снижалась дневная сонливость, повышалась выносливость к физической нагрузке, улучшалась память и интеллектуальная активность. Терапевтический эффект от данного комплекса лечения был стойкий и длительный: у 20% пациентов - до года и более, у 50% - в течение 8 месяцев, у 30% - до 5 месяцев симптомы хронической усталости не возобновлялись.

Таким образом, системный подход к лечению СХУ оказался оправданным, дав гораздо более удовлетворительные результаты, чем классические методы лечения СХУ.

Сравнение симптоматики СХУ и процессов естественного старения позволяют увидеть большую общность между ними в их главных проявлениях (таблица 5).

Таблица 5.

Главные механизмы и проявления СХУ и старения

№	СХУ	СТАРЕНИЕ
1	Медленное прогрессирование	Медленное прогрессирование
2	Причины неизвестны	Единая причина отсутствует
3	Патогенез комплексный, включает все системы организма	Генезис комплексный, затрагивает все системы организма
4	Дезадаптация и дисрегуляция выступают на первый план	Дезадаптация и дисрегуляция важнейшие общие проявления
5	Общее снижение самочувствия –	Общее снижение жизнеспосо-

	важнейший симптом диагноза	бности – важнейший механизм
6	Ионизирующее излучение вызывает СХУ	Ионизирующее излучение вызывает ускоренное старение
7	Изменения общей сопротивляемости и иммунитета типичны	Изменения общей сопротивляемости и иммунитета типичны
8	Стрессы безусловно участвуют в патогенезе СХУ	Теория хронических стрессов - признанная теория старения
9	Типично наличие скрытых хронических заболеваний	Типично наличие нескольких хронических заболеваний
10	Ограничения работоспособности – типичный признак СХУ	Ограничения работоспособности - типичные признак и исход
11	Главные симптомы: слабость, быстрая утомляемость, нарастающие расстройства внимания, раздражительность, неустойчивость эмоционально-психического состояния, нарушения памяти, работоспособности	Типичные проявления: слабость, нарастающие утомляемость, расстройства внимания, повышенная раздражимость, эмоционально-психическая неустойчивость, плаксивость, нарушения памяти
12	Расстройства сна и бодрствования: сонливость днем, бессонница ночью	Расстройства сна и бодрствования: сонливость днем, бессонница ночью
13	Прогрессирующее снижение работоспособности заставляет больных использовать как психостимуляторы так и снотворные одновременно	Прогрессирующее снижение работоспособности заставляет больных использовать как психостимуляторы, так и снотворные одновременно
14	Снижение веса: незначительное, но часто имеет место; иногда ожирение для ведущих малоподвижный образ жизни	Снижение веса типично, иногда ожирение особенно для ведущих малоподвижную жизнь
15	Боли в суставах, обычно крупных, позвоночнике типичны	Боли в суставах, позвоночнике типично для пожилых
16	Апатия, безрадостное настроение, эмоциональная подавленность – типичный признак СХУ	Апатия, безрадостное настроение, эмоциональная подавленность типичны для старения
17	Симптоматика течет прогрессивно и не может быть объяснена сопутствующими соматическими	Все проявления типичны, прогрессируют и не объясняются сопутствующими соматически-

	заболеваниями	ми заболеваниями
18	Клиническое обследование не выявляет никаких объективных изменение в начале СХУ	Клиническое обследование не выявляет никаких объективных патологий при старении
19	В далеко зашедших проявлениях типично снижение Т-иммунитета, ЭЭГ и психо-тестов	В старших возрастах типично снижение Т-иммунитета, ЭЭГ, психо-тестов
20	В лечение используют диеты, общая физическая культура, фито-микроэлементная терапия, иммунотерапия, витамины, биостимуляторы	Эффективны диеты, голодание, общая физическая культура, фито-микроэлементная терапия, иммунотерапия, витамины, биостимуляторы

Приведенная таблица сопоставлений СХУ и старения наглядно демонстрирует значительное сходство как в механизмах, так и в проявлениях и способах лечениях СХУ и сдерживания старения, что наводит на мысль об общности их некоторых патогенетических механизмов, что позволяет подойти более разумно к вопросам выбора диагностических критериев, оценки степени тяжести СХУ и способов эффективного влияния на него.

Взгляд на СХУ, как на принципиально системный процесс, позволил получить хорошие и отличные результаты в лечении этого нового заболевания. Следует напомнить, что традиционные средства монотерапии и ряд клинических приемов, использованных до настоящего времени в других клиниках мира, оказались мало эффективными при лечении СХУ.

3.3. Использование простейших для моделирования старения

У простейших процессы старения и самообновления – внутренней регенерации, тесно связаны с процессами роста и развития, в том числе с половым процессом.

Известно, что биологическая регенерация тесно связана со способами размножения – половым и бесполым. В цикле развития многих видов беспозвоночных с чередованием поколений (губок, кишечнополостных,

червей и др.) бесполые особи постоянно обновляются за счет стволовых клеток (СК) и старение у них отсутствует. После деления полихет, олигохет на фрагменты происходят увеличение числа СК, их миграции и трансдифференцировки в системе СК и формируются новые особи, которые бывают всегда моложе родительских. Система СК гидроидов образуется из эмбриональных СК – ЭСК, больших I-клеток, которые дают клетки- предшественники (малые i-клетки, нервные, секреторные и др.). Обновление организма осуществляется за счет активации СК нейропептидами, которые секретируются нейросекреторными клетками. С другой стороны, эти пептиды тормозят развитие гонад и половое созревание.

Многие виды гидроидов, червей, немертин, мшанок, асцидий и др. при сезонном похолодании и голодании редуцируются. При этом подавляется половое созревание и образование гамет, разрушаются старые клетки, а новые ткани образуются за счет СК. При полной редукции тела первой разрушается половая система, последними гибнут СК. Электронно-микроскопические исследования показывают сходство в обновлении тканей у молодых и голодающих олигохет, в отличие от интактных взрослых. В опытах с голоданием планарий их ПЖ увеличивалась более, чем в 25 раз. Четкие данные по старению одноклеточных можно видеть на примере **дрожжей**. Старые дрожжевые клетки резко снижают синтез белка (в разы) и увеличивают жировые включения (на порядок).

Обычная **амеба** является излюбленным простейшим для изучения старения, в частности, для решения вопроса о необходимости деления для полноценного самообновления (рисунок 10).

Амёба – это всеядное животное диаметром до 0,1 мм, обитающее в мелких прудах и проточных ручьях. Её пищу составляют микроскопические водоросли, инфузории, жгутиконосцы. Цитоплазма отделена от внешней среды тончайшей мембраной и дифференцирована на два слоя: прозрачный наружный (*эктоплазма* или *плазмагель*) и зернистый внутренний (*эндоплазма* или *плазмазоль*).

Известны опыты по многократному удалению части цитоплазмы у амебы, что приводит к прекращению деления (так как амеба не успевает дорасти до нужного размера), при этом ПЖ (как период между делениями) многократно возрастает. Однако, такое удаление цитоплазмы, является по существу, стимулом для усиленного самообновления внутри клетки, хотя, несомненно, деление клетки имеет дополнительные механизмы самообно-

вления, не наблюдающиеся при остановке клеточного деления. Наиболее полноценным оказывается половой процесс – деление с обновлением и «перетасовыванием» генного материала одноклеточных, что дополняется также взаимной конкуренцией новых клеток между собой на уровне популяции.

В ходе подготовки к делению простейшие претерпевают выраженные изменения – лизируются ряд внутренних и внешних структур (жгутики и пр.), которые затем возникают заново. Таким образом, деление простейших – сложный процесс многогранного самообновления, в котором и проходит жизнь типичных одноклеточных организмов. Таким образом, простейшие или одноклеточные – вовсе не простые организмы, они имеют сложное строение и циклы развития и тесно связаны в жизни, росте и развитии с внешней средой.

В целом, на примере простейших четко видно влияние внешних факторов, которые являются прямыми регуляторами скорости клеточного деления (и таким образом самообновления), процессов роста и развития, тогда как у многоклеточных внутренняя среда смазывает эти влияния, опосредуя регуляторными влияниями целостного организма.

Методы исследования простейших включают микроскопию их, культивирование и фиксацию. Исследуют сохранность морфологии в течение времени жизни, в ряде случаев – активность ферментов, содержание белка, реакцию на внешние агенты, скорость деления и наличие полового размножения. Для замедления движения инфузорий и других мелких двигающихся при помощи ресничек животных в каплю воды добавляют раствор вишневого клея или чистого гуммиарабика, иногда для этих целей используют глицерин. В вязкой среде движения животного замедляются. В некоторых случаях прибегают к анестезии.

Для анестезии применяется и целый ряд химических веществ: хлоралгидрат, сернокислый магний, слабые растворы спирта (10-15%). Анестезирующие вещества добавляют в среду с животными постепенно в виде капель крепкого раствора или кристаллов.

Кроме живого материала в большинстве случаев при изучении зоологических объектов используются фиксированные препараты. В состав фиксирующих жидкостей входят сильнодействующие на живую протоплазму вещества, достаточно быстро проникающие в ткани объекта.

Обычными компонентами фиксаторов являются растворы сулемы, пикриновой и хромовой кислоты, а также формалин, спирт, уксусная кислота и некоторые соли. Продолжительность процесса фиксирования варьирует в зависимости от объекта и состава жидкости в широких пределах.

3.4. Различные организмы и модели старения

Планарии (плоские черви) являются простыми и удобными моделями для изучения организмами. Плоские черви (Platyhelminthes) – это тип двусторонне-симметричных беспозвоночных животных. У плоских червей впервые среди многоклеточных животных появляется третий, средний, слой – мезодерма, участвующий в образовании органов и систем органов. В соответствии с названием, тело плоских червей сильно уплощено, а всё пространство между стенкой тела и органами заполнено недифференцированной соединительной тканью — паренхимой. Площадь поверхности тела велика по отношению к объёму, и обмен веществ в нём может поддерживаться путём простой диффузии. Кровеносная система отсутствует. Кожный покров образует эпителиальная ткань, иногда с ресничками. Мускулатура состоит из кольцевых, продольных и косых слоёв, образованных самостоятельными мышечными волокнами и обеспечивающих «червеобразное» движение. Ротовое отверстие расположено на переднем конце тела или на его брюшной стороне. Пищеварение, как правило, происходит в кишечнике; питательные вещества разносит по телу сама кишка, ответвления которой проникают во все части тела червя; анального отверстия нет; непереваренные остатки пищи выбрасываются через ротовое отверстие. Органами выделения являются примитивные протонефридии.

В передней части тела расположен примитивный мозг – передний ганглий, от которого отходят продольные нервные стволы. У свободноживущих форм на переднем конце тела сосредоточены органы чувств – осязательные щупальца, парные глаза, статоцист. Плоские черви – гермафродиты. Их репродуктивная система устроена достаточно сложно. У свободноживущих плоских червей цикл развития простой или с метаморфозом; у паразитических форм он, как правило, более сложен.

Значительные успехи в увеличении ПЖ достигнуты при изучении Caenorhabditis elegans (*C. Elegans)*. Это маленькая свободно живущая **нематода**. Известно точное количество нервных клеток в ее нервной системе (всего 302 клетки), синаптическая структура нервной системы, а каждый из ее нейронов полностью изучен электронно-микроскопически; геном полностью изучен в 1998 году.

Длина взрослой особи около 1 мм, тело состоит примерно из 1000 соматических и 1000 – 2000 половых клеток. Общий план строения в основных чертах такой же, как и у большинства высших животных: удлиненное тело обладает билатеральной симметрией и состоит из обычных тканей – нервы, мышцы, кишечник, кожа. Взрослые особи представлены двумя формами – гермафродитами и самцами. При самооплодотворении в основном возникают гомозиготные потомки. Полный цикл развития составляет около 3 суток.

Генетический аппарат C. elegans также очень простой: в 6 парах гомологичных хромосом содержится, по-видимому, около 3000 жизненно важных генов. Гаплоидный геном содержит 80 млн пар нуклеотидов (в 17 раз больше, чем у E.coli и в 38 раз меньше, чем у человека). С помощью мутационного анализа идентифицировано около 800 генов. Среди них гены, влияющие на форму и поведение червей, гены, кодирующие миозин и гены, контролирующие характер и направление развития, гены гибели и долголетия. Получена библиотека генома в виде большого набора перекрывающихся фрагментов ДНК.

Тело нематоды прозрачно, поэтому можно прижизненно наблюдать деление, миграцию и дифференцировку клеток, а также описать генеалогические отношения и поведение всех клеток, начиная со стадии одноклеточного яйца и кончая взрослым животным. Соматические структуры животного образуются по одной неизменной генеалогической схеме. Каждое из множества клеточных делений происходит в строго определенное время. Полное описание генеалогии C. elegans показало, что клетки каждого из дифференцированных типов, например, клетки гиподермы, нервные, мышечные и клетки гонад, происходят не от одной, а от нескольких клеток – "основательниц", которые возникли в независимых ветвях генеалогического древа. Следовательно, клетки, обладающие сходными признаками, не обязательно должны быть близкородственными. Напротив, близкородственными могут оказаться клетки, различающиеся

по множеству признаков, так, у C. elegans некоторые нейроны являются сестринскими по отношению к мышечным клеткам.

Цикл развития C. elegans около 9 суток, состоит из 4-х личиночных (3-5 дней) и репродуктивной стадий. При неблагоприятных условиях (голодание и др.) на 3-ей стадии образуется Dauer larva – продленная личинка в состоянии диапаузы с резко замедленным метаболизмом и развитием. Длительность этой фазы до 20 сут – не влияет на предстоящую ПЖ. Установлены гены (**daf-1, daf-2, daf-16, age-1**), ответственные за замедление развития, метаболизма и увеличение ПЖ D. larva. Известно более 50 мутантов C. elegans с увеличенной ПЖ. Однако у многих из них наблюдаются аномалии развития.

Существование популяций C. elegans с разной длительностью жизни убедительно демонстрирует, что темп старения находится под генетическим контролем. С помощью химических мутагенов удалось получить червей с большей на 50% средней и в 2 раза максимальной продолжительностью жизни, чем у их предшественников. Ген age-1 определяет активацию спермы, он рецессивен и плотно сцеплен с геном fer-15, влияющим на репродукцию, возможно это один и тот же ген; при этом одной из функций продукта дикого типа гена age-1 может быть усиление репродуктивных свойств, а другой – снижение продолжительности жизни.

Было обнаружено, что мутации в ряде других генов, названных «часовыми генами» (clk-1, 2 и 3) также влияют на продолжительность жизни C. elegans. Генетический анализ червей с мутациями в двух часовых генах или одном часовом и других генах, увеличивающих продолжительность жизни, выявили червей со специфическими комбинациями мутаций, живущих в **пять раз дольше**, чем нормальные, с удлинением каждой фазы жизненного цикла. Более того, такие черви реже питались и выделяли продукты жизнедеятельности, и медленнее двигались. Функция белков clk до сих пор неизвестна, но они могут действовать как регуляторы старения у нематод. Показано, что группа генов C. elegans, имеющих отношение к контролю продолжительности жизни (age-1, daf-2, daf-23, spe-26, clk-1) является частью общего генетического пути и контролируется геном age-1. Интересно, что daf-2 ген является гомологом рецептора инсулина. Уменьшение активности этого гена приводит к существенному (в 2 раза) увеличению продолжительности жизни нематод.

У C. elegans образуется 959 соматических и около 2000 половых клеток (ПК). Удаление у них зрелых ПК или гонад не влияет на старение и ПЖ. Однако при удалении родоначальных ПК, то есть СК, установлено 2-кратное увеличение ПЖ. Объясняют это тем, что половая линия является источником рост- подавляющего сигнала, аналогичного инсулин-подобному фактору 1 (IGF-1) у млекопитающих. Исключение этого фактора, как считают, способствует замедлению развития, старения и увеличению ПЖ. При этом рост взрослой особи продолжается до гигантских размеров. У других видов нематод увеличения ПЖ и/или гигантизма не обнаружено. Известно, что у некоторых видов млекопитающих гонадэктомия в молодости вызывает гигантизм (об увеличении ПЖ данные недостоверны).

Широко используемой моделью изучения старения простых организмов являются кишечнополостные.

Кишечнополостные (Coelenterata) – богатый видами тип примитивных многоклеточных животных с радиальной симметрией тела, часто придающей им сходство с цветком. Это первые животные, у которых появились настоящие ткани, они представляют, по сути, мешок, стенка которого состоит из наружного (эктодермы) и внутреннего (эндодермы) слоёв. Эктодерма состоит из сократительных эпителиально-мускульных и стрекательных клеток, а эндодерма – из пищеварительных эпителиально-мускульных и железистых клеток. Стрекательные клетки служат для нападения и защиты. Слои разделены *мезоглеей* – бесструктурным желеобразным веществом, в котором также могут находиться клетки. Дыхательная, кровеносная и выделительная системы отсутствует.

Внутреннюю часть тела занимает кишечная полость, нередко разделённая на отдельные камеры. Она открывается наружу ротовым отверстием, через которое происходит и заглатывание пищи, и экскреция. Рот обычно окружён щупальцами, служащими для захвата пищи. Пищеварение происходит как в кишечной полости, так и клетках эндодермы, захватывающих частицы пищи с помощью ложноножек.

Щупальца кишечнополостных – длинные, тонкие, способные сильно сокращаться и вытягиваться придатки, вооружённые микроскопическими стрекательными капсулами – *нематоцистами*. Капсулы содержат свёрнутую в спираль нить, которая может с большой силой разворачиваться, вонзаясь в тело мелких животных. Другая характерная особенность

кишечнополостных – это полиформизм. У большинства видов наблюдается чередование поколений: свободноплавающего (*медузы*) и прикреплённого к субстрату (*полипа*).

Нервная система представляет собой сеть из нервных клеток. Органы зрения (светочувствительные глазки) и равновесия (статоцисты) есть только у медуз.

Кишечнополостные размножаются почкованием, обычно приводящим к образованию колоний. При половом размножении гаметы выходят во внешную среду, где происходит их слияние. После этого из образовавшейся зиготы развивается подвижная личинка – *планула*. Полип или медуза возникают после метаморфоза планулы.

Классической моделью в экспериментальной геронтологии является **гидра,** в частности, в связи с тем, что они состоят из постоянно обновляющихся клеток – по существу, это постоянный поток клеток, образующихся с одного конца гидры и слущивающихся с другого. Это позволяет им фактически не стареть и существовать без размножения и полового процесса практически не ограниченно. Таким образом, на примере гидры четко видна связь старения организма с полноценным самообновлением его путем клеточного деления.

Мухи **дрозофилы** являются излюбленной вследствие удобства и изученности биологической моделью для изучения генных процессов и связи ПЖ с процессами роста, развития и влияниями внешней среды (рисунок 15). Обычным методом является изучение ПЖ их в различных условиях и при различных влияниях или генных изменениях.

Дрозофила – род содержащий более 500 видов. Благодаря своим особенностям дрозофила является удобным объектом генетических исследований: короткое время, размножения (десять дней от яйца до половозрелой мухи), большое число потомков, малый размер и неприхотливость в содержании, большое количество спонтанных мутаций, наличие политенных хромосом.

Жизненный цикл дрозофилы при 25 °С занимает 10 дней, при 18°С - месяц. Самки откладывают около 400 яиц, каждое из которых порядка 0,5 мм в длину. Яйца раскрываются через 24 часа. Вылупившиеся личинки растут на протяжении 5 дней, дважды линяя за это время: через 24 и 48 часов после рождения. Затем личинки выползают на поверхность,

подсыхая покрываются твердой оболочкой и претерпевают пятидневную стадию метаморфоза, в результате которого возникают взрослые имаго.

Самки могут быть оплодотворены только один раз за свою жизнь, после чего они непрерывно откладывают яйца, при этом сперма хранится внутри тела самки. После нескольких часов после вылета (5-8) самки остаются стерильными. В этот промежуток экспериментатор собирает вылетевших мух для скрещиваний.

Глаз дрозофилы состоит из 800 омматидиев, каждый из которых состоит из 8 проторецепторных клеток, поддерживающих клеток, пигментных клеток и роговицы. Мухи дикого типа имеют красный цвет глаз.

Как и в случае с C. elegans, мутанты дрозофилы, имеющие разную продолжительность жизни, были разделены с помощью химического мутагенеза. Среди полученных различных мутантов некоторые имели мутации в гене супероксиддисмутазы (СОД). Гомозиготные мутанты по этому гену развивались нормально, но продолжительность их взрослой жизни сократилась с 60 до 10 дней. Показано, что эти мутанты имеют повышенную чувствительность к веществам, продуцирующим свободные радикалы, и недостаточно активную сперму. С другой стороны, особи с увеличенным числом копий генов СОД и каталазы имели большую среднюю и максимальную продолжительность жизни.

Ускоренное старение у D.melanogaster является результатом не только мутаций в специфических генах, но может также быть результатом изменений в экспрессии эпигенетических факторов. Так, у старых мушек было обнаружено резкое снижение экспрессии белка фактора элонгации EF-1a, предшествующее общему снижению синтеза белков. Когда с помощью генетических манипуляций в геном мушек были добавлены дополнительные копии гена EF-1a, то это привело к значительному увеличению продолжительности жизни. Интересно, что манипуляции на одном гене, который не обязательно представляет важный механизм старения, вызывают значительные изменения в комплексном механизме трансляции.

Рыбы являются признанной моделью связи старения с ростом: постоянный рост в течение жизни делает старение рыб мало заметным, а ПЖ мало определенным. В известной книге Л.П.Сабанеева «Рыбы России» приводится известный случай гигантской щуки – историческая щука

императора Фдририха Барбароссы, выловленной через 277 лет после ее окольцевания.

Амфибии, **черепахи** – модель связи ПЖ с температурой, определяющей их скорость метаболизма, роста и развития. Крокодилы живут, видимо, сотни лет и достигают больших размеров. Процессы соотношения роста и развития, ПЖ, полового процесса, гипобиоза и регенерации, наблюдаемые еще у одноклеточных, проявляются и у многих пресмыкающихся, у которых несколько раз в году происходит смена рогового покрова (у змей) с последующим обновлением кожи и организма. Многие из них впадают в гипобиоз летом во время засухи и зимой. При этом происходит замедление половой функции, метаболизма, старения, редукция органов и тканей, а после гипобиоза обновление организма за счет СК, что позволяет некоторым видам доживать до 200 лет и более. Так, 35-летние исследования долгоживущих пресноводных черепах (Emydidae) показали, что их ПЖ 75-125 лет коррелирует с периодом полового созревания. Замедление развития и полового созревания в молодости существенно продлевало их жизнь.

3.5. Рост, развитие и продолжительность жизни.

Связь процессов роста, развития, старения и ПЖ известна давно, так как старение биологами и геронтологами рассматривается как этап онтогенеза, результат окончания программ роста и развития.

В целом, можно заключить, что продолжительность периодов роста, развития и ПЖ животных колеблется в очень широких пределах. Коловратки завершают полный жизненный цикл, от яйца до смерти за 50 - 60 часов, а некоторые из пресмыкающихся живут более ста лет (возможно, могут достичь 200-300 лет и более). Величина животных и связанные с этим – зародышевая жизнь, период роста и время достижения половой зрелости обычно пропорциональны их ПЖ. Но мелкие животные - попугаи, вороны и гуси, значительно переживают многих млекопитающих и гораздо более крупных птиц.

Бюффон определяет ПЖ как 6-7-кратный период роста. Но уже Вейсман приводит пример лошади - полная зрелость которой достигается в 4 года, а живет она в 10-12 раз дольше; тогда как ПЖ овцы только втрое превышает период ее роста. Попугаи, отличающиеся большой долговечностью, в то же время растут очень быстро. Они оперяются и способны размножаться уже в 1-2 года. Зародышевая жизнь длится менее месяца. У домашнего гуся при зародышевой жизни в 1 мес и коротком периоде роста ПЖ достигает десятков лет (ПЖ в сотни раз дольше периода роста). При установленных фактах ПЖ попугаев порядка 100 лет (попугай Чарли У.Черчилля) ПЖ их в 1000 раз больше периода половой зрелости.

В целом, в эволюции ПЖ животных должна обеспечить размножение и воспитание потомства. Но при общем обратном соотношении плодовитости и ПЖ, имеется множество исключений – многие виды попугаев несут 2-3 раза в год по 5-10 яиц, утки и гуси также и плодовиты, и долговечны.

Эволюция «не видит» поздних возрастов – за счет большой смертности в более ранних возрастах, поэтому эволюционное давление, направленное на стабилизацию и максимальную адаптацию организмов не распространяется на старшие возраста. В то же время, старшие возраста по этой же причине «безразличны» для эволюции (она никак не заинтересована в специальных механизмах «убирания» старшего поколения, как утверждают некоторые популярные экологические теории старения).

Таким образом, границы ПЖ животных колеблются в очень широких пределах и прямо не являются жестким эволюционным признаком. Огромные вариации ПЖ указывают на относительно простую возможность повлиять на ПЖ в широких пределах. Схожесть тканевого метаболизма и генетики, например, мыши и человека, при почти 100-кратном различии в ПЖ и, главное, сходными морфо-функциональными изменениями для 1-летней мыши и 100-летнего человека, указывают на возможность резкого изменения масштаба клеточного старения. На это же указывают различные прогерии и биология культур клеток.

Процессы роста и развития являются, вообще говоря, сложными и не связанными прямо, скорее, они регулируются параллельно, и состоят сами из различных компонентов. Так, под развитием понимают прежде всего

половое созревания, однако, даже нормальное половое созревание у человека различается на несколько лет, а при патологии может как возникать в раннем детстве, так и надолго задерживаться, при этом процессы роста и ПЖ практически не изменяются. Другими процессами, относящимися к развитию, являются созревание иммунитета и обратное развитие тимуса, эпифиза, собственно, и окончание роста – все эти процессы также могут независимо варьировать и значительно изменяться в сроках.

Процессы роста связывают напрямую со скоростью самообновления тканей, а не только с массой тела и линейными размерами. Длительный или постоянный рост (гигантские деревья, рыбы, амфибии и т.п.) обычно сопровождается и мало выраженными процессами старения для таких видов, а также фактически не фиксированной длительностью жизни, в противоположность, четкое ограничение размеров обычно связано также с четкими сроками ПЖ, что связывают с «особой формой» ограничения роста, практически, с тем, что по достижению максимума массы тела тут же начинают происходить обратные процессы – плато не образуется, и процессы роста тут же переходят в процессы атрофии тканей.

Сам процесс роста оказывается также весьма сложным, связанным на разных возрастных этапах с разными механизмами – ростовыми факторами крови, половыми гормонами, гормоном роста, найдена также связь с иммунными процессами. Карликовые гипо-гипофизарные иммунодефицитные мыши имеют низкую ПЖ. СТГ (и тироксин) резко повышают ПЖ, но только при раннем введении гормона, что указывает на связь процессов роста, развития и иммунитета. Гипофизарные влияния могут быть прямо связаны с процессами старения соединительной ткани – гипофизэктомия отменяет старение коллагена хвоста крыс, измеряемого по его растворимости в воде при 65ºС [202].

Методы воздействия на процессы роста и развития.

Наиболее известными и простыми являются **методы контроля окружающей среды**, обычно это контроль **пищевого** режима (известен как метод голодания), снижение **температуры**, изменение светового режима (изменение **биоритмов**, в том числе характера и продолжительности сна). По существу, это естественные методы, так как к ним организм естественным образом приспособлен в природе.

Метод **голодания** оказывается и наиболее эффективным, так как поступление пищи естественным образом влияет на скорость процессов роста и развития. Только данным методом удавалось продлить ПЖ мышей до 2-х раз, что фактически недостижимо никаким другим способом. Метод голодания также оказывается мощным аналитическим методом при использовании частичного голодания с **контролем компонентов питания**.

Изменяя количественный состав в рационе мышей и крыс белков, жиров и углеводов, было показано, что играет роль не общая энергетика питания (жиры и углеводы), а белки – основной компонент необходимый для формирования новых тканей растущего организма, что полностью укладывается в представления об изменении темпов развития как основе влияния на ПЖ, когда старение рассматривается как этап онтогенеза, наступающего после окончания роста и развития. Изменяя аминокислотный состав питания удалось показать центральную роль в данном методе влияния на ПЖ незаменимых аминокислот и среди них триптофана.

Интересно, что триптофан – предшественник серотонина, который, с одной стороны, является регулятором биритомов, сна и зимней спячки (гипобиоза), с другой стороны, является регулятором (отрицательным) иммунитета, а влияния на последний также признаются наиболее перспективными среди способов продления жизни в эксперименте, кроме того, иммунитет и процессы роста и развития тесно связаны, в том числе через прямую регуляцию пролиферации и роста тканей, как отмечено выше, что и составляет суть развиваемой нами новой иммуно-регуляторной теории старения.

Гипобиоз как метод влияния на рост, развитие, старение и ПЖ.

Одним из естественных методов выраженного влияния на процессы роста и развития является гипобиоз или зимняя спячка. В состояние гипобиоза впадает большинство беспозвоночных, пресмыкающихся, земноводных, некоторые виды рыб, птиц (козодои), многие виды грызунов, насекомоядных (ежи), рукокрылых, неполнозубых и другие млекопитающие (медведи), в том числе и некоторые приматы (лемуры). В тропических странах в условиях жары в состояние гипобиоза впадают многие беспозвоночные, некоторые виды земноводных, пресмыкающихся, рыб и млекопитающих. Описаны случаи впадения в глубокий гипобиоз животных и человека в экстремальных условиях.

Существенные различия в скорости старения наблюдаются у **незимоспящих** мелких грызунов (полевки, мыши и др.) и насекомоядных (землеройки). Для популяций этих видов характерно чередование весенних и осенних поколений. Животные, родившиеся весной, имеют очень высокий уровень обмена, быстро растут, созревают, а после интенсивного размножения умирают со всеми признаками старости в возрасте 4-6 мес. Поколения, родившиеся к осени, переживают зиму в активном состоянии, периодически впадая в оцепенение во время многократных периодов сна в течение суток. Зимой у них замедляется рост тела и большинства органов за счет снижения темпа деления клеток, а инволюция тимуса замедляется, снижается температура тела и обмен веществ, резко замедляется старение, и период юности продлевается почти на год. После выхода из гипобиоза весной у животных возобновляется рост тела и органов (более, чем в 2 раза, в том числе и тимуса), усиливается функция всех систем и происходит самоактивация организма с признаками омоложения. К осени они стареют также быстро, как и весенние. Осенние бурозубки живут до 12 мес, в 3 раза дольше весенних, сохраняя молодость до 10-11 мес. Полевки при благоприятных условиях могут пережить вторую зиму и прожить за счет продления молодости до 3-х лет, то есть в 6-7 раз дольше весенних. У осенних бурозубок рост тимуса весной не возобновляется, а в периоды активности зимой обмен и температура несколько выше, чем у грызунов. Видимо, поэтому у них старение протекает более интенсивно.

Эти данные указывают на то, что скорость старения млекопитающих не фиксирована наследственно и имеется принципиальная возможность увеличения видового предела жизни в несколько раз за счет продления периода юности и замедления процесса старения в зрелом возрасте, а не в старости. Характерно, что тимус у зимоспящих обладает способностью к ежегодному самовосстановлению после почти полной инволюции. Этот процесс не зависит от температуры: инволюция тимуса начинается за 3 мес до вхождения в спячку, а регенерация его наступает спустя некоторое время после пробуждения.

Как показали опыты на ежах, хомяках и сусликах, впадение их в спячку связано с повышением в мозгу серотонина. Уровень его в гипоталамусе возрастал почти в 2 раза. Серотонин резко подавляет деятельность ЦНС, эндокринных и других органов, замедляет теплообразование, что

приводит к понижению температуры тела и снижению обмена веществ в 20-40 раз (у сони-полчка - в 73 раза).

Снижение метаболизма у зимоспящих возникает еще до спячки, а температура тела становится почти такой же, как у окружающей среды. В норах зимоспящих снижается содержание кислорода (O_2), повышается концентрация CO_2 и понижается температура среды. Каждое из этих воздействий способствует впадению животных в спячку. Сурки потребляют кислорода в 42 раз меньше, чем в активном состоянии, а выделяют углекислоты в 75 раз меньше. Это приводит к повышению концентрации углекислоты в крови почти в 2 раза. Температура тела многих зимоспящих в спячке обычно выше 0^0, а у некоторых видов животных опускается ниже нуля, хотя температура мозга всегда выше нуля.

Нейрохимическая концепция спячки млекопитающих предполагает последовательность выключения четырех функциональных уровней ЦНС: стволового, таламического, архи- и нео- кортикального, в результате снижается активность всей эндокринной системы, однако выделение кортизона из надпочечников не уменьшается. Электрическая активность в ЭЭГ различных областей головного мозга исчезает в следующей последовательности: 1) кора мозга, 2) ретикулярная формация, таламус, 3) лимбическая система (септум, гиппокамп, гипоталамус). Погружение в гипобиоз начинается с понижения температурного порога гипоталамуса (заданное значение температуры для вызова повышения уровня метаболизма), что приводит к снижению температуры тела при охлаждении.

Активация гипоталамо-гипофизарной нейросекреторной системы начинается еще до пробуждения животных от спячки и продолжается после пробуждения. Этот период характеризуется высокой митотической активностью глиальных клеток и высокой активностью выделения нейрогормонов. В пробуждении значительную роль пускового механизма, по-видимому, играют катехоламины надпочечников.

Методы вызывания гипобиоза.

В настоящее время разработано несколько методов получения искусственного гипобиоза, несколько отличающегося от естественного, но они основаны на том же принципе - перестройке гормонально-медиаторной активности моноаминовых систем организма и поддержании

теплообменного гомеостаза на сниженном уровне при весьма умеренном угнетении ЦНС [128].

Оксикапнический метод заключается в создании гипобиоза с помощью гипоксических и гиперкапнических (повышенное содержание CO_2) газовых сред. Механизм действия основан на снижении уровня оксигенации крови (до 50%) и повышении в ней содержания углекислоты, что приводит к уменьшению потребления O_2, стабилизации теплообменного гомеостаза и более экономному потреблению энергии.

Моноаминовый метод заключается в замедлении выхода катехоламинов из депонированного состояния с помощью лекарственных средств, снижающих основной обмен: вещества фенотиазинового ряда, радиопротекторы, антипиперитические средства и ганглиоблокаторы.

Эти модели гипобиоза позволяют получить теплообменный гомеостаз у некоторых видов животных без нарушения ЦНС и физиологических функций в течение нескольких суток. Однако в опытах много животных не могут перенести гипобиоза.

Гипобиоз можно вызвать и другим путем. Так, белые лабораторные мыши впадают в оцепенение при ограничении питания и температуре среды 16ºС, при этом, температура их тела снижается до 16ºС.

В общем, следует отметить, что у многих видов животных гипобиоз достигается трудно и на ограниченное время с помощью комбинированного воздействия фармакологических средств (резерпин, орнид и др.), газовых сред с повышенным содержанием CO_2, голода и снижения температуры тела.

Примером достижения гипобиоза в лабораторных мышей с влиянием на ПЖ, но без наступления сна, является работа В.Е.Чернилевского [145], при достижении гипобиоза у мышей линии CD2F1 с использованием газовой среды и/или резерпина как агента влияющего на серотониновый обмен (рисунок 9).

Эффект гипобиоза остигался во всех случаях: ПЖ составила в контроле 187 дней и в 1-2-3-й группах соответственно: 339, 283 и 329 дней; максимальная ПЖ в контроле 850 дней и в опыте – 1001, 1084 и 982 дня.

Таким образом, гипобиоз затрагивает многие процессы в организме, в том числе и старение, при этом его влияние на процессы роста, развития, старения, собственно сон и метаболизм и температуру тела можно разделить. Это делает данный метод перспективным как в исследовании

механизмов влияния его на старение, так и как метод влияния на процесс старения у человека. Обращает внимание возможность достижения «гипобиоза без гипобиоза» – без спячки, снижения температуры и метаболизма, влияя на часть регуляторных задействующихся при гипобиозе механизмов, ответственных преимущественно за обновление тканей, контроль роста и развития, задержку старения и повышение продолжительности жизни.

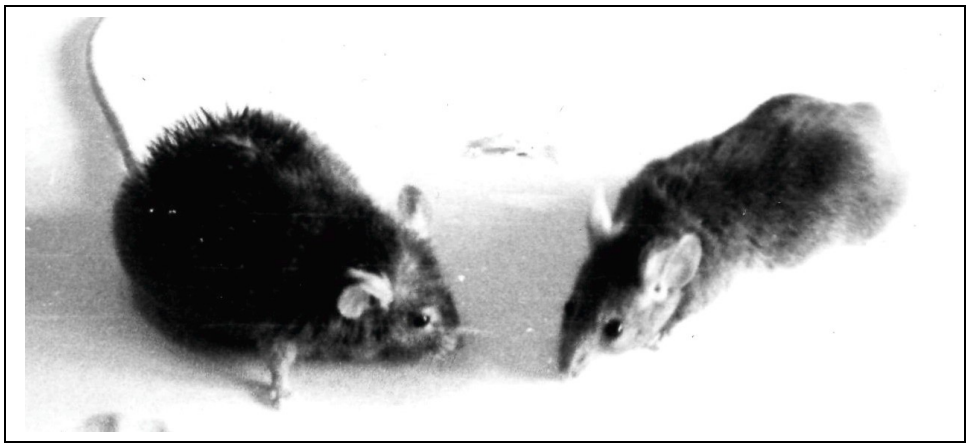


Рисунок 9. Контрольная (слева) и гипобиозная (справа) мыши
Гипобиозная мышь выглядит моложе, бодрее и меньше весом.

Глава 4.
Популяционные методы исследования старения

4.1. Значение метода наблюдения в геронтологии

Наблюдение – древнейший метод познания, сохраняющий все свое значение и до настоящего времени даже в наиболее продвинутых и современных областях науки. Наблюдение за возрастной динамикой смертности составляет основу для популяционной геронтологии, которая основывается прежде всего на демографии, что дает в руки исследователя огромный материал – данные о миллиардах населения Земли, что по объему изучения не достижимо ни для какого другого метода. Возрастная динамика смертности дает также материал и для экспериментальной геронтологии при применении самых различных методов и воздействий на старение.

Обычно исследуют графики дожития контрольной и опытной популяций, отмечая среднюю продолжительность жизни (СПЖ) и так называемую МПЖ – максимальную продолжительность жизни (более точно – рекордную ПЖ, так как вероятностный закон вымирания делает невозможным точное вычисление МПЖ и срок жизни последней особи в популяции вероятностно варьирует в значительных пределах, поэтому лучше говорить о выживаемости 10%, 5%, 1% популяции и т.п.).

4.2. Популяционные методы исследования старения

4.2.1. История и сущность статистических методов в геронтологии

В качестве первых результатов, полученных в области количественной геронтологии, следует упомянуть таблицы ПЖ жителей Лондона, построенные в 1662 г. Д. Граунтом. Основываясь на этих данных, выдающийся голландский физик Х. Гюйгенс в середине 17-го века рассчитал впервые среднюю продолжительность жизни – СПЖ и предложил использовать такие таблицы для расчета вероятности дожития до опреде-

ленного возраста. Наиболее надежные данные для подобных таблиц впервые получил немецкий математик В. Лейбниц. На основе этих данных английский астроном Э. Галлей построил первые надежные таблицы ПЖ.

Метод Галлея был дополнен швейцарским математиком Л. Эйлером («Общие исследования о смертности и размножении рода человеческого»). Великий французский ученый П. Лаплас развил вероятностную интерпретацию таблиц ПЖ, а его ученик - астроном, математик и статистик А. Кетле в своей «Антропологии» распространил эти методы и на оценку ПЖ животных.

Главным событием для математической геронтологии явилось появление в 1825 г. знаменитой формулы англичанина Б. Гомперца, описывающей изменение силы смертности человека и многих видов животных в зависимости от возраста. Б. Гомперцем впервые было показано экспоненциальное нарастание интенсивности смертности с возрастом (собственно закон старения) и предложено теоретическое объяснение этого закона. В 1860 г. У. Мейкем дополнил формулу Б. Гомперца аддитивной константой – не зависимой от возраста компонентой фоновой смертности, связанной с влияниями внешней среды. Таким образом, еще со времен Гомперца для геронтологов было ясно существование биологической компоненты смертности, зависящей от внутренних особенностей организма. Общая идея спонтанной утраты «жизнеспособности», положенная в основу формулы Б. Гомперцом (1825), является и в настоящее время краеугольным камнем современной геронтологии, так как позволяет наиболее просто и точно описывать возрастное изменение смертности человека и, видимо, большинства других организмов.

Основоположником собственно биологического учения о ПЖ считают К. Пиркса, основавшего в 1901 г. журнал «Биометрика», и Р. Пирла, опубликовавшего пространные рассуждения на эту тему в «Биологии смерти» (1922), целиком посвященной вопросам биологии ПЖ. Именно Р. Пирл, как считают, создал научную школу биологии продолжительности жизни.

Задачи статистического анализа старения можно разделить на две группы в соответствии с выбором главного показателя, характеризующего старение. В свою очередь, особенности исследуемых показателей предопределяют и выбор адекватных статистических методов.

Первую группу образуют задачи анализа связей между возрастом и показателями здоровья. Такие методы применимы в исследованиях как на

популяционном, так и на индивидуальном уровне. Для решения задач подобного типа может быть использован весь аппарат так называемой многомерной статистики. В настоящее время существует немало статистических пакетов (наиболее распространенные - *Statistica, SPSS, Statgraphics, BMDP*), в которых методы анализа связей между показателями реализованы в виде, удобном для пользователя, в том числе и не являющегося специалистом в области статистики.

Вторая группа задач основана на подходе к старению как к процессу снижения с возрастом сопротивляемости смерти. Статистический аппарат этого направления исследований составляет группа методов анализа продолжительности жизни, то есть показателя, который может быть измерен лишь однажды для каждого индивида. Поэтому данный подход применим лишь в групповых и популяционных, но не в индивидуальных исследованиях. Среди распространенных пакетов наилучшие возможности в этом плане предоставляет пакет *Statistica фирмы StatSoft*, в котором имеется блок *Survival and Failure Time Analysis* (Анализ Продолжительности Жизни и Времени Отказов).

Показатели, характеризующие старение, имеют ряд особенностей, усложняющих статистический анализ.

Во-первых, распределение продолжительности жизни, а следовательно, и распределение населения по возрасту, лишь в редких случаях подчиняется нормальному закону. Поэтому многие из наиболее распространенных методов математической статистики, основанных на предположении о нормальном виде распределений (например, сравнение выборок по критерию Стьюдента, дисперсионный и факторный анализ), при анализе старения либо совершенно непригодны, либо могут быть использованы лишь с определенными ограничениями. Применение же непараметрических методов анализа, как правило, требует для получения статистически достоверных результатов очень больших объемов выборок.

Помимо методов, обеспечивающих **оценивание достоверности** связей между различными показателями или достоверности различий между выборками, важную в практическом плане роль играют так называемые методы **описательной статистки**. К описательным методам относятся вычисление таких оценок выборки, как *среднее*, *среднеквадратичное отклонение*, *медиана*, *коэффициент асимметрии*, *доверительный интервал среднего*, а также графические методы представления выборок,

например, в виде *гистограммы* или *полигона частот*. Стандартные описательные методы реализованы во всех статистических пакетах. В области анализа продолжительности жизни, помимо общепринятых, используется специфический набор **описательных методов**. К ним относятся вычисление общих и специальных *показателей смертности* и представление данных о продолжительности жизни в виде *таблиц дожития*. Математические методы исследования старения изложены нами в отдельной монографии [82].

4.2.2. Исследование возрастной смертности

Формулирование формулы Гомперца-Мейкема при наличии демографической статистики дало большой материал для развития популяционной геронтологии, изучающей особенности старения различных групп населения в различных географических условиях и в различные временные периоды. В основе количественного представления процессов изменения ПЖ, старения и смертности в геронтологии, демографии, экологии и других дисциплинах широко используются прежде всего следующие показатели:

- таблицы и графики дожития;
- вероятность смерти для определенного возраста;
- ожидаемая продолжительность жизни.

Таблицы дожития содержат как минимум два столбца, в первом из которых приводятся значения возраста (обозначаемого обычно как **x**), а во втором – численность представителей исследуемой популяции, доживших до этого возраста (обозначаемая как **l(x)**). Функция **l(x)** называется функцией дожития, а ее график – графиком дожития. В современные таблицы дожития часто включают значения показателя ожидаемой продолжительности предстоящей жизни индивидуумов, доживших до возраста **x**, которую обозначают **e(x)** или **e**, а также некоторые промежуточные расчетные величины, которые необходимы для вычисления ожидаемой продолжительности жизни (повозрастные коэффициенты смертности, повозрастные риски смерти и т.д.)

Различают два вида таблиц дожития – таблицы для реальных и для гипотетических поколений. В первом случае предметом исследования

является порядок вымирания реальной группы ровесников, или когорты; регистрация уровней смертности в различных возрастах осуществляется до полного вымирания когорты. Такой метод исследования является продольным, лонгитудинальным или когортным; главное преимущество продольного метода заключается в том, что он позволяет получить характеристики смертности для реальной когорты.

При исследовании смертности на популяционном уровне значительно чаще используется метод поперечного анализа, называемый также методом условных, или гипотетических, поколений. Этот метод демографического анализа основан на экстраполяции на некоторый продолжительный временной интервал в будущем частот смерти в различных возрастных группах, непосредственно определенных для короткого календарного периода (один год или несколько лет). Таблицы дожития для условных поколений рассчитывают на основе повозрастных коэффициентов смертности, определяемых за один год или за несколько лет, примыкающих к году построения таблицы. Поскольку повозрастные коэффициенты смертности для мужчин и женщин, как правило, неодинаковы, таблицы дожития составляют для каждого пола отдельно.

Если таблица дожития рассчитывается для гипотетического поколения, то начальная его численность **(l(0))** может быть выбрана произвольно. Эта величина называется корнем таблицы.

Показатели смертности и продолжительности жизни могут быть рассчитаны разными способами. Наиболее просто они определяются в когортных исследованиях. Допустим, что мы измеряем число индивидов (особей), оставшихся в живых, через одинаковые промежутки времени **n**. Величина интервала **n** может колебаться от дней (например, для дрозофил) до 5-10 лет для человека. В когортных исследованиях функция дожития **l(x)** является величиной, непосредственно измеряемой в соответствующие моменты времени. Разница между количеством доживших до возраста **x** и доживших до возраста **x+n** равна, очевидно, числу умерших в возрастном интервале (**x,x+n**) и обычно обозначается через **d(x)** или **d**:

$$d(x) = l(x) - l(x+n) \qquad (10)$$

Вероятность смерти на интервале **n** для индивидов (или особей), доживших до возраста **x**, обозначается через **q(x)** или **q** и определяется как:

$$\mathbf{q(x) = d(x) / l(x)}. \qquad (11)$$

Иногда **d(x)** и **q(x)** включаются в таблицы дожития наряду с **l(x)**. При поперечных исследованиях исходными данными для вычислений табличных показателей являются повозрастные коэффициенты смертности, которые, в свою очередь, определяются по имеющимся статистическим данным о численности отдельных возрастных групп и смертности в них. На основе этих данных с помощью специальных методик рассчитывают табличные значения **d(x)**, **q(x)** и **l(x)** (детальное описание методов расчета таблиц дожития для условных поколений можно найти, например, в работах О.Д. Захаровой (1996) и Б.И. Марченко (1997) [61, 89].

Для вычисления **ожидаемой продолжительности предстоящей жизни** (ОПЖ или ОППЖ) индивидуумов, доживших до возраста **x**, которую обозначают **e(x)** или **e**, используют промежуточные вычисления. Сначала определяют суммарное число лет (точнее, человеко-лет) **L(x)** (или часов, дней, месяцев, если исследуются короткоживущие животные), проживаемых всей исследуемой когортой в интервале (**x, x+n**):

$$\mathbf{L(x) = n\ [l(x)+l(x+n)]\ /2} \qquad (12)$$

Данное соотношение строго справедливо, если функция **l(x)** является линейной на изучаемом интервале. Для реальных популяций функция “**l**” нелинейна и поэтому, чтобы не допускать существенных ошибок в расчетах, интервал **n** необходимо выбирать не слишком большим, чтобы на нем функция “**l**” отличалась от прямой линии не более, чем на несколько процентов, если мы хотим, чтобы погрешность в расчетах также измерялась несколькими процентами.

Исходя из этого требования, при расчетах ожидаемой продолжительности жизни используют 5-летние возрастные интервалы, причем в первом из них выделяют первый год жизни, для которого функция l(x) имеет экспоненциальный характер. Суммарное число лет для детей в возрасте до года вычисляют по формуле:

$$\mathbf{L(0)=0.35l(0) + 0.65\ l(1)} \qquad (13)$$

Эта формула пригодна для современного российского населения. В случае, если расчеты проводятся для населения с существенно более высоким уровнем детской смертности, для первого возрастного интервала используется формулы с другими коэффициентами [89].

Ниже приведен пример расчетов **L(x)** по табличным значениям **l(x)** для таблицы дожития с неравномерным шагом **n**:

За начало последнего возрастного интервала, ширина которого не ограничивается, принимается величина 100 лет или близкая к ней (в отечественной практике часто используется величина 95 лет). Для этого интервала величину **L(x)** определяют на основе статистических данных о среднем возрасте умерших в возрасте **x** лет и выше. Следует отметить, что средняя продолжительность жизни для лиц самых старших возрастов является устойчивой величиной. В частности, если за последнюю возрастную категорию принята группа 95 лет и старше, то удовлетворительной оценкой является **L(95)=3.2l(95)**.

Далее рассчитывают суммарное число лет **T(x)**, проживаемых когортой в возрасте **x** и старше (пока вся когорта не закончит свое существование):

$$\mathbf{T(x) = L(x)+...+L(w)} \qquad (14)$$

где w - это значение возраста, соответствующее началу последнего возрастного интервала.

Для последнего интервала полагают **T(w) = L(w)**. Таким образом, при расчете суммарного числа предстоящих лет **T(x)** для возраста **x** суммирование производится "снизу вверх", т.е. от последнего включенного в таблицу дожития возраста **w** по убыванию до возраста **x** включительно.

Ожидаемая средняя продолжительность предстоящей жизни для доживших до возраста **x** определяется далее из соотношения: **e(x) = T(x) / l(x)**. Наиболее часто в качестве характеристики старения и смертности населения используют величину **e(0)**, то есть, **ожидаемую среднюю продолжительность жизни при рождении**.

Показатель ожидаемой продолжительности жизни является значительно более эффективным интегральным показателем состояния здоровья населения, чем часто используемый на практике **общий коэффициент смертности** (ОКС). Так, сравнение неких 2-х групп населения может

показать, что расчетное значение ОКС оказывается выше для населения 1 несмотря на то, что повозрастные коэффициенты смертности во всех возрастных группах для этого населения ниже, чем для населения 2. Это объясняется тем, что в населении 1 по сравнению с населением 2 меньше доля младших возрастных групп, для которых характерна наименьшая интенсивность смертности, и значительно выше доля самой старшей группы, для которой интенсивность смертности максимальна. Такой парадоксальный результат исключается при использовании для сравнения показателя ожидаемой продолжительности предстоящей жизни, которая, во-первых, не зависит от возрастной структуры населения, а во-вторых, рассчитывается на основе повозрастных коэффициентов смертности, и, соответственно, для любой возрастной подгруппы населения 1 выше, чем соответствующей подгруппы населения 2.

4.2.3. Использование формулы Гомперца

С теоретической точки зрения до настоящего времени формула Гомперца-Мейкема остается наилучшей для описания смертности, связанной со старением, для самых различных видов, включая человека.

Как отмечено, формула Гомперца основана на сущностном определении старения как снижении с возрастом общей жизнеспособности («X»): $dX/dt = -k X$, при этом общая жизнеспособность для удобства количественного исчисления заменена на обратную величину – смертность ($\mu = 1/X$); решение уравнения относительно «μ» дает известную формулу Гомперца – экспоненциального нарастания смертности с возрастом:

$$\mu = R_o * \exp(\alpha * t) + A \qquad (15)$$

где R_o – начальный уровень смертности, α – скорость нарастания смертности, **A** – коэффициент, характеризующий вклад в смертность внешних влияний (эко-социальные влияния), эффект их слабо зависит от возраста.

Таким образом, Б. Гомперцем впервые было показано экспоненциальное нарастание интенсивности смертности с возрастом – собственно закон старения, - и предложено теоретическое объяснение этого закона. В

1860 г. У. Мейкем дополнил формулу Б. Гомперца аддитивной константой – не зависимой от возраста компонентой фоновой смертности, связанной с влияниями внешней среды. Таким образом, еще со времен Гомперца для геронтологов было ясно существование биологической компоненты смертности, зависящей от внутренних особенностей организма.

Принято представлять график экспоненты в полулогарифмических координатах, где она имеет вид прямой. Однако, аддитивная поправка Мейкема в правой части уравнения обусловливает отклонение от прямой линии зависимости ln(m) от t. Поскольку A является константой, получить в правой части уравнения чистую экспоненту можно, продифференцировав уравнение Гомперца-Мейкема. Тогда график в полулогарифмических координатах будет иметь вид прямой линии с тангенсом угла наклона к оси времени равным «a», которая пересекает ось ординат в точке «Ro a». Поэтому значения Ro и a, соответственно характеризующие значение смертности в начальный момент времени t=0 и темп старения, могут быть легко найдены из такого графика.

Затем можно рассчитать значение поправки Мейкема как разность между наблюдаемым значением смертности и ее возрастной компонентой, описываемой экспонентой.

Таким образом, для целей количественной геронтологии необходимо иметь возможность вычисления параметров уравнения Гомперца-Мейкема, что можно сделать методами нелинейной регрессии. Для вычисления «вручную» Л.А. Гаврилов и Н.С. Гаврилова (1991) предлагают нижеследующий алгоритм, дающий вполне удовлетворительную точность.

Пусть мы имеем значения чисел доживших «l» для четырех равноотстоящих друг от друга моментов времени: t, t+n, t+2n, t+3n.

Вначале вычисляют вспомогательные величины:

$$y1 = \ln[l(t) / l(t+n)]; \; y2 = \ln[l(t+n) / (l(t+2n)];$$
$$y3 = \ln[l(t+2n) / (l(t+3n)]; \; z = y1+y3-2y2; \qquad (16)$$
$$w= (y3-y2) / (y2-y1)$$

Тогда параметры формулы Гомперца-Мейкема могут быть найдены из следующих соотношений:

$$\mathbf{A} = (y1\ y3 - y22) / (z\ n),$$
$$\mathbf{Ro} = [(y2 - y1)2 \ln(w)] / [z\ n\ (w-1)\ w\ (t/n)], \qquad (17)$$
$$\mathbf{a} = \ln(w) / n$$

Из этих формул нетрудно заметить, что вспомогательные величины **y1, y2, y3, z** и **w** являются безразмерными, а размерность параметров **A**, **Ro** и **a** обратна размерности используемой единицы возраста. В геронтологии единицей возраста чаще всего служит год, поэтому размерность параметров **A**, **Ro** и **a** равна год-1.

Наибольшая точность оценки параметров уравнения Гомперца-Мейкема с помощью данного четырех-точечного алгоритма достигается в случае, если **t = n** = 20 лет, поскольку в возрастном диапазоне от 20 до 80 лет уравнение Гомперца-Мейкема описывает смертность гораздо лучше, чем вне этого диапазона. Кроме того, при **t = n** при вычислении **Ro** показатель степени (**t/n**) обращается в 1, а **w (t/n)**, соответственно, в **w**, что значительно упрощает вычисления.

Общераспространенным методом расчета показателей «**Ro**» и «**a**» формулы Гомперца является также графический метод. При этом строят зависимость логарифма показателя смертности (R – rate of mortality, отношение числа умерших за определенный промежуток времени к числу доживших до начала данного возрастного периода) от возраста. В такой полулогарифмической шкале график имеет наклон к оси абсцисс равный коэффициенту «a» формулы Гомперца, а экстраполяция до пересечения с осью R – значение Ro.

Интересны некоторые очевидные и экспериментально и демографически подтверждаемые выводы, полученные из выше сказанного, однако, иногда парадоксально звучащие. Так из вышесказанного очевидно, что наибольшее абсолютное снижение жизнеспособности можно наблюдать в раннем возрасте, что мы и видим по кривым изменения в онтогенезе абсолютного значения многих физиологических функций. В это время, соответственно, эффективны мероприятия по профилактике старения и удобно проводить экспериментальную проверку геропрофилактических средств.

В то же время, в старости даже небольшие абсолютные изменения жизнеспособности ведут к выраженным изменениям смертности, поэтому в старших возрастах удобно изучать влияния адаптогенов и биостимуляторов, хотя малый жизненный ресурс может и не приводить к повышению длительность жизни при их использовании.

Вычисление параметров формулы Гомперца имело важное значение для популяционной геронтологии. Так, было показано, что вымирание

популяций как человека, так и многих других видов, подчиняется этому закону (рисунок 10, приведен по Гаврилов, Гаврилова, 1986).

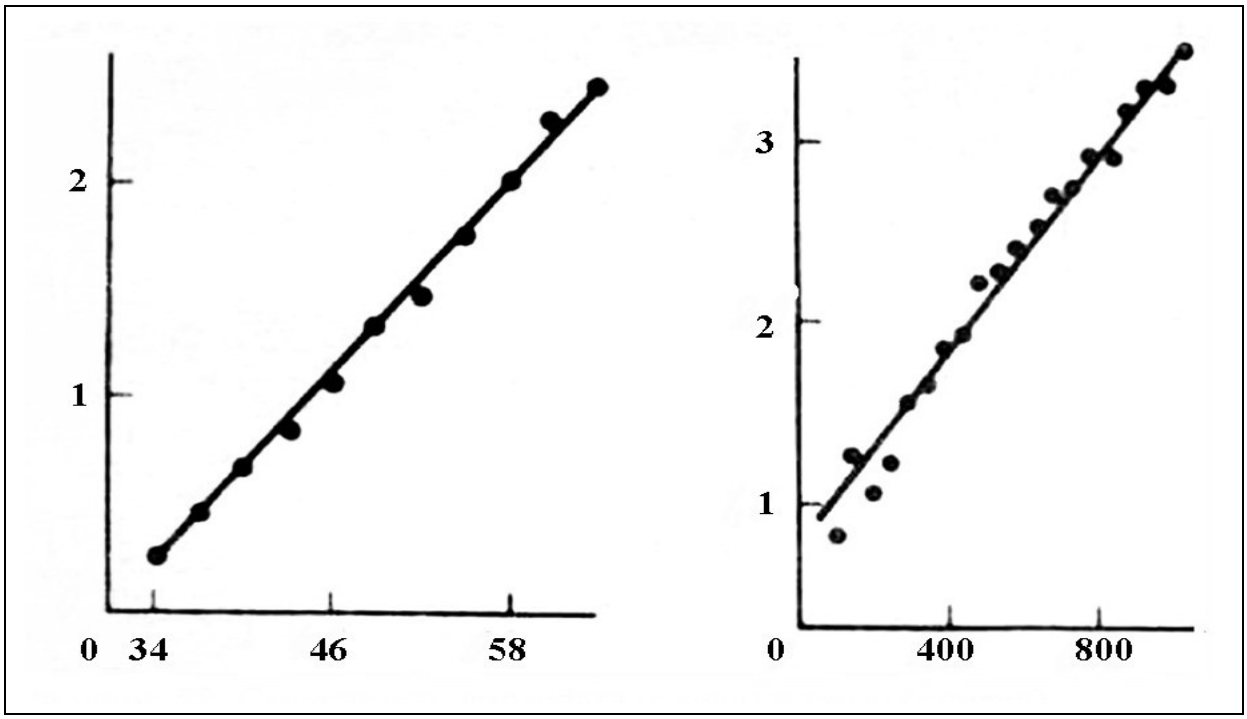


Рисунок 10. Смертность дрозофил (слева) и крыс (справа) – график Гомперца (приводится по Гаврилову, Гавриловой, 1986)

По горизонтали – время жизни в днях, по вертикали – смертность (Lg $\mu * 10^3$ для дрозофил и Lg $\mu * 10^5$для крыс)

Обработка данных демографической статистики за различные исторические периоды по Гомперцу открыла фундаментальный факт – ***Явление исторической стабильности возрастной компоненты смертности***: была показана стабильность компонентов **Ro** и **a,** изменения смертности целиком приходились на компоненту **A** Мейкема, отражающую улучшение социальных условий, медицинского обслуживания и пр. Таким образом, биологическая природа старения не изменилась с успехами медицины, и влияние на старение является отдельной задачей (рисунок 11, приведен по Гаврилов, Гаврилова, 1986).

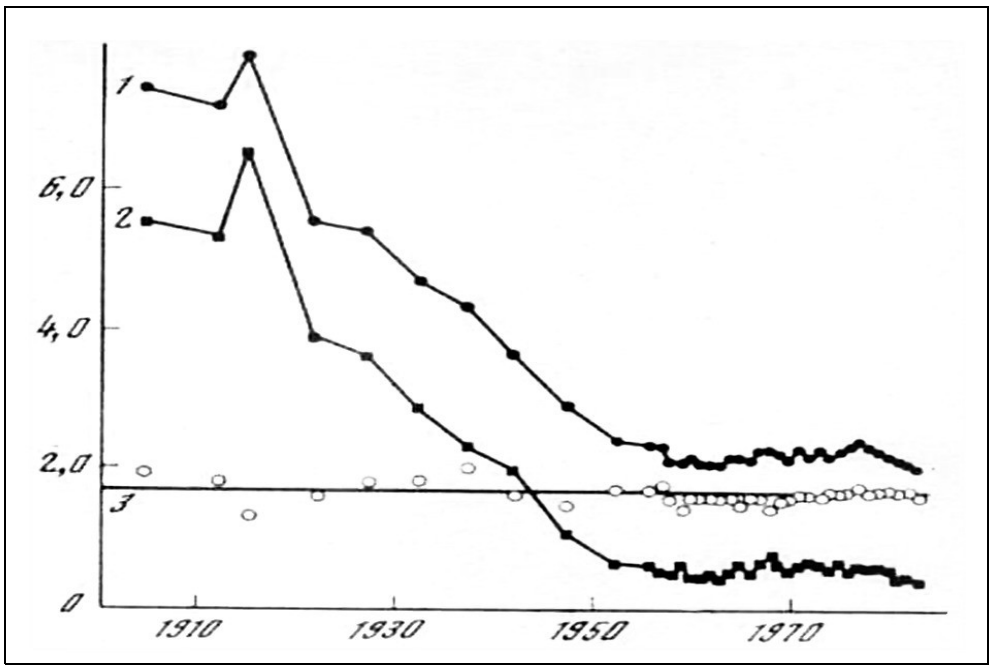


Рисунок 11. Историческая стабильность возрастной компоненты смертности (приводится по Гаврилову, Гавриловой, 1986)

По горизонтали – годы; по вертикали – интенсивность смертности ($\mu*10^3$) 40-летних мужчин Швеции (общая – 1, фоновая – 2, возрастная компонента – 3)

В различных регионах, однако, значение возрастной компоненты смертности может различаться. Сопоставление возрастной компоненты смертности в регионах показало вторую фундаментальную особенность: ***компенсационный эффект смертности*** – в пределах биологического вида изменение в различных условиях (на примере дрозофил) или в различных регионах (у человека) возрастной компоненты смертности таково, что все кривые сходятся в одной точке. То есть, при высоких начальных уровнях смертности темп нарастания смертности с возрастом снижен, а при низких – более высок. Для человека эта точка, к которой стремятся все кривые смертности – около 95 лет; это, видимо, видовой предел продолжительности жизни, который не может быть значительно изменен внешними влияниями. Этот возраст, видимо, и следует считать «**максимальной продолжительностью жизни**» (МПЖ) для человека. Многие путают **рекордные возраста** дожития с МПЖ, однако, вероятностный закон повышения смертности и смертности в целом не позволяют говорит о каком-либо конкретном сроке как величине МПЖ – есть вероятность

дожить до любого возраста, и ни в каком возрасте не существует 100% вероятности смерти.

Оба эти явления, как и вероятностный закон смертности, дают возможность понять тот наблюдаемый эмпирически факт, что снижение смертности от какой-либо причины в пожилом возрасте «компенсируется» ее возрастанием от других причин. Этот почти мистический феномен на самом деле совершенно понятен для математиков и демографов: смертность в определенном возрасте раскладывается по случайным причинам, а уровень ее является биологически задаваемым значением (снижение жизнеспособности с возрастом – результат прежде всего внутренних причин). Это, в частности, делает мало перспективным профилактические оздоровительные курсы от одного заболевания. Так, в свое время длительные и широкомасштабные исследования с участием десятков тысяч добровольцев по профилактике сердечно-сосудистых заболеваний показали, что если смертность от них действительно выраженно снижается, то общая смертность меняется очень мало. В последние годы величина компонента Мейкема в формуле Гомперца-Мейкема в развитых странах подошла к «0», что означает фактическое исчерпание обычных

Таким образом, популяционная геронтология позволяет выявлять некоторые фундаментальные закономерности старения и прогнозировать изменение смертности при введении профилактических мероприятий.

В то же время, развитие Анти-возрастной медицины направляет внимание на такие специальные средства, влияющие на глубинные механизмы старения, что требует и быстрой адекватной количественной оценки индивидуального старения, что обычно связывают с понятием Биологического возраста (БВ).

4.3. Биологический возраст: понятие и сущность

При одном и том же астрономическом или календарном возрасте (КВ) различных индивидов, степень постарения их организмов в целом, а также отдельных органов, элементов и систем их организмов, может быть различна, поэтому появляется потребность оценки степени старения или уровня жизнеспособности организма и его элементов, что является одной из

ключевых задач профилактической геронтологии, поскольку такая оценка позволяет объективно зарегистрировать темп старения и его изменения при лечебно-профилактических воздействиях.

Биологический возраст (БВ) - это показатель уровня развития, изменения или износа структуры или функции элемента организма, функциональной системы или организма, выраженный в единицах времени, путем соотнесения значений определяющих эти процессы биомаркеров старения с эталонными среднестатистическими зависимостями изменений этих биомаркеров от календарного возраста.

То есть**,** БВ – это **степень износа** конкретного организма, оцениваемая по снижению функционального ресурса основных его систем жизнеобеспечения, причем оценка проводится в сравнении со средними статистическими значениями нормы для определенных возрастов и выражается в единицах возраста, которому эти функциональные ресурсы соответствуют.

Обычно БВ используют широко в исследованиях для человека и гораздо реже и с меньшим успехом – для животных.

Понятие БВ прямо связано с понятием жизнеспособности, когда жизнеспособность целого организма определяется через сумму (интеграл) жизнеспособностей его частей.

Методы оценки биологического возраста

При оценке процесса старения у человека обычно учитывают несколько групп характеристик, предполагающих различные типы профилактических воздействий на них с целью коррекции [18, 44, 55, 63, 113, 143, 162, 193, 259, 310, 311].

При старении **человека** наблюдается ряд изменений физиологических показателей. Наиболее выраженными и типичными являются следующие:

- снижение уровня основного обмена – на 20% от уровня, наблюдаемого в 25-30 лет;
- снижение скорости проведения нервных импульсов – на 15%;
- снижение содержания внутриклеточной воды – в среднем на 25%;
- снижение сердечного индекса – на 30-35%;
- снижение скорости клубочковой фильтрации – на 40-45%;
- снижение почечного кровотока (по диодрасту) – на 50 - 55%;
- снижение максимальной емкости легких – на 55-60%;
- снижение скорости кровотока – на 65-70%;

- снижение числа клеток (в разных органах – на 5-15%);

- выраженное снижение скорости самообновления органов в результате снижения потенциала клеточного роста (например, в печени движение изотопной метки in vivo замедляется на пордяки).

Типичным является разновременное начало изменений для разных органов, разная степень выраженности изменений, иногда разнонаправленность изменений (обычно как результат развития компенсационных процессов), зачастую выраженные индивидуальные различия.

Достаточно однородные изменения отмечены для некоторых функций, например:

- повышение скорости пульсовой волны как отражение возрастного артериосклероза;

- увеличение порога восприятия звука;

- увеличение расстояния ближнего зрения как отражение снижения аккомодации (ввиду уплотнения хрусталика).

В целом, также довольно типичны: поседение волос, снижение числа желез кожи и слизистых, что ведет к снижению выделения пищеварительных соков (часто с нарушениями соотношения ферментов), снижение уровня лактазы (наблюдается особенно часто), что ведет к плохой переносимости молока в старости.

Многие болезни не только увеличивают физиологический возраст - ограничивают функциональные возможности организма, но некоторые из них прямо влияют на механизмы старения, имитируя более старший БВ и сокращая жизнь.

При выборе показателей для оценки биологического возраста из огромного множества возможных биомаркеров следует учитывать ряд требований, выполнение которых существенно повышает информативность и качество оценки:

1. Показатель БВ обязательно должен значительно изменяться (желательно в несколько раз) в промежутке времени от половозрелости до глубокой старости.

2. Показатель БВ должен быть высоко коррелированным с КВ.

3. Межиндивидуальная дисперсия показателя не должна превышать величины изменения его среднего значения с возрастом за 5-ти летний временной интервал.

4. Должна иметь место низкая чувствительность выбранного показателя к болезням (болезни не должны имитировать изменение показателя).

5. Обязательно должно наблюдаться изменение показателя БВ для всех членов популяции с возрастом.

6. Желательно, чтобы тестирование показателя БВ было простым для экспериментатора и легким для обследуемого.

7. Предпочтительны аппаратные методы тестирования с дистанционным и пассивно-контактным типом съема сигнала.

8. Показатель БВ должен быть индикатором достаточно значимого процесса возрастной физиологии и должен иметь смысловую, морфологическую и функциональную интерпретацию, отражать степень возрастной дезинтеграции организма или системы.

Об индивидуальной скорости старения можно судить по соотношению БВ/КВ или по их разности: БВ-КВ (отрицательные значения указывают на показатели жизненного ресурса, характерные для более молодого возраста). Изменения в скорости старения индивида под действием средств профилактики старения (геропротекторов) определяют путем последовательного расчета БВ в течение нескольких лет.

Для определения биологического возраста человека различными группами отечественных и зарубежных исследователей предложены различные наборы тестов. К настоящему времени не имеется сравнительного анализа этих наборов по каким-либо критериям качества. Детальные описания методик тестирования можно найти в соответствующих справочниках по физиологии, клинической диагностике, лабораторной диагностике и т.д. В настоящих рекомендациях мы ограничимся только их общим обзором и систематизацией по классам.

Для определения БВ человека используют показатели разных классов:

1. Показатели внешних проявлений старения: поседение волос (баллы), облысение (баллы);

2. Морфологические показатели: вес, рост, рост сидя, ширина носа,- длина уха, ширина плеч, толщина живота, толщина складки кожи (плечо).

3. Физиологические функции в покое: аудиометрия – верхняя частотная граница слышимости (кГц), аудиометрия - порог слышимости (в дБ) на частоте обычно 4 кГц, острота зрения, расстояние ближней точки зрения, сила кисти доминирующей руки, ЧСС в покое, систолическое артериальное давление, диастолическое артериальное давление, пульсовое давление,

давление кислорода артериальное, ЖЕЛ, антефлексия позвоночника (градусы), ретрофлексия позвоночника (градусы), изгиб вбок (градусы), эластичность кожи (сек).

4. Психологические и нервно-психические показатели: статическая балансировка на левой ноге (сек), тест распознавания картинок, категориальный картиночный тест (время и число ошибок), символьный тест Векслера, тест на концентрацию внимания по Bourdon, тест на скорость движения пальцев (скорость закрашивания 10 кружков), время реакции выбора (из 4 рисунков), точность рук (№ кружка из суживающегося ряда с точным попаданием), тест постукивания, световая экстинкция (сек), координационная проба рука-глаз, цветовой тест, тест на концентрацию внимания Ландольта, тест концентрации внимания в лабиринтном тесте, время звуковой реакции (мСек), время световой реакции (мСек), вибрационная чувствительность.

5. Нагрузочные тесты: максимальная эргометрия (ватт), скорость выполнения физических упражнений, ЧД при физической нагрузке, ЧСС (через 30 сек, 1, 2, 3, 4 мин после физических упражнений), отношение ЧСС при стандартных нагрузках к ЧСС в покое, максимальное систолическое давление (при физических упражнениях), максимальное поглощение кислорода (при велоэргометрии), форсированный экспираторный объем, форсированная ЖЕЛ, экскреция фенолсульфонфталеина за 15 мин, клиренс креатинина, темновая адаптация (сек), сахарная нагрузка, скорость кислородного обмена.

6. Биохимические и клинические показатели: число эритроцитов и гемоглобин, СОЭ, общий белок, азот мочевины крови, щелочная фосфатаза крови, холестерол крови, кальций крови, альбумин крови, глуПВК-трансаминаза, соотношение альбумин/глобулин крови, глутОксалацетат трансферраза, фибриноген крови, триглицериды крови, фосфолипиды крови, креатинин крови, мочевая кислота крови, кариесный зубной индекс.

Все перечисленные показатели практически в произвольных сочетаниях используются теми или иными школами по определению БВ. Число используемых показателей также значительно варьирует от 37 для Лейпцигского Университета до 3 в некоторых тестах Финляндского Университета Jyvaskyla.

Не удается однозначно ответить на вопрос, какое же число показателей оптимально для определения БВ. Ясно, однако, что увеличение числа показателей более 10-15 мало что дает в отношении точности определения БВ, небольшое же число показателей БВ (3-4) не позволяет дифференцировать типы и профиль старения.

