

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В.ЛОМОНОСОВА  
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

*На правах рукописи*

**ШИЛОВСКИЙ Григорий Александрович**

**ПОЛИ(АДР-РИБОЗИЛ)ИРОВАНИЕ БЕЛКОВ В  
КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТКАХ: ВЛИЯНИЕ  
«СТАЦИОНАРНОГО СТАРЕНИЯ» И РАЗЛИЧНЫХ  
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ**

03.01.08 - Биоинженерия

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва - 2019

## ОГЛАВЛЕНИЕ

	<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ</b>	5
	<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	7
<b>1.</b>	<b>ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	12
1.1.	Система поли(ADP-рибозил)ирования белков и ее роль в регуляции клеточных процессов	12
1.1.1.	Семейство поли(ADP-рибоза)-полимераз	14
1.1.2.	Поли(ADP-рибоза)-гликогидролазы и родственные белки	18
1.1.3.	Особенности фенотипа мышей, дефектных по генам белков семейства поли(ADP-рибоза)-полимераз	20
1.1.4.	Система поли(ADP-рибозил)ирования белков в регуляции пролиферации, дифференцировки и гибели клетки	20
1.2.	Роль системы поли(ADP-рибозил)ирования белков в поддержании стабильности генома	22
1.2.1.	Система поли(ADP-рибозил)ирования белков и репарация ДНК	23
1.2.2.	Роль поли(ADP-рибоза)-полимеразы-1 в предотвращении возникновения хромосомных нарушений	27
1.2.3.	Взаимодействие поли(ADP-рибоза)-полимеразы-1 со специфическими белками прогерий	28
1.2.4.	Система поли(ADP-рибозил)ирования белков и спонтанный канцерогенез	30
1.3.	Негативная роль системы поли(ADP-рибозил)ирования белков в патогенезе ряда возрастных заболеваний	31
1.3.1.	Перспективы применения ингибиторов поли(ADP-рибоза)-полимераз в терапии возрастных заболеваний	34
1.3.2.	Флавоноиды - новая группа модуляторов системы поли(ADP-рибозил)ирования белков	37
1.4.	Роль системы поли(ADP-рибозил)ирования белков в детерминации продолжительности жизни	40
1.4.1.	Корреляция между максимальной продолжительностью жизни и активностью поли(ADP-рибоза)-полимераз	41
1.4.2.	Влияние уровня экспрессии гена поли(ADP-рибоза)-полимеразы-1 на продолжительность жизни	43

	1.4.3.	Ассоциация полиморфизмов гена поли(ADP-рибоза)-полимеразы-1 с продолжительностью жизни	45
	1.4.4.	Ассоциация полиморфизмов гена поли(ADP-рибоза)-полимеразы-1 с риском развития возрастных нейродегенеративных патологий	46
1.5.		Изменения в системе поли(ADP-рибозил)ирования белков в процессе развития и старения	47
	1.5.1.	Стимулированная и нестимулированная активности поли(ADP-рибоза)-полимераз	48
	1.5.2.	Изменения в системе поли(ADP-рибозил)ирования белков в ходе развития организма	50
	1.5.3.	Изменение активности поли(ADP-рибоза)-полимераз при старении организма	51
	1.5.4.	Изменение уровня экспрессии поли(ADP-рибоза)-полимеразы-1 при старении организма	57
	1.5.5.	Возрастные изменения уровня поли(ADP-рибозил)ированных белков и активности поли(ADP-рибоза)-гликогидролазы	58
1.6.		Влияние пролиферативного статуса клетки на активность поли(ADP-рибоза)-полимераз	60
1.7.		Моделирование онтогенетических изменений в культуре клеток	61
1.8.		Исследования «возрастных» изменений в системе поли(ADP-рибозил)ирования белков на клеточных моделях старения	65
<b>2.</b>		<b>МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b>	68
2.1.		Материалы и реактивы	68
2.2.		Методы исследования	69
<b>3.</b>		<b>РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ</b>	78
3.1.		Обоснование использования стационарных культур клеток для исследования старения клеток <i>in vivo</i>	78
3.2.		Проявление признаков старения при длительном культивировании клеток VII-dii-FAF28 в стационарной фазе роста	80
	3.2.1.	Изменение морфологии клеток	80
	3.2.2.	Снижение жизнеспособности клеток	81
	3.2.3.	Накопление в культуре клеток со сенесцентным фенотипом	84
3.3.		Влияние «возраста» кондиционированной культуральной среды на развитие характерных для старения клетки признаков	87

	3.3.1.	Влияние «возраста» среды на пролиферацию клеток ВП-dii-FAF28	87
	3.3.2.	Влияние «возраста» среды на репликативный синтез ДНК	89
3.4.		Влияние окислительного стресса на жизнеспособность клеток ВП-dii-FAF28 разного «возраста»	90
3.5.		Временная динамика показателей активности поли(ADP-рибоза)-полимераз при «стационарном старении» клеток ВП-dii-FAF28	94
	3.5.1.	Оптимизация метода измерения активности поли(ADP-рибоза)-полимераз в пермеабелизованных клетках ВП-dii-FAF28	94
	3.5.2.	Изменение стимулированной и нестимулированной активностей PARP с «возрастом» культуры	103
3.6.		Влияние «стационарного старения» на способности клеток к поли(ADP-рибозил)ированию белков в ответ на генотоксический стресс	109
3.7.		Влияние ингибиторов PARP на выживаемость клеток ВП-dii-FAF28 в ходе их «стационарного старения»	112
3.8.		Изменение уровней экспрессии генов семейства PARP при «стационарном старении» клеток ВП-dii-FAF28	113
3.9.		Влияние флавоноидов на активность поли(ADP-рибоза)-полимераз и выживаемость культивируемых клеток в условиях окислительного стресса	117
	3.9.1.	Ингибирование PARP тимуса теленка флавоноидами	117
	3.9.2.	Влияние экстракта Ginkgo biloba EGb 761 на стимулированную активность PARP и выживаемость клеток PC12 после воздействия окислительного стресса	118
		<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b>	124
		<b>ВЫВОДЫ</b>	127
		<b>БЛАГОДАРНОСТИ</b>	128
		<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b>	129

## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

<b>АФК</b>	–	активные формы кислорода
<b>БП</b>	–	болезнь Паркинсона
<b>БА</b>	–	болезнь Альцгеймера
<b>ДНК-ПК</b>	–	ДНК-зависимая протеинкиназа
<b>ДФЧ</b>	–	диплоидные фибробласты человека
<b>ИПА</b>	–	индекс пролиферативной активности
<b>ИМ</b>	–	индекс мечения
<b>ЛПС</b>	–	липополисахариды
<b>мес.</b>	–	месяц
<b>НА</b>	–	никотинамид
<b>нед.</b>	–	неделя
<b>НСА</b>	–	нестимулированная активность
<b>ПЖ</b>	–	продолжительность жизни
<b>ПЭГ</b>	–	полиэтиленгликоль
<b>СА</b>	–	стимулированная активность
<b>ТС</b>	–	трипановый синий
<b>УКП</b>	–	удвоение клеточной популяции
<b>ФДЭ</b>	–	фосфодиэстераза змеиного яда
<b>ХОБЛ</b>	–	хроническая обструктивная болезнь легких
<b>ЭДТА</b>	–	этилендиамминтетраацетат
<b>3-AB</b>	–	3-аминобензамид
<b>Ade</b>	–	аденин
<b>AIF</b>	–	апоптоз-индуцирующий фактор (apoptosis-inducing factor)
<b>ALC1</b>	–	фактор реорганизации хроматина (Amplified in Liver Cancer 1)
<b>ATM</b>	–	киназа, мутации в гене которой вызывают атаксию-телеангиэктазию (ataxia-telangiectasia mutated kinase)
<b>BER</b>	–	эксцизионная репарация оснований (base excision repair)
<b>bFGF</b>	–	основной фактор роста фибробластов (basic fibroblast growth factor)
<b>CSB</b>	–	белок, мутации в гене которого вызывают синдром Коккейна типа В (Cockayne syndrome protein B)
<b>DDB1 и DDB2</b>	–	белки, формирующие комплекс, специфически связывающийся с поврежденными участками ДНК (DNA damage-binding protein)
<b>DIV</b>	–	сут <i>in vitro</i> (days <i>in vitro</i> )
<b>DNA-ПК</b>	–	ДНК-зависимая протеинкиназа (DNA-dependent protein kinase)
<b>DSB</b>	–	двунитевые разрывы ДНК (double strand breaks)
<b>EGb 761</b>	–	экстракт <i>Ginkgo biloba</i> (extract <i>Ginkgo biloba</i> )
<b>EGF</b>	–	эпидермальный фактор роста (epidermal growth factor)
<b>IL</b>	–	интерлейкин (interleukin)
<b>INO-1001</b>	–	ингибитор поли(ADP-рибоза)-полимеразы инденоизохинолинон (indeno-isoquinolinone)
<b>IGF-I</b>	–	инсулиноподобный фактор роста I (insulin-like growth factor I)
<b>MEM</b>	–	минимальная достаточная среда (minimal essential medium)
<b>MMS</b>	–	метилметансульфонат (methyl methane sulphonate)
<b>MNNG</b>	–	<i>N</i> -метил- <i>N'</i> -нитро- <i>N'</i> -нитрозогуанидин ( <i>N</i> -methyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N'</i> -nitroso guanidine)
<b>MNU</b>	–	<i>N</i> -метил- <i>N</i> -нитрозомочевина ( <i>N</i> -methyl- <i>N</i> -nitrosourea)
<b>NAD+</b>	–	никотинамидадениндинуклеотид (nicotinamide adenine dinucleotide)

<b>NER</b>	–	эксцизионная репарация ДНК путем удаления нуклеотидов (nucleotide excision repair)
<b>NF-κB</b>	–	ядерный фактор κB (nuclear factor kappa B)
<b>NPO</b>	–	единственный ортолог PARP у <i>Neurospora crassa</i> (Neurospora PARP ortholog)
<b>PAR</b>	–	поли(ADP-рибоза) (poly(ADP-ribose))
<b>PARG</b>	–	поли(ADP-рибоза)-гликогидролаза (poly(ADP-ribose) glycohydrolase)
<b>PARG(110)</b>	–	ядерная изоформа PARG с молекулярной массой 110 кДа
<b>PARP</b>	–	поли(ADP-рибоза)-полимеразы (poly(ADP-ribose) polymerases)
<b>PARP-1</b>	–	поли(ADP-рибоза)-полимераза-1 (poly(ADP-ribose) polymerase 1)
<b>PARP-2</b>	–	поли(ADP-рибоза)-полимераза-2 (poly(ADP-ribose) polymerase 2)
<b>PBMC</b>	–	мононуклеарные лейкоциты периферической крови (peripheral blood mononuclear cells)
<b>PBS</b>	–	Фосфатно-солевой буфер (Phosphate buffered saline)
<b>PJ34</b>	–	ингибитор поли(ADP-рибоза)-полимераз N-(5,6-дигидро-6-оксо-2-фенантридинил)-2-(диметиламино)ацетамид (N-(5,6-Dihydro-6-oxo-2-phenanthridinyl)-2-(dimethylamino)acetamide)
<i>prpA</i>	–	единственный ген, кодирующий PARP у мицелиального гриба <i>Aspergillus nidulans</i>
<b>SA-β-Gal</b>	–	связанная со старением β-галактозидаза (senescence-associated β-Galactosidase)
<b>SCE</b>	–	сестринские хроматидные обмены ДНК (sister chromatid exchanges)
<b>SSB</b>	–	однонитевые разрывы ДНК (single strand breaks)
<b>TERF1</b>	–	связывающийся с теломерными повторами фактор 1 (telomeric repeat-binding factor 1)
<b>TNF</b>	–	фактор некроза опухолей (tumor necrosis factor)
<b>Tnks1</b>	–	танкираза 1 (tankyrase 1)
<b>Tnks2</b>	–	танкираза 2 (tankyrase 2)
<b>UV</b>	–	ультрафиолетовый свет (ultraviolet)
<b>vPARP</b>	–	поли(ADP-рибоза)-полимераза крупных цитоплазматических рибонуклеопротеидных комплексов (vault PARP)
<b>WRN</b>	–	белок, мутации в гене которого вызывают синдром Вернера (Werner protein)
<b>WS</b>	–	синдром Вернера (Werner syndrome)
<b>XPA</b>	–	белок, мутации в гене которого вызывают пигментную ксеродерму типа А (xeroderma pigmentosum protein A)
<b>XRCC1</b>	–	белок XRCC1 (X-ray repair cross-complementing protein 1)

## ВВЕДЕНИЕ

При написании раздела использованы статьи автора диссертации: [Shilovsky G.A., Khokhlov A.N., and Shram S.I. 2013. The protein poly(ADP-ribosyl)ation system: its role in genome stability and lifespan determination // Biochemistry (Moscow). Vol. 78. № 5. P. 433-444].

**Актуальность проблемы.** До настоящего времени было высказано много различных гипотез о первопричинах развития деструктивных онтогенетических изменений, ведущих к увеличению вероятности смерти с возрастом, т.е. к старению [1, 2]. На более поздних стадиях онтогенеза приобретают значение различные экзогенные и эндогенные негенетические факторы, влияющие на скорость старения взрослого человека в зависимости от условий его существования (питания, физических нагрузок, экологии), а не от генов. История попыток соотнести хронологический и биологический возраст и количественно оценить темп процесса старения весьма обширна. Как правило, определение возраста основывают на том или ином молекулярном аспекте старения, например, степени повреждения ДНК клетки. Так, например интегративный биомаркер старения – индекс *Glycan Age*, основанный на оценке структурных деталей сахарных цепей, прикрепленных к определенным участкам трех типов молекул IgG. Этот показатель отражает уровень системного воспаления, прогнозирует хронологический возраст со стандартным отклонением 9,7 лет и превосходит по точности оценку возраста с использованием длины теломер [3]. Разработка эффективных методов оценки биологического возраста в гериатрии (при разработке стратегий «омолаживания») важна для оценки эффективности профилактики и лечения хронических заболеваний, использование мультипараметрического подхода для оценки биологического возраста – повышает «объективность» анализа.

При изучении механизмов клеточного старения известной проблемой является выбор релевантной и удобной модели. Широко распространена модель репликативного старения «по-Хейфлику» [4], основанная на феномене истощения митотического потенциала культуры клеток приблизительно после нескольких десятков удвоений клеточной популяции (50 пассажей для диплоидных фибробластов человека). Однако многие исследователи ставят под сомнение релевантность данной модели, указывая на то, что она не достаточно хорошо отражает положение дел в целом организме. Действительно, доля делящихся клеток в организме не очень велика. Кроме того, организм не гибнет от исчерпания митотического потенциала и уменьшения скорости пролиферации клеток, тогда как, по Хейфлику, «состарившейся» считается популяция культивируемых клеток, не способная за определенный промежуток времени (две недели)

удвоить свою численность. Кроме того, следует отметить, что модель Хейфлика не является столь универсальной, так как пригодна только для исследования клеток с ограниченным числом делений в культуре. Так, например, у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* средняя репликативная ПЖ составляет около 15 делений [5], однако уже после двух-трех клеточных циклов у материнских клеток снижается резистентность к тепловому и солевому стрессу [6]. Это, видимо, связано с тем, что клетки, совершившие более четырех делений, в меньшей степени способны к перестройке своих защитных систем, чем новообразованные материнские клетки.

Другой крайностью является подход, основанный на применении моделей стресс-индуцированного старения, вызванного различными повреждающими факторами. Здесь основным препятствием является необходимость доказательства того, что в клетке действительно имеет место старение, в смысле постепенного накопления повреждений, а не включение механизмов программированной клеточной гибели.

Накопление с возрастом повреждений ДНК является одним из наиболее известных проявлений старения [7, 8]. Считается, что это связано не только с накоплением внутриклеточного содержания повреждений ДНК, но также со снижением потенциала систем, ответственных за поддержание стабильности генома [9, 10]. В условиях, когда повреждения ДНК не могут быть быстро устранены, происходит активация и многократное повторное связывание поли(ADP-рибоза)-полимераз (PARP), (в основном PARP-1) с разрывами ДНК [11]. Это препятствует различным перестройкам ДНК в области повреждения. Таким образом, связывание PARP-1 с односторонними разрывами ДНК или промежуточными соединениями, образующимися в процессе репарации ДНК, играет защитную роль в тех случаях, когда возможности системы репарации ограничены [11-13]. Также обнаружена сильная положительная корреляция между максимальной продолжительности жизни (ПЖ) млекопитающих и активностью PARP [14]. Мыши с нокаутом по генам PARP-1 [15-19] или PARP-2 [20] имели нормальный фенотип, нормально развивались и сохраняли фертильность, хотя их ПЖ снижалась, а подверженность опухолеобразованию была повышена [21]. При этом нокаут по обоим генам у мыши (PARP-1-/-/PARP-2-/-) приводил к летальности фенотипа на стадии гаструляции (E8.0) [22]. Однако в условиях патологии активность PARP будет оказывать негативное воздействие на клетку, истощая запасы NAD и ATP, а также способствуя экспрессии воспалительных цитокинов. Поскольку развитие патологий и дисфункций различных систем органов может приобретать с возрастом хронический характер, поиск и разработка специфических ингибиторов, снижающих последствия такой сверхактивации PARP, представляются необходимыми. Отдельным перспективным направлением, на наш



взгляд, является поиск природных соединений, обладающих нужными свойствами. Большая часть данных по защитному действию ингибиторов PARP в моделях повреждения нейронов и других клеток получено с использованием в качестве ингибиторов никотинамида и его структурных аналогов - бензамида и 3-аминобензамида (3-AB). Бензамид и его производные обладали низкой токсичностью и невысокой избирательностью к PARP [23]. В последнее время был синтезирован целый ряд более сильных, по сравнению с 3-AB, ингибиторов PARP. В литературе появились данные о влиянии этих веществ на важнейшие клеточные процессы, а также данные об их фармакологическом эффекте при онкогенезе. Рядом фармакологических компаний проводятся клинические испытания лекарственных препаратов на основе ингибиторов PARP [24].

**Цель и задачи работы.** Целью работы было установить в исследованиях на модели «стационарного старения» клеток эукариот возможные взаимосвязи между процессом поли(ADP-рибозил)ирования белков, с одной стороны, и жизнеспособностью и старением клеток, с другой. На основе анализа показателей, характеризующих активность PARP в клетках, предложить подходы для оценки биологического возраста животных/человека и для тестирования фармакологических веществ на их геропротекторную/геропротормонную активность.

Задачи работы:

1. На примере трансформированных культивируемых клеток китайского хомячка линии ВП-dii-FAF28 исследовать влияние длительного пребывания эукариотических клеток в стационарной фазе роста (в модели «стационарного старения» клеток *in vivo*) на их жизнеспособность, морфологические характеристики и уровень маркеров клеточного старения (senescence).
2. Выяснить, как изменяется стимулированная двухцепочечными дезокси-олигонуклеотидами и нестимулированная активности PARP, а также «базальный» и стимулированный генотоксическими агентами уровни PAR при «стационарном старении» клеток ВП-dii-FAF28.
3. Исследовать временную динамику уровней экспрессии генов, кодирующих белки семейства PARP, при «стационарном старении» клеток ВП-dii-FAF28.
4. Выяснить, как влияет фармакологическое ингибирование PARP на выживаемость клеток ВП-dii-FAF28 в ходе их «стационарного старения».
5. Протестировать ряд флавоноидов и флавоноид-содержащих нутриентов, входящих в состав лекарственных средств, на PARP-ингибирующее и цитопротекторное действие.

**Научная новизна работы.** В работе впервые была исследована временная динамика экспрессии поли(ADP-рибоза)-полимераз и ряда показателей их активности при воспроизведении характерных для старения многоклеточного организма процессов на клеточной модели «стационарного старения». По результатам проведенных исследований было предложено использовать безразмерные показатели, характеризующие способность системы поли(ADP-рибозил)ирования белков реагировать на вновь возникающие повреждения ДНК, в качестве новых биохимических маркеров возрастных процессов, ассоциированных со старением организма. Показано, что ингибиторы PARP существенно не влияют на жизнеспособность клеток в ходе их «стационарного старения». Сделан вывод о том, что наблюдаемые в данной экспериментальной модели изменения в состоянии системы поли(ADP-рибозил)ирования белков не способствуют развитию возраст-зависимых деструктивных процессов в клетках а, видимо, направлены на адаптацию клеток к усиливающемуся с возрастом давлению неблагоприятных факторов внутренней и внешней среды.

**Практическая значимость исследования** заключается в том, что соискателем был предложены новые биохимические маркеры биологического возраста животных и человека (показатели «1-NCA/CA» и «1-PAR<sub>b</sub>/PAR<sub>s</sub>) и на основе них предложен оригинальный подход для тестирования биологически активных веществ на геропротекторную/геропромоторную активность в условиях «стационарного старения» клеток в культуре. Кроме того, в работе была определена PARP-ингибирующая активность ряда флавоноидов и известного флавоноид-содержащего растительного препарата из *Ginkgo biloba* - экстракта EGb 761. Развитие данного направления в перспективе позволит разработать рекомендации «лечебно-профилактического» рациона для лиц, страдающих рядом хронических заболеваний, при котором подавление активности PARP должно оказывать положительное терапевтическое действие.

**Апробация работы.** Результаты диссертационной работы были представлены на международных и всероссийских научных конференциях: Международной научно-практической конференции «Пожилой больной. Качество жизни» (Москва, 2017); «Современные аспекты геронтологии и гериатрии: от теории к практике» (Киев, 2014); «Фундаментальные проблемы геронтологии и гериатрии» (Санкт-Петербург, 2014); Конференции «Актуальные проблемы геронтологии и гериатрии: от теории к практике» (Киев, 2013); Международной научно-практической конференции «Пожилой больной. Качество жизни» (Москва, 2014); Научной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения акад. И.Н. Буланкина «Научное наследие академика И.Н. Буланкина и его

развитие в современной биохимии» (Харьков, 2001); III Международном симпозиуме «Биологические механизмы старения» (Харьков, 1998).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 12 печатных работ, из них 6 статей в рецензируемых научных журналах, индексируемых в Scopus или Web of Science, 2 – в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК, и 4 тезисов докладов в сборниках трудов научных конференций.

**Личный вклад автора в проведение исследования.** Основные результаты работы были получены самим автором. Личный вклад заключается в анализе литературы по теме диссертации, планировании и проведении экспериментов, статистической обработке полученных данных, представлении результатов на научных конференциях и подготовке материалов к публикации в научных журналах.

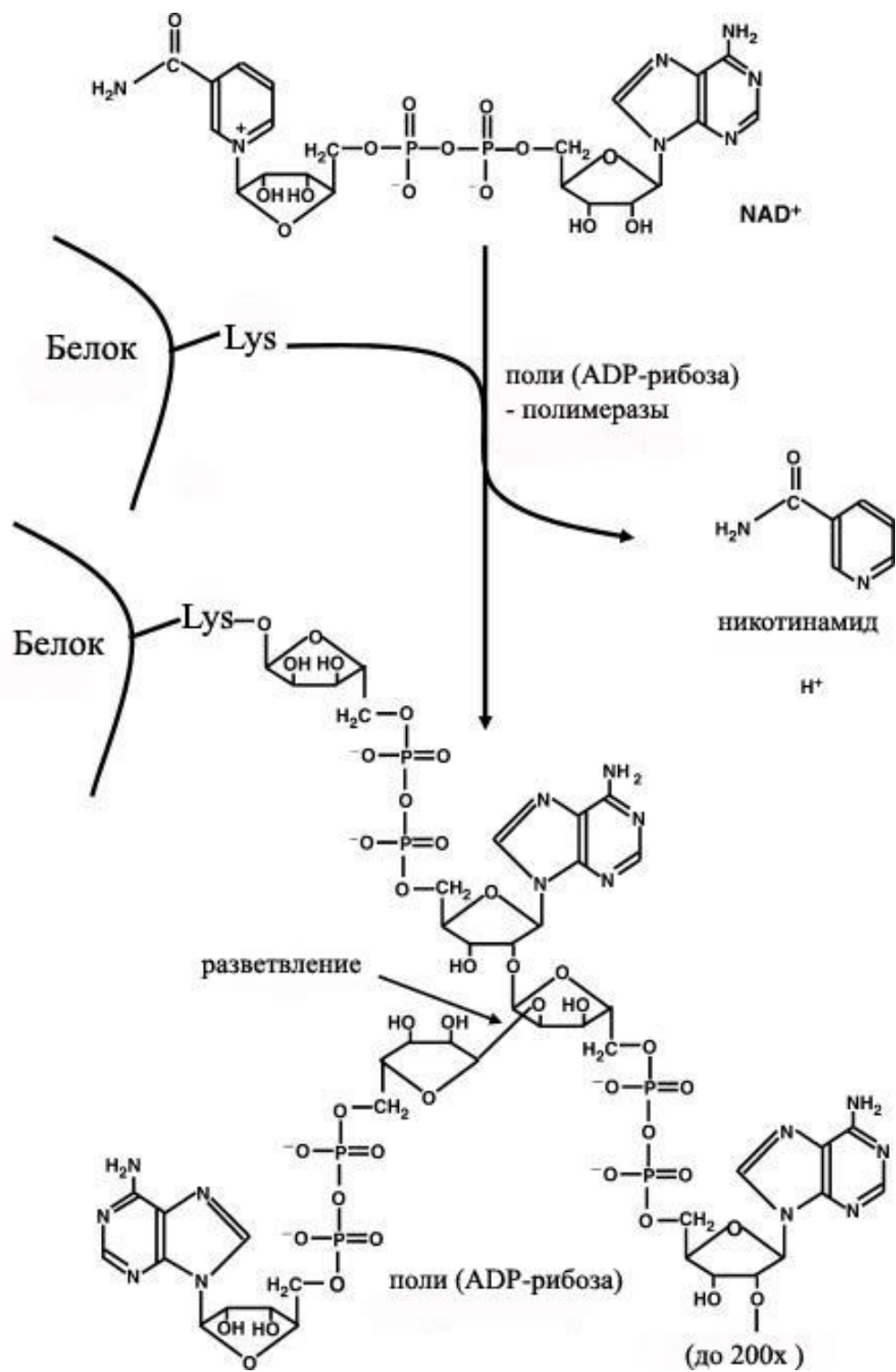
## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

При написании раздела использованы статьи автора диссертации: [Shilovsky G.A., Khokhlov A.N., and Shram S.I. 2013. The protein poly(ADP-ribosyl)ation system: its role in genome stability and lifespan determination // *Biochemistry (Moscow)*. Vol. 78. № 5. P. 433-444; Shilovsky G.A., Shram S.I., Morgunova G.V., and Khokhlov A.N. Protein poly(ADP-ribosyl)ation system: Changes in development and aging as well as due to restriction of cell proliferation // *Biochemistry (Moscow)* 2017. Vol. 82. № 11. P. 1391-1401].

### 1.1. Система поли(ADP-рибозил)ирования белков и ее роль в регуляции клеточных процессов

В геронтологических исследованиях особое внимание уделяется работе систем, ответственных за репарацию повреждений ДНК и поддержание стабильности генома [7, 25]. Функционирование этих систем может значительно меняться с возрастом и в условиях патологии. Одним из наиболее ранних ответов клетки на повреждение ДНК является поли(ADP-рибозил)ирование белков, осуществляемое ферментами поли(ADP-рибоза)-полимеразами (PARP) [12, 26-28]. Эти уникальные гликозилтрансферазы катализируют реакцию переноса ADP-рибозильных остатков NAD<sup>+</sup> на доступные ε-аминогруппы остатков лизина белка-акцептора и последующее наращивание цепи за счет образования гликозидных связей между рибозильными группами мономеров ADP-рибозы [28]. Впервые химизм этой реакции был описан Полем Манделем и его коллегами в 1966 г. [29]. В начале 60-х годов в лаборатории Поля Манделя был установлен любопытный факт: никотинамидмононуклеотид, являющийся предшественником NAD<sup>+</sup>, почти в 1000 раз увеличивал включение аденильных остатков АТР в полинуклеотидную фракцию ядер печени цыпленка [30]. Было сделано предположение, что он является активатором новой ДНК-зависимой поли(А)-синтазы. Однако последующие исследования структуры образующегося полинуклеотида опровергло это предположение. Оказалось, что никотинамидмононуклеотид стимулировал синтез до этого неизвестного ещё полинуклеотида – поли(ADP-рибозы) посредством активизации синтеза NAD<sup>+</sup> [29], причем источником ADP-рибозильных групп этого полинуклеотида, как оказалось, является NAD [31].

Поли(ADP-рибозил)ирование представляет собой реакцию посттрансляционной модификации белков (см. обзоры [31-33]). Первый остаток ADP-рибозы присоединяется к ε-аминогруппе лизина белка-акцептора, а последующие связываются за счет гликозидных связей (1'' - 2', реже 1''' - 2'') [12, 34]. При этом образуется прикрепленный к белку ковалентной связью разветвленный полимер, содержащий до нескольких сот звеньев мономера (ADP-рибозы) (**рис. 1**).

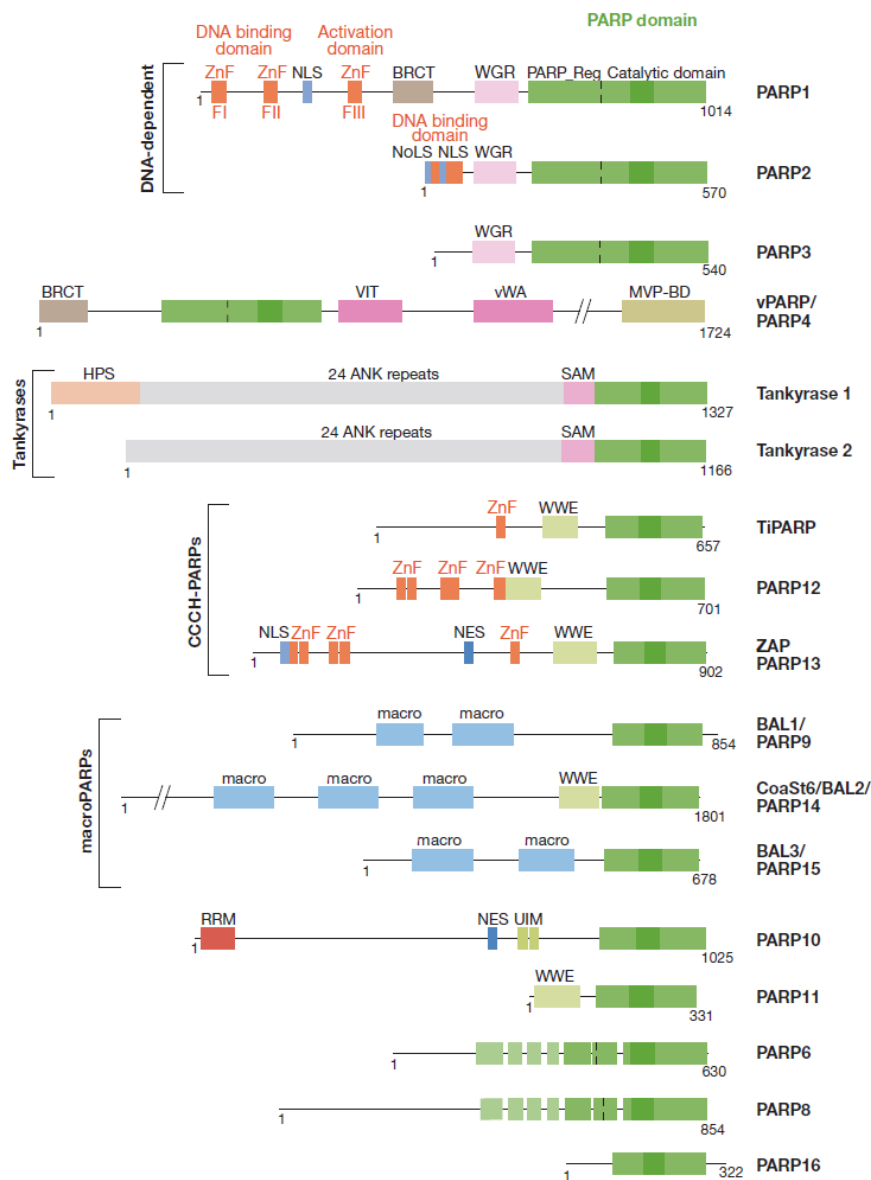


**Рисунок 1.** Реакция поли(ADP-рибозил)ирования белков (из [34], с небольшими изменениями).

### 1.1.1. Семейство поли(ADP-рибоза)-полимераз

Поли(ADP-рибоза)-полимеразы представляют собой большое семейство белков. На данный момент в геноме человека обнаружено 16 генов, кодирующих белки семейства PARP [27] (**рис. 2.**). Уровень их экспрессии в клетке сильно различается. Белки семейства PARP отличаются по длине полипептидной цепи, первичной структуре той части молекулы, которая находится вне каталитического домена, локализации в клетке и способности модифицировать те или иные белки. Однако все они содержат высококонсервативную С-концевую аминокислотную последовательность (PARP signature), состоящую из 50 аминокислотных остатков, входящих в каталитический домен. Высокая консервативность первичных последовательностей PARP в эволюционном ряду организмов показывает, что функции этих ферментов чрезвычайно важны для клетки и организма в целом. Становится очевидным, что поли(ADP-рибозил)ирование является одним из наиболее распространенных типов модификации белков. Оно сопряжено в разнообразных клеточных процессах, включая репарации, репликацию, транскрипцию и рекомбинацию ДНК, а также с клеточную гибель [35] (**табл. 1.**).

Первой была обнаружена и охарактеризована поли(ADP-рибоза)-полимераза-1 (PARP-1, КФ 2.4.2.30). PARP-1 (113 кДа) найдена у всех представителей эукариот, за исключением дрожжей. Высокую каталитическую активность фермент проявляет только в присутствии двуцепочечной ДНК, содержащей одно- или двунитевые разрывы. PARP-1 является конститутивным ферментом, характеризующимся высоким уровнем экспрессии во всех типах клеток –  $0,2-2,0 \times 10^6$  молекул на клетку [36].



**Рисунок 2.** Доменная структура белков семейства поли(ADP-рибоза)-полимераз человека [27].

В гомологичном регионе всех PARP (у PARP-1 - остатки 859-908) расположена последовательность, называемая «PARP signature» (выделена темно-зеленым цветом). Обозначения: BAL1 - В-агрессивная лимфома 1; BRCT, SAM, UIM, MVP-BD, VWA и ANK - модули взаимодействия с другими белками; ANK - анкирин; BRCT - BRCA1-С-конец; CoaSt6 - помощник проведения сигнала и активатор транскрипции 6; HPS - гомополимерные участки His, Pro и Ser; macro – макродомен, домен, участвующий в связывании ADP-рибозы и поли(ADP-рибозы); MVP-BD - MVP-связывающий домен; NES - сигнал ядерного экспорта; N(o)LS - сигнал ядерной (ядрышковской) локализации; PARP - поли(ADP-рибоза)-полимераза; PARP-Reg - предполагаемый регуляторный домен PARP; RRM - РНК-связывающий мотив; SAM - стерильный  $\alpha$ -мотив; TiPARP - 2,3,7,8-тетрахлородибензо-п-диоксин-индуцируемая поли(ADP-рибоза)-полимераза; UIM - убиквитин-взаимодействующий мотив; VIT - vault inter- $\alpha$ -trypsin; vPARP - PARP крупных цитоплазматических рибонуклеопротеидных комплексов; VWA - фактор фон Виллебранда типа А; WGR и WWE - консервативные участки, содержащие последовательности богатые остатками Trp-Gly-Arg и Trp-Trp-Glu; ZAP - антивирусный белок, содержащий цинковый палец; ZnF - ДНК- или РНК-связывающие цинковые пальцы.

**Таблица 1.** Разнообразие процессов, в которые вовлечены белки семейства поли(ADP-рибоза)-полимераз [27].

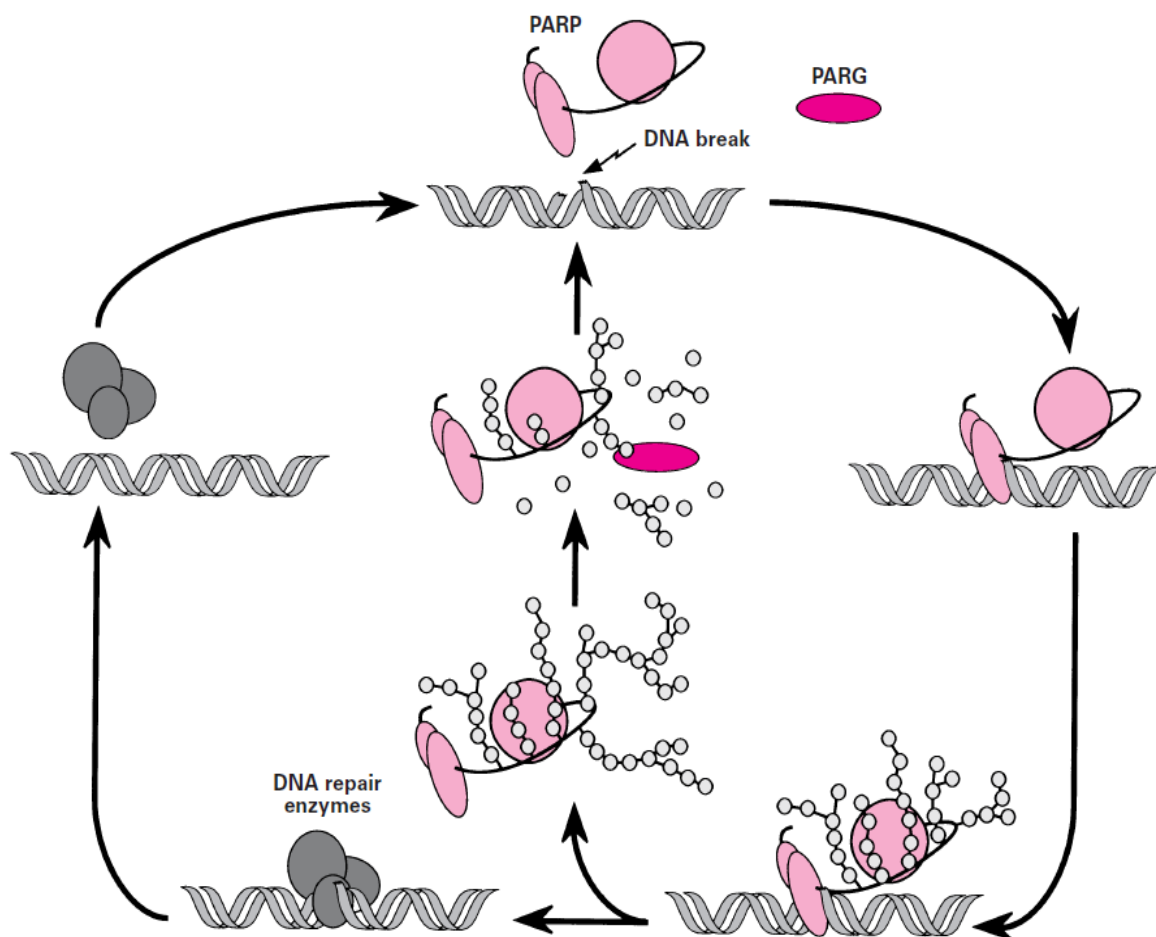
<b><i>Структура хроматина и метаболизм ДНК</i></b>	
Компактизация и деконденсация хроматина	PARP-1, PARP-2?
Транскрипция	PARP-1, PARP-2, Coast6, BAL1
Взаимодействие с доменами хроматина	PARP-1
Репарация однонитевых разрывов (эксцизионная репарация оснований)	PARP-1, PARP-2
Репарация двунитевых разрывов (резервный путь)	PARP-1
Репликация ДНК	PARP-1
Поддержание гомеостаза или целостности теломер	Танкираза-1, Танкираза-2, PARP-1, PARP-2
<b><i>Деление клеток, пролиферация, дифференцировка и гибель</i></b>	
Взаимодействие с центросомой, полюсами митотического веретена	PARP-1, PARP-3, Танкираза-1
Взаимодействие с центромерой, кинетохором	PARP-1, PARP-2
Разделение теломер	Танкираза-1
Дифференцировка клеток	PARP-1, PARP-2
Гибель клеток	PARP-1
Клеточная пролиферация	PARP-10
<b><i>Физиология и патологии</i></b>	
Канцерогенез, развитие опухоли, гипоксия или миграция клеток	PARP-1, BAL1
Репликация или транскрипция	ZAP, PARP-1
Иммунная и воспалительная реакция	PARP-1, PARP-2, BAL1, Coast6
Множественная лекарственная устойчивость	vPARP
Внутриклеточный транспорт	vPARP
Метаболизм липидов	PARP-2
Сперматогенез	PARP-2
<b><i>Развитие скелета и сосудов</i></b>	TiPARP

Примечания: «Обозначения см. в подписях к **Рисунку 2**»



Между открытием PARP-1 и других представителей семейства прошло более 30 лет. За это время было обнаружено несколько белков, в той или иной степени сходных с PARP-1. Так, sPARP-1 (на рисунке не приведена, т.к. нет самостоятельного гена) имеет массу 55,3 кДа и представляет собой «усеченный» белок, кодируемый тем же геном, что и PARP-1 [37]. PARP-2 (62 кДа) является функциональным аналогом PARP-1, хотя и содержится в клетке в гораздо меньшем количестве [38]. При нокауте по PARP-1 именно она компенсирует недостаток поли(ADP-рибоза)-полимеразной активности. Танкираза-1 (142 кДа) и танкираза-2 (127 кДа) находятся в комплексе Гольджи и могут транспортироваться в ядро [39, 40]. Их активность связана исключительно с регуляцией теломерных участков хромосом. Субстратом танкиразы-1 и танкиразы-2 является теломерный белок TEF1, в течение клеточного цикла закрывающий теломерные участки хромосом от теломеразы. Кроме того, сверхэкспрессия танкиразы-2 вызывает клеточную гибель некротического типа [39, 40]. PARP-3 (67кДа) участвует в клеточном делении и является маркером дочерней центриоли [41]. V-PARP (193 кДа) обнаружена в крупных цитоплазматических рибонуклеопротеидных комплексах [42]. Другие представители семейства PARP изучены в меньшей степени.