Оптимальным, видимо, является набор из наиболее отличающихся тестов, охватывающих различные системы и органы и отражающих:

- возрастную физиологию;
- возрастную хроническую патологию;
- пределы адаптации и функциональные резервы;
- физическую и умственную работоспособность;
- характеристики постарения наиболее важных систем организма;
- самооценку состояния.

Формулы оценки биовозраста организмов

При использовании различных тестов определения БВ для каждого обследуемого регистрируется некоторый набор количественных показателей **M1, M2, ..., Mn** – так называемых **биомаркеров** старения. Полученные данные можно анализировать двумя способами - либо строить **профиль старения**, характеризующий уровень износа отдельных структурных элементов или функций организма, или же строить **комплексный показатель старения**. В последнем случае БВ должен быть представлен в виде некоторой интегральной функции маркеров. Наиболее простой и распространенной формой такого представления является линейная регрессионная зависимость:

$$\mathbf{БВ = A + B1\ M1 + B2\ M2 + ... + Bn\ Mn} \qquad (18)$$

где A, B1, B2 , .., Bn – постоянные коэффициенты.

Сущность метода множественной линейной регрессии заключается в нахождении таких значений коэффициентов, которые минимизируют разность между значениями календарного возраста (КВ) и его регрессионным выражением (КВрегр) в виде линейной комбинации маркеров для референтной популяции, для которой были проведены измерения маркеров. Полученное выражение для КВрегр отождествляют с БВ (т.е. полагают БВ = КВрегр). Качество полученной аппроксимации оценивают

по величине коэффициента корреляции r между двумя выборками - набором реальных значений КВ для референтной популяции и набором расчетных значений БВ. Квадрат коэффициента корреляции ($\mathbf{r^2}$), значение которого обычно приводят в процентах, называется коэффициентом множественной детерминации. Эта величина показывает, какую часть вариации БВ можно объяснить за счет представления БВ в виде функции от набора маркеров.

При любом линейном регрессионном методе определения БВ для лиц молодых возрастов расчетные значения БВ оказываются в среднем выше КВ, а для старших возрастов, наоборот, величина БВ в среднем ниже КВ. Поэтому в целях компенсации этого смещения вводится понятие должного биологического возраста (ДБВ), который определяется в виде линейной функции от КВ: **ДБВ = a + b КВ,** где коэффициенты **a** и **b** определяются путем линейной регрессии БВ на КВ. При этом $\mathbf{b = r^2}$.

Вследствие значительных половых различий процессов старения, формулы для БВ и ДБВ определяют отдельно для мужчин и женщин.

В настоящее время разработано огромное количество методов определения БВ с помощью моделей множественной линейной регрессии. Обзор таких методов можно найти, например, в работах W.Dean (1988) и Л.М.Белозеровой (1999, 2000). W.Dean, в частности, отмечает, что в геронтологической литературе крайне редко встречаются работы, в которых сопоставляются результаты применения разных методов определения БВ для одной и той же популяции или же одного и того же метода - для разных популяций.

В России до настоящего времени наиболее широко использовалась разработанная в Институте геронтологии АМН СССР в Киеве методика определения БВ, включающая следующий набор маркеров:

1. АДс, АДд и АДп – систолическое, диастолическое и пульсовое артериальное давление (в мм.рт.ст.)
2. Сэ – скорость распространения пульсовой волны по сосудам эластического типа (м/сек) на участке сонная – бедренная артерии.
3. См – скорость распространения пульсовой волны по сосудам мышечного типа (м/сек) – на участке сонная – лучевая артерии.
4. ЖЕЛ – жизненная емкость легких (в мл).
5. ЗДвыд. – время задержки дыхания на выдохе.

6. А – аккомодация хрусталика (по расстоянию ближней точки зрения, выраженная в диоптриях).

7. ОС – острота слуха или слуховой порог при 4000 Гц (в Дб).

8. СБ – статическая балансировка (сек) на левой ноге.

9. МТ – масса тела (кг).

10. СОЗ – самооценка здоровья (количество неблагоприятных ответов на 29 вопросов стандартной анкеты).

11. ТВ – символьно-цифровой тест Векслера (число правильно заполненных ячеек за 90 сек).

В соответствии с этой методикой, для количественного определения БВ и ДБВ применяются следующие формулы.

Для мужчин:

БВ = 58.873 + 0.180 АДс - 0.073 АДд - 0.141 АДп - 0.262 Сэ + 0.646 См - 0.001 ЖЕЛ + 0.005 ЗДвыд - 1.881 А + 0.189 ОС - 0.026 СБ - 0.107 МТ + 0.320 СОЗ - 0.327 ТВ ДБВ = 6.58 + 0.863 КВ (19)

Для женщин:

БВ = 16.271 + 0.280 АДс - 0.193 АДд - 0.105 АДп + 0.125 Сэ + 1.202 См –0.003 ЖЕЛ - 0.065 ЗДвыд - 0.621 А + 0.277 ОС - 0.070 СБ + 0.207 МТ+0.039 СОЗ - 0.152 ТВ ДБВ = 12.10 + 0.706 КВ (20)

Коэффициент детерминации БВ составляет 86.3% для мужчин и 70.6% для женщин.

Нами была оценена эффективность определения БВ с помощью методики Института геронтологии (г. Киев) для популяции жителей г. Москвы. Было обследовано 195 практически здоровых мужчин и женщин в возрасте от 20 до 74 лет, обратившихся в геропрофилактический центр, работавший на базе Медико-санитарной части N 169 Управления медико-биологических и экстремальных проблем, и в Национальный геронтологический центр в 1995-1999 гг.

На основе полученных данных мы построили новые формулы БВ, удовлетворяющие требованиям: минимальности числа используемых маркеров, надежности всех входящих в формулы коэффициентов, учета нелинейного характера возрастной динамики некоторых маркеров. Нели-

нейные оценки БВ включают по 4 маркера как для мужчин, так и для женщин и имеют следующий вид.

Для мужчин:
БВ = 23,400 + 5.246 Сэ - 0,004 ЖЕЛ - 3,371 ln(СБ) + 0.191 ЗД
ДБВ = 10.1 + 0.762 КВ (21)

Для женщин:
БВ = -21,337 + 4.911 Сэ - 0,063 СБ + 0,173 ОС + 5,512 ln(А) ,
если аккомодация измеряется в мм, или:

БВ = 16,740 + 4.911 Сэ - 0,063 СБ + 0,173 ОС - 5,512 ln(А),
ДБВ = 13.35 + 0.691 КВ (22)
если аккомодация измеряется в диоптриях.

Коэффициенты множественной детерминации составили 76% у мужчин и 69% – у женщин. Все коэффициенты, входящие в формулы, достоверно отличны от 0 с уровнем значимости $p<0.01$.

Примером других систем БВ является, например, Австралийская система (Университет Нового Южного Уэльса, по Dean W., 1988):

Женщины: (23)
БВ = 8,93 + 0,71*Азот мочевины сыворотки (мг/дл) - 6,93*Объем форсир.выдоха в 1 сек (л) + 0,12*АДсист.(мм РТ ст) + 10,97*lg щелочной фосфатазы (МЕ/л) + 2,38*lg СОЭ(мм в час) + 0,05* Холестерин (мг/дл)

Мужчины: (23)
БВ = 47,0 + 0,42*Азот мочевины сыворотки (мг/дл) - 6,63*Объем форс.выдоха в 1 сек (л) + 0,10*АДсист.(мм РТ ст) + 5,37*lg СОЭ(мм в час)

ИЛИ

Женщины: (25)

БВ = 51,01 - 0,84*Азот мочевины сыворотки (мг/дл) + 5,53*Объем форсир.выдоха в 1 сек (л) + 0,20*АДсист.(мм РТ ст) + 0,093* Холестерин (мг/дл) -5,53*Общий кальций сыворотки (мг/дл)

Мужчины: (26)

БВ = 93,86 + 0,44*Азот мочевины сыворотки (мг/дл) - 4,92*Объем форсир.выдоха в 1 сек (л) + 0,10* Холестерин (мг/дл) -9,01*Общий кальций сыворотки (мг/дл)

Значительно хуже разработаны методы определения БВ для **животных**. Это связано прежде всего с тем, что у животных используются в первую очередь биохимические показатели, которые часто мало изменяются с возрастом.

Наилучшие корреляции дают показатели БВ у крыс и мышей, измеренные по ОВИМ (относительный вес икроножной мышцы) и ОГ (окисленный глутатион), а также для соотношения альбумин/глобулин сыворотки крови (А/Г коэффициент). Для ОГ уравнение регрессии составляет [55, 56]:

для беспородных крыс: ОГ = 2,50 + 0,188 * Возраст (мес) (27)

для крыс Вистар: ОГ = 2,29 + 0,185 * Возраст(мес) (28)

Для ОВИМ уравнение регрессии составляет [55]:

для беспородных крыс: ОВИМ = 0,631 - 0,0071 * Возраст (мес) (29)

для крыс Вистар: ОВИМ = 0,672 - 0,0106 * Возраст(мес) (30)

Для А/Г коэффициента уравнение регрессии для сыворотки крыс составляет [71]:

А/Г = 0,0754 – 0,014 * Возраст (мес) (31)

Глава 5.
Генетические методы изучения старения

5.1. Направления в генетике старения

Продолжительность жизни является видовым признаком, что дает основание для применения генетических методов изучения старения. Классические методы – исследование наследуемости долгожительства и врожденные прогерии. Современные методы основаны на методах генной инженерии и направлены на:

- выяснение основной группы генов, определяющих старение и долгожительство их аллелей,
- выяснение генов наследуемости преждевременного старения,
- генные модели старения,
- выявление генов клеточного старения,
- изучение генов которые могут быть биомаркерами старения (изменение экспрессии генов с возрастом),
- изучение генов естественного полиморфизма продолжительности жизни внутри вида,
- новое направление – изучение видоспецифических генов долголетия.

Современные исследования генетики долгожительства и старения опираются прежде всего на анализ генных мутаций у модельных организмов.

Роль генетического полиморфизма в процессе старения является предметом пристального изучения геронтологов [16, 17, 24, 37 93-95]. Имеет большое количество работ по генетике старения, обобщенных, например [93-95].

В 1980 году впервые были обнаружены мутации, увеличивающие длительность жизни, на примере нематоды C. elegans (ген age-1, кодирующий фосфоинозитол-3-киназный каскад). У дрожжей были обнаружены гены долголетия, интересные тем, что они консервативны в эволюции и обнаруживаются и у человека. В 1988 году был открыт первый ген, влияю-

щий на ПЖ, у дрозофилы, а в 1989 году показано увеличение длительности жизни при мутации в гене *p66* у мышей.

В настоящее время обнаружено более 100 генов, мутации в которых увеличивают длительность жизни, причем многие из них – консервативные в эволюции, что означает кодирование высоко значимых для выживания и фундаментальных для жизни в целом функций.

Анализ генов, однако, дает неоднозначные результаты в интерпретации. Так, во многих случаях снижение скорости клеточного деления повышает длительность жизни. Эти данные касаются прежде всего простых организмов, что, видимо, означает связь долгожительства с программами регуляции роста и развития, полового процесса и размножения. Снижают длительность жизни мутации, понижающие активность генов-эффекторов и генов регуляторов стресса и адаптации; активация их способствует долголетию.

В целом, на продолжительность жизни влияют гены, ответственные за самые различные процессы жизнеобеспечения, это гены, кодирующие:

- ГТФ-связывающие белки и ассоциированные рецепторы мембраны, регулирующие метаболизм и проведение сигналов в клетку;
- митохондриальные белки;
- деацетилаза гистонов, регулирующая активность генома;
- серин/треониновые протеинкины, фосфоинозитол-киназа, фосфатаза *PTEN*, протеинкиназа *TOR* и рецепторы инсулина (контролирующие рост и деление клеток и проведение сигналов в клетку);
- регуляторы экспрессии антистрессорных белков;
- гены-регуляторы апоптоза клетки;
- гены репарации ДНК и некоторые другие.

Видимо, значительную роль играет и вид животных. Так, у дрозофил дополнительные гены (трансгенные животные) СОД, центральный фермент антиоксидативной системы, значительно повышают ПЖ, но у мышей выключение генов данного типа не вызывает преждевременного старения. Видимо, у постмитотических животных, у которых клетки не делятся, сохранность их количества важна для ПЖ, а у мышей, у которых большинство тканей самообновляется клеточным делением, механизм повреждения клеток не играет определяющей роли в старении и ПЖ.

Пример генетически ускоренного старения обычно ассоциируют у мышей с геном *klotho*, мутация которого вызывает проявления ускоренного старения: укорочение ПЖ, гипокинезию, бесплодие, артериосклероз, облысение, атрофию кожи и тимуса, снижение числа клеток гипофиза, продуцирующих гормон роста; этот ген кодирует мембранный белок типа бета-гликозидазы. Сокращение ПЖ, возможно за счет нарастания частоты спонтанных опухолей, наблюдали у мышей с выключенным геном *p53* (центральным геном для апоптоза и регуляции клеточного деления).

В 1985 году была открыта теломераза – фермент, который достраивал укороченную теломеразу в половых клетках и клетках опухолей, обеспечивая их бессмертие (неограниченный рост клеток в культуре). Соматические клетки эукариотов, имеющие линейные хромосомы, лишены теломеразной активности. Их теломеры укорачиваются как в процессе онтогенеза и старения *in vivo*, так и при культивировании *in vitro*. Клетки больных синдромом преждевременного старения Хатчинсона-Гилфорда и синдромом Дауна имеют укороченные теломеры, однако, клетки мыши, живущей в 100 раз меньше человека, имеют в несколько раз большие размеры теломер.

Исходя из этих наблюдений, рядом авторов предлагается фармакологическая коррекция продуктов генов старения и долгожительства. Так, стимулятор сиртуинов резвератрол увеличивает ПЖ на ряде модельных организмов; рапамицин, подавляя *TOR*, подавляет некоторые возраст-зависимые изменения у человека; ингибитор рецепторов, связанных с G-белками, повышает ПЖ у дрозофил и оказывает другие эффекты.

5.2. Исследование долгожительства

Классические данные по генетике долгожительства основаны на оценке продолжительности жизни у детей и родителей и анализе феномена долгожительства. Наиболее смелые оценки, однако, дают лишь 2-4-х кратную большую вероятность дожить до 90-100 лет для кровных родственников 100-летних родителей. Имеющие обоих родителей, доживших до 80 лет, получают дополнительно порядка 5 лет ПЖ по сравнению с дожившими до 60 лет. Наличие одного родителя-долгожителя дает

значительно меньшую вероятность долгожительства у детей. У моно-зиготных близнецов ПЖ различается обычно не более чем на 3 года.

Вклад генетической компоненты в изменчивость по продолжительности жизни оценивают в 0,13-0,44 у дрозофилы, 0,20-0,30 у нематод и 0,21-0,36 у мышей.

На примере 100-летних людей предполагают важную роль у них сочетания нескольких генов долголетия, из которых наиболее важны гены, кодирующие инсулино-подобный фактор роста, цитокины, ферменты антиоксидантной системы, метаболизм липидов – характерно для долгожителей большое количество липопротеинов высокой плотности; у 100-летних сохраняется чувствительность к инсулину и высокая резистентность к оксидативному стрессу. Важную роль отводят центральному гену апоптоза *bcl-2*, блокирующему программируемую смерть клетки, в том числе от оксидативного стресса.

Видимо, наличием генетически различающихся по вероятной ПЖ групп объясняется и обнаруживаемая бимодальность кривых смертности в области 60-70 лет, сменяющаяся на одномодальность в более поздних возрастах. Последнее делает популяционную геронтологию методом исследования генетики старения и долгожительства. В целом, для человека генетическая предрасположенность к долголетию играет, видимо, незначительную роль, исключая явно выраженные случаи прогерий.

5.3. Прогерии – наследственное ускоренное старение

Прогерии являются естественными моделями старения, изучение которых позволяет ответить на ряд фундаментальных вопросов о сущности и механизмах старения, соотношении старения отдельных органов и систем и целостного организма, роли процессов роста и развития и наличии отдельного механизма старения и его программной регуляции (модное во все времена представление, до настоящего времени опровергающееся всеми исследованиями и теоретическим анализом феномена старения).

Преждевременное старение у человека известно как прогерии, которые могут носить частный характер или затрагивать весь организм, начи-

наться с рождения – натогерии, или проявляется в среднем возрасте (синдром Вернера).

Разнообразие частичных прогерий огромно, в то же время, достаточно четко выявляются некоторые общие механизмы:

- нарушение репарации и репликации ДНК,
- генетическая нестабильность;
- нарушение свойств теломер, хроматина и ядра клетки;
- нарушение экспрессии генов;
- репликативное старение клетки;
- повышенная чувствительность клеток к апоптозу;
- элиминация стволовых клеток.

Многие из частичных прогерий сопряжены с короткими теломерами: синдром Вернера, прогерия Хатчинсона-Гилфорда, атаксия телангиэктазия и др. Ускоренное укорочение теломер при прогериях, обусловливая репликативное старение дифференцированных соматических клеток и дисфункцию стволовых клеток, вызывает симптомы, во многом напоминающие нормальное старение: потеря волос, поседение, дистрофия ногтей, снижение костной массы, гематологические заболевания, иммунодефициты.

Натогерии

Натогерии встречаются спорадически, но в нескольких семьях зарегистрирована у сибсов, в том числе от кровнородственных браков, что свидетельствует о возможности аутосомно-рецессивного характера наследования этой патологии. В клетках кожи таких больных обнаружены нарушения ферментов репарации ДНК, снижение числа пересевов фибробластов (феномен Хейфлика), атрофические изменения кожи.

Хотя детская прогерия может быть врождённой, у большинства больных признаки старения проявляются на 2-3-м году жизни. Резко замедляется рост, отмечаются атрофические изменения дермы, подкожной клетчатки, особенно на лице и конечностях. Кожа истончается, становится сухой, морщинистой, на туловище появляются участки гиперпигментации и склеродермоподобные очаги, просвечивают вены.

Внешний вид больного характерен: большая голова, лобные бугры выступают над маленьким заостренным «птичьим» лицом с клювовидным носом, нижняя челюсть недоразвита; наблюдаются также атрофия мышц, дистрофические процессы в зубах, волосах и ногтях; отмечаются

изменения костно-суставного аппарата, миокарда, гипоплазия половых органов, нарушение жирового обмена, помутнение хрусталика, атеросклероз.

Одна из форм прогерий с быстро развивающимся – в течение нескольких лет или месяцев после рождения, прогерий связана с гипергомоцистеинэмией. Повышение гомоцистеина крови возможно и как заболевание, чему в последнее время отводят важную роль в патогенезе атеросклероза (возможно, до 50% от всей заболеваемости атеросклерозом всех возрастов).

Синдром Хатчинсона-Гилфорда связан с дефектом гена структурного белка ядерной оболочки ламина А, что проявляется дизморфизмом поверхности ядра, увеличением повреждений ДНК, снижение экспрессии ряда ядерных белков, происходит снижение гетерохроматин-специфичного триметилирования по остатку Lys9 в гистоне Н3. Ядра клеток больных прогерией Хатчинсона-Гилфорда теряют гетерохроматин и в результате происходит патологическая сверхактивация ряда транскриптов, в норме репрессированных, например перицентрического сателлитного повтора III.

Рестриктивная дермопатия – редкий аутосомно-рецессивный синдром; летальное перинатальное прогероидное заболевание, характеризуется задержкой роста, плотной и жесткой кожей, облысением, нарушениями костей. Вызывается делецией гена *ZMPSTE24*, кодирующего протеазу, необходимую для эндопротеолитического процессинга преламина А в зрелый ламин. Как и синдром Хатчинсона-Гилфорда, она вызывается дефектом биогенеза ламина А.

Прогерии взрослых

У взрослых прогерия имеет аутосомно-рецессивный тип наследования. Предполагается связь с нарушением репарации ДНК и обмена соединительной ткани.

Гистологическая картина включает уплощение эпидермиса, гомогенизацию и склероз соединительной ткани, атрофию подкожной клетчатки с замещением ее соединительной тканью. Отмечаются замедленный рост, симптомы гипогонадизма (при раннем развитии заболевания).

Обычно на третьем десятилетии жизни седеют и выпадают волосы, развивается катаракта, истончается кожа и атрофируется подкожная клетчатка на лице и конечностях, появляются очаги склеродермо-

подобного уплотнения, нарушения пигментации, гиперкератоз в местах давления, хронические трофические язвы. Обычно наблюдается остеопороз, кальцификация мягких тканей, часто наблюдается сахарный диабет, возможны злокачественные новообразования.

При **синдроме Вернера** аутосомно-рецессивная мутация в гене *WRN*, находящемся на хромосоме 8, приводит к нарушению функции особой геликазы, расплетающей двухцепочечную ДНК, что является необходимым условием для большинства молекулярно-генетических процессов, таких как синтез копий ДНК, а также транскрипция РНК и репарация ДНК.

Больные аутосомно-рецессивным заболеванием **атаксией-телангиэктазией** страдают от нейрональной дегенерации, преждевременного старения и увеличения частоты возникновения опухолей. *In vitro* клетки больных ускоренно теряют теломеры вследствие их оксидативного повреждения. Пациенты несут мутацию в гене, кодирующем киназу ATM, главный сенсор повреждения ДНК в клетке. Распознавая повреждение ДНК в контрольных точках клеточного цикла, киназа фосфорилирует белки-мишени: *p53, Chk1, Chk2, BRCA1, NBS1, FANCD2, гистон H2AX*, которые индуцируют задержку клеточного цикла и репарацию ДНК.

Есть целая группа генетических заболеваний, связанных с дефектами различных форм репарации ДНК и имеющих отдельные симптомы ускоренного старения. Одной из наиболее изученных является **пигментная ксеродерма** – редкое аутосомно-рецессивное заболевание, характеризуемое гиперчувствительностью к свету, ненормальной пигментацией и предрасположенностью к раку кожи, особенно на подверженных солнцу участках тела. Заболевание вызывается генетическими дефектами раннего этапа эксцизионной репарации нуклеотидов.

Для **анемии Фанкони** характерны дефекты развития (например, отсутствие пальцев), нарушения функции красного костного мозга, острая миелогенная лейкемия и другие формы опухолей. Известно 7 генов, способных приводить к анемии Фанкони: *FancA*, *FancB*, *FancC*, *FancD*, *FancE*, *FancF* и *FancG*. Продукты этих генов фосфорилируются ATM и участвуют в репарации ДНК и задержке S-фазы клеточного цикла.

Врожденный дискератоз существует в двух формах. Х-сцепленная форма вызвана мутацией гена белка дискерина, участвующего в обеспечении функции теломеразы. Аутосомно-доминантная форма вызвана дефектом в гене РНК компонента теломеразы.

К синдромам ускоренного старения относится и **синдром Дауна** – трисомия по 21-й хромосоме, среди его признаков – ранее начало возраст-зависимых патологических изменений, а также укорочение продолжительности жизни. В мозге больных обнаруживаются активированные ферменты каспаза-3 и каспаза-8, обусловливающие апоптоз нейронов в тех участках, где происходит накопление β-амилоида и нейрофибриллярных бляшек (белок-предшественник амилоида может быть потенциальным субстратом каспаз). Культивируемые *in vitro* нейроны мышей с трисомией 16-й хромосомы (сходной с 21-й хромосомой человека) имеют меньшую продолжительность жизни, чем нормальные фетальные нейроны и их гибель предотвращается ингибиторами каспаз.

Трихотиодистрофия харатеризуется пониженным содержанием серы в волосах и их повышенной ломкостью, задержкой умственного развития, гиперчувствительностью к ультрафиолету и иными врожденными аномалиями. Причина заболевания – мутации в генах *XPB* и *XPD*, кодирующих субъединицы транскрипционного фактора TFIIH. Продукты генов *XPB* и *XPD* имеют геликазную и АТФ-азную активность и участвуют в формировании "транскрипционного пузырька", а также в эксцизионной репарации нуклеотидов, связанной с транскрипцией.

Для аутосомно-рецессивныого синдрома **Ротмунда-Томпсона** ген заболевания RECQL4 относится к семейству ДНК геликаз, которые участвуют в поддержании стабильности генома, регулируя репликационную вилку

При аутосомно-рецессивном **синдроме Блума** характерны гиперчувствительность к ультрафиолету, иммунодефицит, малорослость, остеосаркомы, наблюдается преждевременная менопауза женщин. Вследствие мутации в гене *BLM*, принадлежащем к генам ДНК-геликаз, синдром характеризуется нестабильностью генома и риском канцерогенеза.

Синдром Кокейна – редкое наследственное заболевание, больные не способны к росту, обладают короткой продолжительностью жизни и нейрологической дисфункцией, имеют место нарушения функции нескольких генов (*CSA*, *CSB*, *XPD* и *XPG*), каждый из которых вносит свой вклад во взаимодействие процессов репарации и транскипции.

Синдром поломок Ниджмеджена (NBS) возникает в случае мутации гена NBS1, что ведет к нестабильности хромосом в результате дефекта структур Холлидея, образующихся в процессе пострепликативной рекомбинационной репарации двухцепочечных разрывов ДНК.

5.4. Линии животных и продолжительность жизни

Различия в ПЖ у различных линий мышей давно используется для целей геронтологии и биологии старения. Однако, не следует забывать, что это искусственно выведенные линии животных. Поэтому во многих случаях полученное продление жизни на короткоживущих линиях не воспроизводится на долгоживущих. Происходит скорее компенсация нарушений функций у короткоживущих линий, а также профилактика ряда типичных для линии заболеваний.

Мутантные мыши

Мутантные мыши часто используются для исследования старения и испытания средств профилактики старения, из которых наиболее интересны следующие.

Карликовые мыши Эймса (долгоживущие)

Являются гомозиготами аутосомно-рециссивной точечной мутации гена Prophet pit-1 и живут на 50-65% дольше дикого типа. Это одна из первых и немногих моделей указывающая на возможность значительно продлевать жизнь организма при генной мутации.

У мышей имеет место замедление развитие, гипопитуитаризм, снижен IGF-1 фактор роста и температуры тела, имеет место иммунодепрессия. Повышение активности каталазы увеличивает стресс-устойчивость. Частота опухолей одинакова с диким типом.

Значительное продление жизни отмечено также у ряда других мутантных по гену гормона роста мышей ($GHR^{-/-}$). В то же время у мышей $GHR^{+/+}$ с дополнительными копиями гена гормона роста рост ускорен, а продолжительность жизни снижена до 2-х раз.

Все эти наблюдения можно интерпретировать прежде всего как результат влияния на рост и развитие, что вторично отражается и на всем периоде жизни. Косвенно это указывает на запрограммированность старения как части жизненного цикла, какими бы конкретно механизмами это не обуславливалось непосредственно.

Мыши с ускоренным старением (SAM)

Известная линия мышей (SAM – senescence accelerated mouse) на основе линии AKR. Сублиния SAMP живет 12-15 мес, сублиния SAMR

устойчива к преждевременному старению. Интересно, что мыши SAMP нормально оканчивают развитие в 4 мес, но затем у них быстро развиваются многие признаки старения: потеря волос, кожные изъязвления, уменьшение подвижности, памяти, дезориентация, атрофия легких, повреждения сердца, катаракта, увеличение продукции свободных радикалов во всех органах. Активность СОД в 2 раза меньше нормы, повышена частота хромосомных аберраций и микроядрышек.

Мыши с генетическим ожирением

Мыши *ob/ob* имеют существенно укороченную ПЖ и повышенную скорость старения коллагена хвоста, а также снижение тимус-зависимого иммунитета. У них повышена частота опухолей, холестерин крови и артериальное давление.

Мыши с мутацией гена *klotho*

Еще известная линия мышей с ускоренным старением, укорочением ПЖ, снижением массы тела, бесплодием, атеросклерозом, остеопорозом, атрофией кожи и тимуса, эмфиземой легких. Сахар крови у них снижен, как и уровень инсулина, СТГ, ФСГ и ЛГ. Старческий фенотип у этих мышей проявляется раньше, чем у мышей SAMP.

5.5. Нокаут генов и трангенные мыши

5.5.1. Метод нокаута генов.

В основе метода лежит явление гомологичной рекомбинации – обмена соответствующими участками между парами гомологичных хромосом. Марио Капекки и Оливер Смитис независимо друг от друга изобрели способ выключения (нокаутирования) генов за счет гомологичной рекомбинации с участием **искусственно синтезированных фрагментов ДНК**, имеющих определенную последовательность нуклеотидов, соответствующую участку одного из генов, но некоторым образом видоизмененную. Такие фрагменты вводят в выращиваемые в культуре клетки обычно методом электропорации. За счет рекомбинации в некоторых из клеток культуры введенная последовательность внедряется в хромосому на

место нормальной, что приводит к изменению или отмене синтеза определенного белка. Добавив другой ген, не свойственный мышиным клеткам и делающий их устойчивыми к действию, например, антибиотика, рекомбинантные клетки можно легко отделить от остальных, получив культуру только рекомбинантных клеток.

Применение метода нокаута генов стало особенно актуальным в последние годы, после завершения секвенирования (прочтения последовательности) полных геномов как человека и мыши, а также ряда других видов животных. Последовательно нокаутируя различные гены в пределах мышиного генома, исследователи выясняют функции каждого из них. Учитывая, что у человека и мыши очень многие гены сходны и выполняют одни и те же функции, нокаутные мыши предоставляют исследователям богатый материал для изучения роли генов в нормальном развитии и жизни человеческого организма и в патологических процессах.

5.5.2. Нокаутные мыши - значение для геронтологии

В последние годы бурно развиваются исследования мутаций в геноме мышей на их продолжительность жизни. Имеется ряд обзоров и книги на эту тему [93-95]. Наиболее важными оказались следующие факторы.

Факторы роста

Особые белки, участвующие в межклеточной сигнализации и называемые факторами роста (growth factors, GF), запускают внутриклеточные каскады фосфорилирования различных белков через активацию особых клеточных ферментов - протеинкиназ.

Наиболее изучен и, видимо, важен, инсулиноподобный фактор роста (IGF-1), связывание которого с рецептором инсулина/IGF-1 на клетке активирует на внутренней мембране ее фосфоинозитол-3-киназу, что приводит к образованию низкомолекулярного посредника — фосфоинозитид-3,4,5-трифосфата, который связывается с другой киназой (3-фосфоинозитид-зависимая киназа 1 или PDK-1) и активирует (фосфорилирулирует) киназы Akt/PKB и SGK-1, что позволяет протекать норма-

льным ростовым процессам в клетке. Параллельно выключаются факторы стрессоустойчивости, такие как транскрипционный фактор FOXO.

Мутации генов перечисленных киназ или сверхэкспрессия фосфатазы PTEN, блокирующей каскад этих киназ, продлевают жизнь модельным животным. При этом у мутантных животных снижаются размеры тела и скорость метаболизма.

Еще одно семейство киназ – TOR, высоко консервативно от дрожжей до человека и участвует в регуляции многих клеточных процессов в присутствии достаточного количества питательных веществ: роста клетки, автофагии, биогенеза рибосом, трансляции, метаболизма углеводов и аминокислот, стресс-ответа, организации актинового цитоскелета.

Выключение функции компонентов TOR-каскада фосфорилирования продлевает жизнь модельным животным — нематодам и дрозофилам, что может быть связано с переключением программы развития и роста на программу поддержания жизнеспособности в условиях стресса, как и в случае с вышеописанным инсулин/IGF-1 сигнализированием.

Стресс-индуцируемые протеинкиназы (JNK, MST-1)

JNK- и MST-1-зависимые каскады фосфорилирования выполняют эволюционно консервативную (у нематод, дрозофил, млекопитающих) функцию регуляции различных форм устойчивости к стрессам через активацию транскрипционных факторов FOXO и HSF-1. В результате сверхактивации JNK обычно наблюдается увеличение продолжительности жизни.

Деацетилазы белков (Sir2/SIRT1, Rpd3/HDAC)

Деацетилазы семейства Sir2/ SIRT1 (**сиртуины**) в ответ на стрессовые воздействия подавляют проапоптозную функцию транскрипционных факторов p53 и FOXO, а также репрессируют гены, контролирующие участие эндоплазматической сети в стресс-ответе, способствуя выживаемости клетки и увеличению продолжительности жизни. Другая деацетилаза, Rpd3/HDAC, напротив, способствует старению, а мутация ее гена продлевает жизнь.

Транскрипционные факторы, обеспечивающие устойчивость к стрессам (FOXO, HSF-1)

Группа белков FOXO играет ключевую роль в ответе на различные виды стресса и регулирует широкий спектр реакций клетки – изменение метаболизма, задержку клеточного цикла, дифференцировку, апоптоз и старение. В результате дефосфорилированный транскрипционный фактор

FOXO перемещается в ядро, что приводит к остановке роста клетки (через транскрипцию гена p27 ингибитора циклин-зависимых киназ) и увеличению устойчивости к стрессу, повышая продолжительность жизни.

К FOXO-регулируемым относятся такие гены продолжительности жизни как гены супероксиддисмутазы и каталазы, аполипопротеина C-III, белков теплового шока и белка репарации GADD45. В условиях жесткого стресса FOXO активирует проапоптозный ген bim. Сверхактивация генноинженерными методами некоторых из этих генов (супероксиддисмутазы, каталазы и белков теплового шока) способна приводить к увеличению продолжительности жизни модельных животных.

Еще один транскрипционный фактор, HSF-1, индуцируется в ответ на тепловой шок и контролирует гены ответа на стресс, ответственные за увеличение продолжительности жизни, такие как гены малых белков теплового шока. HSF-1 генетически взаимодействует с FOXO, по крайней мере, у нематод.

Ген Klotho

Мутация в гене klotho приводит к уменьшению, а сверхэкспрессия — к увеличению продолжительности жизни мышей. Кодируемый данным геном пептидный гормон ингибирует эффекты инсулин/IGF-1 пути, увеличивая устойчивость к окислительному стрессу на уровне клетки и организма.

Адапторный белок p66(Shc)

У мышей с мутацией в гене p66 наблюдается увеличение продолжительности жизни. В норме этот ген, в ответ на p53-зависимую активацию, увеличивает выработку активных форм кислорода в клетке и ее апоптоз.

Другие гены долголетия

Помимо вышеперечисленных генов, к долгожительству модельных животных могут приводить: сверхэкспрессия генов репарации окисленных белков (метионинредуктазы), генов протеосомы, автофагии, а также выключение ряда митохондриальных белков (например, субъединиц белков электронотранспортной цепи) и регуляторов функции рибосом.

Глава 6.
Морфологические методы изучения старения

6.1. Уровни проявления старения

Изменения, происходящие в организме при старении, чрезвычайно разнообразны и проявляются на всех уровнях строения организма.

Первый уровень – целостный организм в том виде, как он воспринимается окружающими при непосредственном общении и при самых общих обследованиях. По мере старения редеют волосы и выпадают зубы, кожа становится морщинистой и дряблой, появляется сутулость, меняется форма грудной клетки, в голосе исчезают верхние частоты, походка становится вялой и шаркающей, увеличиваются пороги восприятия сигналов всеми органами чувств. Одновременно изменяется и психологическое состояние человека: сужается область интересов, они становятся однообразными и все больше замыкаются на собственные переживания, усиливаются проявления негативных свойств характера – недоверчивость, неуживчивость, эгоизм. На уровне целостного организма происходящие возрастные изменения проявляются не только увеличением заболеваемости по весьма многим нозологиям, но и появлением специфических "старческих" синдромов: хронической интоксикации, хронической дезадаптации, клеточной дистрофии, хронической усталости, иммунодефицита.

Второй уровень, на котором проявляется старение – уровень регулирования внутренних характеристик и параметров организма. Любой организм – целостная система, которая стремится к оптимизации своего состояния в соответствии с непрерывно происходящими изменениями окружающей среды. При этом оптимизируются не отдельные параметры и характеристики, а вся их огромная совокупность во взаимосвязи друг с другом. В процессе старения регулирование становится все более инерционным, состояние организма все чаще становится далеким от оптимального, что отрицательно сказывается на самочувствии. Пределы, в которых

могут изменяться характеристики и параметры организма сужаются – снижается его возможности адаптации к меняющимся условиям окружающей среды. Особую роль играет то, что в процессе старения снижаются возможности адаптации организма к развитию патологических процессов, что выражается снижением сопротивляемости организма и увеличением вероятности смерти за каждую последующую единицу времени.

Существенное ухудшение системы регуляции с возрастом, как предполагается, может быть связано не только с закономерными возрастными изменениями, обусловленными видовыми особенностями человека, но и тем, что давление эволюционного отбора по параметрам, проявляющимся в старости, всегда было минимальным. Это связано с двумя факторами. Во-первых, в течение сотен поколений лишь доли процента людей доживали до возраста начала естественного старения. Во-вторых, как раньше, так и теперь, потомство у человека в основном возникает в юношеском и зрелом возрастах, когда отбор по качеству возрастных изменений, происшедших в регуляторной системе, еще отсутствует.

Особую роль в процессах старения играет специальная система регуляции клеточного роста, осуществляемая субпопуляциями Т-лимфоцитов. Возрастные изменения в Т-лимфоидной системе приводят, в частности, к снижению скорости пролиферации и самообновления самых различных типов соматических клеток.

Как характерное явление, связанное со старением, отмечается общая "децентрализация" регулирования, уменьшение степени его подчиненности "интересам" целостного организма, автономизация регулирования параметров и характеристик отдельных подсистем организма.

Третий уровень, на котором прослеживаются характерные изменения, обусловленные старением – отдельные системы, органы и ткани организма. Общие признаки старения на этом уровне – уменьшение числа высокодифференцированных клеток и частичная их замена малодифференцированной соединительной тканью.

Характерные частные изменения:

- в сердечно-сосудистой системе — уменьшение эластичности кровеносных сосудов и связанное с этим увеличение скорости пульсовой волны и хрупкости капилляров, стойкое повышение артериального давления, уменьшение минутного объема крови;

- в системе дыхания – уменьшение жизненного объема легких и числа альвеол;

- в нервной системе – уменьшение числа нейронов и скорости проведения нервного импульса;

- в выделительной системе – уменьшение числа нефронов, объема почечного кровотока и скорости почечной фильтрации;

- в опорно-двигательной системе – известкование костной ткани, уменьшение числа мышечных клеток;

- во внеклеточной соединительной ткани – замена эластических и ретикулиновых волокон более грубыми и менее эластичными коллагеновыми волокнами, снижение упругости и эластичности этих последних, уменьшение количества межклеточного вещества.

Четвертый уровень изменений, происходящих при старении организма – клеточный. К этим изменениям, прежде всего, относятся:

- уменьшение проницаемости клеточных мембран, сопровождающееся, во-первых, снижением скорости диффузии в клетку питательных веществ и гормонов, регулирующих функциональную активность клетки, а, во-вторых, снижением скорости выведения из клеток продуктов их метаболизма;

- уменьшение содержания в клетках воды, что сопровождается повышением вязкости цитоплазмы и соответствующим уменьшением скорости биохимических реакций;

- метаболическое засорение необновляющихся, в частности, нервных клеток, липофусцином;

- уменьшение пролиферативной активности самообновляющихся клеток, сопровождающееся повышением в клетке количества недопереваренных субстанций и численности первичных лизосом;

- уменьшение числа рецепторов на поверхности клеток, вследствие чего меняется реакция клеток на внешние воздействия;

- изменение соотношения клеточных рецепторов, чувствительных к различным биоактивным веществам, что переводит клетку на иной тип функционирования;

- снижение энергообразующих возможностей клетки, выражающееся в уменьшении молекул АТФ и креатинфосфата, изменении сопряжения процессов окислительного фосфорилирования и окисления;

- снижение лабильности клеток, что на ЭЭГ отмечается преобладанием медленных ритмов, уменьшением частоты импульсов действия для моторных единиц мышечной ткани и частоты импульсации в афферентных и эфферентных нервах.

Пятый уровень изменений относится к клеточным органеллам. К этим изменениям, в частности, относятся:

- целый комплекс изменений, наблюдаемых в митохондриях (увеличение объема митохондрий при снижении площади мембран в каждой отдельной митохондрии, связанное с увеличением объема резкое набухание митохондрий и расширение промежутков между кристами, разрушение внутренней и повреждение наружной мембран), в связи со всеми этими явлениями интенсивность внутриклеточных дыхательных процессов с возрастом снижается;

- в белковообразующем внутриклеточном комплексе отмечается расширение цистерн гранулярного и гладкого эндоплазматического ретикулума с уменьшением числа рибосом на мембранах, а также редукция и уменьшение площади аппарата Гольджи, проявлением застойных явлений;

- уменьшение надежности лизосомальных мембран, что приводит к выходу в цитоплазму пищеварительных ферментов и аутолизису клетки;

- полиплоидия невозобновляемых и почти невозобновляемых клеток;

- образование многочисленных складок ядерных мембран, дающих увеличение площади соприкосновения кариоплазмы с цитоплазмой, компенсирующее снижение проницаемости мембраны;

- расширение ядерных пор и появление функционально бесполезных ядерных включений.

Шестой, наиболее тонкий уровень изменений, происходящих в организме при старении, является молекулярным. На этом уровне наблюдаются следующие явления:

- накопление точечных соматических мутаций в молекулах ДНК, приводящих к дедифференцировке клеток, снижению их функциональной эффективности, искажению метаболических процессов. Мутации возникают главным образом в какой-либо фазе митоза, при репликации молекул ДНК, при этом одновременно снижается эффективность внутриядерных репаративных процессов, что возможно связано с накоплением мутации, и

в тех локусах, которые ответственны за синтез различных видов репарационных ферментов;

- накопление дефектных, функционально неэффективных и даже вредных молекул, происходящее за счет процессов окисления свободных радикалов в сложных молекулах органических веществ, участвующих в метаболизме клетки. Подавляющее большинство таких молекул возникает под действием проникающего извне ионизирующего излучения;

6.2. Морфологические критерии старения

6.2.1. Общие проявления старения тканей

Важнейшим является изменение цитоархитектоники органов и тканей, которые состоят из старых клеток. Например, естественное снижение скорости клеточного самообновления в коже при наличии естественно идущих процессов дифференцировки кератиноцитов и отшелушивания клеток ведут к таким типичным макропроявлениям старения кожи, как огрубление ее, снижение эластичности, утончение и пр.

Для длительно существующих нервных клеток типичным, например, является механизм старения по типу "метаболического засорения" – накопления липофусцина, тогда как снижение скорости самообновления клеток кожи ведет к выраженным структурным изменениям их по типу дистрофического.

На примере старения кожи четко видно ведущее значение регуляторных механизмов – скорость клеточного роста чисто регуляторный феномен и нет проблем повысить скорость клеточного самообновления в течение часов, например, в ходе регенерации, когда процессы клеточного деления ускоряются многократно. В то же время, старение кожи – наиболее характерный и бросающийся в глаза признак старения организма.

Типичными являются для старения клеток общие принципы старения – неравномерность старения разных типов клеток и формируемых ими

структур (например, артериол мышц, почек и кишечника) или темпа и выраженности старения одного функционально-структурного комплекса по сравнению с другим.

Конкретные проявления старения, например, нейроцита и печеночной клетки различны, однако, существуют и вполне определенные общие черты, общность которых лучше выявляется при анализе на более высоком уровне обобщения. Типичным является избыточное развитие и огрубление соединительной ткани, замена на нее паренхиматозных элементов. Наблюдаются явления атрофии и дистрофии различных клеток. Уменьшение количества паренхиматозных клеток компенсируется активированием функций и гипертрофическими процессами для оставшихся клеток. Увеличивается число ядер в клетке - полиплоидия, причем ядерная мембрана образует многочисленные складки для увеличения площади соприкосновения с цитоплазмой, расширяются ядерные поры, появляются ядерные включения (обычно функционально не активные).

Гистология старых тканей.

При старении изменяется плотность **цитоплазматического матрикса** клетки, как с просветлением, так и с огрублением его участков, с очагами деструкции и некробиоза.

Постоянный признак старения клетки – изменение **митохондрий**: просветление матрикса, расширение межкристных промежутков, резкое набухание митохондрий, разрушение их внутренней мембраны с миелинизацией, повреждение наружной мембраны. Объем митохондрий в клетке повышается при снижении площади мембран в каждой отдельной митохондрии.

Для **белоксинтезирующего аппарата** отмечается расширение цистерн гранулярной и гладкой эндоплазматической сети, уменьшается количество рибосом на мембранах. Отмечают редукцию и уменьшение площади **комплекса Гольджи**, застойные явления в нем.

Достаточно постоянным признаком старения клетки является повышение количества **первичных лизосом**, в них увеличивается количество недопереваренных субстанций, снижается стабильность лизосомальных мембран, что ведет к элементам аутолиза клетки.

Наружная **клеточная мембрана** клеток также значимо изменяется: отмечаются очаговые уплотнения и утолщения, снижается интенсивность

микропиноцитоза, количество микроворсинок, микровыростов. Изменяется количество и функция щелевидных контактов клеток и соединяющего клетки межклеточного вещества.

Качественно меняется реакция клетки на внешние возбудители, прежде всего за счет значительного изменения числа рецепторов на ее поверхности.

Наиболее типичным является повсеместная атрофия тканей при старении. Когда это касается капилляров и соединительной ткани, то возникают признаки ишемии и склероза ткани.

Дегенеративные изменения касаются многих типов клеток и проявляются в общем виде как вакуолизация, нейрофагия, гиалиновая дегенерация, гидропическое набухание, вакуолизация и сморщивание, частичное растворение клеток с возрастом, с выраженными явлениями склероза на месте бывшей паренхимы.

Многие клетки (особенно нервные) оказываются забиты липофусцином, в лизосомах виды непереваренные включения, в пероксисомах – кристаллические включения и т.п.

6.2.2. Общеморфологические методы изучения старения

В целом, сюда обычно относят общий вид животных и гистоморфологию органов и систем.

Общий вид мышей принято оценивать в баллах, учитывая:

- *блеск шерсти,*
- *цвет шерсти (оттенки желтизны для белых мышей),*
- *лоск шерсти (свалянность, клочковатость),*
- *наличие старческого горба,*
- *блеск глаз,*
- *рост (до основания хвоста),*
- *длину хвоста,*
- *вес животных.*

Метод несколько субъективен. Разбросы могут быть значительны даже для содержащихся в одной клетке животных.

При тщательном содержании в «домашних» условиях **общий вид** мышей в наших исследованиях мало отличался от вида молодых даже в 1,5-2-летнем возрасте, хотя общая смертность мышей в течение месяца была уже высока.

В условиях вивария на стандартном корме типичные изменения: тусклый блеск шерсти, клочковатость шерсти, желтизна задней части спины, горбатость, признаки бельма – типично развиваются уже с 8-10 месяцев.

Рост грызунов продолжается в течение всей жизни, однако, со временем он резко замедляется.

Вес в наших условиях, когда животные получали неограниченное и разнообразное питание, четко показал разделение мышей на 2 группе – с массой тела 24-27 гр. и 33-40 гр., с явными признаками ожирения во втором случае.

Гистоморфология предполагает все разнообразие методов световой и электронной микроскопии, а также широкое использование гистохимии и иммунофлюоресцентных методов.

Несмотря на достаточно подробные исследования гистоморфологии старения практически всех тканей, для рутинных исследований геронтологами и биологами старения она практически не используется, так как количественные критерии оценок мало разработаны.

Достаточно широко применяют обычно исследование митотического индекса, так как снижение скорости клеточного самообновления тканей – важнейший показатель старения. Для клеток печени различия могут составлять 1-2 порядка, для других клеток – разы, для хрусталика – десятки процентов.

В последние годы широко применяется окраска флюоресцентными красителями и иммунофлюоресценция, что позволяет количественно изучать практически любые структуры.

МЕТОДЫ

Прямая спектроскопия

Методами прямой спектроскопии можно характеризовать макромолекулы в биологических жидкостях, клетках и тканях.

Используют следующие характерные частоты поглощения: 200-(210)-225 нм – пептидная связь (характеристичность и чувствительность как у биуретовой реакции), 260 нм – ДНК, РНК, 280 нм – ароматические аминокислоты, обычно триптофан, 280-300 нм – ненасыщенные связи липидов (-C=C-), 330-400 нм – стероиды и др.

Сорбция красителей тканями. Имеются сообщения о снижении старыми тканями способности к сорбции красителей.

Сорбция нейтрального красного. *Навеску печени в 150-200 мг помещают в 5 мл 0,01% нейтрального красного на 30 мин и сорбированную краску экстрагируют 2 мл спирта, количественно определяя результаты колориметрически при длине волны 450 нм.*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЛЮОРОХРОМОВ

Используют:

1. Собственную люминесценцию (люминометрия, например, хемилюминесценция крови (свободнорадикальная).

*2. Непосредственное возбуждение структур клетки (обычно – триптофановая флюоресценция, НАД(Ф) и НАД(Ф)*Н и др.).*

3. Окраска флюорохромами определенных структур (ядер, митохондрий и пр.).

4. Исследование степени прохождения флюорохромов в клетки в зависимости от условий (pH, мембранный потенциал, вязкость мембран и пр.) – метод флюоресцентных зондов.

5. Прямую иммунофлюоресценцию.

6. Непрямую иммунофлюоресценция.

Окраску флюорохромами проводят чаще для суспензий клеток в физиологических солевых растворах, но используют и различные методы фиксации. Исследуют флюоресценцию клеток и тканей в флюоресцентных микроскопах при ультрафиолетовом возбуждении и соответствующих фильтрах. Обычно это зеленая, красная, реже синяя флюоресценция.

Количественные данные получают в современных работах используя проточные цитофотометры.

Для количественных данных возможно использование флюориметров, дающих динамические данные.

Удобно также микрофильмировать данные, в том числе для количественной обработки микрофотографий. Возможно использование обычной цифровой фотокамеры или специальных фото-приставок с выходом на компьютер.

Для обработки микрофотографий используют различные компьютерные программы, количественные данные при этом зачастую не хуже, чем при проточной цитофотометрии.

ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИЯ

Метод позволяет выявлять практически любые компоненты или даже несколько сразу, при различном цвете флюоресценции. Обычно клетки также подкрашивают для визуализации ядра (этидий бромид), цитоплазмы и иных компонентов клетки.

Используют прямую иммунофлюоресценцию (антитела связанные с флюорохромом) и непрямую (немеченые специфические антитела и антитела к ним меченные флюорохромом), которая часто более чувствительна. Возможна иммунофлюоресценция в мазках, суспензиях клеток, гистологических препаратах и т.п.

Для идентификации, например, **Т-лимфоцитов** часто используют антигены: CD3+ (все Т-лимфоциты), CD4+ (Т-хелперы) и CD4+ (Т-супрессоры).

Популярны в последние годы исследования **стволовых клеток**. Фенотипическим "портретом" чистых популяций гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) считается присутствие на поверхности клетки маркеров CD34 и CD133 (у человека), c-kit (**CD117**) у мышей, и отсутствие CD38, и специфических маркеров комитированных клеток гликофорина А, CD2, CD3, CD4, CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD56 и CD66b. Долгое время считалось, что ГСК способны дифференцироваться только в клетки крови. Однако исследования по выявлению мультипотентности ГСК выполненные в последние годы показали, что при трансплантации в кровоток ГСК могут дифференцироваться также в гепатоциты, клетки эпителия и эндотелий.

ГСК способны мигрировать не только в костный мозг, но и из костного мозга в кровоток. Показано, что выход ГСК из костного мозга

происходит в ответ на воздействие факторов мобилизации: гранулоцитарно-макрафагального колоние-стимулирующего фактора (ГМ-КСФ), гранулоцитарного колоние-стимулирующего фактора (Г-КСФ). Эти факторы также выделяются клетками стромы. Воздействие ГМ-КСФ и Г-КСФ увеличивает количество ГСК в периферической крови на порядок.

ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫЕ ЗОНДЫ

Флюоресцентные зонды широко используются для исследования физиологии клетки, так как позволяют в динамике и прижизненно следить за самыми различными процессами в клетке.

Обычно добавляют флюресцентный зонд, специфический для изучаемой структуры или функции, в суспензию клеток в физиологическом растворе и исследуют кинетику флюоресценции, в том числе при добавлении различных нефлюоресцирующих клеточных стимулов. Более распространено изучение флюоресцентых зондов флюориметрией, но возможны и серийные микрофотографии в том числе с количественным обсчетом данных.

Таблица 6.

Характеристики наиболее распространенных флюорохромов

Название	**Длина волны поглощения**	**Длина волны флюоресценции**
Пептидная связь	200-210-225 nm	
Триптофан и др. ароматические аминокислоты	280 nm	
Ненасыщенные связи липидов -C=C-	280-330 nm	
Стероиды	330-400 nm	
ДНК, РНК	260 nm	
ФАД внутриклеточный	365 nm	530 nm
НАД(Ф) внутриклеточный	260 nm	
НАД(Ф)*Н внутриклеточный	340 nm	465 nm
Хлортетрациклин	392 nm	536 nm
Alexa 430	431 nm	540 nm
Alexa 488	493 nm	520 nm
Alexa 555	553 nm	568 nm
Alexa Fluor 430 antibody conjugate	431 nm	540 nm
Alexa Fluor 488 hydrazide-water	493 nm	518 nm
Alexa Fluor 555 antibody conjugate	553 nm	568 nm

9-Aminoacridine hydrochloride	400 nm	430 nm
BCECF pH 5.5	485 nm	521 nm
BCECF pH 9.0	501 nm	527 nm
BOBO-1-DNA	461 nm	484 nm
BODIPY TMR-X antibody conjugate	544 nm	573 nm
Bodipy TMR-X conjugate	544 nm	573 nm
BODIPY TMR-X, MeOH	544 nm	570 nm
BODIPY TMR-X, SE	544 nm	570 nm
Calcein	493 nm	514 nm
Calcein pH 9.0	494 nm	514 nm
Calcium Orange	549 nm	574 nm
Calcium Orange Ca^{2+}	549 nm	573 nm
CFDA	495 nm	517 nm
CI-NERF pH 2.5	504 nm	541 nm
Cy 2	489 nm	503 nm
2`7`-Dichlorofluorescein diacetate	504 nm	529 nm
3,3`-Diethyloxadicarbocyanine iodide	579 nm (480)	610 nm (500-520)
DM-NERF pH 4.0	493 nm	530 nm
DTAF	495 nm	517 nm
Ethidium Bromide	524 nm	605 nm
Ethidium homodimer	528 nm	617 nm
Ethidium homodimer-1-DNA	528 nm	617 nm
eGFP(Enhanced Green Fluores.Protein)	488 nm	509 nm
FDA	495 nm	517 nm
FITC	495 nm	517 nm
FITC antibody conjugate pH 8.0	495 nm	519 nm
Fluor-Ruby	554 nm	582 nm
Fluo-3	506 nm	526 nm
Fluo-4	494 nm	516 nm
Fluorescein	495 nm	517 nm
Fluorescein 0.1 M NaOH	493 nm	513 nm
Fluorescein antibody conjugate pH 8.0	493 nm	517 nm
Fluorescein pH 9.0	490 nm	514 nm
Fluoro-Emerald	495 nm	524 nm
FM 1-43	472 nm	578 nm
FM 1-43 lipid	473 nm	579 nm
Fura-2 (AM)	355 nm	495 nm
GFP (S65T)	489 nm	509 nm
Hoechst 33342	346 nm	480 nm
LysoSensor Green	447 nm	504 nm
LysoSensor Green pH 5.0	447 nm	502 nm
Magnesium Orange	550 nm	575 nm
MitoTracker Orange	551 nm	575 nm
MitoTracker Orange, MeOH	551 nm	575 nm
MitoTracker Green	490 nm	512 nm

MitoTracker Green FM, MeOH	490 nm	512 nm
NBD-X	466 nm	534 nm
NBD-X, MeOH	467 nm	538 nm
NeuroTrace	497 nm	524 nm
Nile Red	559 nm	637 nm
Nile Red-lipid	553 nm	636 nm
Nissl	497 nm	524 nm
Oregon Green 488	498 nm	526 nm
Phycoerythrin	565 nm	575 nm
PO-PRO-3	539 nm	571 nm
PO-PRO-3-DNA	539 nm	571 nm
POPO-3	533 nm	573 nm
Propidium Iodide	538 nm	617 nm
Propidium Iodide-DNA	538 nm	619 nm
R-Phycoerythrin pH 7.5	565 nm	576 nm
Pyrene	338 nm	375 nm
	(286 и 334)	(395 и 470)
Rhod-2	552 nm	577 nm
Rhod-2 Ca^{2+}	553 nm	578 nm
Rhodamine	551 nm	573 nm
Rhodamine phalloidin pH 7.0	558 nm	575 nm
Resorufin-beta-D-galactopyranoside	571 nm	590 nm
Rhodamine 123	506 nm	526 nm
	(340, 465-510)	(520-580)
Rhodamine 110	497 nm	520 nm
Rhodamine 110 pH 7.0	497 nm	520 nm
Rhodamine Green	497 nm	524 nm
Rhodaminen Green pH 7.0	497 nm	523 nm
Rhodol Green antibody conjugate	499 nm	524 nm
SYBR Green I	498 nm	522 nm
SYTO 13-DNA	488 nm	506 nm
SYTO 45-DNA	451 nm	486 nm
Tetramethylrhodamine antibody conjugate pH 8.0	552 nm	578 nm
Tetramethylrhodamine dextran pH 7.0	555 nm	582 nm
YO-PRO-1-DNA	491 nm	507 nm
YOYO-1-DNA	491 nm	509 nm
5-TAMRA	549 nm	577 nm
5-TAMRA pH 7.0	553 nm	576 nm
5-TAMRA-MeOH	543 nm	567 nm

Глава 7.
Методы изучения старения клетки

7.1. Общие проявления старения клетки

Во многих клетках с возрастом происходят однотипные изменения.

Уменьшается проницаемость клеточных мембран со снижением скорости диффузии в клетку питательных веществ и гормонов и снижением скорости выведения из клеток продуктов их метаболизма; уменьшается содержание в клетках воды; происходит метаболическое засорение, в первую очередь необновляющихся, в частности, нервных клеток, липофусцином, солями тяжелых металлов и другими стабильными веществами; уменьшается пролиферативная активность самообновляющихся клеток.

На поверхности клеток уменьшение числа рецепторов вследствие чего меняется реакция клеток на внешние воздействия; изменение соотношения клеточных рецепторов, чувствительных к различным биоактивным веществам, что переводит клетку на иной тип функционирования; снижается энергообразующая возможность клеток – уменьшается пул молекул АТФ и креатинфосфата, изменяется сопряжение процессов окислительного фосфорилирования и окисления.

Происходят типичные изменения в **клеточных органеллах**.

Развивается целый комплекс изменений, наблюдаемых в **митохондриях** – энергетических «станциях» клетки (увеличение объема митохондрий при снижении площади мембран в каждой отдельной митохондрии, набухание митохондрий и расширение промежутков между кристами, разрушение внутренней и повреждение наружной мембран митохондрий), в связи со всеми этими явлениями интенсивность внутриклеточных дыхательных процессов с возрастом снижается.

В **белковообразующем внутриклеточном комплексе** отмечается расширение цистерн гранулярного и гладкого эндоплазматического ретикулума с уменьшением числа рибосом на мембранах, а также редукция и уменьшение площади аппарата Гольджи с появлением застойных явлений.

Уменьшение надежности **лизосомальных** мембран, что приводит к выходу в цитоплазму пищеварительных ферментов и аутолизису клетки;

Развивается **полиплоидия** невозобновляемых и слабо возобновляемых клеток. Происходит образование многочисленных складок ядерных **мембран**, дающих увеличение площади соприкосновения кариоплазмы с цитоплазмой, компенсирующее снижение проницаемости мембраны. Происходит расширение ядерных пор и появление функционально бесполезных ядерных включений.

Наиболее тонкий уровень изменений, происходящих в организме при старении, является **молекулярным**. Наблюдается накопление точечных соматических мутаций в молекулах ДНК, приводящих к дедифференцировке клеток, снижению их функциональной эффективности, искажению метаболических процессов; нижается эффективность внутриядерных репаративных процессов. Происходит накопление дефектных, функционально неэффективных и вредных молекул.

Дегенерация клеток в старости.

Многие клетки старых тканей находятся в состоянии различной степени **дегенерации** – вакуолизация, нейрофагия, гиалиновая дегенерация, гидропическое набухание, вакуолизация и сморщивание, частичное растворение клеток с возрастом. Наружная **клеточная мембрана** клеток также значимо изменяется: отмечаются очаговые уплотнения и утолщения, снижается интенсивность микропиноцитоза, количество микроворсинок, микровыростов. Изменяется количество и функция щелевидных контактов клеток и соединяющего клетки межклеточного вещества. Качественно меняется реакция клетки на внешние возбудители, прежде всего за счет значительного изменения числа рецепторов на ее поверхности.

7.2 Апоптоз клеток и старение

Накопление в тканях с возрастом старых клеток, возможно, является результатом появления резистентных к апоптозу стареющих клеток, которые аккумулирует множественные повреждения, приводящие, в конечном счете, к неоплазии, нейродегенеративным процессам и инфаркту миокарда. Как считают, это связано с развитием в старости репрессии генов G_1 фазы, увеличением экспрессии гена анти-апоптоза bcl2 и отсутствием протео-

лиза, что, является «тройным замком», предотвращающим апоптотическую гибель стареющих фибробластов, как считают ряд авторов.

Апоптоз представляет собой программированную гибель клетки и носит активный специфический характер, отличающийся от пассивного процессе некроза тканей: зависит от синтеза ДНК и РНК, ионов кальция и активных форм кислорода (АФК), сопровождается пикнозом ядра и фрагментацией ДНК специфическими ферментами, для него характерна ранняя потеря потенциала мембран митохондрий и появление фосфатидилсерина на мембране клеток, что индуцирует их активный фагоцитоз, а также отсутствие рубца на месте апоптоза. Этот набор признаков может различаться в зависимости от конкретного механизма апоптоза.

Апоптоз может происходить как запрограммировано (обычно на различных этапах эмбриогенеза), так и индуцироваться – Fas-рецепторами мембраны, фактором некроза опухоли, внешними АФК и внутренним повышением H_2O_2, повышающими цАМФ клетки факторами, активацией аденозиновых рецепторов, повышением кальция цитоплазмы (иономицином – А23187), и любым длительным повышением кальция цитоплазмы, что ведет к деэнергизации митохондрий. Цитохром с – зависимый путь апоптоза является, видимо, отдельным путем как реакцией на появление митохондриального цитохрома с в цитоплазме клеток; набухание митохондрий приводит к открытию митохондриальной поры с выходом индуцирующего апоптоз белка. Любое повышение фосфатидилсерина на клетке ведет к ее фагоцитозу. Повреждения ДНК в ходе мутагенеза, ионизирующего облучения, стресса, возможно и в ходе старения, также может запускать апоптоз.

Главный путь про-апоптических эффектов – белок p53: он осуществляет динамический баланс (с участием белка p26 и др.) основных механизмов повреждения и репарации клетки: повреждение ДНК – репарация ДНК – запуск апоптоза. Белок Bcl2 (баланс bcl2/bax) видимо, главный анти-апоптический путь: этот белок входит в структуры ядра, митохондрий, саркоплазматического ретикулума, снижает выход ионов кальция из последнего, а также осуществляет иные не совсем ясные по механизму анти-апоптические эффекты.

Типичные **модели** апоптоза:

- валиномициновый апоптоз с деэнергизацией митохондрий,

- перекисный апоптоз (10-100 мкМ H_2O_2 в среде) с участием НАДФ-оксидазы плазматической мембраны, формирования перекисного окисления липидов мембраны, входом кальция и активацией фосфолипазы С плазматической мембраны с индукцией фагоцитоза макрофагами;

- А23187-индуцированный – независимый от внешнего кальция и от фермента ПАДФС;

- дексаметазоновый апоптоз тимоцитов крыс и мышей (через 15 сек активируется фосфолипаза С, через 1-2 часа повышается кальций цитоплазмы, через 4-5 часов происходит фрагментация ДНК с предыдущей деэнергизацией митохондрий или без этого процесса, через 24 часа клетки интенсивно окрашиваются красителями и происходит их лизис; дексаметазоновый апоптоз блокируется циклогексамидом (синтез белка), актиномицином Д (синтез РНК), связывающими и блокирующими эффекты ионов кальция агентами в т.ч. сульфатом цинка, а также колхицином и цитохалазином С (блокада пор митохондрий).

- типичный ишемический апоптоз, видимо, сводится к следующему: гипоксия – снижение дыхания митохондрий – снижение поглощения кальция цитоплазмы – активация фосфолипазы А2 на наружной мембране митохондрий – набухание митохондрий – разрыв их наружной мембраны – выход цитохрома с – активация каспазы 3 – апоптоз.

Этапы апоптоза:

- запуск апоптоза (обычно рецепторы клетки или генетическая программа, а также набухание митохондрий любого механизма или длительное повышение кальция цитоплазмы любой природы);

- передача сигнала (через рецепторы, кальциевые механизмы и протеинкиназу С запускаются специфические каспазы, являющиеся главными механизмами апоптоза);

- конвергенция (различные механизмы конвергируют на каспазы (первичная каспаза 2, затем 8 или 9 – для цитохром с – зависимого пути, затем центральная каспаза 3 и конечные 7 и 6), обычно важна каспаза 3, которые активно синтезируются с участием вновь образованных РНК);

- проявление апоптоза: деэнергизация митохондрий, утрата потенциала, фрагментация ДНК с активным синтезом специальных эндонуклеаз;

- окончание апоптоза (появление фосфатидилсерина на мембране клетки и ее активный фагоцитоз; участие АФК – внешний H_2O_2 передает сигнал апоптоза окружающим клеткам; формирование H_2O_2 в клетке идет при

любой блокаде утилизации O_2 ниже цитохрома с и при повышение O_2, что формирует патологическую цепочку: нарушения дыхательной цепи митохондрий – супероксид – перкосидация липидов мембран – блок входа фосфатидилсерина в клетку и кальция из клетки – прогрессирующее ухудшение состояния митохондрий).

МЕТОДЫ РЕГИСТРАЦИИ АПОПТОЗА

- морфология апоптозных клеток с обычными красителями;

- флюоресцентный зонд на снижение потенциала митохондрий (родамин 123 и др.);

- фрагментация ДНК – морфология, электрофорез [272];

- акридин-оранж 10-нонил бромид для регистрации изменений митохондрий [185];

- красители (неспецифический метод регистрации лизиса клеток);

- специфические ферменты апоптоза (каспаза 3 и др.).

В настоящее время наиболее часто используют избирательную окраску апоптозных клеток, что дает возможность использовать автоматические проточные анализаторы для анализа их числа. Используют наиболее часто:

- **YO-PRO-1** (длина волн возбуждения и флюоресценции соответственно 491/509 нм)**,** избирательно окрашивает апоптозные клетки на многих моделях апоптоза;

- **Hoechst 33342** (346/480 нм), прокрашивает клетки на начальных этапах апоптоза, когда пропидий и этидий бромид еще не способны войти в клетку ввиду целостности мембраны апоптозных клеток;

- **SNARF-1**, pH индикатор реагирующий на закисление апоптозной клетки, окраска параллельна с прокрашиванием Hoechst 33342**;**

- акридиновый оранжевый по-разному окрашивает нормальные и апоптозные клетки (увеличивается красная и снижается зеленая флюоресценция), что дает возможность выявлять их на проточном цитометре;

- **другие красители**: Alexa Fluor 488 annexin V (495/519 нм), FITC annexin V (494/519 нм), Biotin-X annexin V и Alexa Fluor 488 streptavidin (345/442 нм), R-phycoerythrin (R-PE) annexin V (496/578 нм), allophycocyanin annexin V (650/660 нм) и др.

Широко используется метод регистрации специальных, активно синтезирующихся в апоптозных клетках, каспаз (обычно каспазы 3). Используют иммунофлюоресцентный метод с моноклональными антителами к

каспазе 3 или спектрофлюориметрический метод с использованием специфического субстрата для каспазы 3: DEVD-MCA, Ac-DEVD-AFC, Ac-DEVD-AMC, Ac-DEVD-pNA, Ac-DEVD-CHO и др.

Описывают спектрофлюориметрическое определение каспазы 3 [212] при исследовании индуцированного кортизоном апоптоза тимоцитов (аналогично используется спектрофотометрия).

Ткань тимуса гомогенизируется на льду в буфере содержащем 10 мМ HEPES, pH 7,2, 5 мМ EGTA, 0,1% CHAPS, 5 мМ DTT, 1,5 мМ $MgCl_2$, ингибиторы протеаз (0,5 мМ фенилметилсульфонил флюорида 10 мкг/мл пепстатина 20 мкг/мл леупептина, 10 мкг/мл апротинина) и центрифугируют 20 мин при 20 000 g, используя супернатант для определения каспазы 3; стандартизация по белку против БСА как стандартного белка. При проведении реакции супернатант разводят до 5 мкг белка/мкл и по 25 мкл раствора (125 мкг белка) переносят в 96-плашечные платы; добавляют 50 мкл буфера (100 мМ HEPES pH 7,25, 10% сахароза, 0,1% CHAPS, 5 мМ DTT, 0,0001% Nonidet P-40), субстрат - 50 мкМ DEVD-MCA, реакцию заканчивают добавлением 50 нМ DEVD-CHO ингибитора; реакцию проводят при 37°С мониторируя реакцию по флюоресценции при длине волны возбуждения 355 нм и флюоресценции 460 нм.

7.3. Старение и клеточная пролиферация

7.3.1. Стимуляторы и ингибиторы пролиферации клеток

Для современных многоклеточных известно множество разнообразных регуляторных влияний на пролиферативную активность составляющих их организм клеток. Это система циклических нуклеотидов, ионов кальция и магния, цинка, изменение мембранного потенциала клеток, система ретин-промин, простагландины и простациклины, система кейлонов, целый ряд факторов, выделяемых клетками различного типа белковой и иной природы, большинство гормонов, нейромедиаторы, наконец, целая группа межклеточных регуляторов пролиферации и дифференцировки клеток как имунного, так и иного типов – лимфокейлоны [14].

Наиболее древним фактором, ограничивающим накопление биомассы, является, видимо, ограничение питательных ресурсов в среде. Этот фактор работает на всех уровнях организации живого, вплоть до биоценозов, но факторы регуляции различны на каждом уровне. Для клеток, например, широко используется этот фактор регуляции для задержки в G_1 фазе путем создания дефицита аминокислоты. Высокий уровень даже одной аминокислоты может служить сигналом для начала роста клеток. Оба феномена являются регуляторными и не могут обычно быть сведены просто к голоданию клеток, как это можно видеть при дефиците других веществ. Так, только добавление серина, но не иных аминокислот, запускает клеточный рост, и только дефицит цистеина тормозит его.

Еще одним важным филогенетически ранним механизмом регуляции является контактное торможение. Этот тип торможения известен для всех типов клеток и обычно отсуствует только у опухолевых клеток. Считают, что этот тип регуляции связан не с контактом клеток, а с ближайшим их микроокружением и выделяемыми ингибиторами – специальными ядерными белками. Как и в случае дефицита аминокислот, этот древний тип регуляции функционирует на стадии G_1/S клеточного цикла.

В многоклеточном организме описанные системы могут подвергаться значительным влияниям. Так, если в обычных условиях внешнее содержание аминокислот во внутренней среде организма обычно мало изменяется, при подготовке к пролиферации резко активируется транспорт аминокислот внутрь клетки и активируется древняя регуляторная система контроля клеточного деления.

Для современного многоклеточного организма продолжает функционировать сложная система внутриклеточного контроля клеточной пролиферации. В клетке существует несколько систем регуляции пролиферации. В большинстве случаев это два противоположно действующих фактора. Считают, что способность клетки находиться в состоянии покоя связана с накоплением в ней специального ингибитора клеточного цикла, что в начале ведет к возрастанию времени клеточного цикла, а затем и выходу из него. Ингибитор клеточного цикла синтезируется на ранних стадиях G_1 фазы и действует противоположно белку-активатору, который увеличивает фосфорилирование негистоновых белков ядра и растормаживает синтез РНК на ДНК-матрице. Стимулятор синтезируется в покоящихся клетках заново или формируется из профактора. В некоторых

клетках может быть несколько различных ингибиторов. Белки-стимуляторы и ингибиторы обычно не видоспецифичны и не зависят от типа клеток, что доказано в экспериментах по реактивации покоящихся ядер при слиянии их с активированными к пролиферации клетками и цитопластами.

В G_1 – фазе имеется «точка принятия решения» о пролиферации, когда возможно движение как к состоянию покоя, так и к состоянию клеточного деления. В отличие от постоянного синтеза ингибитора, синтез стимулятора обычно является индуцибельным процессом, находящимся под строгим контролем. В клетках активатор деления может находиться в составе неактивного профактора и синтезироваться на готовых РНК-матрицах или РНК может синтезироваться заново.

К системам клеточного контроля деления можно отнести также HMG-белки, расплетающие ДНК-белки, ферменты синтеза ДНК, протеинкиназы, через которые обычно действуют регуляторы более высокого уровня и пр. Белки-активаторы часто регулируют целый каскад ниже лежащих активаторов, действующих на многие процессы внутри клетки, что необходимо для синхронного вывода ее в новое, активное состояние с резко повышенным метаболизмом.

Широко распространенной и универсальной системой регуляции является система циклических нуклеотидов, а также система кальций-зависимых белков (обычно протеинкиназы). В различных клетках одни и те же влияния могут вызывать как активацию, так и подавление клеточного деления. Простагландины, гистамин, внутриклеточные амины , другие простые и сложные регуляторы могут действовать самостоятельно или через систему циклических нуклеотидов и кальция. Показано, например, что гистамин важен для G_1/S перехода, а при ингибировании синтеза внутриклеточных полиаминов клетка останавливается в G_2 стадии.

В настоящее время схемы контроля клеточного деления дополнены представлениями о специальных белках-циклинах, активация которых привязана к определенной части клеточного цикла, и о наличии специальной программы клеточной гибели – апоптоза.

Мощный прорыв в современной биологии связан прежде всего с расшифровкой процесса клеточного деления, который оказался тесно связан с такими процессами, как межклеточные взаимодействия, клеточная дифференцировка тканей и органогенез, старение и смерть клеток и малигнизация, сопровождающаяся иммортализацией – бессмертием клеточного

клона. Все главные события клетки связаны с клеточным циклом, в котором имеется ряд стадий и контрольных точек (рисунок 12).

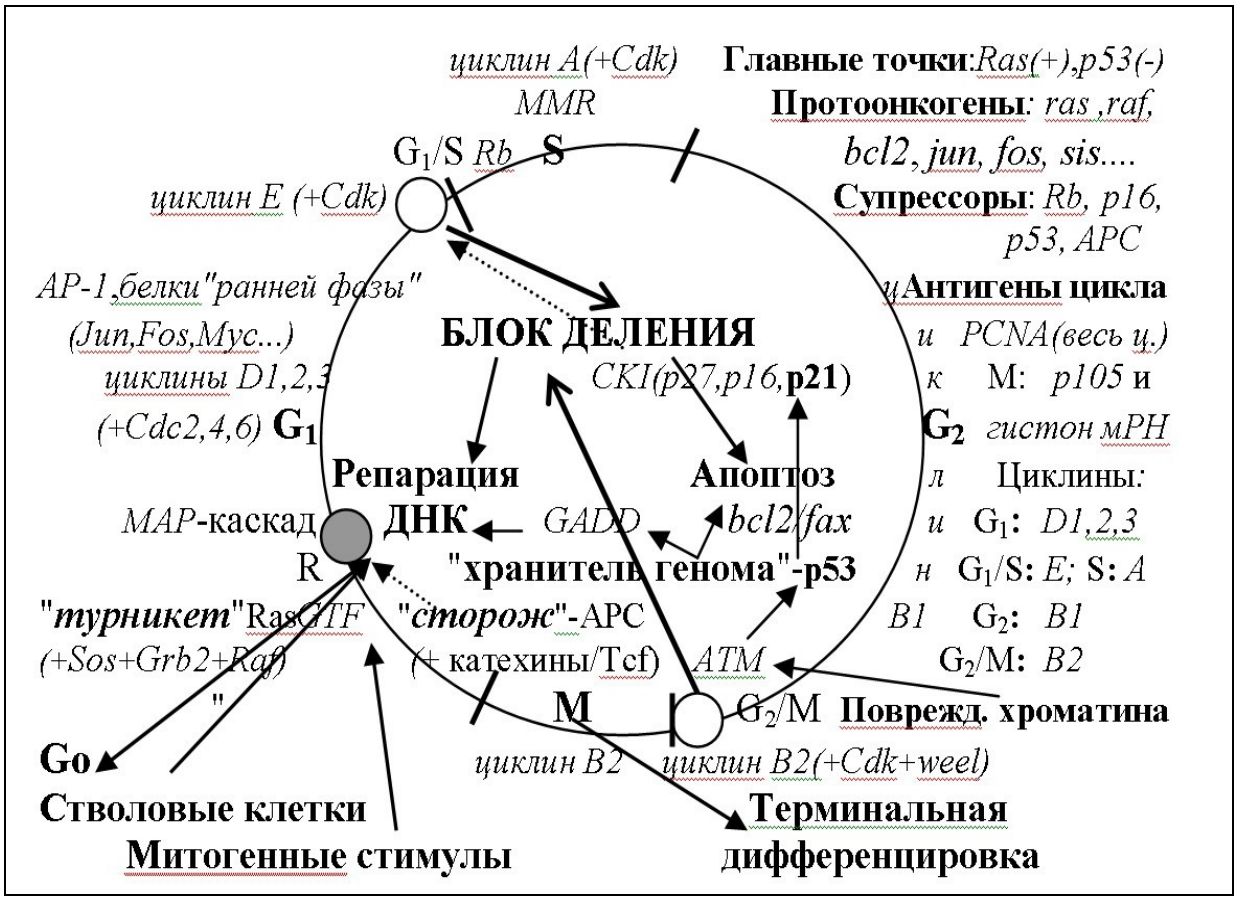


Рисунок 12. Клеточный цикл и его регуляторные точки.
(снаружи – белки-стимуляторы, внутри – белки-ингибиторы)

Главные регуляторные точки: точка рестрикции (R) в G_1 фазе, когда клетка "принимает решение" о начале клеточного цикла и регуляторные точки перед входом клетки в S и M фазы, когда клетка может быть остановлена перед началом синтеза ДНК или митоза. Если процесс выхода в цикл из состояния клеточного покоя G_o – вероятностное событие, то в остальных регуляторных точках происходит активный процесс блокады деления, что может сопровождаться индукцией механизмов репарации ДНК (если блок был связан с обнаружением клеткой генных поломок) или выходом ее в состояние активной гибели – апоптоза.

Перенос митогенного сигнала в клетку осуществляется рядом путей. Наиболее известен путь, связанный с активацией *тирозин-протин-киназных рецепторов* (ТРК) мебраны клетки и *MAP-каскада*. Множество

митогенных стимулов способно активировать один из трех субклассов ТРК к аутофосфорилированию, что делает их способными связывать так называемые "адаптерные белки" (*Grb2* и др.); далее при участии *Sos1* белка комплекс связывает один из важнейших – ***Ras* белок**, обладающий сродством к ГТФ (активная форма) и ГДФ (неактивная форма). Это очень консервативный эволюционно белок, играющий роль "пропускного турникета", через который проходят практически все митогенные влияния на клетку, его активная форма обнаружена почти во всех опухолях человека. Активность *Ras* регулируется *Sos1* белком (активация) и *GAP* белком (инактивация за счет стимуляции ГТФазы). Активная форма *Ras*-ГТФ фосфорилирует *Raf*-белок, который и является главным проводником сигнала в цитоплазму, инициируя *MAP*-киназный каскад, с образованием двух сер-тре-протеинкиназ (*TRK1* и *ERK2*) в цитоплазме. Количественные соотношения *Ras*-ГТФ и *Ras*-ГДФ являются важнейшими в тонкой регуляции клеточного деления и клеточной дифференцировки.

MAP-киназы способны непосредственно (фосфорилируя) и опосредованно (стимулируя транскрипцию) активировать в ядре главный транскрипционный комплекс белков - *AP*-1, в который входят белки семейств *Jun* и *Fos*, вместе с *Myc* группой они образуют "*белки раннего ответа*" при активации клетки и необходимы для клеточного деления вместе с целым комплексом белков, синтезируемых в ходе клеточного удвоения.

Для прогрессии клеточного цикла нужны уже другие белки – *циклины,* специфичные для G_1/S, S и M процессов и активирующие *Cdk*-зависимые сер-тре-протеинкиназы. Их синтез и деградация в определенное время совершенно необходимы для нормального прохождения цикла. Тонкая регуляция *Cdk* осуществляется их фосфорилированием (треонина) и дефос-форилированием (тир). Важнейшим является состояние тирозина в поло-жении 15, который фосфорилируется специфической тир-киназой *weel1* и конкурирующей фосфатазой.

Любое подавляющее митоз воздействие блокирует цикл в одной из *контрольно-пропускных точек*, важнейшая из которых – G_1/S - точка. Совокупность тормозящих деление клетки белков кодируется *генами-супрессорами* и малигнизация клетки возможно только после их инактивации, причем в норме существует по 2 аллеля этих генов, что делает мутационный процесс малигнизации мало вероятным.

Наиболее важными в блокаде клеточного деления являются *Cdk-ингибирующие белки* (*CKI*), ингибирующие комплекс циклин-Cdk. Наиболее важные из них - белки *p27*, *p16* и, наиболее известный – *p21* (другие названия - *WAF1* и *CIP1*), требующий воздействия белка ***p53*** – главного "хранителя генома" клетки (*p53* синтезируется при повреждении ДНК в ходе облучения и других процессов). При отсутствии *p53* отменяется репарация и апоптоз дефектных клеток; почти во всех опухолевых клетках ген *p53* инактивирован или мутантен, а введение нормального гена в клетку прекращает ее малигнизацию. Непосредственная активация *p53* в ответ на повреждение ДНК осуществляется белком *ATM*, который запускает и группу репарирующих ДНК генов (*GADD* – гены). Кроме того, активация *p53* отмечена при ишемии, что ведет клетки к апоптозу.

Другим важнейшим белком-супрессором цикла является ***APC***-белок (2843 аминоксилоты), реагирующий с *DLG*-белком супрессором и катенинами (белки клеточной адгезии). Он также участвует в сигнальном пути *WNT*, приводящем к семейству регуляторов транскрипции *Tcf*. Предполагается, что *APC* является *интегратором* получаемых клеткой сигналов и передает их в ядро опосредованно комплексами □□*катенин*/*Tcf*. Белок *APC* первый из группы, которую наделяют полномочиями "*сторожа*" клеточ-ных популяций – он ответственен за постоянство числа клеток в популя-циях и адекватность реакций клеток при регенарации и пр. Повреждение APC-генов инициирует пролиферации, готовя почву для мутагенной малигнизации; при нормальной функции "сторожа" повреждения других генов не имеют никаких последствий.

В поддержании нормальной функции популяций важнейшую роль играет также система клеточной адгезии – участвующие в межклеточных контактах белки-интегрины индуцируют блокирующий апоптоз (в норме перевод клеток в супензию вызывает их блок деления и гибель) каскад реакций с участием киназ – *FAK* и *протинкиназы С*, а также *Ras* и *MAP*-киназ. Их патология – типична для малигнизированных клеток, приобретающих способность роста в культуре.

Важнейшими направлениями контроля клеточного деления сейчас являются методы воздействия на гены-супрессоры, гены-проонкогены и на механизмы программируемой активной клеточной гибели – апоптоз.

7.3.2. Снижение самообновления клеток в старости

Пролиферативная активность большинства клеточных популяций в организме снижается с возрастом [318], что проявляется в снижении митотического индекса, скорости синтеза ДНК, снижении ответа на пролиферативные стимулы (снижение потенциала клеточного роста), удлинении клеточного цикла и увеличении времени самообновления тканей. Так, пролиферативная активность 70-летних людей в 10 раз ниже, чем 20-летних [294], снижается также, минимум в 2 раза, количество стволовых клеток в коже.

Нами была сформулирована новая регуляторная теория старения, отводящая важную роль возрастному иммунодефициту специфических Т-лимфоцитов-регуляторов роста самых различных типов клеток в организме – иммуно-регуляторная теория старения [46, 49, 54], что приводит к генеральному регуляторному ограничению самообновления тканей за счет клеточного деления. Регуляторный характер ограничения клеточного деления с возрастом ярко виден при индукции репаративной регенерации, когда размножение клеток быстро и резко увеличивается на порядки, что указывает на сохранение потенциала клеточного роста клеток. Функциональные нагрузки сохраняют свою стимулирующую роль для гипертрофии клеток – G_o/G_1 переход не страдает, однако, G_1/S переход требует факторов роста и их дефицит определяет широко известный феномен генерализованного G_1/S блока для всех типов тканей старого организма.

Выявление факторов роста тканей и активаторов Т-лимфоцитов-регуляторов роста соматических тканей представляется наиболее важным направлением профилактики старения и биоактивации практически в любом возрасте.

Важнейшим является также изменение **цитоархитектоники** органов и тканей, которые состоят из таких клеток. Например, естественное снижение скорости клеточного самообновления в коже при наличии естественно идущих процессов дифференцировки кератиноцитов и отшелушивания клеток ведут к таким типичным макропроявлениям старения кожи, как огрубление ее, снижение эластичности, утончение и пр.

На примере старения кожи четко видно ведущее значение регуляторных механизмов – скорость клеточного роста чисто регуляторный феномен и нет проблем повысить скорость клеточного само-

обновления в течение часов, например, в ходе регенерации, когда процессы клеточного деления ускоряются многократно.

Типичными являются для старения клеток некоторые **общие принципы старения** – неравномерность старения разных типов клеток и формируемых ими структур (например, артериол мышц, почек и кишечника) или темпа и выраженности старения одного функционально-структурного комплекса по сравнению с другим.

Конкретные проявления старения, например, нейроцита и печеночной клетки различны, однако, существуют и вполне определенные общие черты, общность которых лучше выявляется при анализе на более высоком уровне обобщения. Типичным является избыточное развитие и огрубление соединительной ткани, замена на нее паренхиматозных элементов. Наблюдаются явления атрофии и дистрофии различных клеток. Уменьшение количества паренхиматозных клеток компенсируется активированием функций и гипертрофическими процессами для оставшихся клеток. Увеличивается число ядер в клетке – полиплоидия, причем ядерная мембрана образует многочисленные складки для увеличения площади соприкосновения с цитоплазмой, расширяются ядерные поры, появляются ядерные включения (обычно функционально не активные).

Одним из признанных механизмов повреждения и гибели клеток является **свободно-радикальный механизм (СР)**. Свободные радикалы действуют не только токсически, сколько, видимо, запускают апоптоз. Особенно важно повреждение клеток для тканей, состоящих из неделящихся клеток (например, нервной); в последней, однако, важнее может быть механизм «метабо-лического засорения» – невозможность до конца освободиться от поврежденных продуктов, что хорошо известно на примере накопления липофусцина в нервных клетках. Однако, для долго живущих организмов, видимо, механизмы защиты от СР приближаются к максимально возможным и назначение им антиоксидантов зачастую не приводит к увеличению продолжительности жизни или даже сокращает ее! Не объясняет СР-теория старения и различия на порядки ПЖ близких видов – мыши и человека. В целом, однако, между соотношением продукции СР (косвенно – уровнем энергообмена на единицу массы) и активностью анти-СР меха-низмов (удельная активность СОД) существует для видов с различной ПЖ тесная линейная связь.

7.3.3. Репликативное старение клеток

Соматические клетки высших эукариот, как правило, имеют ограниченную способность к пролиферации. Постепенное снижение скорости пролиферации клеток in vitro, приводящее, в конечном счете, к ее остановке, называют клеточным или репликативным старением. Ограниченность пролиферативной активности клеток была впервые доказана более 40 лет назад [219-222].

Старые клетки претерпевают характерные изменения в морфологии: становятся более крупными, плоскими и гранулированными. Эти клетки часто характеризуют по экспрессии бета-галактозидазы, активной при pH 6 (лизосомальная гидролаза, в норме активна при pH 4).

Более специфические биологические маркеры для определения репликативного старения разделяют на несколько категорий:

- компоненты сигнальных путей, которые индуцируют и поддерживают состояние старения (индукция ингибиторов циклин-зависимых киназ p16 и p21);

- маркеры генотоксического стресса (очаги повреждения ДНК и их колокализация с теломерами);

- появление характерного типа факультативного гетерохроматина, ассоциированного со старением;

- секреция определенных воспалительных цитокинов и факторов, модифицирующих ткань.

Стареющие клетки, как правило, сохраняют жизнеспособность и метаболическую активность в культуре в течение длительного времени. Считают, что состояние пролиферативного старения характеризуется необратимой утратой клетками, израсходовавшими пролиферативный потенциал, способности синтезировать ДНК в ответ на стимуляцию сывороткой или факторами роста, однако многие гены, связанные с пролиферацией, остаются в них способными к индукции митогенами. Блок пролиферации в этом случае может быть вызван либо отсутствием факторов, инициирующих вступление в S-период клеточного цикла, либо наличием в стареющих клетках ингибиторов пролиферации.

При пролиферативном старении отмечают отсутствие экспрессия некоторых генов, обеспечивающих выход клеток из состояния покоя. В

стареющих клетках подавлена экспрессия циклинов, инсулино-подобного фактора роста-1 (IGF-1) и некоторых других факторов.

Детерминированность процесса клеточного старения предполагает наличие специального молекулярного механизма, позволяющего клетке «отсчитывать» число пройденных удвоений. ДНК является единственной макромолекулой, обладающей достаточной стабильностью, чтобы служить базой такого механизма. Основой функционирования "молекулярных часов" считают изменения ДНК, сопряженные с процессом ее репликации: метилирование ДНК или потеря части ДНК в результате ее неполной репликации. В последнее время роль «молекулярных часов» многие отводят теломерам линейных хромосом эукариотических клеток.

Хромосомы позвоночных оканчиваются последовательностью TTAGGG, повторенной в теломерах сотни и тысячи раз. Считается, что функциями теломерного повтора является защита хромосом от деградации и предотвращение их слияния друг с другом. Соматические клетки теряют от 50 до 200 нуклеотидов при каждом клеточном делении в результате неполной репликации концов хромосом из-за особенностей молекулярного механизма репликативного синтеза ДНК [101-103]. Отстающая цепь репликативной вилки в синтезе ДНК не может синтези-роваться до 5'-конца в отсутствие рибопраймера, который, в свою очередь, не образуется непосредственно на концевом фрагменте. Потери концевой ДНК делают невозможной бесконечную пролиферацию.

В противоположность соматическим смертным клеткам, то есть клеткам, обладающим пределом размножения in vitro, большинство иммортальных клеток, обладающих способностью к бесконечной пролиферации, содержит теломеразу – фермент, достраивающий свобод-ные 3'- концы хромосом короткими повторяющимися последователь-ностями (в случае позвоночных – TTAGGG). Теломераза содержит собствен-ную РНК-матрицу, поэтому может быть отнесена к обратным транскрип-тазам.

В репликативном старении существуют две фазы: так называемый «ранний кризис» (связан с активацией p53 и/или ингибиторов Cdk, возможно, в ответ на укорочение теломер до какого-то критического размера или какие-то другие сигналы) и так называемая «генетическая катастрофа» (очевидно, обусловлена полной дисфункцией теломер и слипанием хромосом). Оказалось, что при инактивации p53 (что

характерно для большинства различных новообразований) «ранний кризис», несмотря на «нокаут» в эксперименте теломеразы и укорочение теломер, не наблюдается. В то же время блокирование теломеразы в таких клетках еще больше увеличивает генетическую нестабильность. При этом «генетическая катастрофа» в таких клетках не наступает, так как, вероятно, включаются альтернативные механизмы удлинения теломер. В результате инактивация гена теломеразы у мышей (обычных или с дополнительным нокаутом гена p53) приводит не к предотвращению развития новообразований, а к увеличению частоты их возникновения. Обнаружено, что активность теломеразы контролируется онкобелком Myc, повышающим транскрипцию гена TERT - субъединицы, уровень экспрессии которой определяет активность фермента в нормальных клетках.

Активизация теломеразы обнаружена в стимулированных митогенами лимфоцитах, а также в пролиферативных зонах волосяных фолликулов и кишечных крипт.

Способность клеток и организмов реагировать на внешние стимуляторы постепенно уменьшается по мере старения. Наиболее вероятно, что основой изменения клеточной реакции на внешние воздействия по мере старения являются метаболические нарушения макромолекулярного синтеза. Широко используемыми митогенами при изучении возрастных изменений клеточного ответа являются сыворотка, гормоны и факторы роста, такие как EGF, FGF, PDGF, инсулин и инсулиноподобный фактор роста (IGF- 1), глюкокортикоиды, включая дексаметазон.

Культуры клеток, полученные из тканей, взятых у пациентов, имеющих синдромы преждевременного старения, такие как прогерия и синдром Вернера, дают значительно более низкий ответ на стимуляцию инсулином, FGF, PDGF и сывороткой, чем клетки здоровых людей.

Факторы роста и гормоны оказывают совместное действие, вызывая аддитивный эффект в «молодых» клетках, но не вызывают его в «старых». Показано, что синергичные эффекты дексаметазона и EGF или IGF-1, инсулина и гидрокортизона сильно снижены или отсутствовали в стареющих фибробластах, серийно пассируемых в культуре.

Способность EGF, инсулина, IGF и сыворотки стимулировать синтез белка в культивируемых фибробластах также снижается по мере пассирования клеток. Индуцированный сывороткой уровень фактора элонгации-2 значительно ниже в «старой» культуре фибробластов человека,

чем в «молодой». Экспрессия ассоциированного с пролиферацией ядерного антигена K-67 не индуцируется в «старых» фибробластах человека в ответ на действие PDGF, хотя она ярко выражена в «молодых». Белок Rb не фосфорилируется в "старых" фибробластах человека после стимуляции сывороткой, хотя фосфорилируется в "молодых" клетках.

Таким образом, не вызывает сомнения снижение чувствительности клеток к факторам роста по мере старения.

Способность стареющих фибробластов к экспрессии мРНК генов, зависящих от клеточного цикла, таких как гены гистонов, орнитин-декарбоксилазы, тимидинкиназы, бета-актина, и протоонкогенов c-myc и c-ras остается неизменной, однако клетки при этом не могут вступать в S-фазу клеточного цикла. В то же время, отмечено снижение активности белка орнитиндекарбоксилазы и отсутствие экспрессии c-fos при стимуляции стареющих фибробластов сывороткой. Стареющие фибробласты, однако, могут экспрессировать G_1-циклины, топоизомеразу II и Ki-67 антиген, не становясь способными к клеточному делению.

Способность PI3K контролировать пролиферации и апоптоз клеток послужила стимулом для изучения его роли PI3K в регуляции клеточного старения. Сравнительный анализ действия на фибробласты ингибитора PI3K - LY2940002 и ингибитора МЕК-1 (киназы, фосфорилирующей ERK1 и ERK2)- PD58029 показал, что оба соединения вызывают торможение пролиферации клеток. При этом только в первом случае (при действии ингибитора PI3K) задержка клеточного роста сопровождается появлением комплекса специфических фенотипических изменений, обычно характерного для стареющих фибробластов: активации галактозидазы, повышения экспрессии гена коллагеназы и подавления экспрессии специфического маркера пролиферирующих фибробластов гена EPC-1.

Контроль репликативного старения – важный механизм антиопухолевой активности p53. Фибробласты из p53-нокаутных мышей не стареют в культуре, продолжая неограниченно пролиферировать. При выведении иммортализованных стабильных клеточных линий p53 часто специально инактивируют, экспрессируя онкобелки ДНК-содержащих вирусов. Необра-тимая остановка пролиферации старых клеток сопровождается p53-зависимой транскрипционной активацией генов-мишеней p53. Активация p53 в старых клетках, по-видимому, происходит в ответ на хромо-

сомные разрывы, ассоциированные с укорочением теломер в стареющих клетках.

Инактивация p53 способна задерживать, хотя и не отменять, репликативное старение в человеческих клетках. В старых клетках p53 мРНК и уровни белка по большому счету не изменяются, но p53 становится фосфорилированным и его активность, как транскрипционного фактора, повышается в процессе старения.

Одной из мишеней p53 является ингибитор циклин-зависимых киназ, p21. Экспрессия p21 повышается в процессе репликативного старения, и его активация зависит от сигналов, инициируемых укорочением теломер, поскольку экспрессия TERT блокирует эту активацию. Было обнаружено, что экспрессия p21 в течение репликативного старения регулируется по двум механизмам: p53-зависимому и p53-независимому. Гиперэкспрессия p21 индуцирует остановку клеточного роста в некоторых клетках, тогда как делеция p21 может отсрочивать ее, связанную со старением. Совместно эти исследования говорят о том, что функции p53 в старении заключаются, по крайней мере, частично, в индукции p21.

Ингибирование p53 и pRb дает возможность клеткам достигать более 50 делений. Эти результаты привели к развитию концепции, что два пути ответственны за индукцию старения, и они действуют параллельно друг другу; pRb является центральным регулятором прохождения клеточного цикла.

Гиперфосфорилированный pRb позволяет проходить клеточный цикл, тогда как гипофосфорилированный pRb предотвращает его прохождение; pRb преимущественно действует через инактивацию E2F семейства факторов транскрипции, ответственных за транскрипцию нескольких генов, вовлеченных в G_1/S переход и синтез ДНК. Фосфорилирование pRb зависит от циклин-зависимых киназ (CDK), которые управляют прохождением через разные фазы клеточного цикла. Инактивация G_1 CDK, ответственных за фосфорилирование pRb, предотвращает переход из G_1 фазы в S фазу и блокирует клеточный цикл, индуцируя, в том числе, репликативное старение. Ингибиторы циклин-зависимых киназ (CDKI) ингибируют активность CDK; CDKI p16 нарушает и ингибирует активности CDK4 и CDK6, таким образом, предотвращая прохождение клеточного цикла.

Экспрессия p16 увеличивается в некоторых старых человеческих фибробластах и индукция p16 не всегда связана с укорочением теломер. Экспрессия p16 повышается после запуска старения в клетках, в отличие от быстрого увеличения экспрессии p21 в клетках только входящих в состояние репликативного старения. Старая популяция человеческих клеток в культуре представляет собой некую мозаику, в которой некоторые клетки экспрессируют p16, тогда как другие экспрессируют p21. При этом индукция p16 не отменяется смещением экспрессии TERT, а функциональная инактивация p16 не предотвращает репликативное старение в человеческих фибробластах, что говорит о том, что p16 не связан с репликативным старением, опосредованным укорочением теломер. В ответ на укорочение теломер активация p21 может приводить к ингибированию фосфорилирования pRb, что выстраивает p53-p21 и pRb в один общий процесс.

Существуют примеры, что инактивация либо p53, либо pRb может существенно задерживать начало старения, подтверждая линейность пути p53-pRb. В других примерах необходимо ингибировать оба и p53 и pRb, чтобы предотвратить начало репликативного старения в человеческих клетках, что говорит о наличии двух параллельных путей. Путь p53-p21-pRb преимущественно ответственен за старение, индуцированное укорочением теломер; путь p16-pRb, видимо, опосредует преждевременное старение, индуцированное стрессом. Видимо, p53 и pRb/p16 пути работают совместно для остановки пролиферации клеток.

По-видимому, существуют принципиальные молекулярные различия между обратимой остановкой в клеточном цикле и необратимой блокировкой, наступающей при старении, хотя эти различия пока полностью не выявлены.

МЕТОДЫ

Метод пересевов. *Растущие в стерильных пластиковых флаконах фибробласты пересевают при заполнении всей поверхности роста в 2 флакона, регистрируя увеличение времени роста и ограничение числа пересевов (порядка 50 пересевов, примерно соответствует 50 клеточным делениям). Число пересевов фибробластов от старых доноров обычно ниже.*

Метод стационарного старения**.** *Клеткам дают дорасти до границ поверхности роста и не проводят пересевы. Клетки «старятся» по мере выдерживания в культуре (несмотря на периодическую замену питательной среды), в результате прекращения пролиферации. Исследуют морфологию и гистохимию клеток в культуре. При возобновлении пересевов клетки «молодеют».*

7.4. Стволовые клетки

Показано, что эмбриональные ткани являются источником уникальных по своим свойствам стволовых клеток, обладающих высоким потенциалом к росту и дифференцировке [301]. Это открытие признано равным по значимости открытию двойной спирали ДНК.

При попадании во взрослый организм, эмбриональные стволовые клетки способны оказать глубокое влияние на все его органы и ткани. Трансплантация стволовых клеток в последние годы прочно вошла в арсенал современных экспериментальных клинических подходов к лечению целого ряда наследственных и приобретенных заболеваний. Кроветворные стволовые клетки используются для восстановления кроветворения у пациентов с онкологическими и гематологическими заболеваниями, инсульта, нейродегенеративных заболеваний, травм головного и спинного мозга.

В эмбриогенезе человека и млекопитающих образование нескольких сотен вариантов специализированных клеток происходит из пула зародышевых листков (экто-, энто- и мезодермы), а также из эмбриональной мезенхимы.

Термин "стволовая клетка" (СК) определяет популяцию тканевых или циркулирующих в крови низкодифференцированных клеток-предшественников, обладающих способностью к самообновлению и дифференцировке в клеточные компоненты различных тканей. Наименее дифференцированные – эмбриональные СК получают из внутренней массы бластоцисты на 5-6 день после искусственного оплодотворения яйцеклетки. В результате культивирования in vitro из них могут быть получены линии

"истинных" эмбриональных СК, сочетающие в себе практически неограниченный пролиферативный потенциал и возможность разнонаправленной дифференцировки.

Терминология и классификация стволовых клеток в настоящее время находится в стадии становления. Наиболее важна классификация стволовых клеток по источнику их выделения:

1.Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) - внутриклеточная масса раннего эмбриона (на этапе бластоцисты 4-7 день развития).

2. Фетальные стволовые клетки (ФСК) - клетки зародыша на 9-12 неделе развития, выделенные из абортивного материала.

3. Стволовые клетки взрослого организма:

- *Гемопоэтические стволовые клетки* (ГСК) – мультипотентные стволовые клетки, дающие начало всем клеткам крови: крови - эритроцитам, В-лимфоцитам, Т- лимфоцитам, нейтрофилам, базофилам, эозинофилам, моноцитам, макрофагам и тромбоцитам Кроме костного мозга ГКС обнаружены в системном кровотоке и скелетных мышцах.

- *Мезенхимальные стволовые клетки* (МСК) – мультипотентные региональные стволовые клетки, содержащиеся во всех мезенхимальных тканях (главным образом в костном мозге), способные к дифференцировке в различные типы мезенхимальных тканей, а так же в клетки других зародышевых слоёв.

- *Стромальные стволовые клетки* (ССК*)* – мультипотентные стволовые клетки взрослого организма, образующие строму костного мозга (поддерживающую гемопоэз), имеющие мезенхимальное происхождение.

- *Тканеспецифичные стволовые клетки* (ТСК) – располагаются в различных видах тканей и в первую очередь, отвечают за обновление их клеточной популяции, первыми активируются при повреждении. Классически считалось, что тканеспецифические СК обладают более низкой потентностью, чем стромальные СК костного мозга. Однако последние исследования показывают высокую **пластичность** ТСК (способность к дедифференцировке и дифференцировке в другие типы клеток.

В настоящее время привлекают все большее внимание фибробласты, в результате исследований, показывающих возможность обратной трансформации фибробластов в МСК.

Согласно современным данным, практически все известные тканевые системы содержат то или иное количество СК. Тем не менее, практическое значение для выделения СК с целью их последующего клинического применения имеют лишь ткани, содержащие реальные количества клеток-предшественников. К ним можно отнести костный мозг, жировую ткань, кровь и строму пуповины/плаценты.

Еще задолго от открытия стволовых клеток было отмечено уменьшение с возрастом способности к регенерации у высших животных и человека, и замедление репаративных процессов. Этот феномен связывают как с уменьшением количества стволовых клеток, так и реактивности организма на повреждающие воздействия.

С увеличением возраста количество СК в организме уменьшается. При рождении 1 МСК приходится на 10.000 стромальных клеток костного мозга (СККМ), у подростков 1 МСК на 100.000 СККМ, в 50 лет - 1 на 500.000 и в 70 лет 1 на 1000.000. Число ооцитов в яичниках женщины имеет аналогичную динамику с возрастом.

В отношении связи количества прогениторных клеток ситуация не столь однозначная.) Предложили модель истощения пула клеток предшественников как ключевого момента в снижении способности старого организма к восстановлению. Однако ряд авторов показали, что количество эндотелиальных клеток предшественников не изменяется с возрастом, а ключевым моментом является зависимое от возраста и протеасомной активности снижение стабильности индуцируемого гипоксией фактора 1 альфа.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

В настоящее время основную роль в определении стволовых клеток принадлежит их маркерам. Методически используют моноклональные антисыворотки против маркеров клеток и анти-иммуноглобулины меченные флюоресцирующим агентом, что позволяет исследовать клетки в иммунофлюоресцентном тесте.

В настоящее время считают, что основной поверхностный маркер гемопоэтических стволовых клеток человека является гликопротеин CD34, большинство протоколов выделения гемопоэтических стволовых клеток используют CD34 в качестве основного критерия. Однако, по последним данным, гемопоэтические стволовые клетки, которые способны к

длительному самообновлению обладают фенотипом CD34-. Поэтому в настоящее время ведется поиск других характерных маркеров гемопоэтических стволовых клеток. Сейчас уже достоверно установлено, что такими маркерами для: **мышиных** клеток могут быть Sca-1, Thy-1 (CD90), CD38, CD117(C-kit), CD133 (Promin-1); для **человеческих** - C1q(C1qRp), AC133, CD59, Thy-1(CD90), низкий уровень CD38 и C-kit.

Помимо стволовых клеток интерес могут представлять коммитированные клетки предшественники (committed hematopoietic progenitor cells), т.е. клетки уже определившиеся с областью своей специализации, но еще не дошедшие до последней стадии дифференцировки. Маркерами таких клеток у человека служат CD84, HoxB4.

Дифференцированные клетки идентифицируются при помощи панели антител на типичные маркеры специализированных клеток. Присутствие хотя бы одного такого маркера является основанием для отсева клетки как не являющейся стволовой.

Среди маркеров человеческих дифференцированных гемопоэтических клеток обычно используют различные комбинации из CD2, CD3, CD10, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD24, CD33, CD36, CD45RA, CD56, Glycophorin A (CD235a) и Nuclear Erythroid Cell Surface Antigen. Для мышиных клеток - это CD3, CD4, CD5, CD8a, CD11b, CD45R.

Все шире использует метод **магнитной сепарации клеток.** Типичный набор для выделения стволовых CD133+ клеток представляет собой набор магнитных меток для получения CD133+ клеток и рассчитан по получение нужной фракции из общего числа $2*10^8$ клеток. Этот набор позволяет в одну стадию изолировать не гемопоэтические и ранние предшественники гемопоэтических и стволовых клеток. Набор обычно содержит блокирующий реагент FcR Blocking Reagent (2мл) и микросферы MACS MicroBeads (2 мл), коньюгированные к мышиным моноклональным антителам против человеческого CD 133 (клон AC 133), что позволяет идентифицировать эпитоп CD 133/1. Рекомендуется использовать CD133/2 (293C3)-PE или CD133/2 (293C3)-APC для количественного мечения CD133-выделенных клеток, поскольку указанные наборы позволяют узнавать эпитоп CD 133/2.

Исследование функций стволовых клеток in vivo.

Метод состоит во введении облученным реципиентам клеток костного мозга и визуальным наблюдением через несколько дней макрос-

копически видимых колоний в селезенке (КОЕ-с). Можно как количественно подсчитать КОЕ, так и определять диаметр образуемых колоний.

Широко используется **перенос стволовых клеток** (обычно костный мозг как их источник) для исследования их функции у реципиентов, в том числе в комбинациях: молодой донор старый реципиент и старый донор – молодой реципиент. Колониеобразующие единицы при переносе от молодых мышей к старым воспроизводятся меньше в числе и размерах у старых животных, но достаточно активны при трансплантации костного мозга (источник КОЕ) от старых животных к молодым. Активация мобилизации стволовых клеток из депо, повышение их числа в крови, активация их функции в тканях – одно из современных перспективных направлений в профилактике старения и биоактивации тканей в старости.

В целом, отмечено для стволовых клеток при старении: гибель покоящихся стволовых клеток, истощение клона пролиферирующих стволовых клеток, снижение числа СК в костном мозге, снижение числа СК в крови (рециркулирующих СК, репопулирующих ткани), снижение факторов роста микроокружения; функция самих СК с возрастом меняется, видимо, мало [104].

7.5. Внутриклеточные изменения при старении

7.5.1. Кислотность внутриклеточной среды

Внутриклеточная pH поддерживается в клетке мощными буферными системами, однако, в ходе физиологической нагрузки или при гипоксии и других влияниях возможны изменения pH, отражающиеся на всех ферментных и иных процессах происходящих в клетке. В настоящее время для контроля pH клетки используются флюоресцентные зонды, из которых наиболее чувствительным, простым и доступным является широко известных тест с 9-аминоакридином (9-АА), который является слабодиссициирующим агентом, выражено накапливающимся внутри клетки [286, 302] при снижении pH (закислении). В пределах концентрации 0,1 – 10 мкМ вход 9-АА (слабая щелочь) пропорционален внутриклеточному pH,

причем отношение внутриклеточный/внеклеточный 9-АА может достигать 50-500 для pH 7,5 – 6,0; максимум накопления – через 15 минут; используемая длина волны возбуждения – 380-400 нм, флюоресценции - 430-455 нм (максимум 430 нм, вторичные максимумы – 455, 480, 520 нм). Для калибровки pH используют среду с нигерицином (K+/H+ ионофор) с добавлением внеклеточного K+ (осмолярность поддерживается холин-хлоридом), с формулой:

$$pH = 6{,}065 + 0{,}634 * \mathrm{Log}(KCl) \qquad (32)$$

МЕТОД

Выделенные клетки инкубируют в количестве 106-107 клеток в физиологической среде с 1-10 мкМ 9-АА при 37оС в течение 20 минут и быстро отмываются центрифугированием. Содержание внеклеточного и внутриклеточного 9-АА измеряется по синей флюоресценции спектрофлюориметрически при 390 нМ возбуждения и флюоресценции – 430-450 нм).

Нами было проведено исследование накопления 9-АА клетками селезенки молодых (4 мес) и старых (14 мес) мышей Balb/c. Клетки селезенки молодых мышей накапливали 45,6+1,7% добавленного флюоресцентного зонда, старых: 57,2+1,3%, что указывает на закисление внутриклеточной среды с возрастом.

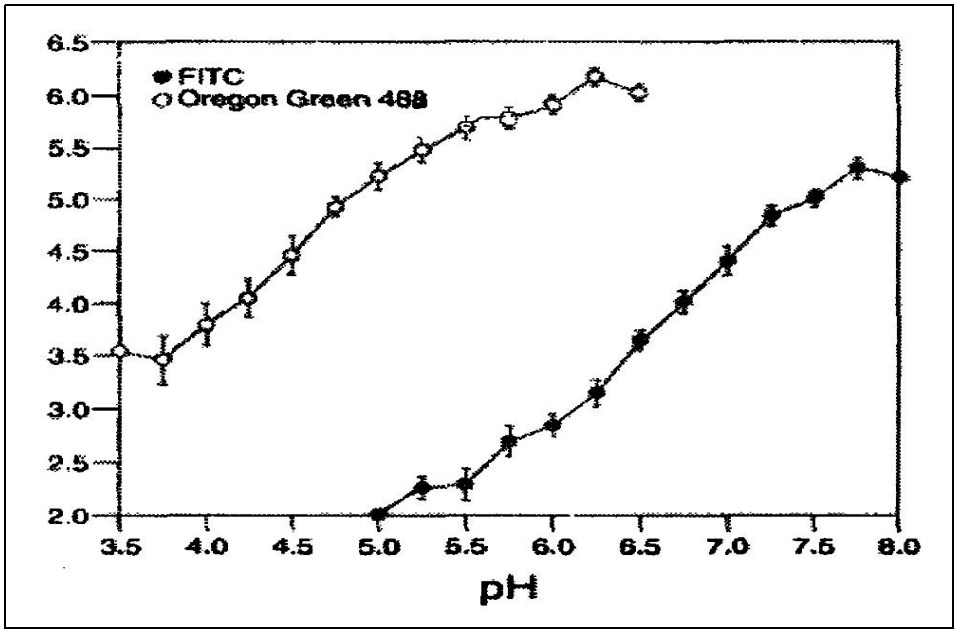


Рисунок 13. Исследование pH в клетках с использованием флюоресцентных зондов - FITC и Oregon Green 488 (литературные данные).

Для более интенсивных изменений pH (до 4,0 и ниже), например, при активации фагоцитоза нейтрофилов, используют часто 2`7`-dichlorofluorescein diacetate, с длиной волны возбуждения 504 нм и излучения 529 нм. Для стандартизации флюоресценции ФИТЦ и Oregon Green 488 при различных pH используют K^+/H^+ ионофор нигерицин; отношение флюоресценции при возбуждении 498/450 нм пропорционально pH клеток.

7.5.2. Изменения митохондрий при старении

Считается, что митохондрии с возрастом снижают свою активность, снижается их устойчивость к гипоксии и увеличивается способность к генерации свободных радикалов. С возрастом число митохондрий в клетках уменьшается, размеры их увеличиваются, а функция уменьшается, увеличивается число мутаций в митохондриальной ДНК.

Для общей оценки энергетики митохондрий предложен индекс активации митохондрий в живых клетках: отношение флюоресценции ФАД к НАД*Н (по Карнаухов, 1976, 1978) при 365 нм длины волны возбуждения флюоресценции:

$$\text{Коэф. актив. митохондрий (Кмх)} = (\mathbf{F_{530}}\text{-}0{,}5^{*}\ \mathbf{F_{465}}) / \mathbf{F_{465}} \qquad (33)$$

Общая схема функционирования энергосистемы митохондрий показана ниже на рисунке 14.

Дыхательная цепь располагается в межмембранном пространстве митохондрий, кальциевый переносчик – на внутренней мембране, Н+АТФаза (АТФ-синтетаза) – на внутренней мембране, обращена внутрь матрикса. Энергизация митохондрий (дыхание) регистрируется обычно по потреблению НАД*Н (ингибитор – ротенон) или сукцината (ингибитор – малат), причем последний процес (дыхание в присутствии сукцината) оказывается устойчив к возрастным влияниям, что используют, назначая сукцинат в терапевтических и профилактических целях пожилым.

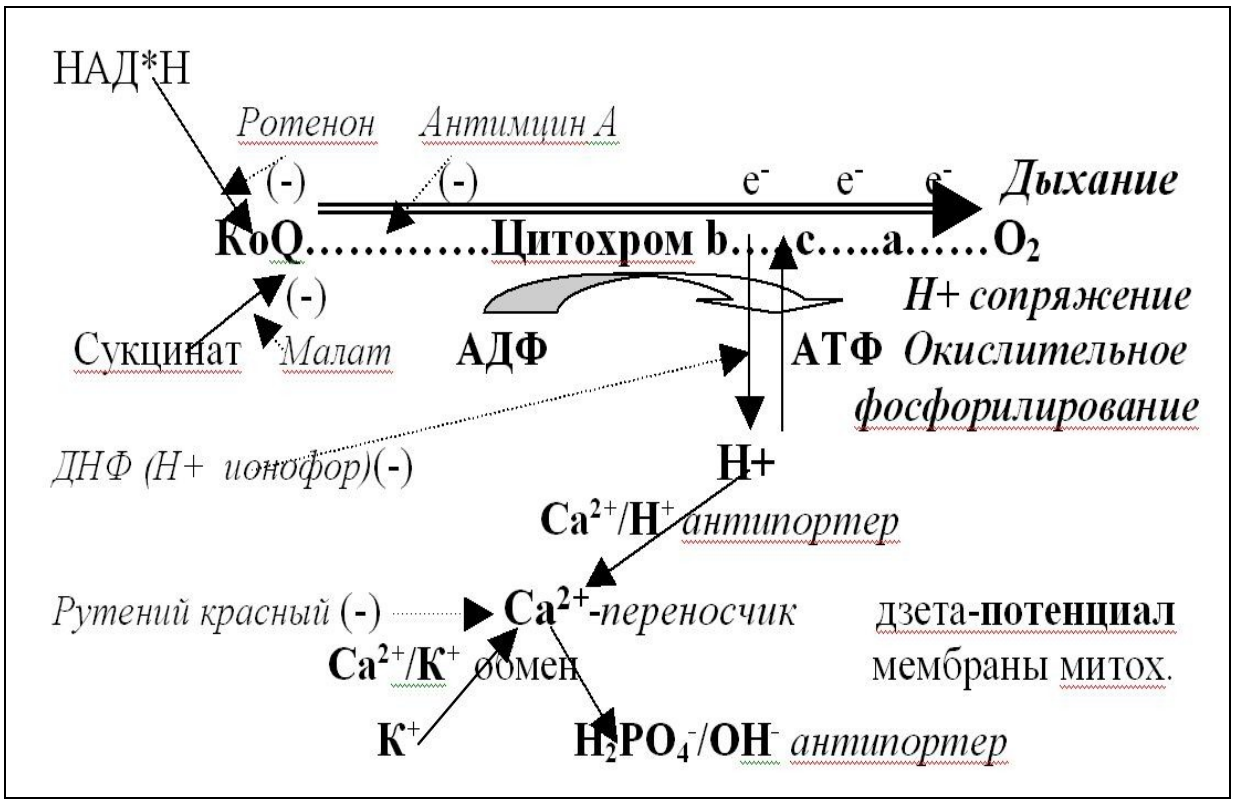


Рисунок 14. Общая схема функционирования митохондрий

Энергизация митохондрий в присутствии субстрата, кислорода и АДФ ведет к (соответственно может регистрироваться в эксперименте):

- потреблению субстрата,
- переносу электронов (е) на дыхательную цепь и кислород (дыхание),
- перенос электронов запускает H+ помпу – выход протонов из митохондрий и формирование градиента H+ (что может ингибироваться в эксперименте H+ ионофором – ДНФ),
- происходит формирование электропотенциала (180 мВ),
- происходит формирование протон-движущей силы и вход H+ в митохондрии,
- вход H+ сопрягает окисление с синтезом АТФ – окислительное фосфорилирование, которое, таким образом, можно регистрировать по потреблению как кислорода, так и H+ или снижению АДФ и синтезу АТФ,
- градиент H+ (и синтезируемая АТФ) частично расходуются на транспорт ионов Ca^{2+} в митохондрии (кальций-чувствительный переносчик на внутренней мембране, чувствительный к рутению красному),
- транспорт Ca^{2+} в митохондрии ведет ко входу фосфата в обмен на избыток OH^-.

Происходящие в митохондриях процессы можно измерять по:

- потреблению субстрата: НАД*Н спектроскопически по поглощению при 340 нм или накоплению НАД поглощающего при 280 (260) нм;

- потребление кислорода (в присутствии субстрата и АДФ) обычно измеряют потенциометрически, или манометрически (энергия расходуется на синтез АТФ при сопряжении со входом Н+, и на транспорт Ca^{2+} против его градиента в митохондрии),

- вход Н+ измеряется рН-метрией, отражает синтез АТФ (и потребление АДФ), при окислительном фосфорилировании,

- выход Н+ измеряется рН-метрией, отражает работу Н+ помпы, формирование Н+ зависимого потенциала,

- вход Ca^{2+} измеряют селективными кальциевыми электродами, хлортетрациклиновым флюоресцентным зондом, или опосредованно – по стимуляции дыхания (потребление кислорода), быстрому входу Н+ и быстрому выходу К+,

- потенциал исследуют используя селективные электроды (***pTPP***$^{+}$), флюоресцентный зонд (родамин 123) или опосредованно по выходу К+ (ингибитор - калиевый ионофор валиномицин).

Оценка интактности и активность митохондрий часто исследуют по светорассеянию (или светопоглощению): набухание митохондрий увеличивает светопропускание.

А.Я.Литошенко (2006) указывает на возможную важную роль в процессах старения **митохондриальной наследственности**. Митохондрии находятся под двойным генетическим контролем - со стороны ядерной и митохондриальной ДНК (яДНК и мтДНК). Особенностями митохондриальной генетики являются материнская (неменделевская) наследственность, полиплоидия (до 10 молекул мтДНК на органеллу, тысячи на клетку), высокая скорость мутирования (на порядок выше таковой для яДНК; мтДНК 2-х индивидуумов часто различаются на 10-70 п.н.), особенно в области D-петли молекулы мтДНК, а также не ассоциированная с клеточным циклом репликация и репликативная сегрегация при клеточном делении.

К особенностям митохондриального генома относятся ковалентно замкнутая кольцевая форма молекулы мтДНК, ее небольшие размеры (~16 т.п.н.), 37 кодируемых ею генов (13 полипептидов – субъединиц комп-

лексов окислительного фосфорилирования, 2 рРНК и 22 тРНК), собственный генетический код, отличный от универсального, зависимость экспрессии от экспрессии ядерного генома. Большинство эволюционно зафиксированных мутаций мтДНК, в первую очередь однонуклеотидные замены (SNP), создают нейтральные полиморфизмы, сегрегирующие и накапливающиеся в популяциях по материнской линии. Эти полиморфизмы распределяются на гаплогруппы и связанные с ними гаплотипы. Вариабельность последовательностей мтДНК явилась инструментом реконструкции эволюции человека.

Установлена корреляция между принадлежностью индивидуумов к той или иной гаплогруппе и продолжительностью жизни и риском развития ассоциированный с возрастом дегенеративных заболеваний. В онтогенезе происходит накопление соматических мутаций (замена оснований, делеции) и других повреждений (модификация оснований, сшивки) мтДНК. Некоторые мутантные молекулы могут амплифицироваться с большей скоростью, чем «дикие» молекулы мтДНК, постепенно замещая последние (гомоплазмия мутантных мтДНК). В быстро делящихся клетках этот механизм может лежать в основе развития опухолей.

Накопление с возрастом поврежденных молекул мтДНК вызывает энергетическую недостаточность, прежде всего, самих митохондрий. Вследствие этого молекулы мтДНК могут покидать органеллу через открывшуюся пору переменной проницаемости, промотируя инсерционный мутагенез яДНК. При достижении же некоего порога энергетической недостаточности клетки (для разных типов клеток его величина различна) происходит митохондриальная индукция гибели клеток (апоптотическая или некротическая), и, как следствие, функциональная недостаточность органов и тканей, лежащая в основе дистрофических болезней, ассоциированных со старением.

По мнению ряда авторов, накопление мутаций мтДНК как результат нормального функционирования митохондрий может лежать в основе старения и связанных с ним заболеваний.

Митохондрии и свободные радикалы.

Исследование генерации активных форм кислорода (свободных радикалов) митохондриями проводится еще с работ Чанса, однако, до настоящего времени не ясно, имеет ли место повышение с возрастом продукции СР митохондриями и какое это имеет значение для старения.

Ясно, однако, что в условиях гипоксии старые митохондрии оказываются способными генерировать СР значимо выше, чем молодые, что, учитывая механизм возрастной гипоксии как типичный для процессов старения тканей, позволяет говорить о значимости этого явления для старения в целом. Оксидативный клеточный стресс представляется типичным возрастным синдромом [8, 291], а влияния на клеточный стресс – перспективным направлением профилактических влияний [181].

В процессе старения митохондрий наблюдаются снижение их респираторной функции и мутации митохондриальной ДНК, что связывают с развитием возрастного оксидативного клеточного стресса и нарушениями генной экспрессии [187, 254,249, 281 , 313], хотя отмечено, что мутации митохондриальной ДНК могут и не приводить к увеличению продукции активных форм кислорода в клетке [303]. Набухание митохондрий в клетках обычно ведет к выходу в цитоплазму цитохрома с, что запускает процессы апоптоза, что связывает процессы старения и активной гибели клеток [195], хотя связь апоптоза со старением является не простой; часто старые клетки оказываются устойчивыми к апоптозу, что наряду с ухудшением их функций может вести к неблагоприятным результатам для целостного организма, так как выбраковывание таких клеток задерживается в старости [311]. Тем не менее, некоторые авторы рассматривают запрограммированную клеточную смерть как мишень для борьбы со старением [118]. Для изучения продукции митохондриями СР используют флюоресцентные зонды, в настоящее время интересны работы с применением люциногена.

МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ МИТОХОНДРИЙ

Митохондрии получают из печени крыс стандартным дифференциальным центрифугированием. *Среда выделения содержит 0,21 М манит, 0,07 М сахарозу, 5 мМ Трис-буфера, 1 мМ ЭДТА, 0,5% БСА, рН 7,4. Среда инкубации: 0,125 М KCl, 2 мМ KH_2PO_4, 0,01 М HEPES, рР 7,4. Для энергизации добавляют 5 мМ сукцината (с ротеноном - 2 мкг на 1 мг белка), 5 мМ пирувата с 5 мМ малата или 2 мМ АТФ.Активность митохондрий измеряют по флюоресценции никотинамидных нуклеотидов, активность продукции СР исследуют в присутствии люциногена (50-400 мкМ) на хемолюминометре, реагирующего на супероксидный анион в среде. Этот метод позволяет наблюдать быстрые обратимые изменения хемолюминесценции в ходе работы митохондрий.*

Прижизненная окраска митохондрий клетки.

Для общего изучения митохондрий в клетке часто используют флюоресцентные зонды родаминовой природы [191, 192], а также прижизненную окраску Янусом зеленым В. Прижизненная окраска Янусом зеленым В (по Ченцов, 1988): для культур клеток используют разведение краски 1:50 000 на физиологическом растворе, добавляют на предметное стекло с клетками 1-2 капли краски и оставляют на 5-10 мин в термостате; митохондрии окрашиваются в сине-зеленый цвет, а затем под действием редуктаз митохондрий краситель восстанавливается в красный цвет.

При проточной флюориметрии в ответ на ФГА стимуляцию наблюдается изменение флюоресценции митохондрий в присутствии родамина в несколько раз (до 15 раз), увеличение свечения, соответственно максимуму ДНК синтеза, что коррелирует с активностью синтеза РНК и числом митохондрий на клетку (но не на 1 митохондрию и не на единицу поверхности мембран).

Положительно заряженный Родамин 123 считают зондом на активные митохондрии [172]. Его накопление происходит очень быстро – за 5-10 мин, одинаково в диапазоне 0 - 37°C, дозо-зависимо в пределах 0,1-10 мкг/мл, с некоторой потерей при переводе в среду без краски, при гибели клеток часто происходит некоторое транзиторное повышение флюоресценции; мертвые клетки дают или однородную сильную флюоресценцию или неоднородную соответственно раздутым митохондриям; через 4-8 ч. мертвые клетки теряют способность удерживать родамин и лизируются. Способность к захвату родамина повышается при активации клеток в цикле, пропорционально синтезу РНК клеткой. Во всех дозах родамин не токсичен и может использоваться для прижизненной регистрации активности митохондрий (их мембранный потенциал).

Окраска родамином 123.

Выделенные клетки в количестве $10^6 – 10^7$ инкубируют 10 мин при 37°C с 5-25 мкМ родамина 123, быстро отмывают центрифугированием и исследуют зеленую флюоресценцию на люминесцентном микроскопе (возбуждение при 506, 340, 465-510 нм и флюоресценция при 526, 520-580 нм). Можно проводить исследования и спектрофлюориметрически. Нами показан оптимум – 495 нм возбуждения и 526 нм регистрации (спектрофлюориметр «Панорама»).

Поглощение кальция митохондриями.

Митохондрии имеют очень большую буферную емкость к ионам кальция, которые могут резко, на порядки, возрастать в цитозоле в ходе активации клетки. Исследование поглощения кальция митохондриями проводится с использованием специфического для митохондрий тетрациклинового флюоресцентного зонда, или радиометки – $^{45}Ca^{2+}$, а также возможно использование кальциевых электродов (в том числе без выделения митохондрий – для этого используют пермеабилизированные дигитонином клетки и среду инкубации характерную для митохондрий).

Использование пермеабилизированных клеток.

Клетки порядка 10^8 в 1 мл пермеабилизируют 0,005% дигитонином в среде: 0,1 М KCl, 1,1 мМ KH2PO4, 3 мМ MgSO4, 5 мМ сукцината натрия, 5 мМ Трис pH 7,4, ротенон 5 мкМ. Дробно добавляют кальций по 10 нМ и смотрят его поглощение митохондриями, с использованием кальциевого электрода. Можно использовать флюоресцентные зонды на кальций, в том числе хлортетрациклин, связывающийся с митохондриями пропорционально накоплению в них кальция (длина волны возбуждения 392 нм, флюоресценции – 536 нм).

7.5.3. Свободный кальций в цитоплазме клеток

Для изучения свободного кальция (Ca^{2+}) в цитоплазме клеток используют обычно современные флюоресцентные зонды, позволяющие прижизненно в динамике наблюдать кинетику изменения содержания ионов кальция в цитоплазме. В настоящее время используют высоко чувствительные зонды, практически не светящиеся без ионов кальция, Флуо-3 и Флуо-4 [209, 234], в качестве ацетооксиметиловых эфиров (Флуо-АМ), которые свободно проходят в клетку и там подвергаются гидролизу. После нагрузки клеток выход ионов кальция в клетку ведет к активации флюоресценции зондов (в 300-1000 раз). Все еще популярны и другие зонды, в частности Фура-2 [216].

Флюоресцентный зонд Квин-2. Связывается со многими двувалентными ионами прочнее чем с Ca_{2+}, поэтому добавляют в среду инкубации микромолярные концентрации ЭДТА (или других комплексионов) для их удаления. Флюоресценция Квин-2 низкая, что препятствует работе с

отдельными клетками, но нагрузка им проходит для клеток легче и быстрее, чем для зондов последующих поколений, так как он практически не связывается с белками и липидами и быстро расщепляется эстеразами. Флюоресценция возбуждается при 340 нм и регистриреутся при 500 нм. Концентрация свободного кальция в цитоплазме рассчитывается как:

$[Ca_{2+}]$ = Кдисс * (F - Fmin) / (Fmax – F) (34)

где F – флюоресценция в опыте, Fmax и Fmin – флюоресценция квин-2 в связанной с Ca^{2+} и свободной формах.

Для определения Fmax к суспензии клеток при насыщенных концентрациях Ca^{2+} (1-2 мМ) добавляют дигитонин или другой детергент, а Fmin определяют вслед за этим вытесняя связанный Ca^{2+}_5-10 мМ ЭГТА в слабокислой среде (pH 8-9) или добавляют 0,5 мМ Mn_{2+}, который вытесняет ионы кальция и гасит флюоресценцию зонда.

Флюоресцентный зонд Фура-2. Имеет более высокую экстенкцию при связывании с ионами кальция, при концентрациях 20-100 мкМ в цитоплазме можно регистрировать флюоресценцию под микроскопом. При связывании с Ca^{2+} спектр **возбуждения** смещается в более коротко-волновую область, флюоресценция при 340 нм возрастает в 3 раза, аа при 380 нм снижается в 10 раз.

Выделенные клетки помещают в среду Хенкса с 10 мМ HEPES pH 7,3 и добавляют Фура-2-АМ (из диметилсульфоксидного раствора) до концентрации 25 мкМ. Через 30 мин клетки отмывают центри-фугированием от непроникшей краски (концентрация зонда в клетке составляет 10-20 мкМ). Флюоресценцию возбуждают при 355 нм и регистрируют при 495 нм. Содержание кальция рассчитывают по формуле: $[Ca^2]$= *Kd * (F – Fmin / Fmax-F), где Kd = 224 нМ, F – наблюдаемая флюоресценция, Fmin и Fmax – флюоресценция в условиях когда весь Фура-2 находится в состоянии комплекса с кальцием или в виде свободной кислоты (для этого добавляют избыток ЭДТА или кальция).*

Можно использовать двуволновой метод, возбуждая флюоресценцию при 340 и 380 нм, отношение F_{340}/F_{380} изменяется в 10-20 раз. Содержание кальция рассчитывают:

$[Ca^{2+}]_{цит}$ = K (R-Rmin) / (Rmax-R) (35)

где Rmin и Rmax представляют собой отношения F_{340}/F_{380} соответственно при нулевой и насыщенной концентрациях ионов кальция, а коэффициент К определяется как Кдисс * (Fo/Fs), где Fs – флюоресценция при 380 нм Фура-2 связанной с Ca^{2+}.

Флюоресцентный зонд Индо-1. Также имеет более высокий коэффициент экстенкции при связывании с ионами кальция. При связывании с Ca^{2+} спектр **флюоресценции** смещается в более коротковолновую область (с 480 нм до 410 нм). Работа ведется как с Фура-2. Можно использовать и одноволновой метод, с длиной волны возбуждения 340 нм и флюоресценции 400-410 нм.

Флюоресцентный зонд Fluo-3 (и Fluo-4). *Свечение Fluo-3 увеличивается в присутствии ионов кальция на 2 порядка, Fluo-4 – на 3 порядка, без сдвига максимума поглощения и излучения. Клетки 10^5-10^7 в 1 мл инкубируют в среде Хенкса с 25 мМ Трис буфера pH 7,3, без кальция, с 1-10 мкМ ацетооксиметиловым эфиром Fluo-3 или Fluo-4 при 20-47°С в течение 15-60 мин и трижды отмывают центрифугированием от непроникшего в клетку зонда. Затем клетки 30 мин инкубируют в термостате и добавляют исследуемые вещества, регистрируя цитоплоазматический кальций клеток по повышению флюоресценции зонда при длине волны возбуждения 506 нм и флюоресценции 526 нм (для Флуо-4 - 495 и 516 нм). Количественно можно калибровать флюоресценцию добавлением стандартных доз кальция.*

В наибольшей степени на уровень цитоплазматического кальция в обычных условиях влияет Ca^{2+}/H^+ помпа саркоплазматического ретикулума, затем Са-АТФаза плазматической мембраны. Механизм положительного усиления сигнала (эффект сопряжения): вход ионов кальция через плазматическую мембрану повышает выход кальция из саркоплазматического ретикулума. Митохондрии быстро поглощают кальций, имея огромный буферный запас для него, что предотвращает чрезмерную активацию клетки. Эффекты ионов кальция в клетке обычно идут через посредство белка – кальмодулина.

Продукцию внутриклеточного кальция (Ca^{2+}) лейкоцитами периферической крови можно оценить также с помощью проточной цитометрии, используя краситель Fluo-3 по методике, описанной [180], в

качестве критерия работы системы используется классический стимулятор внутриклеточного Ca^{2+} – кальциевый ионофор А23187 (1 мкг/мл).

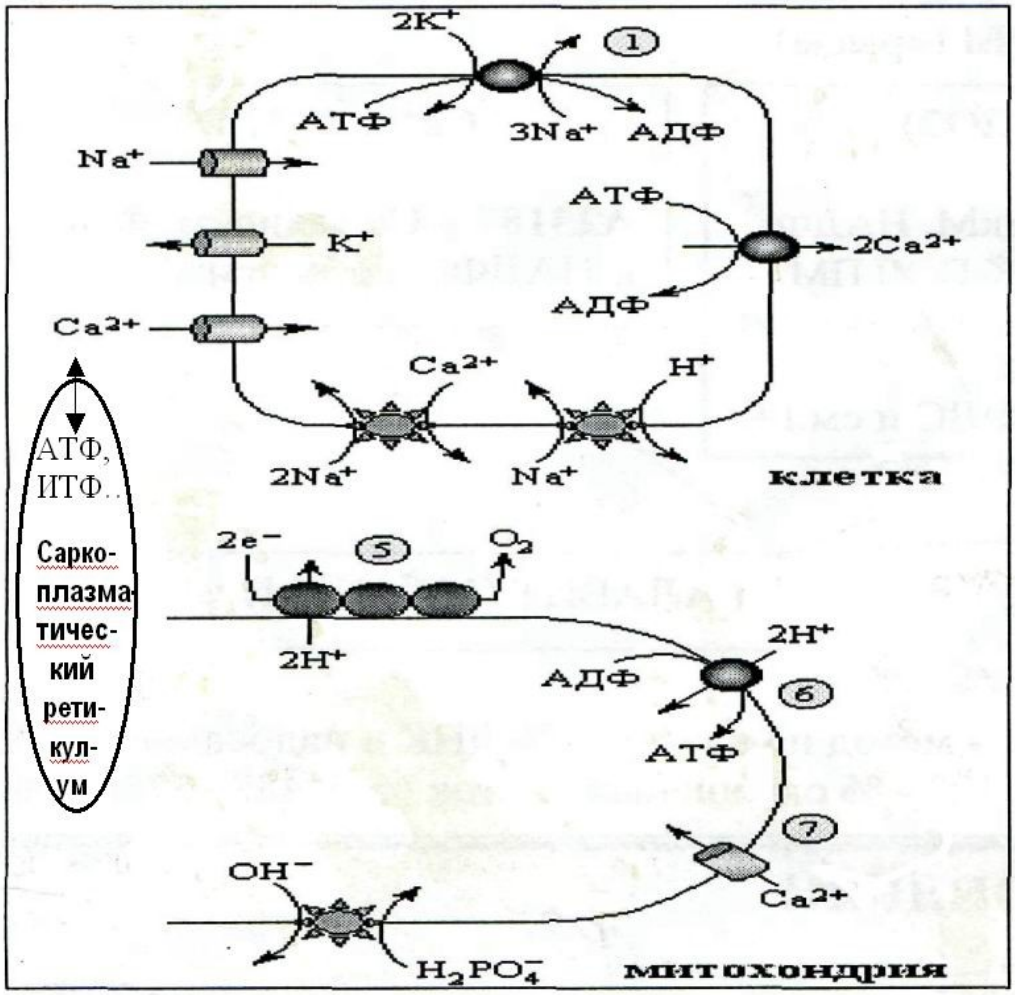


Рисунок 15. Схема кальциевого транспорта в клетке

Использование специфических блокаторов и агонистов позволяет исследовать роль тех или иных компартментов клетки в выходе кальция в цитозоль, а также активировать клетку простым добавлением кальциевого ионофора.

Используют агонисты: КонА 1-100 мкМ 10-120 мин, и малые количества А23187 (кальциевый ионофор) и ингибиторы:

- ЭДТА – для связывания внеклеточного кальция,

- хлопромазин – как анти-кальмодулин для блокады рецептор-зависимого входа кальция,

- V_2O_5 – для блокады Са-АТФазы плазматической мембраны и саркоплазматического ретикулума,

- кофеин – блокада саркоплазматического ретикулума,

- амилорид и доксорубицин – для блокады обмена $Ca^{2+}/3\ Na^{+}$,

- рутений красный – для снижения входа кальция в митохондрии,

- ДНФ (ионофор H^{+}) для снижения зависимого от H^{+} входа кальция в митохондрии,

- антимицин А – для снижения энергозависимого входа кальция в митохондрии,

- валиномицин – для снижения K^{+} зависимого входа кальция в саркоплазматический ретикулум,

- нигерицин – для снижения ИТФ-зависимого Ca^{2+}/H^{+} обменника в саркоплазматическом ретикулуме,

- ионы Cd^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+} и Co^{2+} для блокады L-каналов (потенциал-зависимый вход кальция) и другие блокаторы или агонисты.

7.5.4. Изменения лизосом при старении

Лизосомы – совершенно необходимый компонент клетки, участвующий в ее питании и обновлении. Один из признаков лизосом — наличие в них ряда ферментов (кислых гидролаз, всего около 40), способных расщеплять белки, углеводы, липиды и нуклеиновые кислоты. К числу ферментов лизосом относятся катепсины (тканевые протеазы), кислая рибонуклеаза, фосфолипаза и др. Кроме того, в лизосомах присутствуют ферменты, которые способны отщеплять от органических молекул сульфатные (сульфатазы) или фосфатные (кислая фосфатаза) группы.

Для лизосом характерна кислая реакция внутренней среды. Обычно pH в лизосомах составляет около 4,5-5 (концентрация протонов на два порядка выше, чем в цитоплазме). Это обеспечивается активным транспортом протонов, который осуществляет встроенный в мембраны лизосом белок-насос -протонная АТФаза.

Высокая активность кислой фосфатазы ранее использовалась как один из маркеров лизосом. В настоящее время более надежным маркером считается присутствие специфических мембранных гликопротеидов —

LAMP1 и LAMP2. Они присутствуют на мембране лизосом и поздних эндосом, но отсутствуют на мембранах других компартментов клетки.

Достаточно постоянным признаком старения клетки является повышение количества **первичных лизосом**, в них увеличивается количество недопереваренных субстанций, липофусцина, снижается стабильность лизосомальных мембран. Липофусцин формируется в лизосомах из продуктов пероксидации липидов, ионов железа и перекрёстно сшитых белковых агрегатов. Типичным считают повышение проницаемости мембран лизосом и аутолиз клеток.

Старые клетки часто характеризуют по экспрессии β-галактозидазы, активной при pH 6 – лизосомальная гидролаза, в норме активна при pH 4 [231, 240]. Для изучения активности этого фермента в клетках можно использовать, например, резоруфин-бэта-галактопиранозид как флюоресцентный субстрат с максимум поглощения 571 нм и флюоресценции 590 нм [316], или поглощение продукта гидролиза о-нитрофенилгалактозида при $ОД_{420}$, для отделения фермента клетки обрабатывают толуолом или тритоном X-100, а также субстрат, известный как x-gal.

В качестве теста биологического возраста, видимо, может служить кислая фосфатаза печени, положительно коррелирующая с возрастом у мышей [201], а также отношение МДГ/ЛДГ в печени и почках мышей и крыс [21].

Реакция на **кислую фосфатазу** является одним из тестов на лизосомы. Клетки паренхимы печени и особенно эндотелия капилляров богаты этим ферментом. Сущность гистохимической реакции заключается в инкубации ткани при кислом pH (pH 5) с глицерософатом и $Pb(NO_3)_2$, с образованием фосфата свинца, который переводят в черный PbS.

Зафиксированные кальций-формолом (10% хлористый кальций 10 мл, нейтральный неразведенный формалин – 10 мл, дистиллированная вода – 80 мл) в течение 18 час. Кусочки тканей промывают проточной водой и делают срезы на замораживающем микротоме. Срезы помещают в инкубационную смесь: 0,01 М глицерофосфат натрия в 0,05 М ацетатном буфере при pH 5, с 0,004 М $Pb(NO_3)_2$ при 37°С на 30 мин – 2 часа (инкубационную смесь предварительно выдерживают 2 часа в холодильнике). Срезы промывают в дистиллированной воде и помещают в 1-2% раствор

Na_2S на 1-2 мин, промывают дистиллятом и заключают в глицерин-желатину.

Для прижизненной окраски лизосом может быть использован флюорохром – *4-Nitro-7-(1-piperazinyl)-2,1,3-benzoxadiazole* (NBD-PZ), дающий флюоресценцию с митохондриями уже через 3 минуты добавления к суспензии клеток.

Описывают использование субстрата x-gal (5-бром-4-хлор-3-индолил-бета-Д-галактопиранозид), расщепляемого при pH 6,0, как маркера старения, в частности, для культивируемых фибробластов [62]: *клетки отмывали фосфатным буфером и фиксировали 3% формальдегидом 20 мин при комнатной температуре, затем обрабатывали субстратом (x-gal 1 мг/мл, 40 мМ цитрат-фосфатный буфер с pH 6,0, 5 мМ красная и желтая кровяные соли ($K_3[Fe(CN)_6]$ и $K_4[Fe(CN)_6]\cdot 3H_2O$.), 150 мМ NaCl и 2 мМ $MgCl_2$) в течение 18 часов*.

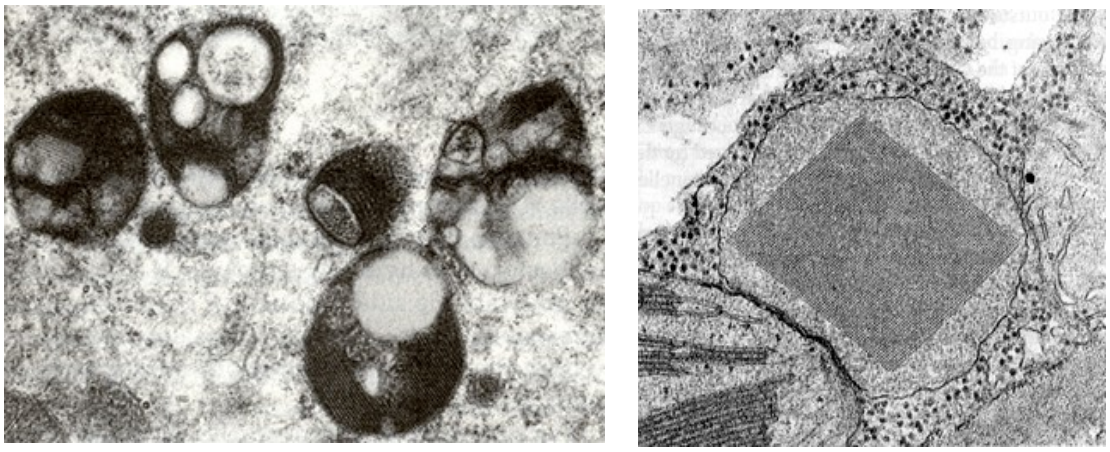


Рисунок 16. Непереваренные включения в лизосомы (слева) и кристаллические включения в пероксисомы (справа) с возрастом.
(По Нагорный, Никитин, Буланкин, 1963)

7.5.5. Реактивность клеток и старение

Количество рецепторов и сродство их к разным биоактивным веществам изменяется для разных клеток по-разному. Изменение соотношения рецепторов к разным биоактивным веществам переводит клетку на иной

тип функционирования. Эти изменения отражают также и компенсаторные реакции в ответ на изменение количества циркулирующих гормонов.

Особое значение принадлежит изменению числа клеток, числа рецепторов и их аффинности для нейроцитов регуляторных вегетативных центров, управляющих развитием - отмечены выраженные возрастные изменения для центров регуляции роста и полового развития при относительной устойчивости других областей мозга.

Во многих исследованиях исследуют жизнеспособность клеток. Обычно применяют прижизненную окраску или окраску мертвых клеток.

В мертвые, но не живые клетки хорошо проникает и окрашивает их в синий цвет толуидин синий, 0,5% трипан синий и др. (0,05 – 0,5%), флюоресцентные красители – этидий йодид и пропидий бромид.

Накопление пероксида в клетке.

Во многих случаях снижение жизнеспособности клетки ведет к накоплению в ней H_2O_2, как и кратковременная активация клетки различными агентами. Удобно использовать прижизненную регистрацию содержания перекиси в клетке флюоресцентным зондом – 5(6)-карбокси-флюоресцеином [169, 213].

Клетки в фосфатном буфере инкубируют с 5 мкМ флюоресцентного агента 30 минут при 37°С, отмывают центрифугированием и исследуют флюоресценцию при длине волны возбуждения 505 и регистрации 530 нм.

Рецепторы к факторам роста.