Ген, кодирующий белок PARP-1 человека, находится в хромосоме 1 (локус 1q41-q42), состоит из 23 экзонов и экспрессируется конститутивно [12, 36]. В структуре PARP-1 (113 кДа) выделяют три функциональных домена: N-концевой ДНК-связывающий (42 кДа); С-концевой NAD-связывающий (каталитический) (55 кДа) и аутомодифицируемый (16 кДа), расположенный в средней части молекулы. При возникновении однонитевых разрывов ДНК PARP-1 может связываться с ней за счет «цинковых пальцев», расположенных в ДНК-связывающем домене. Возникновение разрывов ДНК инициирует образование прочного комплекса PARP-1 (в виде димера) с ДНК и активацию каталитической функции фермента, NAD связывается с активным центром, расположенным в каталитическом домене, и вступает в реакцию [12, 26]; **рис. 3**. При этом поли(ADP-рибозил)ированию подвергаются не только разнообразные ядерные белки, ассоциированные с хроматином или входящие в его структуру (гистоны, топоизомеразы, ДНК-лигазы, ДНК-полимеразы, но и сама PARP-1) [35, 43-45]. При этом доля PARP-1 среди всех поли(ADP-рибозил)ированных белков может достигать 80-90% [43]. По мере возрастания степени аутомодификации PARP-1 теряет сродство к разрыву и отсоединяется от ДНК, видимо, за счет электростатического отталкивания [12].



**Рисунок 3.** «Челночная» модель взаимодействия поли(ADP-рибоза)-полимеразы-1 с ДНК (из [35], с небольшими изменениями).

Поли(ADP-рибозил)ирование PARP-1 (на схеме – PARP, или других ДНК-связывающих белков, таких как гистоны) в ответ на повреждение ДНК приводит к постепенной потере сродства PARP-1 к ДНК. Эта потеря сродства приводит, в конечном счете, к отделению аутомодифицированной PARP-1 от разрыва ДНК и к последующей инактивации фермента. ДНК-связывающая активность PARP-1 повторно активируется после расщепления полимера PARG. Структура типа «бусы на нити» представляет собой поли(ADP-рибозу). Для простоты PARP-1 показана на этой схеме в качестве мономерного белка, взаимодействующего с ДНК до ферментов репарации ДНК.

### 1.1.2. Поли(ADP-рибоза)-гликогидролазы и родственные белки

При написании раздела использованы статьи автора диссертации: [Shilovsky G.A., Khokhlov A.N., and Shram S.I. 2013. The protein poly(ADP-ribosylation) system: its role in genome stability and lifespan determination // *Biochemistry (Moscow)*. Vol. 78. № 5. P. 433-444].

Расщепление поли(ADP-рибозы) (PAR) до олигомеров и мономеров ADP-рибозы осуществляется поли(ADP-рибоза)-гликогидролазами (PARG; КФ 3.2.1.143) [46-51] и ADP-рибозилпротеидлиазой [52, 53].

PARG человека представлена в клетке несколькими изоформами, образующимися из одного гена путем альтернативного сплайсинга мРНК [48]. Ген *PARG* человека находится в хромосоме 10 (10q11.23), он содержит 18 экзонов, 17 интронов и имеет общий промотор с транслоказой внутренней мембраны митохондрий [54]. В ядрах клеток человека обнаружена полноразмерная форма фермента с молекулярной массой 111 кДа (у мышей - 110 кДа), а в цитоплазме - укороченные формы: 102, 99 и 60 кДа (у мышей - 65 кДа). В митохондриях обнаружен еще один белок, обладающий активностью PARG – ADP-рибозилгидролаза-3 с молекулярной массой 39 кДа [49-51]. Она не является продуктом гена *PARG*, однако аминокислотная последовательность ее каталитического домена имеет высокую степень гомологии с PARG. Наибольшая активность PARG в клетке обнаружена в цитоплазме, что оказалось неожиданным, так как синтез PAR преимущественно локализован в ядре [48]. Возможно, это связано с необходимостью защиты митохондрий от токсического действия попадающих в цитозоль молекул PAR [55].

PARG является необходимым компонентом для нормального функционирования системы поли(ADP-рибозил)ирования [56]. Об этом, в частности, свидетельствуют данные, полученные на дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*. Известно, что дикий штамм *S. cerevisiae* не содержит аналогов PARP и PARG. Экспрессия кДНК *PARP1* у *S. cerevisiae* приводила к накоплению PAR-модифицированных белков, что, в свою очередь, вызывало подавление репликации и транскрипции ДНК и, впоследствии, гибель клетки [57]. Полная инактивация гена *Parg* у мышей приводила к летальности на ранних стадиях эмбриогенеза [58], тогда как мыши, избирательно лишённые только ядерной изоформы с молекулярной массой 110 кДа (*PARG(110)<sup>-/-</sup>*), были жизнеспособны и фертильны, но при этом проявляли чрезвычайно высокую чувствительность к алкилирующим агентам, ионизирующей радиации и эндотоксическому шоку [59]. Однако подавление экспрессии ядерной формы PARG антисмысловыми олигонуклеотидами в первичной культуре астроцитов, наоборот, приводило к подавлению гибели клеток, вызванной *N*-метил-*N'*-нитро-*N'*-нитрозогуанидином (MNNG) [60]. С другой стороны, культуры клеток эмбриональных фибробластов мыши 3Т3 из гипоморфно мутантных по гену PARG линий, у которых были повышены уровни PARG(110) и гидролиз PAR в ядре, оказались более чувствительными к действию MNNG из-за нарушений в системе репарации повреждений ДНК [61]. Таким образом, PARG и, в частности, ее ядерная форма играют важную роль как в клеточных ответах на повреждение ДНК (репарация ДНК, гибель клеток), так и в некоторых патологических процессах. При этом нарушение координации в действии PARP и PARG может приводить к развитию патологических реакций.

### **1.1.3. Особенности фенотипа мышей, дефектных по генам белков семейства поли(ADP-рибоза)-полимераз**

При написании раздела использованы статьи автора диссертации: [Shilovsky G.A., Khokhlov A.N., and Shram S.I. 2013. The protein poly(ADP-ribosyl)ation system: its role in genome stability and lifespan determination // Biochemistry (Moscow). Vol. 78. № 5. P. 433-444].

Важным этапом в исследовании роли PARP в организме млекопитающих были работы по нокауту генов, кодирующих белки PARP-1 и PARP-2. Мыши с нокаутом по генам PARP-1 [15, 17-19, 62] или PARP-2 [20] имели нормальный фенотип, сохраняли фертильность, нормально развивались и сохраняли жизнеспособность. Однако полный нокаут по обоим генам (мыши PARP-1<sup>-/-</sup>/PARP-2<sup>-/-</sup>) приводил к летальности фенотипа на стадии гастрюляции (E8.0), а частичный нокаут по *Parp1* и полный нокаут по гену *Parp2* (мыши PARP-1<sup>+/-</sup>/PARP-2<sup>-/-</sup>) вызывал у самок мышей нестабильность X-хромосомы, бесплодие и приводил к более высокому уровню эмбриональной смертности [22]. Было показано, что у нокаутированных по *Parp1* мышей нет нарушений репарации ДНК на клеточном уровне, но, вместе с тем, такие мыши более предрасположены к образованию опухолей кожной ткани [18] и у них повышена нестабильность генома [63, 64]. Кроме того, оказалось, что нокаут по *Parp1* уменьшает ПЖ у крыс [21, 65, 66].

Однако, анализируя эти работы, нужно учитывать тот факт, что помимо PARP-1 и PARP-2, в клетке содержится целый ряд других белков семейства PARP [38, 40-42, 67, 68], которые, по крайней мере, частично, способны компенсировать отсутствие PARP-1 [24, 38]. Данные по влиянию нокаута генов других представителей семейства PARP на фенотипические признаки особей более скудны [69, 70-72] (табл. 2).

### **1.1.4. Система поли(ADP-рибозил)ирования белков в регуляции пролиферации, дифференцировки и гибели клетки**

При написании раздела использованы статьи автора диссертации: [Shilovsky G.A., Khokhlov A.N., and Shram S.I. 2013. The protein poly(ADP-ribosyl)ation system: its role in genome stability and lifespan determination // Biochemistry (Moscow). Vol. 78. № 5. P. 433-444].

Известно, что активность PARP гораздо выше в активном хроматине, то есть в активно делящихся или растущих клетках [7, 72]. Это объясняется более легким доступом различных ферментов, в том числе и PARP, к неупакованному хроматину. В результате поли(ADP-рибозил)ирования ядерных белков может происходить их отделение от ДНК, что содействует ее репликации в S-фазе ([7], см. также табл. 1). Особый интерес вызывает изменение активности PARP в клетках зародышевого пути и соответствующих тканях и

органах, как модели влияния различных биологически активных веществ (гормонов, митогенов и пр.) на функционирование системы клеточного поли(ADP-рибозил)ирования.

**Таблица 2.** Влияние нокаута генов системы поли(ADP-рибозил)ирования белков на процесс развития и фенотипические признаки у мышей (из [24], с небольшими изменениями).

Ген	Эффект	Ссылка
<i>Parp1</i>	Гиперчувствительность к $\gamma$ -облучению и алкилирующим агентам, высокая нестабильность генома (высокий уровень сестринских хроматидных обменов и микроядер), накопление повреждений ДНК и нарушение репарации ДНК	[17, 18, 62]
<i>Parp1</i>	Отсутствие дефектов в жизнеспособности, фертильности, развитии и дифференцировке тканей	[17, 18, 62]
<i>Parp2</i>	Гиперчувствительность к $\gamma$ -облучению и алкилирующим агентам	[20, 22],
<i>Parp2</i>	Высокая нестабильность генома (нарушение сегрегации хромосом и высокий уровень сестринских хроматидных обменов)	[20, 22]
<i>Parp2</i>	Нарушение тимопоэза, адипогенеза и сперматогенеза	[20, 22],
<i>Parp2</i>	Отсутствие дефектов в жизнеспособности, фертильности, развитии и дифференцировке тканей	[20, 22],
<i>Parp1; Parp2</i>	Эмбриональная летальность в начале гастрюляции	[22]
<i>Parp4</i> ( <i>vPARP</i> )	Повышенная заболеваемость опухолью толстой кишки после обработки диметилгидразином	[69]
<i>Tnks</i>	Повышенный расход энергии и снижение ожирения	[71, 72]
<i>Tnks</i>	Отсутствие дефектов в поддержании или кэппировании теломер	[71, 72]
<i>Tnks2</i>	Замедление роста	[70]
<i>Tnks2</i>	Отсутствие дефектов в поддержании или кэппировании теломер	[70]
Каталитический домен <i>Tnks2</i>	Эмбриональная летальность на 10 день	[71]
<i>Parg</i>	Эмбриональная летальность на 3-ий день и повышенная чувствительность к окислительному стрессу	[58]

В некоторых исследованиях было показано, что в раннем периоде развития организма после рождения, когда замедляется скорость роста организма и, соответственно, общая митотическая активность клеток, наблюдаются значительное уменьшение активности PARP.

В то же время, чрезмерная активация PARP, вызванная многочисленными повреждениями ДНК, может привести к гибели клетки. Возможно, это служит своеобразной защитой от генетически нестабильных и склонных к трансформации клеток. В 1985 г. Бергер предложил так называемую «суицидную гипотезу» гибели клетки, согласно которой ДНК-повреждающие агенты вызывают сверхактивацию PARP, которая приводит к значительному истощению запасов NAD<sup>+</sup> и АТФ, выраженному подавлению энергозависимых процессов, таких как гликолиз и митохондриальное дыхание, и, в конечном итоге, к гибели клетки по пути некроза [73, 74]. Известно также об участии PARP-1 в каспазанезависимом апоптозе, связанном с инициацией транслокации апоптоз-индуцирующего фактора в ядро [75] - предположительно, за счет взаимодействия проникающих в цитозоль молекул PAR с митохондриями [55, 76]. Этот тип клеточной гибели получил название «партанатоз» (parthanatos). Нокаутные по генам *Parp1* или *Parp2* мыши были более устойчивы к патологическим воздействиям, вызывающим сверхактивацию PARP, например, к ишемии [77-80].

Таким образом, имеющиеся в настоящее время данные указывают на то, что функционирование системы поли(ADP-рибозил)ирования направлено на обеспечение устойчивости клетки к внешним и внутренним факторам, вызывающим повреждение ДНК и нарушение целостности генома, хотя молекулярные механизмы, посредством которых реализуется эта функция, еще не совсем ясны.

## **1.2. Роль системы поли(ADP-рибозил)ирования белков в поддержании стабильности генома**

При написании раздела использованы статьи автора диссертации: [Shilovsky G.A., Khokhlov A.N., and Shram S.I. 2013. The protein poly(ADP-ribosyl)ation system: its role in genome stability and lifespan determination // *Biochemistry (Moscow)*. Vol. 78. № 5. P. 433-444].

Целостности генома постоянно угрожают повреждения ДНК, вызванные многочисленными экзогенными и эндогенными факторами. Образующиеся в патологических условиях окислительные радикалы повреждают различные клеточные структуры и макромолекулы, включая ДНК. Выживание клетки зависит от немедленного распознавания этих повреждений и быстрой мобилизации факторов репарации. Считается,

что PARP-1 способна одной из первых распознавать повреждения ДНК, и поэтому она идеально подходит на роль фактора, управляющего механизмами репарации ДНК в местах ее повреждения [12].

Установлено, что PARP-1 физически взаимодействует с белковым комплексом эксцизионной репарации ДНК, на основании чего можно предположить, что этот фермент способен направлять аппарат эксцизионной репарации к сайтам повреждения ДНК и облегчать ее репарацию [81, 82]. Кроме того, PARP-1 обеспечивает временную защиту образовавшихся при повреждении ДНК разрывов, изменяет структуру хроматина через поли(ADP-рибозил)ирование гистонов и, возможно, участвует в генерации сигналов о повреждении ДНК в клетке [83, 84].

Вызванная повреждением ДНК активация PARP приводит к модификации различных клеточных белков, в том числе и отвечающих за контроль клеточного цикла и клеточную гибель [28, 35, 81].

### **1.2.1. Система поли(ADP-рибозил)ирования белков и репарация ДНК**

Поли(ADP-рибозил)ирование играет важную роль в эксцизионной репарации оснований (BER) [81, 85-87]. С использованием метода перекрестных сшивок было показано, что PARP-1 связывается с поврежденной ДНК на ранних стадиях репарации [11].

Мобилизация PARP-1 в местах повреждения ДНК регулируется по механизму обратной связи: после того, как PARP-1 связывается с ДНК в местах возникновения повреждений, происходит активация поли(ADP-рибозил)ирования, а затем, в результате сильной аутомодификации, PARP-1 теряет сродство с ДНК и уходит с места повреждения. Фармакологическое ингибирование поли(ADP-рибозил)ирования блокирует диссоциацию комплекса PARP-1 с поврежденной ДНК, что затрудняет репарацию. В условиях, когда повреждения ДНК не могут быть быстро устранены, происходит многократное повторное связывание PARP-1 с разрывами ДНК [11]. Это препятствует различным перестройкам ДНК в области повреждения. Таким образом, связывание PARP-1 с односторонними разрывами ДНК или промежуточными соединениями, образующимися в процессе репарации ДНК, играет защитную роль в тех случаях, когда возможности системы репарации ограничены [11-13].

Другая функция PARP-1 в эксцизионной репарации состоит в инициации сборки комплекса белков BER, состоящего из белка XRCC1, ДНК-лигазы III и ДНК-полимеразы  $\beta$ , за счет нековалентного взаимодействия PAR с этими белками [88-91].

Окано с соавт. в экспериментах на культивируемых диплоидных фибробластах

человека (ДФЧ) показали, что синтез PAR происходит сразу после индукции односторонних разрывов ДНК (SSB) в локальных участках ядра [92]. Вслед за этим из всего ядра к местам повреждения ДНК перемещается XRCC1, причем для его мобилизации необходима активация PARP. Предполагается, что XRCC1 концентрируется и удерживается в местах повреждения ДНК посредством взаимодействия его BRCT1-домена с PAR. Таким образом, локальное поли(ADP-рибозил)ирование в месте повреждения ДНК амплифицирует сигнал повреждения и способствует мобилизации факторов репарации, что обеспечивает быстрое и эффективное восстановление целостности генома [82].

Однако в искусственной модельной системе, в условиях избытка XRCC1 или ДНК-лигазы III, сборка репарационного комплекса происходит эффективно и без активации синтеза PAR в местах повреждений, а внесение PARP-1 приводит даже к замедлению репарации ДНК [90, 91]. После обнаружения факта поли(ADP-рибозил)ирования XRCC1 было сделано предположение, что PARP-1 способна подавлять активность комплекса BER путем нарушения взаимодействия XRCC1 (в результате его модификации) с другими белками комплекса [90, 91]. Эти данные указывают на то, что PARP-1 сама по себе не является необходимым фактором для осуществления репарации SSB, но, как указывалось выше, ее роль заключается в ускорении формирования комплекса BER в местах повреждения ДНК и в предотвращении различных перестроек ДНК до того, как повреждение будет репарировано. Об этом свидетельствуют и результаты, полученные на первичных культурах клеток мышей PARP-1<sup>-/-</sup>. Было показано, что репарация повреждений ДНК, вызванных  $\gamma$ -излучением и химическими агентами, в таких клетках не нарушена [18], но, при этом, наблюдается повышение частоты сестринских хроматидных обменов (SCE) и других перестроек генома [19].

Во многих исследованиях было показано, что фармакологическое ингибирование PARP приводит к подавлению репарации ДНК и к увеличению цитотоксичности ДНК-повреждающих агентов в отношении опухолевых клеток [12]. Сходные результаты были получены в экспериментах на культуре клеток, трансфицированных ДНК, кодирующей ДНК-связывающий домен PARP-1 [93, 94]. И в том, и в другом случае наблюдаемые эффекты связаны с конкуренцией PARP-1 (или его ДНК-связывающего домена) с белками BER за места связывания с ДНК.

Оригинальная гипотеза об еще одной функции системы поли(ADP-рибозил)ирования в репарации ДНК обосновывается в работах Маруты с соавт [95, 96]. Они указывают на возможную роль PAR в создании высокой локальной концентрации АТФ в местах повреждения ДНК, что способствует быстрой ее репарации. Это нашло подтверждение и в другом исследовании, в котором с использованием



синхронизированной культуры клеток HeLa показали, что PAR способна служить предшественником АТР за счет согласованного действия PARG и пирофосфорилазы, а также что вновь образовавшийся АТР используется на стадии лигирования ДНК [97]. Активация PARP наблюдается и при облучении клеток млекопитающих ультрафиолетовым светом (UV) [98-101].

В исследованиях на эпидермисе мыши *in vivo* и на культивируемых ДФЧ, кератиноцитах и др. клетках кожи человека было показано, что облучение UV-B вызывает расщепление NAD<sup>+</sup> и активацию синтеза PAR, что, в свою очередь, приводит к активации ядерных протеасом и расщеплению поврежденных ядерных белков, включая гистоны [99]. Известно, что воздействие на клетки как UV-B, так и UV-C вызывает прямые повреждения ДНК (циклобутановые пиримидиновые димеры и фотопродукты типа 6-4), которые репарируются путем эксцизионной репарации нуклеотидов (NER), а также окислительные повреждения ДНК, репарируемые BER.

В работе Воденичарова и соавт. было обнаружено, что облучение фибробластов мыши UV-B приводит к двухфазной активации PARP: ранней - в течение первых 5 мин и поздней - между 60 и 120 мин [100]. При этом ранняя активация PARP связана с прямым повреждением ДНК, а поздняя - с повреждением ДНК активными формами кислорода, генерируемыми UV.

В целом ряде работ было продемонстрировано тесное взаимодействие системы поли(ADP-рибозил)ирования с NER и сделано предположение об участии поли(ADP-рибозил)ирования в клеточных ответах на вызываемые UV прямые повреждения ДНК. При этом облучение клеток UV вызывало только раннюю активацию PARP. Используя ряд экспериментальных подходов (антиоксиданты, локальное облучение, иммунопреципитацию хроматина и определение активности PARP), выяснили, что ранняя активация PARP связана с прямым повреждением ДНК (образование тиминовых димеров) UV-B или UV-C, тогда как вторая фаза (отдаленная) активации PARP обусловлена вторичными эффектами (генерацией АФК) облучения клеток UV-B. На основании полученных данных можно предположить, что клетки могут селективно активировать PARP для участия в различных реакциях клеток на повреждения ДНК.

В экспериментах на культивируемых ДФЧ GM637 с различным статусом NER (NER-дефицитные и NER-компетентные линии) обнаружили, что истощение PARP-1 с помощью РНК-интерференции в одинаковой степени снижает способность клеток к репарации повреждений ДНК, вызываемых как UV-B, так и UV-C [101]. При этом также сильно снижается способность NER-компетентных клеток реагировать на повреждения ДНК (до уровня NER-дефицитных клеток) и образовывать колонии.

Известно, что один из ключевых факторов NER - белок XPA (xeroderma pigmentosum protein A) - содержит в своей структуре участок связывания с PAR [84]. Фахрер и соавт. в экспериментах с рекомбинантным XPA человека и синтезированной PAR с различным числом мономеров показали, что эффективность их взаимодействия зависит от длины цепи PAR: 16-членный полимер не взаимодействовал с XPA, в то время как 63-членный полимер был способен связывать до четырех молекул XPA с константой диссоциации в области  $10^{-8}$  М [102].

Позже, в экспериментах на клеточных линиях кератиноцитов человека обнаружили, что облучение клеток UV вызывает перераспределение XPA в ядре - он колокализуется с PARP-1 в местах повреждений ДНК, но только в условиях активации PARP-1 [103]. Ингибирование PARP-1 приводило к ухудшению взаимодействия XPA с PARP-1 и предотвращало связывание XPA с хроматином после облучения клеток UV. Таким образом, в основе взаимодействия XPA с хроматином в местах ее повреждения лежит способность XPA физически взаимодействовать с полинуклеотидной частью аутомодифицированной формы PARP-1 и, в меньшей степени, других поли(ADP-рибозил)ированных белков, хотя некоторые факты указывают также на возможность образования комплекса между XPA и немодифицированной PARP-1.

В литературе также имеются сведения о взаимодействии PARP-1 с белком DDB2 (DNA damage-binding protein 2), который вместе с белком DDB1 (DNA damage-binding protein 1) образует многофункциональный фактор NER - UV-DDB [104]. Пинес с соавт. показали, что UV-DDB может образовывать комплекс с PARP-1, и что DDB2 усиливает поли(ADP-рибозил)ирование хроматина вблизи повреждения, тем самым привлекая к нему фактор реорганизации хроматина ALC1 (Amplified in Liver Cancer 1), облегчающий доступ факторов NER к поврежденному участку ДНК [105]. Кроме того, DDB2 может подвергаться поли(ADP-рибозил)ированию, что может вызывать увеличение его резистентности к действию протеаз и, соответственно, пролонгировать время жизни комплекса DDB2 с ДНК. Таким образом, взаимодействие PARP-1 с DDB2 является важным моментом в регуляции NER.

Недавно было показано, что моно(ADP-рибозил)ирование PARP-1 по остатку Lys521, осуществляемое белком SIRT6, приводит к активации каталитической функции PARP-1 и способствует репарации двунитевых разрывов (DSB) ДНК, вызываемых действием  $H_2O_2$  на культивируемые ДФЧ и диплоидные фибробласты мыши [106]. При этом ингибиторы PARP-1 (3-AB и PJ34) подавляли опосредуемую SIRT6 репарацию DSB через гомологичную рекомбинацию и негомологичное соединение концов. На основании

этого авторы делают вывод, что SIRT6 способствует репарации DSB через активацию PARP-1.

Следует также подчеркнуть, что после воздействия ДНК-повреждающих агентов происходит активация не только синтеза, но и гидролиза PAR в ядре. Так, было показано, что MNNG или UV (в области 254 нм) дозозависимо стимулируют катаболизм PAR в хроматине культивируемых гепатоцитов, причем обнаружен как быстрый (десятки секунд), так и медленный (часы) круговорот PAR [98].

Таким образом, в клетках млекопитающих синтез PAR, стимулируемый повреждениями ДНК, видимо, хорошо согласован с деградацией PAR, которая должна постоянно адаптироваться к изменяющемуся уровню повреждений ДНК.

### **1.2.2. Роль поли(ADP-рибоза)-полимеразы-1 в предотвращении возникновения хромосомных нарушений**

При написании раздела использованы статьи автора диссертации: [Shilovsky G.A., Khokhlov A.N., and Shram S.I. 2013. The protein poly(ADP-ribosylation) system: its role in genome stability and lifespan determination // *Biochemistry (Moscow)*. Vol. 78. № 5. P. 433-444].

Участие PARP в подавлении хромосомных перестроек, которые усиливаются при действии генотоксических агентов, было продемонстрировано в целом ряде работ. Показано, что фармакологическое ингибирование PARP вызывает увеличение частоты SCE [107, 108], амплификацию генов [109] и подавляет внутрехромосомную (но не межхромосомную) рекомбинацию [110].

Сверхэкспрессия ДНК-связывающего домена PARP-1 также приводила к накоплению мутаций [111], амплификации генов [112], увеличению времени удвоения клеточной популяции (УКП) и чувствительности клеток к действию генотоксических агентов [92]. Аналогичные изменения наблюдали и при нокауте гена *Parp1*. Инактивация четвертого экзона в гене *Parp1* мыши приводила к повышению частоты SCE и разрывов хроматина в тонком кишечнике после воздействия  $\gamma$ -облучения и N-метил-N-нитрозомочевины [62]. В культуре фибробластов, полученных от таких мышей, наблюдали замедление роста клеток, остановку клеточного цикла в фазах G<sub>2</sub>/M, активацию апоптоза и нарушение репарации при воздействии MMS [63]. Инактивация первого экзона в гене *Parp1* мыши снижала выживаемость эмбриональных стволовых клеток при воздействии  $\gamma$ -облучения и MMS [17]. В первичных культурах фибробластов и тимоцитов, полученных от мышей PARP-1<sup>-/-</sup> (инактивация гена *Parp1* по второму экзону), была повышена частота SCE и образования микроядер после воздействия  $\gamma$ -облучения и митомицина C [19]. Подавление экспрессии гена *PARP1* человека антисмысловой РНК в

клетках HeLa приводило к изменению клеточной морфологии, структуры хроматина, замедлению репарации ДНК и снижению уровня выживаемости после воздействия алкилирующих агентов и азотистого иприта, но не UV [113, 114]. Наоборот, сверхэкспрессия PARP-1 приводила к снижению частоты SCE [115].

Исследования функции PARP у мицелиального гриба *Aspergillus nidulans*, у которого есть только один ген, кодирующий PARP - *prpA*, показали, что инактивация этого гена летальна в гаплоидных линиях, а диплоидные линии, несущие только одну копию *prpA*, растут гораздо хуже и чувствительны к мутагенным соединениям [116]. В другом исследовании обнаружили, что единственный ортолог PARP у *Neurospora crassa* – NPO (Neurospora PARP ortholog), не обязателен для выживания клетки, репарации ДНК и сайленсинга, но в линиях NPO<sup>-/-</sup> репликативное старение мицелия ускоряется [117]. Таким образом, необходимость PARP для репарации ДНК и поддержания жизнеспособности прослеживается даже у мицелиальных грибов.

С использованием техники нокаута генов исследовали роль PARP-1, Ku86 и каталитической субъединицы ДНК-зависимой протеинкиназы (DNA-PK) в поддержании длины теломер, а также в процессах опухолеобразования и старения [118]. Было обнаружено, что инактивация гена *Parp1* не влияет на скорость укорочения теломер и жизнеспособность мышей, нокаутированных по гену теломеразы. Напротив, мыши, нокаутированные одновременно по генам как теломеразы, так и Ku86 или каталитической субъединицы DNA-PK, характеризовались ускоренным снижением жизнеспособности организма по сравнению с мышами, нокаутированными только по гену теломеразы. Из этого следует, что PARP-1 прямо не вовлечена в поддержание длины теломер даже в условиях инактивации теломеразы. Однако в других работах было показано, что PARP-1 и PARP-2, наряду с танкиразами, могут играть определенную роль в поддержании целостности теломерной ДНК [119, 120].

### **1.2.3. Взаимодействие поли(ADP-рибоза)-полимеразы-1 со специфическими белками прогерий**

При написании раздела использованы статьи автора диссертации: [Shilovsky G.A., Khokhlov A.N., and Shram S.I. 2013. The protein poly(ADP-ribosyl)ation system: its role in genome stability and lifespan determination // Biochemistry (Moscow). Vol. 78. № 5. P. 433-444].

Особого внимания заслуживают работы по исследованию взаимодействия PARP-1 со специфическими белками прогерий (болезней преждевременного старения), так как они заведомо связаны с системами репарации ДНК. Известен ряд генов человека, мутация в которых ассоциируется с той или иной прогерией: *ATM*, *WRN*, *CSB* и др. [121-

126].

Гены, кодирующие белки, вовлеченные в развитие синдрома Вернера, необходимы для процессов транскрипции, репликации и/или репарации ДНК [124]. Характерными чертами клеток, полученных от больных синдромом Вернера, являются нестабильность генома и гиперчувствительность к ДНК-повреждающим агентам [127, 128]. Дефект в белке синдрома Вернера (WRN) вызывает преждевременное старение.

В работе фон Коббе и соавт. показано, что PARP-1 способна физически взаимодействовать с высококонсервативным участком WRN – RecQ доменом [122]. Кроме того, исследования функционального взаимодействия между WRN и PARP-1 показали, что клетки больных синдромом Вернера характеризуются сниженной способностью к синтезу PAR в ответ на действие ДНК повреждающих агентов - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и MMS [122].

Фибробласты эмбрионов мышей, дефицитных по WRN и PARP-1 (PARP-1<sup>-/-</sup>/WRN<sup>Δhel/Δhel</sup>), характеризовались увеличенной частотой мультирадиальных хромосомных структур [125]. Такие клетки не содержали каких-либо хромосомных aberrаций, но отличались увеличенной частотой разрывов хроматид. Интересно, что мультирадиальные структуры были единственным типом перестройки ДНК, увеличение частоты которой было обнаружено в дефицитных по PARP-1 и WRN фибробластах. Авторы предположили, что WRN и PARP-1 могут быть частью одного белкового комплекса, вовлеченного в репарацию разрывов ДНК, и что дисфункция этого комплекса может, в конечном счете, приводить к образованию мультирадиальных структур. Полученные результаты также указывают на то, что одновременная инактивация генов *Parp1* и *Wrn* не приводит к увеличению частоты перестроек ДНК в более хрупких участках хроматина. Мутантные эмбриональные клетки мышей PARP-1<sup>-/-</sup>/WRN<sup>Δhel/Δhel</sup> характеризуются не только хромосомными нарушениями, но и значительным изменением профиля экспрессии генов, вовлеченных в эмбриональное развитие, контроль клеточного цикла, апоптоз, метаболизм, внутриклеточную передачу сигналов и окислительный стресс [124].

При этом более половины генов с измененной экспрессией, из числа выявленных в клетках с двойной мутацией, имели нормальный уровень экспрессии в клетках с мутацией только по одному гену (*Parp1* или *Wrn*), что указывает на синергизм во взаимодействии этих генов. Следует отметить, что все три типа мутантных клеток характеризовались измененной экспрессией генов, отвечающих на окислительный стресс. В исследованиях *in vivo* было показано, что выявленные на клетках изменения в профиле экспрессии генов проявляются также на уровне фенотипа – как у эмбрионов, так и у взрослых особей. У мышей с двойной мутацией выявлены дефекты развития эмбриона, а в тканях взрослых животных обнаружено увеличенное число апоптотических клеток плюс сильное

увеличение интенсивности внутриклеточного фосфорилирования и окислительного повреждения ДНК [124].

Синдром Коккейна - редкая генетическая болезнь, синдром сегментарного преждевременного старения. Белок, мутации в гене которого вызывают синдром Коккейна типа В (CSB), участвует в репарации, сопряженной с транскрипцией, и восстановлении синтеза РНК после повреждения ДНК, а также в BER после окислительного повреждения ДНК. Торслунд с соавт. обнаружили, что CSB локализуется в местах активации PARP-1 после окислительного стресса, идентифицировали CSB как новый акцептор PAR и показали, что поли(ADP-рибозил)ирование CSB ингибирует его ДНК-зависимую АТФазную активность [126]. Было установлено, что дефицитные по CSB клеточные линии являются сверхчувствительными к ингибиторам PARP. Авторы сделали вывод, что CSB поли(ADP-рибозил)ируется после развития окислительного стресса и предположили, что CSB играет важную роль в клеточном ответе на вызываемые активными формами кислорода повреждения.

Белок ATM является серин/треониновой протеинкиназой, играющей центральную роль в контроле клеточного ответа на ионизирующую радиацию и другие ДНК-повреждающие воздействия. Показано, что PAR способна стимулировать протеинкиназную активность ATM [121]. На основании данного факта можно предположить, что образующаяся в результате повреждения ДНК PAR может приводить к активации ATM. Тем не менее, фармакологическое ингибирование образования PAR в клетках не влияло на активацию ATM-зависимого пути при повреждении ДНК ионизирующим излучением [121].

#### **1.2.4. Система поли(ADP-рибозил)ирования белков и спонтанный канцерогенез**

При написании раздела использованы статьи автора диссертации: [Shilovsky G.A., Khokhlov A.N., and Shram S.I. 2013. The protein poly(ADP-ribosyl)ation system: its role in genome stability and lifespan determination // *Biochemistry (Moscow)*. Vol. 78. № 5. P. 433-444].

Хорошо известно, что повреждения генома могут способствовать развитию опухолей [129, 130]. В этой связи интересно рассмотреть возможное влияние PARP на процессы спонтанного канцерогенеза. В экспериментах на мышах PARP-1<sup>-/-</sup> отмечено уменьшение латентного периода образования спонтанных новообразований и повышение чувствительности животных к действию канцерогенов [65].

Уровень спонтанных опухолей в группах мышей PARP-1<sup>-/-</sup> и PARP-1<sup>+/+</sup> сходен, однако злокачественные опухоли, включая утробные опухоли, аденокарциномы легкого и

гепатоцеллюлярные карциномы (печеночно-клеточный рак, эпителиома печени), развиваются со значительно более высокой частотой у мышей PARP-1<sup>-/-</sup>, чем у мышей PARP-1<sup>+/+</sup> - 72% и 49% (p<0,05), соответственно [66]. Кроме того, у мышей PARP-1<sup>-/-</sup>, спонтанные опухоли развиваются в более раннем возрасте, по сравнению с животными дикого типа [66]. Авторами этих исследований было показано, что инактивация гена *Parp1* у мышей приводит к ускорению старения и уменьшению ПЖ (см. раздел 1.4).

У мышей с двойным нокаутом - по гену *Parp1* и по одному из генов, вовлеченных в ответ клетки на повреждение ДНК (гены, кодирующие WRN, p53, DNA-ПК или Ku86), наблюдали увеличение вероятности возникновения спонтанного развития опухолей [118]. В этой связи интересно отметить, что мыши, нокаутированные одновременно по гену теломеразы и гену одного из трех белков, - PARP-1, Ku86 или каталитической субъединицы DNA-ПК - не отличались большей частотой развития опухолей по сравнению с мышами, нокаутированными только по гену теломеразы [118].

Установлено, что количество индуцированной блеомицином PAR в лимфоцитах периферической крови у больных злокачественной опухолью гортани значительно ниже, чем у здоровых, на основании чего авторы предположили, что снижение способности соматических клеток к синтезу PAR может быть связано с увеличением риска развития злокачественных опухолей [131].

Повреждение ДНК, вызванное UV-B, способствует развитию злокачественных новообразований кожи. Чувствительность мышей к вызванному UV-B канцерогенезу кожи увеличивается при фармакологическом применении ингибиторов PARP [132]. Следовательно, активация PARP может быть связана с клеточными ответами, которые подавляют канцерогенез [100, 133].

Таким образом, имеющиеся в настоящее время данные указывают на то, что PARP, благодаря своей роли в поддержании стабильности генома, действуют как фактор, препятствующий возникновению спонтанных и индуцированных канцерогенами опухолей.

### **1.3. Негативная роль системы поли(ADP-рибозил)ирования белков в патогенезе ряда возрастных заболеваний**

При написании раздела использованы статьи автора диссертации: [Shilovsky G.A., Khokhlov A.N., and Shram S.I. 2013. The protein poly(ADP-ribosyl)ation system: its role in genome stability and lifespan determination // Biochemistry (Moscow). Vol. 78. № 5. P. 433-444].