Были предприняты попытки выяснить механизм снижения чувствительности клеток к факторам роста по мере старения. Показано, что хотя число EGF-специфических сайтов связывания на клетку по мере старения культуры возрастает, их число на единицу площади остается постоянным, как и число мест связывания дексаметазона и их аффинность остаются неизменными в процессе старения культивируемых фибробластов. Специфичное связывание клеткой IGF также не меняется при старении. При старении фибробластов человека наблюдались лишь незначительные изменения в константе диссоциации (Kd) глюкокортикоидного рецептора. Характеристики связывания рецептора инсулина остаются неизменными в процессе старения фибробластов, полученных от доноров различных возрастов. Для EGF-специфических рецепторов обнаружено, что не только

их число остается постоянным при клеточном старении, но также и процесс их деградации остается количественно и качественно неизменным на протяжении жизни клетки в культуре. В случае PDGF-рецепторного комплекса сообщается о неизменности Kd в течение клеточного старения, и одинаковом уровне фосфорилирования рецепторов в мембранах «молодых» и «старых» клеток.

Таким образом, снижение способности клеток к ответу на факторы роста не может быть объяснено изменением способности их рецепторов к связыванию лигандов и внутриклеточному процессингу. Вместе с тем, при клеточном старении показано значительное снижение автокаталитической киназной активности рецепторов EGF, хотя не меняется тирозинкиназная активность рецептора PDGF. В настоящее время не существует доказательств того, что изменения клеточного ответа в процессе старения происходят благодаря существенным изменениям в рецепторных системах. Стабильность рецепторных систем подтверждается также тем, что многие процессы, инициированные факторами роста в покоящихся «молодых» и иммортальных клетках, инициируются и в стареющих клетках. Например, способность стареющих фибробластов к экспрессии мРНК генов, зависящих от клеточного цикла, таких как гены гистонов, орнитин-декарбоксилазы, тимидинкиназы, бета-актина, и протоонкогенов c-myc и c-ras остается неизменной, клетки при этом не могут вступать в S-фазу клеточного цикла.

Рецепторы к гормону роста.

Рост-стимулирующее действие ГР определяется в первую очередь инсулин-зависимым фатором роста (ИФР1), который образуется в печени и регулирует секрецию ГР, подавляя высвобождение соматолиберина и стимулируя высвобождение соматостатина. По структуре ИФР-1 сходен с проинсулином. В плазме человека обнаруживается также ИФР2: оба фактора связываются с мембранными рецепторами. Несмотря на то, что содержание ИФР1 в плазме вдвое меньше содержания ИФР2, именно ИФР1 обнаруживает сходство с эффектами ГР. Лица с дефицитом ИФР1, но вырабатывающие ИФР2 в достаточном количестве лишены способности к нормальному росту.

Инсулиноподобные факторы роста не относятся к панкреатическим гормонам, но, тем не менее, близки к инсулину по структуре и функции.

Влияние инсулина на рост и деление клеток трудно отделить от аналогичных эффектов со стороны ИФР1 и ИФР2. Инсулин оказывает более сильное влияние на метаболизм, чем инсулиноподобные факторы роста, однако последние сильнее стимулируют рост клеток. Каждый из этих гормонов имеет свой специфический рецептор. Эти гормоны способны в какой-то степени перекрестно связываться с рецепторами, чем, возможно, и объясняется присущая им смешанная биологическая активность. ИФР1 стимулирует рост хряща и ряд процессов в хрящевой ткани: транспорт аминокислот, синтез РНК, ДНК, белка, хондроитин-сульфата, коллагена. Ростовые факторы проявляют также инсулиноподобную активность: в мышцах – стимуляция транспорта аминокислот и глюкозы, образование коллагена, синтез белка; в жировой ткани – стимуляция транспорта глюкозы, окисление глюкозы до CO_2, включение глюкозы в липиды, подавление липолиза.

Между возрастными изменениями в содержании гормона роста, инсулин-подобного фактора роста (IGF-1) и сердечно-сосудистыми заболеваниями находят причинную связь [235].

ДРУГИЕ РЕЦЕПТОРЫ КЛЕТОК.

Аденозиновые рецепторы. Рецепторы А1(3) активируют аденилатциклазу, изменяют уровень инозинтрифосфата (ИТФ) и ионов кальция клетки, повышают активность G-белков и снижают проницаемость кальциевых каналов мембраны клеток. Рецепторы А2(А,В) активируют G-белки и аденилаткциклазу. Этот тип рецепторов блокируется кофеином. Истинные аденозиновые рецепторы действуют быстро, без лагпериода и без вторичных посредников, составляя, видимо, сами катионный канал для Ca^{2+}, K^+, Na^+ и представлены типично на гладкомышечных клетках и тромбоцитах.

Кальциевые каналы. Кальциевые каналы могут быть селективными (тучные клетки) и неселективными (тромбоциты): Ca^{2+} – Na^+ - каналы. На плазматической мембраны они представлены потенциал-зависимыми каналами: L. N, T и P типы активируются частично через G-белок, частично через вторичные посредники – ИТФ (изнутри клетки, на Т-лимфоцитах) или через кальций цитоплазмы (нейтрофилы) или циклические АМФ и ГМФ (никзоселективные катионные каналы, пропускающие Ca^{2+}, K^+, Na^+). Специфический ингибитор L типа каналов – верапамил (резко снижает ток кальция в цитоплазму через плазматическую

мембрану, но не из саркоплазматического ретикулума - СР) и никардипин (дипиридиновый ряд препаратов) – снижает ток кальция в цитоплазму и через плазматическую мембрану и из СР (специфичен при концентрации 1 мМ, при концентрации 10 мМ снижает также рецептор-зависимые кальциевые эффекты и вызывает резкую деполяризацию мембраны вплоть до 0, так как активирует вход Na^+ через кальциевые каналы, при замене внешнего Na^+ на холин-хлорид деполяризации не происходит).

Рецептор-зависимые каналы часто являются и потенциал-зависимыми. Рецепторы к АДФ (тромбоциты) действуют через G-белок; существуют и рецепторы к АТФ; рецепторы к ацетилхолину н-типа сами составляют катионный канал (для Na^+ и Ca^{2+}). Обычно все рецептор-зависимые каналы действуют через G-белок (для факторов роста – через тирозиновые протеинкиназы). Активация рецептор-зависимых каналов может изменять потенциал клетки, активировать потенциал-зависимый вход ионов кальция в клетку, повышать кальций цитоплазмы, активировать кальций-зависимые Cl^- каналы, активировать низкоселективные катионные каналы для кальция и натрия (снижать потенциал главным образом за счет тока ионов натрия).

Na^+ каналы. Все натриевые каналы чувствительны к тетрадотоксину, действие на них осуществляется прямо, например, н-ацетилхолиновые рецепторы представляют собой натриевый канал открывающийся при воздействии ацетилхолина; L I-III тип натриевых каналов имеется в нервных клетках, альфа1-тип – в мышечных клетках, сердечной мускулатуре.

K^+ каналы. В плазматической мембране и СР имеется 5 типов потенциал-чувствительных калиевых каналов, время активированного состояния составляет 0,1-1 сек, блокаторы – ионы Cs^+ (2 мМ), 4-амино-пиридин, тетраэтиламмоний. Кальций (часто и потенциал)-зависимые калиевые каналы существуют в открытом состоянии 10-250 рСек, блокаторы – Ba_{2+}, хинин, анти-кальмодулиновые агенты (трифторперазин, галоперидол). Рецептор-зависимые калиевые каналы активируются бета-сипатомиметиками, аденозином; ингибируются м-ацетилхолином, ГАМК, опиоидами – через G-белок. Другие типы калиевых каналов – натрий-активруемые, реагирующие на осмотическое давление, АТФ-ингибируемые (изнутри клетки), АТВ+кальций-активируемые.

Саркоплазматический ретикулум (СР). СР является кальциевым буфером для клетки, выход Ca^{2+} из СР представляет собой распространенный механизм активации клетки на различные стимулы и механизм усиления при прохождении Ca^{2+} через плазматическую мембрану. Часто используют при изучении СР активаторы и ингибиторы кальциевого тока: А23187, ИТФ, кофеин, цАМФ.

Роль цГМФ: при повышении Ca^{2+} в цитоплазме увеличивается активность ферментов, продуцирующих NO, последний является активатором гуанилатциклазы, что еще больше повышает уровень цГМФ цитоплазмы клетки, а также активирует механизмы обратной отрицательной связи – уровень Ca^{2+} цитоплазмы быстро снижается.

G-белок. Специальный G-белок активируется 5-10 мМ NaF, что активирует Ca^{2+} цитоплазмы клеток по механизму обратной положительной связи (при повышении входа Ca^{2+} в клетку через плазматическую мембрану). Во всех типах клеток G-белок активирует или снижает (от типа клетки) аденилатциклазу, активирует L тип Ca^{2+} каналов (потенциал-зависимые), снижает активность Na^{+} каналов, повышает фосфолипазу А2, часто активирует K^{+} каналы и фосфолипазу С, активирует фосфодиэстеразу для цГМФ и снижает для цАМФ, повышает эндоцитоз (самообновление) рецепторов клетки.

Протеинкиназа С. Активируется форболовыми эфирами (ФМА), снижает Ca^{2+} цитоплазмы при рецептор-опосредованном ответе на агонисты рецепторов, через активацию входа Ca^{2+} через кальций-рецепторные каналы, повышает цАМФ-чувствительные рецепторные эффекты и снижает Ca^{2+} опосредованный рецепторные эффекты, видимо, через G-белок.

Кальмодулин. Является общераспространенным внутриклеточным медиатором для проявления множества различных внутриклеточных эффектов. Повышает рецептор-зависимый уровень кальция в цитоплазме, повышает фосфодиэстеразу для цАМФ и снижает для цГМФ; инактивируется хлорпромазином.

Инозинтрифосфат (ИТФ). ИТФ участвует в регуляции функций плазматической мембраны и СР.

Активаторы и ингибиторы различных типов каналов обычно используются при регистрации повышения уровня Ca^{2+} цитоплазмы как универсального активирующего и регулирующего агента самых различных типов клеток. Часто используется метод пермеабилизации клеток, что

позволяет не выделять СР ультрацентрифугированием, а использовать цельные клетки, обработанные повышающими проницаемость плазматической мембраны агентами (малые дозы детергентов).

МЕТОД - иследование влияния ИТФ на Ca^{2+} в СР.

Клетки в среде с АТФ и Mg^{2+} с добавками дигитонина и рутения красного (для исключения вклада митохондрий в обмен кальция) и с флюоресцентными зондами на Ca^{2+} (например, Флуо-3) реагируют быстро выходом Ca^{2+} (повышением флюоресценции) из СР на 0,1-2 мкМ ИТФ; процесс не зависит от температуры, не чувствителен к потенциалу мембран СР (истинные Ca^{2+} каналы). Обычно в конце опыта добавление больших доз детергента или ионофора показывает общее содержание кальция клетки.

Радиологические методы оценки рецепторов клеток.

Обычно для исследования числа и аффинитета рецепторов клеток используются радиологические методики. Клетки в количестве 10^6 – 10^8 на пробу инкубируют на холоду 10-30 минут с радиомеченными лигандами, затем отмывая их на холоду быстрым центрифугированием (3-м мин при 4-6 тыс. оборотов в мин на центрифуге типа ЦЛС-3) или на фильтрах. Связавшуюся метку определяют в счетчиках радиоактивности, растворяя клетки с радиометкой в сцинтилляционной жидкости (при использовании бэта-радиоактивной метки); современные счетчики дают значения степени гашения для каждой пробы, позволяющие вычислить истинную радиоактивность, но для точности используют калибровочные кривые с добавлением известного количества радиометки. В контроле связывание подавляют многократным избытком нерадиоактивного лиганда. Для расчета мест связывания используют известную удельную радиоактивность (Кюри на мкМ лиганда) и число Авогадро для перевода радиоактивности в число молекул.

Для точного количественного расчета числа мест связывания на клетке и аффинитета рецепторов используют несколько близких концентраций лиганда в области максимума связывания и строят график зависимости связанной радиоактивности от концентрации добавленного радиоактивного лиганда (график Скэтчарда).

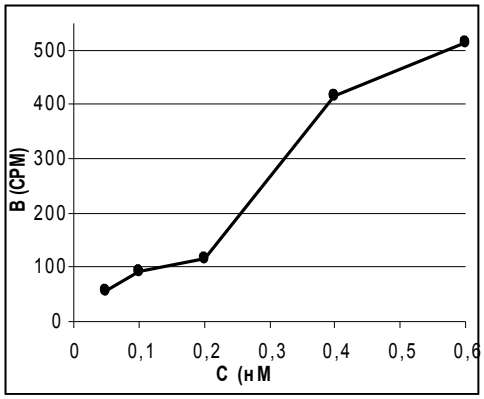
График Скэтчарда - это удобный способ представления в линеаризованной форме (есть и другие представления) уравнения равновесия для моновалентного взаимодействия между лигандом и рецептором L+R<=>LR: в равновесии Kd=(Le)(Re)/(LRe).

Для построения графика Скэтчарда надо знать равновесную концентрацию свободного лиганда Le, а также комплексов LRe. В этом случае уравнение можно записать в виде: Kd=(Le)(R0-LRe)/(LRe)(с учетом, что (Re)=(R0)-(LRe)), что ведет к уравнению Скэтчарда:

(LRe)/(Le)=(R0)/Kd-(LRe)/Kd. Если известна только добавленная концентрация лиганда, то подставляется Le=L0-LRe.

При построении графика Скэтчарда откладывают по оси X значение (LRe), а по оси Y значение (LRe)/(Le)или величины им пропорциональные (обычно - отсчеты или импульсы распадов в минуту - CPM). Отрезок отсекаемый на 0Y =(R0)/Kd, наклон = -Kd.

Мы использовали данный метод для оценки возраст-зависимого связывания клетками селезенки мышей бэта-адреномиметик, м-холино-миметика и нейропептидов. Использовали выделенные в градиенте фи-колла мононуклеары селезенки мышей BALB/c, самок, в возрасте 1-2 дня, 1, 3 и 12 мес. Пробы клеток в количестве 5-70 млн. на пробу инкубировали с ^{3}H-дигидроальпренололом (специфическая активность 82 Ки/мМ) и наномолярных концентрациях, в контроле – 10 мкМ пропранолола, или с ^{3}H-квинуклидиниолом, контроль - с 100 мкМ атропина; или с ^{125}I-энке-фалином; в течение 20 мин с последующей отмывкой центрифугированием и счетом радиоактивности на жидкостном бэта-сцинтилляционном счетчике. График ниже показывает типичное связывание ^{125}**I**-энкефалина в зависимости от добавленной концентрации (общая радиоактивность проб за вычетом фоновой); представление данных в виде графика Скэтчарда показывает наличие высоко аффинных сайтов связывания и низко-аффинных (вероятно, простая адсорбция лиганда).



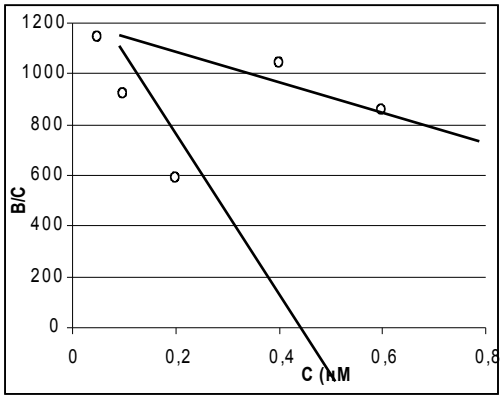


График 17а. Связывание ^{125}**I**-мет-энкефалина с клетками селезенки

По вертикали – связанная радиоактивность (импульсы в мин)

По горизонтали – добавленная концентрация радиолиганда (нМ)

График 17б. Связывание ^{125}**I**-мет-энкефалина с клетками селезенки в координатах Скэтчарда (собственные данные)

По вертикали – отношение связанной радиоактивности (В) к добавленной (С), по горизонтали – добавленная концентрация радиолиганда (нМ)

Ниже приведенная таблица иллюстрирует резкое изменение числа рецепторов с возрастом у мышей, что указывает на изменение способности клеток к рецепции адренергических, холинергических и энкефалиновых влияний на клетки.

Таблица 7.

Возраст-зависимое изменение рецепторов на клетках селезенки мышей

Тип рецептора	Мест связывания на клетке при возрасте			
	1-2 дня	1 мес	3 мес	12 мес
Адренорецепторы	2740±320	4470±415	3600±335	2260±219
Холинорецепторы	---	440±52	320±26	140±12
Энкефалиновые рецепторы	---	21±2	14±5	11±2

Исследование накопления цАМФ после 10 мин инкубации клеток с адреналином (упаковки КІТ фирмы «Amersham») показало 3-х кратное

снижение базального и инкубированного уровня цАМФ при ответе клеток старых мышей в сравнении с молодыми.

Таким образом, с возрастом снижается количество рецепторов и накопление внутриклеточных медиаторов переноса сигнала при воздействии на клетки внешних влияний, что отражается на их реактивности и адаптабильности.

7.5.6. Старение ядра клетки

Изменениям ядра придают важное значение в диагностике и проявлении старения. Изменяется активность хроматина, накапливаются повреждения (мутации), снижается активность репарационных ферментов.

Мутации ядер клеток.

Основной причиной образования свободных радикалов в биологических жидкостях называют естественный фон и искусственное облучение. До настоящего времени фактически единственным признанным экспериментальным методом искусственной индукции ускоренного старения является облучение. Кривые повышения смертности при облу-ении очень схожи с ускоренным старением. При этом оказалось, что достаточно облучать голову – важны регуляторные механизмы вегетативного мозга, а не обновляющиеся путем деления соматические клетки остальных тканей организма. Небольшие дозы облучения, с другой стороны, могут продлевать жизнь и даже снижать уровень естественных мутаций, нарастающих с возрастом в соматических клетках (рисунок 18).

В некоторых регионах с естественно повышенным фоном также отмечают более высокую жизнеспособность местного населения. Последние данные связаны, видимо, с индукцией слабыми дозами облучения процессов репарации ДНК, которые превалируют над процессами естественного повреждения ДНК клеток в обычных условиях.

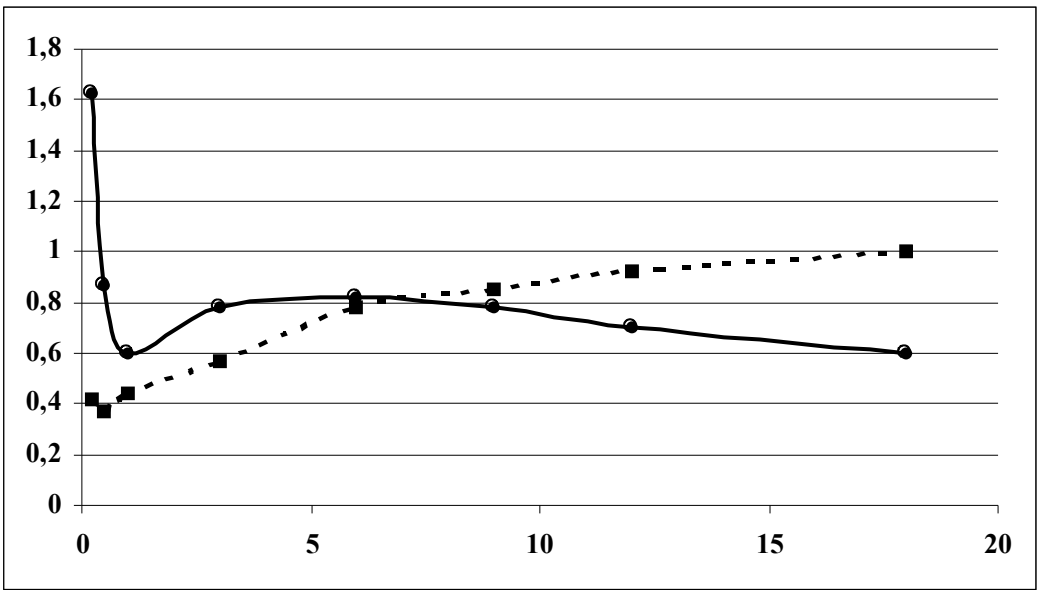


Рисунок 18. Зависимость количества полихроматофильных эритроцитов с микроядрами в клетках костного мозга облученных (сплошная линия) и необлученных (штриховая линия) мышей от возраста.

По горизонтали – время после облучения в мес, по вертикали – процент клеток (приводится по Балакину с соавт., 2001)

Наиболее интересным фактом из многообразных исследований по связи свободно-радикальных процессов с процессом старения являются комплексные итоговые расчеты, показывающие, что продолжительность жизни самых разных видов хорошо коррелирует с соотношением процессов синтеза свободных радикалов (оцениваются по удельному потреблению кислорода тканями на единицу массы ткани) и процессами защиты от них (оцениваются по удельной активности супероксид-дисмутазы (СОД) на единицу массы ткани). Интересно, что важна активность СОД – первичного фермента, инактивирующего первые реакционные молекулы возникающие при облучении. В данный механизм естественным образом укладываются известные другие соотношения по связи ПЖ с интенсивностью дыхания, активностью антиоксидантных механизмов, уровнем ТБК-активных веществ в тканях и пр., которые никогда не давали хорощих корреляций для разных видов. Интересно, что данное отношение работает даже для птиц – известное исключение из большинства других развиваемых формул отношения ПЖ и тех или иных морфо-функциональных характеристик организма. Все это указывает на

затрагивание основных механизмов старения в данном случае – глобальных механизмов неспецифического повреждения клеток свободными радикалами.

В последнее время значительный интерес проявляется у геронтологов к специфическим генным белкам **сиртуинам**. Они найдены в клетках практически всех организмов, от бактерий до млекопитающих. Эти белки представляют собой ферменты, участвующие в процессе упаковки молекулы ДНК в белки гистоны. Сиртуины препятствуют распаковке «ненужных» генов, а также участвуют в репарации ДНК. Показано, что избыток сиртуинов в клетках дрожжей препятствует их старению. У мышей, генетически предрасположенных к развитию лимфомы, введение сиртуинов или стимуляция генов сиртуинов увеличивает на 25 - 45% их выживаемость [263]. Стимуляция генов сиртуинов происходит, в частности, антиоксидантом ресвератолом (который содержится в красном вине и которому приписывают геропротекторный эффект).

Проточная цитометрия.

При проточной цитометрии можно сканировать от 100 до нескольких тысяч клеток в секунду, что позволяет очень быстро получить достоверные результаты. Однако таким способом можно анализировать только очень разбавленные клеточные суспензии. Солидные ткани необходимо сначала дезагрегировать, что всегда сопровождается нарушением морфологии. Клетки монослоя обычно диспергируют обработкой трипсином в присутсвии ЭДТА.

В настоящее время выпускают два основных типа приборов для проточной цитометрии: 1) простые в использовании аппараты, которые могут измерять флуоресценцию при двух и более длинах волн и светорассеяние под углом около 10º (малоугловое прямое рассеяние) и 90º ; 2) большие клеточные сортеры, которые не только измеряют пять и более клеточных или ядерных параметров, но и сортируют частицы с заданным набором этих параметров.

Принципы проточной цитометрии просты. Клетки или ядра поодиночке пересекают сфокусированный световой пучок, обычно лазерный. Свет определенной длины возбуждает молекулы флуоресцирующих красителей, связанных с различными клеточными

компонентами, при этом при этом может происходить одновременное возбуждение нескольких разных красителей, что позволяет оценить сразу несколько клеточных параметров. Свет, испускаемый красителями, собирают с помощью системы линз и зеркал и разлагают на компоненты. Световые сигналы детектируют, преобразуют в электрические импульсы и далее в форму, удобную для компьютерной обработки и хранения информации. Методом проточной цитометрии можно получать самые разные данные: определять содержание в клетке ДНК и РНК, количество общих и специфических белков, узнаваемых моноклональными антителами, исследовать клеточный метаболизм (например, внутриклеточный pH), транспорт ионов кальция и кинетику ферментативных реакций и пр. [266].

Измерение содержания ДНК – одно из самых простых и распространенных применений проточной цитометрии, позволяет четко различить клетки, находящиеся в G_1-, S- и G_2/ M-фазах клеточного цикла.

Самый простой способ оценки качества результатов основан на вычислении **коэффициента вариации** (CV) для G_1-пика ДНК диплоидных клеток: $CV = W / (M \cdot 2{,}35)$, где W – ширина пика на уровне полувысоты, M – номер канала для максимума G_1 - пика.

Индекс ДНК для «анеуплоидного» пика (пиков) на гистограммах с двумя или более G_1-пиками вычисляют, ориентируясь на «диплоидный» G_1-пик. Если присутствуют только диплоидные клетки, то ИД считают равным 1,0. Основная проблема при определении плоидности связана с трудностью выявления малого числа анеуплоидных стволовых клеток. Еще труднее идентифицировать малочисленные тетраплоидные стволовые клетки, поскольку такие клетки в G_1 - фазе по содержанию ДНК равноценны диплоидным клеткам в фазе G_2.

Для определения доли клеток в S -фазе используется метод Байсха и др., модифицированный применительно к анеуплоидным клеткам. Суть метода состоит в построении прямоугольника, вписывающегося в пространство между G_1- и G_2- пиками. Высота этого прямоугольника определяется числом клеток, приходящихся на 10 центральных каналов области S -фазы, из которого вычисляется среднее число клеток на канал. Аналогичным способом можно определить долю анеуплоидных клеток в S-фазе при условии, что высоту прямоугольника можно вычислить, используя ту часть гистограммы, которая не перекрывается с областью, отвечающей диплоидным клеткам.

Наиболее выраженные вариации в содержании ДНК наблюдаются в клетках пролиферирующих органов – печени и селезенки.

Одновременное изучение двух параметров – ДНК и белка, ДНК и РНК – дает существенно больше информации о кинетике клеточного цикла, так как позволяет разделить сливающиеся фазы цикла, такие, как G_0+G_1, G_2+M, а также идентифицировать дополнительные фазы в пресинтетическом G1 и постсинтетическом G2 периодах. Так, показана возможность использования АО (регистрация ДНК и РНК) для дополнительной классификации G_1 -периода на G_{IQ}, G_{IA}, G_{IB} и G_{2A}, G_{2B} [191].

При цитометрическом анализе ДНК и белка (FITC/PI) в клетках трех различных экспериментальных моделей, включающая не стимулированные и стимулированные фитогемагглютинином (ФГА) лимфоциты, показана возможность разделения пресинтетического периода на три фазы – покоящиеся клетки G_{IQ}, ранние G_{IA} и поздние G_{2B} клетки, в постсинтетическом периоде были соответственно выделены ранние G_{2A} и поздние G_{2B} клетки. Для задержки вхождения клеток в S -фазу используют актиномицидин D, оксимочевину, для блока митотических клеток применяют колцемид и др.

При окрашивании клеточной ДНК с целью последующего определения ее содержания с помощью проточной цитометрии следует учитывать специфичность красителя по отношению к ДНК, спектральные характеристики флюорохрома: интенсивность флуоресценции и возможность ее регистрации имеющимися в продаже приборами; стоимость и удобство в работе (растворимость, стабильность и т.д.) Этим требованиям отвечает целый ряд флуорохромов [186, 240]. Чаще других флуорохромов используется **иодистый пропидий** (ИП), несмотря на то, что он не строго специфичен по отношению к ДНК (окрашивается также двухцепочечная РНК). Спектральные характеристики ИП очень удобны для проточной цитометрии: для возбуждения флуоресценции используется обычный аргоновый лазер с рабочей длиной волны 488 нм, а максимум флуоресценции находится вблизи 620 нм, что позволяет параллельно использовать флуоресцеин при проведении многопараметрических измерений; аналогично, используют **этидий бромид** [233], длина волны излучения 600 нм при возбуждении 539 нм.

Независимо от красителя последний должен находиться с ДНК в стехиометрических соотношениях, т.е. количество связанного с ДНК

красителя должно быть пропорционально содержанию ДНК в клетке. Чтобы красителем были заняты все доступные для связывания места, его следует брать в некотором избытке.

Большинство флуоресцирующих красителей, связывающихся с ДНК, в том числе и ИП, не могут проходить через мембраны интактных клеток. Чтобы повысить проницаемость мембран, клетки либо фиксируют спиртом, либо обрабатывают детергентами.

7.5.7. Мембранный потенциал и старение

Мембранный потенциал клетки является важнейшим общим показателем функциональной активности клетки. Он практически не изменяется в мышечных волокнах, гепатоцитах, мотонейронах спинного мозга, но растет для кардиоцитов, гладкомышечных клеток сосудов и др. В пределах одной и той же клеточной популяции отмечаются выраженные различия в величине мембранного потенциала. По-разному изменяется также электровозбудимость различных типов клеток.

Для измерения мембранного потенциала клеток, саркоплазматического ретикулума, используются в настоящее время различные флюоресцентные зонды, например, 3,3`-Diethyloxadicarbo-cyanine iodide [171].

Типичная схема состоит в следующем.

Флюоресценция (длина волны возбуждения 480 нм, регистрации 500-520 нм) зонда (1-10 мкМ) снижается при добавлении клеток за счет встраивания зонда в мембрану клетки. Добавление калиевого ионофора валиномицина (10 мкМ) снижает флюоресценции до минимума, что соответствует максимально возможному потенциалу, а титрование KCl снижает до нуля мембранный потенциал, повышая флюоресценцию до максимума. Расчет в мВ мембранного потенциала проводят по формуле: мВ = (F (KCl) - F (клеток)) / (F (KCl) - F (Валиномицн)) X мВ (X для клеток селезенки можно принять порядка 140 мВ)*

7.5.8. Микровязкость мембран клеток

Механизм возникновения и развития многих патологических состояний, в том числе и злокачественного роста, связан с нарушением структуры и свойств биологических мембран. Микровязкость мембран является интегральным показателем, зависящим от нескольких компонентов: ненасыщенности липидов, содержания холестерина в мембране, фосфолипидного состава и количества белка, внедренного в мембрану. Важнейшим регулятором текучести мембран считают холестерин. Одной из причин снижения текучести мембран клеток крови может являться и изменение состава сфинголипидов, существенно влияющих на структуру липидного бислоя мембран, например, уменьшение молярного соотношения церамиды/ганглиозиды; ганглиозиды ингибируют противоопухолевый иммунитет, а церамиды являются супрессорами опухолевого роста. Важное значение в изменении структурно-функциональных свойств мембран придают также увеличению содержания сфингомиелина, способствующего наряду с холестерином увеличению микровязкости липидной фазы мембран [58]. Известно также, что увеличение ненасыщенности липидов (повышение числа двойных связей) ведет к повышению текучести мембран; особенно значимым является появление первой двойной связи в липидной молекуле, с увеличением степени ненасыщенности эффект прогрессивно снижается [290].

Повышение микровязкости мембран клеток крови ухудшает их вязкоэластические и реологические свойства, затрудняет микроциркуляцию, снижает активность мембраносвязанных ферментов, тормозит такие функционально важные мембранные процессы как связывание рецепторов со вторичными мессенджерами и лигандами, выполнение лимфоцитами иммунных функций. Предполагается, что именно повышение ригидности липидного бислоя мембран является одной из причин значительного снижения активности многих ферментов при опухолевом росте [58].

Между интенсивностью клеточной пролиферации и содержанием холестерина (и некоторых других липидов) в плазматической мембране существует двусторонняя связь. В частности, было показано, что в неделящихся культивируемых клетках, претерпевающих "стационарное старение", происходит накопление холестерина в плазматической мембране, приводящее к увеличению ее микровязкости; воздействие на "состарив-

шиеся" клетки липосомными препаратами, извлекающими холестерин из клеточной мембраны, приводит к "омоложению" этих клеток; воздействие на активно пролиферирующие трансформированные клетки липосомными препаратами, обогащающими клеточную мембрану холестерином, резко снижает их способность к делению, т.е. «старит» клетки. Все это свидетельствует о важной роли состояния плазматической мембраны в регуляции процессов клеточного старения, хотя первичный «запуск» этих процессов происходит на уровне хроматина.

Показано также, что лейкоциты с высоким соотношением холестерин/фосфолипиды и повышенной поэтому микровязкостью имеют существенно сниженную иммунную реактивностью Считают, что с этим может быть связано и снижение антиопухолевой активности лейкоцитов у онкологических больных [290]. Увеличение микровязкости иммунокомпетентных клеток крыс показано при рентгеновском облучении, вызывающем вторичное иммунодефицитное состояние организма.

Текучести принадлежит ключевая роль в регуляции всех процессов, происходящих в мембранах. Этот комплексный показатель отражает как структуру, так и диффузионные аспекты липидной составляющей мембран и реагирует на метаболические изменения и внешние воздействия [290].

Структура и свойства мембран лимфоцитов и эритроцитов крови является удобным и чувствительным показателем общего состоянии мембран организма. Исследуют обычно микровязкость липидного бислоя и зон белок-липидных контактов лимфоцитов и эритроцитов. Оценку относительной микровязкости мембран клеток крови осуществляют обычно методом латеральной диффузии гидрофобного зонда пирена ($C_{16}H_{10}$). Определение микровязкости основано на образовании эксимеров (возбужденных димеров) пирена. Коэффициент эксимеризации пирена $F_э/F_м$, равный отношению интенсивности флюоресценции эксимеров (длина волны испускания 470 нм) и мономеров (длина волны испускания 395 нм), находится в **обратной** зависимости от относительной микровязкости (прямо пропорционален **текучести** мембраны). Микровязкость липидного бислоя мембран оценивают при длине волны возбуждения 334 нм, а микровязкость зон белок-липидных контактов при длине волны возбуждения 286 нм [27].

МЕТОДИКА**.** *Суспензию клеток разводят до концентрации 10^6 - 10^7 кл/мл (эритроцитов - до оптической плотности 1,400 ед. в 1,0 см по ширине кювете при длине волны поглощения 650 нм). Инкубацию суспензии*

клеток с пиреном (1-5 мкМ на 1 мл суспензии) проводят при 25° С в течение 1 мин при постоянном встряхивании на мешалке. Интенсивность флюоресценции димеров и мономеров пирена определяют в отдельных лимфоцитах и эритроцитах на люминесцентном микроскопе "ЛЮМАМ И-3". В каждом препарате измеряют флюоресценцию не менее чем в 10 клетках и находят среднее значение и дисперсию среднего. Возможно также использование спектрофлюориметра.

Нормальные значения для человека **Fэ/Fм** составляют – для лимфоцитов: белок-липидные контакты – 2,92±0,15, липидный бислой – 2,95±0,15; для эритроцитов: белок-липидные контакты – 2,75±0,17, липидный бислой – 2,77±0,20. По другим авторам, значения **Fэ/Fм** варьируют: 3,66 – 2,9 – 1,8 – 1,37 – 1,2 – 0,5.

Длина волны возбуждения также может составлять: 282, 285, 286, 334 нм; волна регистрации флюоресценции: 370, 372, 390, 393, 395 и 470 нм.

Обычно используют для исследования:

- микровязкости белок-липидного слоя: отношение флюоресценции при 470/395 нм при возбуждении 286 нм,
- микровязкости липидного слоя: отношение флюоресценции при 470/395 нм при возбуждении 334 нм,
- полярности окружения пиренового зонда: отношение флюоресценции при 372/393 нм при возбуждении 282 нм.

Мы исследовали флюоресценцию пирена спектрофлюориметрически для клеток селезенки мышей BALB/c возраста 4 мес и 14 мес. Оптимальными оказались: 10 млн клеток на мл в растворе Хенкса (без глюкозы и кальция), 2 мкМ пирена (в этиловом спирте, приготовлен заранее), 5 мин инкубации при 25°С; исследовалась флюоресценция при 470, 395, 393 и 372 нм при возбуждении 282, 286 и 334 нм, спектрофлюориметр «Панорама», низкая чувствительность, режим полной коррекции.

Мы исследовали флюоресценцию пирена (спектрофлюориметр «Панорама» для клеток селезенки мышей BALB/c возраста 4 мес и 14 мес. Опти-мальными оказались: 10 млн клеток на мл в растворе Хенкса (без глюкозы и кальция), 2 мкМ пирена (в этиловом спирте, приготовлен заранее), 5 мин инкубации при 25°С; исследовалась флюоресценция при 470, 395, 393 и 372 нм при возбуждении 282, 286 и 334 нм.

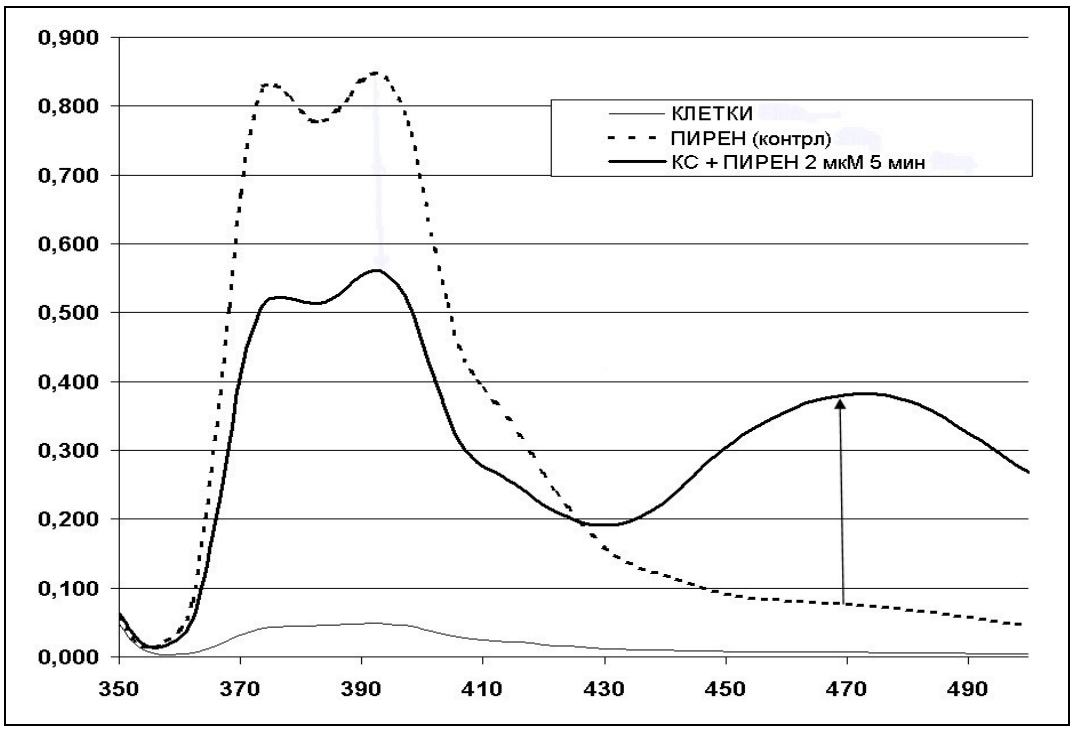


Рисунок 19. Спектр флюоресценция пирена в растворе Хенкса в присутствии и без клеток селезенки мышей при длине волны возбуждения **334** нм.

По горизонтали – длина волны флюоресценции,

По вертикали – величина флюоресценции (у.е.).

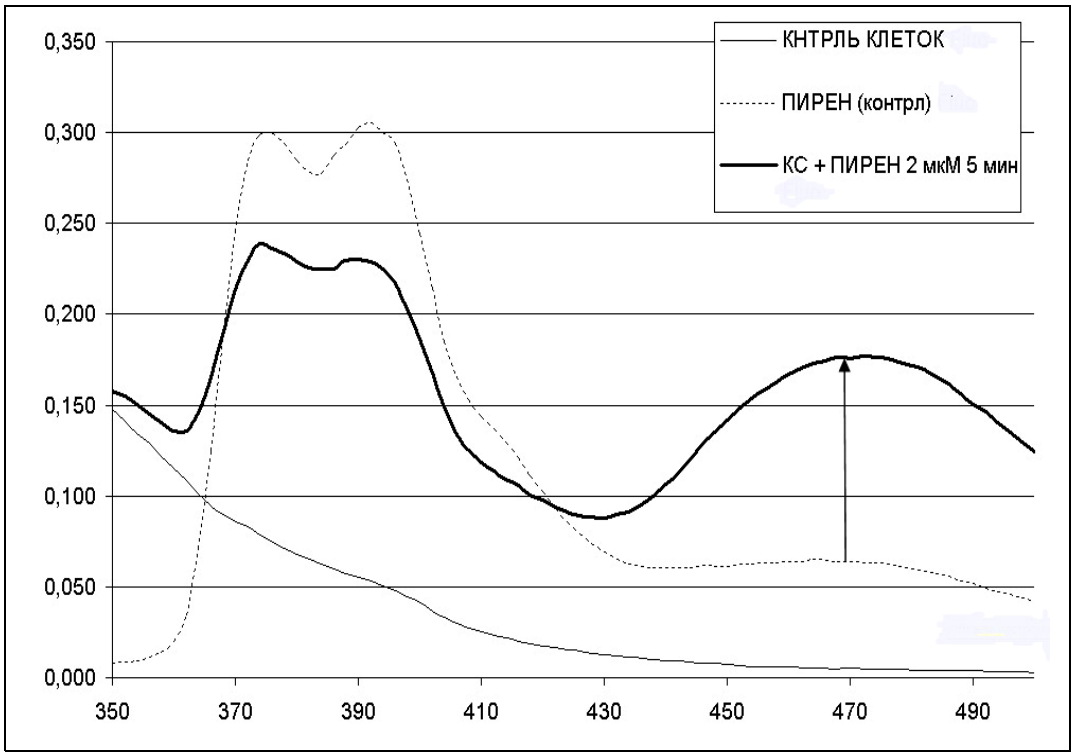


Рисунок 20. То же при длине волны возбуждения **282** нм.

Для взрослых 4-6 мес мышей величины микровязкости составили:

- показатель полярности окружения (флюоресценции при 372/393 нм при возбуждении 282 нм): **1.001**;

- микровязкость белок-липидного слоя (флюоресценция при 470/395 нм при возбуждении 286 нм): **0,647**;

- микровязкость липидного слоя (флюоресценция при 470/395 нм при возбуждении 334 нм): 0,**683**;

7.5.9. Электрокинетические свойства ядер.

Исследования генома эукариотических организмов показали, что в ядре существуют механизмы регуляции генетической активности, в связи с чем приобретает особую актуальность изучение интегральных биофизических характеристик, в частности, электрического потенциала и электрокинетических свойств ядра и внутриядерных структур. Трансмембранный потенциал ядер зарегистрирован в клетках различных организмов, он сохраняется в изолированных, выделенных из клеток ядрах . Электрокинетические свойства ядер, изолированных из клеток, в ряде случаев отражают изменения в активности синтетических процессов в клетках. Величина отрицательного мембранного потенциала ядра составляет порядка – 43 В (клетки Hela) и изменяется в ходе клеточного цикла, омическое сопротивление мембраны ядра – порядка 1 Ом * $см^2$. В ходе индукции клеточного деления (например, при регенерации печени), электрокинетическая активность ядер значительно и рано возрастает, что зависит от синтеза РНК в клетках.

Электрокинетические свойства ядер и внутриядерных структур в живых клетках характеризуются с помощью показателей электроотрицательности ядер и хроматина, которые изменяются при изменении активности клеток и состояния организма и чувствительны к действию повреждающих факторов. Результаты исследований с помощью метода внутриклеточного микроэлектрофореза имеют также прикладное значение и находят применение в различных областях медицины при изучении утомляемости, выносливости человека в экстремальных условиях, неспецифических реакций организма на различные заболевания.

Исследования более 3000 доноров позволили определить зависимость величины электрокинетической активности ядер от возраста донора [151, 152]. На рисунке 21 показано изменение данного показателя для клеток буккального эпителия в зависимости от возраста. Видно, что с возрастом эта величина выражено снижается, впрочем, график имеет выраженный максимум в среднем возрасте, для более ранних возрастов эта величина также более низка. Последнее не позволяет напрямую связать электрический потенциал ядер с возрастом, однако, снижение его при различной патологии и повышение при выздоровлении и улучшении общего и физического состояния позволяют говорить о нем как о важной и простой для регистрации величине. Данный феномен отмечен для большинства типов клеток и видов животных, поэтому он может быть, видимо, использован и у лабораторных животных при исследовании процессов старения.

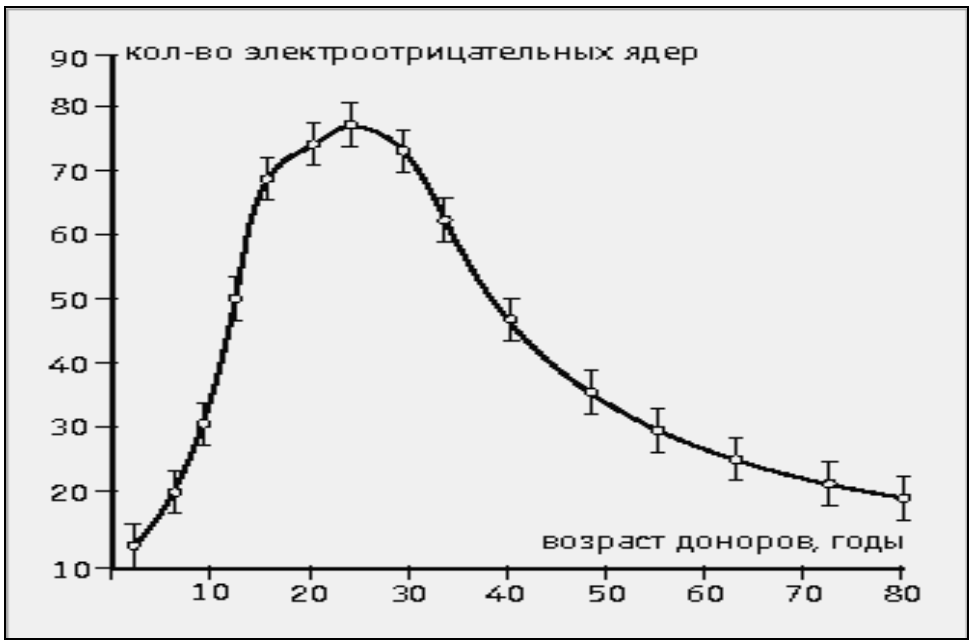


Рисунок 21. Возраст-зависимое изменение количества электро-отрицательных ядер буккального эпителия человека

Электрофоретическая подвижность ядер клеток (ЭФПЯ) известна давно и основана на наличии дзета-потенциала у ядер живых клеток, но подробно исследована и внедрена в практику как метод исследования биологического возраста В.Г.Шахбазовым.

В классическом исполнении исследуемый материал (соскоб эпителия щеки или клетки другой природы, например, лимфоциты), помещают на

предметное стекло, добавляют каплю воды, делают мазок и накрывают вторым покровным стеклом. Влажной фильтровальной бумагой подводят ток от приборы для электрофореза и устанавливают при напряжении 20-30 В ток 0,01 – 0,4 мкА. Изменяя полярность, в течение 5 минут подсчи-тывают число клеток (на 100-200 клеток), у которых ядро смещается при изменении полярности. Можно подбирать ток до максимума числа клеток со смещаемым ядром.

Число положительных в тесте клеток снижается пропорционально возрасту с 25 лет, хотя до этого возраста также наблюдается рост фактически с рождения.

Изменяется также собственно **электрическая активность** клеток: удлиняется скрытый период включения моторной единицы, для групп клеток отмечается большое количество потенциалов малой силы. Значимо уменьшается количество воды в тканях, количество внутриклеточных ионов калия, с неизменным или даже повышенным содержанием ионов натрия (в некоторых клетках, наоборот, происходит накопление внутриклеточного калия).

Мембранная активность **К-Na-АТФазы** падает, снижается содержание молекул − энергоносителей (АТФ и креатинфосфата), изменяется сопряжение окислительного фосфорилирования и окисления; в этих условиях росту внутриклеточного гликолиза отводят компенсаторную роль.

На фоне зачастую нормальной **величины поляризации** − статического параметра, отмечается изменение динамической величины − реполяризации после различных воздействий на клетку. Температурный коэффициент и энергия активации процессов, определяющих **реполяризацию** у старых животных, в 2 раза выше, что указывает на увеличение доли не ферментативных реакций в развитии реполяризации (это означает снижение уровня контроля за этим процессом и сдвиг соотношения свойств "живое/неживое" вещество).

Снижение лабильности - одна из главных характеристик проявления старения на клеточном уровне. На ЭЭГ отмечается преобладание медленных ритмов; происходит также снижение частоты токов действия для моторных единиц мышц, урежение частоты импульсации в афферентных и эфферентных нервах. Падает лабильность вегетативных ганглиев и блуждающего нерва, что увеличивает рассогласованность систем и

снижает подчинение "периферии центру". В области синапса частота и амплитуда миниатюрных потенциалов не изменяется, однако, изменяется реактивность к блокаторам и агонистам, влияющим на синаптическое проведение импульса.

Снижается синтез ацетилхолина и коэнзима А − ключевого фермента для холинэстеразы, снижается синтез и обратный захват норадреналина, компенсаторно повышается чувствительность постсинаптической мембраны к этим медиаторам. Также снижается количество неперерожденных синапсов.

7.5.10. Методы гистоморфологии

Гистоморфология предполагает все разнообразие методов световой и электронной микроскопии, а также широкое использование гистохимии и иммунофлюоресцентных методов.

Несмотря на достаточно подробные исследования гистоморфологии старения практически всех тканей, для рутинных исследований геронтологами и биологами старения она практически не используется, так как количественные критерии оценок мало разработаны.

Достаточно широко применяют обычно исследование митотического индекса, так как снижение скорости клеточного самообновления тканей – важнейший показатель старения. Для клеток печени различия могут составлять 1-2 порядка, для других клеток – разы, для хрусталика – десятки процентов.

В последние годы широко применяется окраска флюоресцентными красителями и иммунофлюоресценция, что позволяет количественно изучать практически любые структуры.

МЕТОДЫ.

ГИСТОЛОГИЯ и ГИСТОХИМИЯ.

Прямая спектроскопия

Методами прямой спектроскопии можно характеризовать макромолекулы в биологических жидкостях, клетках и тканях.

Используют следующие характерные частоты поглощения:

200-(210)-225 нм – пептидная связь (характеристичность и чувствительность как у биуретовой реакции),

260 нм – ДНК, РНК,

280 нм – ароматические аминокислоты, обычно триптофан,

280-300 нм – ненасыщенные связи липидов (-C=C-)

330-400 нм – стероиды.

Окраска макрофагов (НСТ-тест)

Примером специфической окраски клеток является окраска макрофагов нитросиним тетразолием.

Принцип НСТ-теста заключается в поглощении из среды фагоцитирующими клетками бесцветного нитросинего тетразолия (НСТ) и восстановлении его в темно-синий диформазан. Активность восстановления НСТ отражает состояние бактерицидных пероксидазных систем клетки и коррелирует с образованием супероксидных радикалов.

Для постановки НСТ-теста к 0,1 мл лейковзвеси добавляют 0,1 мл 0,2 % нитросинего тетразолия. Смесь инкубируют в водяной бане при температуре 37°С в течение 25 мин и при комнатной температуре в течение 15 мин. Клетки трижды отмывают средой 199 и готовят мазки на стекле. Высушенные препараты фиксируют метанолом и окрашивают 2 % водным раствором метилового зеленого от 30 с до 5 мин.

При количественном учете реакции отмечают диформазан-отрицательные клетки (0 степень активности), клетки с единичными гранулами диформазана или с площадью, окрашенной диформазаном, до 25-30 % (1-я степень активности); клетки, цитоплазма которых на 30-70 % занята глыбками диформазана (2-я степень) и клетки, у которых более 70 % цитоплазмы содержит гранулы диформазана (3-я степень).

Митотический индекс.

Используют обычно замороженные или любые иные срезы тканей, а также удобно использовать мазки-отпечатки печени и суспензии клеток, например, тимуса или костного мозга. Окраску производят обычно Азур-эозином, доступным в широкой продаже. Ткани фиксируют спиртом и отмывают проточной водой, суспензии клеток можно окрашивать и исследовать в физиологических солевых растворах. Просчитывают при большом увеличении и масляной иммерсии видимые митозы на 100-200-

1000 клеток (в зависимости от количества митозов в ткани) и выражают митотический индекс в промилле (на 1000 клеток).

Окраску ядер клеток для оценки ДНК и РНК и активности хроматина можно производить также реактивом Шиффа (Супоницкий, 1925, видоизмененный метод Green, 1970): *мазки клеток (лимфоидных органов, для оценки бластной реакции) фиксируют формалином или этанолом и обрабатывают насыщенным раствором пикриновой кислоты 1 час при 60°С, затем отывая проточной водой 20 мин до исчезновения насыщенной желтой окраски; препараты просушивают и помещают на 39 мин в раствор Шиффа, затем промывают проточной водой до проявления пурпурной окраски и докрашивают в 0,03% растворе метиленового синего с pH 3,0 в течение 2 мин; после отмывки в проточной воде просушивают и микроскопируют. Ядра окрашиваются от пурпурного до темно-синего цвета, цитоплазма – в бирюзовый цвет; компактое ядро – темно-синее, при стимуляции бластообразования – в переходные цвета, при ясной бластной трансформации – в пурпурный цвет. Реактив Шиффа: 1 г. даимантофуксина растворяют в 200 мг горячей воды, кипятят 20 мин, доводят до 50°С, фильтруют и добавляют 20 мл 1 н HCl, доводят до 25°С и добавляют 1 г Na_2SO_3, раствор зреет 24 ч. становясь бесцветным, хранят в темноте.*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЛЮОРОХРОМОВ

Используют:

1. Собственную люминесценцию (люминометрия, например, хемилюминесценция крови (свободнорадикальная).

*2. Непосредственное возбуждение структур клетки (обычно – триптофановая флюоресценция, НАД(Ф) и НАД(Ф)*Н и др.).*

3. Окраска флюорохромами определенных структур (ядра, митохондрий и пр.).

4. Исследование степени прохождения флюорохромов в клетки в зависимости от условий (pH, мембранный потенциал, вязкость мембран и пр.) – метод флюоресцентных зондов.

5. Прямую иммунофлюоресценцию.

6. Непрямую иммунофлюоресценция.

Окраску флюорохромами проводят чаще для суспензий клеток в физиологических солевых растворах, но используют и различные методы фиксации. Исследуют флюоресценцию клеток и тканей в флюоресцентных микроскопах при ультрафиолетовом возбуждении и соответствующих фильтрах. Обычно это красная, зеленая, реже синяя флюоресценция. Количественные данные получают в современных работах используя проточные цитофотометры.

Для количественных данных возможно использование флюориметров, дающих динамические данные.

Удобно также микрофильмировать данные, в том числе для количественной обработки микрофотографий. Возможно использование обычной цифровой фотокамеры или специальных фото-приставок с выходом на компьютер.

Для обраб отки микрофотографий используют различные компьютерные программы, количественные данные при этом зачастую не хуже, чем при цитофотометрии.

ФЛЮОРЕСЦЕНЦИЯ ЯДЕР КЛЕТОК

Окраска этидием бромидом

Обычно основана на красно-коричневой флюоресценции ядер живых клеток при окраске этидием бромидом.На мазок клеток наносят 10-15 мкл 0,0004% (1 мг в 250 мл дистиллировано воды) этидиума бромида; стекло слегка подогревают, проводя несколько раз над пламенем горелки. Препарат промывают в трех сменах охлажденного ЗФР. Удаляют фильтровальной бумагой избыток жидкости и на мазок наносят 50% раствор глицерина в ЗФР; препарат накрывают покровным стеклом и с помощью фильтровальной бумаги удаляют избыток глицерина. С целью сохранения препарата от высыхания края покровного стекла окантовывают расплавленным парафином.

ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИЯ

Метод позволяет выявлять практически любые компоненты или даже несколько сразу, при различном цвете флюоресценции. Обычно клетки также подкрашивают для визуализации ядра (этидий дромид), цитоплазмы и иных компонентов клетки.

Используют прямую иммунофлюоресценцию (антитела связанные с флюорохромом) и непрямую (специфические антитела и антитела к ним

меченные флюорохромом), которая часто более чувствительна. Возможна иммунофлюоресценция в мазках, суспениях клеток, гистологических препаратах и т.п.

Иммунофлюоресценция в мазках клеток

1. Приготовление забуференного изотонического раствора *хлорида натрия (ЗФР): 15,6 г NaH_2PO растворить в 1 л. дистиллированной воды (раствор № 1); 35,8 г Na_2HPO растворить в дистиллированной воде, доведя объем до 1 литра (раствор № 2). Смешать 13 частей раствора № 1 и 37 частей раствора № 2, добавить 8,5 г NaC1; pH раствора должен составить 7,2-7,4.*

2. Проведение реакции. *Выделенные на центрифугированием в градиенте плотности фиколл-гипака (плотность 1,085-1,090) лимфоциты дважды отмывают охлажденным до 4°С ЗФР в течение 10 мин при 1000-1500 об/мин; суспензию лимфоцитов разводят ЗФР до концентрации 1×10^6 - $1*10^7$ клеток в 1 мл.*

Тщательно отмытые и обезжиренные предметные стекла покрывают 0.01% раствором поли-L-лизина в ЗФР путем нанесения его на стекло с последующей инкубацией в течение 1 часа при 37°С. На стекло, покрытое слоем поли-L-лизина, наносят 0,05 мл суспензии лимфоцитов. Клетки осаждают на стекле во влажной камере при температуре 37°С (в качестве влажной камеры используют чашку Петри с вложенной в нее влажнойфильтровальной бумагой). После осаждения клеток препарат осторожно промывают круговыми движениями последовательно в трех сосудах с охлажденным ЗФР. Мазок подсушивают фильтровальной бумагой (не касаясь монослоя клеток).

На мазок лимфоцитов наносят один из растворов моноклональных антител, содержащий 3 мкг/мл ОКТ3, ОКТ4 или ОКТ8 антител (для Т-лимфоцитов) или иных моноклональных антител в ЗФР и инкубируют во влажной камере в течение 40 мин при комнатной температуре. По окончании инкубации препарат осторожно промывают в трех сменах охлажденного ЗФР.

Для проявления моноклональных антител на мазок наносят 10-15 мкл кроличьего антимышиного иммуноглобулина, меченного ФИТЦ, разведенного 1:50 в ЗФР, и инкубируют во влажной камере в течение 30мин при комнатной температуре. Препарат промывают в трех сменах

охлаж-денного ЗФР. (Существуют также ряд антител меченных флюоро-хромами, что исключает необходимость данного этапа).

На мазок наносят 10-15 мкл 0,0004% (1 мг в 250 мл дистиллировано воды) этидиума бромида для окраски ядра клеток; стекло слегка подогревают, проводя несколько раз над пламенем горелки. Препарат промывают в трех сменах охлажденного ЗФР. Удаляют фильтровальной бумагой избыток жидкости и на мазок наносят 50% раствор глицерина в ЗФР; препарат накрывают покровным стеклом и с помощью фильтровальной бумаги удаляют избыток глицерина.С целью сохранения препарата от высыхания края покровного стекла окантовывают расплавленным парафином.

3. Анализ результатов. *Препарат анализируют с помощью люминес-центного микроскопа, последовательность фильтров (для метки ФИТЦ) - начиная от ртутной лампы: ЗСС, ЗСС 24, ФС-1, БС-8). В поле зрения микроскопа видны лимфоциты, ядро которых светится кирпичнокрасным цветом, а антительный комплекс, связавшийся с поверхностными рецепторами клеток, имеет точечное свечение изумрудно-зеленого цвета. Клетки, имеющие диффузное изумрудно-зеленое или чисто зеленое свечение, являются мертвыми и при анализе не учитываются. В нескольких полях зрения сосчитывают общее число лимфоцитов и среди них количество клеток, имеющих точечное изумрудно-зеленое свечение. Процент светящихся лимфоцитов определяют обычно после подсчета 200 клеток. Так как флюоресценция и возбуждение для различных флюорохромов различна, используют различные фильтры с различной длиной волны возбуждения и излучения.*

Иммунофлюоресценция в суспензии клеток

Производители отечественных моноклональных антител против антигенов лимфоцитов рекомендуют следующую процедуру окраски для изучения иммунофлюоресценции.

Лимфоциты выделяют из гепаринизированной крови центрифуги-рованием на градиенте фиколл-верографина (плотность 1,077 г/мл). Затем 1-0,1 млн лимфоцитов в объеме 50 мкл вносят в центрифужные пробирки или лунки 96-луночного круглодонного планшета. К клеткам добавляют 5 мкл тестируемого моноклонального антитела и инкубируют 30-45 мин при +4° С.

Добавляют 150 мкл раствора Хенкса и центрифугируют 5 мин при 200 g (1200 об/мин на центрифуге с радиусом 15 см). Удаляют супернатант. Затем вносят 50 мкл раствора Хенкса, клетки суспендируют, добавляют 150 мкл раствора Хенкса и центрифугируют 5 мин при 200 g.

Если в работе используются моноклональные антитела, меченые напрямую флуоресцеин изотиоционатом (FITC) или фикоэритрином (PE), ниже следующая стадия не выполняется не проводится.

К осадку отмытых клеток добавляют 50 мкл $F(ab')_2$ -фрагментов овечьих антител к Ig мыши, меченных ФИТЦ и разведенных 1:100. Для разведения используют физраствор, забуференный фосфатами (PBS), содержащий 0,5% желатины и 0,1% азида натрия (вместо PBS можно использовать раствор Хенкса). Клетки суспендируют и инкубируют 30 мин при +4 °С. Клетки 2 раза отмывают как указано выше.

Клетки готовы для наблюдения иммунофлуоресценции, однако если результаты теста будут учитываться лишь через несколько часов, то клетки необходимо зафиксировать. Для этого после заключительного центрифугирования и удаления супернатанта к осадку клеток добавляют 50 мкл 1% параформальдегида на PBS (можно использовать раствор формалина разведенный 1:40 на PBS). Клетки суспендируют. Фиксированные клетки сохраняют флуоресценцию в течении недели.

Для подсчета результатов суспензия переносится на предметное стекло, накрывается покровным стеклом и препарат просматривается под иммерсией на флуоресцентном микроскопе (объектив х 90). Наилучшее качество изображение достигается при использовании окуляров с небольшим увеличением (х3 или даже х1,7). Рекомендуется использовать не флуоресцирующее иммерсионное масло. Наблюдение следует проводить в затемненном помещении. Количество антиген позитивных клеток определяют как % флуоресцирующих клеток при просматривании 200 лимфоцитов за вычетом % флуоресцирующих клеток, наблюдаемых в препарате отрицательного контроля. В качестве отрицательного контроля используют препараты, подготовленные аналогичным образом, за исключением того, что вместо моноклональных антител клетки обрабатывают раствором Хенкса или нормальным Ig мыши.

Для идентификации **Т-лимфоцитов** часто используют антигены: CD3+ (все Т-лимфоциты), CD4+ (Т-хелперы) и CD4+ (Т-супрессоры).

Популярны в последние годы исследования **стволовых клеток**. Фенотипическим «портретом» чистых популяций гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) считается присутствие на поверхности клетки маркеров CD34 и CD133 (у человека), c-kit (**CD117**) у мышей, и отсутствие CD38, и специфических маркеров комитированных клеток гликофорина А, CD2,CD3, CD4, CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD56 и CD66b. Долгое время считалось, что ГСК способны дифференцироваться только в клетки крови. Однако исследования по выявлению мультипотентности ГСК выполненные в последние годы показали, что при трансплантации в кровоток ГСК могут дифференцироваться также в гепатоциты, клетки эпителия и эндотелий.

ГСК способны мигрировать не только в костный мозг, но и из костного мозга в кровоток. Показано, что выход ГСК из костного мозга происходит в ответ на воздействие факторов мобилизации: гранулоцитарно-макрафагального колоние-стимулирующего фактора (ГМ-КСФ), гранулоцитарного колоние-стимулирующего фактора (Г-КСФ). Эти факторы также выделяются клетками стромы. Воздействие ГМ-КСФ и Г-КСФ увеличивает количество ГСК в периферической крови на порядок.

ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫЕ ЗОНДЫ

Флюоресцентные зонды широко используются для исследования физиологии клетки, так как позволяют в динамике и прижизненно следить за самыми различными процессами в клетке. Обычно добавляют флюресцентный зонд, специфический для изучаемой структуры или функции, в суспензию клеток в физиологическом растворе и исследуют кинетику флюоресценции, в том числе при добавлении различных нефлюоресцирующих клеточных стимулов. Более распространено изучение флюоресцентых зондов флюориметрией, но возможны и серийные микрофотографии в том числе с количественным обсчетом данных.

Более подробно методы работы с флюоресцентными зондами будут описаны в следующей главе, здесь дается пример использования одного из наиболее распространенных флюоресцентных зондов – акридинового оранжевого (АО), для изучения ДНК и РНК клеток [151, 152]. Известно, что АО связывается с ДНК клетки, давая зеленую флюоресценцию (и с РНК, в больших концентрациях, давая красную флюоресценцию).

Оптимум возбуждения флюоресценции – 495 нм и регистрации – 520 нм (для клеток селезенки в растворе Хенкса).

Показано в ряде работ, что интенсивность связывания АО зависит от активности хроматина: так, влияние мембранных агентов, таких как конканавалин А, активирует хроматин клеток с максимумом уже через 30 мин [258]. Мы показали этим методом, что способность активироваться у хроматина клеток селезенки для старых мышей ниже, чем для молодых.

Мы исследовали выделенные в градиенте плотности фиколла клетки селезенки мышей Balb/c, самок, в возрасте 3 мес и 1 года. Окраску акридином оранжевым проводили в конечной концентрации 5 мкг/мл в растворе Хенкса с глюкозой и кальцием, в течение 5 мин при 37°C с немедленной флюоресцентной микроскопией и микрофильмированием (рисунки 54-58). При изучении влияния КонА последний добавляли в концентрации 0,1 – 1,0 и 10,0 мкг/мл и инкубировали в течение 30 мин. при 38°C.

Для количественного учета результатов мы использовали компьютерную программу «Цитоскан», разработанную нами (Лаб. Геронтологии НИМСИ МГМСУ с участием ИСА РАН (Лаб. Системного анализа и информатики в медицине и экологии). Было подтверждено активирование флюоресценции АО при воздействии мембранотропного агента на клетки, что интерпретируется в литературе как увеличение доступности хроматина для АО в результате раннего активирования хроматина клеток (конА является митогеном для лимфоидных клеток).

Активирование было дозо-зависимым и более значимым для клеток молодых животных, что можно интерпретировать как снижение реактивности клеток с возрастом, возможно, на уровне хроматина ядер клеток.

Распределение клеток по размеру показывает, что у старых клеток повышена доля клеток средних размеров с высоким свечением АО, что коррелирует с представлениями о G_1/S блоке клеток у старых животных как недостатке регуляторных стимулов для пролиферации и напряжении активности клеток.

Глава 8.
Физиологические методы изучения старения

8.1. Виртуальные приборы для научных исследований

Виртуальные приборы (ВП) представляют собой новый класс учебного и научно-исследовательского оборудования, открывающего новые возможности для научно-исследовательских работ. ВП основаны на широком использовании возможностей современных компьютеров – генерация, регистрация и обработка внешних сигналов, и на использовании современных дешевых и высоко чувствительных датчиков. Использование для ввода и вывода сигналов звуковой карты компьютера дает возможность полностью обойти использование дорогих аналогово-цифровых преобразователей сигналов и узко специализированных программ [51].

Традиционной для обычного программирования, достаточно простой и наглядной средой программирования является известная среда «Delphi». Она представляет собой набор заготовок – «Объектов», свойства которых можно выбрать на панели слева или прямо запрограммировать в ходе выполнения программы. Среда программирования Delphi является объект-программированной средой, которая представляет собой наборы панелей заготовок-объектов, свойства которых можно выбирать на панели слева - Object inspector или вводить прямо в код программирования (рисунок 22).

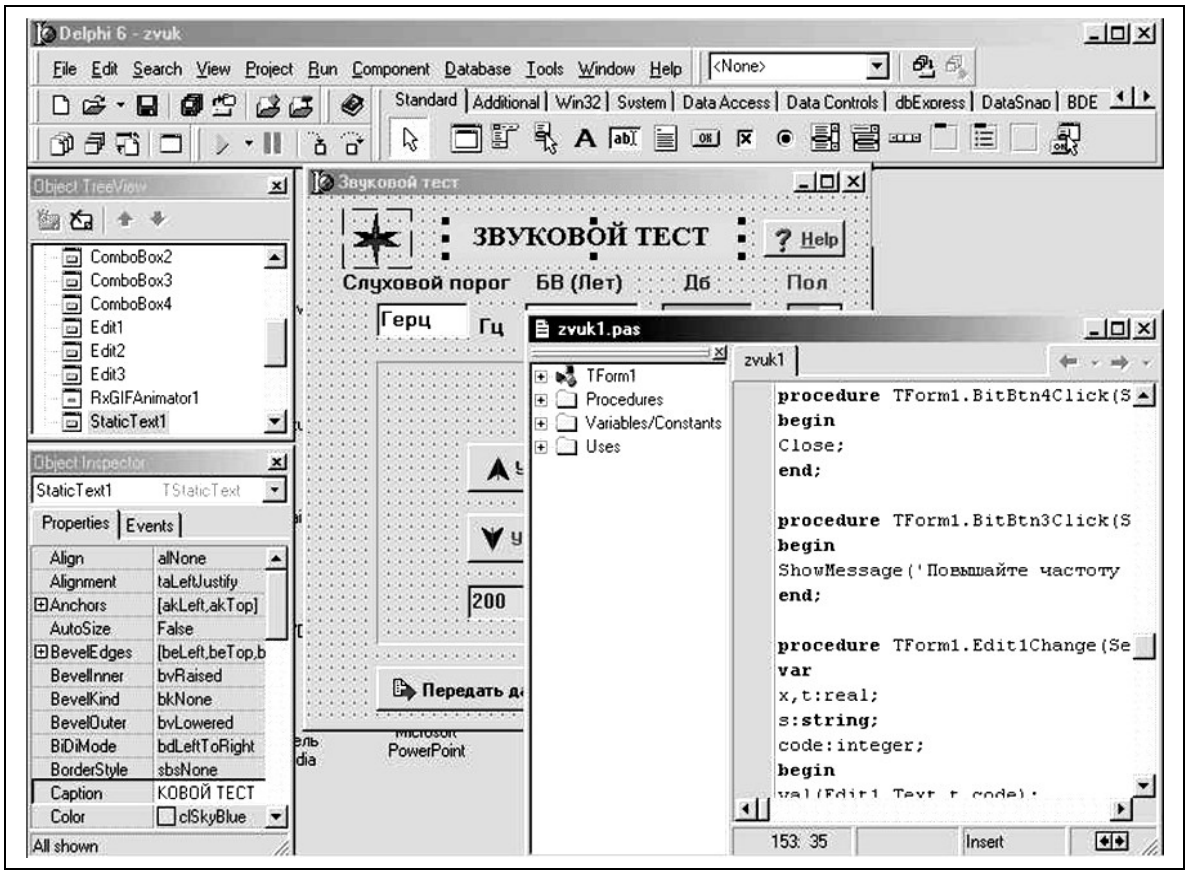
Объекты расположены вверху и собраны в ряд панелей, из которых наиболее важны: Standart, Additional, System, Dialog.

Сами объекты после щелчка по ним мыши переносятся на Лицевую панель программы, которая практически дублирует то, что можно видеть при запуске программы.

Свойства объектов представлены на страничке *Properties* панели Object inspector, а на второй страничке этой панели (*Events*) представлены наиболее частые возможности действий с объектом – самый частый – реакция на щелчок мышью (Click). Такое действие носит название Процедуры (procedure) и открывает сразу готовый трафарет, например,

такой как показано было выше для процедуры щелчка мышью на кнопке BitBtn3:

```
procedure TForm1.BitBtn3Click(Sender: TObject);
begin
end;
```



Панель свойств Лицевая панель и Панель Кодов

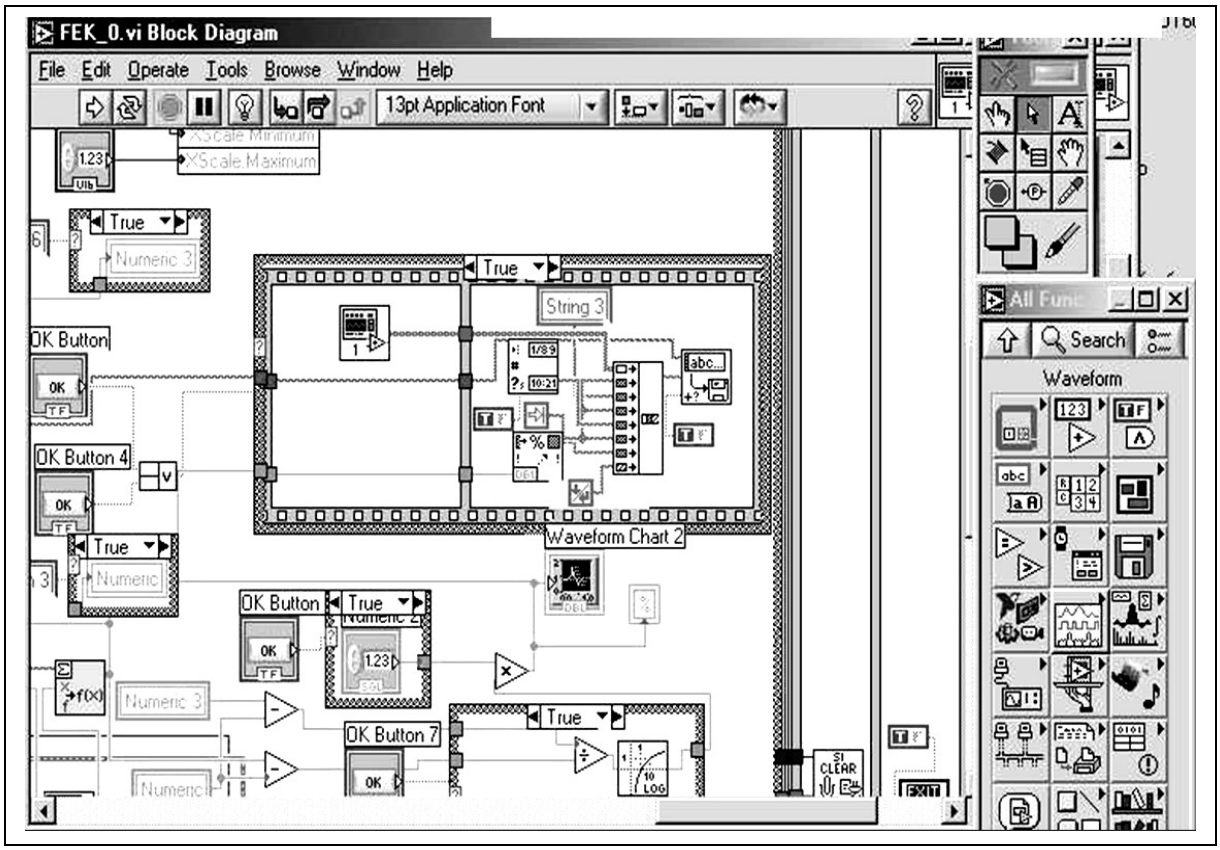
Рисунок 22. Общий вид среды программирования Delphi 6

После создания программы достаточно нажать кнопку компилирования, чтобы создать работающий program.exe файл, который можно открывать в любой программе как обычный ***.exe файл.

Основу программирования на Delphi составляет набор команд языка Pascal. Если названия объектов и их свойства могут варьировать до бесконечности (типичны набор свойств в несколько десятков для каждого объекта и уже сотни созданных самых разнообразных самих объектов), то набор команд языка Pascal достаточно ограничен.

Общепринятой программной средой для разработки ВП, однако, является специализированная программная среда **LabVIEW** (Laboratory Virtual Instruments Engineering Workbench (Среда разработки лабораторных виртуальных приборов).

Концепция LabVIEW представляет разработчику легкую в использовании графическую оболочку, включающую в себя набор готовых инструментов – ВП первого уровня, которые при прямом графическом соединении уже представляют собой готовую к использованию программу. Настройка ввода и вывода сигналов звуковой картой компьютера также представлена отдельным комплексом ВП, позволяющим легко и просто взаимодействовать со стандартным оснащением компьютера. Программа на языке LabVIEW представляет собой набор первичных ВП, соединенных между собой в порядке приема и обработки сигнала и является полным аналогом инженерных электрических и электронных схем, что позволяет как легко обучаться, так и быстро строить собственные ВП, сохраняя полную наглядность и визуальное восприятие полного прибора (рисунок 23).



Часть готовой программы Первичные ВП

Рисунок 23. Программная среда LabView

Вторым важным свойством среды LabVIEW является то, что она специально предназначена для работы с внешними источниками сигналов (а также дает возможность формировать различные сигналы). Имеется огромное разнообразие первичных ВП, позволяющих создавать, принимать, обрабатывать, отображать разнообразные сигналы и совершать ряд вспомогательных действий и оформлять в удобном виде лицевую панель.

Соединенные между собой ВП представляют уже готовую работающую программу, которую можно запускать белой стрелкой вверху окна программирования. Первичные ВП сами представляют из себя уже довольно сложные программы, структуру которых можно увидеть (и изменить!) щелкнув по ней левой клавишей мыши.

Щелчок правой клавишей мыши по ВП позволяет открыть список свойств данного ВП, что дает возможность тонко настраивать ВП в соответствии с необходимостью (или оставить все как есть).

Перенесенные на Лицевую панель ВП при подведении к ним курсора мыши, показывают порталы связи – окрашенные в разный цвет отростки, через которые их можно соединить с другими ВП. Как правило, щелкнув по порталу правой клавишей мыши, можно вызвать список других ВП, которые могут быть созданы и сразу же соединены с данным ВП.

Первичные ВП и средства управления ими сведены в 3 Палитры.

Палитра инструментов – Tools, содержит: стрелку и руку – инструмент выбора и перемещения объектов; «А» – текстовой маркер для введения надписей; пипетку – для изменения цвета ВП; катушку – главный инструмент программирования – соединения ВП друг с другом, и некоторые другие не столь часто употребляемые.

Палитра управления – Controls, позволяет устанавливать на Лицевой панели индикаторы, тумблеры, переключатели и прочие средства управления и индикации (числовой и графической).

Палитра функций содержит большое число самых различных функций для генерации и обработки сигналов, математические функции, функции работы с файлами и пр.

Главные наборы ВП палитры управления – Controls:

Набор Numeric – средства управления и индикаторы (ввод и вывод чисел);

Набор String – то же для строковых данных;

Набор Boolean – булевы значения (true, false, сравнение величин);

Набор Array&Claster – массивы данных и кластеры (собранные в группы проводники ВП);
Набор Path – работа с файлами (путь к файлу);
Набор List&Ring – списки как элемент управление (выбор действий из списка);
Набор Graf – главные индикаторы графического вывода данных;
Набор I/O: набор работы с файлами; и другие.

Создано огромное число первичных ВП и драйверов для различных приборов, с вводом сигналов через АЦП, Com – порт, USB – порт и с использованием звуковой платы самого компьютера. Последний вариант представляется нам наиболее важным, так как все АЦП дороги и требуют навыков для программирования, Com – порты начинают отходить, а USB еще не вошли в широкое использование для программирования работы с ними. Использование LabView для учебного процесса требует простых и дешевых возможностей, что открывается при использовании звуковой платы компьютера для ввода и вывода сигналов. Ограничение частот до 20 кГц как правило более чем достаточно для медико-биологических исследований, однако, ограничение частоты снизу – порядка 20 Гц, не позволяет вводить низкочастотные сигналы и гальванический ток, однако, последний может быть преобразован, например, используя микросхему для преобразования напряжения в частоту (ПНЧ платы).

Вводимым сигналом может быть, например, сигнал с высоко чувствительного микрофона, позволяющий выслушивать ритмы сердца – фонокардиография (ФКГ). Используются высокочувствительные микрофоны со встроенным усилением – типа «Кулон», «Шорох», «МК-3» и пр.

Работу с периферическими датчиками можно хорошо отследить на примере ВП «Пульсометр». Для регистрации пульса используется отечественный пъезодатчик ДТК-1М, специально разработанный и сертифицированный для реакции на пульсовую волну. Он обеспечивает хорошее отображение сигнала и позволяет подключать его прямо к микрофонному гнезду. Датчик нужно укрепить на запястье в области пульса под достаточно тугую повязку, регулируя положение и натяжение повязки до оптимума сигнала.

Другим примером датчика является фото-пара (ИК-излучатель – ИК-фоторезистор), например, снятая с механической компьютерной мыши.

ИК-излучатель можно запитать от батарейки, регулируя ток питания переменным резистором, а с ИК-фоторезистора снимать сигнал, подавая сигнал питания порядка 1000 Гц со звуковой платы и анализируя амплитуду этого сигнала на входе звуковой платы после прохождения сигнала питания через фоторезистор. Датчик крепится: у человека – на мочке уха, у мышей – на хвосте, возможны иные положения. Для регистрации сигналов подойдет схема, приведенная на рисунке 24.

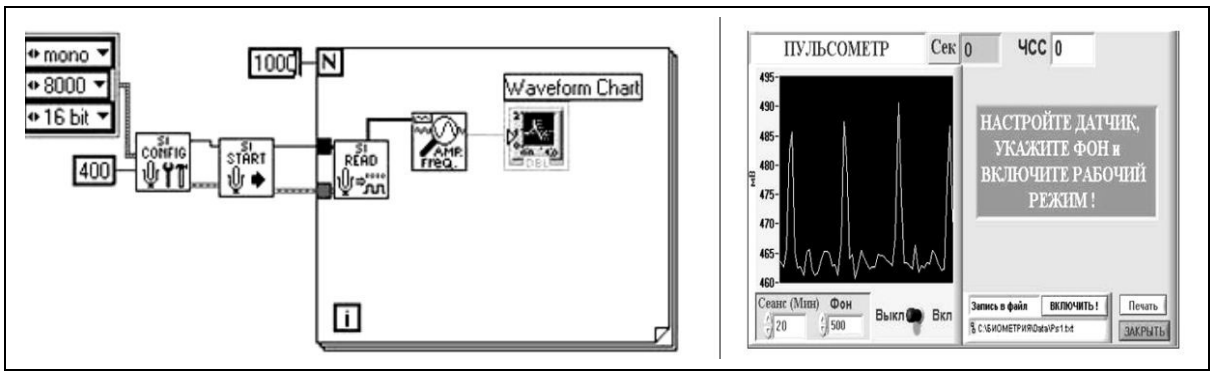


Рисунок 24. ВП «Пульсометр»
Блок-схема в минимальном варианте и Лицевая панель в полном варианте

Нами разработаны более 30 специализированных и ряд общих программа приема и обработки сигнала от самых различных биологических и иных датчиков, что позволяет использовать их в физиологических и биохимических исследования [51].

8.2. Диагностика общего состояния животных

8.2.1. Общие показатели

Общее состояние является общепринятым для оценки старения и самочувствия животных. Кроме морфологических критериев и общего вида животных (описаны в главе 4) используются показатели опрятности, подвижности, физической силы, общей реактивности.

Опрятность. *Число умываний за определенное время.*

Подвижность. *Исследуют число пересеченных квадратов за определенное время (дно клетки 30 * 20 * 10 см. размечают квадратами 5*4 см).*

Исследовательский инстинкт. *Исследуется число стоек за определенное время при пересадке в новую клетку.*

Общая активность в наших исследованиях по числу стоек и количеству пересеченных квадратов за определенное время также не различалась для молодых и старых мышей и индивидуально значительно варьировала.

Ниже приведены индивидуальные разбросы ряда показателей старения у мышей долгоживущей линии Balb/c (4 мес и 14 мес).

8.2.2. Физическая сила

Тест струны. *Общепринятый тест - время в сек. висения на струне, натянутой на высоте 80 см; через 20 мин. можно повторить как тест на восстановление работоспособности*.

Динамометрия. *Исследуется максимальная сила натяжения динамометра (точность 0,1 г) – в качестве динамометра можно использовать проградуированную гирьками линейку с пружинкой или резинкой на конце которой приделывается удобная для захвата лапками мыши сетка.*

ОВИМ – *относительный вес икроножной мышцы.* Широко распространенный тест, хорошо коррелирующий с возрастом.

Относительный вес икроножной мышцы (ОВИМ) является по данным многих авторов удобным и достаточно точным показателем мышечной силы и атрофии тканей, снижаясь с возрастом в 1,5 раза. Уравнение возрастной регрессии (Дубина, Разумович, 1995) представляет собой следующий вид:

для беспородных самок крыс: ОВИМ = 0,631-0,0071 * Возраст (мес) (36)
и для самок Вистар: ОВИМ = 0,672 – 0,0106. (37)

Хотя корреляция с возрастом для этого теста достигает r = - 0,70, индивидуальные разбросы могут перекрываться для молодых и старых животных. Для мышей этот показатель, видимо, работает хуже.

Очень информативным является **тест висения на струне** – средние различия у молодых и старых животных различаются на порядок (рисунок 25). В то же время индивидуальные различия здесь очень велики. Фактически, часть животных не желает висеть и тут же спрыгивает; видимо, нижние значения теста следует исключать его оценки. Не совсем ясно, отражает ли этот тест собственно мышечную силу животных – различия в разы массы тела молодых и старых мышей не позволяют однозначно интерпретировать этот тест.

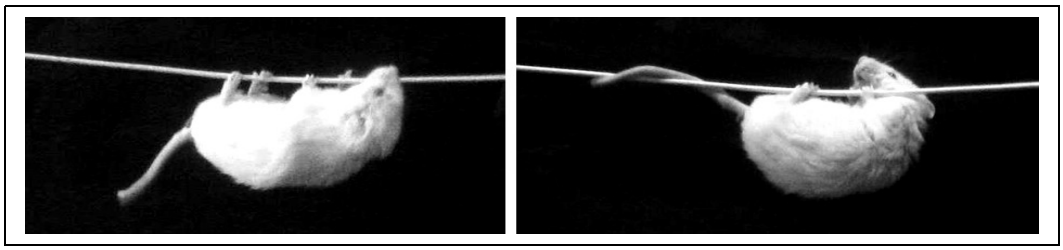


Рисунок 25. Тест струны – молодая (слева) и старая (справа) мыши

Сила животных, оцениваемая в наших исследованиях по показателям **динамометрии**, статистически значимо не менялась, при значительных вариациях.

Индекс икроножной мышцы (**ОВИМ**) – широко применяемый в экспериментальной геронтологии тест, также оказался в наших исследо-

ваниях индивидуально очень вариабельным; впрочем, корреляция его с возрастом по данным многих авторов не слишком значительна.

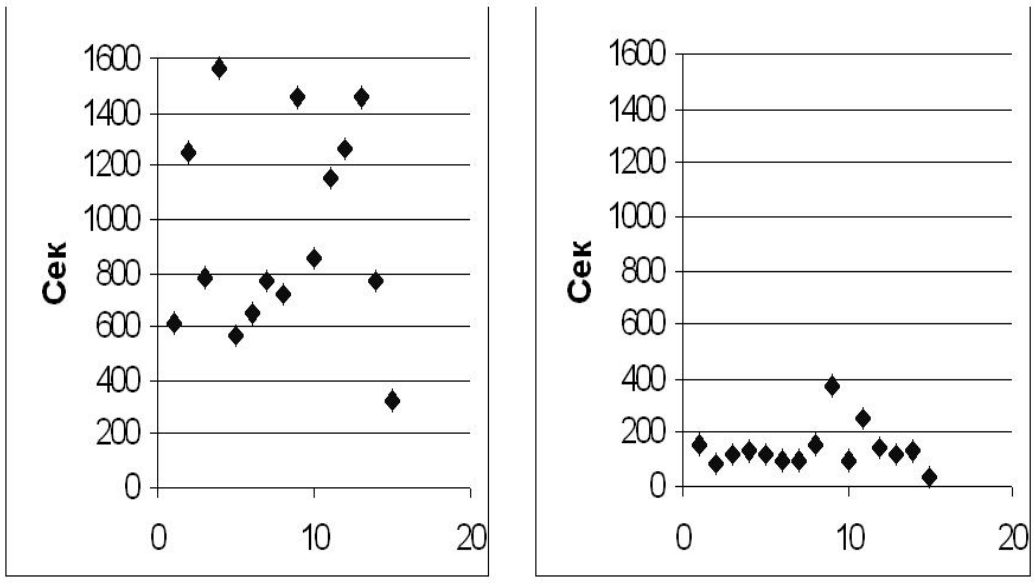


Рисунок 26. Возрастные изменения силы мышей (тест струны)
Слева молодые (3 мес), справа старые (1,5 года)

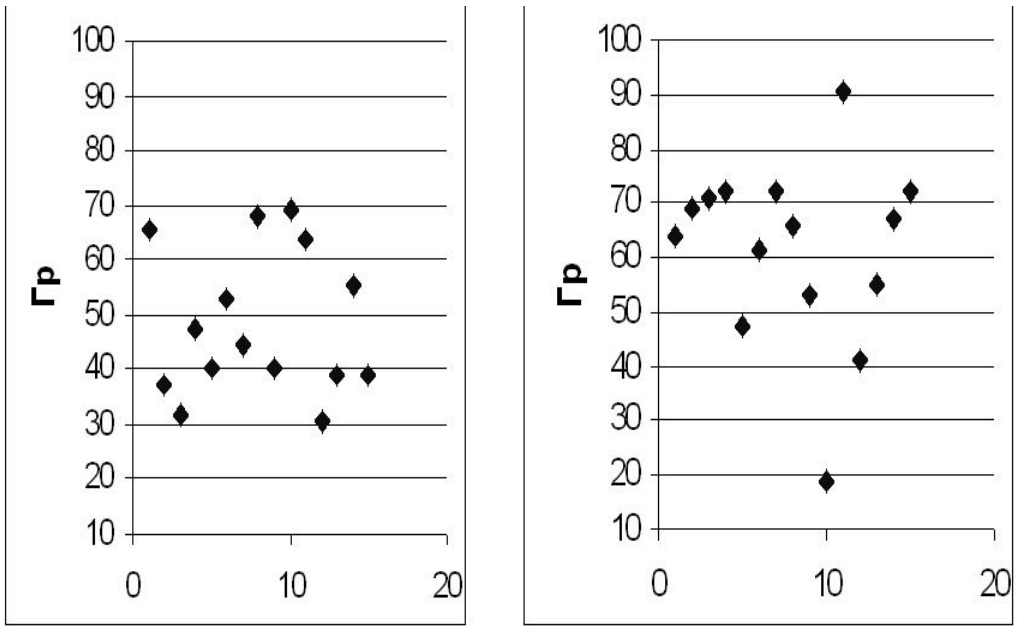


Рисунок 27. Возрастные изменения силы мышей
Слева молодые (3 мес), справа старые (1,5 года)

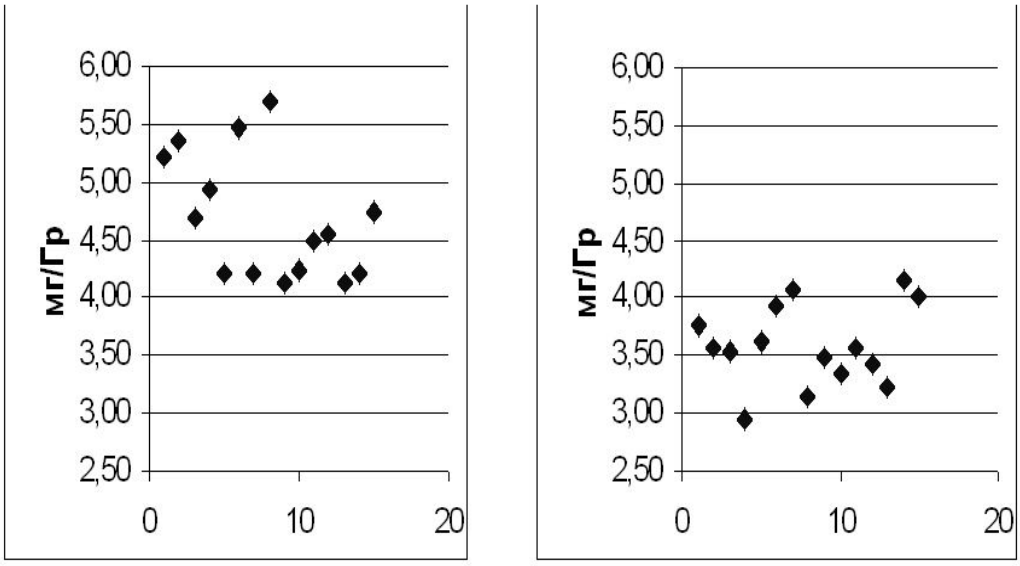


Рисунок 28. Возрастные изменения ОВИМ мышей (собственные данные) Слева молодые (3 мес), справа старые (1,5 года)

8.2.3. Морфологические показатели.

Вес внутренних органов (абсолютный и относительный к массе тела) исследуется для оценки возрастной атрофии тканей и органов. Наибольшее значение имеет индекс **ОВИМ** – относительный вес икроножной мышцы.

Относительная масса внутренних органов при наших измерениях была информативна только для органов иммуногенеза – селезенки и тимуса, причем масса тимуса выраженно снижалась и в абсолютных величинах.)

8.2.4. Общая реактивность.

Обмен веществ, оцениваемый по температуре тела, в наших исследованиях показал снижение температуры с возрастом, однако, имели место значительные индивидуальные вариации, видимо, ввиду того, что местная температура у самок может значительно зависеть от эстрального цикла и для данного возраста неравномерного вхождения в (пре)климактерический

период. Обмен веществ, оцениваемый по потреблению кислорода, значительно варьировал, что связано с индивидуальной подвижностью животных и их психическим состоянием, которые не поддаются нормировке.

Уровень потребления кислорода. Известно, что с возрастом потребление кислорода снижается в результате снижения основного обмена, атрофии паренхимы.

Потребление кислорода оценивают обычно порядка:

белые мыши: 3,91±0,12 Л/кг*час (38)

крысы: 1,29±0,01 Л/кг*час. (39)

Выделение углекислого газа белыми мышами оценивают порядка (по Трахтенберг и др., 1978):

4,24±,08 Л/кг*час (40)

Интенсивность тканевого дыхания у крыс составляет (в мкЛ/мг ткани * час):

для печени – 2,04±0,11 (41)

для почек – 6,00±0,19 (42)

для мозга – 3,42±0,16 (43)

для сердца – 2,05±0,13 (44)

для легких – 1,54±0,12 (45)

для мышц – 1,16±0,12 (46)

для селезенки – 2,01±0,18 (47)

Манометрические методы основаны на уменьшении объема (или давления) в замкнутом пространстве при дыхании и требуют коррекции – поглощения углекислоты. Возможно и прямое исследование *кислородными датчиками*, дающее зачастую более высокие значения.

Мы использовали *гальванический кислородный датчик* Е-25 для регистрации потребления кислорода у молодых и старых мышей, однако, этот тест оказался весьма лабильным индивидуальным показателем, связанным в первую очередь с подвижностью животных.

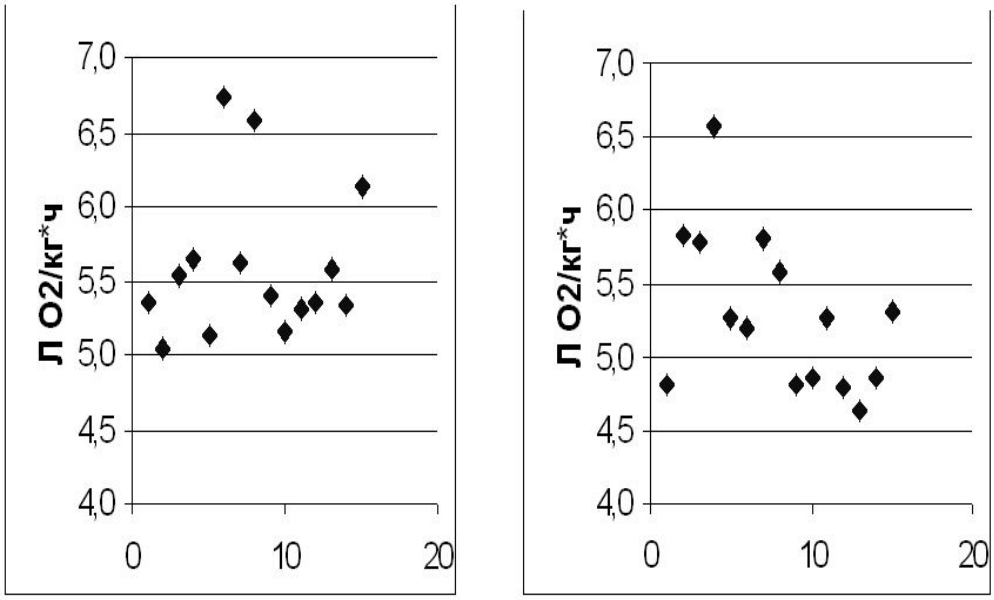


Рисунок 29. Возрастные изменения потребления O_2 мышей
Слева молодые (3 мес), справа старые (1,5 года)

Температура тела отражает интенсивность общего обмена, и с возрастом у мышей она снижается на 1,5-2°С и более. Температуру тела оценивают в прямой кишке у мышей медицинской термопарой или градусником, терморезистором и пр. на глубине 1 см глубиной (с точностью не менее 0,1°С).

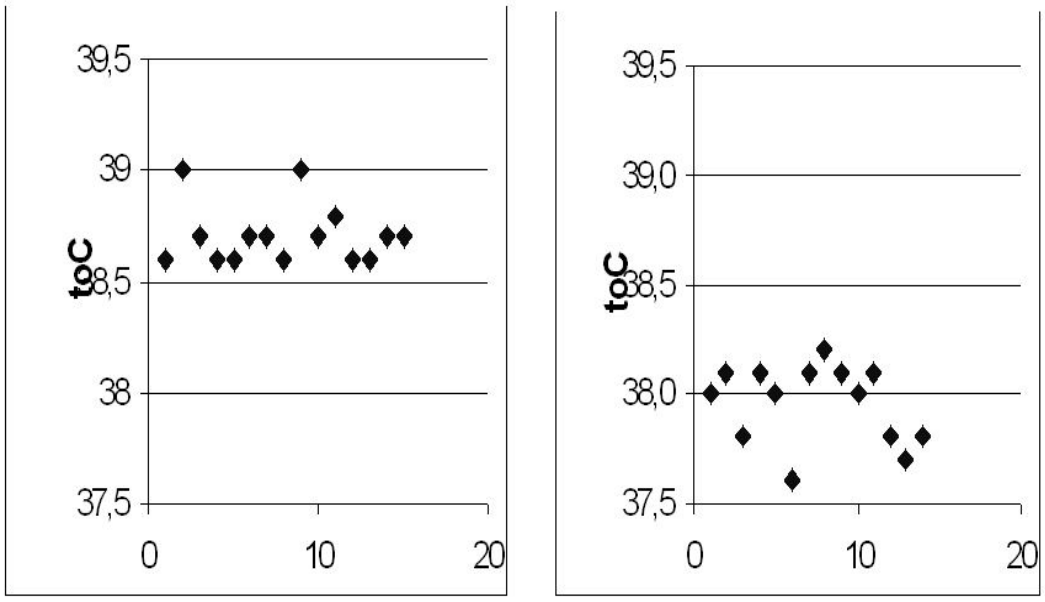


Рисунок 30. Возрастные изменения температуры мышей
Слева молодые (3 мес), справа старые (1,5 года)

Осмотическая резистентность эритроцитов.

Этот показатель многие относят к разряду общих, отражающих общее состояние организма. Используются различные варианты гемолиза – дистиллированной водой, гипотонический солевой раствор, гемолиз уксусной кислотой, гемолиз мочевиной.

Гемолиз мочевиной. *Трижды отмытые эритроциты в физиологическом растворе с 10% фосфатного буфера pH 7,4, смешивают с понижающимися разведениями 0,3 М мочевины или со стандартной гипотонической смесью: 0,05 мл эритроцитов, 2 мл физиологического раствора и 4 мл 0,3 М мочевины через 10 мин центрифугируют и колориметрируют гемолизированный надосадок при 540 нм. Данные выражают в процентах против 100% гемолиза эритроцитов в 0,3 М мочевине.*

Данные по возрастному гемолизу противоречивы, не ясно даже происходит ли повышение или понижение реакции. В наших исследованиях различий у молодых и старых животных выявить не удалось.

Устойчивость к гипоксии.

Выживаемость старых крыс при пониженном давлении резко снижается: «потолок» новорожденных крыс соответствует давлению, аналогичному пребыванию на высоте 13000 м. в течение 1 часа, у старых – на высоте 8000 м. Устойчивость к гипоксии исследуют при пониженном давлении (соответствующим 27 мм рт. ст. содержания кислорода), по времени: до потери позы (обычно 45 сек), до остановки дыхания (обычно 100 сек), и по времени восстановления.

8.2.5. Ростовой потенциал тканей.

Снижение скорости роста и самообновления – типичное проявление старения, оценка которого является важным методом изучения старения. Кроме исследования митотического индекса и включения радиометки (обычно ^{3}Н-тимидина в ДНК) используют также индуцированный синтез ДНК, репаративную гиперплазию и фармакологически индуцированную

гиперплазию (и гипертрофию) тканей. С возрастом увеличиваются время начала и максимума достижения митозов, конечная масса регенерации органа и др. показатели. Такие тонкие тесты, как скорость движения пульсовой радиоактивной метки, отражающие скорость самообновления ткани, показывают, например, что скорость самообновления печени снижается с возрастом в сотни раз.

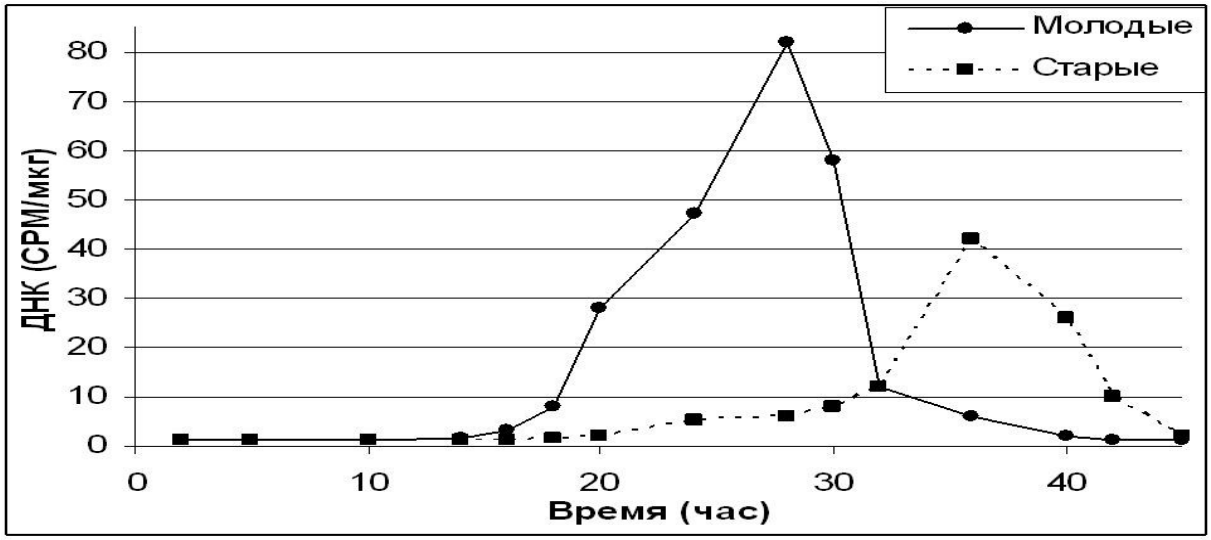


Рисунок 31. Изопротерено-индуцирования гиперплазия слюнных желез у молодых и старых мышей, оцениваемая по включению ^{3}H-тимидина (по Adelman, 1971)

По вертикали – радиоактивность ДНК (импульсы в мин на 1 мкг)

По горизонтали – время после введения изопротеренола (часы)

Нами использовался тест Селье – феномен гиперплазии ткани слюнных желез при введении симпатомиметиков (бэта-адреномиметика изопротеренола).

У старых животных зачастую гиперплазия отсутствовала, как и наблюдаемая параллельно бластная реакция активации лимфоцитов региональных лимфоузлов и селезенки. Как отмечалось выше, это указывает на снижение лимфоидного обеспечения ростовых функций соматических тканей в рамках развиваемой нами иммунной теории старения.

В литературе показано, что реакция слюнных желез на изопротеренол имеет характер истинной гиперплазии, что доказывается радиоактивной меткой (рисунок 31).

Нами использовался тест Селье – феномен гиперплазии ткани слюнных желез при введении симпатомиметиков (бэта-адреномиметика изопротеренола).

У старых животных зачастую гиперплазия отсутствовала, как и наблюдаемая параллельно бластная реакция активации лимфоцитов региональных лимфоузлов и селезенки. Как отмечалось выше, это указывает на снижение лимфоидного обеспечения ростовых функций соматических тканей в рамках развиваемой нами иммунной теории старения.

В литературе показано, что реакция слюнных желез на изопротеренол имеет характер истинной гиперплазии, что доказывается радиоактивной меткой (рисунок 31).

Обычным явлением у старых животных и человека является остеопороз. Оценка его у мышей, однако, является отдельной задачей.

8.2.6. Методы оценки возрастного остеопороза

Несмотря на интенсивные исследования и широко применяемую терапию и профилактику, патогенез возрастного остеопороза (ОП) остается мало понятным. Крайне необходимым является разработка адекватной модели возрастного ОП в эксперименте.

Важнейшим в увеличении ломкости кости с возрастом являются 2 фактора: степень минерализации кости и ее архитектоника, в очень большой мере влияющая на ее ломкость. В настоящее время для ранней диагностики ОП используются различные методы костной денситометрии, позволяющие выявить уже 2–5% потери массы кости. Прочность кости высоко коррелирует с костной массой.

Оценку структуры осуществляют при помощи костной гистоморфометрии и новых методов количественных измерений микроархитектоники губчатой кости и трабекулярной сцепленности; эти методы включают подсчет и измерение толщины трабекул и их сепарации, анализ элементов трабекул, измерение звездчатых объемов костного мозга и трабекул. Имеются различные экспериментальные модели ОП [29], главные –

генетические [210, 260, 292], путем овариэктомии, используя иммобилизацию, при иммуноэктомии [26, 43, 131, 215]; представления о возрастном иммунодефиците как причине возрастной дистрофии тканей, в том числе костной и о прямом влиянии лимфоцитов на регенерацию тканей, но все они имеют различные недостатки – прежде всего, это частный механизм развития ОП, связанный с самой моделью.

Наиболее адекватной моделью представляется естественно развивающийся ОП с оценкой степени минерализации кости и степени ломкости, так как наибольшее клиническое значение имеет именно повышение ломкости кости с возрастом, ведущее к переломам.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ РАСЧЕТЫ ПОКАЗАТЕЛЯ ПРОЧНОСТИ КОСТИ

Нами [144] проведен анализ прочности костной ткани с точки зрения теории сопротивления материалов [19]. Прочность кости определяется ее упругостью и пределом прочности. Упругость определяет изгиб f образца под действием внешней силы по закону Гука. Предел прочности – это наибольшее напряжение σ max, которое может выдержать материал без разрушения, определяется критической силой P, при которой происходит разрушение. По закону Гука σ max = f E, где E - модуль упругости, который характеризует жесткость кости и зависит от ее формы, размеров, строения и структуры материала, т.е. он в общем случае не постоянен по объему.

Наибольшее напряжение образца, отвечающее предельной силе P, называется теоретической прочностью, которая приблизительно равна 0,1 E. Практически прочность существенно зависит от строения материала. Таким образом, можно считать, что прочность кости на излом под действием силы P определяется величиной f E, или σ max . Решение задачи о нахождении зависимости σ max от силы P для образца кости связано со сложностью постановки самой задачи.

В теории сопротивления материалов задачи решаются обычно для образцов правильной геометрической формы, однородных по объему, принимая постоянным модуль Юнга E, не учитывается наличие элементов жесткости по объему (как имеет место в реальности для кости) и ряд других упрощений, позволяющих точно или приближенно решить задачу.

Наша задача состояла в нахождении решения в первом приближении для оценки параметров, определяющих прочность кости, а именно макси-

мальное напряжение σmax, возникающее под действием предельной силы P, при которой происходит разрушение кости (перелом).

Было принято, что образец кости – сплошной цилиндр длиной L круглого сечения диаметром D или труба кольцевого сечения с внутренним диаметром d (трубчатая кость), модуль Юнга и плотность материала постоянны по объему. Образец располагается на двух опорах на расстоянии L и посередине на него действует сила P. Для хрупких материалов прогиб образца не учитывается.

Расчет на прочность проводится по наибольшим нормальным напряжениям σ max, возникающим в среднем сечении образца. Условие прочности имеет вид: $\sigma max \leq [\sigma]$, где $[\sigma]$ – допустимое напряжение, [Па]. Для данной задачи $[\sigma]= \sigma max$. В среднем сечении под действием силы P возникает наибольший изгибающий момент M max. Для этого сечения условие прочности определяется выражением $\sigma max = M\ max / W$, где W – момент сопротивления сечения – геометрическая характеристика прочности образца, работающего на изгиб, размерность – [$м^3$]. Расчетные зависимости для M max и W имеют вид: $M\ max = 3\ P\ L / 16$, $W = \pi\ D^3\ (1 - c^4) / 32 = 0{,}1\ D^3\ (1-c^4)$, где c = d/D, для сплошного цилиндра c=0. Подставляя выражения, получаем формулы прочности: $\sigma\ max = 3\ P\ L / 1{,}6\ D^3\ (1-c^4)$, для кольцевого сечения $\sigma\ max = 1{,}87\ P\ L / D^3\ (1-c^4)$, для сплошного цилиндра $\sigma\ max = 1{,}87\ P\ L / D^3$.

Данное решение позволяет оценить параметры, от которых зависит прочность образца кости. Используя формулу, мы можем определить прочность кости у животных в остром опыте по диаметру кости и силе перелома (при постоянном плече перелома). Допущением является одинаковое соотношение d / D для мышей разного возраста, что дает постоянный коэффициент $k=1-c^4$, который можно не учитывать в расчетах. Таким образом, окончательной формулой для оценки прочности кости будет формула, в которой можно опустить численный коэффициент и L, так как при методике определения перелома кости L является постоянной экспериментальной величиной; назовем это значение прочностью – S:

$$S = P / D^3 \qquad (48)$$

Альтернативными единицами могут служить: относительная масса кости к массе тела и отношение критической силы «P» к массе тела, а также относительное содержания кальция к массе кости, отражающее степень минерализации кости.

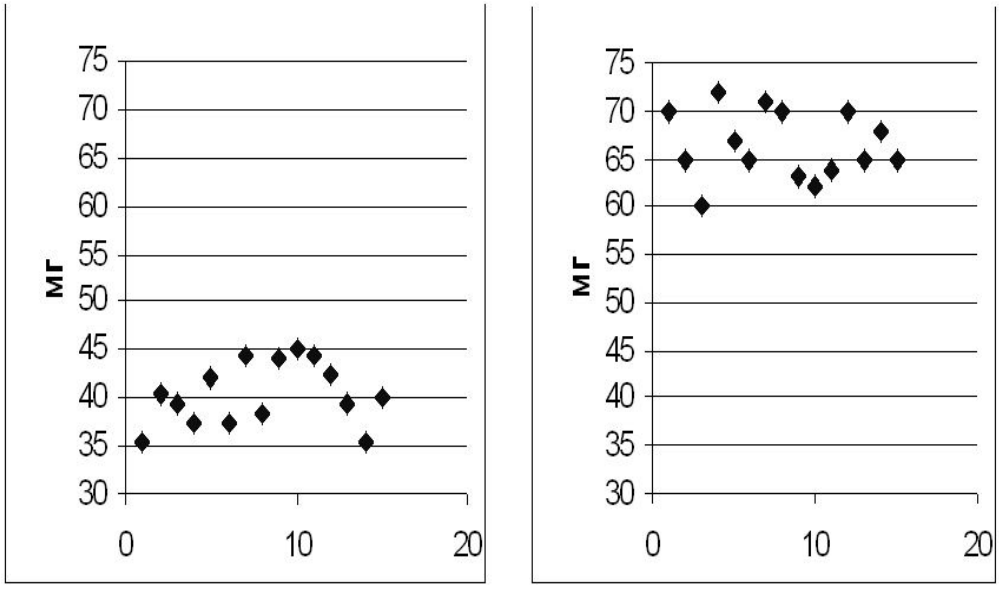


Рисунок 32. Возрастные влажной массы бедренной кости
Слева молодые (3 мес), справа старые (1,5 года)

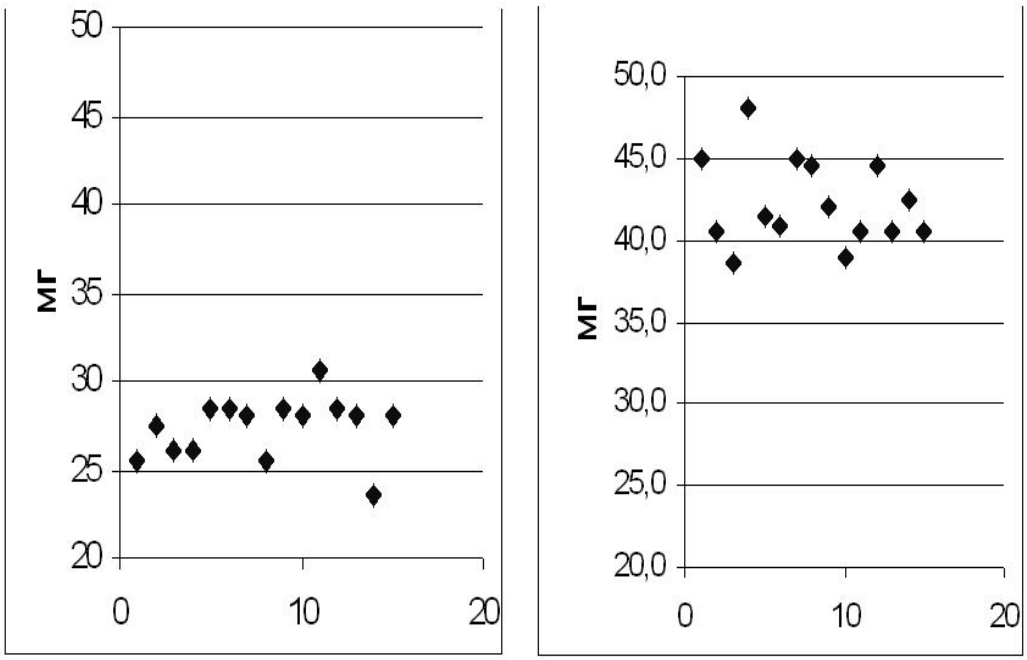


Рисунок 33. Возрастные сухой массы бедренной кости
Слева молодые (3 мес), справа старые (1,5 года)

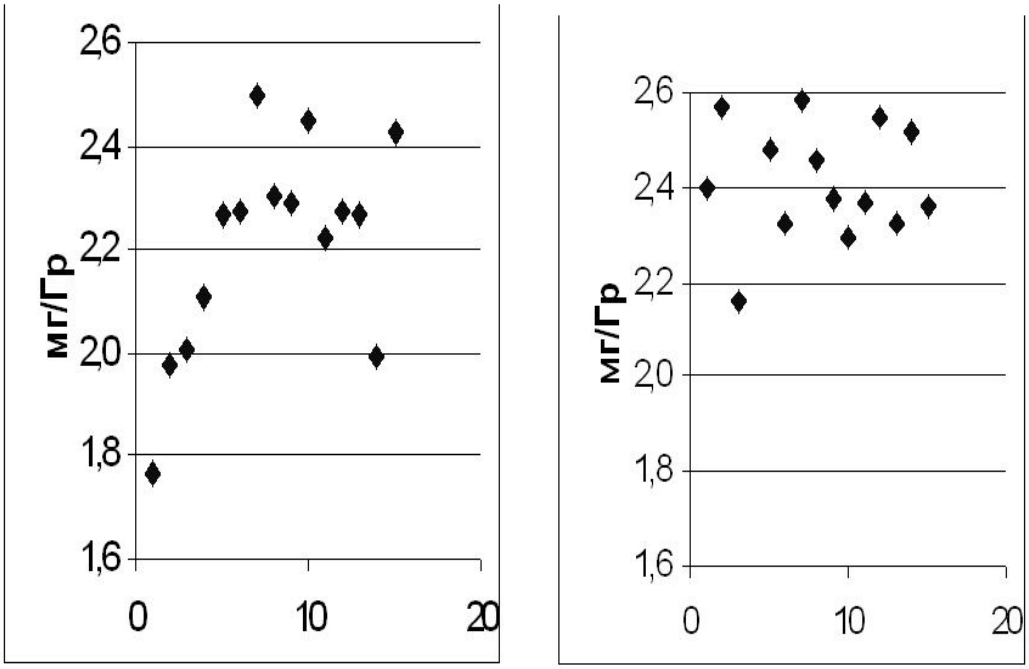


Рисунок 34. Возрастные изменения относительной влажной массы бедренной кости. Слева молодые (3 мес), справа старые (1,5 года)

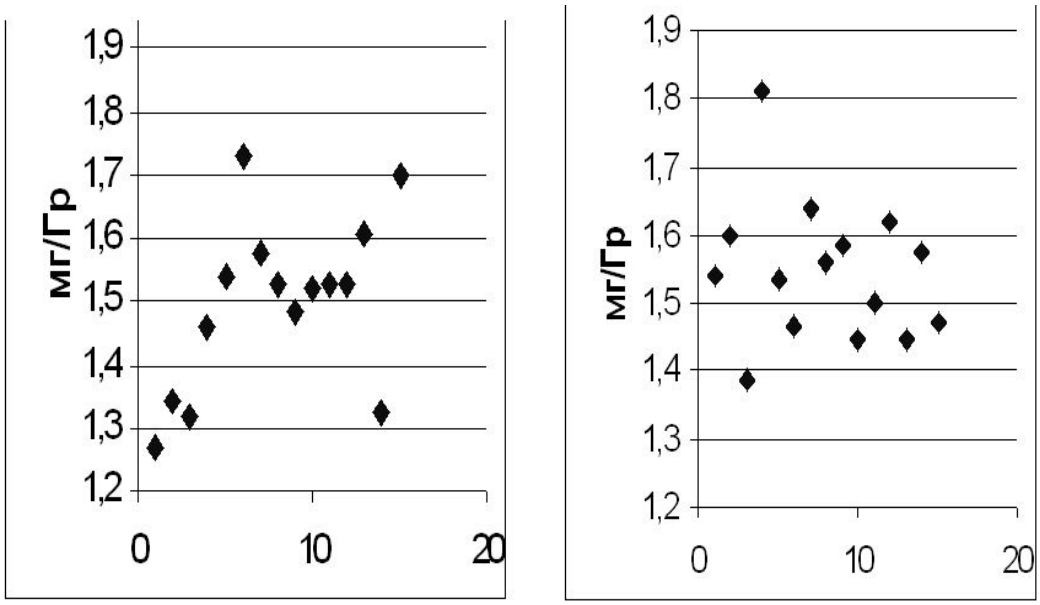


Рисунок 35. Возрастные изменения относительной сухой массы бедренной кости. Слева молодые (3 мес), справа старые (1,5 года)

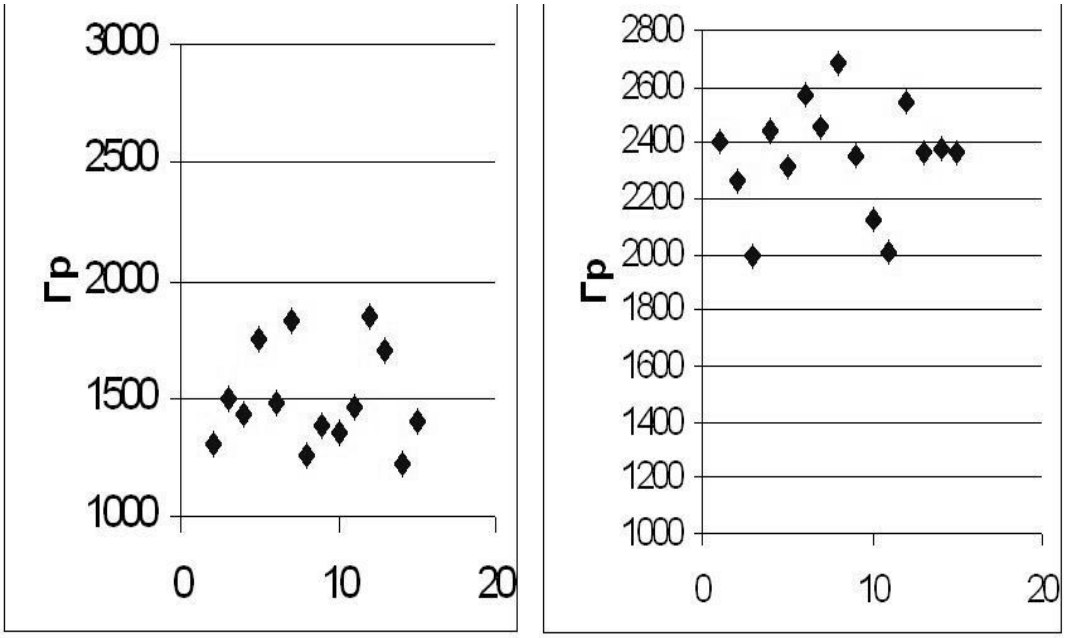


Рисунок 36. Возростные изменения ломкости бедренной кости
Слева молодые (3 мес), справа старые (1,5 года)

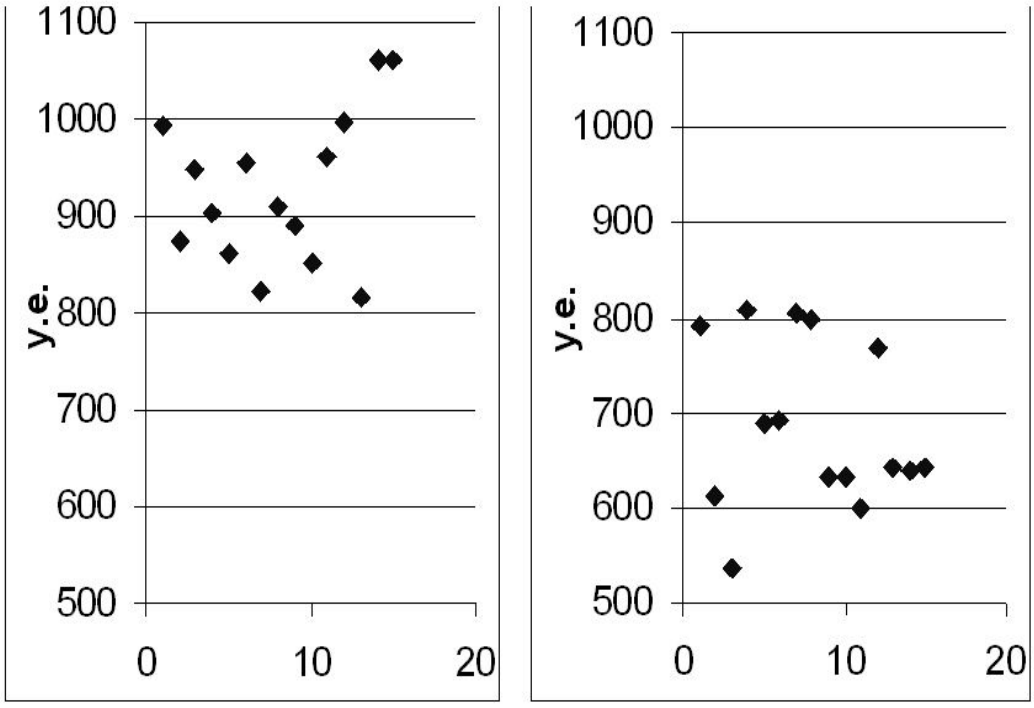


Рисунок 37. Возрастные изменения **прочности** кости (Сила/Куб диаметра кости). Слева молодые (3 мес), справа старые (1,5 года).

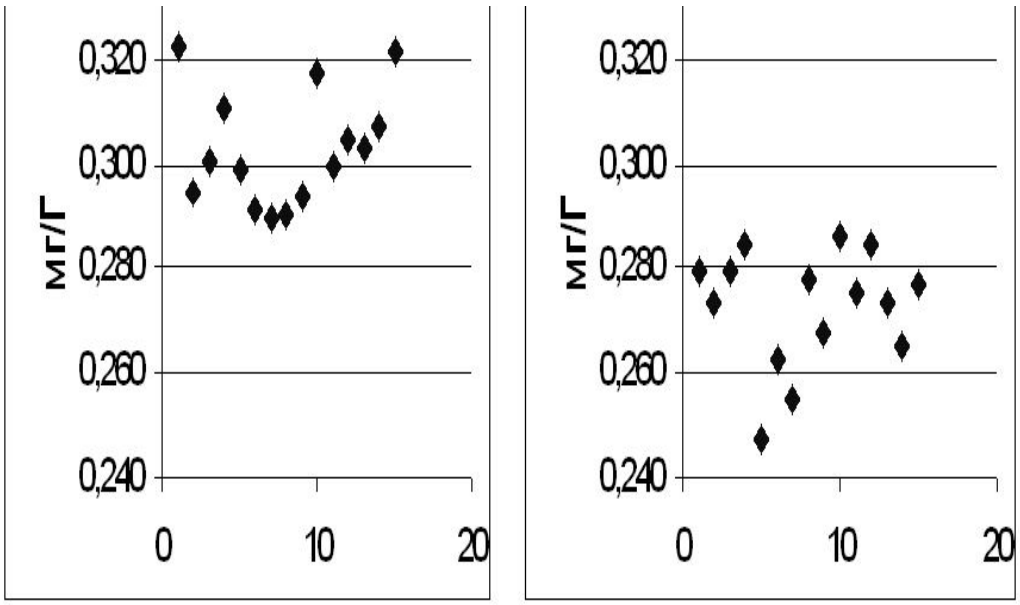


Рисунок 38. Возрастные минерализации кости (Ca^{2+} мг/гр массы тела)
Слева молодые (3 мес), справа старые (1,5 года)

Сравнение костной ткани старых и молодых мышей дает значимые отличия для относительного содержания кальция на массу сухой кости и прочности кости – отношения силы ломки кости к кубу диаметра кости.

Ломкость кости в поперечном направлении удобно оценивать, выделив бедренную кость и приложив поперечно (с упорами на концах кости, с фиксированным расстоянием) силу, натягивая цифровой безмен (например, типа НЕ-107, с точностью 5-10 г в диапазоне 0-7,5 кг.

Для исследования содержания кальция в кости удобно экстрагировать кальций из кости соляной кислотой и определить его концентрацию в известной навеске кости арсеназным методом.

МЕТОД

Мы взвешивали высушенную на воздухе бедренную кость с точностью до 0,5 мг и помещали ее в 3 мл 1 М HCl на 24 часа. Разводили 0,1 мл экстракта в 5 мл 0,15 М фосфатного буфера pH 6,0; затем 0,1 мл разведенного экстракта добавляли к 2 мл буфера и 0,15 мл ***Арсеназо III*** *(500 мкМ раствор); через 5 мин исследовали поглощении света при длине волны 656 нм. Для количественного вычисления использовали стандартную кривую известного количества кальция.*

8.2.7. Старение соединительной ткани

Возрастные изменения соединительной ткани являются наиболее часто определяемыми как маркеры возрастных изменений, обычно у крыс. С возрастом увеличивается количество межмолекулярных связей коллагена и он становится более грубым, менее растворимым и более прочным.

Используют обычно следующие **методы**:

- флюоресценция коллагена при 405 нм (повышается) и 305 нм (снижается, по La Bella, Paul, 1965);

- снижается (по Verzar, 1964) растворимость (по содержанию оксипролина) при 60оС в физиологическом растворе коллагена кожи и сухожилий крыс (от 90% в 2 мес до 28% в 25 мес для сухожилий) и в H_2SO_4;

- повышается (по Everett et al., 1968) время разрыва волокон хвостового сухожилия в 7 М растворе мочевины под нагрузкой 2 г. (от 20 мин у 200-дневных крыс до 500 мин у 1200 дневных животных) – логарифм линейной функцией возраста, снижается (по Hamlin, Kohn, 1971);

- перевариваемость коллагена коллагеназой – лоагарифм полупереваривания линейно пропорционален возрасту,

- увеличение времени термического сокращения (со 130 сек в 4 мес до 420 сек в 28 мес).

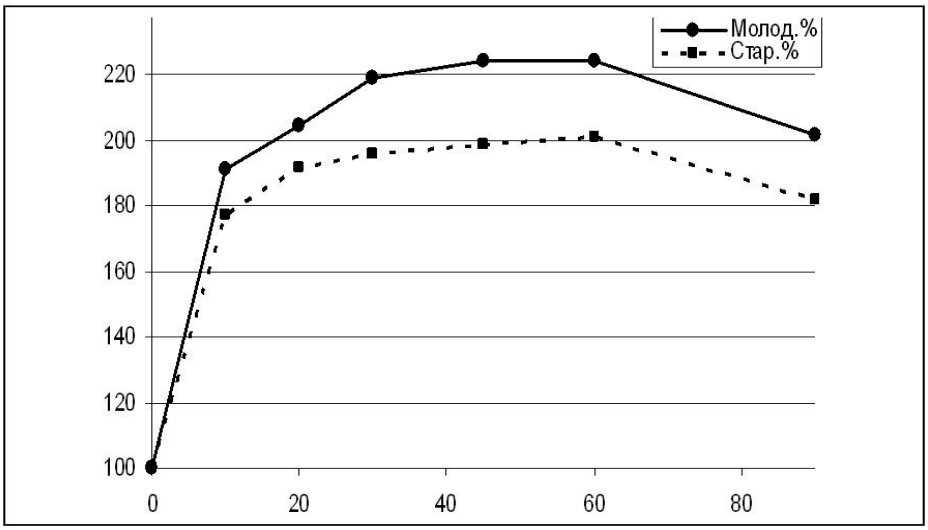


Рисунок 39. Набухание сухожилий хвоста молодых и старых мышей в 82% серной кислоте (собственные данные).
По вертикали – масса в % к исходной,
по горизонтали – время инкубации (мин).

Набухание **сухожилий** хвоста в серной кислоте значимо снижалось с возрастом, что свидетельствует о снижении растворимости и гидрофильности соединительной ткани, также типичный признак старения. Однако, тест выраженно зависит от времени экспозиции, концентрации кислоты и др. условий.

Изменения **сорбционной** способности тканей к красителю нам достоверно обнаружить не удалось.

Описывают изменение с возрастом растворимости коллагена хвоста крыс, при регистрации по окси-пролину. Последний можно регистрировать, например, по реакции с нингидрином [150]. *При этом 0,5 мл 0,2% нингидрина в ацетоне инкубируют с 2,5 мл аминокислотного гидролизата-экстракта в течение 5-15 мин при 100°С и регистрируют спектрофотометрически поглощение светло-желтого раствора о-про 440 нм (остальные аминокислоты дают сине-фиолетовое окрашивание, с максимумом поглощения при 575 нм).*

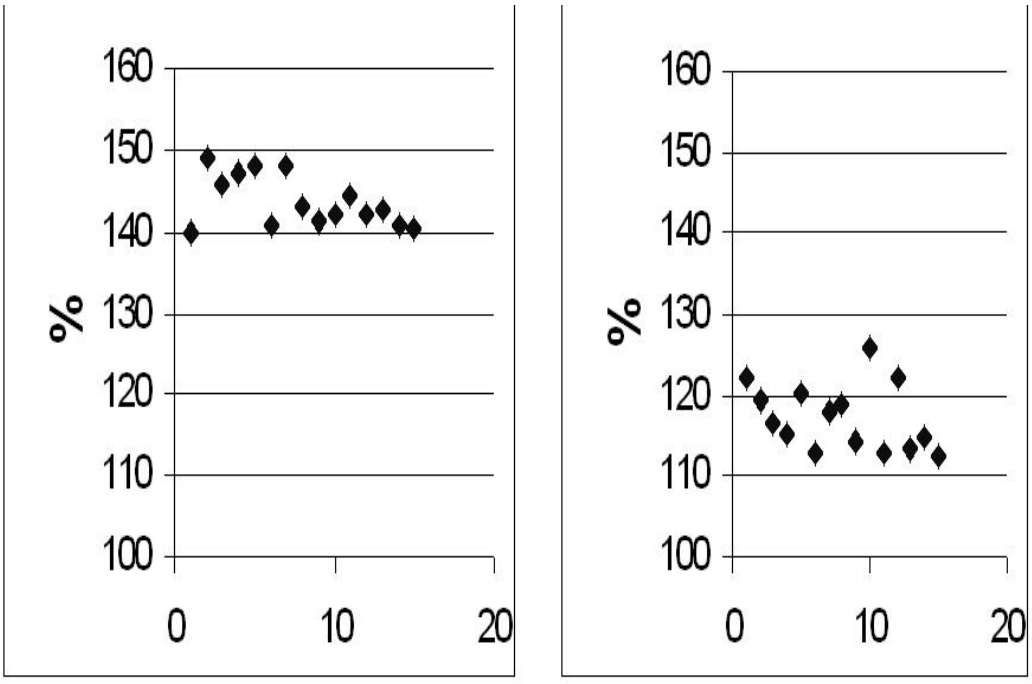


Рисунок 40. Возрастные изменения набухания коллагена хвоста мышей в серной кислоте. Слева молодые (3 мес), справа старые (1,5 года)

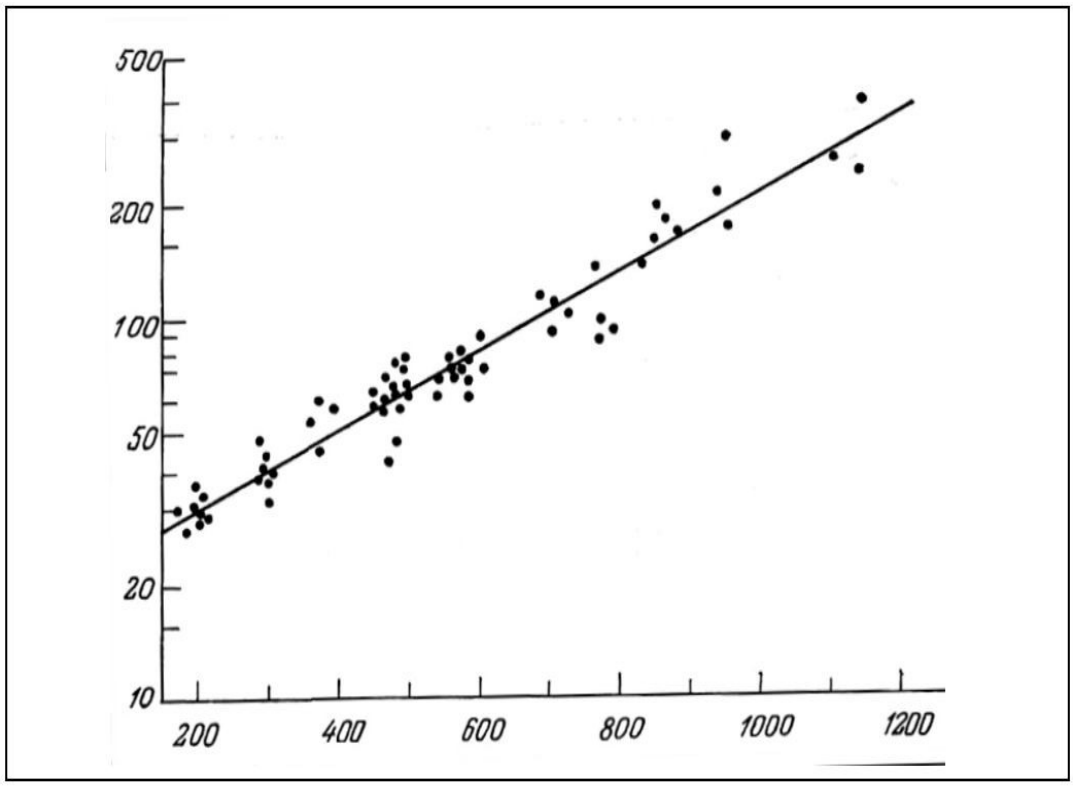


Рисунок 41. Увеличение с возрастом времени разрыва коллагена хвоста крысы в 7 М мочевине (по Everitt et al., 1968).
По вертикали – время разрыва (мин, логарифм),
по горизонтали – возраст (суток)

Наиболее выражено, видимо, происходит увеличение с возрастом времени разрыва коллагена хвоста крысы в 7 М мочевине (по Everitt et al., 1968), что отражено на рисунке 41.

Параллельно со снижением активности соединительной ткани и затуханием метаболизма паренхиматозной ткани происходит снижение содержания внутриклеточной воды и нарастание процессов минерализации, прежде всего кальцификации. Кальцификация наблюдается и для мягких тканей, но в наибольшей степени, видимо, это характерно для артерий, особенно аорты, для крыс и мышей эти изменения имеют меньший характер.

8.2.8. Содержание воды в организме

Содержание воды в тканях отражает уровень метаболизма, с максимумом в детском возрасте. Для человека общее количество воды снижается с возрастом – от 52-63% в 9 лет, до 42-53% в 60-80 лет; видны выраженные индивидуальные различия. Внеклеточная вода при этом может даже нарастать (возрастные отеки), тогда как внутриклеточная закономерно снижается – со 190 мл/кг в 20-40 лет до 135 мл/кг для 80 лет (данные для женщин).

В настоящее время для определения внеклеточной и внутриклеточной воды в организме имеются точные и быстрые неинвазивные методы на основе проводимости тканей токов различной частоты. Токи порядка 5 кГц проходят практически только по внеклеточному руслу, токи порядка 50 кГц и выше способны проходить также и через клеточные мембраны.

Важное значение имеет **связанная вода** в тканях, так как она прямо отражает уровень биологической активности тканей. Предложен простой метод исследования связанной воды в тканях (Окунцова, Маринчик, 1964), используя растворы сахарозы разной концентрации.

Навески тканей погружают в раствор сахарозы. Через 3 часа при помощи рефрактометра АББЕ определяли показатель преломления раствора и рассчитывали количество связанной воды. Разность между водой перешедшей в 42 % и в 25 % раствор сахарозы представляет собой фракцию связанной воды.

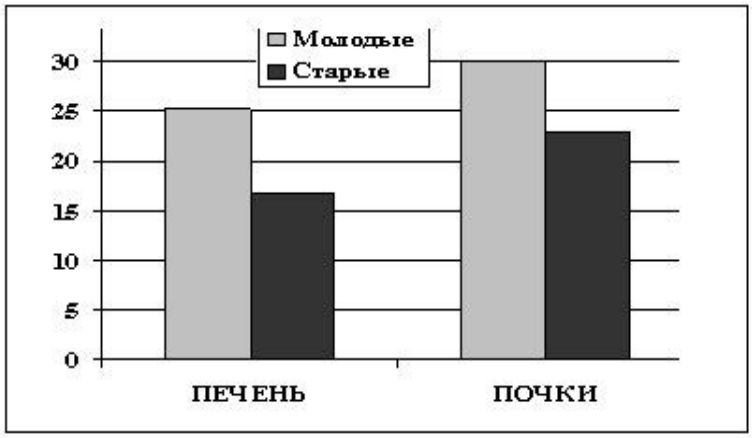


Рисунок 42. Потеря массы ткани в 42% сахарозе
По вертикали – потеря массы (%)

Исследования О.И.Галавиной (2006) показали снижение с возрастом содержания связанной воды во всех исследованных тканях, что по ее мнению может свидетельствовать как об уменьшении количества биоструктуры («живой структуры» организма), так и о снижении состояния неравновесия биоструктуры при старении; т.е. отмечается увеличение энтропии, что является фундаментальной причиной старения. Необратимое изменение биоструктуры в онтогенезе вызывает широкий спектр адаптивных изменений; такими изменениями возможно является происходящее в онтогенезе увеличение термостабильности хроматина и коллагена.

Нами исследовалась потеря массы навески ткани печени и почек у мышей BALB/c в 42% сахарозе через 2 часа инкубации (рисунок 42), для старых (6 мес) мышей потеря воды существенно меньше, чем у молодых (3 мес).

8.2.9. Старение иммунной системы

Показана несомненная связь функций иммунной системы с процессом старения: прогрессирующая атрофия тимуса и всей лимфоидной ткани с возрастом, снижение предстоящей продолжительности жизни при снижении количества циркулирующих Т-лимфоцитов, сходство старческих изменений и процессов, наблюдаемых при ранней тимэктомии и иммунодефицитах иной природы, иммунологические расстройства и нарушения экспрессии антигенов гистосовместимости при прогериях и пр.

Возрастные изменения отмечаются для всех функций системы иммунитета, особенно для Т-системы иммунитета: атрофия тимуса, селезенки и лимфоузлов, снижение числа периферических Т-клеток, увеличение числа незрелых лимфоцитов вследствие задержки их дифференцировки, снижение числа предшественников Т-клеток и выраженное снижение продукции тимических гормонов с диссоциацией в сторону активации Т-супрессорных механизмов, сопровождающейся активацией неспецифических Т-хелперов и Т-супрессоров, что растормаживает аутоиммунные процессы, уменьшение разнообразия антигенного репертуара лимфоцитов, снижение продукции ИЛ-2 Т-хелперами, выраженное снижение способности лимфоцитов активироваться собственными клетками организма снижение так

называемой сингенной смешанной культуры лимфоцитов, снижение противоопухолевой устойчивости организма и др.

Наиболее показательными изменениями с возрастам считают [119] следующие. Наиболее значимо, видимо, изменяется продукция тимических пептидов с возрастом, которые после 40 лет уже практически не обнаруживаются в периферической крови. Это ведет к прогрессирующей возрастной атрофии тимуса, затуханием процесса поставления новых Т-лимфоцитов, способных распознавать новые антигены: снижается количество «наивных» Т-клеток (особенно для CD4+ Т-лимфоцитов - с 56% в 20 лет до 19 в 80 лет) с повышением Т-клеток памяти (для CD4+ Т-лимфоцитов – с 42% в 20 лет до 79% в 80 лет). Одновременно резко снижается экспрессия CD28+ антигена на поверхности Т-лимфоцитов, который является ко-стимулятором пролиферации при активации лимфоцитов в ходе иммунного ответа антигеном. С возрастом снижается общее соотношение лимфоцитов и нейтрофилов, а также абсолютное содержание CD4+ и CD8+ клеток, как и В-лимфоцитов, тогда как количество NK (естественных киллеров, с фенотипом CD16+CD56+CD57+) повышается (функциональная активность последних, однако, даже несколько снижается, таким образом, страдает качество этих клеток).

С возрастом закономерно повышается аутоиммунные компонент, антитела против ДНК и тироглобулина, иммуноглобулины крови и изменяются CD4+CD25+ Т-лимфоциты, регулирующие аутоиммунные реакции.

Закономерно повышается содержание провоспалительных лимфокинов: ИЛ-6 и ФНО-альфа, которые даже стали называть «лимфокинами старения». Повышается также содержание в крови М-КСФ, онкостатина, фактора стволовых клеток (лиганл c-kit молекулы важной для процессов активации и пролиферации лимфоцитов).

Снижается с возрастом содержание в крови ИЛ-2, ИЛ-10, ИЛ-11 и ИЛ-13, а также ИЛ-7, который ответственен за атрофию тимуса.

С возрастом повышается чувствительность лимфоцитов к апоптозу, снижается способность к активации и пролиферации, а также полноценной дифференцировке.

Тестостерон и эстрогены способны прямо индуцировать атрофию тимуса, видимо, без участия кортикостероидов, что связывает процессы окончания роста и развития и полового созревания с окончанием формирования иммунитета и началом его инволюции.

Нами была разработана новая лимфоидная теория старения, основные ее положения могут быть сведены к следующему: ведущим механизмом старения соматических тканей является снижение их клеточного самообновления; снижение потенциала клеточного роста соматических тканей при старении определяется (опосредуется) снижением функции системы лимфоидной регуляции пролиферации соматических клеток. Изменения являются результатом продолжения действия регуляторов ограничения роста организма после того, как рост закончен, при участии гипоталамо-

Исследования иммунитета является весьма важным направлением в исследовании старения, так как возрастной иммунодефицит – типичное проявление старения.Используют методы оценки иммунитета как in vitro, так и in vivo. Наиболее признанными являются в настоящее время иммунофлюоресцентные методы, позволяющие исследовать практически любые клеточные популяции и маркеры активации их, что дает количество соответствующие клеток. Иммуноферментные методы чаще используют для исследования лимфокинов. Однако, остаются важны и старые методы оценки иммунной реакции в целостном организме, учитывающие уже результирующую реакцию целостной системы иммунитета и влияния на нее всех регуляторных факторов целостного организма.