Ранее отмечалось (см. раздел 1.1.4), что, помимо репарации ДНК, PARP-1 может быть вовлечена в процессы экспрессии и амплификации генов, пролиферации, дифференцировки и программируемой гибели клетки. Так, согласно так называемой «суицидной гипотезе» клеточной гибели, ДНК-повреждающие агенты вызывают сверхактивацию PARP, что приводит к значительному истощению запасов NAD<sup>+</sup> и АТФ, выраженному подавлению энергозависимых процессов, таких как гликолиз и митохондриальное дыхание, и, в конечном итоге, к некрозу [73, 74]. Известно также об участии PARP-1 в каспаза-независимом апоптозе – «партанатозе», связанном с инициацией транслокации апоптоз-индуцирующего фактора в ядро [75], предположительно, за счет взаимодействия проникающих в цитозоль молекул PAR с митохондриями [55, 76].

Таким образом, в условиях патологии активность PARP-1 будет оказывать негативное воздействие на клетку, истощая запасы NAD и АТФ, и способствуя экспрессии воспалительных цитокинов. Поскольку развитие патологий и дисфункций различных систем органов может приобретать с возрастом хронический характер, поиск и разработка специфических ингибиторов, снижающих последствия такой сверхактивации PARP, представляются необходимыми. Отдельным перспективным направлением, на наш взгляд, является поиск природных соединений, обладающих нужными свойствами (см. раздел 1.3.3).

Особый интерес представляет исследование молекулярных механизмов развития сердечно-сосудистой дисфункции с возрастом, включая активацию NF- $\kappa$ B, и роль в ПЖ PARP и генов, которые связаны с регуляцией клеточного окислительно-восстановительного статуса и с устойчивостью к окислительному стрессу (p66<sup>shc</sup>, сиртуины, факторы транскрипции FOXO) [134].

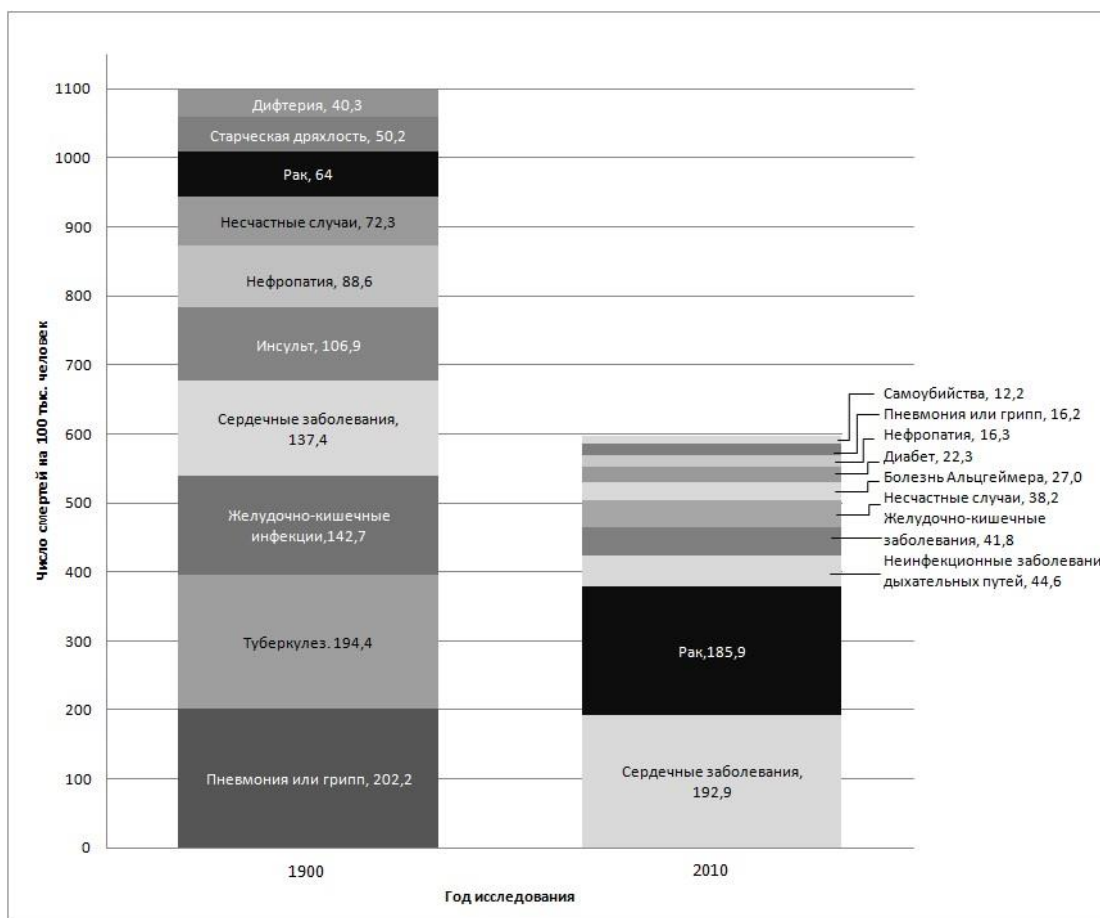
В эпидемиологических исследованиях показывали, что даже в отсутствие других факторов риска (например, диабет, гипертония, гиперхолестеринемия), с возрастом значительно увеличивается риск возникновения сердечно-сосудистых заболеваний. В связи с этим геронтологи считают, что лучшее понимание процесса старения приведет к разработке фармакологических средств, которые приведут к значительному сдерживанию возрастных нарушений в функционировании сердечно-сосудистой системы. Имеются данные о роли окислительного и нитрозирующего стресса в сердечно-сосудистой дисфункции при старении.

В работе Джонса и соавт. приведена структура смертности и ее изменение за последние сто лет [135] (**рис. 4**). Весомую роль в нее как ранее, так и сейчас, вносят заболевания сердечно-сосудистой системы, вышедшие на I место по числу причин смерти



(192,9 на 100 тыс. населения; 32.2% от числа всех умерших в 2010 г. и 12.5% в 1900 г., соответственно). Кроме того, особого внимания заслуживает рассмотрения роль фермента в нейродегенеративных заболеваниях. Важность данной группы патологий объясняется, тем, что они хоть и не обладает столь сильным влиянием на структуру смертности (так, например, болезнь Альцгеймера (БА) занимает шестую строчку в списке - 27 случаев на 100000 населения; 4.5% в от числа всех умерших в 2010 г), однако нейродегенеративные чрезвычайно негативно влияют на качество жизни человека, его социализацию и способность самостоятельно обеспечивать себя.

Увеличенная продукция АФК играет важную роль в развитии сердечной и эндотелиальной дисфункции, связанной с атеросклерозом, гипертонией и старением. Вызванное окислителем повреждение клетки вызывает активацию ядерного фермента PARP-1, который в свою очередь, способствует сердечной и сосудистой дисфункции в различных патофизиологических условиях, включая диабет, реперфузионное повреждение, сердечно-сосудистый шок и старение.



**Рисунок 4.** Основные причины смертности в развитых странах (приведен пример структуры смертности в США) [135].

### **1.3.1 Перспективы применения ингибиторов поли(ADP-рибоза)-полимераз в терапии возрастных заболеваний**

При написании раздела использованы статьи автора диссертации: [Shilovsky G.A., Khokhlov A.N., and Shram S.I. 2013. The protein poly(ADP-ribosyl)ation system: its role in genome stability and lifespan determination // *Biochemistry (Moscow)*. Vol. 78. № 5. P. 433-444].

Эффект ингибитора PARP INO-1001 на сердечную и эндотелиальную дисфункцию изучали, используя изолированные кольца аорты. Молодые (3 мес.) и старые (24 мес.) крысы Fischer получали в течение 2 месяцев физраствор или INO-1001. У обработанных физраствором старых животных наблюдали значительное снижение систолической и диастолической сердечной функции и эндотелиального релаксирующего ответа колец аорты на ацетилхолин. INO-1001 улучшал работу сердца у старых животных, а также вызванную ацетилхолином сосудистую релаксацию, опосредуемую NO. Сделали вывод, что фармакологическое ингибирование PARP может представлять новый подход для улучшения возрастной сердечной и сосудистой дисфункции [136].

В другом аналогичном исследовании Радовиц и соавт., используя катетер, выполняли анализ «давление-объем» левого желудочка молодых и старых крыс до и после однократной инъекции INO-1001 (5 мг/кг) [137]. Эндотелий-зависимую и -независимую вазорелаксацию изолированных колец аорты изучали с использованием ацетилхолина и нитропрусида натрия. Показали значительное снижение миокардиальной сократимости и эндотелий-зависимого релаксирующего ответа колец аорты у старых животных. Однократная доза INO-1001 вызывала значительное улучшение сердечной и эндотелиальной функции. Иммуногистохимия на нитротирозин и PAR подтвердила усиленный нитроокислительный стресс и активацию PARP у старых животных. INO-1001 уменьшал активацию PARP, но не влиял на иммунореактивность нитротирозина. Сделали вывод, что возрастная хроническая сердечно-сосудистая дисфункция может быть улучшена, по крайней мере, на короткий срок, отдельным курсом терапии ингибитором PARP, подтверждая роль пути нитроокислительный стресс-PARP в патогенезе возрастной сердечно-сосудистой дисфункции. С помощью иммуногистохимического окрашивания показали, что декомпозиция пероксинитрита FP15 эффективно снижает нитрозирующий стресс и предотвращает активацию PARP в стенке аорты старых крыс. На основании полученных данных авторы сделали вывод о важности эндогенного избыточного образования пероксинитрита в патогенезе возрастной сердечно-сосудистой дисфункции, а фармакологическое ингибирование PARP может применяться для лечения возрастной сердечно-сосудистой дисфункции [137].

Большинство данных по защитному действию ингибиторов PARP в моделях повреждения нейронов и других клеток получено с использованием в качестве ингибиторов никотинамида (НА) и его структурных аналогов – бензамида и 3-аминобензамида (3-АВ). Бензамид и его производные обладали низкой токсичностью и высокой избирательностью к PARP. Однако при использовании НА и бензамидов был выявлен целый ряд неспецифических эффектов: действие их в качестве антиоксидантов, влияние на метаболизм глюкозы, липидов и нуклеотидов, подавление общего синтеза ДНК, РНК и белка [23, 32]. В последнее время был синтезирован целый ряд более сильных, по сравнению с 3-АВ, ингибиторов PARP: 1,5-дигидроизохинолин, 6(5Н)-фенантридинон, 5-йодо-6-амино-1,2-бензопирон, 4-амино-1,8-нафталимид, 3-аминофталгидразид. В литературе появились данные о влиянии этих веществ на важнейшие клеточные процессы, а также данные об их фармакологических свойствах при онкогенезе [24]. В настоящее время рядом фармакологических компаний проводятся клинические испытания лекарственных препаратов на основе ингибиторов PARP (табл. 3).

Еще одним способом подавления активности PARP является, как ни удивительно, и ингибирование противоположного ему фермента – PARG. Это объясняется тем, что, как уже упоминалось, PARP является основным субстратом поли(ADP-рибозил)ирования. PAR-модифицированная же PARP теряет средство к поврежденной ДНК. Ингибиторами PARG, кроме известных химических ингибиторов, таких как ADP-гидроксиметилпирролидиндиол (самый мощный из известных ингибиторов PARG) [138, 139], является ряд природных веществ. К ним, прежде всего, относятся танины, являющиеся природными компонентами зеленого чая и красного вина, в том числе таниновая кислота, а также компоненты галла (нароста на листьях дуба - в том числе производные моно-галлоилглюкозы), и лигнина, полиметоксифенольного вещества естественного происхождения (хотя канифериловый спирт, являющийся основным компонентом лигнина, ингибиторного действия не оказывает) [139-142]. Возможно, что описанные ранее положительные фармакологические эффекты этих природных соединений связаны не только с их антиоксидантными свойствами, но и с возможностью подавлять гидролиз PAR. В этой связи интересным является сообщение о проникающих через клеточную мембрану ингибиторах на основе салициланилида, способных ингибировать и PARG и PARP [143].

**Таблица 3.** Клинические испытания ингибиторов поли(ADP-рибоза)-полимераз.

Ингибитор PARP	Фирма	Сродство к PARP	Синергетический эффект с ( <i>in vitro</i> )	Вид опухоли	Фаза	Статья
ABT-888	Abbott	$K_i = 5,2$ нМ (PARP-1) $K_i = 2,9$ нМ (PARP-2) $EC_{50} = 2$ нМ (для клеток C41)	Темозоломид Препараты платины Циклофосфамид Ионизирующее излучение MNNG Ингибиторы топоизомеразы I	Глиобластома мультиформная Твердые опухоли и лейкозы BRCA1 или BRCA2-мутантные опухоли	Фаза II Фаза I Фаза I	[144-150]
AG014699	Pfizer	$K_i = 1,4$ нМ (PARP)	Темозоломид Ионизирующее излучение Топотекан	BRCA1 или BRCA2-мутантные опухоли	Фаза II	[151-153]
AZD2281 (олапариб)	AstraZeneca	$IC_{50} = 5$ нМ (PARP-1) $IC_{50} = 1$ нМ (PARP-2) $IC_{50} = 1,5$ мкМ (танкираза-1)	Темозоломид Препараты платины Метилметансульфонат (MMS) Ионизирующее излучение	Платин-чувствительные опухоли яичников BRCA1 или BRCA2-мутантные опухоли Рак молочной железы Другие твердые опухоли	Фаза II Фаза II Фаза II фазы I / II	[154-159]
BSI-201	Sanofi-Aventis	Нет данных	Ионизирующее излучение Препараты платины Гемцитабин Топотекан	Рак молочной железы Рак яичников, глиобластома мультиформная и рак матки (в различных сочетаниях) BRCA2-мутантный рак поджелудочной железы Другие твердые опухоли	Фаза III Фаза II Фаза Ib Фаза I / II	[160-162]
CEP-8983 / CEP-9722 (пропрепарат)	Cephalon	$IC_{50} = 20$ нМ (PARP-1) $IC_{50} = 6$ нМ (PARP-2)	Темозоломид Ингибиторы топоизомеразы I	Твердые опухоли	Фаза I	[163]
МК-4827	Merck	$IC_{50} = 3,2$ нМ (PARP-1) $IC_{50} = 4$ нМ (PARP-2)		Твердые опухоли и рак яичников	Фаза I	[164]

### **1.3.2. Флавоноиды – новая группа модуляторов системы поли(ADP-рибозил)ирования белков**

Флавоноиды (антоцианидины, флавонолы, флавоны, флаваноны и халконы) - фенолсодержащие пигменты растений (известно более четырех тысяч), входят в состав обычного рациона питания и обладают лекарственными свойствами при различных патологиях человека, ввиду чего предлагается их использование в лечении воспалительных болезней [165-167]. Флавоноиды являются экзогенными низкомолекулярными антиоксидантами, способными предупреждать возникновение и нейтрализовать действие АФК [168, 169]. Их антиоксидантное действие обусловлено способностью образовывать хелатные комплексы с металлами, а также связывать свободные радикалы [170]. Легкость окисления определяет биологическую активность флавоноидов, защищающих от окисления другие соединения или способствующих их восстановлению [168, 170]. В последнее время, с учетом роли свободных радикалов в развитии апоптоза нейронов, ведется активный поиск новых лекарственных веществ среди растительных фенолов, способных препятствовать их токсическому воздействию на клетки. Были описаны цитопротекторные эффекты флавоноидов в реакциях воспаления [166], при заболеваниях сердечно-сосудистой системы [171, 172] и раке [173]. Их действие обуславливается модуляцией редокс-зависимых функций и кальциевого гомеостаза [174], активности различных ферментных систем [166], а также пролиферации, дифференциации и других клеточных ответов на действие ряда стимулов [166, 175]. Этот эффект защищает нейроны от апоптоза при ишемии [176].

Кроме антиоксидантного и противовоспалительного эффекта, для флавоноидов показаны и цитопротекторные эффекты при апоптозе [177, 178]. Ингибиторы протеасом MG132 и MG115 вызывали уменьшение уровня Bid, Bcl-2, Bcl-XL и белка сурвивина, повышение уровня Bax, потерю трансмембранного потенциала митохондрий, высвобождение цитохрома C, активацию каспаз (-3, -8 и -9), увеличение уровня опухолевого супрессора p53 и расщепление PARP-1 в дифференцированных клетках РС12. Байкалеин подавлял вызванное ингибированием протеасом изменение уровня связанных с апоптозом белков, образование АФК, истощение восстановленного глутатиона, повреждение ДНК и гибель клеток. Таким образом, байкалеин может ослабить вызванный ингибированием протеасомы апоптоз, подавляя активацию митохондриального пути и каспазы-8 и Bid-зависимых путей, видимо, за счет его ингибирующего действия на образование АФК и истощение восстановленного глутатиона.

PARP-ингибирующее действие было показано у многих природных и синтетических флавоноидов (кверцетин, рутин, мальтоглокозил- и моноглокозилрутин и др.) [179-181]. *In vitro* методом ELISA показали, что флавоноиды ингибируют активность PARP, тогда как глюкозильные модификации снижают ингибирующий эффект [182].

Также флуоресцентным методом, (основанном на измерении уровня неизрасходованного NAD<sup>+</sup> при его превращении в стабильный флуоресцентный продукт) показали, что флавоноид является также мощным ингибитором танкиразы (IC<sub>50</sub>=325 нМ). Производные флавоноидов апигенин и изопропилгаллат оказывали ингибирующее действие в микромолярных концентрациях, но были более чем тридцать раз более селективны к танкиразе, чем к PARP-1 и PARP-2 [183].

Ли и соавт. исследовали противовоспалительное действие даидзеина (4',7'-дигидроксифлавоноид) – изофлавоноид, выделенного из многих лекарственных трав, при вызванном фактором некроза опухолей (TNF)-α воспалении легких у мышей *in vivo* и в эпителиальных клетках легких мыши MLE-12 *in vitro* [180]. Показали, что предварительная обработка даидзеином (400 мг/кг), заметно ослабляла индуцированное TNF-α воспаление легких у мышей и подавляла экспрессию Cxcl2 в тканях легких. Кроме того, даидзеин (10 мкМ) предотвращал вызванное TNF-α увеличение экспрессии и активности Cxcl2 и транскрипционную активность NF-κB, и заметно снижал вызванное TNF-α поли(ADP-рибозил)ирование белка в клетках MLE-12 *in vitro*. Авторы делают вывод, что противовоспалительное действие даидзеина в эпителиальных клетках легких мыши, видимо, опосредовано прямым взаимодействием с PARP-1, ингибирующим поли(ADP-рибозил)ирование белка RelA/p65, необходимого для транскрипции провоспалительных хемокинов, таких как Cxcl2.

Гератц и соавт. показали, что флавоноид дозозависимо ингибировал активность PARP-1, а также подавлял уменьшение содержания NAD<sup>+</sup> и образование полимеров PAR в обработанных MNNG легочных эпителиальных и сосудистых эндотелиальных клетках человека [184]. Кроме того, флавоноид снижал вызванное ЛПС образование IL-8 в легочных эпителиальных клетках, что было подтверждено анализом транскрипции. Кроме того, флавоноид значительно увеличивал содержание ингибитора транскрипции IκB-α. Сделали вывод, что флавоноид является потенциальным кандидатом на применение в лечении хронических воспалительных болезней.

При неврологических и нейродегенеративных состояниях очень перспективной и привлекательной терапевтической мишенью является подавление партанатаза, ведущего к

гибели нейронов за счет сверхактивации PARP-1. Фатокун и соавт. проанализировали несколько тысяч производных флавонола с целью выявления веществ с нейропротекторным эффектом [179]. Нейропротекторные способности различных производных флавононов тестировали в культуре кортикальных нейронов. 4'-метоксифлавонон и 3',4'-диметоксифлавонон предотвращали уменьшение клеточной жизнеспособности HeLa и SH-SY5Y, вызванное ДНК-алкилирующим агентом MNNG, индуцирующим партанатоз. Оба соединения снижали синтез и накопление PAR и защищали кортикальные нейроны от гибели клеток, вызванной N-метил-D-аспаратом. Показали, что метоксилирование флавонона в положении 4' вызывает подавление партанатоза, а дополнительное метоксилирование в положении 3' улучшает метаболическую стабильность и не нарушает активность. Таким образом, эти молекулы могут служить для разработки новых нейротерапевтических препаратов для лечения неврологических и нейродегенеративных состояний.

Янг и соавт. показали, что югланин, выделенный из сырого экстракта горца птичьего (*Polygonum aviculare*) подавляет «старение» в фибробластах кожи человека. Югланин снижал активность SA- $\beta$ -Gal и уровень АФК в клетках при повреждении, вызванном адриамицином, а также подавлял увеличение активности SA- $\beta$ -Gal в фибробластах при репликативном старении [181]. Авторы делают вывод, что югланин подавляет клеточное старение и может быть полезным для разработки пищевых добавок или косметики.

Противовоспалительный и PARP-ингибирующий эффект флавоноидов оценивали в цельной крови больных хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) (n=10) или диабетом 2 типа (n=10) и у здоровых людей (n=10) соответствующего возраста [185]. Кровь обрабатывали липолисахаридами (ЛПС) (1 мкг/л, 16 ч) с или без предварительной инкубации с флавононом, физетином, морином или трицетином. Показали, что преинкубация с физетином или трицетином сильно подавляла вызванное ЛПС снижение концентрации TNF- $\alpha$  в крови больных ХОБЛ [среднее ( $\pm$ SEM): -41 $\pm$ 4% (физетин) и -31 $\pm$ 4% (трицетин); p< 0,001] и IL-6 в крови больных диабетом 2 типа [-31 $\pm$ 5% (физетин) и -29 $\pm$ 6% (трицетин); p $\leq$ 0,001]. Сделали вывод, что ингибирующие PARP флавоноиды физетин и трицетин способны снижать вызванное ЛПС выделение цитокинов из лейкоцитов больных хроническим системным воспалением, что предполагает их возможное применение как лечебных пищевых добавок [185].

Кверцетин защищал клетки PC12 с нейрональным фенотипом от токсического действия H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [186]. Флавоноиды *G. biloba* снижали повреждение клеток

феохромоцитомы крысы клеток PC12 и нейронов гиппокампа [187-189]. Флавоноиды дозозависимо подавляли снижение содержания NAD<sup>+</sup> и образование PAR в обработанных MNNG легочных эпителиальных и сосудистых эндотелиальных клетках человека, и, кроме того, снижал вызванное липополисахаридами образование IL-8 в легочных эпителиальных клетках [167]. Одним из возможных путей протекторного действия флавоноидов является, как предполагается, ингибирование PARP-1 и сохранение клеточного NAD<sup>+</sup> и энергетики и противовоспалительная активность этих флавоноидов [167].

#### **1.4. Роль системы поли(ADP-рибозил)ирования белков в детерминации продолжительности жизни**

При написании раздела использованы статьи автора диссертации: [Shilovsky G.A., Khokhlov A.N., and Shram S.I. 2013. The protein poly(ADP-ribosyl)ation system: its role in genome stability and lifespan determination // *Biochemistry (Moscow)*. Vol. 78. № 5. P. 433-444].

Накопленные за последние десятилетия сведения позволили предположить, что эффективность работы систем репарации ДНК у млекопитающих положительно коррелирует с видовой ПЖ. В этой связи следует упомянуть, прежде всего, ставшую уже классической работу Харта и Сетлоу, в которой авторами была обнаружена положительная корреляция между видовой ПЖ млекопитающих и эффективностью репарации ДНК (внеплановый синтез ДНК, определяемый по включению [<sup>3</sup>H]-тимидина) в культивируемых фибробластах животных семи различных видов млекопитающих после облучения клеток UV [190]. При этом авторами было сделано допущение о приблизительно равном содержании ДНК в клетках различных млекопитающих, о равном содержании ДНК в клетках различных млекопитающих, о равенстве числа разрывов, а также размеров репарируемого участка. В работе Фрэнсиса с соавт. [191] эти результаты были частично подтверждены: выявлена линейная корреляция между ПЖ у 21 вида млекопитающих и числом сайтов репарации (но не их размером, как у Харта и Сетлоу) после облучения UV культуры диплоидных фибробластов.

В то же время, в аналогичном, но более обширном исследовании, выполненном Като с соавт. (34 вида млекопитающих, пять из которых были теми же, что и в работе Харта и Сетлоу), не было выявлено корреляции между ПЖ и эффективностью репарации повреждений ДНК, вызванных UV [192]. Таким образом, можно констатировать, что данные, касающиеся корреляции максимальной ПЖ и способности к репарации вызванных UV повреждений, не столь однозначны, как принято считать.



#### **1.4.1 Корреляция между максимальной продолжительностью жизни и активностью поли(ADP-рибоза)-полимераз**

При написании раздела использованы статьи автора диссертации: [Shilovsky G.A., Khokhlov A.N., and Shram S.I. 2013. The protein poly(ADP-ribosyl)ation system: its role in genome stability and lifespan determination // Biochemistry (Moscow). Vol. 78. № 5. P. 433-444].

Перо с соавт. определяли активность PARP (стимулированный  $\gamma$ -облучением в дозе 100 Гр синтез PAR) в лейкоцитах 12 различных видов млекопитающих [193]. Была обнаружена высокая положительная корреляция ( $r=0,97$ ,  $p<0,0001$ ) между максимальной ПЖ млекопитающих и активностью PARP. Авторы показали, что выявленная корреляция не является следствием видовых различий в размере генома или различиями в эффективной дозе облучения. Однако другие исследователи обратили внимание на существование ряда особенностей методического характера, которые затрудняют столь однозначную интерпретацию полученных Перо с соавт. результатов: разная чувствительность ДНК к  $\gamma$ -излучению; больший уровень NAD<sup>+</sup> в лейкоцитах более долгоживущих видов; отсутствие строгого контроля возраста животных при формировании групп [14].

Учитывая все вышеприведенные обстоятельства, Грюбе и Бюркле [14] провели проверку полученных группой Перо данных с использованием более корректных методических подходов. Ими был поставлен масштабный эксперимент, в котором определяли активность PARP в пермеабелизованных мононуклеарных лейкоцитах периферической крови (РВМС) 13 видов млекопитающих с различной видовой ПЖ в пределах от 3,5 (мышь) до 95 лет (человек). При этом возраст отобранных в эксперимент животных не превышал 30-40% от видовой ПЖ. Активацию PARP вызывали внесением в реакционную смесь насыщающих количеств двунитевых дезоксиолигонуклеотидов и NAD<sup>+</sup>, что исключало возможное влияние ряда факторов на активность PARP, как это было в экспериментах группы Перо. Тем не менее, полученные группой Бюркле результаты подтвердили наличие строгой положительной корреляции между активностью PARP и ПЖ вида ( $r=0,84$ ;  $p<0,001$ ).

Кроме того, Бюркле с соавт. изучали образование PAR в ответ на индуцированное  $\gamma$ -облучением повреждение ДНК в РВМС крысы и человека с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии [194]. Авторы обнаружили, что способность лейкоцитов человека к синтезу PAR в ответ на облучение  $\gamma$ -лучами значительно превышает таковую для аналогичных клеток крысы, несмотря на более высокое содержание NAD<sup>+</sup> в РВМС крыс по сравнению с РВМС человека и незначительные

различия в числе вызванных радиацией разрывов нитей ДНК у этих видов. Это соответствует результатам других работ той же группы [34]. При этом не было выявлено каких-либо существенных различий в содержании белка PARP-1 в клетках обоих видов [14]. Сравнение каталитических свойств очищенных рекомбинантных белков показало, что PARP-1 человека характеризуется более высоким значением каталитической константы скорости реакции аутомодификации фермента по сравнению с PARP-1 крысы [34]. Таким образом, выявленные ранее различия в активности PARP в РВМС могут, по крайней мере, частично, объясняться видоспецифическими различиями в каталитических свойствах ферментов, что, по-видимому, обусловлено различиями в первичной структуре этих белков.

Для выяснения возможной связи между поли(ADP-рибозил)ированием и ПЖ у людей Муйрас с соавт. определяли стимулированную активность PARP (определение этого термина приведено в разделе 1.5.1) в трансформированных вирусом Эпштейна-Барр лимфобластоидных клеточных линиях, полученных из РВМС 49 долгожителей в возрасте 100 лет и более, а также 51 добровольца в возрасте 20-70 лет из популяции французских европеоидов [195]. Стимулированная активность PARP в расчете на клетку у долгожителей в возрасте 100 лет и более оказалась всего лишь в 1,15 раза выше ( $p=0,031$ ), чем в контрольной группе, но при этом уровень белка PARP-1 у долгожителей был в 1,39 раза ниже, чем в контрольной группе. Из этого следует, что у долгожителей в возрасте 100 лет и более система поли(ADP-рибозил)ирования работает более эффективно, чем у обычных людей.

Шеванн и соавт. изучали взаимосвязь между способностью к репарации ДНК и активностью PARP в иммортализованных вирусом Эпштейна-Барр клеточных линиях В-лимфоцитов здоровых итальянцев трех различных возрастных групп: молодых (19-26 лет), старых (69-75 лет) и долгожителей (100-107 лет) [196]. Было показано, что по способности к запуску репарации после сублетального окислительного повреждения, вызванного  $H_2O_2$ , и по способности к поли(ADP-рибозил)ированию клетки долгожителей имеют характеристики, типичные для клеток молодых людей, тогда как у клеток старых людей эти показатели снижены. Более того, в клетках старых людей обнаружили снижение экспрессии генов *PARP1* и *PARP2* приблизительно в 2 раза, а также снижение уровня аутомодифицированной PARP-1 и других поли(ADP-рибозил)ированных белков по сравнению с этими показателями у молодых и долгожителей. При этом ни у одного долгожителя эти показатели не укладывались в диапазон величин, характерных для группы старых людей. Авторы делают вывод, что система поли(ADP-рибозил)ирования хорошо сохранена у здоровых людей, достигших возраста 100 лет и более, являющихся

собой наилучший пример «успешного старения».

В заключение следует отметить интересный феномен, обнаруженный Лиза с соавт. [197]. Ими было показано, что уровень аутоантител к PARP-1 в сыворотке крови долгожителей (n=33) значительно выше, чем в контрольной группе, состоящей из здоровых людей в возрасте от 12 до 80 лет (n=66). Эти данные хорошо согласуются с имеющимися в литературе сведениями о возрастном повышении уровня неорганоспецифических аутоантител, в том числе антиядерных антител [198], и подтверждают гипотезу Грабера о том, что «аутореактивные антитела представляют собой физиологические системы утилизации продуктов метаболизма и катаболизма» [199], тем самым помогая пожилым стать долгожителями.

#### **1.4.2. Влияние уровня экспрессии гена поли(ADP-рибоза)-полимеразы-1 на продолжительность жизни**

При написании раздела использованы статьи автора диссертации: [Shilovsky G.A., Khokhlov A.N., and Shram S.I. 2013. The protein poly(ADP-ribosylation) system: its role in genome stability and lifespan determination // *Biochemistry (Moscow)*. Vol. 78. № 5. P. 433-444].

Ранее Вонг с соавт. показали, что нокаутированные по гену *Parp1* мыши 129/Sv более подвержены развитию опухолей [18] (см. выше). Также у самок мышей PARP-1<sup>-/-</sup> было отмечено снижение ПЖ и существенное увеличение скорости старения популяции. Анализ ряда показателей, включая прибавление в весе, температуру тела, эстральную функцию, поведение, биохимические показатели, четко указывает на ускорение биологического старения у мышей PARP-1<sup>-/-</sup> [18].

В другом исследовании было показано, что средняя и максимальная ПЖ у самцов мышей 129/Sv PARP-1<sup>-/-</sup> на 30% (p<0,000005) и 25% (p<0,01) меньше, чем у животных PARP-1<sup>+/+</sup>, соответственно [66]. При этом начальный риск смерти у самцов PARP-1<sup>-/-</sup> мышей был почти в 8 раз больше (p<0,01), чем у мышей PARP-1<sup>+/+</sup> [66]. У самок мышей 129/Sv PARP-1<sup>-/-</sup> снижение средней и максимальной ПЖ по сравнению с контрольной группой было менее выраженным - 13,3% (p<0,002) и 16,4% (p<0,05), соответственно [21]. Таким образом, для мышей PARP-1<sup>-/-</sup> характерны некоторые признаки ускоренного старения, ухудшение выживаемости, сокращение ПЖ, раннее развитие новообразований различных локализаций и повышение частоты возникновения спонтанных опухолей печени по сравнению с мышами PARP-1<sup>+/+</sup>, что подтверждает важную роль системы поли(ADP-рибозил)ирования в процессах канцерогенеза и старения [21, 66].

В связи с тем, что с возрастом происходит накопление геномных нарушений, ведущих к ухудшению жизнеспособности клетки и старению организма, особый интерес

представляют исследования по влиянию сверхэкспрессии генов контроля репарации ДНК на ПЖ. Данные, согласно которым активность PARP в РВМС снижается с возрастом [14, 195], послужили предпосылкой к предположению, что повышенная активность PARP способствует долгожительству [200, 201]. Иначе говоря, логично было бы предположить, что более высокая способность к поли(ADP-рибозил)ированию сделает клетку более жизнеспособной и стрессоустойчивой.

Используя экспрессионную систему GAL4/UAS, Шапошников и Москалёв исследовали влияние сверхэкспрессии гена *Parp1* в нервной системе *Drosophila melanogaster* на ПЖ [202]. Экспрессию гена, кодирующего PARP-1, активировали как в течение всего жизненного цикла (конститутивно), так и на стадии имаго (кондиционно). Было показано, что сверхэкспрессия *Parp1* не влияет значительно на уровень повреждений ДНК в нервной системе. Конститутивная активация экспрессии гена *Parp1* на протяжении всего жизненного цикла у самцов приводила к снижению как средней (на 14%), так и максимальной (на 8%) ПЖ, тогда как у самок наоборот - к увеличению средней (на 14%) и максимальной (на 20%) ПЖ. В то же время кондиционная активация экспрессии *Parp1* приводила к увеличению как у самцов, так и у самок средней (на 16% и 3%, соответственно) и максимальной (на 15% и 10%, соответственно) ПЖ. Таким образом, у самок как конститутивная, так и кондиционная сверхэкспрессия *Parp1* продлевает жизнь, тогда как у самцов конститутивная экспрессия уменьшает, а кондиционная - увеличивает ПЖ. Можно предположить, что эти различия объясняются тем, что конститутивная сверхэкспрессия гена *Parp1*, в отличие от кондиционной, может влиять на ПЖ опосредованно - через влияние на развитие особи и морфогенез уже на начальных стадиях жизненного цикла.

Также авторами этого исследования было обнаружено, что фармакологическое ингибирование пирролидинеолдифтиокарбаматом ядерного фактора κВ (NF-κВ), контролирующего гены воспалительных реакций, вызывает увеличение ПЖ как у самцов, так и у самок *D. melanogaster* (на 13-20% - средней ПЖ, и на 10-15% - максимальной ПЖ). Однако, как ни удивительно, ингибирование NF-κВ в комбинации с кондиционной сверхэкспрессией гена *Parp1* вызывало статистически значимое снижение ПЖ у самцов. Авторы делают вывод, что синергического эффекта между кондиционной сверхэкспрессией *Parp1* и фармакологическим ингибированием NF-κВ не обнаружено, а геропротекторный эффект сверхэкспрессии *Parp1* зависит от пола и стадии индукции сверхэкспрессии гена.

Влияние сверхэкспрессии гена, кодирующего PARP-1, на ПЖ и жизнеспособность мышей исследовали в работе Мангриха с соавт. [203]. При создании модели эктопической

экспрессии гена *PARP1* человека у мыши под контролем промотора *Parp1* мыши произошло спонтанное удвоение фланкирующих последовательностей гена *PARP1* и *Parp1*, в результате чего получились мутантные мыши с удвоенным числом генов *PARP-1* человека и мыши, что привело к резкому увеличению уровня этого белка [203]. Против ожиданий, оказалось, что такие мыши характеризуются меньшей стрессоустойчивостью, большей заболеваемостью и ускоренным старением [204].

Таким образом, сверхэкспрессия *PARP-1* не всегда ведет к повышению стабильности генома и устойчивости организма к патологиям. Можно предположить, что поли(ADP-рибозил)ирование является важным механизмом регуляции процессов, запускаемых при повреждении ДНК, позволяющим клетке сделать выбор между энергозатратной репарацией и клеточной гибелью.

#### **1.4.3. Ассоциация полиморфизмов гена поли(ADP-рибоза)-полимеразы-1 с продолжительностью жизни**

При написании раздела использованы статьи автора диссертации: [Shilovsky G.A., Khokhlov A.N., and Shram S.I. 2013. The protein poly(ADP-ribosyl)ation system: its role in genome stability and lifespan determination // *Biochemistry (Moscow)*. Vol. 78. № 5. P. 433-444].

Был предпринят ряд попыток выявить возможную взаимосвязь между генетическими полиморфизмами *PARP1* и ПЖ в популяции французских европеоидов [205, 206]. Были описаны четыре новых генетических полиморфизма *PARP1*, три из которых представляют собой молчащие нуклеотидные варианты (C402T, T1011C, G1215A), а еще один ведет к замене валина-762 на аланин (T2444C) в кодирующей части гена. Изучали связь между двумя из этих полиморфизмов и ПЖ человека или способностью к поли(ADP-рибозил)ированию в пермеабелизованных лимфобластоидных клетках.

С помощью флуоресцентной аллель-специфической полимеразной цепной реакции проанализировали 648 образцов ДНК: 324 - от долгожителей в возрасте 100 лет и более; 324 - от здоровых людей от 20 до 70 лет (средний возраст - 51 год), выступающих в качестве контрольной группы. Авторы не обнаружили различий частоты встречаемости перечисленных полиморфизмов между группой долгожителей и контрольной группой [206]. Кроме того, был проведен анализ ДНК лимфобластоидных линий клеток с наибольшей для долгожителей и наименьшей для контрольной группы активностью *PARP* [206].

Установлено, что ни одна из комбинаций генотипов по какому-либо из изученных сайтов полиморфизма не связана с высокой или низкой способностью к поли(ADP-

рибозил)ированию. Таким образом, связанные с ПЖ различия в способности к поли(ADP-рибозил)ированию в лимфобластоидных клеточных линиях человека пока не могут быть объяснены наличием полиморфизмов в кодирующей части гена *PARP1* и, следовательно, требуется поиск других возможных механизмов регуляции поли(ADP-рибозил)ирования у долгожителей.

Муйрас с соавт. исследовали связь между частотой встречаемости полиморфного динуклеотидного повтора CA, расположенного в промоторном участке гена *PARP1*, и изменчивостью активности PARP или ПЖ человека. Было проанализировано 239 образцов ДНК долгожителей и 198 образцов ДНК контрольной группы (от 20 до 70 лет) [195]. Никакой значимой связи между частотой распределения данного аллеля и ПЖ или активностью PARP выявлено не было.

В другом исследовании также не выявили значимых различий в частоте встречаемости генотипов *PARP1* между долгожителями в возрасте 100 лет и более и контрольной группой (возраст от 10 до 85 лет) у итальянцев [205]. Следовательно, можно заключить, что рассматриваемые в этих работах полиморфизмы не ассоциированы с индивидуальной изменчивостью ПЖ - по крайней мере, с точки зрения качественных различий критериев.