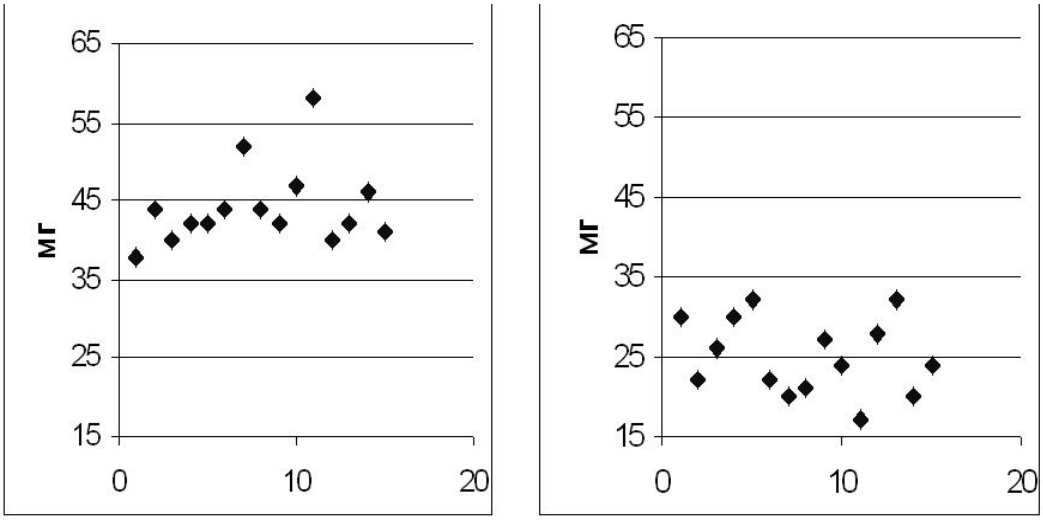


Рисунок 43. Возрастные изменения абсолютной массы тимуса.
Слева молодые (3 мес), справа старые (1,5 года)

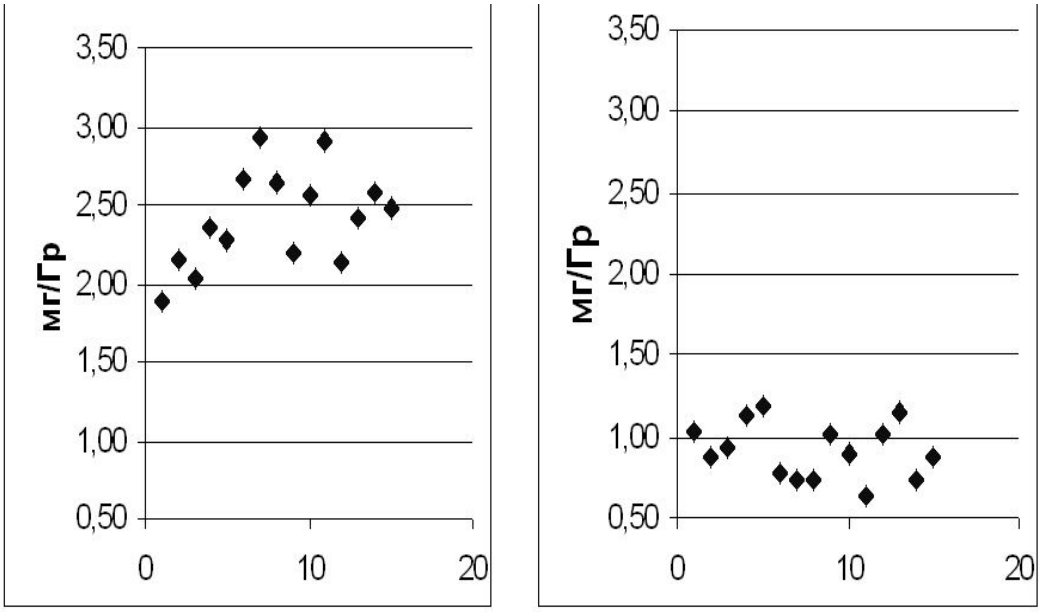


Рисунок 44. Возрастные изменения относительной массы тимуса. Слева молодые (3 мес), справа старые (1,5 года)

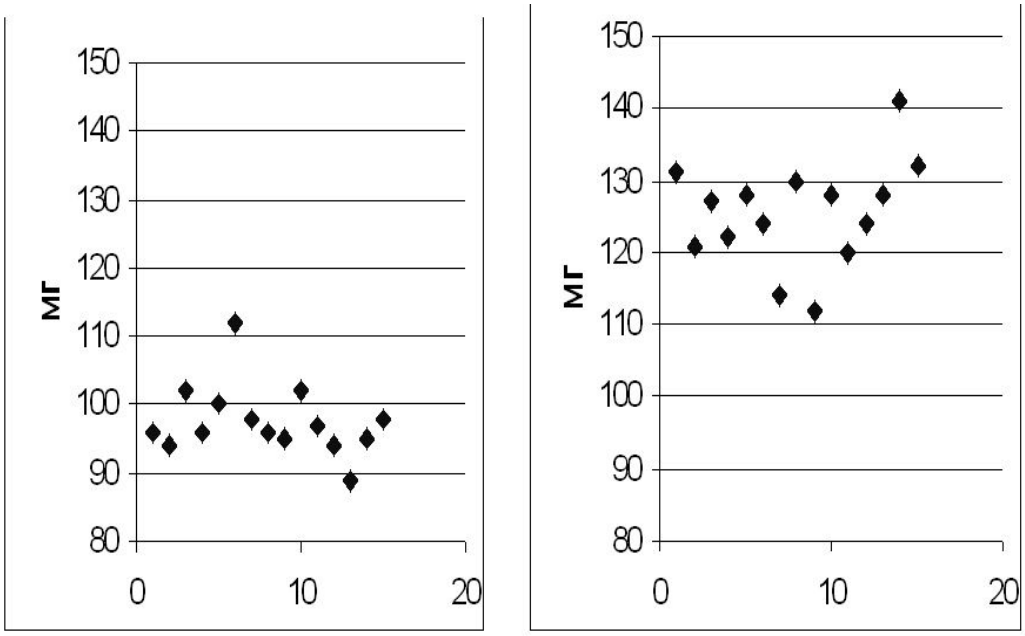


Рисунок 45. Возрастные изменения абсолютной массы селезенки. Слева молодые (3 мес), справа старые (1,5 года)

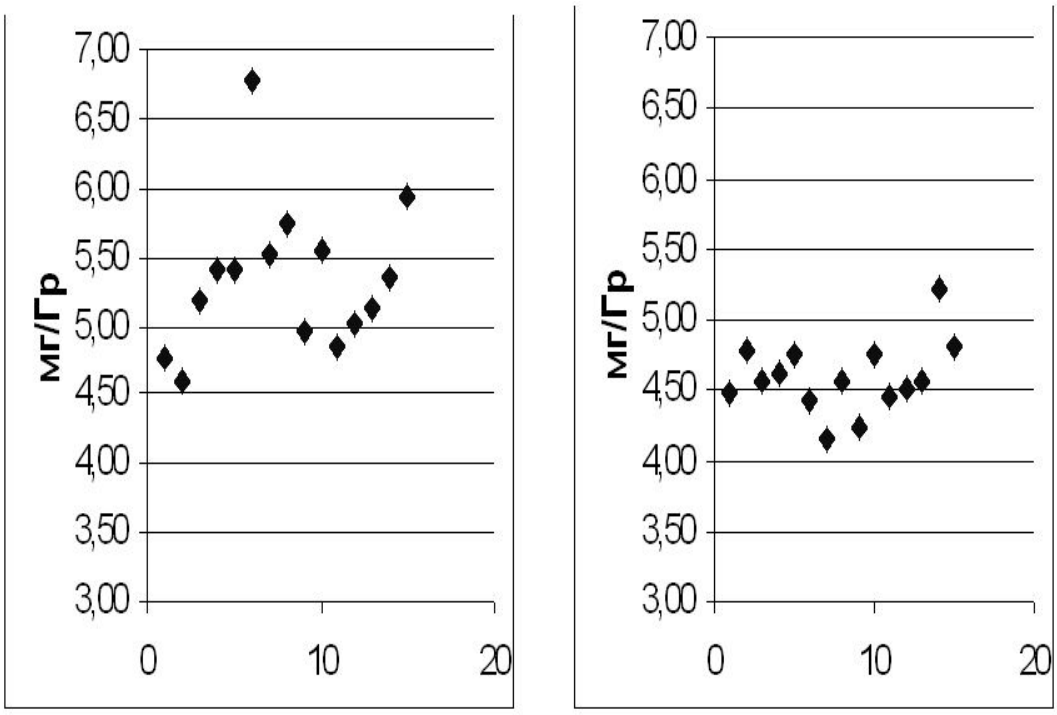


Рисунок 46. Возрастные изменения относительной массы селезенки.
Слева молодые (3 мес), справа старые (1,5 года)

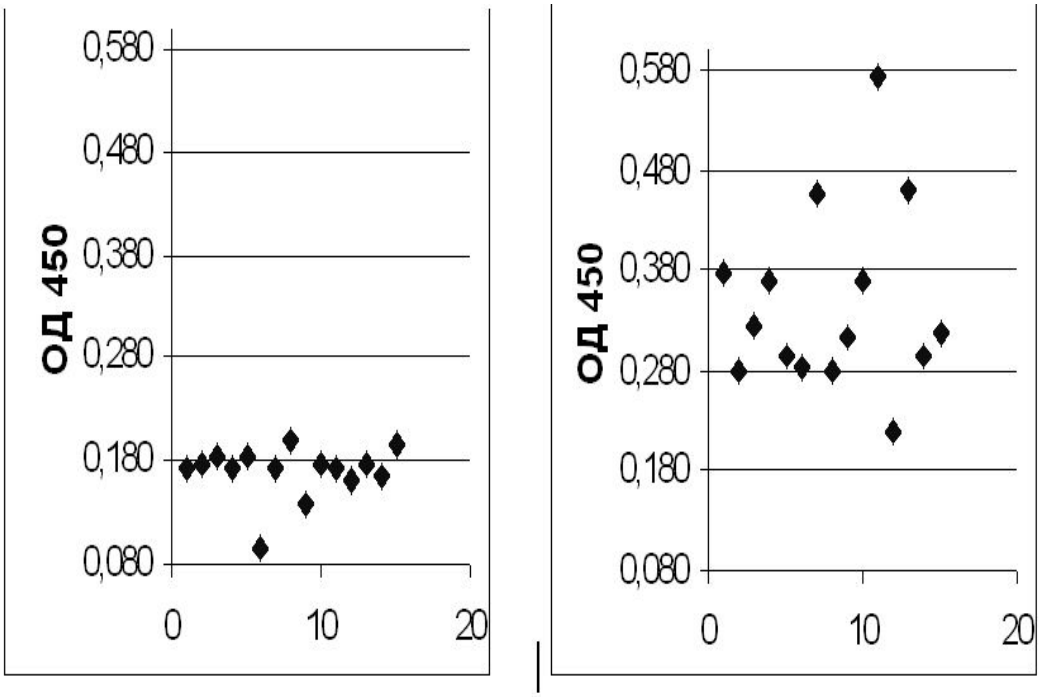


Рисунок 47. Возрастные изменения иммунных комплексов.
Слева молодые (3 мес), справа старые (1,5 года)

Таким образом, выраженное снижение массы тимуса и селезенки с возрастом сопровождается увеличением содержания циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови старых животных, что свидетельствует о развитии аутоиммунной реакции с возрастом – типичное явление у животных и человека.

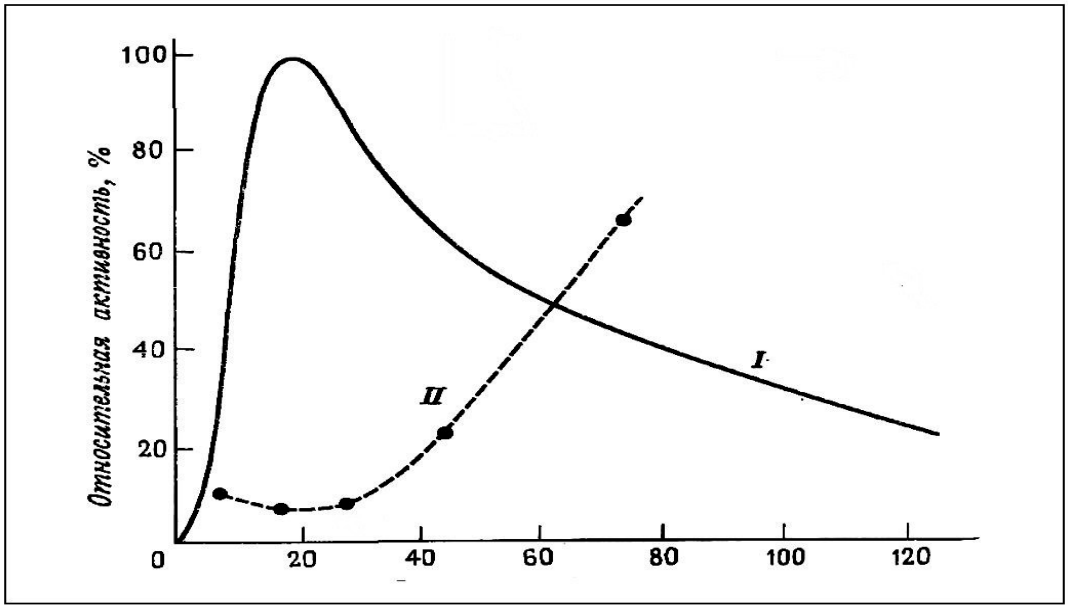


Рисунок 48. Возрастной иммунодефицит у мышей долгоживущих линий (по Walford, 1974).
1 – первичный антительный ответ, 2 – частота антинуклеарных антител

Наиболее интересным и прямо связанным со старением является участием лимфоцитов в регуляции клеточного роста соматических тканей. Как показано в главе 1, развиваемая нами иммуно-регуляторная теория старения, увязывающая регуляторное снижение этой функции с возрастом, может объяснить старение практически всех самообновляющихся путем клеточного деления тканей. Разработанные простые методические подходы оценки данной функции лимфоцитов на примере изопротеренол-индуцированной гиперплазии слюнных желез позволяют детально изучить эти механизмы и повлиять на них, тем самым осуществляя иммунорегуляции клеточного деления соматических тканей и противодействуя старению.

На рисунке 49 показано возрастное снижение ростового потенциала тканей, сопровождаемое снижением бластной активации лимфоцитов в ходе данной реакции.

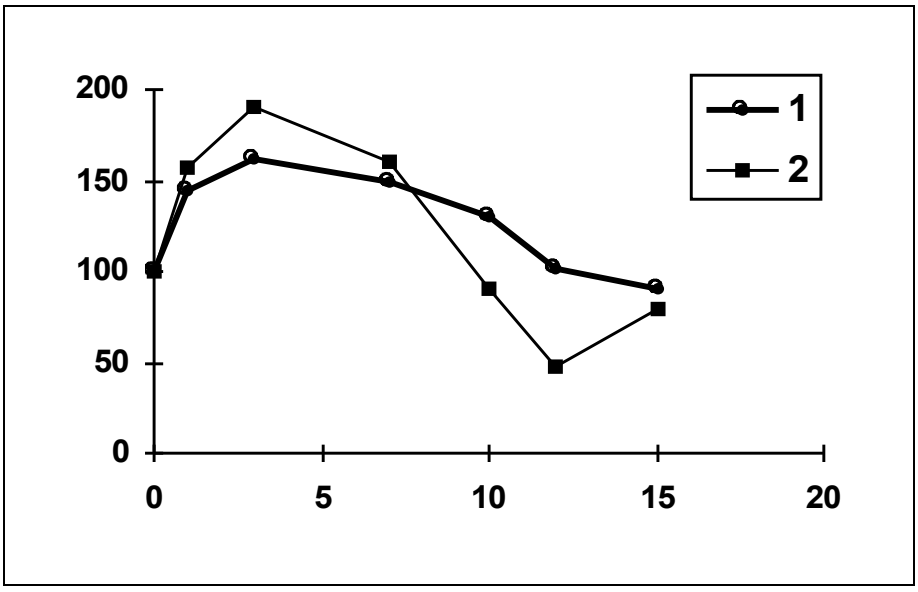


Рисунок 49. Возраст-зависимое снижение изопротеренол-индуцированной гиперплазии слюнных желез у мышей (собственные данные)

По горизонтали – возраст мышей BALB/c в месяцах,

По вертикали – параметры в процентах к интактным животным.

1 – гиперпластическая реакция ткани слюнных желез,

2 – интенсивность бластообразования в селезенке.

В наших экспериментах ДОПА восстанавливал кинетику реакции на изопротеренол у старых мышей. Особый интерес представляет возможность восстановления ростового потенциала тканей старых мышей сывороткой крови молодых животных, показанной нами в эксперименте [46-64].

МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ИММУНИТЕТА.

Для общего представления исследуют относительный **вес органов иммунитета** (тимуса и селезенки), а также можно определить количество **активных – бластных клеток** в селезенке, не осаждающихся при центрифугировании в градиенте плотности фиколла 1,065 - 1,07.

Потенциал клеточного роста (особая функция лимфоцитов – способность контролировать пролиферацию и рост соматических клеток) оценивают на примере реакции Селье – фармакологически индуцированной гиперплазии слюнных желез; реакция резко снижается с возрастом и зависит от определенных популяций Т-лимфоцитов, регулирующих клеточный рост соматических клеток [46-54].

Для этого мышам вводят внутрибрюшинно или подкожно 3-5 мг изопротеренола; реакция начинается через 8-12 часов и достигает максимума через сутки у молодых мышей (крыс и других грызунов) или 3-4 дня у старых животных (у них может реакция отсутствовать); реакцию учитывают по массе подчелюстных слюнных желез (обычная реакция гиперплазии у молодых животных – 140-160% от массы у интактных).

***Выделение мононуклеаров**. Мононуклеары (лимфоциты и моноциты) выделяют обычно из крови, селезенки, тимуса или лимфоузлов, используя центрифугирование в градиенте фиколл-урографина плотностью 1,09 – 1,08, более низкие градиенты можно использовать для выделения бластных клеток, ступенчатый градиент – для выделения нескольких типов клеток различной плотности* [280]. *Клетки (от одной селезенки мыши в 5 мл физиологического раствора, или 5 мл крови) наслаивают на градиент и центрифугируют 30 мин при 200 g (2000 - 3000 оборотов в мин на лабораторной центрифуге типа ЦЛС-3 с откидным ротором), затем отсасывают клетки на границе градиента и отмывают 3 раза цен-трифугированием по 10 мин. в физиологическом растворе. Клетки содер-жат на 80-90% лимфоциты и моноциты и незначительное количество эритроцитов, от которых можно избавиться кратковременным гипо-тоническим шоком.*

Отделение макрофагов. При необходимости макрофаги (адгезивные клетки – А-клетки) отделяют прилипанием к пластиковой поверхности чашке Петри в течение 2 часов; используют раствор Хенкса (с кальцием и глюкозой) при 37°С с отмывкой прилипших клеток холодным раствором без кальция. Описывают также отделение адгезивных клеток пропусканием взвеси клеток через сефадекс G-10; клетки адсорбируются в тепле и отмываются на холоду [179].

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ИММУНИТЕТА

Иммунизацию у мышей проводят обычно белковыми антигенами или эритроцитами барана для изучения гуморальной иммунной реакции, или внутрикожным (например, в кожу уха) введением гаптенов (простых химических веществ – пикриновой кислоты и пр., хотя возможно и введение клеток и белковых антгенов) для изучения клеточного иммунитета

(обычно с адъювантом Фрейнда). Для избирательной активации В-лимфоидного ответа описана иммунизация антигена в комплексе с В-специфическим лектином – липополисахаридом - LPS E.Colli [242]. Возможна также индукция иммунной реакции in vivo введением лектинов – Конканавалина А (КонА, ConA, активатор Т-лимфоцитов, преимущественно Т-супрессоров/киллеров), Фитогемагглютинина (ФГА – активатор Т-лимфоцитов, преимущественно Т-хелперов), Липополисахарида (ЛПС, LPS – активатор В-лимфоцитов): бластная реакция достигает максимума на 5-10 мкг лектина при внутривенном введении уже через 4-6 дней.

Смешанная культура лимфоцитов (СКЛ).

Реакцию СКЛ часто используют для определения рактивности клеток селезенки или лимфоцитов крови при активации аллогенными клетками (аллогенная СКЛ) или митогенами (КонА – для Т-лимфоцитов, преимущественно Т-супрессоров, ФГА – преимущественно Т-хелперов и ЛПС – преимущественно В-лимфоцитов). Реакция проводится стерильно в течение 5-10 дней и учитывается обычно по бластообразованию, включению радиоактивной метки (^{3}Н-тимидина) или появлению антигенов активации (некоторые – уже в течение 6-8 часов после начала реакции).

Активация лимфоцитов селезенки КонА, ФГА и ЛПС in vivo.

Кроме обычно реакции на Конканавалин А или фитогемагглютинин, липополисахарид в культуре (смешанная культура лимфоцитов – СКЛ), описаны методы активации лимфоцитов в организме данными антигенами, что позволяет учитывать влияние целостного организма [184, 241]. Используют 10-100 мкг митогена внутривенно с оценкой реакции по интенсивности бластообразования через 1-3 дня; максимум реакции отмечен для мышей С57Black через 48 часов на дозу 10 мкг.

РЕАКЦИИ РОЗЕТКООБРАЗОВАНИЯ (РОК). Для изучения мононуклеаров, активных по отношению к данному антигену, можно использовать простую реакцию розеткообразования. Для этого выделенные мононуклеары смешивают с 10-100-кратным избытком эритроцитов (обычно барана) к которому привязан антиген (или просто с эритроцитами барана – ЭБ, если последние использовались для иммунизации). Затем клетки мягко осаждают центрифугированием и через 1-2 часа инкубации на холоду ресуспендируют и подсчитывают число розеток (обычно на 1 млн

клеток или на селезенку). Типичная розетка – мононкулеар, окруженн-ый более мелкими эритроцитами (не менее 3-х вокруг клетки).

Реакцию РОК можно использовать для выделения практически любых рецепторов на клетках любого типа, если нагрузить эритроциты соответствующим лигандом, к которому имеются рецепторы на розеткообразующей клетки. Например, описаны РОК для рецепторов к простагландинами на мононукларах селезенки. РОК можно даже выделить центрифугированием в градиенте фиколла с гемолизом эритроцитов.

КЛЕТОЧНЫЕ РЕАКЦИИ (реакции замедленного типа). Реакции иммунитета замедленного типа можно наблюдать на инъекцию разрешающей дозы антигена внутрикожно. Описывают чувствительный метод – по утолщению уха (в 2-3 раза) у морских свинок [237], мышей через 48-72 часа после инъекции 0,02 мкл антигена внутрикожно (измерение микрометром). У мышей также можно оценивать реакцию замедленного типа по утолщению подушечек лап на введение разрешающей дозы антигена через 7-9 дней после сенсибилизации белковым антигеном с адъювантом Фрейнда [300].

ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ

РПГА (реакция пассивной гемагглютинации).

Сыворотку иммунного животного адсорбируют эртроцитами барана (1:4 20 мин при 20°С) и инактивируют при 56°С 30 мин, затем разводят физиологическим раствором забуференным фосфатным буфером pH 7,2 с 1% инактивированной лошадиной сыворотки. Смешивают в лунках 96-луночного планшета круглым дном 2-кратные разведения сыворотки с равным объемом 0,5% взвеси эритроцитов барана коньюгированных с антигеном и через 2-3 часа учитывают реакцию по титру положительной реакции (оседание по всей поверхности лунки планшета).

Для привызывания антигена обычно используют простую адсорбцию (Boydens, 1951) белковых и иных антигенов на мембраны эритроцитов (часто обработанных таниновой кислотой), прямую химическую связь эритроцитов с агрессивными антигенами или привязывание антигенов к эритроцитам – глутаровым альдегидом (Wright, Hunter, 1982),или хлоридом хрома (Sevelkone at al., 1988).

*При использовании **глутарового альдегида**: к 3 мл раствора белка оптимальной концентрации(обычно для бекловых антигенов порядка 20 мкг/мл по азоту) добавляют 0,1 мл отмытого осадка эритроцитов и 0,1 мо 0,25% глутарового альдегида при комнатной температуре; через 1 час трижды отмывают и хранят в физиологическом растворе до 1 мес.*

*При использовании **$CrCl_3$:** к 10% взвеси эритроцитов в физиологическом растворе добавляют в 1 мл 1 мг белка и 50 мкл свежеприготовленного на физиологичексом растворе $CrCl_3*6H_2O$, через 1,5 часа инкубации при 37_oC при постоянном встряхивании эритроциты отмывают центрифугированием и хранят на холоду.*

Часто используют и простую реакцию гемагглютинации – при иммунизации эритроцитами барана (1-100 млн клеток на мышь, внутрибрюшинно).

Реакция Ерне (антителообрзующие клетки – АТОК).

Выделенные клетки селезенки суспендируют в среде 199 (или растворе Хенкса с кальцием и глюкозой), 1 млн клеток в 0,05 мл смешивают с100 млн эритроцитов барана (антигеном) в 0,05 мл Хенкса с сывороткой мыши (источником комплемента, оптимальную дозу комплемента пред-варительно титруют) и заливают в 1% агар на стекле (можно исполь-зовать монослои или неглубокие камеры на покровных стеклах). Через 2-4 часа наблюдают образования светлых бляшек – АТОК (места гемолиза в центре которых находится антиген-продуцирующая клетка). Вычисляют число АТОК на 1 млн клеток селезенки или на селезенку (Jerne et al., 1963).

Обычно методом АТОК регистрируются IgM-продуцирующие плазматические клетки, с максимумом на 3-5-й дни иммунизации; возможно также использовать анти-иммуноглобулиновые сыворотки, проявляющие IgG и IgA – продуценты, с более поздней иммунной реакцией.

Реакция АТОК в монослоях по A.J.Cunningham (1965). *Предметные стекла соединяют парафином и сбоку вводят 5-25 мкл смеси – 10% эритроциты (могут быть конъюгированы с антигеном если регистрируется реакция не на сами эритроциты, обычно эритроциты барана, но могут быть использованы эритроциты крысы и др.) и оттитрованный комплементы (сыворотка мыши), запаивают парафином окончательно; смесь держать на холоду до использования, запаивают парафином оконча-*

тельно. Через 1-2 часа выдерживания при 37°С регистрируют бляшки. В полученном монослое хорошо выявляются даже небольшие бляшки.

Определение аутоантител.

ОСАЖДЕНИЕ ПЭГ-6000. *Простой метод сожадения полиэтилен-гликолем (ПЭГ-6000) с нефелометрической регистрацией степени помутнения на спектрофотометре, выражая результаты в у.е. равных оптической плотности; для определения ЦИК к 0,05 мл сыворотки крови мышей добавляют 0,1 мл 0,1 М боратный буфер с pH 8,4. и 1 мл ПЭГ, через 1 час при 20°С замеряют оптическую плотность при 450 нм.*

ОСАЖДЕНИЕ УКСУСНОЙ КИСЛОТОЙ [72]. *К 0,1 мл сыворотки (прогретой 30 мин при 36°С) добавляют 2 мл холодной 0,1 М уксусной кислоты с pH 4,6 и центрифугируют сразу на холоду 30 мин при 3000 оборотов в минуту, 1 раз отмывают центри-фугрованием, растворяют в 3 мл 0,1 М NaOH и определяют содержание белка любым методом.*

Исследование миграции клеток.

Миграция стволовых, иммунных клеток – типичный процесс, который можно исследовать, используя клеточную метку. Описан, например, метод прижизненной окраска акридиновым оранжевым лимфоцитов с введением их затем донорам и флюориметрическим определением флюоресцентной метки в тканях [108], что, в частности, показало усиленную миграцию лимфоцитов в регенерирующую печень.

Исследование кинетики восстановления лимфоцитов

Кинетику восстановления лимфоцитов удобно исследовать на введение кортикостероидов мышам: при внутрибрюшинном введении 100 мкг/кг гидрокортизона клеточность тимуса и селезенки резко падает, в норме у молодых животных - к 6-8-му дню и восстанавливается к 28-му дню [182].

8.2.10. Методы парабиоза, удаления, пересадки и подсадки органов

Методы удаления функции или изменения ее введением регуляторных факторов или пересадкой органов – классические методы физиологии, используемые и в экспериментальной геронтологии.

Метод парабиоза состоит в создании общей системы кровообращения (у крыс и мышей – сшиванием мышц и кожи в области бока животных) с использованием линейных животных для предотвращения реакций иммунологического отторжения.

Если это молодые и старые животные, то можно оценить влияния регуляторных факторов на процессы старения. Таким способом было показано, например, что старение иммунитета и инволюция тимуса являются регуляторными процессами, причем имеет место в основном угнетение иммунных реакций у молодых, при небольшом стимулировании у старых животных. Об увеличении продолжительности жизни старых мышей в таких экспериментах не сообщалось.

Таким образом, метод парабиоза указывает на наличие угнетающих активных регуляторных влияний со стороны старого организма, при наличии и некоторых стимуляторных влияний со стороны молодого организма на общую жизнеспособность животных; возможно, однако, что стимулирующих факторов молодого организма «не хватает» на двоих животных, в соответствии с чем наличный уровень жизнеспособности делится на двоих, при этом увеличивается жизнеспособность старого за счет снижения у молодого организма.

Рисунок 50. Парабиоз старой (слева) и молодой мышей.

Методы удаления органа или снижения его функции позволили доказать наличие активных супрессорных влияний на жизненные функции со стороны гипоталамуса и гипофиза старых животных. Так, гипофизэктомия предотвращает возрастную дегенерацию тимуса у крыс и мышей [223]; хирургические методы гипофизэктомии могут быть заменены введением анти-гипофизарной сыворотки, которую получают иммунизируя кроликов тканью гипофиза мышей или крыс с адсорбцией антисыворотки неспецифической тканью – печени и др. После гипофизэктомии животных обычно содержат с заместительной терапией кортикостероидами, а также тироксином и другими необходимыми для жизнедеятельности гормонами. Наличие супрессорного фактора выделяемого гипофизом показано также и на примере так называемого фактора снижающего основной обмен [194].

В старости снижается, видимо активно, чувствительность тканей к тиреоидным гормонам (по некоторым данным в 3 раза). Введение тироксина обладает по многим параметрам омолаживающим действием на старых животных, в том числе восстанавливает сниженный в старости иммунитет у мышей [257].

Методы пересадки и **подсадки органов**, **тканей** и **клеток** являются широко распространенными для уточнения значения микроокружения в функционировании клеток или соотношения целого и части в процессах старения. Пересадка гипоталамуса восстанавливает функции яичника и восстановление эстрального цикла у старых крыс [251]. Нами показано восстановление у старых мышей иммунных функций и улучшение жизнеспособности при пересадке им фетального гипоталамуса, причем можно использовать межвидовые пересадки – от кролика, аналогичным образом в исследованиях Ф.А.Ата-Мурадовой показано восстановление ментальных функций, ЭЭГ и условных рефлексов у старых кроликов при пересадке им эмбриональных областей коры головного мозга [10].

Влияния гипоталамуса на эструс определяется, видимо, изменениями в обмене медиаторов, в том числе ДОФА, так как концентрация ДОФА достигает максимума в период половозрелости и затем снижается [199], а введение L-ДОФА старым животным восстанавливает у них эстральный цикл [230]. ДОФА и серотонин являются также, по представлениям ряда исследователей, универсальными (противоположными) регуляторами

иммунитета [140]. Преоптические ядра оказываются прямо вовлеченными в процессы регенерации тканей, выражено увеличиваясь в объеме и активности при индукции регенерации органов. Неоднократно показано влияние пересадок и подсадок гипоталамуса, гипофиза, тимуса, селезенки, введение иммуно-компетентных клеток на иммунитет у старых животных, что послужило основанием указывать многим исследователям на иммунотерапию как на один из наиболее перспективных методов геропрофилактики и омоло-жения, причем не только иммунитета, но и многих других сниженных в старости функций. Аналогичными образом влияют различные иммуно-тропные средства у старых животных.

Сниженные функции, в том числе для гипоталамуса, могут быть также **стимулированы физическими агентами** – током, магнитным полем и пр. Так, методы транскраниальной электростимуляции вошли в арсенал клинической медицины для стимуляции мезенцефалона и, видимо, гипоталамуса, в частности, приводя к выраженной стимуляции регенерационных процессов тканей; магнитостимуляция гипоталамуса в опытах Гаркави с соавт. приводила к общеомолаживающим влияниям [32, 33].

Методы переноса широко используются в терапии стволовыми клетками. При этом можно использовать облученных животных, в селезенке которых стволовые клетки образуют макроскопически видимые колонии (метод КОЕ-с). Показано, что число мигрирующих стволовых клеток снижается с возрастом, как и их активность (диаметр колоний), но в основном за счет влияния микроокружения старого организма. Еще в опытах P. L. Krohn (1962) показано, что эксплантаты кожи сохраняют свою способность к росту на протяжении не менее 5-6 пассажей неизменной, значительно превосходя по длительности жизни ПЖ мышей. Старые трансплантаты обычно восстанавливали свою активность и жили столько же, сколько и трансплантаты от молодых животных. Пересадка тканей, в частности кожи, позволяет ответить на вопрос о первичном старении тканей или о вторичном регуляторном, со стороны целостного организма.

Таким образом, методы пересадок и подсадок клеток, органов и тканей дополняются методами клеточной и фармакологической заместительной терапии и методами физической приборной активации, что уже давно вошло в арсенал клинической геропрофилактики и нового направления – анти-возрастной медицины.

8.3. Другие физиологические показатели

Из других физиологических тестов рекомендуются к изучению при старении у мышей и крыс следующие показатели.

Тест **щелевой лампы** для регистрации катаракты, а также другие показатели прозрачности сред глаз. Развитие катаракты является типичным для старых мышей, что видно на глаз при далеко зашедших стадиях, однако, показатель индивидулен.

Изучение познавательной функции (тест **лабиринта**), является типичным для изучения старения крыс, но для мышей он применяется редко. В наших исследованиях мыши Balb/c просто не захотели двигаться по лабиринту и тест провести не удалось. Вместо большого лабиринта для мышей используют часто Т-образный лабиринт, исследуя для группы животных выбор поворота направо или налево.

В литературе рекомендуют также исследовать у животных изменение содержания **гормонов** с возрастом, обычно это глюкокортикоиды, половые гормоны, гонадотропины, пролактин, инсулин, IGF-1, гормон роста, лептин, тироксин, трийодтиронин, рекомендуется определять эстрогеновый статус, однако, референсные значения для животных разных возрастов и линий мышей мало изучены и не понятны индивидуальные различия и во многих случаях значимость самих параметров.

Для самок мышей часто исследуют **эстрогеновый статус** по вагинальным мазкам. Определяют фазу цикла (проэструс, эструс, метаэс-

трус, диэструс) и показатели – соотношение фаз эстрального цикла, гармоничность и нарушение фаз, сохранность фаз для определенного возраста (процент мышей с сохраненным эструсом) и др.

Для человека известно также значимое изменение с возрастом **атеровенозной** разницы по кислороду, что отражает замедление кровотока и изменение диффузии газов с возрастом, для животных, однако, этот показатель практически не регистрируют.

Эритроциты являются универсальными адсорбентами, переносящими многие вещества в организме, а также проявляющими таким образом **антитоксические свойства**. Предлагается использовать адсорбцию эритроцитами витальных красок для оценки уровня эндогенной токсичности [129]*: в варианте для человека 4 мл крови смешивают с 1 мл цитрата 4% натрия и отделяют эритроциты центрифугированием; к 1 мл эритроцитов добавляют 3 мл 0,025% метиленового синего (или другого витального красителя), перемешивают и инкубируют 10-12 мин при комнатной температуре, затем цетрифугируют 10 мин и надосадок спектрофтометрируют при 630 нм, контролем служит физиологический раствор; поглощенный краситель расчитывают как разность 100% и отношений оптических плотностей красителя после и до инкубации с эритроцитами.* В норме для человека показатель устойчив, менее 38,5% (37,12±1,43%), при инфаркте, перитоните он поднимается до 60-70%; у крыс в норме 45,2±5,1%.

Мы исследовали этот показатель у молодых и старых мышей: к 0,2 мл осадка эритроцитов добавляли 0,6 мл 0,025% метиленового синего и через 10 мин центрифугированием осаждали эритроциты, измеряя OD_{500}. Оказалось, что молодые эритроциты сорбируют 81,9+2,9% добавленного красителя, а старые: 64,2+4,5%. Известно, что у старых животных скорость замены эритроцитов новыми снижается и количество старых эритроцитов оказывается больше.

Глава 9.
Биохимические методы изучения старения

9.1. Изменения хроматина при старении

Обзорные работы по биохимии старения указывают на многие разнообразные и разнонаправленные изменения метаболизма, что отражается на уровне хроматина, белков, липидов, углеводного обмена, ферментов, однако, эти изменения во многом неспецифичны и не всегда наблюдаемы [66, 126].

Изменениям хроматина в процессе старения придавали выраженное значение, так как в нем заложена вся информация об организме. Типичными возрастными изменениями хроматина являются: увеличение температуры плавления, что отражает увеличение числа химических сшивок молекулы ДНК; снижение экстрагируемости хромосомных белков (вследствие той же причины); снижение степени ковалентных модификаций белков и влияния способности различных агентов модифицировать эти белки, что снижает управляемость геномом. Уменьшается транскрипционная активность – синтез РНК на активных участках ДНК и пр.

При облучении мышей разного возраста **репаративный синтез** изменяется в 2-3 раза, при этом дело, видимо, не в снижении активности ферментов репарации ДНК, поврежденной радиацией, а в степени доступности для ферментов этих повреждений ДНК в составе хроматина клеток. Об этом свидетельствует возрастное снижение релаксируемости нуклеотида ядер печени мышей при сравнении молодых и старых облученных животных.

Известно большое число различных механизмов репарации ДНК [122].

Фотореактивация и репарация тиминовых димеров – участвует активируемая ультрафиолетовым облучением фотолиаза**.**

Дезаминирование (метилирование) и репарация ошибочно спаренных оснований – с помощью Г-А-мисмэтч-репарации или Г-Т-мисмэтч-репарации с участием белковых продуктов генов семейства Mut: H, L, S и U, белков-хеликаз, ДНК-полимераз, а также аденозин-трифосфатазы (ATP) и дезоксинуклеотидфосфатазы (dNTP). Системы мисмэтч-репарации оперируют на дочерней нити и производят замену некомплементарных оснований только в ней.

Если образование классических «уотсон-криковских» пар оснований вообще затруднено, то во время репликации могут происходить ошибки спаривания (ошибки репликации) и также возникают мисмэтчи. Для их устранения привлекаются уже другие ферменты: эндонуклеаза, фосфодиэстераза, ДНК-полимераза I и фермент-лигаза.

Алкилирование и репарация О6-алкилированного (метилированного) гуанина или О4-алкилированного тимина – в ходе алкилирования в клетках синтезируются белки - метилтрансферазы, которые захватывают у модифицированного гуанина его метиловые группы, восстанавливая исходную структуру ДНК. Выделен также механизм репарации О4-алкилированного тимина (О4-алТ). Как правило, внутри клетки накапливаются тысячи таких молекул

Апуринизация и репарация АП-сайтов – каждая соматическая клетка при функционировании теряет за сутки примерно 10 тысяч пуринов и пиримидинов, и в результате в ее молекуле ДНК образуются апуриновые сайты или сахаро-фосфатные группы без оснований (АП-сайты). Причины апуринизации: повышение температуры, изменение pH, ионизирующее излучение и другие влияния. В ходе устранения АП-сайтов ферменты-инсертазы разрывают ковалентную N-гликозидную связь между основанием и дезоксирибозой, и после этого осуществляется прямая вставка пуринов, эксцизионная репарация поврежденных оснований с помощью ДНК-гликозилаз, которые узнают повреждения оснований, возникающие при метилировании, окислении, восстановлении, дезаминировании, присоединении формамидных групп и других реакциях. Семейство ДНК-гликозилаз включает 11 типов ферментов. Образовавшиеся АП-сайты распознаются ферментом: АП-эндонуклеазой, после появления разрыва вступает в действие фосфодиестераза, которая отщепляет от ДНК ту сахаро-фосфатную группу, к которой уже не присоединено основание, в результате появляется брешь в одной цепи ДНК размером в один нуклеотид. Напро-

тив бреши в противоположной цепи ДНК расположен неповрежденный нуклеотид, и ДНК-полимераза вставляет в брешь комплементарный ему нуклеотид, присоединяя его к свободному 3, ОН-концу. Этот конец нити ДНК и ранее образовавшийся при разрыве нити 5,- конец соединяются между собой под действием полинуклеотидлигазы. После чего вся структура считается полностью восстановленной: удалено неправильное основание, вырезан сахарофосфат, к которому было присоединено это основание, брешь заполнена правильным нуклеотидом и однонитевой разрыв восстановлен.

Эксцизионная репарация поврежденных нуклеотидов – более сложный и энерго-затратный механизм, связанный с вырезанием не просто поврежденного основания, а значительного участка цепи ДНК перед и позади повреждения. Он включает распознавание повреждения белками uvr A и B, изгиб молекулы ДНК и изменение конформации белка uvr B, внесение двух однонитевых надрезов ДНК с обеих сторон от повреждения с помощью белков uvr B и C, расплетение ДНК в участке между двумя надрезами с помощью белка uvr D (это хеликаза II), отсоединение содержащего дефект фрагмента длиной 12 нуклеотидов (12-мер) с образованием бреши, и при этом расходуется энергия одной молекулы АТФ, застройка образовавшейся бреши с помощью ДНК-полимеразы, соединение свободных концов сахаро-фосфатного остова ДНК с помощью ДНК-лигазы.

Репарация поврежденных нуклеотидов включает мисмэтч-репарацию или репарацию некомплементарных или неканонических (не «уотсон-криковских» пар оснований) – репарация ошибочно спаренных оснований.

Репарация однонитевых разрывов ДНК – эта прямая репарация вызывается в ответ на действие ионизируюущнй радиаци. Она обеспечивается последовательным действием ферментов: 3'-фосфодиэстеразы, ДНК-полимеразы-b и ДНК-лигазы (ДНК-полинуклеотидлигазы). Восстановление такого разрыва идет с использованием в качестве матрицы неповрежденной комплементарной цепочки ДНК.

Репарация двунитевых разрывов ДНК – двунитевые разрывы молекулы ДНК являются самым опасным для клетки типом повреждений, так как, как правило, приводят к развитию генетической нестабильности, появлению точковых мутаций и хромосомных аберраций и последующей гибели клеток. Известны 2 механизма репарации двунитевых разрывов ДНК: негомологичное воссоединение разорванных концов и гомологичная

рекомбинация. *Негомологичное* воссоединение разорванных концов ДНК происходит между концами молекулы, которые имеют негомологичные последовательности нуклеотидов разной длины или очень короткие гомологичные участки. У млекопитающих негомологичное воссоединение происходит с участием белка Rad50, родственных ему белков, факторов Ku, ДНК-лигазы IV и факторов сайленсинга. Механизм *гомологичной* рекомбинации подробно изучен у Drosophila melanogaster. В ходе гомологичной рекомбинации на одной из нитей ДНК образуется брешь, по размеру равная удаляемому элементу (Р-элемент). Восстановление бреши происходит с участием копии Р-элемента, находящейся на сестринской хроматиде и используемой в качестве матрицы для репаративного синтеза.

Пострепликативная (рекомбинационная) репарация – изучена У.Рапп и П.Ховард-Фландерс на примере обработанных ультрафиолетом бактериальной ДНК.

SOS – репарация ДНК – последняя возможность восстанолвения для поврежденной ДНК клетки, которая подошла к репликации, имея повреждения, не устраненные с помощью всех других механизмов репарации. В ходе этого механизма индуцируется синтез белков, присоединяющихся к ДНК-полимеразному комплексу и «загрубляющих» его работу таким образом, что комплекс становится способным строить дочернюю нить ДНК напротив дефектных звеньев матричной нити, но при этом в дочерней нити появляется много ошибок (мутаций).

Механизм репарации с участием фермента ПАРП – белок-фермент ПАРП или поли-АДФ-рибоза-полимераза относится к одному из ядерных факторов, первым распознающим повреждение ДНК. Этот фактор управляет запуском механизма репарации ДНК в живых клетках с места повреждения ДНК и входит в мультипротеиновый комплекс (МР-комплекс), включающий также фактор XRCC1, ДНК-лигазу III и бета-ДНК-полимеразу. Присутствие ПАРП в этом комплексе обеспечивает направление всех участников репарации ДНК к сайтам повреждения ДНК in vivo, что облегчает восстановление молекулы ДНК.

Модель репарации с антирекомбинационным эффектом фермента ПАРП – в последние годы предложена модель репарации ДНК с антирекомбинационным эффектом ПАРП. Согласно этой модели ПАРП взаимодействует с разрывами ДНК и совместно с реакциями поли-АДФ-рибозилирования соседних белков специфически защищает концы ДНК от дейс-

твия нуклеаз и/или блокирует процесс рекомбинации. Это подтверждается на примере экспериментальных животных, дефицитных по гену ПАРП.

Белки Альбертса и их роль в репликации и репарации – белки SSB содержат кластер положительно заряженных аминокислотных остатков, но при этом их общий заряд остается отрицательным, благодаря чему они имеют повышенное сродство к одноцепочечной ДНК, фиксируя ее одноцепочечное состояние. Участие белков SSB в репликации молекулы ДНК абсолютно необходимо: они удерживают в репликативной вилке в одноцепочечном состоянии обе матричные нити, защищая каждую нить от действия нуклеаз и избирательно стимулируя работу ДНК-полимеразы.

Репарация ДНК с участием метилтрансфераз – при помощи поддерживающих ферментов: цитозин-ДНК-метилтрансфераз (М-таз) можно проводить de novo метилирование остатков цитозина в ДНК с образованием 5 - метилцитозина (5-mC), а также метилирование олигонуклеотидов, содержащих ошибочно спаренные основания.

Репарация ДНК с участием хеликаз – это филогенетически устойчивые ферменты, способные разделять цепи молекулы ДНК, переводя ее из нативного состояния в одноцепочечное. Они участвуют во всех фундаментальных генетических процессах с разделением родительских цепей молекулы ДНК или основанных на таком разделении процессах: репликация, транскрипция, рекомбинация, репарация сегрегация хромосом, процессинг и сплайсинг пре-мРНК, транспорт из ядра мРНК в цитоплазму и ее трансляция на рибосомах. В ходе этих процессов хилазы обеспечивают доступность открываемых ими одноцепочечных участков молекулы ДНК для действия других ферментов, включая ферменты репарации.

ДНК-хеликазы участвуют в инициации транскрипции, рекомбинации, репарации и сегрегации хромосом.

РНК-хеликазы участвуют в биогенезе рибосом, транскрипции мРНК, сплайсинге пре-мРНК, созревании и транспорте мРНК в цитоплазму и ее трансляции на рибосомах.

Репарация нонсенс-транскриптов мРНК – примерно одна треть наследственных болезней и многие формы рака обусловлены нонсенс-транскриптами или мутациями сдвига рамки считывания. В результате этих мутаций возникают преждевременные стоп-кодоны (ПСК) и появляются неполноценные белки. Вместе с тем в клетках существуют системы, распознающие и разрушающие большинство нонсенс-транскриптов.

Две такие универсальные для эукариот системы получили название: «noncence- mediated mRNA decay» (NMD), а также «Staul-опосредованная деградация мРНК или Staufen 1(Staul)-mediated mRNA decay» (SMD).

Возрастные изменения репарации ДНК – 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. Показано также влияние возраста донора на интенсивность внепланового синтеза ДНК в клетках человека, подвергнутых in vitro УФ-облучению: найдена отрицательная корреляция между возрастом и величиной внепланового синтеза ДНК в лейкоцитах периферической крови здоровых субъектов 13-94 лет при сильных индивидуальных колебаниях величины. Было обнаружено также ослабление индуцированного УФ-светом репаративного синтеза в лимфоцитах человека с возрастом и в глубокой старости.

Двунитевые разрывы ДНК относятся к наиболее тяжелым повреждениям генома. Они являются молекулярным субстратом формирования различного вида структурных мутаций генов, аберраций хромосом, участвуют в инициации клеточной трансформации. ДР образуются при действии ионизирующих излучений, различных химических мутагенов и канцерогенов.

Для определения закономерностей индукции и репарации ДР ДНК при действии ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками обычно используются методы ДНК-комет и ДНК-фокусов.

Метод «ДНК-комет», основан на электрофорезе ДНК индивидуальных клеток в постоянном электрическом поле. При использовании этого метода геном отдельных клеток во флуоресцентном микроскопе представляется в виде электрофоретического следа. Длина следа и доля в нём ДНК связаны с поврежденностью клеточной ДНК.

Метод ДНК-фокусов основан на использовании меченных флуоресцентными красителями отдельных ферментов, участвующих в репарации двунитевых разрывов ДНК. При использовании конфокального лазерного микроскопа можно регистрировать отдельные места – «фокусы» связы-

вания этих ферментов с сайтами репарации образующихся двунитевых разрывов ДНК.

Один из наиболее чувствительных методов исследования репарации ДНК в клетках – **метод седиментации** в градиенте щелочной сахарозы.

Цитологические методы – выявление остаточных мутаций: хромосомные аберрации, сестринские хроматидные обмены, микроядерный тест, разрывы ДНК.

Распространенные тесты – регистрация включения **^{3}H-тимидиновой метки** в репарируемую ДНК при остатновке клеточного деления.

Для индукции репарации ДНК используют обычно ультрафиолетовое облучение, радиоактивное воздействие.

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. С увеличением возраста не отмечено изменений стехиометрии большинства гистонов, однако имеются сообщения об изменениях строения подвида гистона HI. Ацетилирование гистонов, которое, предположительно, изменяет взаимодействие гистон-ДНК и делает ДНК более доступной для разного рода воздействий, снижается по мере старения на 30-70%.

Метилирование генома и возраст.

Некоторые авторы подчеркивают значимость определенных процессов в хроматине, важных для старения, например – изменения степени **метилирования** генома. По-видимому, метилирование ДНК препятствует взаимодействию регуляторных белков (факторов транскрипции) с промотором. Метилирование ДНК способствует привлечению к району промотора белков, подавляющих транскрипцию.

Неметилированные CpG-динуклеотиды сгруппированы в так называемые «CpG-островки», которые присутствуют в 5' регуляторных областях многих генов. Различные заболевания, например, рак, сопровождаются начальным аномальным гипометилированием ДНК и последующим гиперметилированием CpG-островков в промоторных областях генов, что приводит к устойчивой репрессии транскрипции. Репрессия транскрипции в этом случае опосредована белками, которые способны связываться с метилированными CpG-динуклеотидами. Эти белки, называемые метил-

цитозин-связывающими белками, привлекают деацетилазу гистонов (HDAC) и другие факторы, участвующие в ремоделировании хроматина. Сформировавшийся комплекс может модифицировать гистоны, формируя конденсированную транскрипционно не активную структуру гетерохроматина. Отсутствие метилцитозин-связывающего белка 2 (MeCP2) вследствие, например, мутации в соответствующем гене, приводит к развитию синдрома Ретта у человека; инактивация метилцитозин-связывающего доменного белка 2 (Methyl-CpG binding domain protein 2 — MBD2), который участвует в репрессии транскрипции гиперметилированных генов, отмечена при онкологических заболеваниях.

До 5% всех остатков цитозина в ДНК млекопитающих метилировано по 5'-позиции с образованием 5-метилцитозина (5-мЦ). Это единственное постоянно модифицированное основание в ДНК высших эукариот. Метилирование происходит в обеих нитях ДНК, симметрично, и остатки 5-мЦ всегда фланкируются остатками гуанина со стороны З'-конца. Метилирование ДНК вовлечено в регуляцию активности генов. Изменения в метилировании, в частности деметилирование динуклеотидов у позвоночных, связаны с изменением уровня транскрипции. Возрастное деметилирование ДНК впервые описано в 1973 г. Ванюшиным, когда была обнаружена разница в степени деметилирования в тканях крыс – в ткани мозга по сравнению с печенью оно было выше. В дальнейшем было показано возрастное снижение количества 5-мЦ в легких и культурах фибробластов кожи, для последних отмечена связь деметилирования со снижением возможности к росту в культуре [315]. Было высказано предположение о том, что возрастное деметилирование пред-располагает клетки к опухолевой трансформации.

Несколько неожиданный результат был получен в ходе реализации проекта HEP (Human Epigenome Project). Было проанализировано 2524 амплификата, включающих в себя кодирующие, некодирующие и эволюционно-консервативные последовательности, ассоциированные с 873 генами. В результате был определен статус 1,88 миллионов CpG сайтов. Общий анализ метилирования амплификатов показал, что 27,4% локусов являются неметилированными (<20% метилирования), 42.4% являются гиперметилированными (>80% метилирования), 30.2% гетерогенно метилированы (от 20 до 80% метилирования). При этом большинство CpG-островков в амплификатах является неметилированными

(90,8%). Интересным результатом представляется то, что авторам не удалось найти статистически значимых результатов при анализе метилирования в зависимости от возраста (две группы 26 и 68 лет в среднем) и пола образца. Также было найдено, что 17% генов (из 873) являются дифференциально метилированными в их 5'-UTR и что метилирование примерно одной трети из них имеет обратную корреляцию с экспрессией. Полученные данные размещены на общедоступной базе HEP.

На протяжении более 50 лет изучения феномена применялись разные методы, как количественной оценки, так и статуса метилирования специфических участков генома [196]). Суммарное содержание метилированного цитозина в ДНК оценивают обычно после предварительного кислотного или ферментативного гидролиза, 5-Метил-цитозин выявляют хроматографией и электрофорезом, газовой хроматографией, масс-спектрометрией, ВЭЖХ. Используют также метод, основанный на способности метилчувствительных рестриктаз расщеплять ДНК, не подвергшуюся метилированию и оставлять негидролизованными участки, содержащие метилцитозин. Конъюгаты 5-метилцитозина с сывороточным альбумином могут быть использованы для получения антител, которые эффективно (хотя и не абсолютно специфично) выявляют в ДНК малые количества этого модифицированного основания.

Не удалось связать продолжительность жизни организма с количеством повторяющихся или **уникальных генов**.

8-Окси-2'-дезоксигуанозин (8-одГ) является наиболее распространенным окислительным продуктом повреждения ДНК. Количество его при старении in vivo и in vitro непрерывно увеличивается как в ядерной, так и в митохондриальной ДНК (в последней – с гораздо более высокой скоростью), поэтому многие геронтологи, особенно стоящие на позициях свободнорадикальной теории старения, считают его одним из лучших молекулярных биомаркеров старения.

Существует ряд **методов** определения количества 8-одГ в ДНК тканей: иммуноферментный метод, аффинная хроматография, хроматография с масс-спектрометрией или электрохимической детекцией, некоторые из них позволяют проводить такую оценку в цитогеронтологических экспериментах, в культивируемых клетках.

Радиологические методы исследования метаболизма.

Радиологические методы широко используются для исследования метаболизма ДНК, РНК, белка и других макромолекул и сводятся к добавлению радиоактивных предшественников к культуре клеток или in vivo. Используют обычно ^{3}H-тимидин для изучения скорости синтеза ДНК, ^{3}H-Уридин или ^{32}P-Уридин для РНК, ^{14}C-меченные аминокислоты для изучения обмена белков. Несвязавшуюся метку отмывают центрифугированием, макромолекулы осаждают обычно трихлоруксусной кислотой и растворяют в сцинтилляционной жидкости. Современные жидкостные сцинтилляционные счетчики бэта-радиоактивности (определяют СРМ – число распадов в минуту), позволяют не только учитывать степень гашения в каждой пробе, для более точного расчета радиоактивности, но и учитывать энергию каждого импульса что дает возможность, например, просчитывать несколько меток в одной пробе.

Было показано, например, что *скорость внедрения радиоактивного фосфора* в клетки печени снижается в старости в 2-3 раза для ДНК и примерно так же – для РНК.

Снижение **лабильности хроматина** с возрастом может быть измерено простым физико-химическим тестом: *повышением температуры плавления (Tm) хроматина* печени и тимуса [173, 227, 265, 277]. При снятии кинетики реакции можно видеть переломы кривой при 40°C, 66°C и 81°C, что соответствует фракции хроматина – свободной ДНК, ДНК+ слабоосновные гистоны, ДНК+прочно-связанные гистоны [247].

Количество **хромосомных аберраций** в делящихся клетках печени – нарушения нормальной картины митоза, мостики, микроядра в анафазе в ранней телофазе в регенерирующей печени, увеличивается с возрастом у всех лабораторных животных [188].

МЕТОДЫ

НУКЛЕОПРОТЕИДЫ (реакция на рибозу) – реакция Троммера.

Реакция: к 0,5 мл пробы + 1 мл 30% NaOH + 3 капли 7% $CuSO_4$, нагреть до кипения.

Качественная реакция: желтый осадок (CuOH) или красный осадок (Cu_2O)

Спектрофотометрические методы определения **нуклеиновых кислот** в тканях чувствительны и просты и основаны на специфическом поглощении света при 270 и 290 нм (A_{270} и A_{290}).

Измельченную на холоду навеску (100-200 мг) ткани помещают в пробирку с 5-10 мл охлажденного 0,2 N раствора хлорной кислоты, перемешивают и осаждают на холоду при 3000 g в течение 10 минут). Осадок повторно отмывают хлорной кислотой и добавляют 5-10 мл 0,5 N $HClO_4$, нагревают в кипящей водяной бане 30 мин. для экстракции нуклеиновых кислот в раствор и кислотного гидролиза; гидролизаты охлаждают и центрифугированием удаляют осадок (после повторной экстракции 0,5 N $HClO_4$). Объединенный гидролизаты фотоколориметрируют при 270 и 290 нм против контроля - 0,5 N $HClO_4$. Расчет фосфора нуклеиновых кислот в 1 мл раствора ведут по формуле: Смкг фосфора = $A_{270} - A_{290}$ /0,19; для пересчета на количество нуклеиновых кислот пользуются средним пересчетным коэффициентов = 10,3.

Раздельное определение РНК и ДНК в тканях (по Шмидту-Тангаузеру). В основе метода лежит разделение РНК и ДНК путем мягкого гидролиза слабой щелочью с расщеплением РНК, но не ДНК.

Измельченную на холоду навеску тканей (100-200 мг) помещают в 10 мл 0,2 N хлористой кислоты, перемешивают и центрифугируют на холоду (3000 g 10 мин), осадок отмывают повторно хлорной кислотой и 5-10 мл охлажденного спирта для удаления кислоты, затем смесью спирт : эфир (1:1) и эфиром для экстракции липидов, оставляя в вакуум-экстракторе для осушения. К высушенному материалу добавляют 0,75 N КОН (1 мл щелочи на 100 мг материала) и проводят гидролиз при 37°С 18 ч. (или 5 мин кипячением). Суспензию охлаждают до 0°С, нейтрализуют по лакмусу хлорной кислотой и добавляют концентрированной $HClO_4$ до конечной концентрации 1-2%, перемешивают и центрифугируют на холоду при 5000 g 15 мин. Осадок еще дважды экстрагируют 1 мл 2% $HClO_4$. Супернатант содержит РНК, его нейтрализуют 40% КОН в присутствии бромфенолового синего и оставляют в холодильнике на 1-3 часа, осадок центрифугируют и отбрасывают, в насодсадке определяют РНК спектрофотометрически.

Для выделения ДНК к 50-100 мг ткани в центрифужной пробирке добавляют 1 мл 1 N NaOH и нагревают помешивая в кипящей водяной бане 5 мин (или 18 часов при 37°С). Гидролиза помещают на лед, добавляют 0,5 мл насыщенного раствора NaCl на 20% уксусной кислоте и через 3-5 мин выпавший белок осаждают центрифугированием на холоду при 600 g 10 мин. Осадок растворяют на холоду в 1 мл 1 N NaOH, повторно осаждают белки 0,5 мл NaCl и центрифугируют. Центрифугаты объединяют и осаждают ДНК тройным объемом охлажденного этанола. Через 1-2 часа на холоду осадок ДНК собирают центрифугированием при 600 g 10 мин на холоду, добавляют 5 мл 0,5 N HClo4 и помещают на кипящую водяную баню на 20 мин. Содержание ДНК в гидролизате определяют спектрофотометрически.

Широко распространенным количественным методом окраски **ДНК** клеток являлась **реакция Фельгена** (по Ченцов, 1988), что позволяет определять и фазы клеточного цикла. В основе реакции Фельгена лежит мягкий гидролиз ДНК на срезе фиксированной ткани, с последующей реакцией с реактивом Шиффа.

Реактив Шиффа готовят смешивая 1 г. диамантфуксина, 200 мл горячей дистиллированной воды, кипятят 15-20 мин, охлаждают до 50°С, фильтруют и добавляют 20 мл 1 N HCl, остужают до комнатной температуры и добавляют 1 г. Na_2SO_3; жидкость созревает сутки во флаконе темного стекла (из темно-красной до бесцветной), хранят в темноте.

При проведении реакции Фельгена срезы окунают в холодный раствор 1 N HCl, переносят в холодный 1 N HCl, затем 60°С 1 N HCl на 4-6 минут (можно гидролизовать 5 N HCl при 39оС 15 мин), затем вновь в холодный 1 N HCl и споласкивают дистиллированной водой. Затем помещают на 20-40 мин в реактив Шиффа (фуксинсернистую кислоты), после чего промывают в 4-х сменах серной воды (биусльфат калия или натрия: 1 г. Na_2SO_3 или $Na_2S_2O_5$ в 200 мл воды и 10 мл 1 N HCl), промывают дистиллированной водой и проводят мазки через спирты и ксилол, заключают в бальзам и микроскопируют. Можно докрасить 0,1% раствором светлого зеленого (зеленые ядрышки); ДНК приобретает красно-фиолетовую окраску.

Флюоресцентный зонд **Акридиновый оранжевый** (АО) способен связываться с 2-цепочечными нуклеиновыми кислотами (ДНК) с зеленым свечением (530 нм), преимущественно при низких концентрациях, и с одноцепочечными – РНК с красным свечением (640 нм) при более высоких концентрациях. Показано, что связывание его с ДНК пропорционально активному хроматину (но не прямо общему ДНК клетки); экстракция H1-гистона резко увеличивает окраску ДНК; интенсивность окраски АО значительно повышается (в разы) при активации ДНК митогенами [258], причем возможен анализ клеток по клеточному циклу [302], учитывая зеленое свечение ДНК и красное – РНК: увеличение красного свечения в G_1 фазу, красного и зеленого в S фазу и зеленого в G_2-M фазу.

Флюоресцентный зонд **Этидий** связывается с ДНК пропорционально концентрации последней.

9.2. Белковый обмен и ферменты

Синтез белков разного типа мало изменяется с возрастом или часто меняется циклически в процессе всего онтогенеза, отражая в большинстве случаев изменения процессов центральной регуляции. Снижение протеолиза белков, часто отмечаемое в старости, наряду со снижением их синтеза, видимо, также является регуляторно-компенсаторным феноменом.

Были изучены разные аспекты функционирования ферментов как функции возраста – активность, изомеры, индукция, кинетические параметры и пр. Для многих ферментов никаких изменений не отмечено. Не выявлено никаких специфических закономерностей в изменении ферментов определенных классов, одного и того же органа или клеточной органеллы.

Часто наблюдаемые изменения в составе изоферментов отражают переключения с возрастом в работе генов – в старости работают часто другие гены, синтезирующие другие изоформы данного фермента. Сдвиг к Н4-ЛДГ в мозге, сердце и скелетных мышцах, отмеченный для крыс в старости, может сделать эти ткани более аэробными.

Измерение индукции ферментов, особенно стероидными гормонами, указывает, что, в целом, в старости степень индукции снижается. Сни-

жение индукции ацетилхолинэстеразы эстрадиолом в старости происходит, скорее всего, за счет уменьшения уровня специфических для этого гормона рецепторов в ткани. Стимулирование регенерации, например печени, восстанавливает число таких рецепторов. Кинетические параметры ферментов (молекулярная масса, электрофоретическая подвижность, Км и др.) в большинстве случаев одинаковы для молодых и старых организмов. Однако, удельная активность ферментов, в расчете на очищенный фермент, часто снижается в старости, а их термочувствительность возрастает.

Характерное проявление общих принципов старения для «старения молекулы» – это снижение специфических функций и снижение степени резистентности к условиям внешней среды.

В целом, большинство авторов резюмируют, что изменения уровня ферментов с возрастом являются вторичными, отражающими регуляторные изменения в организме.

Синтез белка, видимо, значимо снижается с возрастом – срезы печени старых крыс синтезируют почти вдвое меньше белка, в сравнении с молодыми, в основном за счет снижения альбуминовой фракции [25].

С возрастом может изменяться количество **–SH** групп в макромолекулах. Это активные группы и снижение их количества отражается на функции ферментов, детоксицирующих свойствах организма и пр. Количество **–SH** групп можно определить в крови, например, методом йодометрического титрования [133].

Ультрамикроскопический метод определения –SH групп.

*К 0,01 мл крови (или 0,1 мл сыворотки) добавляют 1 мл дистиллированной воды, 1 мл 6 М KJ (приготовленного ex tempore), 3 капли 5% крахмала как индикатора, 3,9 мл фосфатного буфера pH 7,6 и фотоколориметрируют (ширина кюветы 2 см) при длине волны 500 нм, затем проводят реакцию с 0,3 мл 0,001 N раствора **J** (готовят из 0,1 N раствора), и через 10 минут вновь фотоколориметрируют при той же длине волны. Количество –SH групп в 1 мкМ будет равно 0,3*(Ек-Еа)/Ек. Небелковые –SH группы можно оттитровать после осаждения белка 2 мл 3% сульфосалициловой кислоты и центрифугирования.*

Известен ряд методов определения –SH групп: ацетат ртути(II) используют для амперометрического титрования SH-групп в пептидах и протеинах (7-50 мкг SH определяют с ошибкой + 2%), более перспективно использование ртуть-органических титрантов - о-оксимеркурбензойная кислота, о-оксимер-курфенил, этилртутьхлорид, п-диэтиламино-фенилмер-курацетат. Разработан визуальный метод титрования с исполь-зованием в качестве индикатора дифенилкарбазона (2 капли 0,2% раствора в спирте как индикатор); предложенный метод апробирован на веществах различных классов, содержащих сульфгидрильную группу, и практически является универсальным, 1-50 мг вещества определяются с относительной погрешностью 0,2—1,5 %.

Наиболее известен метод определения сульфгидрильных групп с помощью **титрования азотнокислым серебром**; принцип метода заключается в титровании раствора, содержащего сульфгидрильные соединения, раствором азотнокислого серебра, при котором образуются нерастворимые меркаптиды, в результате чего изменяется электропроводность раствора; изменение электропроводности регистрируется микроамперметром, поэтому метод часто именуется амперометрическим; предложен Кольтгофф и Гаррис, и модифицирова Соколовским (1993) для исследования крови.

Реакции на белки, пептиды и аминокислоты.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА ПО ПОГЛОЩЕНИЮ при 280 нм

Концентрация «условного» белка в растворе 1 мг/мл при длине оптического пути 1 см принимается равной 1,0 при длине волны поглощения 280 нм. Для точного определения следует строить калибровочную кривую по определяемому белку и учитывать поглощение нуклеиновых кислот в образце (поглощают максимально при 260 нм); предложена формула Калькара: **Содержание белка = 1,45 * A_{280} – 0,74 * A_{260} (мг/мл).**

БИУРЕТОВАЯ реакция, специфична на белок.

*В 0,2 М NaOH 1,5 г. $CuSO_4$ * 5 H_2O и разведение 1:5 Реакция: к 5 мл реактива 0,1 мл пробы белка, ровно 30 мин и ФЭК при $ОД_{546}$.*

В продаже есть готовый биуретовый рекактив, достаточно добавить к 0,5 мл пробы с 2% детергента (0,2 – 4 мг белка в пробе) 2,5 мл реактива, смешать и через 30 мин можно определять спектроскопически при 546 нм поглощения содержание белка в пробе против стандартной кривой (Watters, 1978).

НИНГИДРИНОВАЯ РЕАКЦИЯ, на пептиды и аминокислоты.

Оптимум: 0,2-2% нингидрин в ДМСО, этаноле, ацетоне (+1% ледяной уксусной к-т), 95°С, pH 5,0-6,0 (можно в щелочном), ФЭК при ОД 570 нм – фиолетово-синяя (про и о-про: 440 нм - желтая). Это реакция на амино-группу (и на аммиак - неспецифична).

Реакция с Кумасси синим. В отличие от других методов большинство буферов и других органических и неорганических соединений не влияют на реакцию. *Для приготовления раствора 10 мг Cumassie brilliant blue (G-250) гомогенизируют в стеклянном гомогенизаторе в 5 мл 95% фосфорной кислоты и разводят до 100 мл дистиллированной водой, фильтруют и хранят до 2-х недель. К 1,5 мл раствора содержащего 10-50 мкг белка добавляют 1,5 мл раствора красителя и через 3-5 мин измеряют оптическую плотность при 595 нм, с контролем против раствора кумасси без белка.*

Реакция с сульфосалициловой кислотой (турбодиметрия).

Реакция: 1 мл пробы + 3 мл 3% сульфосалициловой кислотыты, 5 мин и ОД 630-650 нм (красно-оранжевый цвет).

Реакция Сакагучи на аргинин.

Реакция: к 1 мл пробы + 2 капли 10% NaOH + 2 капли а-нафтола в этаноле + 2 капли гипохлорита. Розово-красный цвет– положительная реакция.

Реакция Фоля на цистеин.

Реакция: 1 мл пробы + 1 мл сульфата аммония +3 капли 5% нитропруссида натрия + 3 капли 30% NaOH. Пурпурный цвет – положительная реакция.

Ксантопротеиновая реакция на ароматические амионкислоты.

Реакция: 1 мл пробы + 3-5 капли концентрированной азотной кислоты, нагреть: желтая окраска положительная.

Реакция по Гессу на СИАЛОВЫЕ кислоты.

Кипячение с H_2SO_4 дает розовую окраску

9.3. Изменения отдельных белков при старении

КОЛЛАГЕН, ЭЛЛАСТИН И СОЕДИНИТЕЛЬНАЯ ТКАНЬ. Изменению коллагена с возрастом издавна придавали важное значение ввиду того, что он является основой соединительной ткани, играющей важную роль как в питании клеток, так и в строении механического каркаса, например, для сосудов.

Возрастной артериосклероз определяется именно изменениями состояния соединительной ткани, определяющими атеросклероз, гипертонию и снижение растяжимости сосудов.

Изменяется растворимость коллагена, устойчивость к механическому разрыву, к модификации ферментами и способность к обновлению. Обычно считают, что это – результат изменений ферментов, структурно модифицирующих коллаген. Однако, для короткоживущих видов, например мышей, ввиду длительной естественной обновляемости коллагена (сотни дней), прямые возрастные физико-химические изменения его являются удобной моделью изучения непосредственно химических причин старения молекул, а также удобным показателем определения биовозраста животных.

Для человека, живущего на два порядка дольше, эти чисто физико-химические явления старения коллагена носят второстепенный характер. Основными причинами физико-химического старения коллагена являются неконтролируемые химические реакции, температуро-индуцируемые нарушения структуры и естественным образом возникающие свободные радикалы и перекрестно-связывающие химические агенты, в частности, ионы тяжелых металлов (последние, видимо, важны в первую очередь для возраст-зависимых перекрестных сшивок ДНК).

АЛЬБУМИН И ГЛОБУЛИН КРОВИ.

Изменения А/Г коэффициент с возрастом отражают как снижение метаболизма белка (альбумина печенью), так и повышение аутоиммунных реакций. Формула регрессии составляет для крыс:

$$А/Г = 0{,}754 – 0{,}014 * \text{Возраст (мес)} \qquad (49)$$

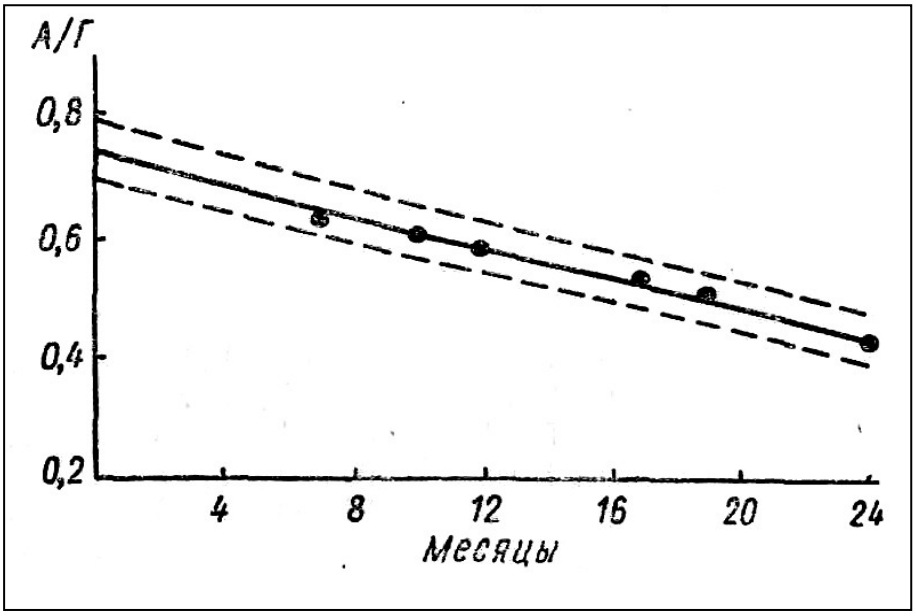


Рисунок 51. Возрастные изменения альбумин / глобулинового коэффициента в крови крыс (по Коломийчук, 1972)

9.4. Углеводный обмен и старение

Потребность и использование углеводов с возрастом снижается (наряду с повышением потребности в витаминах и микроэлементах, содержащихся в овощах и фруктах). Уменьшаются запасы гликогена в мышцах и печени. Изменяется гормональное обеспечение процессов утилизации глюкозы с повышением контраинсулярных влияний и развитием относительной недостаточности инсулин-зависимых процессов. Повышается активность глюконеогенеза в тканях с повышенным уровнем утилизации лактата.Типичным является недостаточность лактозы в желудочно-кишечном тракте, определяющая плохую переносимость молока в старости. Типично повышение содержания глюкозы в крови и ухудшение показателей теста с сахарной нагрузкой..

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ

Можно использовать имеющиеся в свободной продаже глюкометры, работающие с тест-**полосками** на глюкозу.

Можно использовать экспресс-реакцию с **пикриновой кислотой** (по восстановлению ее сахарами крови до пикраминовой кислоты в щелочной среде). *К 0,2 мл крови добавляют 1,8 мл дистиллированной воды и 1 мл 1,2% пикриновой кислоты. Тщательно взбалтывают и фильтруют, пробирку и фильтр споласкивают 1 мл воды и. К 2 мл фильтрата добавляют 0,2 мл 10% NaOH, кипятят 3 мин на водяной бане, охлаждают и, взбалтывают и сравнивают цвет с цветной шкалой: 125 мг % сахара – светлооранжевый, 150 мг % - темно-оранжевый, 200 мг % - оранжево-коричневый, 300 мг % - темно-коричневый (для количественного определения можно воспользоваться стандартами и фотоколориметрией).*

Часто используют реакцию с **орто-толоидином**. *При этом к 0,9 мл раствора трихлоруксусной кислоты (30 г/л) добавляют 0,1 мл крови, взбалтывают и центрифугируют для удаления белка (15 мин при 1500 оборотов в мин на центрифуге типа ОПН-3). К 0,5 мл надосадка приливают 4,5 мл орто-толуидинового реактива, прогревают 8 мин на кипящей водяной бане, охлаждают под краном и колориметрируют при длине волны 600-650 нм или 595 нм (красный или желтый цвет). В контроле добавляют вместо крови кислоту, в стандартах – известные концентрации глюкозы. Орто-толуидиновый реактив готовят так: 0,15 г. тиомочевины растворяют в 94 мл ледяной уксусной кислоте и смешивают с 6 мл очищенного перегонкой (бесцветный или слабо желтый цвет) орто-толуидина; реактив устойчив длительно на холоду.*

9.5. Обмен липидов и старение

Типично повышение с возрастом содержания жира в организме и его избирательное накопление в определенных областях тела, что, во многом, определяется регуляторными изменениями, прежде всего для половых гормонов. Содержание холестерина крови растет с 20-30 лет до 60 (у мужчин) и 70 (у женщин) лет. Распад липидов выраженно снижается с возрастом, синтез липидов снижается медленнее. Фосфолипидный состав мембран клеток, видимо, достаточно постоянен с возрастом, в сыворотке крови количество их может изменяться весьма выраженно и разнонаправленно.

Повышение с возрастом уровня триглицеридов происходит, видимо, за счет снижения активности липопротеидлипазы - ключевого фермента липидного обмена; последнее также приводит к снижению антиатерогенных липопротеидов низкой и очень низкой плотности, стабилизирующих жиры крови. Жирные кислоты крови, один из существеннейших источников энергии для интенсивно работающих тканей (сердечная мышца, скелетные мышцы, печень), изменяются мало с возрастом или их уровень несколько повышается за счет снижения интенсивности окисления кислот при сохранении уровня их синтеза.

В качестве тестов на старение предлагается использовать измерение *флюоресценции липидных экстрактов тканей* [298]): показано линейное и интенсивное увеличение с возрастом флюоресценции экстрактов сердца семенников у мышей в связи с накоплением перекисей липидов при старении.

Накопление липофусцина происходит во многих тканях, в особенности в необновляющихся делением – нервных клетках, в сердце также накапливается до 0,3% объема за 10 лет [295]. *Методы выделения липопигментов* из различных тканей описаны [283].

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА

Можно использовать имеющиеся в свободной продаже холестериномеры, работающие подобно глюкометрам с тест-полосками на холестерин.

Часто используют также простую реакцию с хлорным железом**.** *При этом: к 1,3 мл ледяной уксусной кислоты добавляют 0,05 мл плазмы или сыворотки крови без признаков гемолиза, перемешивают и добавляют 1 мл цветного реактива (2,5 г. $FeCl_3$*6H_2O нагревают с 80 мл 83% ортофосфорной кислотой до растоврения и доводят объем до 100 мл; затем к 8 мл раствора хлорного железа добавляется серная кислота до 100 мл); перемешивают и встряхивают, через 30 мин колориметрируют при длине волны 530 нМ против контроля (то же без цветного реактива, вместо него добавляют 1 мл серной кислоты). Для количественных результатов используют стандартную кривую с известными концентрациями холестерина.*

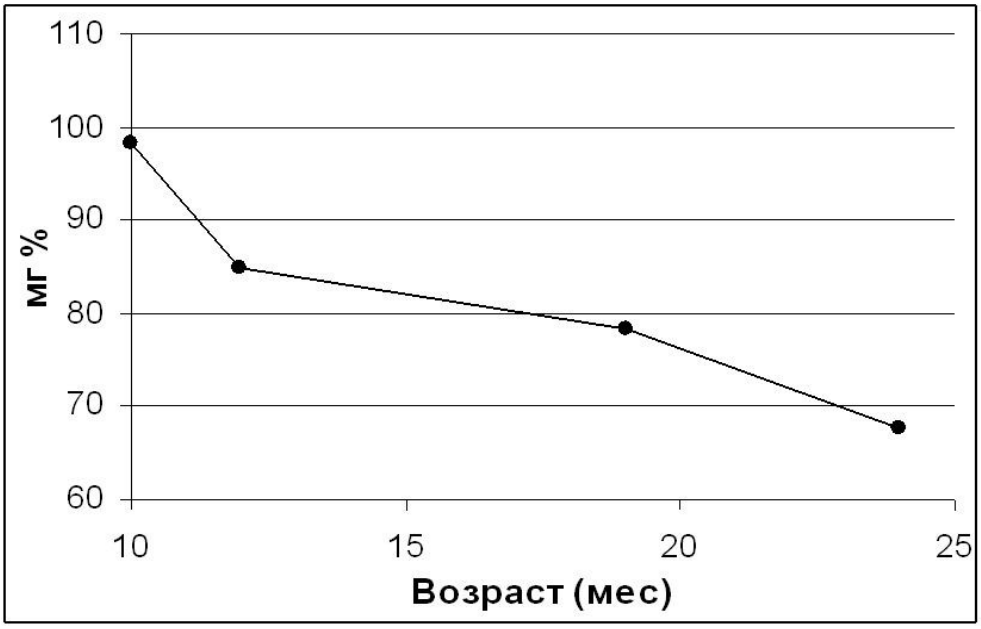


Рисунок 52**.** Фосфолипиды в печени крыс (по Коломийчук, 1972)

9.6. Энергетический обмен и старение

Способность генерировать и утилизировать энергию – ключевое явление для жизни, поэтому снижение основного обмена с возрастом эквивалент снижению жизненности вообще.

С возрастом снижается основной обмен, что отражает общее снижение жизнеспособности организма.

Большинство авторов отмечает снижение поглощения кислорода тканями с возрастом, особенно для сердечной мышцы, как для эндогенного дыхания, так и в присутствии субстрата (кроме сукцината, при использовании которого потребление кислорода тканями старого сердца такое же, как и молодого).

Содержание различных метаболитов цикла Кребса меняется разнонаправленно для разных органов. Отмечается падение активности сукцинатдегидрогеназы.

Количество пиридиновых коферментов в старости растет на 10-30% в основном за счет их восстановленных форм (НАД·2Н и НАДФ·2Н), что отражает нарушения в самом начале цепи дыхания митохондрий. Содержание этих коферментов растет в цитоплазме и снижается в мито-

хондриях. В пересчете на единицу белка митохондрий активность цитохромоксидазной системы митохондрий растет и увеличивается сопряженность процессов дыхания с фосфорилированием, однако в расчете на единицу белка ткани она падает.

Изменение гемодинамики и развитие тканевой гипоксии также вносят свой вклад в изменение энергообмена тканей с возрастом.

Образование АТФ в реакциях гликолитического фосфорилирования до уровня пирувата и лактата не требует участия кислорода. Отмечено повышение мощности лактат-формирующих и утилизирующих процессов в тканях, а также утилизации аминокислот в реакциях глюконеогенеза, хотя данные об изменениях процессов гликолиза с возрастом противоречивы. Отмечают повышение в печени в 2 раза активности лимитирующего гликолиз фермента – гексокиназы.

При старении закономерно отмечают снижение концентрации главных поставщиков энергии – АТФ и креатинфосфата в тканях, при выраженном снижении скорости их обновления. АТФазная активность некоторых тканей, однако, повышается. О напряженности энергообмена судят по соотношению моно- , ди- и трифосфатов (энергетический заряд Аткинса). Снижение его с 0,85 до 0,53 в сердце и других тканях в старости говорит об активировании энергосинтезирующих процессов при снижении энергопотребляющих, то есть, о диспропорции и напряженности энергообмена в старости.

Во многих случаях источником энергии для ферментов является восстановленный никотинаминадениндинуклеотид (**НАД*Н**), имеющий максимум поглощения при 340 нм, в отличие от $НАД^+$, имеющего максимум поглощения при 260 нм, при коэффициенте молярного поглощения (Км) НАД (НАДФ) при 340 нм равного $6,22 * 10^3$ M^{-1} $см^{-1}$.

*Это позволяет рассчитывать количественно потребление НАД*Н в мкМ по отношению снижения флюоресценции при 340 нм (умножив на объем в мл реакционной смеси и разделив на 6,22).*

Для общей оценки энергетики клетки предложен индекс активации митохондрий в живых клетках: отношение флюоресценции ФАД к НАД*Н (по Карнаухов, 1976, 1978) при 365 нм длины волны возбуждения флюоресценции:

Коэффициент активности митохондрий = (F_{530}-0,5* F_{465}) / F_{465} (50)

Таким образом, с возрастом происходят разнонаправленные изменения в клеточном обмене и внутриклеточных компонентах, отражающие как общее затухание обмена веществ и функции клетки, так компенсаторные процессы. Главной причиной возрастных изменений клеток является затухание их клеточного самообновления – деления, что является регуляторным феноменом и может быть поэтому восстановлено внешними регуляторными влияниями, к том числе иммунофармакотропными средствами. Возрастной регуляторный иммунодефицит специфических Т-лимфоцитов-регуляторов роста всех типов тканей является современной предложенной нами иммунорегуляторной теорией старения.

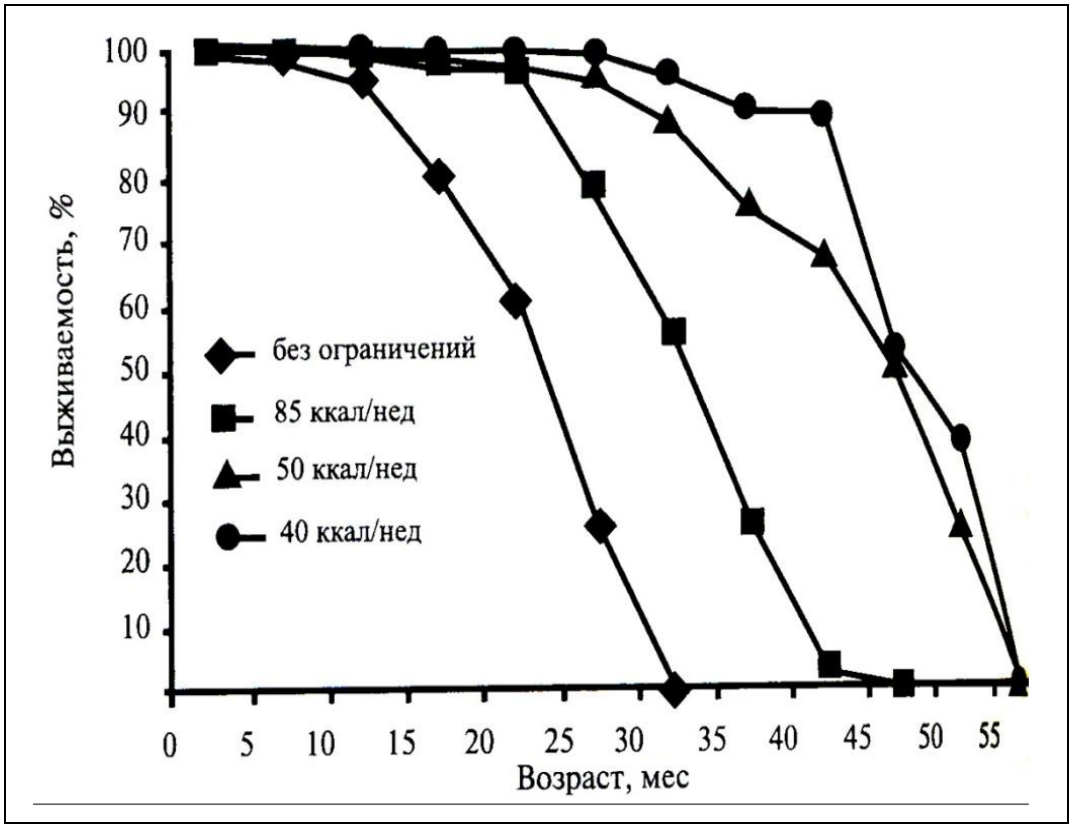


Рисунок 53. Влияние ограничения питания на длительность жизни мышей (по Кишкун, 2008).

Влияние на обмен путем ограничения питания – наиболее известный метод повышения длительности жизни у мышей и крыс, хотя для человека этот метод скорее всего не пригоден. Видимо, речь идет о влиянии на ско-

рость роста и развития, однако, у грызунов наблюдается также обычно снижение температуры тела. Наиболее эффективно снижение белков, а из них – триптофана, что может указывать на участие в процессе нейромедиаторов – производных триптофана. Известно, что ДОФА и серотонин противоположно регулируют иммунный ответ [40], а возможно, и другие функции, в том числе теплопродукцию и пр.

На рисунке ниже показано влияние различных режимов голодания на длительность жизни мышей.

9.7. Антиоксидантная система и старение

Молекулярный кислород сам по себе обычно не вступает в неконтролируемые химические реакции внутри организма, для его активации нужны ферментативные процессы – главные ферменты метаболизма кислорода у млекопитающих: оксидазы и оксигеназы. Но в каталитических центрах этих ферментов кислород испытывает превращения до конечных соединений, не выделяясь в среду и не подвергая опасности органические макромолекулы клетки, повреждающими же агентами являются активные формы кислорода (АФК), образующиеся в ряде физико-химических процессов в организме. Главные активные формы кислорода [100]:

- супероксидные радикалы (O_2^-),
- перекись водорода (H_2O_2),
- гидроксильные (свободные) радикалы ($^*OH$, HO_2^*),
- синглетные формы кислорода ($^1O_2$),
- ионы HO_2^-.

Основные механизмы появления АФК в организме связаны обычно с нарушениями функционирования электрон-транспортных цепей митохондрий или микросом, а также при изменении свойств дегидрогеназ. Особняком стоит нормальный процесс формирования АФК фагоцитами в ходе стимуляции неспецифической защиты организма.

Синглетный кислород образуется в реакициях фотоокисления в присутствии так называемых фотосенсибилизаторов: флавины, гематопор-

фирин, хлорофилл и др., а также при дисмутации супероксидных радикалов. Синглетный кислород агрессивен в отношении биосубстратов, в особенности в отношении молекул с двойной связью; конечным итогом таких реакций обычно является образование гидроперекисей органических молекул, играющих важную роль в процессах перекисного окисления ненасыщенных липидов в биомембранах. В присутствии металлов переменной валентности эти продукты запускают цепные реакции окислительной деградации биомолекул. Главным защитным механизмом такого процесса является бэта-каротин, переводящий синглетный кислород в триплетный, однако, обычная вода и альфа-□токоферол также способны вызывать такой процесс инактивации синглетного кислорода.

Во всех аэробных клетках в процессе присоединения одного электрона к молекуле кислорода образуются супероксидный анион-радикал - O_2^- и его протонированная форма – гидроперекисный радикал – HO_2^*; оба они порождают ряд других активных форм кислорода. Образование этих АФК наиболее существенно вблизи цепей переноса электронов – дыхательная цепь, микросомы и, в растительных клетках, хлоропласты. Эти АФК играют также важную роль в защитных **–** неспецифических иммунных механизмах организма: они выделяются в ходе активации при инфекционных и иных воспалительных процессах фагоцитирующих клеток (нейтрофилы, макрофаги, моноциты, эозинофилы). Супероксидный радикал может прямо инактивировать адреналин, аскорбиновую кислоту, а более активный гидроперекисный радикал – реагирует с линолевой, линоленовой, арахидоновой кислотами, окисляя их до гидроперекисей.

Образованию гидроперекисного радикала способствует закисление среды, он также свободно проникает через биомембраны, так как не несет заряда. Гидроперекиси липидов являются весьма активными соединениями и обладают высокой биологической агрессивностью. Для протекания цепного окисления липидов в биологических мембранах совершенно необходимы переходные металлы, в частности, ионы железа.

Простым и доступным методом определения продуктов перекисного окисления липидов является реакция с тиобарбитуровой кислотой.

Главным механизмом защиты организма от данных форм АФК является фермент – супероксиддисмутаза (СОД), активность ее обычно достаточна, чтобы инактивировать их в месте образования, не допуская диффузии в среде органических макромолекул.

Для определения концентрации супероксидных анион-радикалов используют методы электропарамагнитного резонанса (ЭПР-резонанс) и реакции оксиления интенсивно поглощающих соединений: цитохрома С, нитросинего тетразолия, адреналина и др. [175, 250, 253]. Для доказа-ельства специфичности этих реакций используют их подавление супероксид-дисмутазой.

Дисмутация супероксидных анион-радикалов под действием СОД в биологических тканях ведет к образованию перекиси водорода, способной легко проникать через мембраны клеток. Перекись водорода обнаруживается при фагоцитозе, при работе митохондрий и микросом. В присутствии ионов переходных металлов (например Fe^{2+}) перекись водорода может давать высоко активный гидроксильный радикал ($^{*}OH$). Этому процессу препятствуют главные высоко активные ферменты антиоксидантной защиты организма: каталаза и глутатион-пероксидаза. Измерение перекиси водорода в биосубстратах проводят обычно методом титрования перманганатом калия, реакцией с молибдатом аммония [70] или прямой спектрофотометрией при длине волны равной 240 нм [174]. Используют также пероксидазную реакцию, в ходе которой изменяется окраска индикатора, например, индигокармина [297], и флюориметричevкие методы [270].

Высокой реакционной способностью обладает гидроксильный радикал ($^{*}OH$), образующийся из перекиси водорода в присутствии ионов переходных металлов. Высокая реакционная способность определяет преимущественно местное воздействие этой формы АФК. Прямое повреждение ДНК при этом характеризуется разрывом цепи; с другими биомолекулами $^{*}OH$ образует вторичные свободные радикалы, в том числе перекисные соединения липидов [2? 264].

Главные типы повреждений биомолекул $^{*}OH$: отрыв атома водорода (таким образом повреждается лецитин – главный компонент биологических мембран, а также сахара в составе нуклеозидов ДНК); присоединение к молекулам по двойным связям (взаимодействие с пуринами и пиримидинами ДНК и РНК, в том числе с образованием вторичных радикалов); перенос электронов также является патогенным механизмом действия $^{*}OH$. В образовании гидроксильного радикала важное значение имеют ионы металлов с переменной валентностью, в первую очередь ионы железа. Ионы железа входят в большом количестве в состав организма

(гемоглобин, миоглобин и пр.); в крови они находятся в связанной форме – с трансферрином.

АФК могут образовываться также и при многих иных процессах в организме. Так, например, формирование АФК обычно сопровождает процесс инактивирования в организме ксенобиотиков [256, 284], потенцируя их повреждающий эффект.

Главные методы определения *OH: ЭПР, хроматография биомолекул для определения результатов их изменения под действием *OH и прямые химические методы определения таких агентов, важным является также метод хемолюминесценции биомолекул, обычно с использованием активаторов хемилюминесценции, наиболее известными из которых являются люминол, люциноген [160].

С возрастом изменяется скорость накопления соматических мутаций в разных тканях, причем она выше в печени, чем в мозгу [197]. Это позволяет ряду авторов говорить о возможности использования антиоксидантов в качестве геропротекторов и средств коррекции возрастной патологии, в том числе опухолей, так как риск их возникновения выраженно растет с возрастом [224-226].

АФК в процессах старения организма

Старение организма – сложный и многогранный процесс, он не может быть в принципе сведен к одному конкретному механизму (наши ссылки), но среди групп факторов, играющих важную роль в старении, безусловно существенное значение имеет механизм повреждения биомолекул разнообразными внешними влияниями.

Среди таких влияний одиним из наиболее значимых факторов оказался окислительный метаболизм – выяснилось, что его интенсивность обратно пропорциональна продолжительности жизни для многих далеко отстоящих друг от друга видов, хотя некоторые исследователи отмечают, что это соблюдается достаточно хорошо только для относительного (на единицу массы) значения его, причем в расчете на единицу активности супероксиддисмутазы – ключевого фермента антиоксидантной защиты организма [38, 57]. Основное положение свободно-радикальной теории старения было сформулировано в 1954 году D.Harman, предположившим, что универсальной причиной старения служит свободнорадикальное

окисление липидов, жиров и белков всех организмов кислородом воздуха). В дальнейшем было выполнено значительное число разнообразных работ в этой области, но каких-либо однозначно интерпретируемых результатов получено не было. Так, митохондрии (основной потребитель кислорода клеток) старых животных не отличались значимо от таковых молодых [69] по генерации супероксидного радикала, хотя отмечена структурная и функциональная неоднородность митохондрий старых животных, приводящая к значительным разбросам в результатах исследований и тенденция к повышению генерации АФК митохондриями старых животных все же имеет место [69, 223]. Аналогично, микросомы – другой значимый источник супероксидных радикалов, в старости генерируют в 2 раза меньшие количества АФК, снижение же активности СОД цитоплазмы происходит всего на 40%, что явно компенсирует эти изменения. В отдельных случаях активность СОД тканей может даже повышаться с возрастом. Активность ферментов антиоксидантной защиты, в принципе, зависит от нейроэндокринной регуляции и может, таким образом, подтверждать не теорию повреждений, а регуляторную теорию старения.

Активность СОД мозга долгоживущих мышей оказывается выше, чем для короткоживущих линий. Генетически измененные дрозофилы с повышенной активностью СОД живут дольше нормальных мух [267]. Ингибиторы свободнорадикальных механизмов (дибунол и пр.) увеличивают на 20-30% длительность жизни мышей [99, 214-216]. Для людей, однако, можно видеть противоположное – синдром Дауна с укорочением продолжительности жизни вдвое сопровождается ростом активности СОД тканей. Фармакокоррекция системы антиоксидантной защиты организма также мало достоверна – активность обычных ферментов (СОД, каталаза, пероксидаза) очень высока и специфична, поэтому способы фармакологического «тушения» антиоксидантов, видимо, мало эффективны в принципе. Более эффективны непрямые методы, например, нормализации функции митохондрий, где эффективны окись азота, кортикостероиды, тиреоидные гормоны.

В то же время, с возрастом безусловно повышается содержание в тканях человека и животных продуктов окислительного повреждения макромолекул, в том числе ДНК [38, 135-137, 268]. С нашей точки зрения, впрочем, это указывает лишь на снижение скорости метаболизма для организма в целом. Повреждения ДНК, однако, могут играть важную роль в

мутагенезе в старости [268]. Возможно, АФК стимулируют и апоптоз – программируемую гибель клеток, путем раскрытия каналов мембраны для белка, находящегося в межмембранном пространстве и запускающего этот процесс. АФК, несомненно, главный мутаген аэробных клеток.

АФК могут снижать скорость клеточного деления, возможно, влияя на так называемый «пределе клеточных делений Хейфлика» – культуральный феномен остановки клеточного роста после ряда пассажей культур на свежую среду. Возможно влияние АФК на ускоренное укорочение концевых (теломерных) участков ДНК – процесс, которому придают важную роль как в клеточном делении, так и в его ограничении [267].

Интересны данные получены при параллельном изучении продукции АФК тканями молодых и старых животных [3-5]. Показано, что в головном мозгу старых животных почти в 2 раза снижается активность СОД; это, однако, не приводило ни к повышению концентрации диеновых конъюгатов ни к повышению показателей перекисного окисления белков или общей антиокислительной активности (содержание аскорбиновой кислоты, токоферола, мочевой килсоты, тиоловых соединений – глутатиона и др.), концентрация же шиффовых основания даже снижалась.

В то же время, в печени старых животных существенно повышалась концентрация шиффовых оснований и продуктов перекисного окисления белков, также при снижении активности СОД в 2 более раза; но не изменялись уровень общей антиокислительной активности и содержание диеновых конъюгатов. В сыворотке старых крыс существенно повышалось содержание продуктов перекисного окисления липидов и белков при снижении активности СОД и общей антиокислительной активности сыворотки крови. В литературе отмечены данные о существенном снижении в сыворотке крови пожилых и старых лиц (60-97 лет) уровня глутатиона и повышение продуктов перекисного окисления липидов. Возможно, накопление продуктов перекисного окисления липидов в мозгу играет роль и в патогенезе возрастной патологии мозга, включая болезнь Альцгеймера. Интересно, что эти изменения идут на фоне существенного снижения с возрастом генерации АФК в тканях старых животных и человека. В связи с этим снижение активности ферментов антиоксидазной защиты может в этих условиях быть результатом чисто регуляторных изменений – приспособления к пониженной продукции АФК. Накопление же конечных продуктов повреждения тканей может быть результатом

иных процессов – прежде всего, результатом снижения метаболизма и физиологической регенерации большинства самообновляющихся тканей в старости – в этих условиях резко снижается обновление любых макромолекул и биологических структур, что создает возможности для персистенции измененных форм макромолекул вследствие общего увеличения длительности их жизни.

Сейчас все больше склоняются к мнению, что наиболее значимым при старении оказывается усиленное перекисное окисление белков, а не липидов, чему способствует снижение активности СОД как результата снижения общей продукции АФК.

Общий анализ данных об участии АФК в процессах старения и сопровождающих старение заболеваний позволяет ряду авторов утверждать, что повреждение под действием АФК макромолекул приводит к мутациям, нестабильности генома в целом и развитию ряда возрастных патологий: рак, сердечно-сосудистые заболевания, возрастная иммунодепрессия, дисфункция мозга, катаракта и др.

Конкретный механизм индукции старения свободными радикалами мало понятен. Предполагают, что АФК повреждают хроматин, ДНК, мембраны, коллаген, изменяют регуляцию внутриклеточного кальция и пр. Важным также является разнонаправленность изменений антиоксидантного статуса в различных органах, что соответствует и различной чувствительности к химическим канцерогенам и ионизирующему облучению. Скорость накопления соматических мутаций в разных тканях может также существенно различаться с возрастом, причем она выше в печени, чем в мозгу. Все это позволяет говорить о возможности использования антиоксидантов в качестве геропротекторов и средств коррекции возрастной патологии. Данные, полученные на трансгенных дрозофилах с дополнительными копиями гена СОД и каталазы показали увеличение средней и максимальной продолжительности жизни [267]; трансгенные мыши с избыточной экспрессией СОД, каталазы и глутатионпероксидазы обладали повышенной резистентностью к оксидативному стрессу, при снижении же активности этих генов мыши имели признаки преждевременного старения [228].

В процессах **оксидативного стресса** может принимать участие **церамид** [13] – компонент мембранных структур клетки и участник различных внутриклеточных сигнальных путей. Содержание церамида увели-

чивается в клетках в ответ на действие самых различных экстраклеточных сигналов в разных физиологических и патофизиологических ситуациях, роль липида в процессах роста, дифференцировки и гибели клеток при действии различных стрессорных факторов является доказанной. Уровень церамида резко увеличивается в различных клетках при действии противоопухолевых препаратов, γ-облучения и ряда токсических веществ, что предшествует апоптозу, некрозу или развитию воспалительной реакции. Повышение способности клеток и тканей образовывать и накапливать церамид наблюдается при атеросклерозе, диабете и нейро-дегенеративных заболеваниях наиболее часто возникающих в пожилом возрасте и в старости.

Экзогенный церамид, добавленный в культуральную среду молодых клеток, способствует формированию фенотипа старой клетки. Церамид вызывает экспрессию маркера старения клеток – β-галактозидазы, индуцирует дефосфорилирование pRb и его активацию, ингибирует регулятор клеточного цикла Cdk2, увеличивает концентрацию ингибиторов Cdk: p21/Sdi p27/Kip1 и индуцирует остановку клеточного цикла и морфологические изменения, характерные для старой клетки. Уровень церамида в клетках и тканях существенно увеличивается в условиях нормального старения организма животных и человека – в печени, гиппокампе, коре больших полушарий, мышечной ткани и поджелудочной железе. Основной причиной увеличения базального уровня липида является активация сфингомиелиназ на фоне подавления способности клеток метаболизировать церамид в старости.

В тоже время, кратковременное накопление церамида в стимулированных клетках молодых доноров – важное условие нормального ответа на действие тиреоидных гормонов и ряда других стимулов. Накопление церамида в старых клетках и клетках, подвергнутых воздействию стресса (CCl_4, NO), является важной причиной нарушения эффекта пролиферативных стимулов и гормонов. Церамид, препятствуя транслокации Rho и Arf в плазматическую мембрану, блокирует активацию тиреоидными гормонами, инсулином и ростовыми факторами фосфолипазы D.

Установлено, что возраст- и стресс-зависимые изменения обмена церамида и индуцированные церамидом нарушения регуляции активности фосфолипазы D обратимы. Подавление под действием α-токоферола в старых клетках печени активности сфингомиелиназ, приводящее к сниже-

нию массы церамида, сопровождается увеличением чувствительности клеток к действию тироксина и инсулина, что выражается в активации сфингомиелинсинтазы, кратковременном накоплении диацилглицерина (ДАГ) и последующем ДАГ/протеинкиназа С-зависимом увеличении активности фосфатидилхолин-специфичной фосфолипазы D.

По мнению Н.А. Бабенко моделируя пищевой статус организма старых животных либо состав среды культивирования клеток, можно направленно воздействовать на определенные звенья обмена сфинголипидов, снижать базальный уровень церамидов и реконструировать ответ клеток на действие гормонального стимула, измененные в старых тканях.

В процессе формирования **оксидативного стресса** образуются также цитотоксические карбонильные соединения и в том числе альдегиды. В клетках существует ферментативная система их утилизации, которая включает альдегидредуктазу (АР), альдегиддегидрогеназу (АЛДГ) и глутатионтрансферазу (ГТ). Эта система принимает участие в адаптации к повреждающему действию оксидативного стресса. Изменение ее состояния при старении может способствовать возрастному понижению адаптационных свойств организма.

Исследования [132] показали, что в печени взрослых (12-ти месячных) крыс активность всех изученных ферментов значительно превышает их величину в сердечной мышце. В печени активность НАДН-зависимой АР и ГТ в 68 и в 36 раз соответственно выше, чем в миокарде. При старении в печени происходит понижение активности НАДН-зависимой АР и АЛДГ на 36 %, по сравнению с их величиной у взрослых животных. Активность НАДФН-зависимой АР и ГТ существенно не изменяется. Аналогичная ситуация наблюдается и в миокарде: у старых крыс активность НАДН-зависимой АР и АЛДГ понижается на 35 и 45 % соответственно, по сравнению с их величиной у взрослых животных. По мнению авторов понижение активности ферментов катаболизма альдегидов выступает в качестве одного из факторов возрастания чувствительности тканей внутренних органов к оксидативному стрессу, в большей мере это касается миокарда, что предопределяет особое место заболеваний сердечно-сосудистой системы в возрастной патологии.

НЕКОТОРЫЕ ДРУГИЕ ЭФФЕКТЫ АФК

В последние годы все большее внимание привлекают физиологические эффекты АФК, которые оказались на удивление разнообразными. Так, кислороду и АФК придают важное значение в процессах эволюции и видообразования [121], у целого ряда клеток АФК вызывают повышение клеточного деления, причем показано, что это регуляторный эффект, реализуемый через специфические белки (NF-kB, c-Jun, p21, p44MAPK, c-fos). Достаточно изучен процесс регуляции АФК сосудистого тонуса. Общеизвестен и хорошо изучен механизм «дыхательного взрыва» фагоцитов, являющийся главным компонентом неспецифической иммунной защиты организма. Продуктам перекисного окисления липидов (ПОЛ) придают важное значение в процессах нормального обновления клеток и клеточных мембран

Действие внешних прооксидантов, повышенное потребление кислорода, ионизирующее и ультрафиолетовое облучение, загрязнение воздуха, воды и продуктов, недостаток естественных антиоксидантов (витамины Е, К, А, селен и пр.), врожденная недостаточность ферментов антиокосидантной защиты, другие состояния могут приводить к напряжению системы антиоксидантной защиты организма и вызывать так называемый «оксидативный стресс», проявляющийся на молекулярном, клеточном и организменном уровне. Подобный стресс, видимо, является патогенетическим моментом в развитии воспалительных, бронхолегочных и сердечно-сосудистых заболеваний.

Нами определялись некоторые показатели антиоксидантной системы у молодых и старых мышей. Значимые различия с небольшими индивидуальными вариациями отмечены для ТБК-активных вещество крови. Каталаза и пероксидаза не отличались по своей активности и были индивидуально вариабильны.

Окисленный глутатион (ОГ) определялся нами в современном тесте с хлористым палладием [146], который дает у авторов в несколько раз заниженные величины в сравнении с ранее определяемым классическим тестом с орто-фталевым альдегидом.

Рисунок 54. Общая схема системы антиоксидантной защиты организма и образования активных форм кислорода

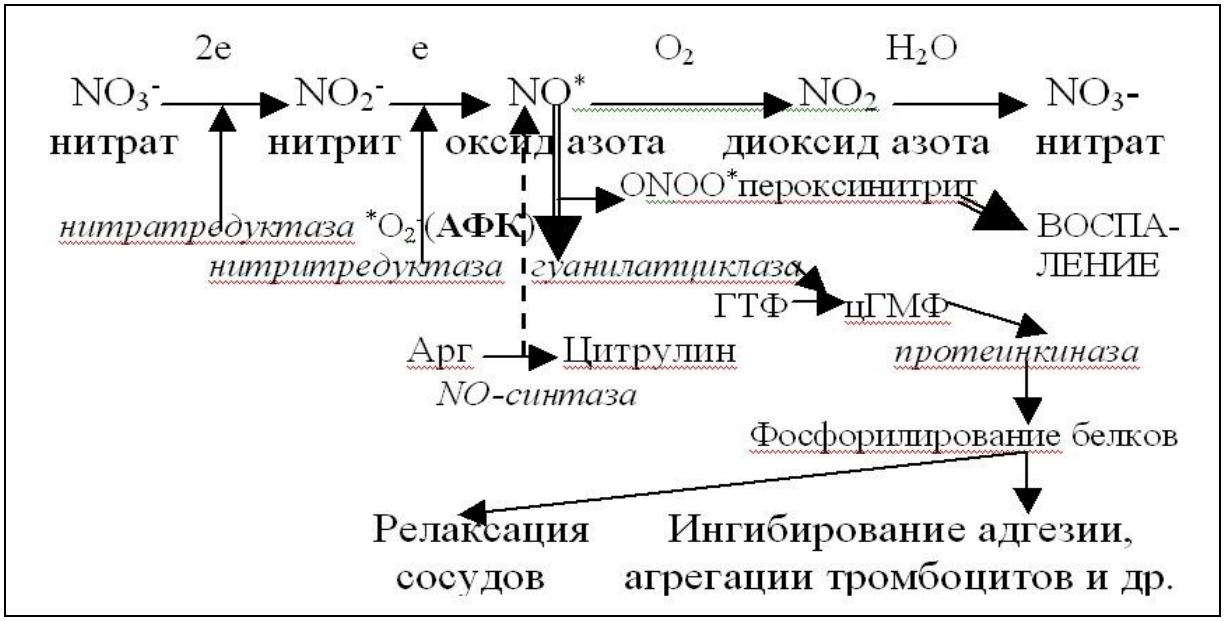


Рисунок 55. Схема взаимодействия системы активных форм кислорода и системы активных форм азота.

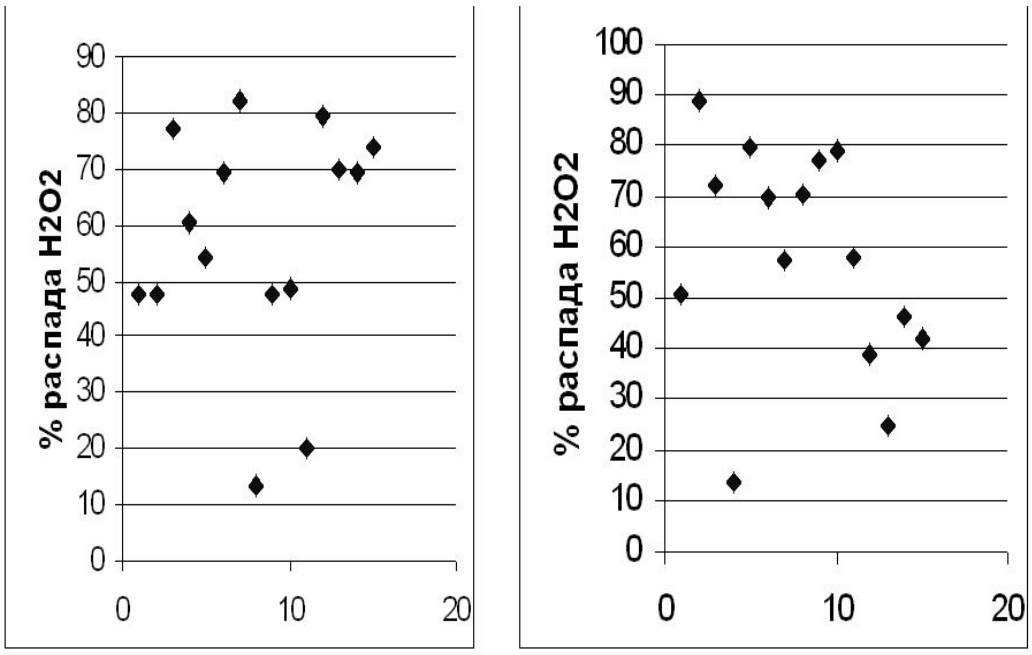


Рисунок 56. Возрастные изменения каталазы крови у мышей.
Слева – молодые мыши, справа – старые.

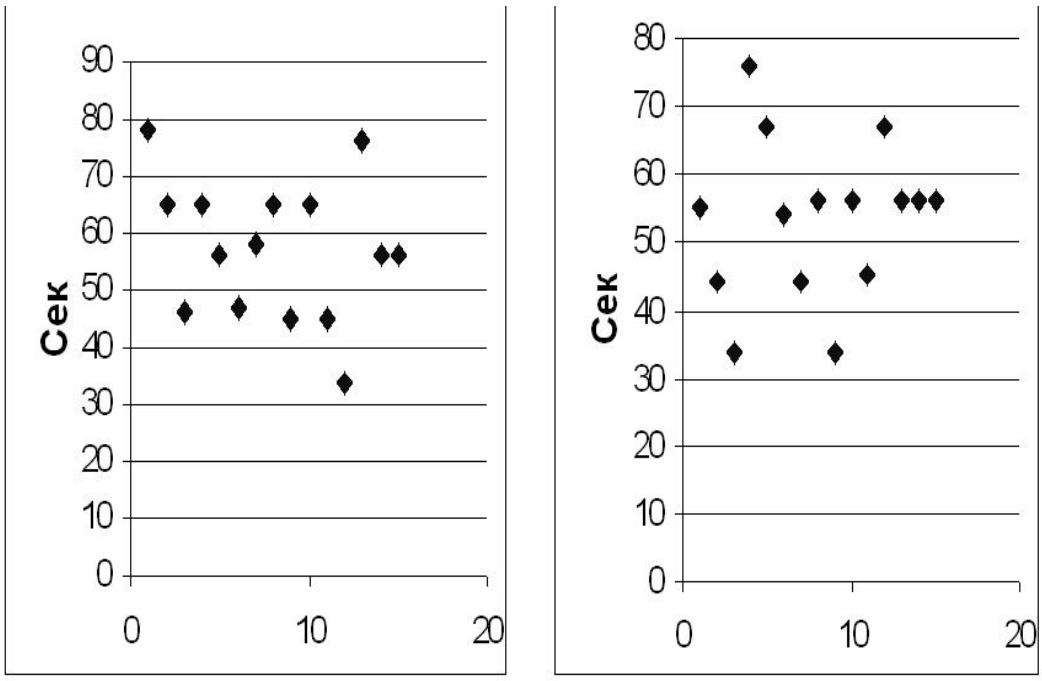


Рисунок 57. Возрастные изменения пероксидазы крови мышей
Слева – молодые мыши, справа – старые.

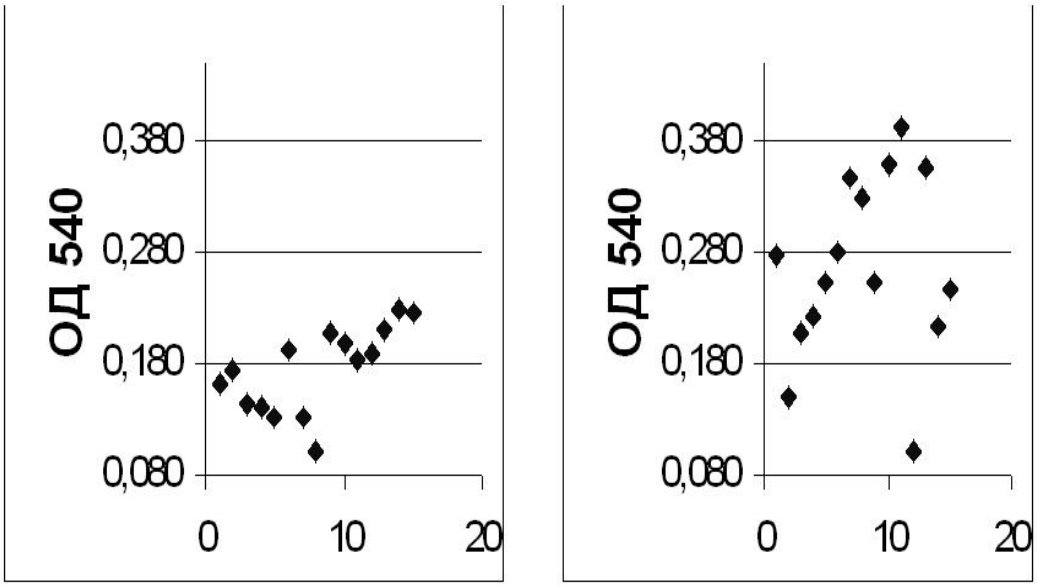


Рисунок 58. Возрастные изменения ТБК-активных веществ в крови у мышей. Слева – молодые мыши, справа – старые.

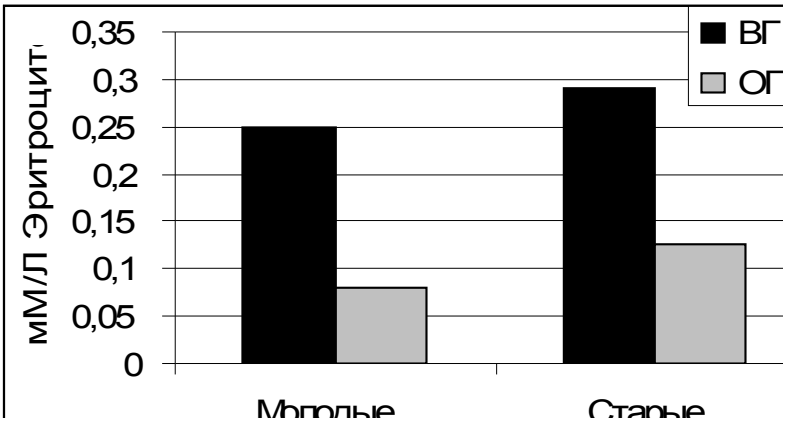


Рисунок 59. Возрастные изменения глутатиона крови у мышей.

Однако, более ранние данные по альдегидном тесту менее специфичны. Индивидуальные различия теста также велики (крайние значения нормы могут изменяться в разы), а определение ОГ часто ведется на уровне чувствительности метода. При интерпретации данных по ОГ у старых животных следует учитывать, что его значения могут быть быстро нормализованы при введении ряда биоактивных добавок к пище, что вряд ли означает столь же быстрое и интенсивное «омоложение» животных. К тому же, в настоящее время широко используется терапия «Глутоксимом», что ставит вопрос о патологическом характере данных изменений ОГ при старении.

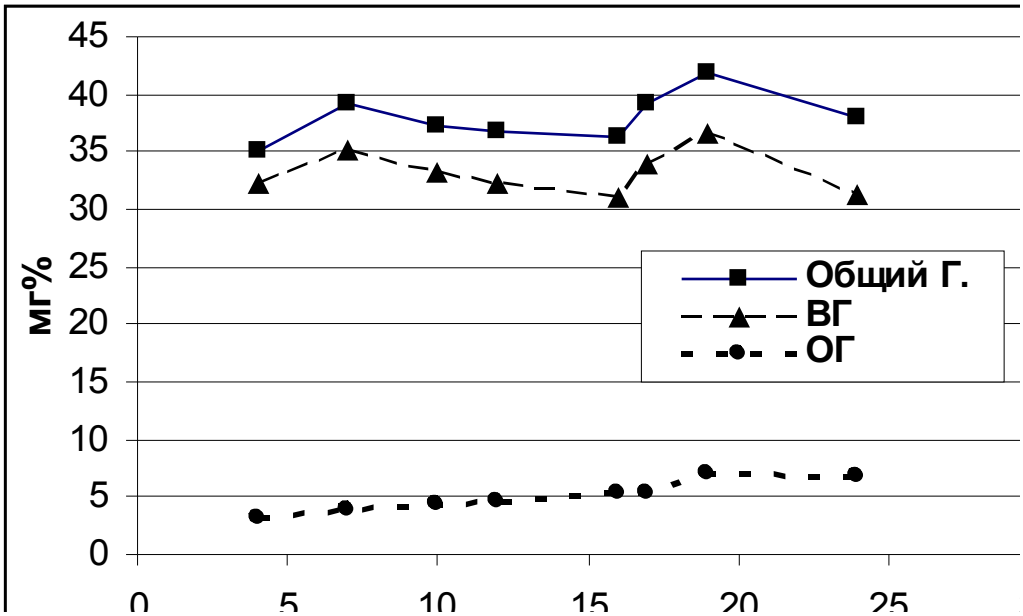


Рисунок 60. Возрастное содержание общего, восстановленного и окисленного глутатиона в крови крыс (по данным Коломийчук, 1972)

Уравнение возрастной регрессии (по Дубина, Разумович, 1975) для ОГ крови беспородных крыс представляется как:

ОГ = 2,50 + 0,188 *возраст (мес) (51)

Коэффициент корреляции для ОГ достигает r = + 0,776 (для беспородных крыс) и до 0,925 (для инбредных), однако, индивидуальные вариации могут перекрываться для молодых и старых животных. Данные также зависят от используемого метода определения ОГ и ВГ. Старые методы (с орто-фталевым альдегидом) дают завышенные в разы результаты и отражают, видимо, общий пул реагирующих с данным реактивом молекул.

Наши исследования у мышей с использованием метода с орто-фталевым ангидридом показали тенденцию повышения оксиленного глутатиона у старых мышей, но отличия были недостоверны по сравнению с молодыми мышами; восстановленный глутатион не изменялся с возрастом.

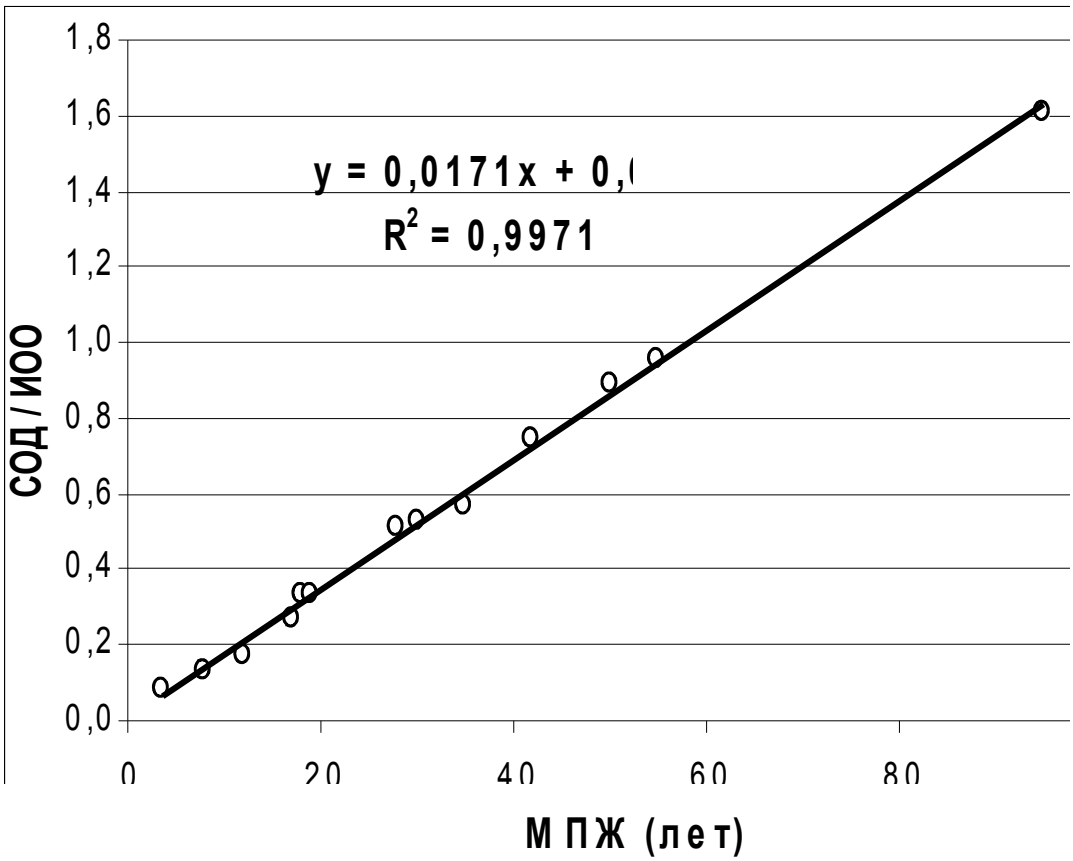


Рисунок 61. Связь максимальной продолжительности жизни и соотношения активность СОД / удельная продукция свободных радикалов (интенсивность основного обмена - ИОО) (по данным литературы)

Точки соответствуют в порядке повышения величин МПЖ видам: Домовая мышь, Оленья мышь, Тупайя, Беличья обезьяна, Галаго толстохвостый, Тамарин, Лемур, Зеленая мартышка, Макака резус, Павиан анибус, Горилла, Шимпанзе, Человек.

МЕТОДЫ

Состояние антиоксидантной системы отражает процессы повреждения тканей и составляет сущность свободнорадикальной теории старения.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИЕНОВЫХ КОНЪЮГАТОВ

В 100 мл колбу Эрлейнмеера приливают 0,5 мл плазмы или сыворотки крови, 1 мл воды и 10 мл смеси гептан-изопропанол (поровну); содержимое встряхивают 20 сек, оставляют на 10 мин и центрифугируют 10 мин при 1500-3000 оборотах в мин на центрифуге типа ОПН-3; отсасывают верхний (гептановый) слой и колориметрируют при 233 нм (диеновые конъюгаты) и 278 нм

(диенокетоны); в контроле используют дистиллированную воду..Результат выражают в единицах адсорбции (умножая на 2 для пересчета на 1 мл).

Норма для человека: 0,21±0,006 ед/мл для диеновых конъюгатов и 0,07±0,002 ед/мл для диенкетонов.

ТБК-активность крови. Оценивается общее содержание продуктов свободнорадикального повреждения – **ТБК-активных веществ**, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, выражая результат в единицах оптической плотности.

*Осадок трижды отмытых эритроцитов в количестве 0,05 мл гемолизируют 1 мл дистиллированной воды; добавляют 0,5 мл 17% трихлоруксусной кислоты и 0,5 мл 0,8% тиобарбитуровой кислоты; прогревают 10 минут на кипящей водяной бане и 10 минут центрифугируют при 3000 оборотов в минуту на центрифуге типа ЦЛС-3, после чего колориметрируют надосадок при длине волны 540 нм в кювете шириной 1 см. Концентрация в мкМ равна OD_{540} * 256,4 (коэффициент молекулярной экстинкции).*

Глутатион окисленный и Восстановленный (по Hissin etc. (1964).

Кровь в количестве 0,25 мл добавляют на холоду к 3,75 мл 0,1 М фосфатного буфера pH 7,4 с 0,005 М ЭДТА и 1 мл фосфорной кислоты для осаждения белков, центрифугируют на холоду при 100 000 g 30 минут и супернатант берут в опыт. Для определения ГВ 0,5 мл пробы добавляют к 4,5 мл фосфатного буфера с ЭДТА (в 2 мл конечной смеси содержится 0,1 мл крови), к 1,8 мл буфера добавляют 0,1 мл ортофталевого альдегида в метаноле (100 мкг на мл), перемешивают и выдерживают 15 мин при комнатной температуре, затем флюориметрируют при длине волны возбуждения 350 нм и регистрации 420 нм. Для определения ОГ 0,5 мл пробы инкубируют с 0,2 мл NEM 30 минут при комнатной температуре и добавляют 4,3 мл 0,1 N NaOH; 0,1 мл смеси добавляют к 1,8 мл 0,1 N NaOH и 0,1 мл ортофталевого альдегида. Реакцию регистрируют при тех же параметрах флюоресценции. Стандарты – ГО и ВГ в тех же реакциях.

Хемилюминесценция мочи.

Как и ХЛ сыворотки крови, используется для исследования свободно-радикальной активности биологических жидкостей.

Метод заключается в регистрации ХЛ люминометром, различают спонтанную и индуцированную (ионами Fe^{2+}) ХЛ.

Кривая записи хемилюминесценции мочи, индуцированной ионами железа по своему внешнему виду напоминает свечение плазмы крови. В ней также можно выделить спонтанное свечение, быструю вспышку, возникающую в момент добавления солей двухвалентного железа. Дальнейшее развитие свечения зависит от величины pH мочи, концентрации ионов железа. Медленная вспышка возникает, если pH мочи колеблется от 4,5 до 5,5 ед., а начальное содержание железа в среде инкубации составляет 2,5 - 5 мМ. Увеличение pH мочи, как и повышение концентрации инициатора, ведет к постепенному слиянию медленной вспышки с быстрой. Светосумма свечения максимальна при колебаниях pH мочи от 5,0 до 5,5 ед. и концентрации ионов Fe^{2+} порядка 2,5 мМ.

Показано, что в отличие от плазмы крови, в моче за время медленной вспышки не накапливаются продукты перекисного окисления липидов – ни малоновый диальдегид, ни диеновые конъюгаты. На характер хемилюминесценции мочи не влияют такие антиоксиданты, как, например, ионол, подавляющий перекисное окисление липидов и угнетающий свечение крови. В то же время хемилюминесценция мочи снижается при добавлении перехватчиков активных форм кислорода – тиомочевины, гидрохинона, Наоборот, свечение усиливается в присутствии люминола, избирательно активирующего излучение, возникающее при взаимодействии радикалов кислорода. Хемилюминесценция мочи связана с образованием свободных радикалов неорганической природы – активных форм кислорода при окислении добавленного в мочу инициатора хемилюминесценции – ионов двухвалентного железа. Существенно, что интенсивность хемилюминес-ценции мочи зависит от функциональной активности почек, в частности, коррелирует с показателями выделительной и концентрационной функции, с клиренсом креатинина.

Каталаза (по Королюк и др., 1988). *Трижды отмытые эритроциты гемолизируют 1:500 и к 0,1 мл гемолизата добавляют 2 мле 0,03%*

перекиси водорода, через 10 мин. реакцию заканчивают добавлением 1 мл 4% молибдата аммония. Результат выражают в процентах распада перекиси.

Пероксидаза (по Асатиани В.С., 1960). *Трижды отмытые эритроциты гемолизируют 1:100 и 0,2 мл гемолизата смешивают с 2 мл ацетатного буфера, 2 мл 2 N серной кислоты и 2 мл 0,3% перекиси водорода. Оценивают реакцию по времени в сек (в норме порядка 40 сек) в присутствии 1 мл 0,001 N (0,466%) индигокармина по изменению цвета – из синего через зеленый в нейтральный и слабо розовый. Ацетатный буфер (0,001 N с pH 4,7) готовят смешиванием равных объемов 0,2 N уксусной кислоты и 0,2 N ацетата натрия).*

Супероксиддисмутаза (СОД). СОД является, видимо, важнейшим ферментом в антиоксидазной системе защиты организма, отражающей способность инактивировать активные формы кислорода на самых начальных стадиях и специфична для супероксидного иона. До настоящего времени нет достаточно точных и воспроизводимых методов, дающих одинаковые результаты в различных лабораториях.

Нами для исследования активность СОД в гемолизатах эритроцитов был выбран специфический и достаточно точный метод [141]*, принцип которого состоит в конкуренции СОД и нитросинего тетразолия (НСТ) за супероксидные анионы, образующиеся при аэробной реакции НАД*Н и феназинметасульфата (ФМС). В присутствии СОД восстановление НСТ пропорционально снижается, на основании чего можно определять активность СОД по проценту ингибирования реакции; для стандартизации реакции обычно используется известная СОД с построением калибровочной кривой. Для определения в реакции концентрации основного реагента – НСТ восстановлекнного (гидразинтетразолий) используется интенсивность светопоглощения при длине волны 540 нм.*

*Используемые реактивы: 0,15 М pH 7,8 фосфатный буфер, Трис-ЭДТА буфер с pH 8,0, основной реагент "I" (ЭДТА 62 мг + 500 мг НСТ + 92 мг ФМС в 1 л фосфатного буфера с pH 7,8), Реагент "II" (НАД*Н 76, 3 мг в 100 мл ТРИС ЭДТА, pH 8,0). Оптимальная температура – 25°С.*

Подготовка проб (по Дубина и др., 1988): кровь и отмытые эритроциты лизировали 10 объемами 5 мМ Трис HCl с pH 7,4 и мешающий определению гемоглобин осаждали добавлением 0,25 мл 96° спирта и 0,15 мл хлороформа, размешивая 15 минут на холоду и центрифугируя 15 мин

при 12000 g при 4°С (6 тыс. оборотов в мин) или, соответственно другим источникам, 5 минут на холоду и центрифугируют при 5000 g (3,5 тыс. оборотов в мин на центрифуге ЦЛС-3). Для регистрации реакции в большинстве случаев достаточно использовать для характеристики СОД, как и каталазы, значения, полученные непосредственно при измерения хода реакции: экстинкция проб.

Люминесценция крови спонтанная и индуцированная.

К 0,1 мл трижды отмытых эритроцитов в 0,15 М фосфатном буфере рН 7,5 добавляют 0,4 мл $FeSO_4$ (3 мкг/мл) для регистрации спонтанной флюоресценции и затем через 1 мин 0,2 мл 2% перекиси водорода для регистрации индуцированной флюоресценции. Исследуют кинетику свечения на люминометре.

Перекись водорода в клетках.

Перекись водорода в лейкоцитах крови (и иных клетках) можно определять с помощью красителя *дихлорфлуоресцеина диацетата* (длина волны возбуждения – 515 нм и излучения – 575 нм) методом проточной цитометрии по стандартной методике (Model M.A et al., 1997), в качестве критерия работы системы используют классический стимулятор фагоцитов форболмиристил ацетат (ФМА), который добавляют в дозе 100 нг/мл за 30 минут до окончания инкубации, что индуцирует в фагоцитах «кислородный взрыв».

Регистрация активных форм кислорода в нейтрофилах.

*Обычно используют **хемилюминесценцию люминола** или люциногена (20 мкМ) на люминометре, исследуя фоновую активность и различные активаторы фагоцитоза.*

*Известна также реакция **инактивации цитохрома С** активными формами кислорода. Обычно 5 млн клеток в 1 мл инкубируют 1 час с исследуемым веществом, затем 0,1 мл взвеси клеток инкубируют с 1 мл раствора цитохрома С при 37°С и через 10 минут в супернатанте регистрируют оставшийся цитохром С (Км $ОД_{550}$ = 21,1 *10^3 $м^{-1}$).*

*Пероксидазную активность нейтрофилов исследуют обычно в **пробе** с **бензидином**. На мазок клеток на предметном стекле наносят 10 капель 0,1% бензидина (0,1 г. бензидина и 1 мл насыщенного нитропрсуусида натрия в 100 мл 95% спирта), инкубируют 15 минут и добавляют 5 капель перекиси, через 3 минуты отмывают и высушивают; моноциты окрашиваются в синий цвет.*

Глава 10.
Другие методы изучения старения

10.1. Изучение кристаллизации сыворотки крови

Метод кристаллизации биологических жидкостей В.Н.Шабалина, С.Н.Шатохиной [148] показал высокую чувствительность к различным нарушениям внутреннего состояния организма, а также корреляцию с возрастом. Высыхающая капля сыворотки крови образует единую четкую структуру для молодого здорового организма, которая нарушается, с образованием лакун и вкраплений, при нарушениях внутренней среды. Это одна из наглядных иллюстраций представлений о связи старения с нарушением порядка (нарастанием энтропии) как главной причины старения: кристалл является символом наивысшего порядка, нарушение кристаллизации вплоть до аморфного состояния – отражение нарастания энтропийных процессов.

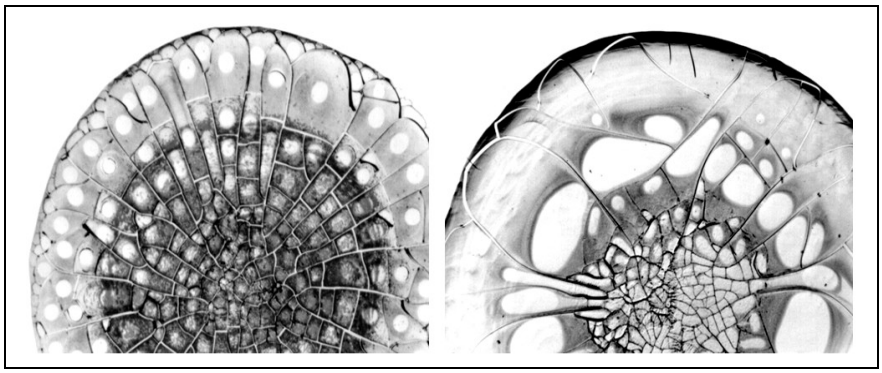


Рисунок 62. Кристаллизация капли сыворотки крови молодого (слева) и старого доноров (по Шабалину, Шатохиной, 2000)

10.2. Изучение корреляционных связей биомаркеров

Корреляционные связи между различными функциями являются тем, что соединяет различные части (органы, ткани, функциональные системы)

в единый организм, реагирующий целостным образом на все изменения внешней и внутренней среды. Поэтому изменения корреляций прямо отражается на интегральной способности организма и отражают также изменения в системах регуляции, роста и развития организма.

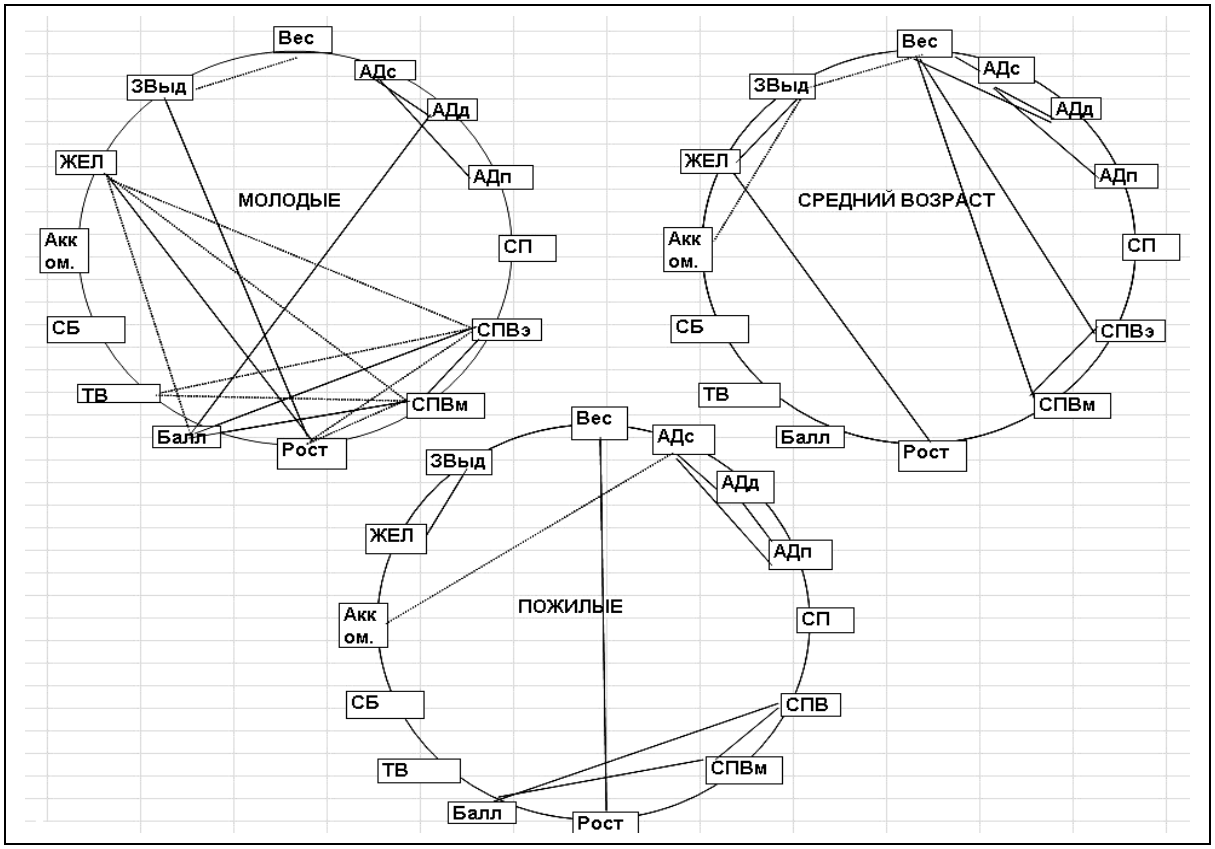


Рисунок 63. Изменение корреляций между маркерами биовозраста для различных возрастных групп (собственные данные)

Обозначения**:** СПВ-скорость пульсовой волны (эластического и мышечного типов), СП – слуховой порог, ТВ – тест Векслера, СБ – статический баланс, Акком. – аккомодация, ЗВыд. – время задержки выдоха, ЖЕЛ – жизненная емкость легких.

Мы исследовали изменения корреляций между важнейшими биомаркерами [52], входящими в известный отечественный тест биологического возраста [140]. Как иллюстрирует рисунок, с возрастом изменяется количество корреляционных связей и само их качество – то, какие биомаркеры коррелируют между собой. В целом, количество корреляций значительно снижается у пожилых, что отражает по существу увеличение энтропии – распад единого целого на подсистемы, слабо взаимодействующие друг с

другом и в меньшей степени формирующие единое целое. Хорошо видно изменение таких корреляций на примере корреляций веса тела: если в молодом возрасте вес связан только с показателем общего развития (время задержки выдоха), то в среднем возрасте при добавляется связь с показателями сердечно-сосудистой системы: артериальным давлением (систолическим, диастолическим и пульсовым) и скоростью пульсовой волны; в пожилом возрасте корреляция веса имеется только с ростом – наиболее грубая корреляционная зависимость, вес перестает зависеть от показателей общего развития и мало влияет уже на состояние сердечно-сосудистой системы.

10.3. Скорость распространения пульсовой волны (СПВ)

СПВ является хорошим показателем биологического возраста у человека и может измеряться по различных участках артериального русла [35]; показатели плечелодыжечной СРПВ очень высоко коррелируют ($r = 0{,}87$, $p < 0{,}01$) со скоростью пульсовой волны в аорте, которая была определена инвазивным методом [319]. Однако, у животных определение этого показа-теля на практике встречает значительные трудности.

10.4. Неинвазивная оценка старения кожи

Кожухова Е.В. и Деев А.И с соавт. исследовали возрастные изменения кожи практически здоровых лиц мужского пола в возрастном диапазоне от 7 до 70 лет с помощью простых, быстрых, неинвазивных методов, основанных на измерении собственной флуоресценции кожи (флуориметрия) и скорости проведения звуковой волны (акустовелосиметрия) в коже определенных точек кисти.

Оценка механических свойств кожи проводилась по измерению **скорости распространения звуковых волн** (5,7 кГц) в коже кисти в области локализации сухожилий. Измерения проводились как с помощью портативного прибора АСА-5, так и на установке, где датчик АСА-5 был подключен к интерфейсу MacLab компьютера Macintosh. Скорость проведения звука на правой руке, измеренная на приборе АСА-5

коррелировала с возрастом с коэффициентом линейной корреляции 0,71 и возрастным инкрементом 0,125 год$^{-1}$. Время задержки звуковой волны, измеренное с помощью интерфейса MacLab, коррелировало с возрастом с коэффициентом линейной корреляции 0,63 и возрастным инкрементом 0,162 год$^{-1}$. Возрастная детерминация параметров проведения звука на правой руке была значительно выше чем на левой.

Интенсивность флуоресценции (длины волн возбуждения – 340-370 нм и флюоресценции – 420-470 нм) кожи подушечек пальцев рук, измеренные на специально сконструированном приборе, коррелировала с возрастом. Коэффициенты линейной корреляции (R) варьировали в зависимости от участка кожи от 0,50 до 0,66. Возрастная зависимость усредненной величины флуоресценции (F),измеренная на 4 пальцах, апроксимировалась полиномом 3-ей степени:

$$F = 0{,}50+0{,}158*T - 0{,}005*T^2+(5{,}46*10^{-5})*T^3$$

(R1 = 0,38, R2 = 0,62, R3 =0,71, n= 168), (52)

где T - хронологический возраст, годы.

Флюоресценция липидных экстрактов. Это известный старый метод изучения накопления липидных веществ с возрастом. *Ткань пробами по 200 мг гомогенизируют при 45°C в смеси хлороформ-метанол (2:1) в 20-кратном избытке к массе ткани, затем через 1-1,5 мин экстракции липи-дов добавляют равный объем воды и центрифугируют для разделения фаз. Измеряют флюоресценцию отобранной хлороформной фазы непосредст-венно или после разведения метанолом.* Показано, что максимальную флю-оресценцию дают экстракты ткани сердца и яичек. С возрастом флю-оресценция экстрактов ткани сердца увеличивается в 2 раза, яичек – в 8 раз; разброс в последнем случае велик для старших возрастов (практически перекрывается с молодыми возрастами). Имеется 2 максимума спектра флюоресценции экстрактов, которые смещаются с возрастом вправо: с 320 нм до 470 нм и с 420 нм до 470 нм.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на большое число предложенных методов оценки старения у экспериментальных животных, остается неясным насколько они отражают процесс старения и насколько они эффективны в его оценке.

Мы исследовали панель из более чем 30 методов оценки различных сторон старения у мышей, с целью отбора наиболее информативных, с наименьшим индивидуальным разбросом и наибольшими изменениями с возрастом методик, которые могли бы быть полезны для быстрой оценки влияния на процесс старения различных геропрофилактических и биоактивирующих средств (таблица 8).

Исследование несколько десятков параметров, отражающих общее состояние животных и различные стороны процесса старения, указывают, что лишь немногие тесты могут быть использованы для рутинных исследований в целях скрининга средств геропрофилактики и биоактивации, так как большинство тестов имеют значительные индивидуальные различия или мало отличаются для молодых и старых животных.

Наиболее значимыми являются, видимо, показатели физической силы, основного обмена, показатели, отражающие старение иммунной системы, содержание ТБК-активных веществ в крови; ростовой потенциал ткани на основе реакции гиперплазии слюнных желез на изопротеренол.

Таблица 8.

Биомаркеры старения у мышей

Тест	Молодые (3 мес)				Старые (12 мес)				
	M	**m**	**Max**	**Min**	**M**	**m**	**Max**	**Min**	**P<**
Общие									
Общий Бал	4,00	0,00	4,00	4,00	3,17	0,48	4,00	2,00	н/д
Рост (мм)	88,9	1,8	91	86	101,3	2,2	105	98	0,001
Хвост (мм)	86,6	3,0	92	82	93,2	2,2	96	90	н/д
Вес (г)	18,4	1,3	21	17	27,4	0,9	29	25	0,001
Энергообмен									
O_2 (Л/(кг*час)	5,60	0,51	6,74	5,05	5,29	0,53	6,57	4,64	н/д
t°C	38,7	0,13	39,0	38,6	38,0	0,18	38,2	36,2	0,01

Активность									
Стоек (за 5 мин)	11,2	2,9	16	7	15,3	3,1	21	10	н/д
Тест квадратов (за 5 мин)	80,3	21,9	112	44	86,1	32,9	144	30	н/д
Сила									
Висение (Сек)	1009	359	1565	325	149,4	75,6	368	40	0,05
Динамометр(г силы)	48,4	14,0	69,0	30,5	60,6	17,1	90,4	18,7	н/д
ОВИМ (мг/г)	4,68	0,53	5,69	4,11	3,55	0,34	4,15	2,94	н/д
Масса внутренних органов									
Почки (мг/г)	10,6	0,8	11,8	9,2	10,1	1,6	11,9	6,3	н/д
Печень (мг/г)	42,93	3,52	49,76	36,68	46,67	3,59	52,64	40,44	н/д
Сердце (мг/г)	4,64	0,32	5,33	4,00	4,70	0,33	5,19	4,25	н/д
Иммунная система									
Тимус (мг/г)	2,41	0,31	2,92	1,89	0,92	0,18	1,19	0,63	0,001
Селезенка (мг/г)	5,34	0,54	6,79	4,59	4,57	0,26	5,22	4,15	н/д
ЦИК ($ОД_{450}$)	0,170	0,025	0,202	0,093	0,353	0,057	0,460	0,275	0,01
Соединительная ткань									
Набухание (%)	143,7	3,2	148,9	140,0	117,7	4,0	125,8	112,5	0,001
Растворение ($ОД_{440}$)	0,125	0,049	0,211	0,055	0,127	0,044	0,199	0,062	н/д
Сорбция краски печенью ($ОД_{450}$)	0,687	0,063	0,777	0,515	0,692	0,023	0,739	0,649	н/д
% Гемолиза эритроцитов	29,7	5,8	37,6	16,2	33,8	5,9	43,6	25,5	н/д
Система антиоксидантов									
КТ % распада перекиси	57,4	20,6	82,0	13,5	57,8	21,7	88,6	13,5	н/д
ПО Сек	57,1	12,2	78	34	53,3	11,7	76	34	н/д
ТБК-активность ($ОД_{540}$)	0,175	0,038	0,230	0,103	0,290	0,038	0,360	0,253	0,05

Глутатион (ОГ) мМ/Л	0,051	0,015	0,063	0,03	0,088	0,021	0,099	0,064	н/д
Глутатион (ВГ) мМ/Л	0,163	0,025	0,188	0,12	0,185	0,014	0,193	0,165	н/д
Костная ткань									
Вес кости влажн. Мг	40,0	3,2	45,0	35,5	66,6	3,7	72,0	60,0	0,001
Вес кости сухой мг	27,4	1,7	30,5	23,5	42,4	2,7	48	38,5	0,001
Вес кости Относит. влажн. мг/г	2,21	0,20	2,50	1,77	2,44	0,14	2,72	2,16	н/д
Вес кости Относит. сухой мг/г	1,50	0,14	1,73	1,27	1,55	0,11	1,81	1,38	н/д
Ломкость кости сухой (г)	1504	205	1850	1220	2349	202	2680	1990	0,01
Относит. ломкость: Гр силы/Гр кости сухой	55,00	5,89	67,69	43,57	55,68	3,51	62,68	49,63	н/д
Средний диаметр кости (мм)	1,18	0,05	1,25	1,10	1,51	0,04	1,55	1,45	0,001
Прочность кости (мГр силы/куб диаметра)	927	78	1061	816	686	88	809	535	0,05
Ca^{2+} (мг/г кости, сухой)	0,300	0,009	0,322	0,288	0,275	0,007	0,285	0,261	0,05
Ростовой потенциал ткани									
Изопротеронол. гиперпл. (%)	142	4,2	147	137	106,9	12,6	127,3	86,4	0,01

Таким образом, для рутинных исследований процесса старения и выявления геропрофилактических и биоактивирующих влияний различных агентов можно использовать панель тестов, отражающих старение с различных сторон и достаточно полноценно и информативно отражающих процесс старения на различных его уровнях [52, 161, 305, 311].