#### **1.4.4. Ассоциация полиморфизмов гена поли(ADP-рибоза)-полимеразы-1 с риском развития возрастных нейродегенеративных патологий**

При написании раздела использованы статьи автора диссертации: [Shilovsky G.A., Khokhlov A.N., and Shram S.I. 2013. The protein poly(ADP-ribosylation) system: its role in genome stability and lifespan determination // *Biochemistry (Moscow)*. Vol. 78. № 5. P. 433-444].

Изучали влияние полиморфизмов в промоторном участке гена PARP-1 на риск развития болезни Паркинсона (БП) в исследовании связи «случай-контроль», включающем 146 больных БП и 161 здоровых людей (контроль) из Северной Испании. Были проанализированы три полиморфизма участка промотора гена PARP-1: -410C/T, -1672G/A и микросателлит (CA)<sub>n</sub>. Защитный эффект от БП был выявлен для гетерозиготности в полиморфизмах (-410) (OR=0,44) и микросателлите (CA)<sub>n</sub> (OR=0,53), а гетерозиготность по полиморфизму (-1672) давала отсрочку на 4 года на возраст начала БП. На основе полученных данных авторами было сделано предположение о том, что изменения в промоторе гена PARP-1 могут модифицировать риск БП [207].

В ряде работ было показано, что при БА в мозгу происходит сверхактивация PARP-1 [207-209]. Инфанте и соавт. была проверена гипотеза о том, что -410 и -1672 полиморфизмы PARP-1 предрасполагают людей к БА из-за сверхэкспрессии гена PARP-1,

независимо или совместно с полиморфизмом провоспалительного интерлейкина (IL)-1A-889. Было выполнено исследование типа «случай-контроль» у 263 испанских пациентов с БА и 293 здоровых (контроль). Гаплотипы -410 PARP-1 и -1672 PARP-1 были связаны с увеличенным риском БА ( $p=0,019$ ), и, кроме того, эти гаплотипы PARP-1 увеличивали риск БА косвенно с аллелем -889 IL-1A2 [210].

Кроме того, ранее показали [211, 212] более высокую нестимулированную активность PARP (определение этого термина приведено в разделе 1.5.1) в гиппокампе старых животных и коре мозга по сравнению с взрослыми особями (см. также главу 3). Сделали вывод о повышении в старом мозге уровня АФК и чувствительности его к окислительному стрессу.

### **1.5. Изменения в системе поли(ADP-рибозил)ирования белков в процессе развития и старения**

При написании раздела использованы статьи автора диссертации: [Shilovsky G.A., Khokhlov A.N., and Shram S.I. 2013. The protein poly(ADP-ribosyl)ation system: its role in genome stability and lifespan determination // *Biochemistry (Moscow)*. Vol. 78. № 5. P. 433-444; Shilovsky G.A., Shram S.I., Morgunova G.V., and Khokhlov A.N. Protein poly(ADP-ribosyl)ation system: Changes in development and aging as well as due to restriction of cell proliferation // *Biochemistry (Moscow)* 2017, Vol. 82 № 11, P. 1391-1401].

Большинство современных молекулярных геронтологов придерживается той точки зрения, что в основе старения живого организма (определяемого, по-видимому, деструктивными изменениями клеток) лежит накопление повреждений ДНК, так как ДНК является матрицей, с помощью которой можно обновить практически любые элементы клетки.

Во многих изученных организмах старение связано с генетической нестабильностью [194]. Кажется весьма вероятным, что повреждения ДНК, вызываемые экзо- и эндогенными агентами, постоянно атакующими геном живых организмов (например, свободными кислородными радикалами, восстанавливающими сахарами, другими физиологическими клеточными метаболитами, канцерогенами окружающей среды или облучением) играют важную роль в индукции генетической нестабильности. Эта точка зрения подтверждается положительной корреляцией между ПЖ млекопитающих и уровнем репарации ДНК: репарация ДНК более эффективно противодействует накоплению повреждений у долгоживущих видов и, таким образом, целостность и стабильность генома могут поддерживаться большее время. Это также может быть фактором, определяющим более позднее формирование опухолей у

долгоживущих видов по сравнению с короткоживущими. Однако следует отметить, что исследованиям роли системы поли(ADP-рибозил)ирования как сенсора повреждений ДНК в развитии и старении высших эукариот может препятствовать функциональная избыточность PARP, достигаемая множественностью форм этого фермента, а также высокая смертность мутантов по нескольким PARP.

### **1.5.1. Стимулированная и нестимулированная активности поли(ADP-рибоза)-полимераз**

При написании раздела использованы статьи автора диссертации: [Shilovsky G.A., Khokhlov A.N., and Shram S.I. 2013. The protein poly(ADP-ribosyl)ation system: its role in genome stability and lifespan determination // *Biochemistry (Moscow)*. Vol. 78. № 5. P. 433-444; Shilovsky G.A., Shram S.I., Morgunova G.V., and Khokhlov A.N. 2017. Protein poly(ADP-ribosyl)ation system: Changes in development and aging as well as due to restriction of cell proliferation // *Biochemistry (Moscow)* Vol. 82. № 11, P. 1391-1401].

Ряд работ посвящен сравнению активности PARP (по сути - сумма активностей PARP-1 и PARP-2, так как именно эти изоформы определяют общую поли(ADP-рибоза)-полимеразную активность в клетке) и содержания белка PARP-1 (в анализируемых работах встречаются данные исключительно для этого представителя семейства белков PARP) в клеточных элементах и тканях человека и животных разного возраста. К сожалению, наличие существенных различий в методах определения активности PARP существенно затрудняет проведение сравнительного анализа имеющихся в литературе данных. Поэтому необходимо кратко остановиться на некоторых особенностях определения активности PARP.

Прежде всего, необходимо отметить, что в работах, касающихся исследований на культурах клеток и препаратах тканей, существуют большие разночтения в использовании термина «активность PARP», также отсутствуют стандартные общепринятые процедуры для ее измерения. Канунго также отмечает ряд затруднений и проблем в оценке биохимических показателей при проведении возрастных исследований [7].

Также в ряде работ исследуют влияние различных ДНК-повреждающих агентов на синтез PAR, не указывая при этом, приводит ли данное воздействие к образованию избыточного в отношении PARP количества повреждений ДНК. Следует также отметить еще один фактор, который может существенно влиять на скорость реакции поли(ADP-рибозил)ирования – это степень аутомодификации остатками ADP-рибозы самого фермента. Известно, что такая модификация PARP-1 существенно снижает ее активность [12].



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

В случае, когда показано, что вызванная тем или иным повреждением ДНК активация фермента максимальна, то можно говорить о «максимальной активности PARP» – «истинной» активности PARP, определяемой в условиях насыщения фермента субстратами и активатором (двунитевыми дезоксиолигонуклеотидами, избыточным количеством. Однако надо отметить, что, несмотря на свою очевидную важность, такого рода эксперименты проводятся довольно редко. 2) Вторым видом активности является «нестимулированная активность PARP» (HCA PARP) - скорость реакции поли(ADP-рибозил)ирования, определяемая в условиях отсутствия искусственной стимуляции PARP разрывами ДНК; в условиях избытка PARP лимитируется количеством разрывов ДНК. Таким образом, при анализе работ по изучению возрастных изменений в системе PARP имеет смысл отдельно анализировать данные по HCA и CA PARP.

В большинстве случаев для определения активности PARP (то есть интенсивности синтеза PAR) использовался радиометрический метод анализа, основанный на определении количества включенных в белки радиоактивно меченных остатков ADP-рибозы. В качестве препаратов фермента использовались пермеабиллизованные клетки, ядра клеток, митохондрии и хроматин. В норме лишь небольшая часть фермента находится в виде комплексов с ДНК, тогда как бóльшая – в свободном, не связанном с ДНК состоянии. При воздействии на клетку агентов, стимулирующих образование разрывов ДНК, интенсивность синтеза поли(ADP-рибозы) многократно возрастает. Понятно, что при умеренном повреждении ДНК скорость реакции поли(ADP-рибозил)ирования будет лимитирована количеством повреждений ДНК, с которыми может образовываться комплекс PARP. И наоборот, при избыточном количестве таких повреждений скорость реакции поли(ADP-рибозил)ирования будет определяться содержанием изоформ PARP, и прежде всего PARP-1, в клетке. Таким образом, для определения активности всей PARP, содержащейся в клетке (или ядре), необходимо создать условия насыщения фермента разрывами ДНК. Обычно для этого используют обработку препаратов ДНКазой I, или гамма-облучение, или внесение коротких

двухцепочечных олигонуклеотидов. К сожалению, во многих работах ошибочно используют термин «активность PARP» и в случае, когда такой искусственной «избыточной» активации фермента разрывами ДНК не производится.

Наиболее аккуратный способ определения активности PARP предложен в работах группы Бюркле [14, 194]. Активность измерялась в пермеабелизованных мононуклеарных лейкоцитах периферической крови (МЛПК) человека и животных в условиях полного насыщения PARP двухцепочечными олигонуклеотидами и NAD<sup>+</sup>. В этом случае скорость реакции не зависела от количества повреждений ДНК и, при этом, определяемый показатель отражал активность как связанного с ДНК, так и свободного фермента.

### **1.5.2. Изменения в системе поли(ADP-рибозил)ирования белков в ходе развития организма**

При написании раздела использованы статьи автора диссертации: [Shilovsky G.A., Shram S.I., Morgunova G.V., and Khokhlov A.N. 2017. Protein poly(ADP-ribosyl)ation system: Changes in development and aging as well as due to restriction of cell proliferation // Biochemistry (Moscow) Vol. 82. № 11. P. 1391-1401].

Известно, что активность PARP гораздо выше в активном хроматине, то есть в активно делящихся клетках [7, 72]. Это объясняется более легким доступом различных ферментов, в том числе и PARP, к неупакованному хроматину. В результате поли(ADP-рибозил)ирования ядерных белков происходит нарушение их ассоциации с ДНК, что облегчает репликацию последней в S-фазе [7]. Особый интерес вызывают модельные системы, обеспечивающие анализ изменений активности PARP (функционирования системы клеточного поли(ADP-рибозил)ирования) в клетках зародышевого пути и имеющих к ним отношение тканях и органах (семенники, простата, яичевод и т.п.) в ответ на действие биологически активных веществ (гормонов, митогенов и пр.). Следует также отметить, что практически во всех работах наблюдали с возрастом (при старении) рост HSA PARP в препаратах хроматина, а затем некоторое ее снижение.

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

вызывающих повышение уровня повреждений ДНК. Накопление таких повреждений будет вызывать увеличение НСА лишь до определенного момента, вследствие того, что общая способность к поли(ADP-рибозил)ированию, как было отмечено выше, с возрастом снижается.

### **1.5.3. Изменение активности поли(ADP-рибоза)-полимераз при старении организма**

При написании раздела использованы статьи автора диссертации: [Shilovsky G.A., Shram S.I., Morgunova G.V., and Khokhlov A.N. 2017. Protein poly(ADP-ribosyl)ation system: Changes in development and aging as well as due to restriction of cell proliferation // Biochemistry (Moscow). Vol. 82. № 11. P. 1391-1401].

#### ***Изменение стимулированной активности поли(ADP-рибоза)-полимераз при старении организма***

Грюбе и Бюркле определяли СА PARP в мононуклеарных лейкоцитах периферической крови (PBMC) крысы и человека в широком возрастном диапазоне - от 0 до 100% максимальной ПЖ у крысы (линия BN/BiRj) и от 0 до 85% максимальной ПЖ у человека [14]. В обоих случаях была выявлена обратная зависимость между возрастом и активностью PARP: коэффициенты корреляции равнялись -0,54 ( $p < 0,001$ ) и -0,34 ( $p < 0,005$ ) для человека и крысы, соответственно. При этом снижение максимально достижимой активности PARP в течение жизни у человека и крысы составляло 59% и 39%, соответственно. Наиболее существенные различия были выявлены при сравнении активности PARP в PBMC молодых (около 30 лет) и старых (около 80 лет) людей. Следует отметить, что практически все приведенные в литературе данные по активности PARP являются результатами не лонгитудинальных, а поперечных исследований, поэтому, хотя мы, следуя сложившейся в литературе традиции, и будем пользоваться термином «изменение активности PARP с возрастом», необходимо подчеркнуть, что корректнее все же было бы говорить о возрастных различиях.

Анализируя данные по максимальной активности PARP, следует отметить, что они касаются исключительно PBMC, и выполнены преимущественно одной группой исследователей. В этих исследованиях было показано, что данная активность PARP при старении организма снижается.

Кроме того, было показано, что в ядерной фракции гиппокампа старых крыс не происходит увеличения СА PARP в ответ на вызываемый  $FeCl_2$  и аскорбатом сильный окислительный/генотоксический стресс, в то время как у молодых крыс наблюдается существенное повышение этого показателя [212]. Повреждение ДНК алкилирующим агентом N-метил-N'-нитро-N'-нитрозогуанидином также вызывало сильное, в 2,6 раза ( $p < 0,05$ ), увеличение уровня поли(ADP-рибозил)ирования белков в гиппокампе молодых,

но не старых крыс [212]. Кроме того, было показано, что в гиппокампе амилоидный пептид и N-метил-D-аспартат вызывают (видимо, опосредованно) вызывает повреждения ДНК, что, в свою очередь, приводит к увеличению активности PARP в коре головного мозга и в гиппокампе молодых (4 мес.) крыс примерно на 80%. Однако препараты не оказывают никакого влияния на этот показатель у старых (24-27 мес.) животных [213].

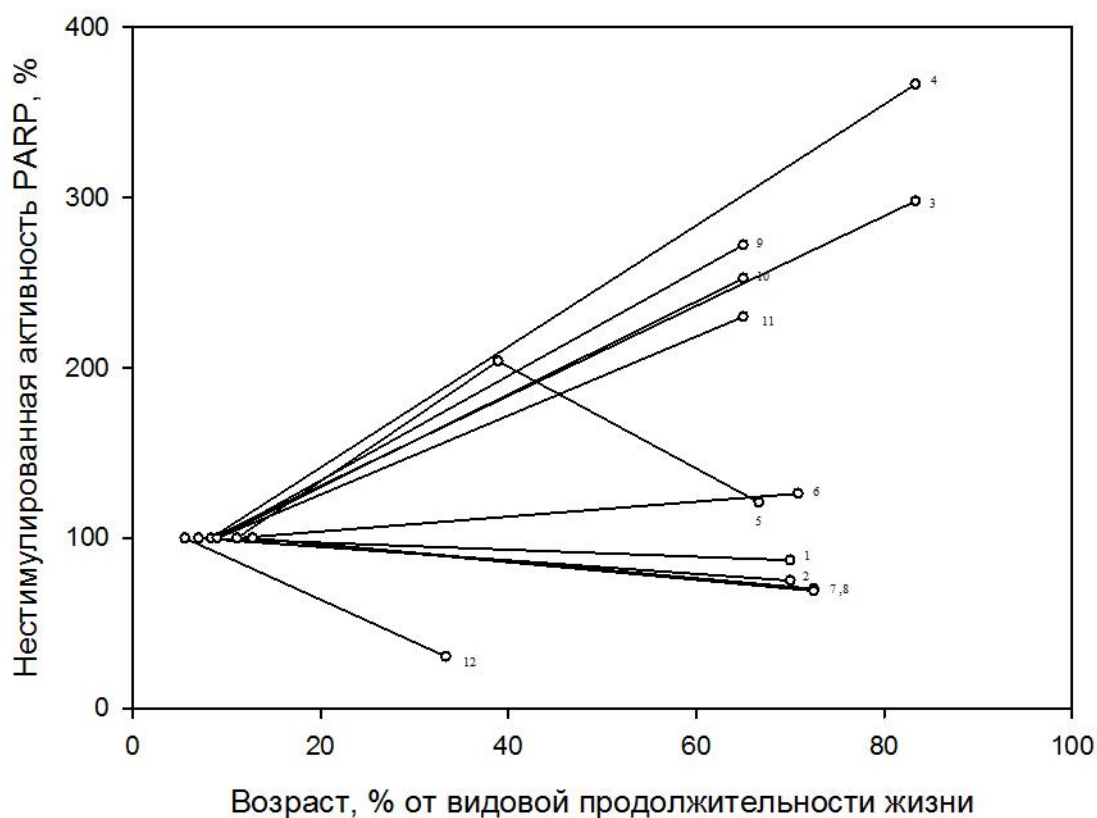
Аналогичные результаты были получены Малангой с соавт., которые показали, что в мозжечке старых (20-27 мес.) крыс снижена способность к активации PARP в ответ на ферментативное расщепление ДНК ДНКазой I (CA PARP) по сравнению с молодыми (2 мес.) животными [214]. При этом HCA PARP в переднем мозгу и мозжечке была практически одинаковой у молодых и старых крыс [214].

В работе Газиева с соавт. исследовали как HCA PARP (в работе – «конститутивная активность PARP»), так и максимальная CA PARP (стимулированная гамма-излучением в дозе 10 Гр активность PAR) в ядерной и митохондриальной фракциях мозга и селезенки молодых (2 мес.) и старых (29 мес.) крыс [215]. Облучение животных в дозе 10 Гр было достаточным для полной активации PARP (т.е. авторы показали, что это корректная, максимальная, CA; это является большой редкостью для работ по исследованию CA PARP). Оказалось, что HCA PARP в ядрах клеток мозга и селезенки на 13 и 25%, а в митохондриях – на 25 и 41% ниже у старых крыс, чем у молодых [215]. У молодых крыс максимальная CA PARP в ядрах мозга и селезенки превышала CA PARP у старых примерно в 2 раза.

В митохондриях мозга и селезенки крыс вызванная облучением (10 Гр) активация PARP была менее выражена: максимальная CA PARP превышала HCA PARP примерно в 1,5 раза у молодых и в 1,3 раза – у старых животных. Таким образом, одной из возможных причин описанного ранее в литературе феномена снижения у старых особей эффективности репарации повреждений ДНК, вызванных гамма-излучением, является снижение способности клетки к поли(ADP-рибозил)ированию белков в ядрах и митохондриях [215].

### ***Изменение нестимулированной активности поли(ADP-рибоза)-полимераз при старении организма***

Гораздо большее число работ посвящено сравнению HCA PARP в препаратах, полученных из тканей крыс разного возраста (**рис. 5**). Как уже говорилось выше, этот показатель, по существу, отражает количество разрывов ДНК в образцах, взятых для анализа.



**Рисунок 5.** Изменение нестимулированной активности PARP с возрастом у крыс.

За 100% принимали активность PARP у молодых животных. Возраст на графике представлен в процентах от видовой ПЖ. Обозначения: 1 - селезенка [215]; 2 - мозг [215]; 3 - мозг, нейроны [216]; 4 - мозг, астроциты [216]; 5 - мозг, кора [211]; 6 - мозг, кора [212]; 7 - мозг [217]; 8 - печень [217]; 9 - печень [218]; 10 - легкие [218]; 11 - сердце [218]; 12 - простата [219].

В лаборатории первооткрывателя PARP Манделя также изучали возрастные изменения HCA PARP (в статье используется термин «базальная активность PARP») в ядрах эпителиальных клеток хрусталика быка [220]. Эти исследования особенно интересны, так как хрусталик является одним из самых известных объектов для моделирования старения и возрастных заболеваний [221]. Авторы показали, что HCA PARP в шесть раз выше у старых быков (113 мес.), чем у молодых (4,5 мес.) [220]. Количество разрывов ДНК у взрослых особей (54 мес.) было лишь незначительно выше, чем у молодых (24 мес.) (на 12,9%;  $p < 0,05$ ). При этом у старых животных (94 мес.), по сравнению с молодыми (24 мес.), наблюдали повышенное (в 2,3 раза;  $p < 0,02$ ) число разрывов ДНК, что выглядит вполне ожидаемым ввиду прямой взаимосвязи между этими показателями. В другом исследовании, проведенном в этой же лаборатории и с использованием тех же подходов, обнаружили значительное увеличение с возрастом HCA PARP в нейронах и астроцитах мозга крыс Wistar [216]. Оказалось, что HCA PARP в нейронах и астроцитах у старых (30 мес.) крыс, соответственно, в 3,5 и 3,9 раза выше, чем

у молодых (3 мес.). При этом у старых животных и уровень повреждений ДНК значительно выше, чем у молодых: в нейронах – в 2,7, а в астроцитах – в 1,3 раза. В этой же работе показали, что в мозгу старых крыс содержание белка PARP-1 было почти в 3,5 раза выше, чем у молодых особей [216].

Строшнайдер и соавт. провели сравнение НСА PARP в ядрах, полученных из различных отделов мозга молодых (4 мес.), взрослых (14 мес.) и старых (24-27 мес.) крыс Wistar [211]. Достоверные возрастные изменения НСА PARP были обнаружены лишь в гиппокампе: у взрослых крыс она была в 2 раза выше, а у старых крыс – в 2,1 раза ниже, чем у взрослых ( $p < 0,02$ ). Для НСА PARP в коре головного мозга и мозжечке у молодых и старых крыс достоверных отличий выявлено не было [211]. В еще одной работе этой же группе исследователей не удалось выявить различий в НСА PARP в мозгу у молодых и старых крыс [213].

В другой работе этой же группы НСА PARP у старых крыс статистически значимо ( $p < 0,05$ ) увеличивался в гиппокампе (на 52%) и коре головного мозга (на 64%), но не в мозжечке (24%) и стриатуме (16%) по сравнению с молодыми животными [212]. При этом не было выявлено значимых изменений с возрастом крысы (сравнивали 4- и 24-месячных животных) уровня белка PARP-1, за исключением стриатума, где он сильно снижался. Авторы не выявили изменений экспрессии гена p53 в коре головного мозга старых крыс, по сравнению с таковой в коре молодых, и обнаружили незначительное увеличение уровня мРНК p53 в гиппокампе и стриатуме. Повышение НСА PARP и экспрессии p53 в мозге старых крыс может указывать на более высокий уровень повреждения ДНК с возрастом [212]. Суммируя данные по НСА PARP, приведенные на **рисунке 5**, можно заметить, что приведенные графики разделяются на две группы: группа, характеризующаяся увеличением НСА PARP с возрастом (как и предполагалось изначально, ведь с возрастом накапливается количество разрывов ДНК в тканях) и группа без такового. Также можно отметить то, что во второй группе в основном находятся ткани с низким пролиферативным индексом, тогда как в верхней части – преимущественно с более высоким. Однако приведенные различия в НСА PARP между тканями с низким и высоким пролиферативным индексом из разных работ меньше, чем различия между таковыми в одной и той же работе. По-видимому, причины этого – методические (приготовление препарата, условия проведения анализа, выбор возраста контрольных и опытных животных). В этой связи следует отметить и другую работу, в которой было показано, что поли(ADP-рибозил)ированию подвергаются преимущественно гистоны H1 и H2b [219]. Квесад и соавт. изучали НСА PARP (в статье – «базальную активность PARP») в ядрах вентральной простаты крыс в возрасте до одного года (14, 28, 60, 180, 360

суток, т.е. от 13 до 35% от максимальной ПЖ). Было обнаружено, что с возрастом происходит значительное (в семь раз) уменьшение НСА PARP, а также степени поли(ADP-рибозил)ирования белков-акцепторов – гистонов H1 и H2b [219].

Одно из объяснений возрастной динамики НСА PARP вытекает из анализа результатов работы Стрoшнайдера [211], где сравнивали НСА PARP не в двух, а в трех возрастных группах: у молодых, взрослых и старых животных. На **рисунке 5** видно, что у взрослых животных она повышается, а затем у старых – опять снижается до характерного для молодых животных уровня. Так как количество разрывов ДНК не снижается с возрастом, то можно предположить, что снижается способность клеток реагировать на повреждения ДНК.

В некоторых других работах было отмечено снижение НСА PARP с возрастом (СА PARP при этом не исследовали). Так, Мишра и Дас показали, что НСА PARP в ядрах мозга и печени у старых крыс (110-115 нед.) примерно на 30% ниже, чем у молодых (20 нед.) ( $p < 0,001$ ). При этом наблюдали возрастное снижение степени поли(ADP-рибозил)ирования как гистоновых, так и негистоновых белков [217].

Возрастные изменения, связанные с системой поли(ADP-рибозил)ирования хроматина были выявлены также Шредером и соавт., обнаружившими, что НСА PARP (в работе – «активность PARP») во фракции хроматина из экстракта яйцевода старых особей (3-3,5 года) обыкновенного перепела *Coturnix coturnix* в два раза меньше, чем у молодых (7-10 мес.) особей [222]. В то же время активность ДНК-топоизомеразы II с возрастом увеличивалась. Авторы предположили, что PARP может играть важную роль в возрастных изменениях активности топоизомеразы II через ее посттрансляционную модификацию [222].

Интересны в связи с этим и результаты, полученные Такуром и Прасадом, которые исследовали поли(ADP-рибозил)ирование негистоновых белков в ядрах печени взрослых (14 нед.) и старых (113 нед.) крыс [223]. Оказалось, что НСА PARP в суммарной фракции негистоновых белков в обеих группах одинакова, хотя спектры PAR-модифицированных белков различаются. Нельзя исключить, что с возрастом могут изменяться не только содержание и активность белков семейства PARP, но и направленность их действия (определяющая спектр PAR-модифицированных белков, длину и разветвленность цепей PAR и т.д.).

В ряде работ исследовали изменения НСА PARP с возрастом во фракции хроматина [217-219, 222, 223]. Мишра и Дас наблюдали ярко выраженное возрастное снижение скорости накопления поли(ADP-рибозил)ирования хромосомных белков в ядрах цельного мозга и печени молодых (20 нед.) и старых (110-115 нед.) крыс, которое

определяли по включению в белки меченных  $^{14}\text{C}$  остатков ADP-рибозы [217]. Авторы показали, что в обеих возрастных группах, синтез PAR выше в печени, чем в мозгу. Кроме того, в обеих тканях НСА PARP у старых крыс был примерно на 30% ниже, чем у молодых ( $p < 0,001$ ). При этом наблюдали снижение степени поли(ADP-рибозил)ирования как гистоновых, так и негистоновых белков. Было также установлено, что в мозге и печени вне зависимости от возраста уровень поли(ADP-рибозил)ирования гистоновых белков был приблизительно в 2-3 раза выше чем негистоновых. В обеих тканях гистоны H1 типа являются главной мишенью PARP [217].

Таким образом, при исследовании НСА PARP в препаратах тканей животных разного возраста получены противоречивые результаты (см. **рис. 5**). В ряде работ было показано, что НСА PARP в ядерной фракции увеличивается с возрастом, что может быть связано с накоплением нерепарированных повреждений ДНК [218]. В то же время, снижение способности клеток старых особей синтезировать PAR в ответ на индукцию таких повреждений (СА PARP) может объясняться уменьшением количества активного фермента, способного взаимодействовать с вновь образующимися разрывами ДНК. Однако в некоторых работах получен противоположный результат – снижение НСА PARP с возрастом (**рис. 5**).

Еще один метод исследования активности PARP основан на измерении содержания внутриклеточного NAD<sup>+</sup> (субстрата PARP). Брейди с соавт. сравнивали уровни PAR, НСА PARP и содержание внутриклеточного NAD<sup>+</sup> в печени, сердце, почках и легких самок крыс Вистар в возрасте от 3 до 24 мес., охватывая, таким образом, все возрастные группы (молодые, взрослые и старые) [218]. Было выявлено достоверное увеличение с возрастом НСА PARP во всех органах: в 1,1-1,2 раза ( $p < 0,01$ ) - к 12-месячному возрасту и в 2-2,2 раза ( $p < 0,01$ ) – к 24-месячному по сравнению с 3-месячным. Кроме того, было продемонстрировано накопление с возрастом PAR, существенное снижение внутриклеточного уровня NAD<sup>+</sup> и увеличение количества повреждений ДНК во всех исследуемых тканях. Авторы предположили, что высокое внутриклеточное содержание NAD<sup>+</sup> является важным биохимическим фактором, положительно влияющим на ПЖ [218].

Этой же группой была исследована НСА PARP в образцах кожи людей (с неосвещенных участков тела) разного возраста. Было показано, что уровень повреждений ДНК хорошо коррелирует с возрастом как у мужчин ( $p = 0,029$ ;  $r = 0,490$ ), так и у женщин ( $p = 0,003$ ,  $r = 0,600$ ). При этом НСА PARP достоверно увеличивалась с возрастом только у мужчин и при рассмотрении выборки от 0 до 77 лет ( $p < 0,0001$ ;  $n = 27$ ;  $r = 0,768$ ). При ограничении возраста мужчин в выборке постпубертатным периодом, а также у женщин в



возрасте 36-76 лет то значимых изменений в HSA PARP не было выявлено [224]. Возможно, обусловленные полом различия являются следствием более сильной гормональной регуляции у женщин [225]. Можно полагать, что наличие/отсутствие возрастных корреляций в данном случае сильно зависит от интенсивности роста организма и, соответственно, пролиферативного статуса клеток (подробнее об этом см. далее). Очевидно, что в постнатально-препубертатном периоде рост очень активен, тогда как в постпубертатном периоде, особенно позднем – нет. Таким образом, необходимо констатировать, что имеющихся в настоящее время сведений недостаточно, чтобы объяснить причины снижения SA PARP с возрастом. Из рассмотренных данных следует, что наблюдаемое снижение этого показателя с возрастом (наряду с увеличением количества повреждений ДНК) может приводить к уменьшению способности клетки реагировать на возникающие дефекты ДНК и, как следствие, вызывать различные нарушения в геноме. В связи с этим логично предположить, что с ростом числа разрывов ДНК в процессе старения уровень поли(ADP-рибозил)ированных белков будет увеличиваться и все возрастающая доля PARP будет в каждый момент времени пребывать в инактивированном состоянии, особенно если учесть возрастное снижение активности поли(ADP-рибоза)-гликогидролазы, как следует из работы [220]. Нельзя, однако, исключить и существование других способов регуляции активности PARP, например, за счет образования комплексов с другими белками, а, кроме того, иных посттрансляционных модификаций белков (ацетилирования, фосфорилирования, моно(ADP-рибозил)ирования), в том числе и самих PARP.

#### **1.5.4. Изменение уровня экспрессии поли(ADP-рибоза)-полимеразы-1 при старении организма**

При написании раздела использованы статьи автора диссертации: [Shilovsky G.A., Shram S.I., Morgunova G.V., and Khokhlov A.N. 2017. Protein poly(ADP-ribosyl)ation system: Changes in development and aging as well as due to restriction of cell proliferation // Biochemistry (Moscow). Vol. 82. № 11. P. 1391-1401].

Грюбе и Бюркле показали отсутствие корреляции между количеством белка PARP-1 и ПЖ [14]. Мессрипур и соавт. установили, что в мозгу старых (30 мес.) крыс содержание белка PARP-1 почти в 3,5 раза выше, чем у молодых (3 мес.) особей [216]. В другом исследовании сравнение иммунореактивности PARP-1 у молодых (4 мес.) и старых (27 мес.) крыс не выявило различий в экспрессии PARP-1 в гиппокампе и мозжечке, тогда как в коре головного мозга и, в еще большей степени, в стриатуме старых крыс содержание PARP-1 было снижено [212]. В то же время, в работе Маланги и соавт.

не обнаружено существенных различий в количестве белка PARP-1 в мозжечке молодых (2 мес.) и старых (20-27 мес.) крыс [214].

Возрастные изменения содержания PARP-1 у человека были выявили О'Валле и соавт. [226]. С использованием иммуногистохимического анализа они показали, что содержание PARP-1 в почках, предназначенных для пересадки, увеличивается с возрастом донора ( $r=0,408$ ,  $p=0,006$ ) и положительно коррелирует с периодом восстановления функциональной активности (эффективного диуреза) у реципиентов ( $r=0,386$ ,  $p<0,01$ ). При этом возраст доноров варьировал в узких пределах – от 53 - до 64,8 лет (средний возраст – 58,9 года). Таким образом, имеющиеся данные не позволяют в полной мере говорить о наличии четко выраженной возрастной динамики экспрессии PARP-1. Так как авторы считают, что при пересадке почек от пожилых доноров сверхактивация PARP может приводить к тубулярному некрозу, задержке восстановления функций и ранней нефропатии трансплантатов, то в этом случае определение PARP-1 в биопсии образцов от пожилых доноров может быть полезным прогнозирующим фактором при пересадке трансплантатов почек [226].

#### **1.5.5. Возрастные изменения уровня поли(ADP-рибозил)ированных белков и активности поли(ADP-рибоза)-гликогидролазы**

При написании раздела использованы статьи автора диссертации: [Shilovsky G.A., Shram S.I., Morgunova G.V., and Khokhlov A.N. 2017. Protein poly(ADP-ribosylation) system: Changes in development and aging as well as due to restriction of cell proliferation // Biochemistry (Moscow). Vol. 82. № 11. P. 1391-1401].

Пытаясь интерпретировать результаты по изменению максимальной стимулированной и нестимулированной активностей PARP с возрастом, необходимо отметить, что на эти показатели влияют не только уровень экспрессии белков семейства PARP, преимущественно PARP-1 и PARP-2, но и степень аутомодификации PARP, а возможно и другие факторы. Дело в том, что при активации PARP-1 поли(ADP-рибозил)ированию в значительной степени подвергается сам фермент, что приводит к его инактивации и диссоциации комплекса ДНК-PARP-1. К сожалению, данные по изменению уровня и степени аутомодификации PARP с возрастом в литературе отсутствуют.

В этой связи вызывают интерес работы по возрастным изменениям активности и уровня экспрессии фермента PARG, осуществляющего расщепление PAR до мономеров, а также изменения уровня поли(ADP-рибозил)ированных белков хроматина. К сожалению, лишь в одной работе приведены данные об изменении активности PARG с возрастом. Бизек и коллеги показали, что в ядрах эпителия хрусталика быка активность PARG

снижалась с возрастом: у 30-месячных животных (14% от максимальной ПЖ) – примерно на 30%, а у 54-месячных (25% от максимальной ПЖ) – почти на 60%, относительно 3-месячных (1,4% от максимальной ПЖ) [220]. Кроме того авторами были выявлены изменения характера поли(ADP-рибозил)ирования с возрастом - уменьшение средней длины цепи от 7,5 остатков у 3-месячных животных до 3,8 остатков – у 30-месячных и 3,1 – у 54-месячных. В то же время степень разветвленности PAR (среднее число цепей определялось по концевым остаткам АМФ) у 30- и 54-месячных животных увеличивалась по сравнению с 3-месячными в 1,3 и 1,7 раза, соответственно: с 1,23 пмоль - у 3-месячных животных до 1,60 пмоль – у 30-месячных и 2,10 – у 54-месячных [220].

Как уже упоминалось выше, из гистоновых белков основными акцепторами PAR являются белки H1 и H2b [217, 219]. В литературе есть также косвенные данные об изменении с возрастом степени поли(ADP-рибозил)ирования негистоновых белков хроматина. Вагнер и соавт. с помощью электрофоретического анализа обнаружили различия в составе негистоновых белков хроматина в ядрах печени молодых (2-3 мес.) и старых (24-28 мес.) крыс [227]. В препаратах, полученных из печени старых крыс, отсутствовала фракция белков с изоэлектрической точкой (pI) 5,8-6,1. Авторы объясняют этот феномен накоплением с возрастом модифицированных, в частности, поли(ADP-рибозил)ированных белков.

Таким образом, необходимо констатировать, что имеющихся в настоящее время сведений недостаточно, чтобы объяснить причины снижения с возрастом активности PARP. Из рассмотренных данных следует, что наблюдаемое при старении организма снижение активности PARP (при одновременном увеличении количества повреждений ДНК) может приводить к снижению способности клетки реагировать на возникающие новые повреждения ДНК и, как следствие, вызывать различные нарушения в геноме. В связи с этим логично предположить, что при увеличении с возрастом числа разрывов ДНК, НСА PARP будет увеличиваться, и все большая доля фермента будет в каждый момент времени пребывать в инактивированном состоянии, особенно если учесть возрастное снижение активности PARG. Нельзя, однако, исключить и существование других способов регуляции активности PARP, например, за счет образования комплексов с другими белками, иных посттрансляционных модификаций белков (ацетилирования, фосфорилирования, моно(ADP-рибозил)ирования), в том числе и самих PARP.

## 1.6. Влияние пролиферативного статуса клетки на активность поли(ADP-рибоза)-полимераз

В работе Швайгерта и соавт. сравнивали интенсивность метаболизма PAR в пролиферирующих и покоящихся клетках опухоли молочной железы мыши, полученных из опухоли молочной железы мыши [228]. Авторами было показано, что как HCA PARP (в статье - «базальная активность PARP»), так и CA PARP (скорость стимулированного X-лучами синтеза PAR) не коррелируют ни с выживанием, ни с репарацией разрывов ДНК. Интересно, что в пролиферирующих культурах клеток исследуемых линий CA PARP была в 7 и 10 раз выше HCA PARP, а в покоящихся – только в 3-4 раза. Результаты анализа HCA PARP в покоящейся и активно делящейся культурах клеток были не столь однозначными. В одной линии этот показатель в покоящихся клетках был ниже, чем в пролиферирующих, тогда как в другой - наоборот, хотя эти линии были изначально получены из одной и той же опухоли. Это еще раз указывает на трудности в интерпретации данных по HCA PARP. При этом пролиферирующие и покоящиеся клетки не различались по скорости расщепления PAR [228]. Также было показано, что HCA PARP выше в пролиферирующих клетках CV-1 (эпителий почки зелёной мартышки) до достижения состояния сомкнутого монослоя, чем в этих же контактно ингибированных клетках [229]. Сделали вывод, что одними из самых явных диагностических сигналов для опухолевых клеток являются активация PARP-1 и запуск синтеза ДНК [229].

Сальминен и соавт. также показали, что иммортализация клеток вирусом SV40 (то есть отмена лимита Хейфлика и активация клеточной пролиферации) приводит к усилению экспрессии PARP в культуре ДФЧ [230].

Спина Пьюрелло и соавт. исследовали влияние ряда факторов роста, обладающих митогенной активностью, на HCA PARP в культурах «молодых», «зрелых» и «старых» клеток астроглии, полученных культивированием в течение 30, 90 и 190 сут (DIV; days *in vitro*), соответственно. Показано, что 12-часовая обработка «молодых» клеток инсулиноподобным фактором роста I (IGF-I) и основным фактором роста фибробластов (bFGF), а «старых» клеток эпидермальным фактором роста (EGF), инсулином или основным фактором роста фибробластов (bFGF) приводила к значительному (в 2-2,5раза) увеличению HCA PARP [231]. В то же время аналогичная обработка «зрелых» клеток ни одним из перечисленных выше факторов роста не приводила к изменению HCA PARP. EGF (10 нг/мл) или инсулин (10 мкг/мл) или bFGF (5 нг/мл) в течение 12 ч значительно стимулировала активность PARP в старых культурах (190 DIV), но не в зрелых (90 DIV) [231].

В работе Танигавы и соавт. исследовали влияние ADP-рибозилирования белков на синтез ДНК в ядрах куриных эмбрионов и взрослых кур [72]. Был обнаружен интересный факт: в ядрах эмбрионов активация PARP приводила к стимулированию синтеза ДНК, тогда как в ядрах зрелых особей подавляла его. На основании полученных результатов предположили, что в ядрах эмбрионов и зрелых крыс поли(ADP-рибозил)ированию могут подвергаться белки, по-разному влияющие на репликацию ДНК. Кроме того, Порто и соавт. показали, что НСА PARP в недифференцированных эпителиальных клетках нижней части крипты тонкой кишки морской свинки была почти в 10 раз выше, чем в дифференцирующихся созревающих эпителиальных клетках верхней крипты ворсинок [232]. В некоторых исследованиях было показано, что в раннем периоде развития организма, когда после рождения замедляется скорость роста организма и, соответственно, средняя митотическая активность клеток, что сопровождается уменьшением СА и НСА PARP. Анализируя результаты по изменению СА и НСА PARP с возрастом, необходимо отметить, что на эти показатели влияют не только уровень экспрессии белков семейства PARP, преимущественно PARP-1 и PARP-2, но и характер и степень модификации PARP, а, возможно, и другие факторы. Так при активации PARP-1 поли(ADP-рибозил)ированию в значительной степени подвергается сам фермент, что приводит к его инактивации и диссоциации комплекса ДНК - PARP-1.

В некоторых исследованиях было показано, что в раннем периоде развития организма после рождения, когда замедляется скорость роста организма, и, соответственно, общая митотическая активность клеток наблюдаются значительные изменения активности PARP [233, 234].

### **1.7. Моделирование онтогенетических изменений в культуре клеток**

При написании раздела использованы статьи автора диссертации: [Shilovsky G.A., Shram S.I., Morgunova G.V., and Khokhlov A.N. 2017. Protein poly(ADP-ribosyl)ation system: Changes in development and aging as well as due to restriction of cell proliferation // Biochemistry (Moscow). Vol. 82. № 11. P. 1391-1401].

Известной проблемой при изучении механизмов клеточного старения является выбор релевантной и удобной модели. Широко распространена модель репликативного старения «по-Хейфлику» [4], основанная на феномене истощения митотического потенциала культуры клеток приблизительно после нескольких десятков удвоений клеточной популяции (50 пассажей для диплоидных фибробластов человека). Однако многие исследователи ставят под сомнение релевантность данной модели, указывая на то, что она не достаточно хорошо отражает положение дел в целом организме.

Действительно, доля делящихся клеток в организме не очень велика. Кроме того, организм не гибнет от исчерпания митотического потенциала и уменьшения скорости пролиферации клеток, тогда как, по-Хейфлику, «состарившейся» считается популяция культивируемых клеток, не способная за определенный промежуток времени (две недели) удвоить свою численность. Кроме того, следует отметить, что модель Хейфлика не является столь универсальной, так как пригодна только для исследования клеток с ограниченным числом делений в культуре. Так, например, у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* средняя репликативная ПЖ составляет около 15 делений [5], однако уже после завершения первых двух-трех клеточных циклов у материнских клеток снижается резистентность к некоторым типам стресса: тепловому шоку [6] и солевому стрессу. Это, видимо, связано с тем, что клетки, совершившие четыре и более деления, в меньшей степени способны к перестройке своих защитных систем, чем новообразованные материнские клетки с репликативным возрастом, соответствующим двум-трем делениям [235]. Также необходимо учитывать, что модель Хейфлика не описывает многие случаи старения *in vivo*, так как в организме далеко не все клетки стареют по-Хейфлику (то есть свободно удваиваясь за определенный промежуток времени). В основном их деление ограничено контактным торможением или действием ростовых факторов.

Другой крайностью является подход, основанный на применении моделей стресс-индуцированного старения, вызванного различными повреждающими факторами. Здесь основным препятствием является необходимость доказательства того, что в клетке действительно имеет место старение, в смысле постепенного накопления повреждений, а не включение механизмов запрограммированной клеточной гибели.

Известно, что многие показатели, используемые при изучении процессов старения, могут хорошо коррелировать с возрастом организма, но при этом не имеют никакого отношения к увеличению вероятности смерти с возрастом (классическое определение старения живых организмов, см., например, [236]). Поэтому предлагается проводить исследования либо в лонгитудинальных экспериментах, либо в экспериментах на так называемых «сущностных» моделях [237, 238]. Под последними подразумеваются такие модельные системы, в основе которых лежат не просто выявленные в геронтологических исследованиях корреляции (пример - известная модель Хейфлика), а постулируемые авторами конкретные механизмы старения организма. Одной из таких моделей является модель «стационарного старения», предложенная более 30 лет назад [237]. Она основана на концепции, согласно которой с возрастом в организме снижается доля делящихся клеток, что способствует накоплению макромолекулярных повреждений и последующему нарушению функционирования органов и тканей, приводящему к увеличению

вероятности смерти [237, 239]. Аналогичные деструктивные изменения накапливаются и в клеточной культуре при ограничении ее пролиферации. Этот процесс был назван «стационарным старением». В рамках данной концепции было предложено использовать стационарные клеточные культуры для изучения возрастных изменений, происходящих в клетках стареющего организма [8, 237, 239-241]. Различия же в ПЖ (в том числе видовые) определяются, по всей видимости, лишь различиями в программах, определяющих надежность систем (клеток, органов, тканей) данного организма [242].

В «стационарно стареющих» клетках, как и в организме, ограничение пролиферации является, как мы уже отмечали, не причиной гибели клетки, а лишь триггером накопления различного рода повреждений [239]. Видимо, накопление unrepaired повреждений ДНК, которое, как было показано, имеет место, в первую очередь, в неделящихся клетках, играет основополагающую роль в старении [9]. Повреждения могут быть самыми разнообразными: сшивки ДНК-белок, депуринизация, замена одного основания другим, глобальное деметилирование и т.д. [7, 237, 242, 243]. Одним из наиболее серьезных повреждений являются разрывы нитей ДНК. Ферменты репарации хуже работают в старых клетках, чем в молодых, что приводит к нарушениям структуры и, соответственно, к ухудшению функционального состояния ДНК.

Что же касается исследований на клеточных культурах, то, действительно, в популяциях интенсивно пролиферирующих клеток (в том числе и трансформированных) не наблюдается накопления деструктивных повреждений. Это может объясняться тем, что даже если в быстро делящихся клетках в результате действия радикалов, иных химических агентов или просто теплового движения молекул и образуются какие-либо повреждения структуры ДНК, то либо они устраняются в процессе репликативной репарации, либо клетки с несовместимыми с жизнью повреждениями просто гибнут, а популяция постоянно пополняется молодыми, не имеющими повреждений клетками. В связи с этим среднее число повреждений ДНК в клеточной популяции (в расчете на одну клетку) не меняется. Из этого можно заключить, что сигналом к накоплению деструктивных повреждений в клеточной популяции, в том числе и повреждений ДНК, является ограничение скорости пролиферации. Видимо, эта ситуация адекватна тому, что происходит в стареющем организме (уменьшение количества делящихся клеток и ухудшение питания клеток в целом) [240].

Дрожжевые клетки, переведенные в стационарное состояние иммобилизацией в специальной системе, обеспечивающей полноценное питание, перестраивали свой фенотип и экспрессию генов, становясь более устойчивыми к стрессу и сохраняли жизнеспособность > 95% в течение 17 сут [244]. В то же время в отсутствие такой

системы (при обычном так называемом «хронобиологическом старении» (см., например, [245]), клетки гибнут, видимо, не от постепенного накопления внутренних повреждений, а от стресса, вызванного закислением среды продуктами метаболизма).

Одним из известных маркеров старения является накопление в клетках фермента  $\beta$ -галактозидазы. В 1995 г. в лаборатории Кампизи сообщили о существовании особой формы бета-галактозидазы, активной не при кислых pH (3-4,5), а при pH 6. Этот фермент был назван ими связанной со старением  $\beta$ -галактозидазой (SA- $\beta$ -Gal) [246]. В этой работе были постулированы следующие утверждения: 1) - увеличение активности цитохимически обнаруживаемой SA- $\beta$ -Gal при pH 6,0 в клеточных культурах и на срезах тканей, полученных от старых доноров, то есть увеличение числа SA- $\beta$ -Gal-положительных клеток на срезах кожи в зависимости от возраста донора; 2) - в иммортализованных клетках не наблюдается окрашивания на SA- $\beta$ -Gal [246]. Эти наблюдения позволили предположить, что окрашивание на SA- $\beta$ -Gal может применяться в качестве как маркера старения, так и для различения клеток, которые будут трансформироваться от тех, которые будут стареть на поздних пассажах в культуре [247]. То есть изменения предложенного ими параметра имеют строгую корреляцию только с изменениями, имеющими место в клетках, стареющих по Хейфлику, и, следовательно, непригоден для изучения других моделей - стационарного и стресс-индуцированного старения. Впоследствии эта точка зрения подверглась жесткой критике (см. далее). Однако затем активность SA- $\beta$ -Gal была обнаружена во многих протестированных иммортализованных клеточных линиях, например, A549, HepG2, клетках лейкемии HL-60 и опухолевых клетках толстого кишечника Caco2-TC7 [248]. Кроме того, были показаны изменения активности SA- $\beta$ -Gal в моделях стационарного старения, когда клетки, в том числе и опухолевые (то есть не имеющие лимита Хейфлика) были переведены в состояние «стационарного» старения различными способами (депривацией сыворотки, действием гепарина, контактным торможением, действием индукторов дифференцировки или окислительным стрессом) [248-253]. Таким образом, можно сделать вывод, что данные по окрашиванию на SA- $\beta$ -Gal при pH 6 не согласуются с предложенной специфичностью для репликативно постаревших клеток. Действительно, в последующих работах было подтверждено, что процент окрашиваемых на SA- $\beta$ -Gal при pH 6 увеличивается при старении по Хейфлику [252, 254, 255]. В фибробластах крайней плотности Hs68 разного репликативного возраста при окрашивании X-Gal при pH 6,0 процент SA- $\beta$ -Gal-положительных клеток увеличивался пропорционально пассажу (<5, 36 и 89% на 18, 25 и 27 пассаже, соответственно) [252]. В культуре гладкомышечных клеток подкожной вены человека SVSMC, полученной от пациентов, перенесших аортокоронарное шунтирование,



доля окрашенных синим клеток увеличивается постепенно с пассажами, достигая 82% положительно окрашенных клеток на 10 пассаже [256].

### **1.8. Исследования «возрастных» изменений в системе поли(ADP-рибозил)ирования белков на клеточных моделях старения**

При написании раздела использованы статьи автора диссертации: [Shilovsky G.A., Shram S.I., Morgunova G.V., and Khokhlov A.N. 2017. Protein poly(ADP-ribosyl)ation system: Changes in development and aging as well as due to restriction of cell proliferation // Biochemistry (Moscow). Vol. 82. № 11. P. 1391-1401].

#### ***Исследования на модели репликативного старения клеток***

CA PARP (стимулированная ДНКазой I) не зависела от клеточной линии и числа УКП, из чего авторы делают вывод об отсутствии «возрастных» изменений уровня белка PARP-1 [257]. Однако это утверждение противоречит результатам Сальминена и соавт., которые показали, что содержание PARP-1 катастрофически снижается на поздних пассажах в культурах ДФЧ WI-38 [230].

Дельорко и Андерсон исследовали изменения HCA PARP (в статье - базальный уровень активности PARP) и CA PARP в ходе старения «по Хейфлику» в пермеабелизованных ДФЧ, полученных из легких плода (штамм IMR-91, пролиферативный потенциал – 50-54 УКП) и крайней плоти новорожденных (штамм CF3, пролиферативный потенциал – 55-75 УКП). В обоих клеточных штаммах количество клеток на поздних пассажах (60-80% от максимального числа УКП) снижалось на 30-60% по сравнению с таковым на ранних пассажах (менее 60% от максимального числа УКП) [257]. CA PARP (стимулированная ДНКазой I) не зависела от клеточной линии и числа УКП, из чего авторы сделали вывод об отсутствии «возрастных» изменений уровня белка PARP-1 [257]. Однако это утверждение противоречит результатам Сальминена и соавт., которые показали, что содержание PARP-1 катастрофически снижается на поздних пассажах в культуре ДФЧ [230]. Для устранения этого противоречия необходимо проведение дополнительных исследований, в которых бы измерялись оба параметра одновременно. Представляется наиболее вероятным, что активация PARP ДНКазой I в экспериментах Дельорко и Андерсона имела некие методические погрешности. Это является еще одним аргументом в пользу применения для активации PARP двунитевых олигонуклеотидов в качестве источника свободных концов ДНК.

### *Исследования на модели «стационарного старения» клеток*

Как уже говорилось, при замедлении пролиферации активность PARP (а значит, и способность реагировать на разрывы ДНК) изменяется. Эти данные особенно важны в свете того, что и при старении «по Хейфлику», и при «стационарном старении» появление «старческого» фенотипа связано с ограничением пролиферации. Так как популяции постмитотических или очень медленно размножающихся клеток неизбежно образуются в процессе развития и именно их наличие в организме является триггером процесса старения, то последний можно считать просто «побочным продуктом» программы развития.

В работе Заниоло и соавт. сравнивали СА PARP и экспрессию PARP-1 в ядерных фракциях до и через определенное время после достижения монослоя в первичных культурах эпителиальных клеток роговицы кролика (RCEC) и человека (HCEC), кератиноцитов кожи человека (HDK) эндотелиальных клеток из пупочной вены человека (HUVEC), гладкомышечных клеток из пупочной вены человека (HVSMC) и клеток пигментного эпителия сетчатки глаза кролика (RPE) [258]. Все клетки выращивали до состояния субмонослоя (около 70% монослоя) или монослоя (100%-ный монослой), после чего культивировали в течение 2, 4, 5, 15 сут (5% CO<sub>2</sub>, 37°C). При длительном пребывании в состоянии покоя после достижения состояния монослоя во всех исследованных типах культур клеток СА PARP снижалась от 2 до 12 раз. Кроме того, наблюдалось значительное снижение уровня белка PARP-1 после достижения монослоя.

Аналогичные результаты были получены ранее Сальминеном и соавт. на культурах ДФЧ [230]. Авторы наблюдали существенное уменьшение уровня белка PARP-1 при переходе клеток на ранних пассажах в состояние покоя. Было показано, что это снижение не было связано с усилением апоптоза или активацией протеолитических ферментов, расщепляющих PARP-1.

В уже упоминавшейся выше работе Спина Пьюрелло и соавт. изучали влияние 36-часовой депривации сыворотки на HSA PARP в первичной культуре астроцитов головного мозга крысы, находящихся на разных стадиях роста: «молодых» («30-DIV»), «зрелых» («90-DIV») и «старых» («190-DIV»). В качестве маркеров «возраста» клеток использовали белки цитоскелета: виментин, содержащийся преимущественно в незрелых астроцитах, и глиальный фибриллярный кислый белок, составляющий основную массу белков промежуточных филаментов в зрелых астроцитах. В «молодой» культуре («30-DIV») наблюдали преимущественно экспрессию виментина, тогда как в культурах «90-DIV» и «190-DIV» – глиального фибриллярного кислого белка. В «старых» клетках («190-DIV») обнаруживали характерные морфологические изменения, указывающие на

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

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

Как уже говорилось ранее, со снижением скорости пролиферации происходит накопление дефектов биологических макромолекул, в том числе и ДНК. Идея о повреждении ДНК как главной причине деградации организма с возрастом лежит в основе многих концепций старения, в частности, свободнорадикальной теории Хармана [2]. В этой связи ряд авторов обратил внимание на то, что нагрузка на системы, выступающих в качестве своеобразных «сенсоров» повреждений ДНК также увеличивается с возрастом, и для их корректной работы требуется увеличение их количества или активности [130, 259]. К таким «сенсорам» повреждений ДНК безусловно относится и система поли(ADP-рибозил)ирования. Судя из опубликованных в литературе данных, одной из причин накопления макромолекулярных повреждений в клетке может быть, кроме того, снижение активности ферментов, отвечающих за расщепление PAR, что, в свою очередь, приводит к накоплению поли(ADP-рибозил)ированных белков, включая и сами PARP. В этой связи накопление PAR-модифицированных белков сопутствует старению.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Материалы и реактивы

#### *Культуры клеток*

Клетки китайского хомячка линии ВП-dii-FAF28 получены из ФГБНУ «Медико-генетический научный центр». Клетки феохромоцитомы крысы PC12 получены из коллекции клеточных культур Института молекулярной генетики РАН (Москва). Мезенхимальные стволовые клетки человека предоставлены Н.С. Линьковой (Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии).

#### *Материалы и реактивы для работы с культурами клеток*

В работе были использованы: питательные среды Игла MEM и DMEM, сыворотка крови крупного рогатого скота (СКРС) и сыворотка плодов коровы (СПК), 0,25% раствор трипсина, 0,02% раствор версена, фосфатно-солевой буфер pH 7,4 (все производства БиолоТ, С.-Петербург), фактор роста нервов мыши 7S (ICN, США); поли-L-лизин (Fluka, США), флаконы и планшеты для культивирования клеток (Corning, США).

#### *Другие реактивы*

Na<sub>2</sub>×EDTA, бычий сывороточный альбумин, трипановый синий, додецилсульфат натрия (SDS), реагент Фолина, 3-AB, Хёхст (Hoechst 33258), (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолий бромид) (МТТ) и иодид пропидия (все производства Sigma, США), танакан (EGb 761; Beafour Ipsen Int., Франция), антитела к поли(ADP-рибозе) (10H; Santa Cruz Biotechnology, США), вторичные антитела козы к IgG мыши, конъюгированные с флуорофором Alexa-488 (Molecular Probes, США), Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> и полиэтиленгликоль 6000 (Fluka, США). Другие реагенты и растворители, – отечественного и зарубежного производства, – соответствовали марке х.ч. или ос.ч.

Декамерный палиндромный олигонуклеотид CGGAATTCCG синтезирован А.А. Володиным (Институт молекулярной генетики РАН, Москва). [Аденин-<sup>3</sup>H] NAD приготовлен, как описано в работе [259]. Флавоноиды были любезно предоставлены к.х.н. Колхиром В.К. (Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений, Москва). Для приготовления жидкого сцинтиллятора 2,5 г 2,5-дифенилоксазол и 0,2 г 1,4-дифенилксазолилбензола растворяли в 1 л толуола. Полученный сцинтиллятор хранили в сухом темном месте.

## **2.2. Методы исследования**

### ***Культивирование клеток***

Клетки VII-dii-FAF28 выращивали в стандартных стеклянных флаконах Карреля (36,3 см<sup>2</sup>) или в прямоугольных стеклянных флаконах (30 см<sup>2</sup>) в минимальной среде Игла MEM, содержащей 10 % сыворотки крови крупного рогатого скота (СКРС) и 80 мг/л сульфата гентамицина (далее – «полная среда») при температуре 37°C. После достижения состояния монослоя (приблизительно на 4-5-ые сут культивирования), клетки рассеивали в соотношении 1:6 – 1:10. Для снятия клеток с подложки использовали смесь растворов ЭДТА (0,02%) и трипсина (0,25%) в соотношении 1:1.

Культивирование клеток феохромоцитомы крысы PC12 проводили согласно процедурам, описанным в [260]. Клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 15% СПК, 2 мМ L-глутамин и 80 мкМ сульфата гентамицина, в культуральных флаконах объемом 50 мл (Corning&Costar, США). Клетки инкубировали в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при температуре 37°C. Пересев клеток (в соотношении 1:3 – 1:5) производили через 3-4 дня культивирования.

### ***Моделирование «стационарного старения» клеток***

Культуры клеток разного «возраста» получали одним из двух способов. В первом случае («продольные» исследования) клетки высевали в 10-20 флаконов в полной среде с плотностью около 35×10<sup>3</sup> клеток/см<sup>2</sup>. Дальнейшее культивирование проводили при 37°C без замены среды. Через определенное время после посева случайным образом выбирали 3-5 флаконов, снимали клетки с подложки раствором трипсин-ЭДТА и проводили определение жизнеспособности и активности PARP. Во втором случае («поперечные» исследования) через каждые 3-4 дня в процессе регулярно проводившихся пассажей клетки отсеивали во флаконы с плотностью около 35×10<sup>3</sup> клеток/см<sup>2</sup> и культивировали, как было описано выше. Затем, по истечении 13-14 дней после посева первых культур, во всех флаконах снимали клетки с подложки и проводили определение жизнеспособности и активности PARP.

### ***Моделирование окислительного стресса в культуре клеток***

Для индукции окислительного стресса клетки помещали в среду без сыворотки, вносили свежеприготовленный раствор H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> до конечной концентрации 1 мМ и инкубировали в течение 30 мин в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C. Затем заменяли среду с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на среду, содержащую 10% сыворотки, и культивировали в течение 4 или 24 ч.

При исследовании способности клеток к поли(ADP-рибозил)ированию белков в ответ на повреждение ДНК с увеличением «возраста» культуры клетки пересевали 1:4 и

сеяли на эксперимент на культуральные 24-луночные планшеты (Corning&Costar, США) из расчета  $35 \times 10^3$  клеток/см<sup>2</sup>. Через несколько дней подсевали клетки из стоковой культуры для получения плашки с культурами клеток разного «стационарного возраста». Для оценки способности клеток к активации синтеза PAR в ответ на повреждения ДНК клетки инкубировали в течение 5 мин в среде с 1мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и определяли уровень PAR в клетке и способность клетки к усиленному синтезу PAR в зависимости от «возраста» культуры клеток VII-dii-FAF28, а также изменение количества клеток, окрашиваемых на маркер старения активность SA-β-Gal в клетках на 3, 6, 8, 10, 13 и 15 день «стационарного старения».

### ***Определение жизнеспособности клеток в культуре***

#### **Окрашивание клеток красителем трипановым синим**

В пластиковой пробирке объемом 1,5 мл смешивали 100 мкл суспензии клеток и 100 мкл 0,4% раствора трипанового синего (ТС). Через 5 мин определяли процентное содержание мертвых клеток с поврежденной плазматической мембраной, интенсивно окрашиваемых ТС. Количество живых и мертвых клеток подсчитывали с использованием камеры Горяева.

#### **МТТ-тест (метод Мосманна)**

Тест основан на способности живых клеток восстанавливать легко проникающий в клетки тетразолий бромид в нерастворимые в воде соли формазана [261]. В одном варианте анализа клетки разного «возраста» снимали с подложки раствором трипсина и промывали 0,9 % раствором NaCl. После центрифугирования отбирали аликвоту (около  $2 \times 10^6$  клеток), суспендировали в культуральной среде до концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл, разливали в 96-луночный планшет – по 100 мкл на лунку, и инкубировали 1 ч при 37 С. Затем в каждую лунку вносили по 50 мкл р-ра МТТ (1 мг/мл в культуральной среде без сыворотки) в среде культивирования и оставляли на ночь при 37 С. После этого заменяли среду культивирования с непрореагировавшим МТТ на лизирующий раствор и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч, а затем проводили анализ оптической плотности на спектрофотометрическом анализаторе для микроплашек. В контрольные образцы добавляли 10 мкл 10 % раствора неионного детергента Tween-20.

В другом варианте эксперимента клетки высевали в 24-луночный пластиковый планшет ( $100 \times 10^3$  клеток на лунку) и инкубировали 3 ч в среде с 1% СКРС в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C. Затем проводили замену среды на среду без сыворотки, содержащую H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0 – 3 мМ), и инкубировали 30 мин при тех же условиях. Затем среду с перекисью заменяли на среду, содержащую МТТ (0,5 мг/мл), инкубировали 4 ч в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>

при 37°C, а затем анализировали количество накопившегося в клетках солей формазана спектрофотометрически на приборе Specord M40 (Carl-Zeiss, Германия). Содержание в клетках формазана определяли, исходя из оптической плотности лизатов при длине волны 570 и 640 нм. Процентное содержание жизнеспособных клеток определяли из соотношения:  $(A_{570(\text{опыт})} - A_{640(\text{опыт})}) / (A_{570(\text{контроль})} - A_{640(\text{контроль})}) \times 100\%$ , где  $A_{570(\text{опыт})}$  и  $A_{640(\text{опыт})}$  – значения оптической плотности в опытных образцах, а  $A_{570(\text{контроль})}$  и  $A_{640(\text{контроль})}$  – в контрольных образцах (т.е. в лунках, не подвергавшихся воздействию).

#### ***Определение ассоциированной со старением активности $\beta$ -галактозидазы в культуре клеток***

Активность SA- $\beta$ -Gal определяли классическим цитохимическим методом, как описано у Димри и соавт. [246]. Эксперимент проводили в виде «поперечного» исследования. Для получения плашки с культурами клеток ВП-dii-FAF28 разного «стационарного возраста» клетки последовательно, с интервалом в 3-4 дня, высевали из стоковой культуры в культуральные 24-луночные планшеты из расчета  $35 \times 10^3$  клеток/см<sup>2</sup> и культивировали при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. В конце культивирования клетки промывали PBS, фиксировали 5 мин раствором 2% формальдегида и 0,2% глутарового альдегида в PBS при комнатной температуре, и дважды промывали PBS. Затем к фиксированным клеткам добавляли реакционную смесь – 1 мг/л X-Gal, 5 мМ калия ферроцианида, 5 мМ калия феррицианида, 150 мМ NaCl, 2 мМ MgCl<sub>2</sub> в 40 мМ цитрат/фосфатном буфере и инкубировали 5 ч при 37°C во влажной камере. После окончания инкубации клетки трижды промывали PBS и один раз метанолом и вносили по 1 мл глицерина. Полученные препараты хранили при +4°C. Документирование и анализ изображений производили с помощью инвертированного светового микроскопа в видимом свете с использованием объектива  $\times 40$ . Полученные изображения сохраняли в виде файлов формата jpeg.

#### ***Определение митотической активности клеток (включение тимидина)***

После серии пересевов, проводившихся каждые 3 дня, «молодые» клетки ВП-dii-FAF28 из 4 флаконов Карреля снимали с поверхности роста раствором трипсин-ЭДТА, суспендировали в 15 мл среды Игла и высевали с плотностью 4500 клеток/см<sup>2</sup> в 42 флакона Карреля. После этого, через определенные промежутки времени, среду из трех случайным образом отобранных флаконов, предварительно стерильно профильтровав, переносили в стерильные пенициллиновые флаконы и хранили при +4°C. Клетки снимали с поверхности роста с помощью раствора трипсин-ЭДТА, суспендировали, объединяли содержимое трех флаконов и подсчитывали количество клеток в камере. Таким образом, к

концу первой части эксперимента (26 сут культивирования) получили набор сред разного «возраста», соответствующего определенной стадии роста и «стационарного старения» культуры. Во второй части эксперимента в лунки 24-луночных культуральных планшетов, на дно которых были помещены покровные стекла размером 8×8 мм, высевали «молодые» (3 сут после последнего посева) клетки ВП-dii-FAF28 с плотностью  $26,6 \times 10^3$  клеток/см<sup>2</sup>, используя свежую среду, и инкубировали 2 ч в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C. После этого среды в лунках заменяли на полученные в первой части эксперимента среды разного «возраста» (3 лунки на каждый «возраст») и через 22 ч определяли плотность клеток на каждом стеклышке, подсчитывая их среднее число в поле зрения микроскопа. Через 48 ч после посева в каждую лунку добавляли [<sup>3</sup>H] тимидин до конечной концентрации  $18,5 \times 10^3$  Бк/мл и через 24 ч (т. е. через 3 сут после посева) снова подсчитывали плотность клеток на стеклах. После этого среду из лунок удаляли, стекла промывали раствором Хенкса, высушивали на воздухе и с помощью смолы приклеивали на предметные стекла. Полученные препараты помещали на 10 мин в 5% раствор трихлоруксусной кислоты, затем раствор удаляли и клетки промывали в течение 2 ч в проточной водопроводной воде. Радиоавтографию проводили стандартным способом, как описано у Епифановой и Терских [262], экспонируя фотоэмульсию в течение 5 сут и проявляя ее затем амидоловым проявителем. С помощью микроскопа определяли относительное количество ядер с 10 зернами серебра и более. На основании полученных результатов для каждого случая рассчитывали два показателя: 1) индекс пролиферативной активности (ИПА) клеток, вычисляемый как  $\log_2(N_3/N_1)$ , где  $N_1$  — плотность культуры клеток через 1 сут после посева, а  $N_3$  — тот же показатель через 3 сут после посева; 2) индекс мечения (ИМ) клеток, вычисляемый как процент клеток, в ядрах которых произошло интенсивное включение радиоактивно меченного тимидина.

#### ***Получение частично очищенного препарата поли(ADP-рибоза)-полимеразы***

Выделение и очистку PARP проводили согласно методам, описанным в работах [263, 264]. Хранившийся при -70°C тимус разморозили, промыли в 0,25 М сахарозе и с помощью скальпеля и пинцета освободили от жировой и соединительной ткани, остатков легких, сгустков крови. Сто пять граммов очищенного тимуса измельчили, поместили в 300 мл буфера А (состав приведен в конце подраздела) и гомогенизировали с помощью бытового блендера. Полученный гомогенат центрифугировали 15 мин на центрифуге Beckman Spinco J2-21 М/Е (США) с ротором JA10 при 8200 об./мин при +4°C. В полученный супернатант (175 мл) постепенно вносили сухой сульфат аммония до 0,4 насыщения, смесь выдержали в ледяной бане в течение 30 мин, а затем центрифугировали



20 мин при 6000 об./мин. В супернатант постепенно вносили новую порцию сульфат аммония до 0,8 насыщения, выдерживали 10 мин в ледяной бане и центрифугировали 30 мин при 8000 об./мин. Полученный в результате осадок ресуспендировали в буфере Б до полного растворения, затем доводили буфером Б (состав приведен в конце подраздела) до 100 мл. Далее полученную сульфат-аммонийную фракцию (0,4-0,8 насыщения) подвергали ступенчатой обработке полиэтиленгликолем (ПЭГ). Для этого к полученной фракции постепенно вносили стоковый раствор (50%, вес/об.) ПЭГ 6000 до конечной концентрации 5%, перемешивали в ледяной бане в течение 30 мин и центрифугировали 20 мин при 5000 об./мин и +4°C на центрифуге K-23D (VEB MLW, Германия). К полученному супернатанту добавляли стоковый раствор ПЭГ до концентрации 16%, а затем перемешивали и центрифугировали, как указано выше. Осадок ресуспендировали в 20 мл буфера Б. На заключительной стадии проводили ионообменную объемную хроматографию с ДЭАЭ-целлюлозой. В стеклянную центрифужную пробирку, содержащую 5 мл геля ДЭАЭ-целлюлозы, уравновешенного в буфере Б, вносили 20 мл фракции ПЭГ (5-16%), перемешивали в течение 30 мин при +4°C и центрифугировали 20 мин при 5000 об./мин и +4°C на центрифуге K23D (VEB MLW, Германия). Полученный супернатант отбирали, а гель промывали 20 мл буфера Б путем суспендирования, перемешивания и центрифугирования. Полученную после центрифугирования промывную фракцию объединяли с несвязавшейся фракцией, замораживали и лиофилизировали. Полученный лиофилизированный порошок хранили при -20°C и использовали в качестве ферментного препарата PARP тимуса теленка.

Составы используемых буферов:

Буфер А: 50 мМ Tris×HCl, 10 мМ ЭДТА, 50 мМ Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 0,3 М NaCl, 1 мМ дитиотреитол, 3 мМ DMSF, 10 мМ □-меркаптоэтанол; pH 8,0.

Буфер Б: 50 мМ Tris×HCl, 1 мМ ЭДТА, 50 мМ Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 0,2М NaCl, 1 мМ дитиотреитол, 10 мМ □-меркаптоэтанол; pH 8,0.

### ***Определение стимулированной и нестимулированной активностей поли(ADP-рибоза)-полимеразы***

Активность PARP в пермеабелизованных клетках ВП-dii-FAF28 и клетках PC12 определяли следующим образом. Культивируемые во флаконах клетки снимали с подложки раствором трипсин-ЭДТА, суспендировали в 10 мл 0,9 % р-ра NaCl и полученную суспензию центрифугировали в течение 10 мин при 200 g и комнатной температуре для удаления остатков трипсина. Осажденные клетки ресуспендировали в 5 мл 0,9% р-ра NaCl и осаждали, как описано выше. На этой стадии также проводили подсчет клеток в камере Горяева. Осажденные клетки ресуспендировали в ледяном

гипотоническом буфере для пермеабиллизации (10 мМ Tris×HCl, 1 мМ Na<sub>2</sub>×ЭДТА, 4 мМ MgCl<sub>2</sub>, 30 мМ β-меркаптоэтанол; pH 7,8) из расчета 1 мл – на 2×10<sup>6</sup> клеток и оставляли на льду в течение 15 мин. После этого пермеабиллизованные клетки осаждали в течение 20 мин при 200g и +4°C и ресуспендировали в буфере для пермеабиллизации из расчета 1 мл – на 20×10<sup>6</sup> клеток.

Аликвоты суспензии клеток, объемом 50 мкл (по 1×10<sup>6</sup> клеток), вносили в эппендорфовские пробирки на 1,5 мл, помещенные в ледяную баню. При анализе СА PАРР к суспензии клеток добавляли по 33 мкл реакционной смеси (100 мМ Tris×HCl, 120 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ NAD<sup>+</sup>; pH 7,8), содержащей радиоактивно меченный NAD<sup>+</sup> (из расчета 1 мКи/на пробу), 13 мкл раствора двухцепочечного дезоксиолигонуклеотида CGGAATTCCG в 15 мМ NaCl (из расчета 10 мкг на пробу) и при необходимости 10 мкл 80 мМ 3-AB в 20% этаноле. Объем реакционной смеси доводили дистиллированной водой до 100 мкл, после чего пробы инкубировали в течение 10-120 мин при 30°C. При анализе НСА PАРР дезоксиолигонуклеотид в реакционную смесь не вносили. Реакцию останавливали добавлением в каждую пробирку по 1 мл охлажденного в ледяной бане 10% (w/w) р-ра ТХУ, содержащего пиррофосфат натрия (2%, w/v) и оставляли на ночь при +4°C. В контрольные пробы раствор ТХУ добавляли сразу же после внесения реакционной смеси. На следующий день содержимое пробирки переносили на фильтры Whatman GF/C. Перенесение проб на фильтры и промывку фильтров проводили с использованием харвестера Brandel M-12S (Brandel, США) и вакуумного насоса Heraeus (Германия). После перенесения проб на фильтры пробирки промывали 1 мл раствора 10% ТХУ и 2% пиррофосфата Na, охлажденного в ледяной бане, а затем фильтры последовательно промывали 10 мл раствора 10% ТХУ и 2% пиррофосфата Na и 10 мл этанола. Фильтры сушили в термостате в течение одного часа при 180°C. Затем фильтры помещали в сцинтилляционные флаконы, заливали 5 мл толуольного сцинтиллятора и определяли содержание радиоактивно меченных тритием продуктов на сцинтилляционном счетчике 1215 Rackbeta (LKB, Швеция). За одну единицу активности (ед. акт.) PАРР принимали такое количество фермента, которое при приведенных выше стандартных условиях способно за 1 мин обеспечивать образование <sup>3</sup>H-поли(ADP-рибозы) в количестве, эквивалентном 1 распаду в минуту.

Определение активности PАРР тимуса телят проводили, как описано выше, используя вместо аликвоты пермеабиллизованных клеток 50 мкл препарата тимуса телят в фосфатном буфере.

### ***Определение концентрации общего белка в пробах***

Общее содержание белка в пробах определяли по методу Лоури в модификации Хартри [265]. К 50 мкл суспензии клеток добавляли 0,5 мл 1% раствора додецилсульфата натрия, перемешивали и оставляли на 10 мин при комнатной температуре. Далее 0,5 мл раствора белка переносили в стеклянные пробирки на 10 мл, добавляли 0,5 мл реагента В (9 частей реагента А и 1 часть реагента Б; составы приведены в конце подраздела), перемешивали и оставляли на 10 мин при комнатной температуре, после чего добавляли 1,5 мл раствора Фолина (1:12) и инкубировали на водяной бане в течение 5 мин (55°C). Затем пробирки помещали в холодную воду. Оптическую плотность раствора определяли на спектрофотометре М40 (Carl Zeiss, Германия) при длине волны 750 нм. Концентрацию белка в пробах рассчитывали из калибровочной кривой, построенной с использованием стандартных растворов бычьего сывороточного альбумина.

Реагент А: 0,5 г Na-К-тартрата $\times$ 4H<sub>2</sub>O + 10 г Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(безв.) + 50 мл 1N NaOH + 50 мл 2,5% раствора додецилсульфата Na.

Реагент Б: 2 г Na-К-тартрата $\times$ 4H<sub>2</sub>O + 1 г CuSO<sub>4</sub> $\times$ 5H<sub>2</sub>O + 90 мл H<sub>2</sub>O + 10 мл 1N NaOH (последний добавляли после растворения всех вышеперечисленных компонентов).

### ***Иммунофлуоресцентный анализ содержания поли(ADP-рибозы) в клетках***

Эксперимент проводили в виде «поперечного» исследования, аналогично экспериментам, в которых измеряли активность SA- $\beta$ -Gal. Культуры клеток ВП-dii-FAF28 разного «возраста» растили на покровных стеклах диаметром 1 см, вложенных в лунки 24-луночных планшетов и предварительно покрытых поли-L-лизинном. Клетки высевали из расчета 35 $\times$ 10<sup>3</sup> клеток/см<sup>2</sup> и культивировали в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C. Для оценки способности клеток ВП-dii-FAF28 разного «возраста» к активации синтеза PAR в ответ на повреждение ДНК клетки инкубировали в течение 5 мин в среде с 1 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Для анализа PAR из лунок удаляли среду, промывали клетки холодным PBS, а затем для фиксации вносили 1 мл охлажденного метанола и оставляли 20 мин на льду. Затем метанол удаляли, дважды промывали клетки PBS и последовательно инкубировали препараты при комнатной температуре в забивочном буфере (PBS, содержащем 5% СПК и 0,25% тритона X-100; 30 мин), буфере с первичными антителами к PAR (10Н, Santa Cruz Biotech, США), взятыми в разведении 1:300 (1,5 ч), и вторичными антителами козы к IgG мыши, конъюгированными с Alexa-488 (Molecular Probes, США), взятыми в разведении 1:1000 (1 ч). После этого препараты трижды промывали PBS и инкубировали с иодидом пропидия (0,33 мкг/мл, 4 мин) и еще раз трижды промывали PBS. Полученные препараты помещали на предметные стекла в капле глицерина и получали флуоресцентные

изображения с использованием конфокального микроскопа LSM 510 META (Zeiss, Германия) при длинах волн возбуждения/эмиссии 488/505-530 нм и объектива EC Plan-Neofluar 40x/1.30 Oil DIC M27. Анализ изображений проводили с использованием программ AxioVision 4.8 и ImageJ 1.42q.

#### ***Анализ экспрессии генов методом полимеразной цепной реакции***

Культивируемые во флаконах клетки ВП-dii-FAF28 снимали с подложки раствором трипсин-ЭДТА и после осаждения центрифугированием помещали в консервирующий раствор для сохранения РНК IntactRNA (Евроген, Москва). Для выделения суммарной РНК использовали набор RNeasy MiniKit (Qiagen, Германия). Первую нить кДНК синтезировали с использованием Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Полученную кДНК использовали непосредственно как матрицу для количественной ПЦР, которую проводили на приборе ДТ-322 (ДНК-Технология, Россия), с использованием набора для амплификации qPCRmix-HS SYBR+ROX (Евроген, Россия). Для конструирования олигонуклеотидных праймеров использовали онлайн-сервис NCBI Primer-Blast. Олигонуклеотидные праймеры были синтезированы в НПО Синтол (Москва). Содержание кДНК интересующих генов определяли методом количественной ПЦР с регистрацией в режиме реального времени на приборе CFX96 Real-Time PCR Detection System (BioRad Lab., США), с использованием набора QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Германия) в присутствии интеркалирующего флуоресцентного красителя SYBR Green I.