В общем случае можно рекомендовать следующий набор тестов для всестороннего исследования процесса старения в эксперименте на долгоживущих мышах.

ОБЩИЙ ВИД, баллы: (старческий горб, шерсть: лоск, блеск, клочковатость);

АКТИВНОСТЬ: тест квадратов, ориентировочный рефлекс;

СИЛА: Динамометрия, Тест висения (струна), ОВИМ;

ОБЩАЯ МОРФОЛОГИЯ: вес, рост, длина хвоста;

МОРФОЛОГИЯ ОРГАНОВ: вес внутренних органов;

ОБЩИЙ И ВОДНЫЙ ОБМЕН: температура тела; биоимпеданс (6 кГц);

СОЕДИНИТЕЛЬНАЯ ТКАНЬ: набухание в H_2SO_4, сорбция красителя тканью печени;

ОСТЕОПОРОЗ: относительная прочность на излом и относительное содержание Ca^{2+};

АНТИОКСИДАТИВНЫЙ СТАТУС: ТБК-активность, каталаза, перок-сидаза, СОД; глутатион (ВГ и ОГ);

ИММУННЫЙ статус: относительный вес тимуса и селезенки, АТОК, внутрикожные реакции замедленного типа;

АУТОИММУНИТЕТ: иммунные комплексы;

МЕМБРАНЫ: осмотический гемолиз, вязкость (пиреновый флюоресцентный зонд);

ОБЩЕЕ СОСТОЯНИЕ КЛЕТОК: pH (флюоресцентный зонд), биоимпеданс (70 кГц);

РОСТОВОЙ ПОТЕНЦИАЛ ТКАНЕЙ: бластные клетки селезенки, реакция изопротеренол-индуцированной гиперплазии слюнных желез и др.

Для выяснения отдельных моментов действия геропрофилактических веществ и выявления отдельных механизмов старения следует использовать специальные для каждой задачи тесты, например, потребление кислорода всего организма и тканями и выделение углекислоты; относительная масса кости, диаметр кости, прочность на излом, относительное содержание Ca^{2+}; реакция бластной трансформации лимфоцитов на митогены и сингенная смешанная культура лимфоцитов, иимуно-флюоресцентные методы определения основных субпопуляций лимфоцитов; флюоресцентные зонды на активность ДНК клеток селезенки и др.

Отобранные тесты мы использовали для оценки влияния на старение долгоживущих линий мышей нового иммунотропного средства – Трансфер фактор (как биологически активная добавка - ТФ). В работе использовали старых мышей линии Balb/c, самок, в возрасте 8 месяцев, которым вводили ТФ (производства компании "4 Life Research Co."), вместе с пищей (вода с молоком), в дозе соответствующей используемой у человека (1 капсула на 50 кг веса).

Введение ТФ в течение 3 месяцев выражено влияло на подопытных животных. В отличие от контрольных мышей, у них улучшались общие показатели – блеск глаз, цвет и лоск шерсти, число умываний и стоек – ориентировочный рефлекс (рисунок 64).

Не изменялся рост животных, но вес выражено снижался – мыши выглядели более молодыми, с меньшим количеством жира (контрольные мыши проявляли признаки значимого ожирения); видимо, с последним связано относительное повышение массы внутренних органов - печени, почек и сердца при назначении ТФ.

Увеличивалась сила животных в тестах динамометрии, висения на струне и ОВИМ; повышалась температура тела и потребление кислорода опытными животными, что указывает на общую активацию метаболизма.

Выражено улучшались показатели иммунной системы: число бластных клеток селезенки, масса тимуса и селезенки, а также восстанавливался лимфоцит-зависимая гипеплазия слюнных желез – тест на ростовой потенциал тканей, выраженно снижающийся с возрастом. Несколько активировалась сорбция красителя тканью печени.

Мало изменялись показатели индуцированной перекисью флюоресценции, гемлоизм и активность каталазы, но улучшались показатели ТБК-активных веществ крови и пероксидаза крови.

Несколько повышались показатели ЦИК – циркулирующие иммунные комплексы, отражающие аутоиммунную реакцию, которая нарастала с возрастом и дополнительно стимулировалась назначением ТФ.

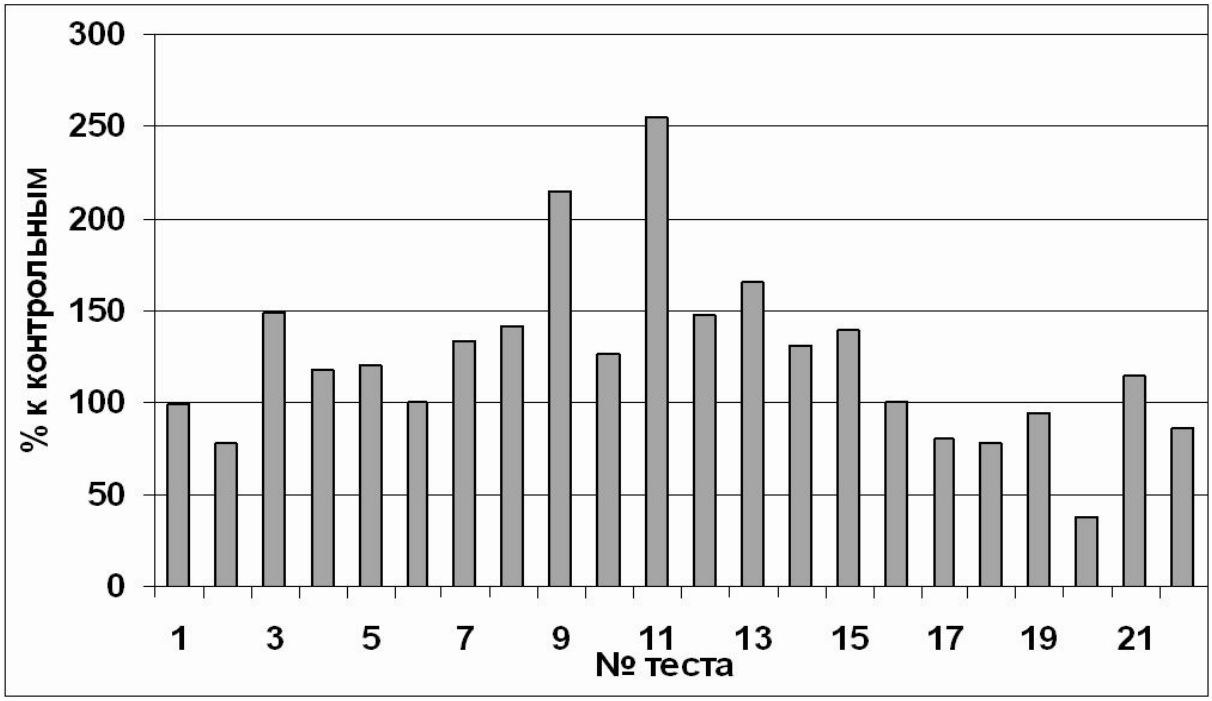


Рисунок. 64. Влияние Трансфер Фактора на показатели старения у мышей

По вертикали – показатель теста (в % к контролю),

По горизонтали – тесты, расположенные по порядку:

№	Тест	№	Тест
1	Рост (мм)	12	Селезенка (мг)
2	Вес (гр)	13	Почки (мг/гр)
3	Сила (гр)	14	Печень (мг/гр)
4	Число умыва-ний за 30 мин	15	Сердце (мг/гр)
5	Число стоек за 10 мин	16	Осмотический гемолиз (%)
6	t^oC в прямой кишке	17	ТБК-активные вещества (OD)
7	pO_2 мм.водн.ст./ 100 г массы тела	18	Пероксидаза (Сек)
8	Гиперпласт. реа- кция на изопро-теренол (%)	19	Каталаза (% H_2O_2)
9	Бласты селезен-ки (млн клеток)	20	Флюоресценция крови (у.е.)
10	ОВИМ	21	Сорбция красителя печенью (%)
11	Тимус (мг)	22	ЦИК (OD)

Рисунок 65. Эффект Трансфер Фактора на старение у мышей
Старая контрольная мышь (вверху),
Старая мышь, получавшая трансфер-фактор (в средине),
Молодая контрольная мышь (внизу).

Таким образом, использованная батарея тестов является высоко чувствительной для диагностики различных сторон комплексного процесса старения, а ТФ является мощным общим биоактивирующим и реювенизирующим препаратом с иммунотропным механизмом действия, влияющим на все стороны сложного общего процесса старения организма.

Интегральный характер старения и важность, в конечном счете, его влияния на продолжительность жизни, ведут, однако, к тому, что важнейшим и по существу единственным окончательным, необходимым и достаточным тестом является исследование выживаемости животных – средней и максимальной продолжительности жизни.

Для общих заключений о причинах и глобальных механизмах старения, в то же время, принципиально не достаточно каких-либо экспериментальных исследований или даже их большого комплекса. Более того,

чисто теоретические исследования и математические модели оказываются намного полезнее, так как старение носит глобальный характер и затрагивает фундаментальные процессы – динамики и самоорганизации сложных систем, возникновения и сохранения порядка и нарастания хаоса в отдельных полуоткрытых системах, которыми только и могут быть живые организмы. Эти процессы известны и подаются строгому анализу, в частности, на основе представлений о действии 2-го закона термодинамики для биологических систем.

К том же, современная общая методология, такая как системный анализ, позволяет понять – что можно получить из тех или иных методов, а также что в конечном итоге мы можем получить при тех или иных воздействиях, что во многих случаях предопределяет постановку задачи и экспериментов.

ПРИЛОЖЕНИЕ

ФОСФАТНЫЙ БУФЕР
0,15 М, pH 4,9-9,2

Na_2HPO_4 ($Na_2HPO_4 * 2\ H_2O$ 26,7 г/л) и KH_2PO_4 (20,04г/л)

pH	Na_2HPO_4 0,15 М(мл)	KH_2PO_4 0,15 М (мл)
4,94	0,10	9,90
5,29	0,25	9,75
5,59	0,50	9,50
5,91	1,00	9,00
6,24	2,00	8,00
6,47	3,00	7,00
6,64	4,00	6,00
6,81	5,00	5,00
6,98	6,00	4,00
7,17	7,00	3,00
7,38	8,00	2,00
7,73	9,00	1,50
8,04	9,50	0,50
8,34	9,75	0,25
8,67	9,90	0,10
9,18	10,00	—

ТРИС-БУФЕР (0,05 М),
(pH 7,2-9,1; М = 121,14)

pH		HCl
23°C	37°C	0,1 М, мл
9,10	8,95	5,0
8,92	8,78	7,5
9,74	8,60	10,0
8,62	8,48	12,5
8,50	8,37	15,0
8,40	8,27	17,5
8,32	8,18	20,0
8,23	8,10	22,5
8,14	8,00	25,0
8,05	7,90	27,5
7,96	7,82	30,0
7,87	7,73	32,5
7,77	7,63	35,0
7,66	7,52	37,5
7,54	7,40	40,0
7,336	7,22	42,5
7,20	7,05	45,0
Трис 0,2 М 25 мл, Вода – до 100 мл		

АЦЕТАТНЫЙ БУФЕР
0,2 М, pH 3,6-5,8

(Ацетат натрия * 3 H_2O М = 136,9)

pH	Ацетат натрия 0,2 М, мл	Уксусная кислота, 0,2 М,мл
3,6	0,75	9,25
3,8	1,20	8,80
4,0	1,80	8,20
4,2	2,65	7,35
4,4	3,70	6,30
4,6	4,90	5,10
4,8	5,90	4,10
5,0	7,00	3,00
5,2	7,90	2,10
5,4	8,60	1,40
5,6	9,10	0,90
5,8	9,40	0,60

БОРАТНЫЙ БУФЕР
0,2 М, РН 7,4-9,0

(Бура: $Na_2B_4O_7$ *10 H_2O
М = 381,43)

pH	Бура 0,2 М, мл	Борная кислота, 0,2 М,мл
7,4	1,0	9,0
7,6	1,5	8,5
7,8	2,0	8,0
8,0	3,0	7,0
8,2	3,5	6,5
8,4	4,5	5,5
8,7	6,0	4,0
9,0	8,0	2,0

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРА ФИКОЛЛА-УРОГРАФИНА

Для приготовления раствора для выделения мононуклеаров крови животных или человека 8,64 г. порошка фиколла-400 растворяют в 96 мл дистиллированной воды; 20,28 мл 78% уротраста (урографина) доводят дистиллированной водой до 42 мл и смешивают растворы, доводя ареометром плотность до 1,077 (для человека) или 1,090 (для мышей); если плотность выше, чем необходимо, добавляют раствор фиколла, если ниже – раствор рентгеноконтрастного вещества. Градиент плотности можно хранить в течение 30 суток при температуре + 4°С в склянке из оранжевого стекла. Градиент плотности можно приготовить только из одного рентгеноконтрастного вещества: 20 мл 76% раствора уротраста смешивают с 86.2 мл дистиллированной воды и добавляют мл 0.1% раствора хлористого натрия; 14.3% уротраст имеет плотность 1,077 г/см.

Таблица 9.

Физиологические растворы для теплокровных

№	Вещество	Локк	Рингер	Тироде	Эрл	Гей	Хенкс
1	NaCl	9	9	8	6,8	8	8
2	KCl	0,42	0,42	0,2	0,4	0,375	0,4
3	$CaCl_2$ б/в	0,24	0,25	0,2	0,2	0,275	0,14
4	$MgSO_4$ 7 H_2O	—	—	—	0,1	—	0,1
5	$MgCl_2$ 6 H_2O	—	—	0,1	—	0,21	0,1
6	NaH_2PO_4 H_2O	—	—	0,05	0,125	—	—
7	Na_2HPO_4 2 H_2O	—	—	—	—	0,15	0,06
8	KH_2PO_4	—	—	—	—	0,025	0,06
9	$NaHCO_3$	0,2	1	1	0,25	—	0,35
10	Глюкоза			1	1	2	1

Таблица 10.

Продолжительность медикаментозного сна мышей и крыс.

Препарат	Мг/кг	Способ введения	Сон (мин)
Мыши			
Гексенал	40	п/кожно	30
Тиопентал натрия	50	п/кожно	75
Барбитал натрия	180	перорально	100
Крысы			
Гексенал	60	в/брюшинно	30
Тиопентал натрия	25	в/брюшинно	20
Барбитал натрия	160	п/кожно	100

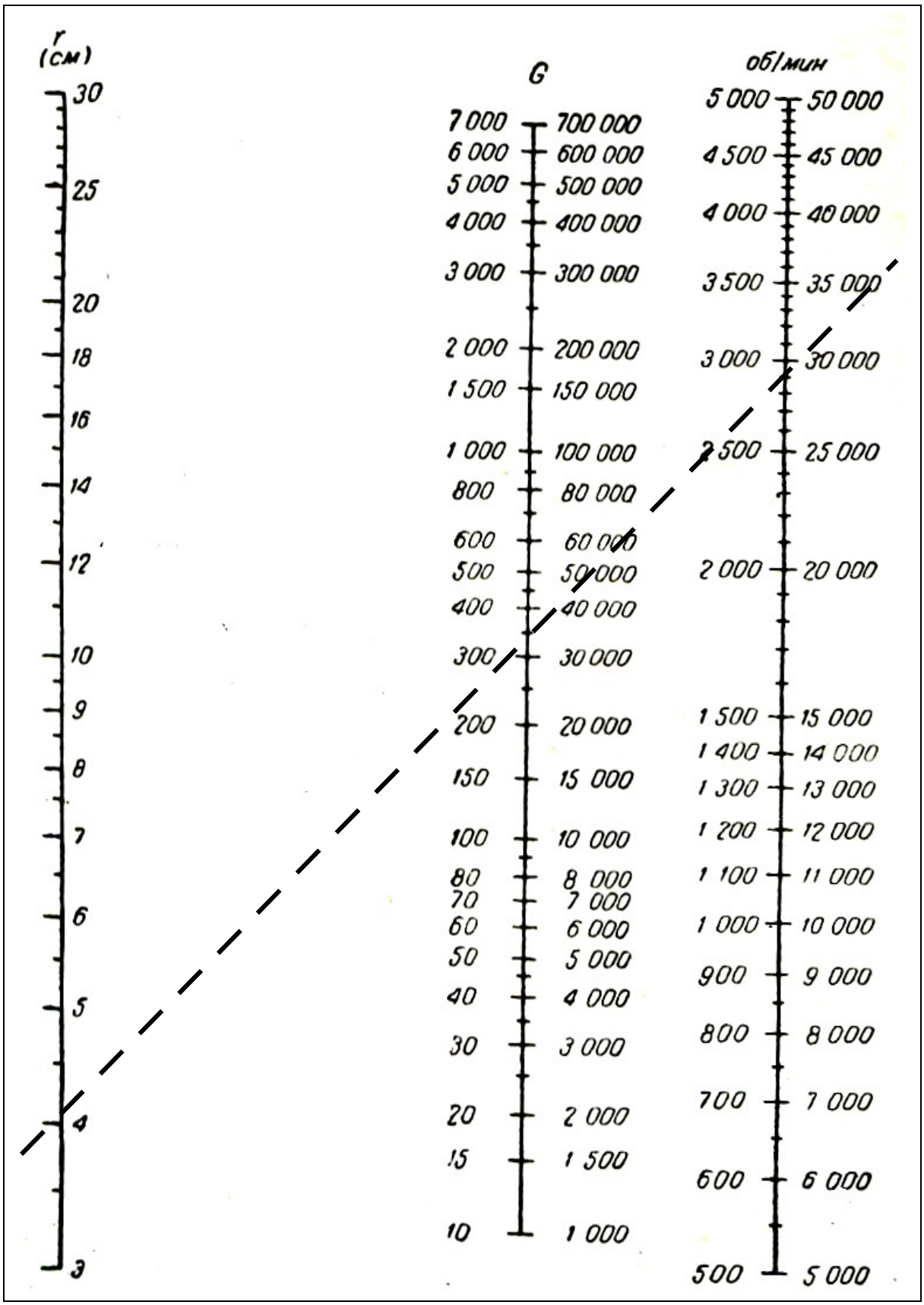


Рисунок 66. Соотношения скорости центрифугирования и «g»
(пример: для 3000 об/мин при радиусе 4 см ускорение составит 350 g)

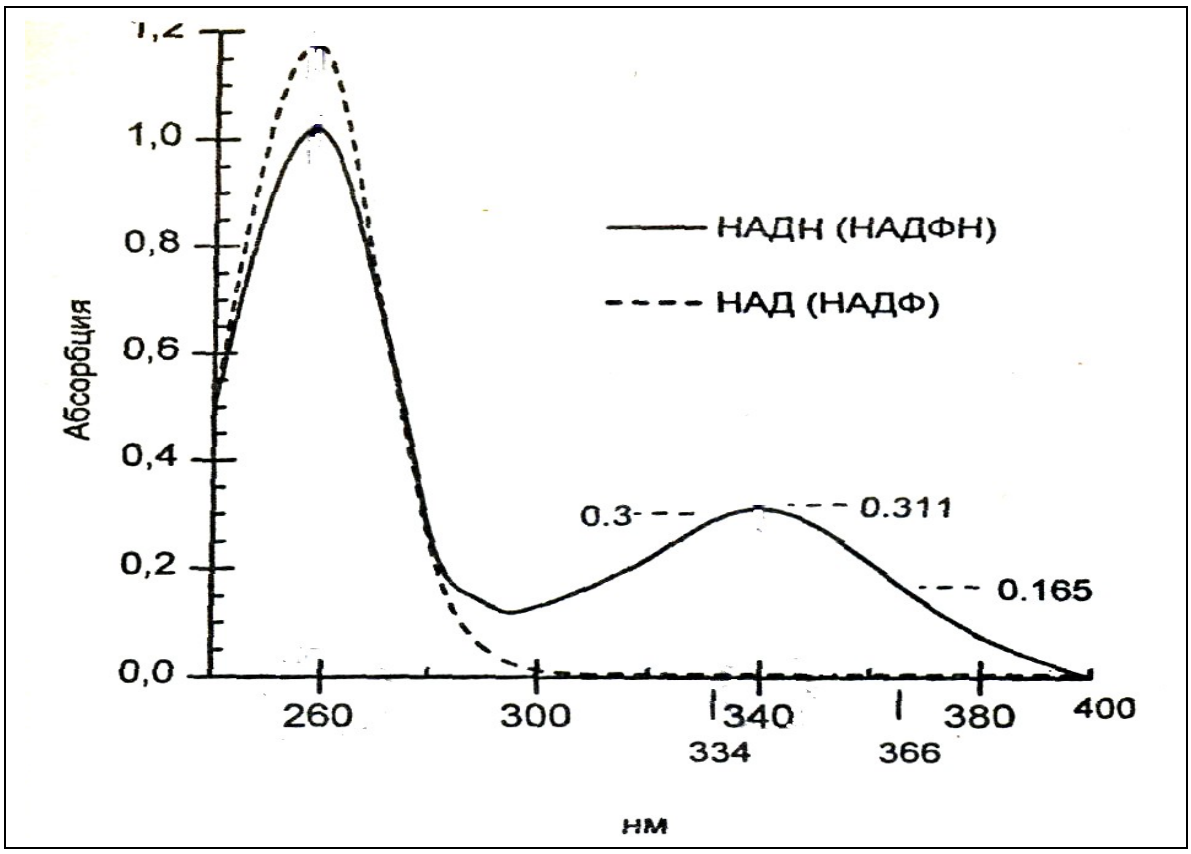


Рисунок 67. Спектр поглощения НАД(Ф) и НАД(Ф)*Н

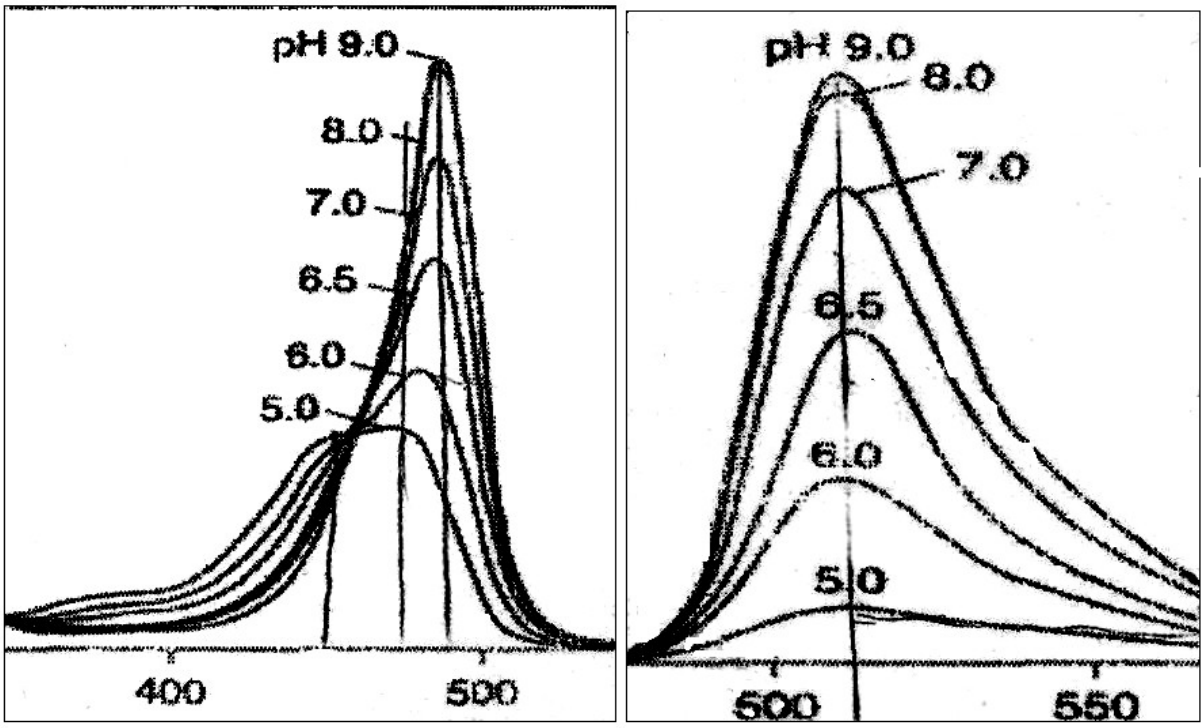


Рисунок 68. Спектр поглощения (слева), эмиссии (справа) флюоресцеина

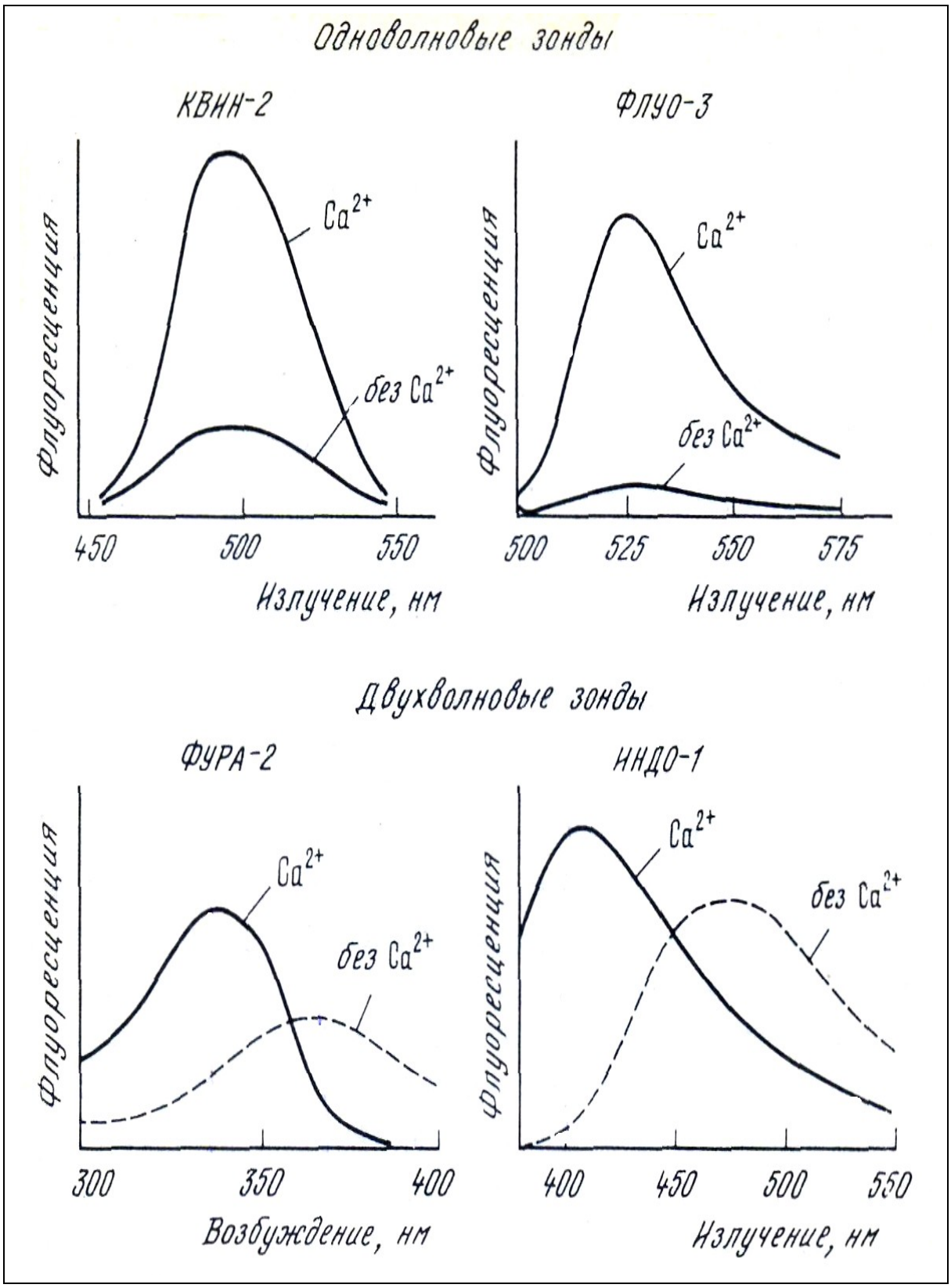


Рисунок 69. Спектры флюоресценции (квин-2, флуо-3, индо-2) и возбуждения (фура-2, флюоресценция при 505 нм) кальциевых зондов (по Авдонин, Ткачук, 1994)

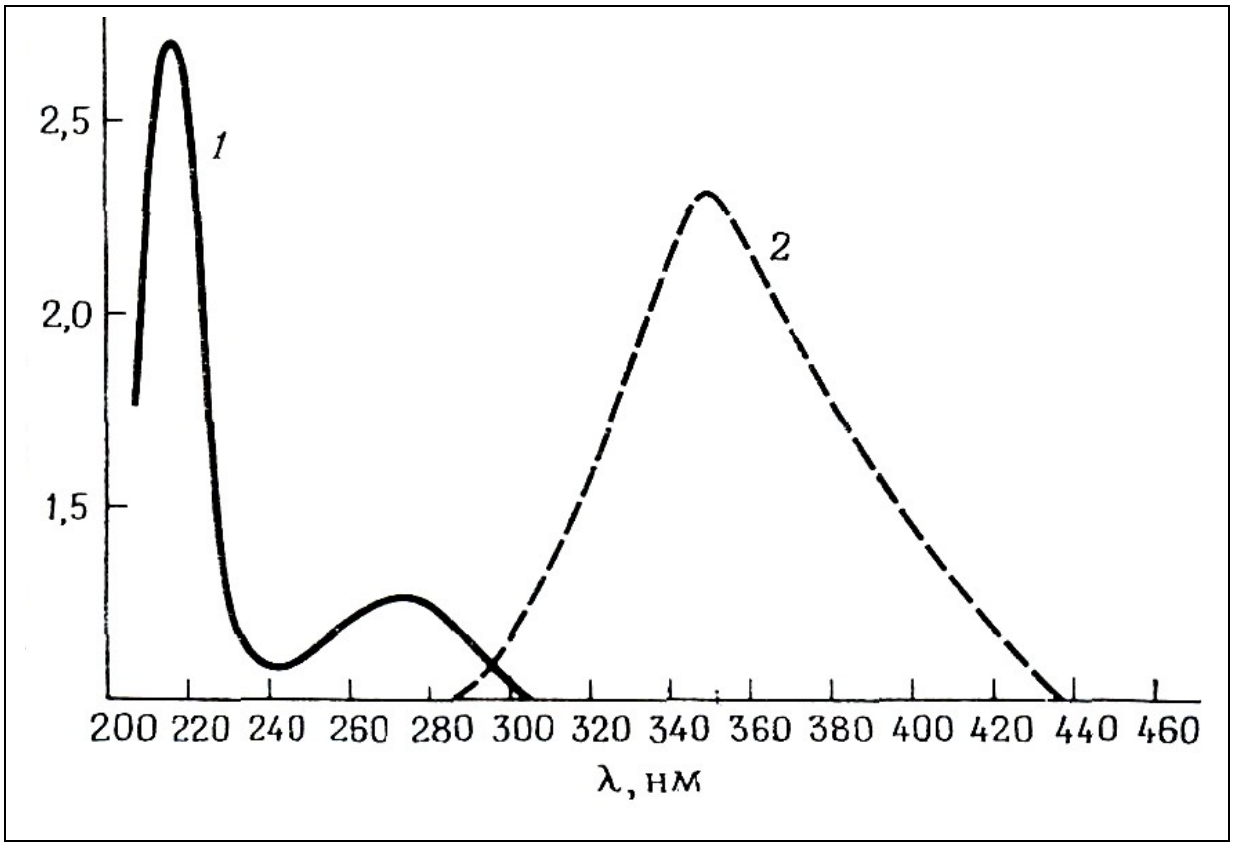


Рисунок 70. Спектр поглощения (1) и флюоресценции (2) триптофана (по Фрайфелдер, 1980

Таблица 11.

Значения коэффициента Стьюдента (***t***-критерия) для различной доверительной вероятности ***p*** и числа степеней свободы ***n*** *:*

n	***p*** для значений ***t*** :							
	0.80	0.90	0.95	0.98	**0.99**	**0.995**	0.998	**0.999**
1	3.0770	6.3130	12.7060	31.820	63.656	127.656	318.306	636.619
2	1.8850	2.9200	4.3020	6.964	9.924	14.089	22.327	31.599
3	1.6377	2.35340	3.182	4.540	5.840	7.458	10.214	12.924
4	1.5332	2.13180	2.776	3.746	4.604	5.597	7.173	8.610
5	1.4759	2.01500	2.570	3.649	4.0321	4.773	5.893	6.863
6	1.4390	1.943	2.4460	3.1420	3.7070	4.316	5.2070	5.958
7	1.4149	1.8946	2.3646	2.998	3.4995	4.2293	4.785	5.4079
8	1.3968	1.8596	2.3060	2.8965	3.3554	3.832	4.5008	5.0413

9	1.3830	1.8331	2.2622	2.8214	3.2498	3.6897	4.2968	4.780
10	1.3720	1.8125	2.2281	2.7638	3.1693	3.5814	4.1437	4.5869
15	1.3406	1.7530	2.1314	2.6025	2.9467	3.2860	3.732	4.072
20	1.3253	1.7247	2.08600	2.5280	2.8453	3.1534	3.5518	3.8495
25	1.3163	1.7081	2.0595	2.4851	2.7874	3.0782	3.4502	3.7251
30	1.3104	1.6973	2.0423	2.4573	2.7500	3.0298	3.3852	3.6460
35	1.3070	1.6909	2.0322	2.4411	2.7284	3.9520	3.3479	3.6007
40	1.303	1.6839	2.0211	2.4233	2.7045	3.9712	3.3069	3.5510
50	1.298	1.6759	2.0086	2.4033	2.6778	3.9370	3.2614	3.4060
60	1.2958	1.6706	2.0003	2.3901	2.6603	3.9146	3.2317	3.4602
70	1.2938	1.6689	1.9944	2.3808	2.6479	3.8987	3.2108	3.4350
80	1.2820	1.6640	1.9900	2.3730	2.6380	2.8870	3.1950	3.4160
90	1.2910	1.6620	1.9867	2.3885	2.6316	2.8779	3.1833	3.4019
100	1.2901	1.6602	1.9840	2.3642	2.6259	2.8707	3.1737	3.3905

$$t = |M_1 - M_2| \,/\, \text{КОРЕНЬ}((m_1^2 + m_2^2) / (n-1)$$

M_1 и **M_2** – средние двух сравниваемых рядов величин,

m_1 и **m_2** – среднее квадратичное (или стандартное) отклонение – **s** (standart deviation), точнее – выборочное стандартное отклонение),

n – число наблюдений в обеих группах.

$$s = \text{Корень}(\Sigma (M - x)^2 / (n-1))$$

M – средняя арифметическая, **x** – величины, **n** – число величин.

В диапазон **M** $\pm$ **s** (или $\pm$ **m**) укладывается 70% значений нормального распределения данных.

(По: Платонов А.Е. Статистический анализ в биологии и медицине.М.:РАН.2000.52 с.)

Библиография

1. Авдонин П.В., Ткачук В.А. Рецепторы и внутриклеточный кальций. М.:Наука. 1994. 288 с.

2. Азизова О.А., Осипов А.Н., Савов В.М. и др. Биофизика. 1985. Т. 30. С. 36-39.

3. Анисимов В.Н., Арутюнян А.В., Опарина Т.И. и др. Росс. физиол. журн. 1999. Вып.85. №4. С.502-507.

4. Анисимов В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения.СПб.:Наука.2008.460 с.

5. Анисимов В.Н. Успехи геронтологии. 2003. № 12. С. 9-27.

6. Анохин П.К. Функциональные системы. В Кн.: Нейропсихология. М.:1984. С.23-28.

7. Арцимович Н.Г. и др. Синдром хронической утомляемости. Журн. неврол. психиат. 1994. N.5. С.47-50.

8. Арутюнян А.В., Козина Л.С. Успехи геронтол. 2009. Т. 22.№ 1. С. 104–116

9. Асатиани В.С. Ферментативные методы анализа. М.:Наука. 1969. 612 с.

10. Ата-Мурадова Ф.А., Донцов В.И. ДАН СССР.1987.Т.297.N.1. С.237-240.

11. Бабаева А.Г., Зотиков Е.А. Иммунология процессов адаптивного роста, пролиферации и их нарушений. МОИП. М. Наука. 1987. 206 с.

12. Бабаева А.Г. Прошлое, настоящее и будущее проблемы лимфоидной регуляции нелимфоидных клеток. Бюлл. экспер. биол. мед. 1995. N.9. С.230-234.

13. Бабенко Н.А. Тез. VII Международн. Симпоз. Биологич. механ. старен. 24 -27 мая 2006 г. Харьков. 2006.

14. Балаж А., Блажек И. Эндогенные ингибиторы клеточной пролиферации. Будапешт. М.:Мир. 1982. 302 с.

15. Балакин В.Е., Заичкина С.И., Розанова О.М. и др. Ежегодник Национального геронтологического центра.2001. Вып.4. С.15-18.

16. Баранов В.С., Баранова Е.В. Успехи герон. 2007. Т.20. №2. С.26-34.

17. Баранов В.С, Баранова Е.В. Успехи герон. 2009. Т.22. №1. С. 84–91

18. Белозерова Л.М. Клинич. геронтология. 2006. Т. 12, № 3. С. 50-52.

19. Беляев Н.М. Сопротивление материалов. М.:Наука. 1976. 608 с.

20. Белозерова Л.М., Методы определения биологического возраста по умственной и физической работоспособности. Пермь:Пермская государственная медицинская академия. 2000. 60 с.

21. Бэрроуз Ч. В Кн.: 9-й Межд. Конгр. геронтологов. Киев. 1972. С.8.

22. Биология старения. Серия "Руководство по физиологии". Академия наук СССР. Л.:Наука. 1982. 616 с.

23. Богомолец А..А. Продление жизни. К.: АН УССР. 1938. 92 с.

24. Бочков Н.П. Вестник РАМН. 2004. № 5. С. 7-13.

25. Буланкин И.Н., Парина Е.В., Головко Н.И. Труды НИИ биологии и биофака ХГУ. Харьков. 1962. Т. 21. С.33-34.

26. Бутенко Г.М. Проблемы остеологии. 1999. Т.2. N3. С.23-28.

27. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флюоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М.: Наука. 1980. 450 с.

28. Войеков В.Л. Успехи геронтологии. 2002. *№9. С. 54-66.*

29. Воложин А.И. Остеопороз. М.:Практич. медицина. 2005. 238 с.

30. Гаврилов Л.А., Гаврилова Н.С. Биология продолжительности жизни. М.:Наука. 1986. 169 с.

31. Галавина О.И. Тез. VII Международн. Симпоз. Биологич. механ. старен. 24 -27 мая 2006 г. Харьков. 2006.

32. Гаркави Л..Х., Уколова М. А., Квакина Е. Б. Закономерность развития качественно отличающихся общих неспецифических адаптационных реакций организма.// «Открытия в СССР». 1975. № 3. С.56-61.

33. Гаркави Л. Х., Квакина Е. Б., Кузьменко Т. С., Шихлярова А. И. Антистрессорные реакции и активационная терапия. Ч.1 — Екатеринбург: «Филантроп». 2002. 196 с.

34. Гвишиани Д.М. ред. Системные исследования.ИСА РАН. М.: 1996.

35. Гендлин Г.Е. Сердце. 2006. № 6. С. 6-8.

36. Гладышев Г.П. Успехи геронтологии. 2001. № 7 С.42-45.

37. Глотов О.С., Баранов В.С. Успехи геронт. 2007. Т.20. № 2.С. 35-55.

38. Гродзинский Д.М., Войтенко В.П., Кутлахмедов Ю.А., Кольтовер В.К. Надежность и старение биологических систем. Киев: Наукова Думка. 1987.

39. Давыдовский И.В. Геронтология. М.:1966. 300 с.

40. Девойно Л.В., Ильюченок Р.Ю. Моно-аминэргические системы в регуляции иммунных реакций. Новосибирск.Наука.1983.234 с.

41. Деев А.И., Осис Ю.Г., Формазюк В.Е. и др. Биофизика. 1987. Т.32. С.629-636.

42. Демьянов В.Ф. Успехи геронтологии. 2005. № 17. С. 18-28.

43. Денисов А.Б. Влияние иммунодепрессии на повторную посттравматическую регенерацию костной ткани. Сборник трудов МГМСУ. М.:1976. С.48-49.

44. Дильман В.М. Большие биологические часы.М.: 1981. 208 с.

45. Догель А.С. Старость и смерть. Л.:Мысль. 1922.

46. Донцов В.И. Успехи современ. биологии. 1986. Т.101. Вып.1. С.18.

47. Донцов В.И. Экспер.онкол. 1989. Т.11. N.5. С.48 - 51.

48. Донцов В.И. Регуляция лимфоцитами клеточной пролиферации - альтернатива теории “противоопухолевого надзора”? Иммунология. 1989. N.5. С.94-96.

49. Донцов В.И. Иммунобиология постнатального развития.М.:РАН, МОИП. Наука. 1990. 152 с.

50. Донцов В.И., Крутько В.Н., Подколзин А.А. Фундаментальные механизмы геропрофилактики. М.: Биоинформсервис. 2002. 464 с.

51. Донцов В.И. Виртуальные приборы в учебном и научном процессе. Lambert Academic Press. 2011. 188 с.

52. Донцов В.И., Крутько В.Н., Труханов А.И. Медицина анти-старения: фундаментальные основы.:URSS. 2010. 680 с.

53. Донцов В.И., Крутько В.Н. Моделирование процессов старения: новая иммуно-регуляторная теория старения//Успехи современной биологии. 2010. Т.130. №1. С.3-19.

54. Донцов В.И. Новая иммунная теория старения: лимфоциты как регуляторы клеточного роста. Lambert Academic Publishing. 2011. 114 с.

55. Дубина Т.Л., Разумович А.Н. Введение в экспериментальную геронтологию. Минск. 1975. 168 с.

56. Дубина Е.Е и др. Лаб.дело. 1988. N8. С.16-19.

57. Дупленко Ю.К. Старение: очерки развития проблемы. Л.: Наука. 1985.

58. Дятловицкая Э.В. Биохимия. 1995. Т.60. С.843-850.

59. Завадовский М.М. Проблемы старости и омоложения в свете учения о внутренней секреции. М.:Красная новь. 1923.

60. Завалишин И.А., Захарова М.Н. Журн. неврол. психиат. 1994. N.5. С.44-47.

61. Захарова О.Д. Методика статистического анализа смертности и продолжительности жизни. М.:ИСПИ РАН.1996.

62. Зубова Ю.Г., Быкова Т.В., Зубова С.Г. и др. Цитология. 2005. Т.47. №12. С.1055-1062.

63. Канунго М. Биохимия старения. М.:Мир. 1982.

64. Карнаухов В.Н. Цитология. 1976. Т.18. №4. С.408-418.

65. Карнаухов В.Н. Люминесцентный спектральный анализ клетки. М.:Наука. 1978. 208 с.

66. Кирова Ю.И., Бородулин В.Б. Успехи геронт. 2009. Т.22. №1. С.74–83

67. Кишкун А.А. Биологический возраст и старение: возможности определения и пути коррекции. М.:ГЭОТАР-Медиа.2008. с.974.

68. Коган А.Х. Вестник РАМН. 1999. № 2. С.7-10.

69. Кольтовер В.К. Успехи геронтологии. 1998. Вып.2. С.37-42.

70. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токорева В.Е. Лаб. дело. 1988. N1. С. 16-19.

71. Коломийчук Т.В. ДАН БССС. 1974. Т.18. С. 77.

72. Косицкая Л.С., Сафронов Б.Н. Иммунология. 1986. №4. С.64-66.

73. Комфорт А. Биология старения. М.:Мир. 1967. 398 с.

74. Конев Ю.В., Лазебник Л.Б. Клинич. геронтология. 2009. Т. 15, №1. С. 39-46.

75. Коршельт Э. Продолжительность жизни, старость и смерть. М-Л. 1925.

76. Кочеткова Н.Г., Ширяев В.И., Кувшинов Б.М., Аршинов А.В. Успехи геронтол. 2008. Т. 21.№ 4. С. 570–574.

77. Крутько В.Н. Подходы к "общей теории здоровья". Физиология человека. 1994. Т.20. N.6. С.34-42.

78. Крутько В.Н., Донцов В.И. Системные исследования. Российская академия наук. Институт системного анализа РАН.М.:1996. С.329-348.

79. Крутько В.Н., Подколзин А.А., Донцов В.И. Общие причины, механизмы и типы старения. Успехи геронтологии. 1997. Вып.1. С.34-40.

80. Крутько В.Н., Смирнова Т.М., Анисимов В.Н. Клиническая геронтология. 1999. N 2. С.42-47.

81. Крутько В.Н. Физиология человека. 2000. N.5. С.161

82. Крутько В.Н., Донцов В.И. Системные механизмы и модели старения. М.:PAH.URSS. 2007. 336 с.

83. Лазебник Л.Б. Клинич. геронтология. 2009. Т. 15, № 1. С. 3-9.

84. Ли С.Е., Иванец Т.А., Турченко Г.В. Бюл. эксперим. биол. мед. 1985. N 4. С.464.

85. Литошенко А.Я. Тез. VII Международн. Симпоз. Биологич. механ. старен. 24 -27 мая 2006 г. Харьков. 2006.

86. Макинодан Т., Юнис Э. п/ред. Иммунология и старение.М.: Мир. 1980. 278 с.

87. Макрушин А.В. Успехи геронтол. 2008. Т. 21.№ 4. С. 546–547

88. Мартыненко Ф.П., Шостак И.Н. Доклады АН УССР. 1982. Серия Б. N.2. С.67.

89. Марченко Б.И. Здоровье на популяционном уровне: статистические методы исследования (руководство для врачей). Таганрог. Сфинкс. 1997. 122 с.

90. Мечников И.И. Этюды о природе человека. М.:1908. 218 с.

91. Мороз И.Н. Астенические состояния при социально-стрессовых расстройствах у ликвидаторов радиационной аварии. Дисс. канд. мед. наук. Челябинск. 1997. 220 с.

92. Моисеев В.С., Кобалава Ж.Д. АРГУС. Артериальная гипертония у лиц старших возрастных групп. М.: МИА, 2002. 448 с.

93. Москалев А.А. Успехи геронтологии. 2008. Т. 21. № 3. С. 463-469.

94. Москалёв А.А.Успехи геронтол. 2009. Т. 22.№ 1. С. 92–103

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

96. Новосельцев В.Н., Михальский А.И. Успехи геронтол. 2009. Т. 22.№ 1. С. 117–128

97. Нагорный А.В., Никитин В.Н., Буланкин И.Н. Проблема старения и долголетия. М.:Медгиз. 1963. 756 с.

98. Николис Дж. Динамика иерархических систем: эволюционное представление. М.:Мир. 1989. 486 с.

99. Обухова Л.К., Эммануэль Н.М. Успехи химии. 1983. Т.52. С.353-372.

100. Осипов А.Н., Азизова О.А., Владимиров Ю.В. Активные формы кислорода и их роль в организме. Успехи. биол. химии. 1990. Т. 31. С.180-208.

101. Оловников А.М. Принцип маргинотомии в матричном синтезе полинуклеотидов. Доклады АН СССР. 1971. Том. 201. С.1496-1499.

102. Оловников А.М. Вестник АМН СССР. 1972. Вып.12. С.85-87.

103. Оловников А.М. Онтогенез. 2007. Вып.38. С.136-158.

104. Орловская И.А., Дубинина Л.В., Халдояниди С.К., Козлов В.А. Онтогенез. 1994. Т.25. С. 26-32.

105. Пальцев М.А, Кветной И.М., Полякова В.И. и др. Успехи геронтол. 2009. Т. 22.№ 1. С. 24–36

106. Петров Р.В., Сеславина Л.С. //Журн.микробиол.1977. N 11. С.28-55.

107. Платонов А.Е. Статистический анализ в биологии и медицине. М.:РАН. 2000. 52 с.

108. Попугайло М.В., Наливайко А.Л., Шаривара А.А. Бюл. эксп. биол. мед. 1984. №8. С.740-742.

109. Практическая гериатрия. Руководство для врачей Под ред. Г.П.Котельникова, О.Г.Яковлева. Самара. 1995. 612.с.

110. Пригожин И. Введение в термодинамику необратимых процессов. М.: Иностр.лит. 1960. 128 с.

111. Подколзин А.А., Донцов В.И. Факторы малой интенсивности в биоактивации и иммунокоррекции.М.: Московские учебники и картолитография. 1995. 220 с.

112. . Подколзин А.А,, Донцов В.И., Крутько В.Н. и др. Оптимизация профилактических мероприятий с использованием компьютерной системы "Профилактика старения".Учебное пособие для врачей.М.: НГЦ, 2003.27 с.

113. Подколзин, А.А., Крутько В.Н., Донцов В.И. и др. Количественная оценка показателей смертности, старения, продолжительности жизни и биологического возраста. Учебное пособие. М.:2001. 56 с.

114. Подколзин А.А. Патофизиологические механизмы синдрома хронической усталости. М.:2000. Биоинформсервис.126 с.

115. Подколзин А.А., Донцов В.И. Старение, долголетие и биоактивация. М.: Московские учебники и картолитография. 1996.

116. Ратова Л.Г., Чазова И.Е. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2007. № 6. С. 93-104.

117. Руководство по геронтологии и гериатрии: в 4т. Под ред. В.Н. Ярыгина. М.: Медицина. 2003. 528 с.

118. Северин Ф.Ф., Скулачёв В.П. Успехи геронт. 2009. Т.22.№ 1. С.37–48.

119. Семенков В.Ф., Карандашов В.И., Ковальчук Л.В. Иммуногеронтология. М.:Медицина. 2005. 206 с.

120. Свет-Молдавский Г.Я., Шхвацабая И.К., Зинзар С.Н. Доклады АН СССР. 1974. Т.218. N.4. С.246.

121. Скулачев В.П. Биохимия. 1998. Т.63. Вып.11. С.1570-1579.

122. Сойфер В.Н. Репарация генетических повреждений// Соросовский Образовательный Журнал. 1997. N 8. С.4-13.

123. Соколовский В.В. //Международные медицинские обзоры. 1993. №1. С.11-14.

124. Стрелер Б. Время, клетки и старение. М.:Мир. 1964. 272 с.

125. Супоницкий В.Я.//Лаб.дело, 1985. №1. С.59.

126. Терёшина Е.В. Успехи геронтол. 2009. Т. 22.№ 1. С. 129–138.

127. Тимошкевич Т.В., Харлова Г.В., Юдина Н.В. Бюл. эксперим. биол. мед. 1984. N 3. С. 352.

128. Тимофеев Н.Н. Искусственный гипобиоз. М. :Медицина. 1987. 192 с.

129. Тогайбаев А.А., Кургузкин А.В., Рикун И.В., Карибжанова Р.М.// Лаб. дело. 1988. №9. С.22-24.

130. Трахтенберг И.М., Сова Р.Е., Шефтель В.О., Оникиенко Ф.А. Показатели нормы у лабораторных животных в токсикологическом эксперименте. М.:Медицина. 1978. с.176.

131. Устименко А.Н., Пашинян Л.Н., Родниченко А.Е., Бутенко Г.М. Досягнення біології та медицини. 2005. Т.6. С.45-51.

132. Фурменкова Н.Ф. и др. Тез. VII Международн. Симпоз. Биологич. механ. старен. 24 -27 мая 2006 г. Харьков. 2006.

133. Фоломеев В.Ф. Лаб. дело. 1981. №1. С.33-37.

134. Фрайфелдер Д. Физическая биохимия. М.:Мир. 1980. 582 с.

135. Фролькис В.В. Старение и биологические возможности организма. М.:1975.272 с.

136. Фролькис В.В., Мурадян Х.К. Экспериментальные пути продления жизни. Л.:Наука. 1988. 120 с.

137. Фролькис В.В., Мурадян Х.К. Старение, эволюция и продление жизни. Киев: Наук, думка, 1992. 336 с.

138. Хавинсон В. Х., Анисимов В.Н. Успехи геронтол. 2009. Т.22. №1. С.11-23.

139. Хавинсон В.Х., Коновалов С.С. Избранные лекции по геронтологии. Спб: Прайм-Еврознак, 2008. – 890 с.

140. Чеботарев Д.Ф. П/ред. Биологический возраст, наследственность и старение. Ежегодник "Геронтология и гериатрия" . Киев. 1984.

141. Чевари С., Чаба И., Секей И. Лаб. дело. 1985. №11. С.678-681.

142. Ченцов Ю.С. п/ред. Практикум по цитологии. М.:МГУ. 292 с.

143. Чернилевский В.Е., Донцов В.И., Глушков М.В. Доклады МОИП. Т.41. 2008. С.142.

144. Чернилевский В.Е., Донцов В.И., Глушков М.В. Методы оценки возрастного остеопороза у старых мышей. Доклады МОИП. Т.41. 2008. С.142.

145. Чернилевский В.Е. Проблемы гипобиоза и продление жизни. Доклады МОИП. Т.41. 2008. С.105.

146. Чернышев В.Г. Лаб. Дело. 1983. №3. С.31-33.

147. Шабалин В.Н. Руководство по геронтологии. – М., Цитадель-трейд, 2005. 800 с.

148. Шабалин В.Н., Шатохина С.Н. Ежегодник Национального геронтологического центра. 2000. Вып.3.С.7-14.

149. Шапошникова В.И. Успехи геронтологии. 2008.Т.21,№ 1.С.14-26.

150. Шараев П.Н. Лаб. Дело. 1981. №5. С.283-285.

151. Шахбазов В.Г., Колупаева Т.В., Набоков А.Л. Лаб.дело. 1986. №7. С.404.

152. Шкорбатов Ю. Г., Шахбазов В. Г. Биоэлектрические свойства клеточных ядер. Успехи современной биологии. 1992. Т.112. Вып.3. С.499-511.

153. Шилова Л.Я., Полторакин В.С., Суслова А.Г. Бюл. эксперим. биол. мед. 1982. N 6. С.99-101.

154. Шукурова Р.А. //Здравоохр. Таджикистана. 1974. № 6. С. 31-33.

155. Шмальгаузен И. И. Организм как целое в индивидуальном и историческом развитии. М.-Л. Изд-во академии наук СССР, 1938. 144 с.

156. Шмальгаузен И.И. Проблема смерти и бессмертия. М.:1926. 92 с.

157. Эйген М., Шустер П. Гиперцикл: принципы самоорганизации макромолекул. М.: Мир.1982.270 с.

158. Эмануэль Н.М. Изв. АН СССР. Сер.биол. 1975. N4. С.785-794.

159. Adelman R.C. Exp. Gerontol. 1971. Vol.6. P.75-78.

160. Allen R.C. Chemical and biological generation of exited states.N.Y.: Acad. press. 1982. P.310—344.

161. Anisimov V.N., Birnbaum L., Butenko G., et al. Principles for Evaluating Chemical Effects on the Aged Population (Environmental Health Criteria 144).WHO, Geneva. 1991.

162. Anisimov V. N. Front. Biosci. 2003. Vol.8. S.883-902.

163. Anisimov V.N., Khavinson V.Kh., Mikhailova O.N. Biogerontology. 2011. Vol.12. P.47-60. Review.

164. Anisimov V.N., Egorov M.V., Krasilshchikova M.S. etc. Aging (Albany N.Y.). 2011. Vol.3. P.1110-9.

165. Babaeva A.G., Zuev V.A. Bull.Exp.Biol.Med. 2007. Vol.144.P.89-90.

166. Checkland P.B. System Thinking. System practice. J.Willey and sons. Chichester. 1986. 380 p.

167. Azbel M.Ya. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.1994.Vol.91.P.12453-12457.

168. Baisch H., Gohde W., Linden W.A. Radiat. Environ. Biophis. 1975. Vol.12. P.31.

169. Badcock D.F. J. Biol. Chem. 1983. Vol.258. P.6380.

170. Behferanz M., Eardley D.D., Gerny J. J.Immunol. 1983. Vol.131. P.2576.

171. Beeler T., Martonosi A., FEBS Lett. 1979. Vol.98. P.173.

172. Benel L. et al. Bas. Appl. Histochem. 1989. Vol.33. P.71.

173. Berdyshev G.V., Zelabovskaya S. Exp. Gerontol. 1972. Vol.7. P.321-330.

174. Bergmeyer H.U. Biochem. Ztschr. 1955. Vol.327. P.255-259.

175. Beyer W.F., Fridovich I. Anal.Biochem. 1987. Vol.161. P.566-599.

176. Bodey B., Bodey B.Jr., Siegel S.E., Kaiser H.E. In Vivo. 1997. Vol.11. P.421-440.

177. Boydens S.V. J. Exp. Med. 1951. Vol.93. P.107-120.

178. Bowles J.T. Med. Hypotheses. 1998. Vol.51. P.179-221.

179. Bowers W.E., Berkowitz M.R. J. Immun. Meth. 1984. Vol.74. P.317-325.

180. Burchiel S.W. et al.Methods. 2000 Vol.21. P.221-230.

181. Calabrese V. et al. Neurochem. Res. 2008. Vol.33. P.2444-2471.

182. Ceredig R., Cummigs D.E. J. Immunol. 1983. Vol.130. P.33-37.

183. Chang E.I., Loh S.A., Ceradini D.J. et al. Circulation. 2007. Vol.116. P.2818-2829.

184. Chaudhori A.T., Chakravarty A.K. J. Indian. Inst. Sci. 1982. Vol.63. P.149-156.

185. Cossarizza A. Exp. Cell. Res. 1994. Vol.214. P.323.

186. Crissman H. A., Steinkamp J.A. In: Flow cytometry and sorting. 2nd edn. Ed. M.R. Melamed, T. Lindmo and M.L Mendelson. Wiley – Liss, New York. 1990. P.227 – 247.

187. Crouch P.J. et al. Rejuvenation Res. 2007. Vol.10. P.349-357. Review.

188. Curtis H.J., Miller K. J. Gerontol. 1971. Vol.26. P.292.

189. Cunningham A.J. Nature. 1965. Vol.207. P.1106-1107.

190. Darzynkiewicz Z. In: Flow Cytometry and Sorting, Melamed M.R., Mullaney P., Mendelson M (eds). J. Wiley & Sons, Inc., New York, 1979. P.283-316.

191. Darzynkiewicz Z., Traganos F., Melamed M.R. Cytometry. 1980. Vol.1. P.98-108.

192. Darzynkiewicz Z., Staiano-Coico L., Melamed M.R. Proc Natl Acad Sci USA. 1981. Vol.78. P.2383-2387.

193. Dean W. (Ed.) Biological aging measurement.Los Angeles.1988.

194. Denkla H.D. J. Clin. Invest. 1974. Vol.53. P.572-580.

195. Dirks A.J., Hofer T., Marzetti E., Pahor M., Leeuwenburgh C. Ageing Res. Rev. 2006. Vol.5. P.179-195. Review.

196. Doerfler W. Ann. Rev. Biochem. 1983. Vol.5. P.93-124.

197. Dolle M.E.,Giese H.,Hopkins C.L. etc. Nature Genetics. 1997. Vol.17. P.431-434.

198. Dontsov V.I.. Theoretical prerequisites for an experimental corroboration of the existence of a specialized cellular system in control of multicellular organism tissue proliferation. J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 1987. Vol.31. P.209-17.

199. Drapa D.D. et al. Exp. Geront. 1984. Vol.19. P.377-381.

200. Eigen M., Schuster P. The hypercycle. A principle of natural self-organization. Part A: Emergence of the hypercycle. Naturwissenschaften. 1977. Vol.64. P.541-65.

201. Elens A., Wattiaux R. Exp. Gerontol. 1969, vol.4. p.131.

202. Everitt A.V., Delbridge L. Exper. Gerontol. 1972. Vol.7. P.45-51.

203. Everitt A.V., Olsen G.G., Burrows G.R. J.Gerontol., 1968. Vol.23. P.333.

204. Ferrer A.S. et al. Anal. Biochem. 1990. Vol.187. P.129.

205. Fuente Mde L., Cruces J., Hernandez O., Ortega E. Curr. Pharm. Des. 2011. Vol.17. P.3966-93.

206. Franklin S.S., Larson M.G., Khan S.A. Circulation. 2001. Vol.103. P.1245-1249.

207. Frew J.E., Jones P., Sholes G. Anal.chim.acta. 1983. Vol.155. P.139.

208. Gavrilova N.S., Gavrilov L.A. Rejuvenation Res. 2010. Vol.13. P.262-4. Review.

209. Gee K.R. et al. Cell Calcium. 2000. Vol.27. P.97.

210. Geoffroy V., Kneissel M., Fournier B., et al. Mol.Cell.Biol. 2002. Vol.22. P.6222-6233.

211. Gompertz B. On the nature of the function expressive of the low human mortality and new model of determining life contingencies// Philos. Trans. Roy. Soc. London A., 1825. Vol.115. P.513-585.

212. Gorman A.M. et al. J. Immunol. Methods. 1999. Vol.226. P.43-48.

213. Graber M.L. et al. Annal. Biochem. 1986. Vol.156. P.202.

214. Gruber J., Schaffer S., Halliwell B. Front Biosci. 2008. Vol.13. P. 6554-79.

215. Grčević D., Katavić V., Lukić I. et al. Croatian Medical Jornal. 2001. Vol.42. P.384-392.

216. Grynkiewicz G., Poenie M. J. Biol. Chem. 1985. Vol.260. P.3440.

217. Guidelines Committee. 2003 European Society of Hypertension – European Society of Cardiology guidelines for the meanagement of arterial hypertension. J. Hypertension. 2003. Vol. 21. P.1011-1053.

218. Hamlin C., Kohn R. Biochem. Biophys. Acta. 1971. Vol. 236. P.458.

219. Hayflick L. Exp. Cell. Res. 1965. Vol.37. P.614.

220. Hayflick L. Ann. N. Y. Acad Sci. 2007. Vol.1100. P.1-13.

221. Hayflick L. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2007. Vol. 1100. P.1-13. Review.

223. Hagen T.M., Yowe D.L., Bartholemew J.C.et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. Vol. 94. P.3064-3069.

223. Harrison D.E., Arcer J.R., Astly C.M. J. Immunol. 1982. Vol.129. P.2673-2677.

214. Harman D. Aging: overview. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2001. Vol.928. P.1-21. Review.

225. Harman D. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. Vol. 88. P.5360-5363.

226. Harman D. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1994. Vol. 717. P.1-15.

227. Hahn H.P. von., Fritz E.C. Gerontologia. 1966. Vol.12. P.237-250.

228. Ho Y.-S., Magnenat J.-L., Gargano M. etc. Environ.Health Perspect. 1998. Vol.106. P.1219-1228.

229. Hissin P.J., Hilt R. Gerontologia. 1964. Vol.9. P.9-17.

230. Qudri S.K., Kledzik G.S., Meites J. Neuroendocrinology. 1973. Vol.11. P.248-255.

231. Itahana K., Campisi J., Dimri G.P. Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay// Methods Mol. Biol. 2007. Vol.371. P.21-31.

232. Jerne N.K., Norolin A.A. Science. 1963. Vol.140. P.405.

233. Karsten U., Wollenberger A. Anal. Biochem. 1977. Vol.77. P.464.

234. Kao J.P.Y. et al. J. Biol. Chem. 1989. Vol.264. P.8179.

235. Khan A.S., Sane D.C., Wannenburg T., Sonntag W.E. Cardiovasc. Res. 2002. Vol.54. P. 25-35. Review.

236. Knight J.A. Adv. Clin. Chem. 2000. Vol.35. P.1-62. Review.

237. Kostiala A.A.I. Int. Arch. Allergy and Appl. Immunol. 1979. Vol.60. P.207-215.

238. Krivol L.R. Chronic fatigue syndrom. Pediatr.Ann. 1995. Vol.24. P.290-292.

239. La Bella F.S., Paul G. J.Gerontol. 1985. vol.20. P.54.

240. Laff S.A., Langolis R.J. In: Flow cytometry and sorting. 2nd edn.. Ed. M.R. Melamed, T. Lindmo and M.L Mendelson). 1990. Wiley – Liss, New York. P.249 – 290.

241. Langer R., Ganiats B., Barret-Connor E. BMG. 1989. Vol. 298. P.1356-1358.

242. Lange M., Le G., Cazenave P-A. J. Immunol. Meth. 1983. Vol.63. P.121-131.

243. Lawrence H. S., Borkowsky W. Biotherapy. 1996. Vol.9. P.1-3.

244. Le Gall J.Y., Ardaillou R. The biology of aging. Bull. Acad. Natl. Med. 2009. Vol.193. P.365-402.

245. Lee H.C., Wei Y.H. J. Formos. Med. Assoc. 1997. Vol.96. P.770-778. Review.

246. Lee B.Y., Han J.A., Morrone A. et al.//Aging Cell. 2006. Vol. 5. P.187-195.

247. Li H.J., Bomer J. Biochemistry. 1971. Vol.10. P.1461-1470.

248. Linton P, Thoman ML T cell senescence. .Front Biosci. 2001 Feb 1; 6:D248-61. Epub 2001 Feb 1.

249. Manczak M., Jung Y., Park B.S. etc. J Neurochem. 2005. Vol.92. P.494-504.

250. Massey V. Biochim. et biophys.acta. 1959. Vol.34. P.255-262.

251. Matsumoto et al. Proc. Jap. Acad. 1984. B.60. № 4. P.73-76.

252. Mattila K., Haavisto M., Rajala S. BMG. 1988. Vol.296. P.887-889.

253. Misra H.P., Frodowich I. J. Biol. Chem. 1972. Vol.247. P.3170-3175.

254. Moody C.E., Hausman P.B.,Gutowski J.K. etc.//Behring Inst. Mitt. 1983.N.72.P.7.

255. Model M.A., KuKuruga M.A., Todd R.F. J. Immunol. Methods. 1997. Vol.202. P.105-111.

256. Mustafa M.G. Free Radicals Biol. and Med. 1990. Vol. 9. P.245.

257. Muzzioli F.N., Mocehegiani E. Mech. Ageing and Devolop. 1982. Vol.18. P.327-328.

258. Nairn R.C. et al. Immunofluor. And related staining techniques. Ed. Knapp W. etc. 1978. P.57.

259. Nelson J. E, Felici L. S., Randall P. K., Sims C., Finch C. E. Biol. Reprod. 1981. Vol.27. P.327-339.

260. Nissen-Meyer L.S., Jemtland R., Gautvik V.T., et al. J.Cell.Sci. 2007. Vol.120. P.2785-2795.

261. Nicolis J.S., Tsuda I. Chaotic dynamics of information processing: the "magic number seven plus-minus two" revisited. Bull. Math. Biol. 1985. Vol.47. P.343-65.

262. Olovnikov A.M. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2005. Vol.1057. P.112-132.

263. Oberdoerffer P. et al. Cell. 2008. Vol.135. P.907-918.

264. O`Connel M.J., Garner A. Intern. J. Radiat.Biol. 1983. Vol.44. P.615.

265. O`Meara A., Herrmann R. Biochim. Biophys. Acta. 1972. Vol.269. P.419-427.

266. Ormerod M.G. Ed. Flow cytometry; A practical approach. IRL Press, Oxford. 1990.

267. Orr W.C., Sohal R.S. Science. 1994. Vol.18. P. 127-137.

268. Ozawa T. Physiol. Rev. 1997. Vol.77. N.2. P.425-464.

269. Pawelec G., Barnett Y., Forsey R., etc. Front Biosci. 2002. Vol.1. P.1056-183.

270. Perschke H., Broda E. Nature. 1961. Vol.190. P.257-261.

271. Perks W. J.Inst.Actuaries, 1932. V. 63. P. 12.

272. Perotto M. et al., FEBS Let. 1990. Vol.259. P.331.

273. Perschke H., Broda E. Nature. 1961. Vol.190. P.257-261.

274. Pearl R. The biology of death. Philadelphia, 1922.

275. Podkolzin A.A., Dontsov V.I., Chernilevskii V.E. etc. Bull. Exp. Biol. Med. 2001. Vol.131. P.53-5.

276. Ponzio N.M. Behring Inst.Mitt. 1983. N.72. P.28.

277. Pyhtila M.J., Sherman F.G. Biochem. Biophys. Res. Coomun. 1968. Vol.31. P.340-344.

278. Rando T.A., Chang H.Y. Cell. 2012. Vol.148. P.46-57.

279. Rowley D.A., Halliwell B. FEBS Lett.1982. Vol.142. P.39-41.

280. Salisbery J.B., Graham J.M., Pasternak C.A. Brit. J. Cancer. 1979. Vol.40. P.307-308.

281. Seidman M.D. et al. Am. J. Otol. 2000. Vol.21. P. 161-167.

282. Sevelkone H.F. et al. J. Immunol. Meth. 1988. Vol.111/ P.31-37.

283. Siakotos A.N., Koppang N. Mech. Ageing and Develop. 1973. Vol.2. P.177.

284. Sinha G.K.,Mimnough E.G. Free Radicals Biol. and Med. 1990. Vol.8. P.567.

285. Schneider G.B.,Relbsom M. Immunology. 1984. Vol.167. P.318-323.

286. Schonfeld M., Schickler H., FEBS Lett. 1984. Vol.167. P.231.

287. Schuster P. Mathematical modeling of evolution. Solved and open problems. Theory. Biosci. 2011. Vol.130. P.71-89.

288. Strick-Marchand H., Masse G.X., Weiss M.C., Di Santo J.P. J. Immunol. 2008. Vol.181. P.2764-71.

289. Scatchard G. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1949. Vol.15. P. 660-672.

290. Shinitzky M. Biochim. Biophisica Acta. 1984. Vol. 738. P.251-261.

291. Squier T.C. Exp. Gerontol. 2001. Vol.36. P.1539-1550. Review.

292. Srivastava A.K., Kapur S., Mohan S., et al. J. Bone Miner. Res. 2005. Vol.20. No.6. P.1041-1050.

293. Staessen J.A., Fagard R., Thijs L. Lancet. 1997. Vol. 350. P.757-364.

294. Stamatas G. N., Estanislao R. B., Suero M. et al//Br. J. Dermatol. 2006. Vol. 154. P. 125—132.

295. Strehler B.L., Mark D., Mildvan A.S., Gee M. J. Gerontol., 1959. Vol.14. P.430.

296. Szent-Gyorgy A. //Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1994. Vol.91. P.10771-10778.

297. Tabatabaie V., Atzmon G., Rajpathak S.N. etc. Aging (Albany N.Y.). 2011. Vol.3. P.1202-5.

298. Tappel A., Fletcher B., Deamer D. J. Gerontol. 1973. Vol. 28. P.415.

299. Trifunovic A., Hansson A., Wredenberg A. etc. Proc Natl. Acad. Sci. U S A. 2005. Vol.102. P.17993-8.

300. Titus R.G., Chiller J.M. 1981. Vol.45. P.65-78.

301. Thomson J., Gorski A.J., Darzynkiewicz Z. et al. Science. 1998. Vol.282. P.1145-1147.

302. Traganos F. et al. J. Histohem. Cytochem. 1977. vol.25. P.881.

303. Trifunovic A. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2005. Vol.13. P.17993-17998.

304. Turing A. The chemical basis of morphogenesis. Trans. Roy. Soc. 1952. V0l. 237. P. 32.

305. Van Zutphen L.E, Baumans V., Beynen A. C. (eds). Principles of Laboratory Animal Science. Elsevier, New York. 2001.

306. Vanyushin B.F., Nemirovsky L.E., Klimenko V.V. et al. Gerontologia. 1973. Vol. 19. P. 138.

307. Verzar F. Gerontologia. 1964. Vol.9. P.209,

308. Vigne et al., FEBS Lett. 1984. Vol.172. P.275.

309. Walford R.L. et al. 10th Inern. Congr. Geront., Jerusalem, Israel (June, 22-27). 1975. Vol. 2. P.39.

310. Warner H.R. Curr. Top. Cell. Regul. 1997. Vol.35. P.107-21. Review.

311. Warner H. R., Ingram D., Miller R. A., Nadon N. L., Richardson, A.G. Mech. Ageing Dev. 2000. Vol.115. P. 199-208.

312. Watters C. Anal. Biochem. 1978. Vol.88. P.695.

313. Wei Y.H., Wu S.B., Ma Y.S., Lee H.C. Chang. Gung. Med. J. 2009. Vol.32. P.113-132. Review.

314. Wessely S. Epid.Rev. 1995. Vol.17. P.139-151.

315. Wilson M., Jones P.A. Science. 1983. Vol. 220. P. 1055.

316. Wittrup K.D., Bailey J.E. Cytometry. 1988.Vol.9. P.394.

317. Wright J.E., Hunter W.M. J.Immunl. Meth. 1982. Vol.48. P.311-325.

318. Wynford-Thomas D.//J. Pathol. 1999. Vol. 187. P. 100—111.

319. Yamashina A., Tomiyama H., Takeda K. Hypertens Res. 2002. Vol.25. P.359-364.