Для определения уровня экспрессии генов семейства PARP в клетках ВП-dii-FAF28 использовали следующие праймеры (направление – от 5' к 3'-концу):

Parp1F: GCATGTTCCACCAGTGACCT	Parp1R: AACTCGGTCCAAGATCGCAG
Parp2F: GTAGGAATCCTGAGCCACGG	Parp2R: TTAGGGGAGACGCAAAGCAG
PargF: CAGAGTGGGAATGGTGCCG	PargR: GGGCAGAGAGCCTCATTCAC
Parp6 (TNKS2) F: ACATGAAGCCGCTGCAAAAG	Parp6 (TNKS2) R: CTGACATCATCTGCCCCGTAT
GapdhF: AAGCTCATTTCCCTGGTATGACAA	GapdhR: CTCCTCTTGCTCGAGTCCT

Для определения уровня экспрессии генов семейства PARP в МСК использовали следующие пары праймеров (направление – от 5' к 3'-концу):

Parp1F: GCCCTAAAGGCTCAGAACGA	Parp1R: СТАCTCGGTCCAAGATCGCC
Parp2F: GCCAGCAAAAGGGTCTCTGA	Parp2R: TACACATGAGCCTTCCCCAC
TNKS2F: GCACTTCGCCGCAGGTTT	TNKS2R: GAGGAATAAGCCCCCATCA
GapdhF: GAATTTGGCTACAGCAACAGGG	GapdhR: TGAGGGTCTCTCTCTTCTCTT

### ***Статистическая обработка данных***

Анализ, статистическую обработку данных и их графическое оформление проводили с использованием программы SigmaPlot 11.0 (Systat Software GmbH., Германия). Для проверки нормальности распределения переменных в выборках использовали W-критерий Шапиро-Уилка. Для выявления статистически значимых различий между средними значениями в сравниваемых выборках с нормальным распределением переменной использовали t-критерий Стьюдента (парное сравнение независимых выборок) или однофакторный дисперсионный анализ ANOVA (множественное сравнение независимых выборок). В последнем случае после проведения дисперсионного анализа выполняли попарное сравнение выборок (апостериорный анализ) с использованием поправки Бонферрони. В отдельных случаях для выявления значимых различий между сравниваемыми выборками полученные данные подвергали непараметрическим методам статистического анализа: при парном сравнении независимой переменной – с использованием U-критерия Манна-Уитни, а при множественном сравнении независимых выборок – ранговый дисперсионный анализ ANOVA (метод Крускала-Уолисса) с последующим апостериорным анализом Данна. Все численные данные в таблицах и на графиках представлены в виде среднего значения и его стандартного отклонения. Различия между средними значениями измеряемых показателей принимали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1. Обоснование использования стационарных культур клеток для исследования старения клеток *in vivo*

При написании раздела использованы статьи автора диссертации: [Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Karmushakov A.F., Shilovsky G.A., Nasonov M.M., Morgunova G.V. 2014. Testing of geroprotectors in experiments on cell cultures: choosing the correct model system // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. Vol. 69. № 1. P. 10-14].

Для моделирования процессов, характерных для «стационарного старения» (более подробно об этом описано в разделе 1.7) клеточная культура определенным образом (например, за счет естественного контактного торможения) переводится в неделящееся состояние. В таком состоянии клетки могут некоторое время оставаться живыми, но, при этом, митотически неактивными. В определенной степени эта ситуация адекватна тому, что происходит в стареющем организме. Как известно, старение организма сопровождается уменьшением количества делящихся клеток и ухудшением питания клеток в целом. В модели «стационарного» старения можно использовать и клетки с неограниченным пролиферативным потенциалом. Однако в последнем случае, для подтверждения релевантности модели «стационарного» старения требуется проведение дополнительных исследований, подтверждающих, что после достижения культурой состояния монослоя, в клетках происходит постепенное накопление повреждений, изменяется их морфология и жизнеспособность, накапливаются характерные для сенесцентного фенотипа маркеры.

Более того, в недавних исследованиях было показано, что культивируемые клетки ВП-dii-FAF28 в стационарной фазе роста действительно стареют «по Гомпертцу»; т.е. вероятность их гибели экспоненциально возрастает со временем в соответствии с законом Гомпертца (**рис. 6**) [8, 238, 266]. Гомпертц показал, что у человека наблюдается старение, определяемое им как увеличение вероятности смерти с возрастом. Оказалось, что при разбиении жизни человека на некоторое число равных интервалов, вероятность умереть (число умерших в данном интервале по отношению к числу живых на его начало), с возрастом неуклонно растет («закон смертности») [267]. При этом сила смертности  $\mu(x)$  рассчитывается из уравнения  $\mu(x) = N^{-1} \times dN/dx$ , где  $N$  – число особей, доживших до возраста  $x$ . Из графика видно, что в логарифмическом масштабе сила смертности с возрастом линейно растет (**рис. 6**).

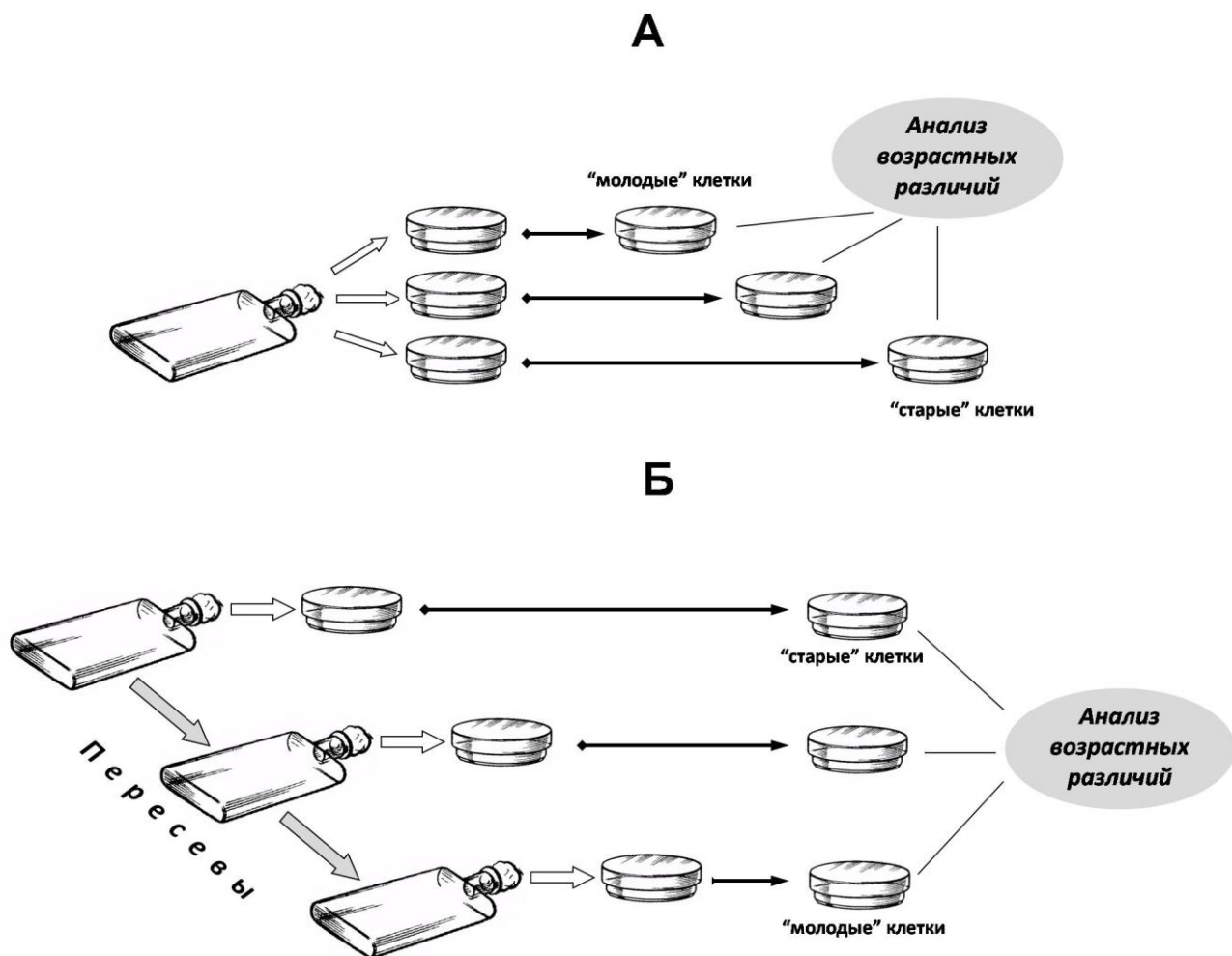


**Рисунок 1.** Кривая гибели стационарной культуры клеток VII-dii-FAF28.

Обозначения:  $N_t$  – общее число клеток на 1см<sup>2</sup> поверхности роста (плотность культуры); **1** – экспериментальные данные ( $N_t$ ); **2** - аппроксимация экспериментальных данных ( $N_t$ ) уравнением Гомпертца ( $r^2 = 0,945$ ); **3** – изменение логарифма силы смертности со временем (см. [267]).

Исследования проводились на стационарных культурах фибробластоподобных клеток китайского хомячка линии VII-dii-FAF28, которые доращивали до определенного «возраста» – от 1 до 14 сут пребывания в стационарной фазе.

В работе использовали два разных дизайна эксперимента, отличающихся способом приготовления культур клеток разного «возраста». В первом случае, при проведении так называемых «продольных» (longitudinal) исследований (**рис. 7А**), клетки высевали с плотностью около 35000 клеток/см<sup>2</sup> в 10-20 флаконов (20 см<sup>2</sup>) одновременно из одного пула. Дальнейшее культивирование проводили при 37°C без замены среды. Через определенное время после посева случайным образом выбирали 3-5 флаконов, клетки снимали с подложки и определяли их жизнеспособность и другие показатели. Во втором случае, в так называемых «поперечных» (cross-sectional) исследованиях (**рис. 7Б**) через каждые 3-4 сут в процессе регулярно проводившихся пересевов, клетки отсевали во флаконы (20 см<sup>2</sup>) с плотностью около 35000 клеток/см<sup>2</sup>, и культивировали, как было описано выше. Затем по истечении 11-13 сут после посева первых культур, во всех флаконах снимали клетки с подложки и проводили определение жизнеспособности и других показателей.



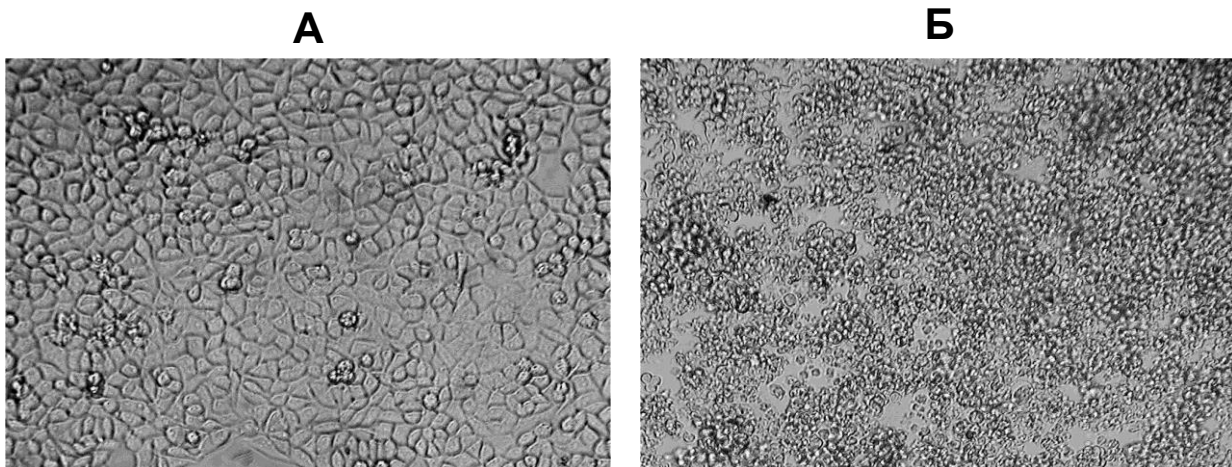
**Рисунок 7.** Схематическое изображение «продольного» (longitudinal; А) и «поперечного» (cross-sectional; Б) исследований.

### 3.2. Проявление признаков старения при длительном культивировании клеток ВП-dii-FAF28 в стационарной фазе роста

#### 3.2.1. Изменение морфологии клеток

На ранних стадиях роста культуры клеток ВП-dii-FAF28 образуют сомкнутый монослой с четко очерченными контурами отдельных клеток, которые при этом, сильно распластаны (**рис. 8**). На поздних стадиях стационарной фазы роста сомкнутый монослой как таковой вообще исчезает, часть клеток открепляется от поверхности роста клеток, а оставшиеся «сморщиваются» и приобретают округлые очертания. Ниже приведены характерные графики, отражающие изменения в плотности культур клеток ВП-dii-FAF28 в процессе стационарного роста (**рис. 9**).





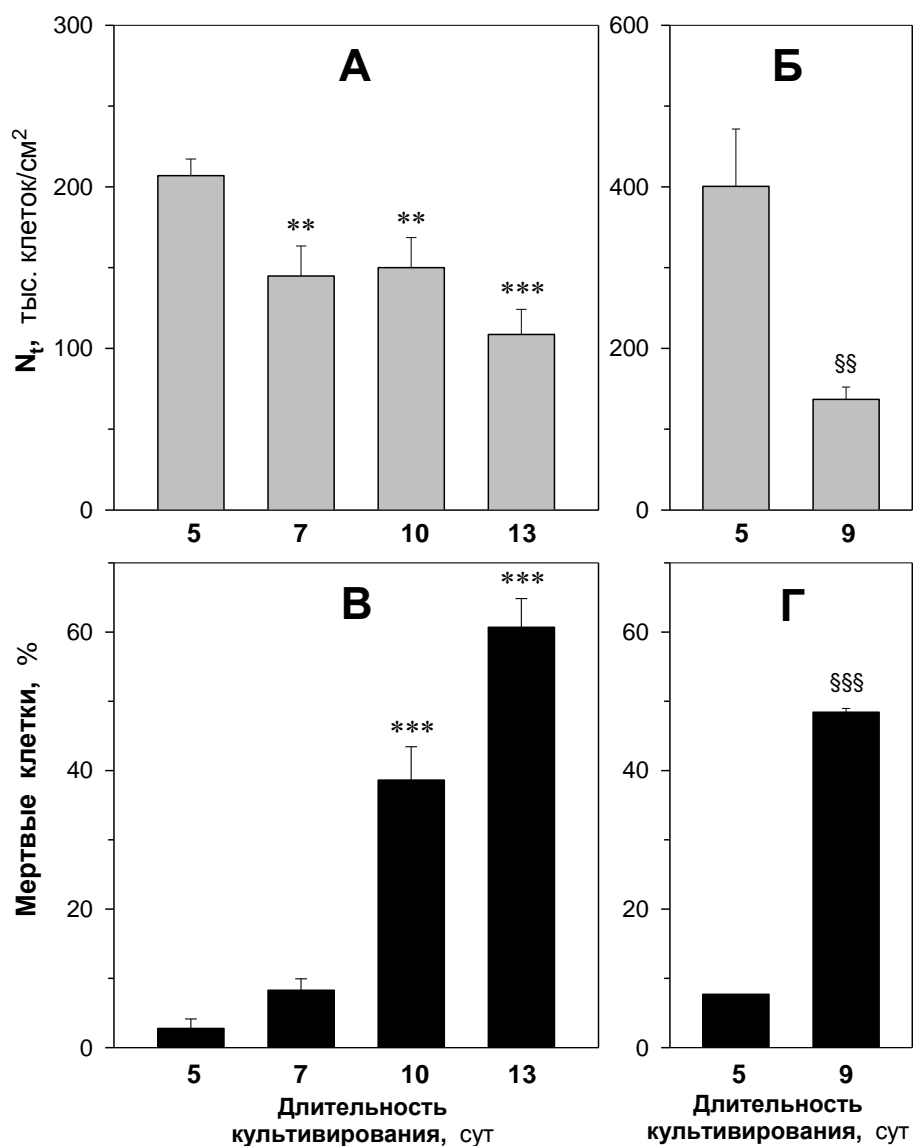
**Рисунок 8.** Изменение морфологии клеток BII-dii-FAF28 в ходе «стационарного старения».

**А.** – Культура «молодых» клеток (длительность культивирования – 4 сут); **Б.** – Культура «старых» клеток (длительность культивирования – 16 сут). Увеличение  $\times 160$ .

### 3.2.2. Снижение жизнеспособности клеток

При написании раздела использованы статьи автора диссертации: [Shram S.I., Shilovsky G.A., Khokhlov A.N. 2006. Poly(ADP-ribose)-polymerase-1 and aging: experimental study of possible relationship on stationary cell cultures // Bull. Exp. Biol. Med. Vol. 141. № 5. P. 628-632].

Определяли плотность клеток BII-dii-FAF28 в культуре и их жизнеспособность в культурах разного «возраста» – от 3 до 13 сут культивирования. При этом культуры соответствовали следующим фазам ростовой кривой: 1) поздней логарифмической фазе – 3 сут после посева; 2) ранней стационарной фазе – 5-7 сут после посева; 3) поздней стационарной фазе – 9-10 сут после посева и 4) фазе деструкции – 13 сут после посева. Было показано, что после достижения стационарной фазы в культуре клеток BII-dii-FAF28 происходит уменьшение количества прикрепленных клеток (**рисунки 8 и 9**). Среди удерживающихся на поверхности роста клеток увеличивался процентное содержание поврежденных клеток, выявляемых методом окрашивания трипановым синим. Жизнеспособность в культурах «старых» клеток была значительно ниже, чем в культурах «молодых» клеток (**рисунки 9В и 9Г**). При этом на более поздних сроках стационарной фазы роста (9-13 сут культивирования) наблюдали резкое увеличение числа мертвых клеток, окрашиваемых трипановым синим (**рисунки 9В и 9Г**). При более длительном культивировании процессы деструкции усиливаются. Следует отметить, что в длительных экспериментах, как, например, в нашем случае, увеличение числа клеток окрашиваемых трипановым синим может быть обусловлено не только развитием собственно некротических процессов, но и вторичным некрозом, как постапоптотической стадии, характерной для растущих в культуре клеток.

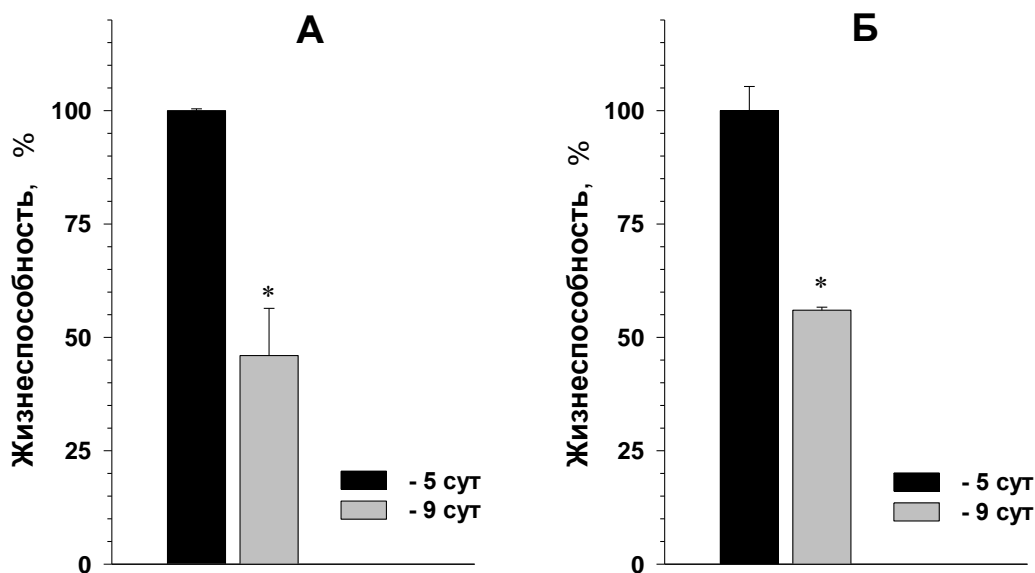


**Рисунок 9.** Влияние длительного культивирования клеток ВП-dii-FAF28 в стационарной фазе роста на жизнеспособность клеток.

**А, В** – «продольное» исследование; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  – по сравнению со значениями на 5 сут (ANOVA, однофакторный анализ).

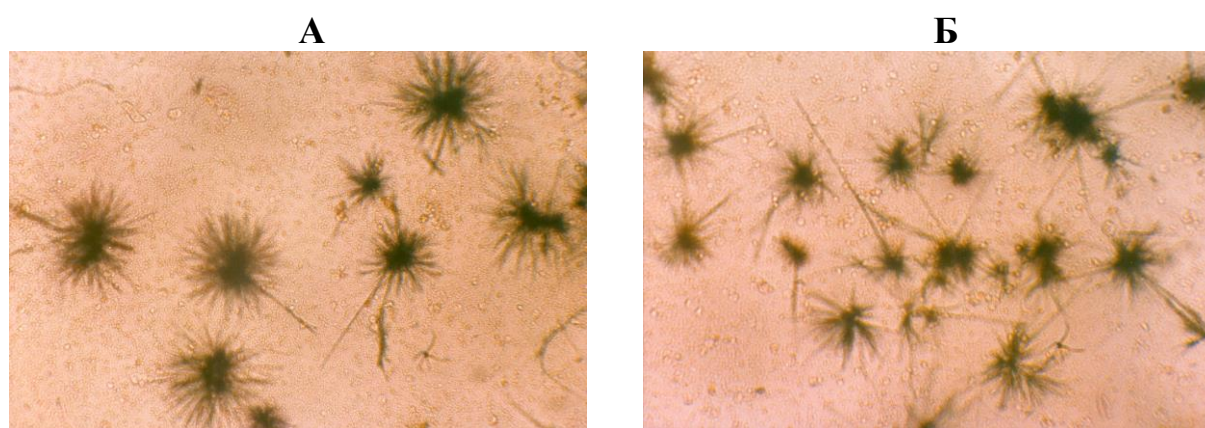
**Б, Г** – «поперечное» исследование;  $\S\S$   $p < 0,01$ ;  $\S\S\S$   $p < 0,001$  – по сравнению со значениями на 5 сут (t-критерий Стьюдента). **А, Б** – общее число клеток на 1см<sup>2</sup> поверхности роста ( $N_t$ ; плотность культуры); **В, Г** – содержание мертвых клеток, окрашиваемых красителем трипановым синим.

Кроме того, для анализа жизнеспособности использовали также МТТ-тест (рис. 10). Определяли общее количество образующегося продукта - формазана спектрофотометрически (см. Методы исследования). Полученные с помощью этого метода результаты оценки жизнеспособности давала сопоставимые с морфометрическим методом (окрашивание трипановым синим) результаты.



**Рисунок 10.** Сравнительный анализ жизнеспособности двух стационарных культур клеток ВП-dii-FAF28 разного «возраста» (культивирование 5 и 9 сут) с использованием красителя трипанового синего (А) и МТТ-теста (денситометрия) (Б).

\*  $p < 0,05$  по сравнению с 5-суточными культурами (t-критерий Стьюдента).



**Рисунок 11.** Анализ жизнеспособности клеток ВП-dii-FAF28 с помощью МТТ-теста. А. - Культура «молодых» клеток (5 сут культивирования). Б. - Культура «старых» клеток (9 сут культивирования).

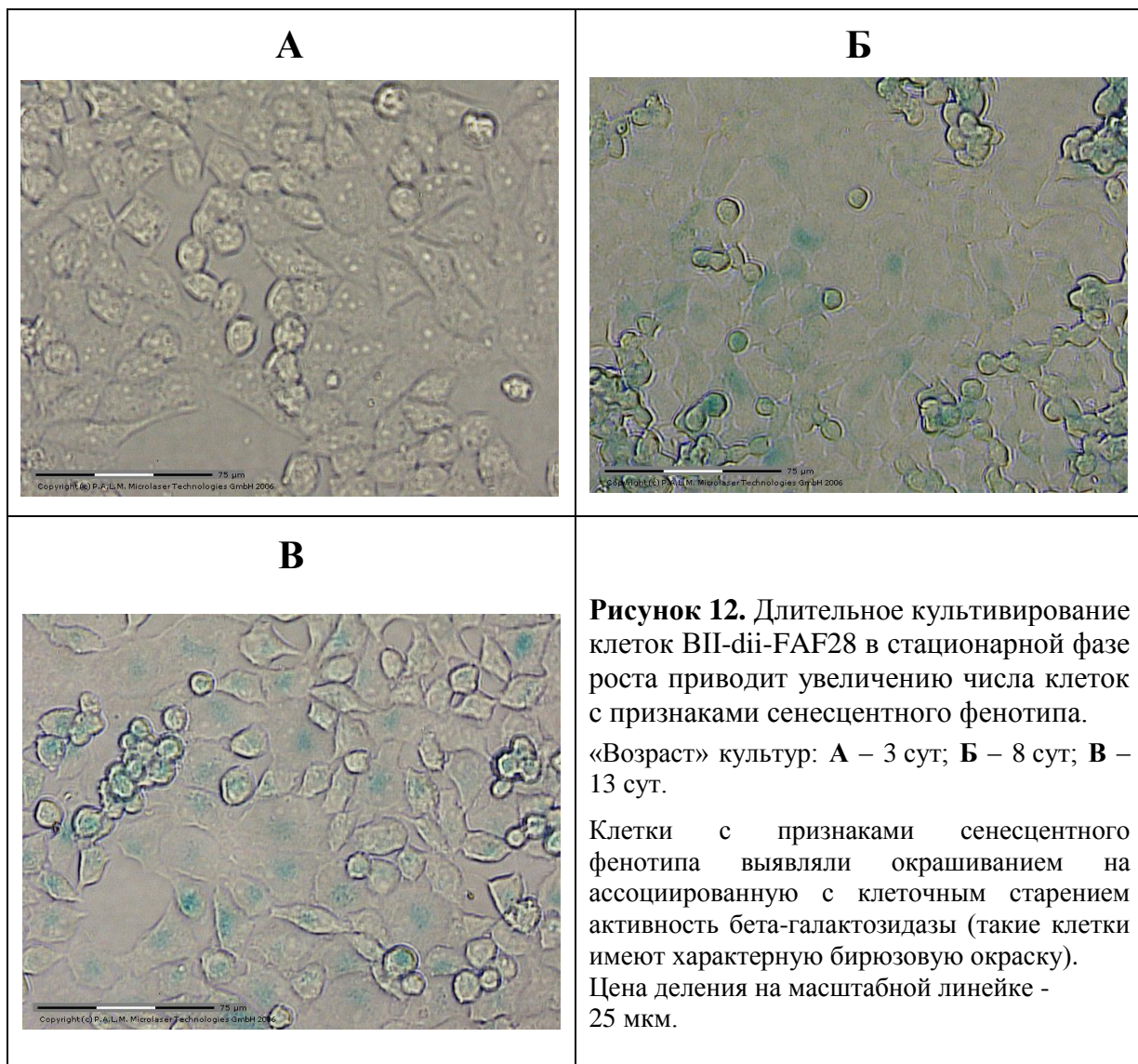
Увеличение  $\times 160$ .

Стоит также обратить внимание на то, что молодые и старые клетки ВП-dii-FAF28 существенно различаются по способности восстанавливать тетразолий бромид (МТТ). Из представленных на **рисунке 11** снимков видно, что далеко не все клетки (вне зависимости от «возраста») образуют кристаллы формазана и что образующиеся скопления кристаллов формазана весьма различаются по размерам. При этом в культуре «молодых» клеток скопления кристаллов более редкие, чем в культуре «старых» клеток, но более крупные, что вероятно указывает на различную активность ферментов, восстанавливающих МТТ в клетках разного «возраста». Это может приводить к ложным результатам. В силу такой неоднозначности метод МТТ следует применять только в дополнение к морфометрическим методам. В данном исследовании метод МТТ не дал дополнительной информации о динамике «возрастных» изменений в культивируемых клетках ВП-dii-FAF28, хотя и подтвердил выводы, полученные с использованием морфометрического анализа.

### **3.2.3. Накопление в культуре клеток со сенесцентным фенотипом**

Ассоциированная со старением активность  $\beta$ -галактозидазы (senescence-associated beta-galactosidase activity; SA- $\beta$ -Gal) – классический маркер старения клеток, поэтому важно было выяснить, как изменяется этот показатель в клетках в рамках используемой нами модели старения.

Клетки ВП-dii-FAF28 достигали состояния монослоя (около 50000 клеток/см<sup>2</sup>) через 3-5 сут культивирования (рис. 12А). Показали, что в молодых культурах (3 сут после посева, субконфлюэнтное состояние культуры) клетки хорошо «распластаны», т.е. имеют большую площадь контакта с субстратом. При этом в культуре не обнаруживаются клетки, окрашенные на SA- $\beta$ -Gal. На 6-8 сут культура достигает состояния конфлюэнтности, формируются многослойные структуры клеток, причем клетки нижнего слоя по-прежнему сохраняют большую степень «распластанности», тогда как клетки во втором слое характеризуются округлой формой и сравнительно небольшой площадью контакта с поверхностью роста. При этом как в нижнем слое клеток, так и в расположенных выше слоях (в многослойных «островках») обнаруживаются клетки, проявляющие повышенную активность SA- $\beta$ -Gal. Особенно много таких клеток в области бислоя, что, возможно, связано с большей уязвимостью этих клеток к действию внешних факторов (ухудшение состояния среды) вследствие недостаточного контакта с субстратом, что может влиять (через рецепторы адгезии) на активацию различных внутриклеточных сигнальных путей и изменение экспрессии генов, ответственных за поддержание жизнеспособности клетки (**рис. 12**).



Через 10-13-е сут культивирования степень «распластанности» клеток снижается, в контактирующем с субстратом слое появляются «проплешины» - свободные от клеток участки поверхности, образующиеся в результате открепления клеток от субстрата и уменьшения площади контакта клеток с субстратом. При этом многие клетки «сморщиваются» и приобретают округлую форму, что свидетельствует об ухудшении их контакта с субстратом. Окрашенные на SA-β-Gal клетки обнаруживаются как, в нижнем слое, так и в расположенных выше слоях (в многослойных структурах) (**рис. 12В**).

При этом SA-β-Gal-положительных клеток становится значительно больше, чем в 8-суточных культурах и, что характерно, практически все клетки в многослойных структурах, расположенные выше нижнего слоя, демонстрируют высокую активность SA-β-Gal.

Таким образом, можно предположить, что в стационарной культуре клеток ВП-dii-FAF28 действительно наблюдается развитие процессов, связанных с клеточным старением, а не только деструкция трансформированных клеток, вызванная контактным торможением.

В организме, как и в «стационарно стареющих» клетках, ограничение пролиферации является, как мы уже отмечали, не причиной гибели клетки, а лишь триггером накопления различного рода повреждений. Видимо, основополагающую роль в старении играет накопление нерепарированных повреждений ДНК, которое, как было показано, имеет место в первую очередь в неделящихся клетках [9]. Повреждения могут быть самыми разнообразными: сшивки ДНК-белок, депуринизация, замена одного основания другим, глобальное деметилирование и т.д. [7]. Одним из наиболее тяжелых повреждений являются разрывы (nicks) нитей ДНК. Ферменты репарации хуже работают в старых клетках, чем в молодых, что приводит к нарушениям структуры и, соответственно, к ухудшению функционального состояния ДНК. Например, известная клеточная линия HeLa поддерживается в сотнях лабораторий в течение более чем 60 лет. Тем не менее, когда рост такой культуры ограничен определенными физиологическими средствами (не вызывающими гибель клеток), различные дефекты на различных структурных и функциональных уровнях начинают накапливаться в клетках, и вероятность их смерти увеличивается; т.е. клетки стареют в истинном смысле [8, 237, 238, 266, 268-270]. В то же время, в связи с теорией надежности, следует учитывать, что стареющий многоклеточный организм не обязательно должен состоять из стареющих клеток: клетки могут просто погибнуть «по экспоненте» (то есть без старения), как в случае радиоактивного распада.

Кроме того, многочисленные эксперименты свидетельствуют, что изменения в клетках, происходящие в нашей модельной системе, действительно похожи на таковые в клетках стареющих многоклеточных организмов. Они включают в себя накопление одонитевых разрывов ДНК и ДНК-белковых сшивок, деметилирование ДНК, изменение в уровне спонтанных сестринских хроматидных обменов, структурные дефекты в ядре клетки, изменения в плазматической мембране, замедление митоген-стимулированной пролиферации, ухудшение колониеобразующей способности, изменение деалкилазной активности цитохрома P-450, накопление 8-оксо-2'-дезоксигуанозина (известный биомаркер старения) в ДНК, увеличение количества клеток, окрашивающихся на ассоциированную со старением бета-галактозидазу (наиболее популярный биомаркер клеточного старения), снижение поли(ADP-рибозил)ирования белков хроматина и т.д. [8, 237, 239, 243, 266]. Важным достоинством данной модели является также то, что в клетках стационарных культур могут быть выявлены в течение относительно короткого времени:



как правило, в течение двух недель после начала эксперимента. Результаты, полученные в продольных и поперечных исследованиях, представляются очень сходными (ведь в трансформированной клеточной культуре нет секулярных трендов, как в человеческой популяции), за исключением того, что один подход направлен на исключение влияния микроразличий в посеве и «качестве» клеток, а другой - на устранение возможного разброса между экспериментами.

Следует подчеркнуть, что такие эксперименты могут быть выполнены с клетками различного происхождения, в том числе бактериями [271], дрожжами (в настоящее время наиболее широко используемых в экспериментах по «стационарному старению»), растительных клетками, микоплазмами и др. Кстати, аналогичные результаты были получены даже на суспензионных культурах *Acholeplasma laidlawii* [272], и наши предыдущие эксперименты с микоплазмой показали, что ее «стационарное старение» может быть успешно замедлено с помощью геропротектора антиоксиданта хлоргидрата 2-этил-6-метил-3-гидрокси-пиридина [243]. Это обеспечивает основу для эволюционного подхода к анализу экспериментальных результатов [237, 239].

### **3.3. Влияние «возраста» кондиционированной культуральной среды на развитие характерных для старения клетки признаков**

При написании раздела использованы статьи автора диссертации: [Shram S.I., Shilovsky G.A., Khokhlov A.N. 2006. Poly(ADP-ribose)-polymerase-1 and aging: experimental study of possible relationship on stationary cell cultures // Bull. Exp. Biol. Med. Vol. 141. № 5, P. 628-632].

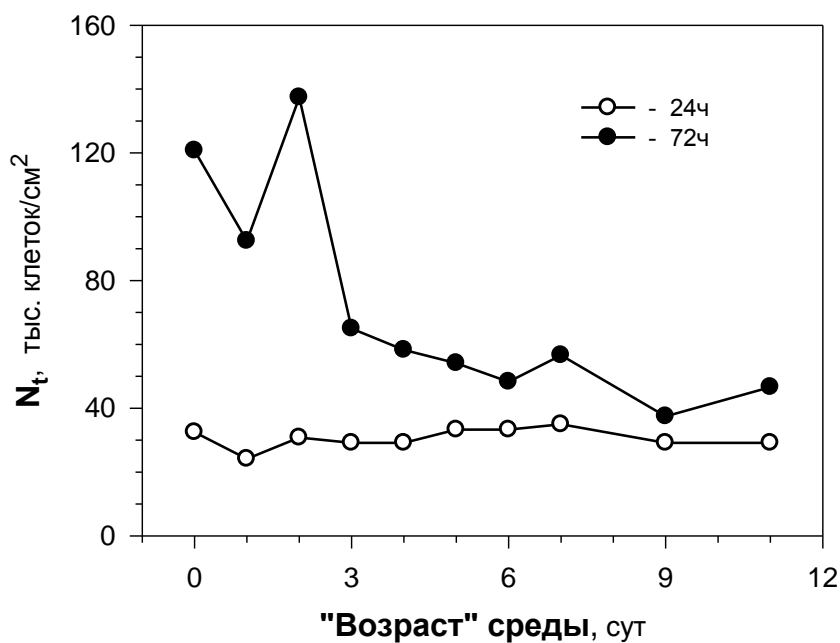
В культурах клеток с неограниченным пролиферативным потенциалом, рост которых прекращен по достижению монослоя за счет контактного торможения, имеет место «стационарное» старение, изменяется клеточная морфология и жизнеспособность (см. выше). Такие исследования мы проводили без замен культуральной среды, так как в противном случае произошла бы активация пролиферации и в стареющей культуре появятся «молодые» клетки.

#### **3.3.1. Влияние «возраста» среды на пролиферацию клеток ВП-dii-FAF28**

При написании раздела использованы статьи автора диссертации: [Хохлов А.Н., Прохоров Л.Ю., Акимов С.С., Шиловский Г.А., Щеглова М.В., Сорока А.Е. 2005. «Стационарное старение» клеточных культур: попытка оценки влияния «возраста» среды // Цитология. Т. 47. № 4. С. 318-322].

Потребовалось проведение дополнительных экспериментов, чтобы выяснить, насколько влияет «возраст» среды на «молодые» клетки, а именно на их способность к

репликативному синтезу ДНК, то есть на подготовку к делению. Для этого в «молодых» (3 сут после последнего пересева) клетки ВП-dii-FAF28 заменяли «молодую» культуральную среду на среду определенного «возраста» (полученную из 3-11-суточных клеточных культур) и через 22 ч определяли плотность клеток и индекс мечения, подсчитывая их среднее число в поле зрения микроскопа.

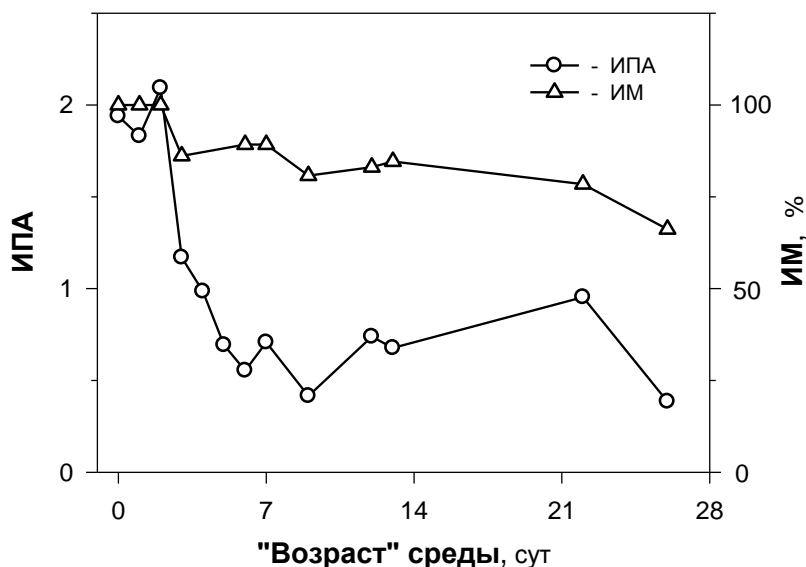


**Рисунок 13.** Влияние «возраста» среды на рост клеток ВП-dii-FAF28 в культуре.

$N_t$  – общее число клеток на  $1\text{cm}^2$  поверхности роста (плотность культуры).  $N_t$  определяли через 24 ч и 72 ч после посева. Клетки высевали из расчета -  $26,6 \times 10^3$  клеток/ $\text{cm}^2$ .

На **рисунке 13** представлены результаты, описывающие зависимость плотности культур клеток ВП-dii-FAF28 на покровных стеклах от «возраста» культуральной среды. Можно видеть, что через 24 ч роста этот показатель практически одинаков для всех тестируемых сред. На первые сутки после посева исследуемые клетки, как правило, находятся в лаг-фазе роста и даже в свежей среде (нулевая точка на **рис. 13**) практически не делятся. Однако через 72 ч после посева уже отчетливо видна общая тенденция к снижению скорости роста клеток с увеличением «возраста» культуральной среды. Резкое возрастание плотности клеточной культуры, растущей на 3-суточной среде, связано, по-видимому, не только с упомянутыми вариациями в количестве посеянных клеток, но и с известным фактом кондиционирования ростовой среды в первые сутки культивирования, то есть обогащения ее различными ростовыми факторами. Наиболее важным выводом из этих данных нам представляется то, что клетки, хотя и медленно, но все-таки продолжают расти даже на самой «старой» из протестированных сред.





**Рисунок 14.** Влияние «возраста» среды на индекс пролиферативной активности (ИПА) и индекс мечения клеток тимидином (ИМ) в культуре «молодых» (3 сут после последнего посева) клеток BII-dii-FAF28.

На **рисунке 14** представлена зависимость показателя ИПА (см. раздел «Материалы и методы») от «возраста» культуральной среды. Этот показатель представляет собой среднее число делений клеток изученной популяции за 48 ч (от 24-го до 72-го часа культивирования). Чем больше данный показатель, тем больше средняя скорость размножения клеток за выбранный период времени. При этом необходимо подчеркнуть, что речь идет именно о средней скорости, так как некоторые клетки могли совсем не делиться, а другие - размножаться в максимально возможном темпе. Используя показатель ИПА, мы убираем влияние фактора плотности посева, получая «чистый» показатель скорости роста клеточной культуры. Из данных, представленных на **рисунках 13** и **14** следует, что величина пролиферативной активности с «возрастом» среды катастрофически снижается со 2-ых по 5-ые сутки культивирования, а далее в течение длительного периода (с 5 по 23 сут) - практически не изменяется. Таким образом, даже в «старых» (23-26-суточных) культурах клеток BII-dii-FAF28 среда роста, которую не заменяли с момента посева клеток, сохраняла способность стимулировать пролиферативную и митотическую активность клеток

### 3.3.2. Влияние «возраста» среды на репликативный синтез ДНК

Также анализировали влияние «возраста» среды на синтез клетками ДНК, по включению [<sup>3</sup>H] тимидина в течение 24 ч инкубации. Расчет показателя ИМ клеток выявил постепенное и не сильное (с 2,1 до 1,5) снижение этого показателя с «возрастом» культуральной среды (**рис. 14**). Это означает, что даже в самой «старой» среде

значительная часть клеток (около 70%) оказывается способной к плановому синтезу ДНК, т. е. попадает в S-фазу клеточного цикла в период инкубации клеток с меченым тимидином. Конечно, гипотетически можно предположить, что «старая» среда вызывает очень интенсивное повреждение ядерной ДНК изучаемых «молодых» клеток и индуцирует таким образом протекающий на очень высоком уровне внеплановой синтез ДНК, однако это предположение представляется нам очень маловероятным, так как использованный радиоавтографический метод как раз и позволяет выделить главным образом популяцию тех клеток, которые включают [<sup>3</sup>H] тимидин во вновь синтезированную ДНК, не учитывая клеток, включающих предшественник во время репарационных процессов.

Мы выявили хорошую корреляцию между значениями ИПА и ИМ в данном исследовании с увеличением «возраста» культуральной среды ( $r = 0,85$ ), что вполне закономерно, так как эти показатели характеризуют схожие функциональные свойства клеток. Нам представляется, что в «старой» среде больше клеток задерживается в фазе G2 клеточного цикла из-за возможного влияния некоторого(ых) ингибитора(ов) клеточной пролиферации, накопившегося(шихся) в этой среде [273, 274]. Однако далеко не полностью истощенная среда, тем не менее, позволяет значительной части клеток входить в S-фазу и синтезировать новую ДНК, что и приводит к довольно высокому ИМ даже для клеток, растущих в самой «старой» среде. Также было сделано предположение, что высокий ИМ «молодых» клеток, растущих на «старых» средах, можно также объяснить удлинением клеточного цикла за счет увеличения как абсолютной, так и относительной длительности S-фазы. Такая возможность упоминается, в частности, в работе Хана и соавторов [275], в которой было показано, что те клетки китайского хомячка линии HA2, которые продолжают размножаться в стационарной стадии роста, имеют удлинённый клеточный цикл, причем это удлинение связано с увеличением длительности S-фазы и фазы G<sub>2</sub>. К такому заключению исследователи пришли на основании экспериментов с импульсным мечением клеток [<sup>3</sup>H]-тимидином.

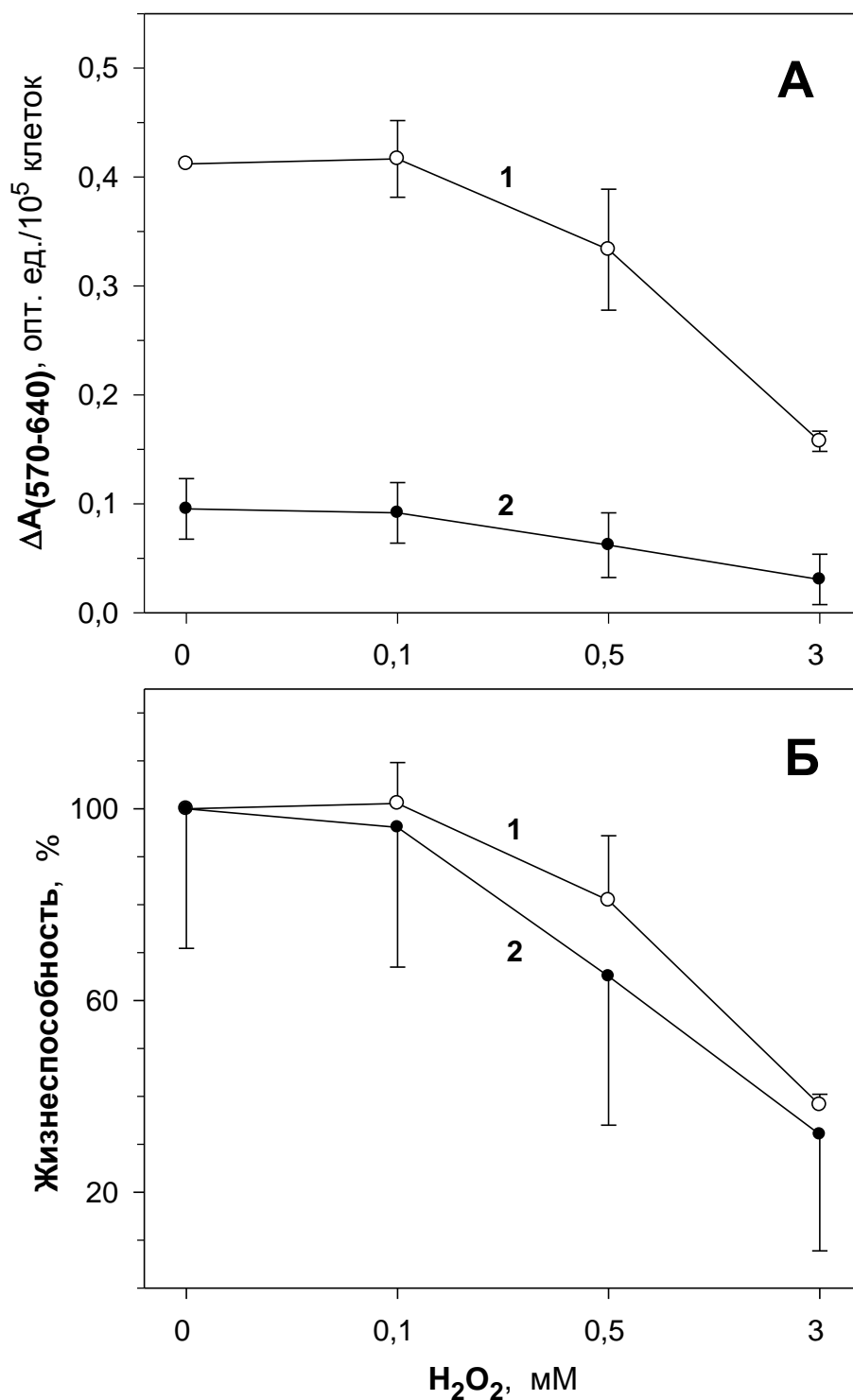
#### **3.4. Влияние окислительного стресса на жизнеспособность клеток ВП-dii-FAF28 разного «возраста»**

Как было сказано выше (см. разделы 1.4 и 1.5), повреждение ДНК и снижение с возрастом способности реагировать на него лежат в основе многих теорий старения начиная с теории Хармана [2, 9, 236-238, 259]. Основной причиной увеличения числа повреждений ДНК при физиологическом старении, а также при ряде патологий связано с хроническим окислительным стрессом. В тоже время известно, что в патогенезе многих

возрастных заболеваний (сердечно-сосудистые патологии, инфаркты мозга и др.) важную роль играет острый окислительный стресс, вызываемый, например ишемией/реперфузией ткани. Окислительный стресс возникает из-за дисбаланса эндогенно вырабатываемых в клетке окислителей и антиоксидантов, точнее избыточным образованием окислителей и/или истощением уровня антиоксидантов [276]. АФК, особенно супероксид и гидроксильный радикал, и высокоэнергетические окислители, такие, как пероксинитрит, являются основными медиаторами повреждения или дисфункции клеточных компонентов. Они вызывают химическую модификацию различных биомолекул, в частности - однонитевые разрывы в ДНК, что в свою очередь приводит к активации PARP. В зависимости от силы и длительности такого генотоксического стресса, а также состояния антистрессорных систем в клетках, подвергшихся воздействию, может реализоваться один из следующих сценариев клеточной «судьбы»: репарация ДНК и выживание, гибель по одному и даже нескольким механизмам, трансформация в сенесцентную клетку.

В этой связи интересно было выяснить, отличаются ли «молодые» и «старые» клетки VII-dii-FAF28, полученные с использованием описанного выше подхода («стационарное старение» клеток в культуре), по чувствительности к действию генотоксического стресса различной силы.

Изучали влияние 30-минутной аппликации пероксида водорода (концентрации 0; 1; 0,5 и 3 мМ) на жизнеспособность «молодых» (4-суточные культуры) и «старых» (12-суточные культуры) клеток. Для индукции окислительного стресса клетки помещали в среду без сыворотки, вносили свежеприготовленный раствор  $H_2O_2$  до заданной концентрации и инкубировали в течение 30 мин в атмосфере 5%  $CO_2$  при 37 С. Затем заменяли среду с  $H_2O_2$  на среду, содержащую 10% сыворотки, и культивировали в течение 24 ч. Как было показано ранее (раздел 3.2) и как видно из представленных на **рисунке 15А** данных, культура «старых» клеток характеризуется существенно меньшей жизнеспособностью, по сравнению с культурой «молодых» клеток при одинаковой плотности посева клеток за 24 ч до проведения анализа. Временная инкубация культур в присутствие пероксида водорода вызывала дозозависимое снижение жизнеспособности, как в «молодых», так и в «старых» клетках. При этом при нормировании показателя жизнеспособности культур в отсутствие  $H_2O_2$  (принимали эти значения за 100%) не наблюдали существенных различий в зависимости выживаемости культур от концентрации  $H_2O_2$  (**рис. 15Б**). Таким образом, несмотря на исходно сниженную жизнеспособность, «старые» клетки сохраняют устойчивость к повреждающим агентам и окислительному стрессу, свойственную «молодым» клеткам (**рис. 15**).



**Рисунок 15.** Влияние пероксида водорода на жизнеспособность клеток VII-dii-FAF28 в стационарных культурах разного «возраста».

**А.** - Жизнеспособность клеток, выраженная в абсолютных единицах; **Б.** - Жизнеспособность клеток, выраженная в % от контроля (инкубация без H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

«Молодые» (1; получены из 4-суточных культур) и «старые» (2; получены из 12-суточных культур) клетки высевали в 24-луночный планшет с плотностью  $100 \times 10^3$  клеток/см<sup>2</sup> (в расчет брали только клетки, не окрашиваемые красителем трипановым синим) (морфометрия) на лунку и через 24 ч проводили анализ жизнеспособности с использованием МТТ-теста (денситометрия).

Известно, что индукция окислительного стресса неизбежно приводит к активации PARP. В свою очередь умеренная или сильная активация PARP приводят к расходованию значительного количества NAD<sup>+</sup>, что вызывает снижение его концентрации, а также концентрации АТФ, расходуемой в реакции ресинтеза NAD<sup>+</sup>. Можно предположить, что это может привести и к снижению восстановленных форм никотинамиддинуклеотидов (НАД(Ф)Н), расходуемых в реакции восстановления МТТ в соли тетразолия. В литературе имеется ряд сведений о влиянии ингибиторов PARP на выживаемость клеток в условиях окислительного стресса, инициированного гидропероксидом водорода. Ингибирование PARP в клетках пигментного эпителия сетчатки глаза (RPE) приводит к снижению способности клеток репарировать вызванные пероксидом водорода (1,5 мМ, 2 ч) повреждения ДНК, а также - к снижению жизнеспособности, определяемой методом МТТ [277]. В тоже время антиоксидант - миметик супероксиддисмутазы, 4-гидрокси-ТЕМРО (ТЕМРОL), предотвращал или снижал вызванные H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,05 и 0,5 мМ, 3 ч) ингибирование клеточного роста, блеббинг мембраны, снижение уровня NAD<sup>+</sup>, активацию PARP, и ограничивал индукцию однонитевых разрывов ДНК, вызываемых H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в культуре эпителиальных клеток хрусталика [278]. В культуре клеток глиомы человека A172 было показано, что H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5 мМ, 2 ч) вызывает снижения уровня АТФ более чем в 20 раз по сравнению с контролем [279]. Ингибитор PARP 3-AB защищал нейроны от окислительного стресса [280] и предотвращал падение уровня АТФ в клетках человеческой глиомы A172 [279]. При индукции окислительного стресса в нейрональных клетках РС12 путем внесения 0,5 или 1 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> количество клеток с поврежденной мембраной (что выявлялось окрашиванием йодидом пропидия и трипановым синим) через 90 мин после стресса было не более 10%, и лишь через 4 ч количество клеток с поврежденной мембраной достигало 25-40% [281]. Таким образом, из литературных данных видно, что метод МТТ выявляет нежизнеспособные клетки на более ранних этапах реализации программы клеточной гибели по сравнению с методом окрашивания трипановым синим, при этом расход «энергетических молекул» может быть большим (как в случае некроза, выявляемого трипановым синим), но клетки при этом могут еще сохранять целостную мембрану. Из этого можно сделать вывод, что МТТ-тест в первую очередь чувствителен к энергетическому статусу клетки.

В наших экспериментах пероксид водорода вызывал дозозависимое снижение жизнеспособности как в «молодых», так и в «старых» клетках (**рис. 15**). При этом соотношение измеряемых с помощью МТТ показателей жизнеспособности для клеток разного «возраста» остается сходным (приблизительно 1:5) при всех рассмотренных концентрациях пероксида водорода (**рис. 15**). Мы сделали предположение, что в культуре

«старых» клеток сохраняется определенный процент клеток, чей энергетический статус и, соответственно, жизнеспособность, сходна с таковой у «молодых» клеток. Таким образом, несмотря на в среднем более низкую жизнеспособность (число окрашиваемых МТТ клеток снижено), «старые» культуры содержат небольшую популяцию клеток, проявляющих такую же жизнеспособность и чувствительность к окислительному стрессу как и культуры «молодых» клеток. Причем можно допустить, что МТТ окрашивается только эта популяция клеток. Так, например, в противоположность однозначности окраски клеток трипановым синим, когда ясно, окрасилась клетка или нет, жизнеспособна ли она по данному критерию, результаты МТТ-теста, хоть и сходны по динамике изменения, но, тем не менее, далеко не так однозначны. На рисунке 11 видно, что далеко не все клетки (вне зависимости от «возраста») образуют кристаллы формазана. Образующиеся же кристаллы весьма различны по форме (рисунки 10 и 11) из чего следует, что энергетический статус клетки зависит не только от «возраста» культуры.

### **3.5. Временная динамика показателей активности поли(ADP-рибоза)-полимераз при «стационарном старении» клеток ВП-dii-FAF28**

При написании раздела использованы статьи автора диссертации: [Шрам С.И., Рыбакова И.Г., Лазуркина Т.Ю., Сидоров Г.В., Шиловский Г.А., Хохлов А.Н., Мясоедов Н.Ф. 1999. Ферментативный синтез селективно меченного тритием по аденину  $^3\text{H-NAD}^+$  и его использование для определения активности поли(ADP-рибоза)-полимеразы // Прикл. биохим. микробиол. Т. 35. № 6. С. 638-646].

#### **3.5.1. Оптимизация метода измерения активности поли(ADP-рибоза)-полимераз в пермеабелизованных клетках ВП-dii-FAF28**

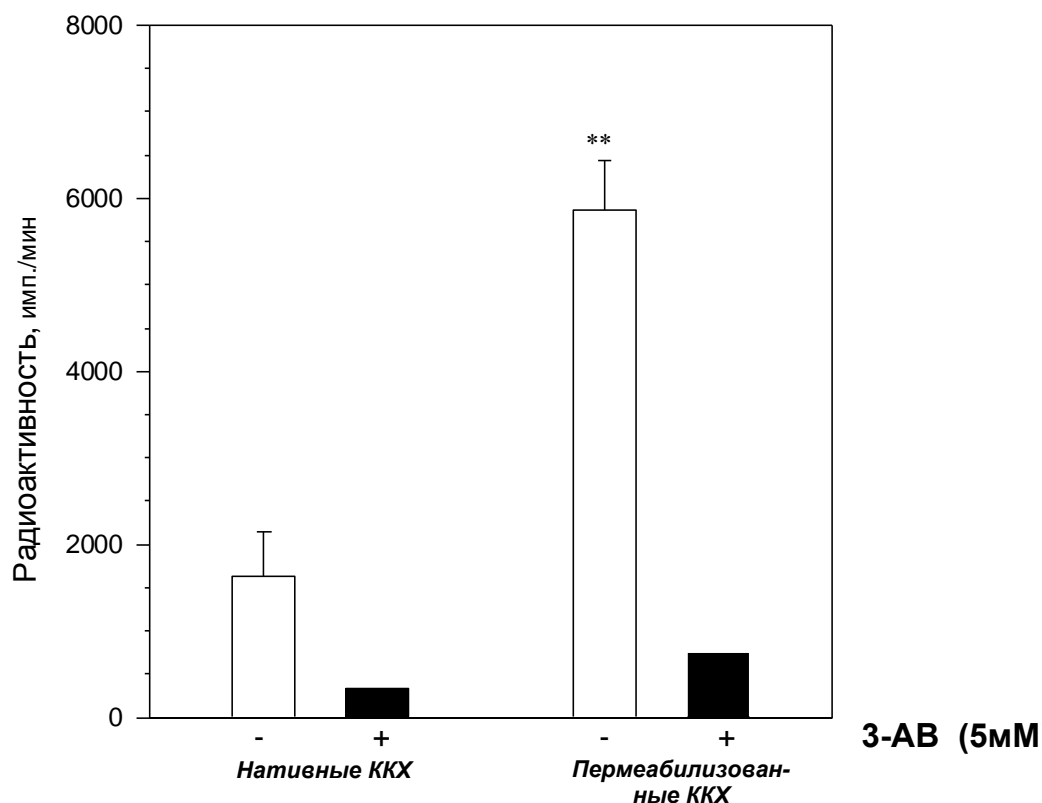
Исходя из анализа литературы в большинстве случаев для определения активности PARP в клетках использовался радиометрический метод анализа, основанный на определении количества включенных в белки радиоактивно меченных остатков ADP-рибозы (например, см. [73, 282]). Общую поли(ADP-рибоза)-полимеразную активность в клетках высших эукариот определяют два белка – PARP-1 и PARP-2. Известно, что связывание этих белков с ДНК в местах, содержащих определенные нарушения ее структуры, приводит к многократному увеличению их каталитической активности [283]. В норме уровень разрывов ДНК в клетке таков, что лишь небольшая доля PARP (в основном PARP-1) связана с ДНК, основная же часть этих белков находится в свободном состоянии. Поэтому для определения активности всего клеточного пула PARP (т.е. общей активности PARP) необходимо создать условия насыщения фермента разрывами ДНК. Обычно для этого используют обработку пермеабелизованных клеток или выделенных

ядер ДНКазой I, или воздействием гамма-излучения, или внесением коротких двухцепочечных олигонуклеотидов, или фрагментированной нативной ДНК. К сожалению, во многих работах ошибочно используют термин «активность PARP» и в тех случаях, когда такого искусственного насыщения фермента разрывами ДНК не производится. Понятно, что в этой ситуации, по сути, измеряется активность только того пула PARP, который связан с разрывами ДНК.

Мы предложили подразделять все приводимые в литературе данные, касающиеся определения активности PARP, на две группы, которые мы обозначили следующими терминами: «стимулированная активность PARP» (СА), она отражает интенсивность реакции поли(ADP-рибозил)ирования в клетке, оцениваемую в условиях искусственной стимуляции PARP повреждениями ДНК (или олигонуклеотидами), и «нестимулированная активность PARP» (НСА), она отражает интенсивность реакции поли(ADP-рибозил)ирования, оцениваемую в условиях отсутствия искусственной стимуляции PARP разрывами ДНК (или олигонуклеотидами). В последнем случае в условиях избытка PARP такая активность будет лимитирована количеством разрывов ДНК.

С нашей точки зрения наиболее аккуратный способ определения СА PARP был предложен в работах группы Бюркле [14, 194, 284]. В этих работах для полной активации PARP к пермеабелизованным клеткам вносили короткие двухцепочечные олигонуклеотиды и NAD<sup>+</sup>. Авторами было показано, что таким образом достигается полная активация PARP, и что в данном случае можно говорить об определении «максимальной активности PARP», или «истинной» активности PARP, определяемой в условиях насыщения фермента субстратами и активатором. Следует, однако, отметить, что, несмотря на кажущуюся очевидность в необходимости использования именно такого подхода, он довольно редко применялся в геронтологических экспериментах. Кроме того, предложенная Грюбе и Бюркле методика, позволяющая обойти упомянутые «подводные камни», была разработана для экспериментов, проводимых на лейкоцитах крови *ex vivo* [14, 284]. Для этого нами был адаптирован описанный ранее радиометрический метод анализа активности PARP для пермеабелизованных лейкоцитов периферической крови, основанный на определении количества включенных в белки радиоактивно меченных остатков ADP-рибозы [14, 284]. В рамках данного исследования были определены оптимальные условия для проведения анализа НСА и СА в пермеабелизованных клетках ВПд-ii-FAF28. В рамках этих исследований необходимо было определить оптимальные условия для проведения анализа активности PARP: концентрации NAD<sup>+</sup> (субстрата PARP) и дезоксиолигонуклеотида (активатор синтеза PAR), а также времени инкубации. Также необходимо было оценить активность ферментов, гидролизующих

PAR, так как при относительно высокой активности этих ферментов может происходить «занижение» определяемых значений активности PARP. Наконец с использованием селективного ингибитора PARP определяли долю PAR в образующемся в ходе инкубации клеток с [<sup>3</sup>H-Ade] NAD<sup>+</sup> высокомолекулярном радиоактивномеченном продукте.



**Рисунок 16.** Синтез радиоактивномеченной поли(ADP-рибозы) в нативных и пермеабиллизованных клетках китайского хомячка ВП-dii-FAF28.

«Пустые» столбики – СА без ингибитора, «темные» - в присутствии ингибитора PARP 3-AB. Условия реакции: объем реакционной смеси – 100 мкл; концентрация клеток – 10 млн/мл, концентрация олигонуклеотидов - 50 мкг/мл, концентрации NAD - 333 мкМ, время инкубации - 15 мин. \*\*  $p < 0,01$  по сравнению с нативными клетками ВП-dii-FAF28.

Пермеабиллизацию клеток (изменение проницаемости клеточной мембраны) проводили при помощи осмотического шока - 15-минутной инкубацией клеток в гипотоническом буфере для пермеабиллизации (10 мМ Tris-HCl, 1 мМ ЭДТА, 4 мМ MgCl<sub>2</sub>, 30 мМ β-меркаптоэтанол; pH 7,8). При этом за счет осмотического давления на клетки происходило перемещение жидкости из раствора в клетку.

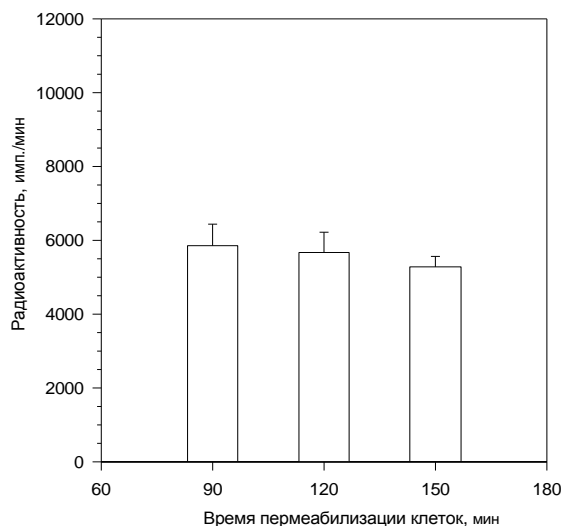
Сравнивали способность нативных и пермеабиллизованных клеток к образованию высокомолекулярных радиоактивномеченных продуктов, образующихся при инкубации



суспензии клеток с [ $^3\text{H-Ade}$ ] NAD $^+$  в присутствии двухцепочечных дезоксиолигонуклеотидов, длиной 10 пар оснований. Показали, что в пермеабелизованных клетках образуется более чем в 3 раза больше радиоактивномеченных продуктов, чем в нативных клетках, что может объясняться большей проницаемостью пермеабелизованных клеток для меченого NAD $^+$  и олигонуклеотидов (**рис. 16**). Инкубация клеток в присутствии низкомолекулярного ингибитора PARP, 3-AB (5 мМ), приводила к 5- и 8-кратному снижению количества образующихся радиоактивномеченных продуктов в нативных и пермеабелизованных клетках, соответственно. При этом неспецифический уровень радиоактивности (сорбция меченого NAD $^+$  на клетках и поверхности пробирки), который определяли в контрольных образцах (остановка реакции сразу после внесения меченого NAD $^+$ ) не превышал 140 импульсов/мин, что соответствовало значениям фоновой радиоактивности контрольных образцов, не содержащих меченый NAD $^+$ .

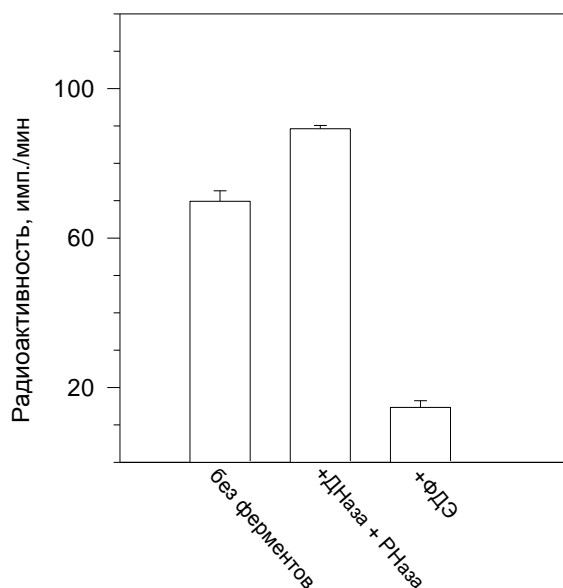
Изучали влияние времени пермеабелизации клеток на стабильность ферментативной активности PARP (**рис. 17**). Оказалось, что сколь-нибудь заметное снижение активности PARP в клетке наблюдается лишь через два с половиной часа после начала пермеабелизации. В дальнейшем анализ активности PARP (стандартные условия) проводился через 90 мин после пермеабелизации клеток.

Для подтверждения того, что анализируемые радиоактивномеченные продукты, содержащиеся в ТХУ-осадке, представляют собой поли(ADP-рибозу), после истечения времени инкубации в реакционную смесь вносили ингибитор PARP (3-AB), а затем - ферменты, вызывающие деградацию ДНК и РНК (РНКазу и ДНКазу), или PAR (фосфодиэстеразу змеиного яда – ФДЭ; 2,5 мг/мл). После инкубации (1ч; 30°C) в присутствии указанных ферментов анализировали содержание в ТХУ-осадке радиоактивных продуктов. Показано, что обработка РНКазой и ДНКазой не только не приводит к снижению, но даже несколько увеличивает радиоактивность образующихся высокомолекулярных продуктов, что может быть обусловлено более высоким неспецифическим связыванием меченого NAD $^+$  по сравнению с контрольным образцом. Следовательно, меченые тритием остатки аденина, используемого в качестве субстрата NAD $^+$ , не включаются в РНК или ДНК. В то время как дополнительная обработка образцов ФДЭ, способной расщеплять PAR по фосфодиэфирным связям (раздел 1.1 и **рис. 1**), приводила к сильному снижению радиоактивности образующихся высокомолекулярных продуктов реакции (**рис. 18**).



**Рисунок 17.** Сохранение активности поли(ADP-рибоза)-полимераз в пермеабилзованных клетках ВП-dii-FAF28 при 0°C.

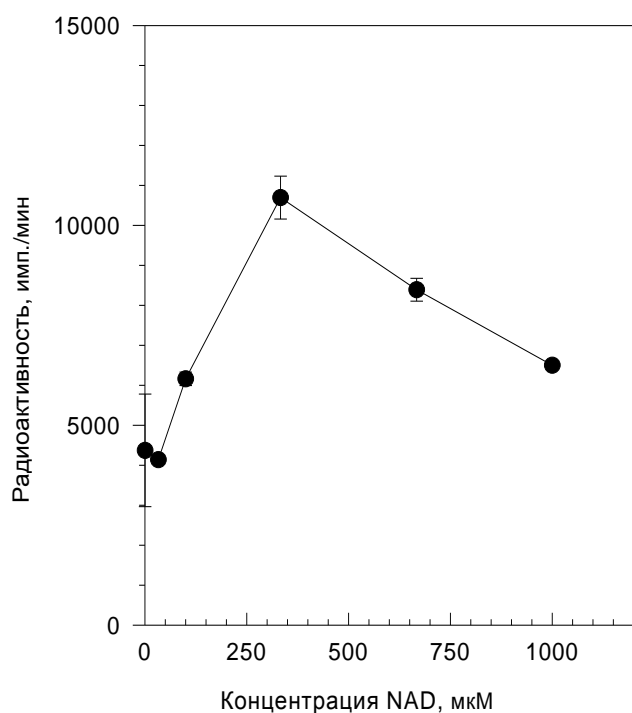
По оси ординат – радиоактивность поли(ADP-рибозы), накопившихся в реакционной смеси за время инкубации (15 мин). Условия реакции: объем реакционной смеси – 100 мкл; концентрация пермеабилзованных клеток – 10 млн/мл, концентрация двухцепочечного олигонуклеотида - 50 мкг/мл, концентрация NAD<sup>+</sup> - 333 мкМ, время инкубации - 15 мин.



**Рисунок 18.** Устойчивость радиоактивно меченных продуктов, содержащихся в ТХУ-осадке, к ферментам, расщепляющим ДНК, РНК и поли(ADP-рибозу).

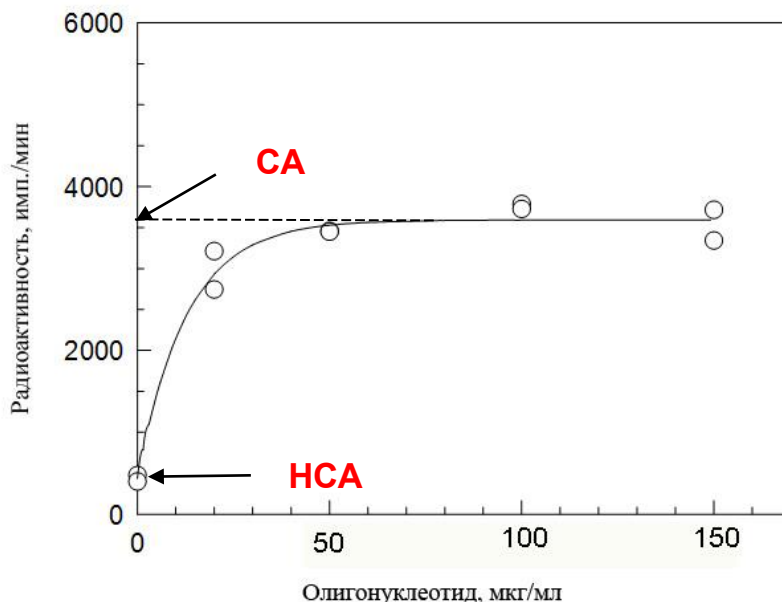
По оси ординат – радиоактивность поли(ADP-рибозы), накопившихся в реакционной смеси за время инкубации (15 мин). Условия реакции: объем реакционной смеси – 100 мкл; концентрация пермеабилзованных клеток – 10 млн/мл, концентрация двухцепочечного олигонуклеотида - 50 мкг/мл, концентрация NAD<sup>+</sup> - 333 мкМ, время инкубации - 15 мин.

Как отмечалось выше, при определении активности PARP требуется внесения в реакцию смесь помимо меченого тритием также и немеченого NAD<sup>+</sup>. Исследовали зависимость скорости синтеза радиоактивно меченного PAR пермеабиллизированными клетками ВП-dii-FAF28 от концентрации немеченого NAD<sup>+</sup> в условиях стимуляции PARP олигонуклеотидами (рис. 19). Выяснилось, что эта зависимость имеет вид кривой с максимумом, соответствующим концентрации NAD<sup>+</sup> равной 333 мкМ.



**Рисунок 19.** Влияние начальной концентрации NAD<sup>+</sup> на скорость синтеза поли(ADP-рибозы) в пермеабиллизированных клетках ВП-dii-FAF28 в присутствии двухцепочечного олигонуклеотида.

По оси ординат – радиоактивность поли(ADP-рибозы), накопившихся в реакционной смеси за время инкубации (15 мин). Условия реакции: объем реакционной смеси – 100 мкл; концентрация пермеабиллизированных клеток – 10 млн/мл, концентрация двухцепочечного олигонуклеотида - 50 мкг/мл, время инкубации - 15 мин.



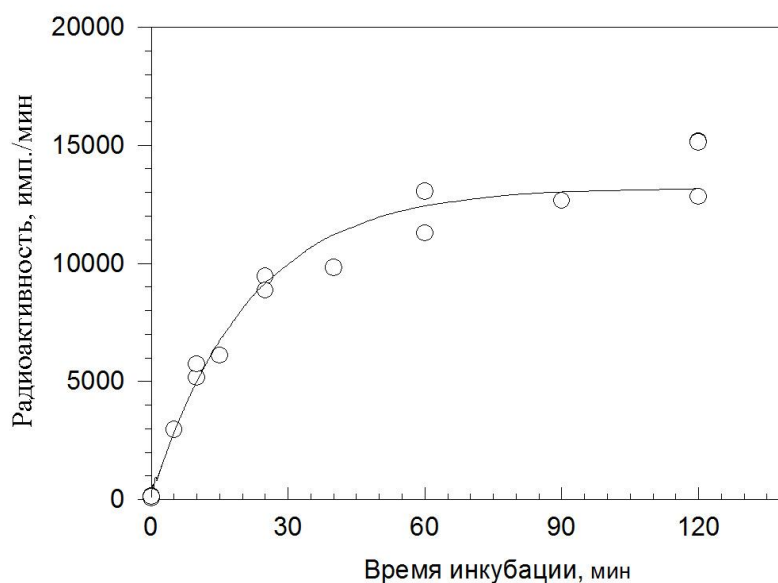
**Рисунок 20.** Стимуляция синтеза поли(ADP-рибозы) в пермеабелизированных клетках ВП-dii-FAF28 двухцепочечным дезоксиолигонуклеотидом CGGAATCCG.

По оси ординат – количество радиоактивно меченных полимеров (ADP-рибозы), накопившихся в пермеабелизированных клетках в течение стандартного времени инкубации (15 мин). CA и HCA – стимулированная (олигонуклеотидом) и нестимулированная активности PARP, соответственно.

Было также исследовано влияние на скорость реакции поли(ADP-рибозил)ирования концентрации добавляемых в реакцию смесь двунитевых дезоксиолигонуклеотидов, имитирующих разрывы ДНК (**рис. 20**). Полученная зависимость хорошо описывалась кривой с насыщением, достигающей максимума при концентрации олигонуклеотида 50 мкг/мл. Таким образом, при данных условиях для активации всего пула PARP концентрация декамерных палиндромных олигонуклеотидов должна быть не ниже 50 мкг/мл.

Накопление радиоактивно меченного PAR во времени, при инкубации клеток ВП-dii-FAF28 с меченым  $NAD^+$  в присутствии олигонуклеотидов, описывается типичной для ферментативных реакций зависимостью, имеющей линейный начальный участок и выход на плато при больших временах реакции (**рис. 20**). Максимальное накопление меченой PAR достигается только примерно через 120 мин инкубации. При этом можно наблюдать постепенное замедление скорости реакции во всем исследуемом диапазоне времени, начиная с 5 мин. Такой характер зависимости не может быть связан со снижением концентрации  $NAD^+$  или с нестабильностью PARP (см. выше). Данный феномен может быть объяснен процессом обратимой инактивации PARP вследствие его ауто-поли(ADP-рибозил)ирования [12, 43]. Хотя не стоит исключать и то, что в процессе реакции может уменьшаться количество доступных для PARP точек инициации синтеза PAR на белках, представляющих собой остатки Lys [28]. Наблюдаемый выход кинетической кривой на

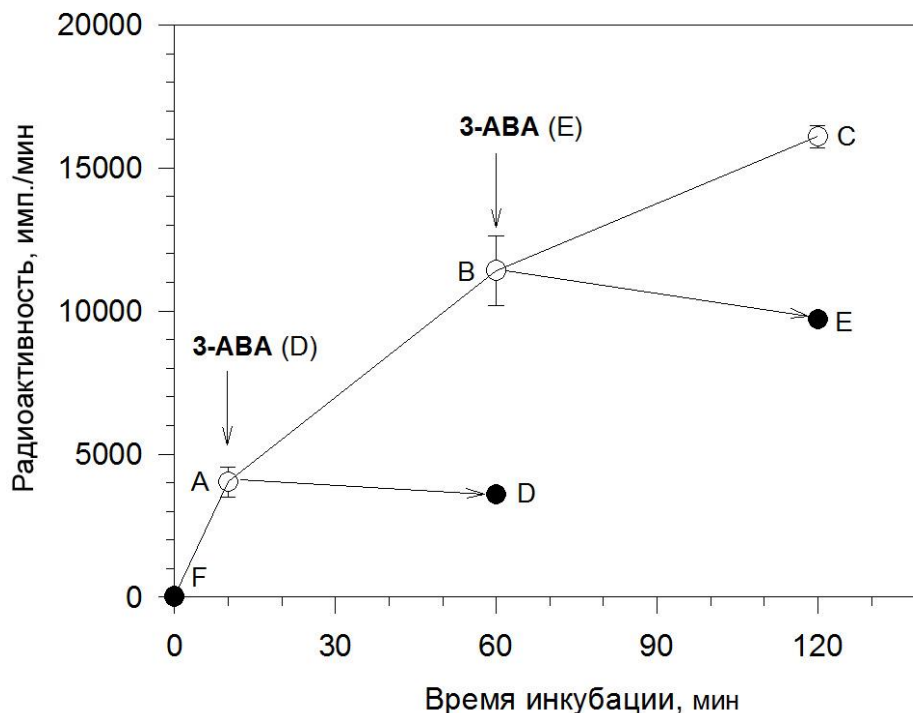
плато обусловлен полной инактивацией PARP в результате его аутомодификации и, возможно, истощением доступных сайтов для инициации синтеза PAR. (Хотя с учетом приведенных ниже данных можно говорить об установлении равновесия между скоростями образования и деградации PAR). При анализе активностей PARP было выбрано время инкубации 10 мин. Это позволяло, с одной стороны, минимизировать влияние эффекта инактивации PARP в ходе реакции (занижающего показатели активности PARP), а с другой – получать достаточно высокие значения радиоактивности в пробах, что положительно сказывалось на точности измерений.



**Рисунок 21.** Кинетика поли(ADP-рибоза)-полимеразной реакции в пермеабилizированных клетках VII-dii-FAF28 в условиях насыщения NAD<sup>+</sup> и полной активации поли(ADP-рибоза)-полимеразы двухцепочечным олигонуклеотидом.

По оси ординат – радиоактивность поли(ADP-рибозы), накопившихся в реакционной смеси за время инкубации (15 мин). Условия реакции: объем реакционной смеси – 100 мкл; концентрация пермеабилizированных клеток – 10 млн/мл, концентрация двухцепочечного олигонуклеотида - 50 мкг/мл, концентрации NAD - 333 мкМ

Расчет с использованием данных представленных на **рисунке 20**, показал, что при подобранных оптимальных условиях за 10 мин концентрация PAR в реакционной смеси достигает значения 325 пмоль, что примерно равно  $20 \times 10^6$  остатков ADP-рибозы на клетку. Таким образом, снижение концентрации NAD<sup>+</sup> за счет его израсходования на образование PAR является незначительным, и видимо никак не влияет на скорость реакции поли(ADP-рибозил)ирования. Также в ходе данной реакции в эквивалентных количествах образуется никотинамид (продукт реакции), который, как известно, способен ингибировать PARP. Однако эффективные концентрации, при которых он может вызывать сколь-нибудь существенное подавление активности PARP, лежат в области гораздо более высоких концентраций ( $IC_{50}=100$  мкМ; [285-287]).



**Рисунок 22.** Оценка активности ферментов деградации поли(ADP-рибозы) в пермеабелизированных клетках ВII-dii-FAF28.

По оси ординат – радиоактивность поли(ADP-рибозы) (PAR), накопившихся в реакционной смеси за время инкубации (15 мин). Условия реакции: объем реакционной смеси – 100 мкл; концентрация пермеабелизированных клеток – 10 млн/мл, концентрация двухцепочечного олигонуклеотида - 50 мкг/мл, концентрации NAD - 333 мкМ, время инкубации - 15 мин. Стрелками указаны времена добавления ингибитора поли(ADP-рибоза)-полимеразы (3-АВ, 5 мМ). Обозначения: А и В - внесение 3-АВ; С- включение меченых остатков ADP-рибозы в PAR в отсутствие 3-АВ; D и E - - включение меченых остатков ADP-рибозы в PAR через 60 мин после внесения 3-АВ; F – уровень радиоактивности анализируемого образца не подвергавшегося инкубации.

Чтобы оценить активность PAR-расщепляющих ферментов (PARG и ARH3) в пермеабелизированных клетках ВII-dii-FAF28 (при используемых нами условиях инкубации) мы исследовали стабильность образующегося радиоактивномеченного PAR после внесения в реакционную смесь ингибитора PARP (3-АВ) в концентрациях, обеспечивающих полное подавление активности этого фермента (**рис. 22**). При этом 3-АВ (5 мМ) вносили на двух характерных сроках: в начале инкубации (10 мин) и после сильного замедления скорости реакции (60 мин). Из сравнения углов наклона полученных графиков видно, что через 10 мин скорость накопления PAR значительно превышает скорость ее расщепления, тогда как через 60 мин эти скорости примерно равны. Однако с учетом того, что в отсутствие ингибитора PARP скорость накопления PAR является суперпозицией реакции ее синтеза и деградации, можно утверждать, что через 60 мин скорость синтеза PAR примерно в 2 раза превышает скорость ее деградации. Полное же

выравнивание скоростей синтеза и деградации (установление равновесия этих процессов) наблюдается примерно после 120 мин инкубации (см. **рис. 21** и Обсуждение). Таким образом, при выбранных нами стандартных условиях анализа активности PARP, ферментативный гидролиз PAR практически не влияет на начальную скорость реакции синтеза PAR и, соответственно, на показатели активности PARP.

Таким образом, в результате проведенных исследований нами были определены следующие оптимальные условия для определения активности PARP: пермеабелизированные клетки ВП-dii-FAF28 -  $10^6$  клеток в 100 мкл реакционной смеси; [NAD<sup>+</sup>] – 333 мкМ; двухцепочечные дезоксиолигонуклеотиды – 50 мкг/мл; время инкубации – 10 мин; температура инкубации – 30°C. Активность PARP, измеряемая при таких условиях, близка к максимальной активности; она будет в дальнейшем обозначаться нами термином «СА». В противоположность этому активность PARP, которая будет измеряться без дополнительной стимуляции (без внесения в реакционную смесь олигонуклеотидов) будет обозначаться термином «НСА» - нестимулированная активность PARP. (см. табл. 1)

### **3.5.2. Изменение стимулированной и нестимулированной активностей PARP с «возрастом» культуры**

При написании раздела использованы статьи автора диссертации [Shilovsky G.A., Khokhlov A.N., and Shram S.I. 2013. The protein poly(ADP-ribosyl)ation system: its role in genome stability and lifespan determination // *Biochemistry (Mosc.)*. Vol. 78. № 5. P. 433-444; Shram S.I., Shilovsky G.A., Khokhlov A.N. 2006. Poly(ADP-ribose)-polymerase-1 and aging: experimental study of possible relationship on stationary cell cultures // *Bull. Exp. Biol. Med.* Vol. 141. № 5. P. 628-632].

Как следует из предыдущего раздела для характеристики системы поли(ADP-рибозил)ирования белков целесообразно определять как стимулированную, так и нестимулированную активности PARP.

Влияние «возраста» культуры клеток ВП-dii-FAF28 на НСА исследовалось как в случае поперечного, так и продольного исследования (**рисунки 23 и 24**). Получали культуры клеток, «возрастом» 6, 12 и 14 сут, что соответствовало средней (12% мертвых клеток, по окрашиванию трипановым синим) и поздней стационарной фазе роста (46% мертвых клеток), а также фазе деструкции (62%).

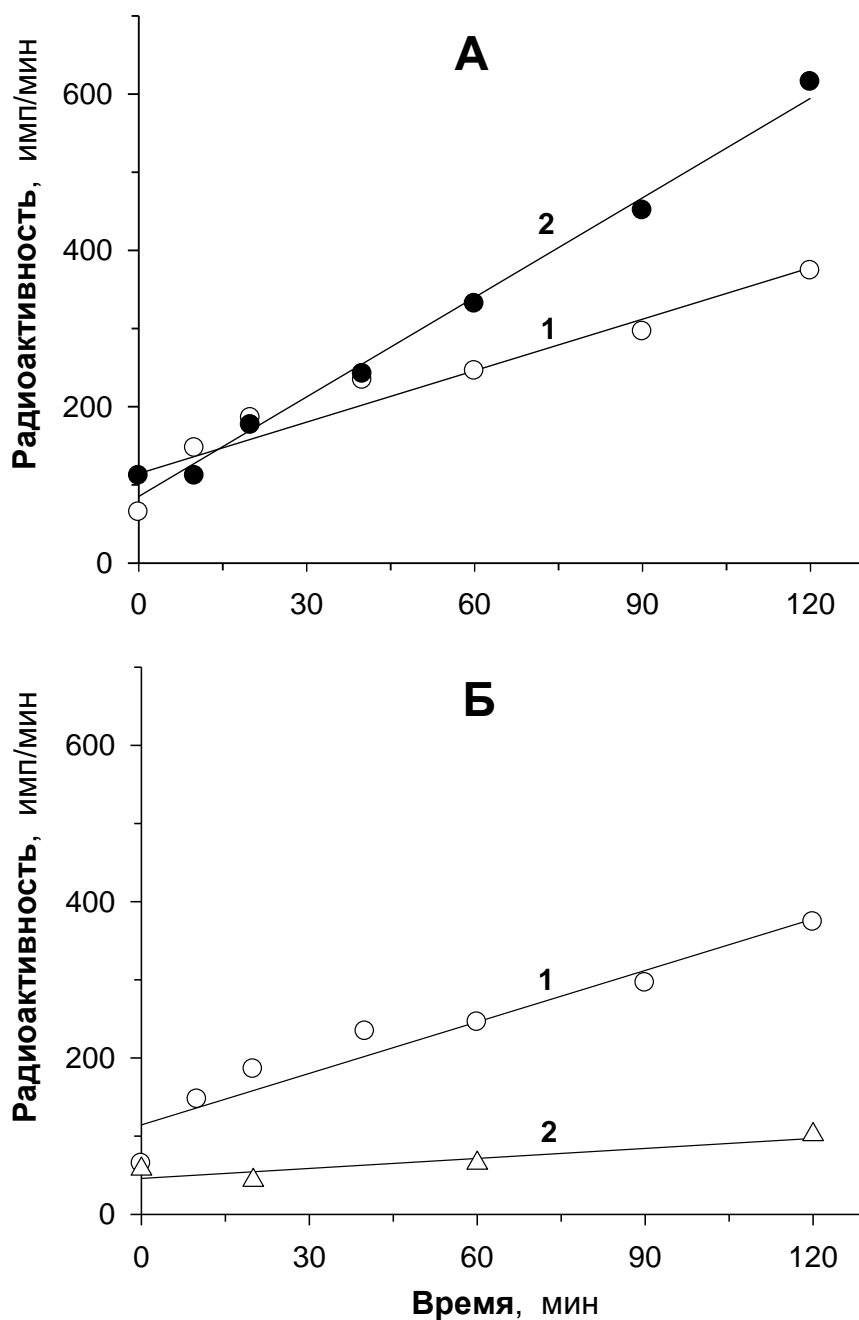
**Таблица 1.** Показатели активности PARP, использованные для анализа возрастных изменений в системе поли(ADP-рибозил)ирования белков, в исследованиях на клеточной модели «стационарного старения».

Показатель <sup>a</sup>	Чему соответствует показатель
CA – стимулированная активность PARP <b>{PAR<sub>s</sub> – стимулированный уровень PAR}</b>	Максимально достижимая активность PARP/ <b>{Максимально достижимый уровень PAR}</b> в клетке при сочетанной стимуляции PARP эндогенными индукторами (имеющимися в клетке повреждениями ДНК и другими активаторами) и внешними искусственными индукторами (насыщающие концентрации двухцепочечных дезоксирибонуклеотидов/ <b>{высокие концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>}</b> ). CA/ <b>{PAR<sub>s</sub>}</b> зависит от общего количества каталитически активных молекул PARP в клетке.
HCA – нестимулированная активность PARP <b>{PAR<sub>b</sub> - базальный уровень PAR}</b>	Активность PARP/ <b>{Уровень PAR}</b> при стимуляции PARP эндогенными индукторами. HCA/ <b>{PAR<sub>b</sub>}</b> зависит как от уровня эндогенных индукторов, так и от количества каталитически активных молекул PARP в клетке (в случае дефицита последних)
CA–HCA <b>{PAR<sub>s</sub>–PAR<sub>b</sub>}</b>	Способность клетки активизировать поли(ADP-рибозил)ирование белков в ответ на вновь возникающие повреждения ДНК
HCA/CA <b>{PAR<sub>b</sub>/PAR<sub>s</sub>}</b>	Доля каталитически активных молекул PARP в клетке, связанных с ДНК и другими эндогенными активаторами
1–HCA/CA <b>{1–PAR<sub>b</sub>/PAR<sub>s</sub>}</b>	Доля свободных (не связанных с ДНК и другими эндогенными активаторами) каталитически активных молекул PARP

<sup>a</sup> Показатели CA, HCA, CA–HCA, HCA/CA и 1–HCA/CA определяли или рассчитывали из данных, полученных при радиометрическом методе анализа активности PARP в пермеабилizированных клетках; показатели PAR<sub>s</sub>, PAR<sub>b</sub>, PAR<sub>s</sub>–PAR<sub>b</sub>, PAR<sub>b</sub>/PAR<sub>s</sub> и 1–PAR<sub>b</sub>/PAR<sub>s</sub> определяли или рассчитывали из данных, полученных при иммунофлуоресцентном анализе PAR в нативных клетках (все, что касается этих показателей, выделено жирным шрифтом и заключено в фигурные скобки).

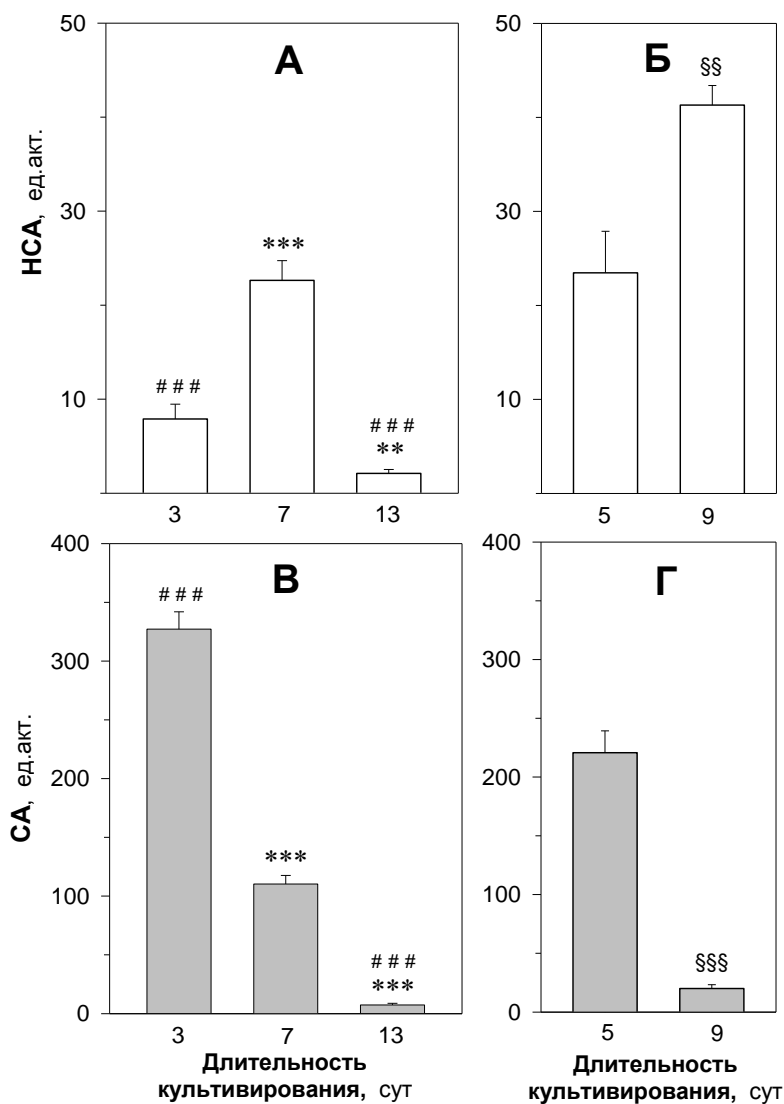
На **рисунке 23** представлены данные поперечного исследования, демонстрирующие изменение накопления радиоактивно меченного PAR со временем в клетках разного «возраста». Показано, что зависимость количества радиоактивно меченной PAR от времени (в интервале 0-120 мин) имеет линейный вид. При этом скорость образования вновь синтезированной PAR в старой культуре (14 сут) оказалась в среднем в 1,8 раза выше, чем в молодой (6 сут) (**рис. 24Б**). Специфичность включения радиоактивной метки доказывается подавлением синтеза PAR при внесении в реакционную смесь ингибитора PARP 3-AB (5 мМ) (**рис. 23Б**).





**Рисунок 23.** Нестимулированный синтез поли(ADP-рибозы) в пермеабелизованных клетках VII-dii-FAF28 (поперечное исследование).

А. – Накопление поли(ADP-рибозы) в клетках VII-dii-FAF28, полученных после 6 (1) и 14 (2) сут культивирования. Б. – Накопление поли(ADP-рибозы) в клетках VII-dii-FAF28 (6 сут культивирования) в отсутствие (1) и в присутствии ингибитора поли(ADP-рибоза)-полимеразы - 3-аминобензамида (5 мМ; 2).



**Рисунок 24.** Влияние длительного культивирования клеток ВП-dii-FAF28 в стационарной фазе роста на нестимулированную (HCA; **А** и **Б**) и стимулированную (СА; **В** и **Г**) активности PARP.

**А, В** – «продольное» исследование; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  – по сравнению со значениями на 3 сут; ###  $p < 0,01$ ; ###  $p < 0,001$  – по сравнению со значениями на 7 сут (ANOVA, однофакторный анализ).

**Б, Г** – «поперечное» исследование; §§  $p < 0,01$ ; §§§  $p < 0,001$  – по сравнению со значениями на 5 сут (t-критерий Стьюдента).

Данные по изменению плотности и жизнеспособности культур для данных экспериментов представлены на рис. 9.

При проведении продольного исследования были получены сходные результаты (**рис. 24А**). Сравнивали показатель НСА в культурах клеток ВП-dii-FAF28 «возрастом» 3, 7 и 13 сут, что соответствовало начальному, среднему и позднему периодам стационарной фазы роста. Как следует из полученных данных в 7-суточных культурах НСА оказалась в 2,9 раза выше, чем в 3-суточных. На поздних стадиях стационарной фазы (13 сут) живые клетки также сохраняют способность к синтезу PAR, однако «возрастные» различия в этом случае трудно оценить из-за высокого процента мертвых клеток. Таким образом, по мере роста в стационарной культуре НСА в клетках ВП-dii-FAF28 возрастает.

В процессе «стационарного старения» в культуре клеток ВП-dii-FAF28 наблюдали драматическое падение СА (**рис. 24**). Так в 7-суточных культурах СА была примерно в 3 раза ниже, а в 13-суточных – в 45 раз ниже, чем в 3-суточных культурах. (**рис. 24В**). Кроме того, нами было показано, что в процессе роста в культуре клеток ВП-dii-FAF28 происходит уменьшение числа прикрепленных клеток, а среди удерживающихся на ростовой поверхности увеличивается процентное содержание мертвых клеток, выявляемых красителем трипановым синим (с 3% на 3-ьи сут до примерно 60% после 13 сут культивирования) (результаты этого эксперимента, касающиеся выживаемости, представлены на **рисунке 9**). В «поперечном» исследовании при сравнении 5- и 9-суточных культур клеток ВП-dii-FAF28 наблюдали схожие изменения (**рис. 24Г**). Культура «старых» клеток (9 сут) в сравнении с культурой «молодых» клеток (5 сут) характеризовалась меньшей плотностью, большим процентом мертвых клеток (45% - в 9-суточной культуре в сравнении с 5% - в 5-суточной; **рис. 9**) и меньшей активностью PARP (**рис. 24Г**).

Как было сказано выше, НСА должна коррелировать с числом накопившихся в клетках повреждений, прежде всего разрывов ДНК. В нашем случае это правило соблюдалось только в диапазоне времени 3 – 7 сут (**рис. 24А**). В культурах «возрастом» более 9 сут НСА катастрофически снижалась, видимо за счет падения СА. НСА характеризуется сложной колоколообразной зависимостью. Последнее вряд ли может объясняться снижением количества повреждений ДНК на более поздних стадиях стационарной фазы роста (13 сут), наоборот, оно увеличивается, как следует из более ранних исследований на данной модели. Наиболее вероятной причиной наблюдаемого «возрастного» эффекта является значительное обеднение пула каталитически активных молекул PARP в клетке, о чем свидетельствуют результаты анализа СА, полученные в этом же эксперименте.

Способность системы поли(ADP-рибозил)ирования белков эффективно реагировать на вновь возникающие повреждения ДНК можно оценить по показателю СА–

НСА (табл. 1 и табл. 2). Расчеты показывают, что этот показатель падает с увеличением «возраста» культуры. При этом возрастные изменения СА и СА–НСА нельзя объяснить только снижением доли живых клеток в культуре, поскольку возрастная динамика этих показателей достаточно сильно различается. Тем не менее, наличие в культуре значительного числа мертвых клеток может в определенной мере усложнять корректную оценку НСА, СА и СА–НСА, а также интерпретацию полученных результатов. Выходом из этой ситуации могло бы быть использование безразмерных показателей, рассчитываемых из СА и НСА.

Нам показалось целесообразным рассмотреть два таких показателя: «НСА/СА» и «1–НСА/СА» (табл. 1 и 2). Первый из них отражает долю каталитически активных молекул PARP, связанных с ДНК и другими эндогенными активаторами, а второй – долю свободных (не связанных с ДНК и другими эндогенными активаторами), каталитически активных молекул PARP.

Из произведенных расчетов видно, что с возрастом стационарной культуры показатель 1–НСА/СА снижается. При этом прослеживается удивительно четкая положительная корреляция между показателями СА–НСА и 1–НСА/СА (табл. 2). Это позволяет использовать показатель 1–НСА/СА, наряду с показателем СА–НСА, для оценки способности системы поли(ADP-рибозил)ирования реагировать на вновь возникающие повреждения ДНК. Снижение показателя 1–НСА/СА с «возрастом» указывает на ухудшение способности клеток к мобилизации системы поли(ADP-рибозил)ирования белков в ответ на вновь возникающие повреждения ДНК. Наоборот, соотношение НСА/СА с «возрастом» культуры увеличивалось, что видимо свидетельствует о том, что все бóльшая доля молекул PARP переходит в связанное с сайтами повреждений ДНК состояние, что, в свою очередь, вызывает повышение уровня поли(ADP-рибозил)ированных белков. При этом наиболее сильное изменение этих двух показателей наблюдали в интервале 3 – 7 сут, тогда как в интервале 7 – 13 сут изменения были не столь существенными. Видимо, это свидетельствует о том, что наиболее значительные изменения фенотипа происходят именно на ранних стадиях стационарной фазы роста клеток.

**Таблица 4.** Показатели активности PARP в пермеабелизованных клетках на разных стадиях стационарной фазы роста культур клеток ВП-dii-FAF28.

«Возраст» культуры, сут	Содержание живых клеток в культуре <sup>a</sup> , %	НСА, ед. акт.	СА, ед. акт.	СА – НСА <sup>b</sup> , ед. акт.	1 – НСА/СА <sup>b</sup> (НСА/СА <sup>b</sup> )
3	97,2±1,4	7,9±1,6	327,2±14,7	319,0	0,976 (0,024)
7	61,4±4,8	22,6±2,1	110,3±7,4	87,7	0,795 (0,205)
13	39,3±4,1	2,1±0,4	7,4±1,5	5,3	0,716 (0,284)

Расчеты произведены на основе данных, представленных на рис. 24. Обозначения: НСА – нестимулированная активность PARP; СА – стимулированная активность PARP; <sup>a</sup> данные представлены на рисунке 2В; <sup>b</sup> при расчетах значений параметров использовали средние значения НСА и СА.

Таким образом, на основе полученных результатов можно сделать предположение, что ограничение пролиферации вызывает накопление в клетках нерепарированных разрывов ДНК, что выражается в росте НСА и показателя НСА/СА. С другой стороны, с «возрастом» культур наблюдали снижение показателей СА, СА–НСА и 1–НСА/СА, что свидетельствует о снижении надежности функционирования поддерживаемых PARP механизмов репарации ДНК. Среди возможных причин падения СА и 1–НСА/СА в ходе «стационарного старения» клеток – снижение уровня экспрессии генов *Parp1* и *Parp2*, нарушение баланса между синтезом и деградацией поли(ADP-рибозы), модификация сульфгидрильных групп остатков цистеина, формирующих цинковые пальцы и др. Ранее другими исследователями было установлено, что показатель СА положительно коррелирует с видовой продолжительностью жизни и отрицательно – с возрастом животных [14].

### 3.6. Влияние «стационарного старения» на способности клеток к поли(ADP-рибозил)ированию белков в ответ на генотоксический стресс

Исследовали способность клеток ВП-dii-FAF28 разного «возраста» к активации синтеза PAR в ответ на массивное повреждение ДНК непосредственно в живых клетках. Культуры клеток выращивали на стеклянной подложке в течение определенного времени (3, 6, 8, 10, 13 и 15 сут) и в конце культивирования половину из них подвергали 5-минутной инкубации в среде с 1 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Анализ PAR проводили иммунофлуоресцентным методом в фиксированных препаратах клеток. Определяли базальный (PAR<sub>b</sub>) и стимулированный генотоксическим агентом (PAR<sub>s</sub>) уровни PAR.

Как и в предыдущих экспериментах (см. **рис. 9**) процент мертвых клеток в культурах клеток ВП-dii-FAF28 на начальном отрезке стационарной фазы роста не превышал 10% и резко возрастал к концу поздней стационарной фазы/началу фазы деструкции (9-11 сут культивирования). Однако следует отметить, что на стеклянной подложке клетки, включая и те, которые следует отнести к мертвым (по критерию окрашивания трипановым синим), удерживались гораздо лучше, чем на пластиковой поверхности.

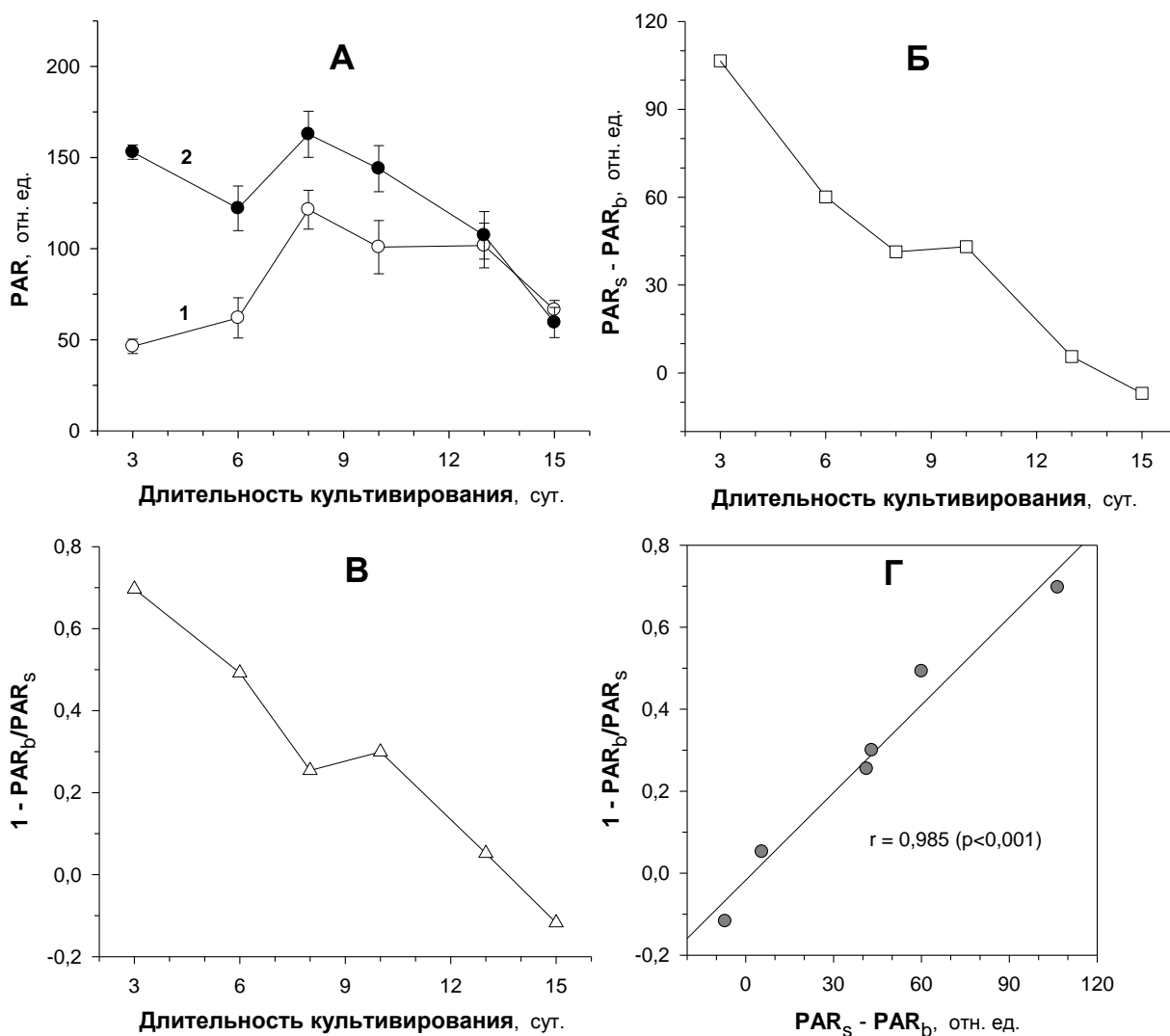
Было обнаружено, что значения «базального» и «стимулированного» (5-минутная обработка клеток 1мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) уровней PAR – PAR<sub>b</sub> и PAR<sub>s</sub>, соответственно (**табл. 1**), в клетках ВП-dii-FAF28 сложным образом зависели от «возраста» культур. В 8-13-суточных культурах уровень PAR<sub>b</sub> был в среднем в два раза выше, чем у 3-суточных, когда культуры достигали монослойного состояния, а при более длительном культивировании наблюдали снижение уровня PAR<sub>b</sub> (**рис. 25А**). В то же время, уровень PAR<sub>s</sub> с «возрастом» постепенно снижался: если для 3-суточных культур наблюдали более чем трехкратную стимуляцию уровня PAR при воздействии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, то для 13 и 15-суточных культур (конец поздней фазы роста) инкубация клеток с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> уже не вызывала увеличения уровня PAR (**рисунки 25А и 25Б**).

Полученные результаты хорошо коррелируют с представленными выше данными по изменению показателей НСА и СА с увеличением «возраста» культур (см. выше). По аналогии с показателями СА–НСА, НСА/СА и 1–НСА/СА было предложено ввести показатели PAR<sub>s</sub>–PAR<sub>b</sub>, PAR<sub>b</sub>/PAR<sub>s</sub> и 1–PAR<sub>b</sub>/PAR<sub>s</sub> (**табл. 1**), который также характеризует способность системы поли(ADP-рибозил)ирования белков реагировать на вновь возникающие в клетке повреждения ДНК. Значения этих параметров претерпевали те же возрастные изменения, что и в случае параметров, рассчитываемых из НСА и СА (сравнение результатов, представленных в **табл. 2** и на **рис. 25**).

Как следует из произведенных расчетов, наибольшие значения показателя PAR<sub>s</sub>–PAR<sub>b</sub>, который также характеризует способность системы поли(ADP-рибозил)ирования белков реагировать на вновь возникающие в клетке повреждения ДНК, получены для культур, находящихся в самом начале стационарной фазы роста (в данном случае 3-суточные культуры), а по мере увеличения «возраста» культур величина этого показателя неуклонно снижается, вплоть до нулевых значений в 15-суточных культурах (**рис. 25Б**).

Сопоставление результатов анализа PAR<sub>s</sub>–PAR<sub>b</sub> и процента живых клеток в культуре указывает на отсутствие тесной взаимосвязи между этими показателями (**рис. 25Б** и **рис. 26В**). В то же время обнаружена высокая положительная линейная корреляция между показателями PAR<sub>s</sub>–PAR<sub>b</sub> и 1–PAR<sub>b</sub>/PAR<sub>s</sub> ( $r = 0,985$ ,  $p < 0,001$ ; **рис. 25Г**).

Следовательно, для оценки способности системы поли(ADP-рибозил)ирования белков реагировать на вновь возникающие повреждения ДНК наряду с показателем  $PAR_s - PAR_b$  может быть использован удобный на практике безразмерный показатель  $1 - PAR_b/PAR_s$ .



**Рисунок 25.** Влияние «стационарного старения» на стимулируемый генотоксическим стрессом синтез поли(ADP-рибозы) в культивируемых клетках BII-dii-FAF28.

**А** – базальный ( $PAR_b$ ; кривая 1) и стимулированный  $H_2O_2$  ( $PAR_s$ ; кривая 2) уровни поли(ADP-рибозы) в клетке; **Б** – показатель  $PAR_s - PAR_b$ ; **В** – показатель  $1 - (PAR_b/PAR_s)$ ; **Г** – корреляция между значениями показателей  $PAR_s - PAR_b$  и  $1 - PAR_b/PAR_s$ . Данные по жизнеспособности культур для данного эксперимента представлены на **рис. 26**.

Таким образом, с использованием альтернативного подхода было установлено, что по мере увеличения «возраста» стационарных культур клеток ВП-dii-FAF28 наблюдается снижение способности системы поли(ADP-рибозил)ирования белков реагировать на вновь возникающие повреждения ДНК (значения показателей  $PAR_s-PAR_b$  и  $1-PAR_b/PAR_s$  снижаются) и увеличение доли молекул PARP, активируемых повреждениями эндогенной ДНК (показатель  $PAR_b/PAR_s$  увеличивается), что, в свою очередь, вызывает повышение базального уровня поли(ADP-рибозил)ирования белков в клетке.

Кроме того, нами были сопоставлены изменения в системе поли(ADP-рибозил)ирования белков и в активности SA- $\beta$ -Gal. Оказалось, что активность SA- $\beta$ -Gal не выявлялась в молодых культурах, не достигших монослоя, но обнаруживалась в клетках ВП-dii-FAF28, достигших состояния монослоя, причем их количество с «возрастом» культуры увеличивалось (см. раздел 3.3). Полученные результаты указывают на снижение потенциала систем репарации ДНК в более старых клетках, что подтверждает описанные ранее факты (см. обзор [9]).

### **3.7. Влияние ингибиторов PARP на выживаемость клеток ВП-dii-FAF28 в ходе их «стационарного старения»**

Как было показано в предыдущем разделе (см. раздел 3.5) с «возрастом» культуры клеток ВП-dii-FAF28 наблюдается снижение СА и увеличение НСА. В этой связи логично было предположить, что в случае если наблюдаемое с возрастом культур падение СА является причиной происходящих в клетках деструктивных процессов, характерных для старения, полное фармакологическое ингибирование PARP должно привести к ускоренному развитию этих процессов. Для проверки этого предположения исследовали влияние известного ингибитора PARP – 3-AB (0.5 мМ) на рост и выживаемость клеток ВП-dii-FAF28 в стационарной культуре. Для этого клетки ВП-dii-FAF28 культивировали в присутствии 3-AB, конечная концентрация которого равнялась 0,5 мМ. Как видно из представленных на **рисунке 26** данных, в интервале 6-15 сут плотность клеток (живых+мертвых) в культуре существенно не изменяется (**рис. 26А**). Однако после 8 сут культивирования наблюдали резкое снижение доли живых клеток и увеличение доли мертвых клеток, сохраняющих при этом свои адгезивные свойства (**рис. 26Б** и **рис. 26В**). Динамика накопления мертвых клеток в культуре совпадает с таковой, полученной в других экспериментах (см. раздел 3.2.2; **рис. 9**). Подобная же картина наблюдается при стимуляции гибели опухолевых клеток некоторыми ДНК-повреждающими агентами. Следует также отметить, что обработка культуральных стекол лизином, улучшает прикрепление клеток к субстрату, и даже «мертвые» (окрашиваемые трипановым синим

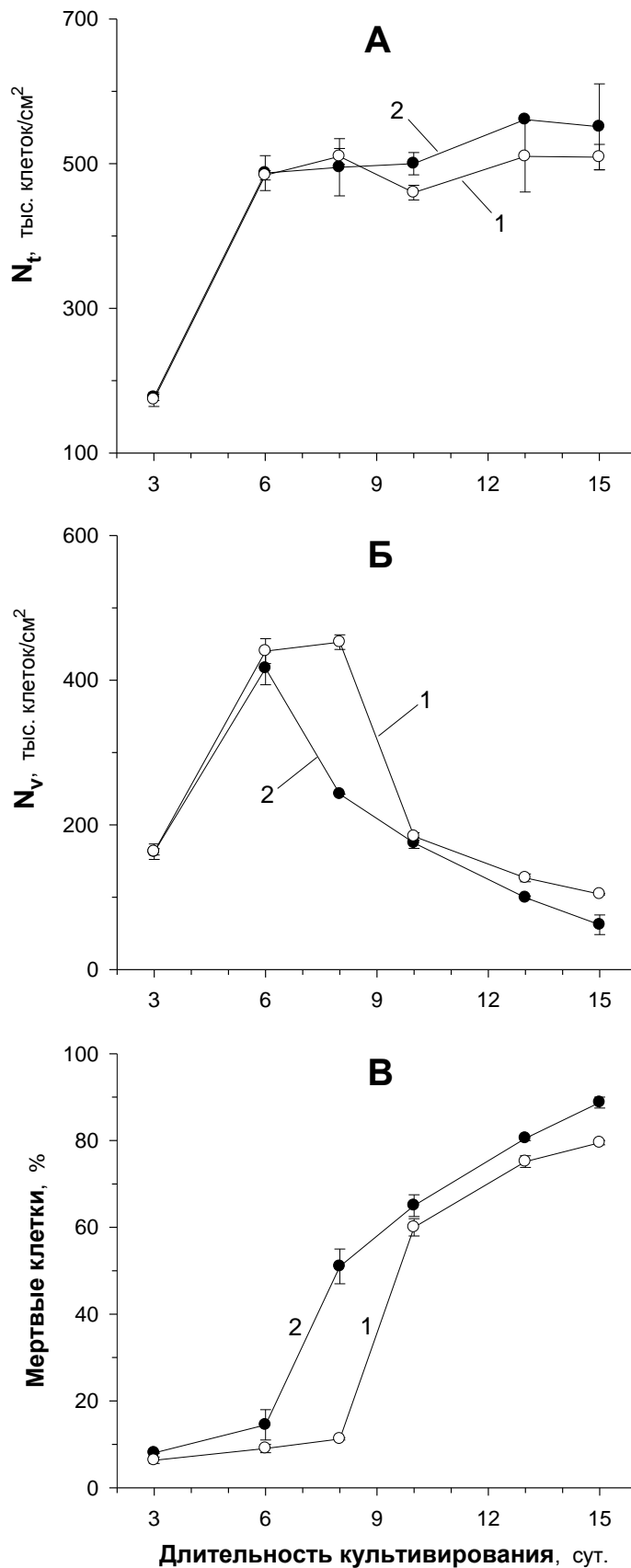


клетки) остаются подолгу прикрепленными к нему (для сравнения см. раздел 3.2.2; рис. 9).

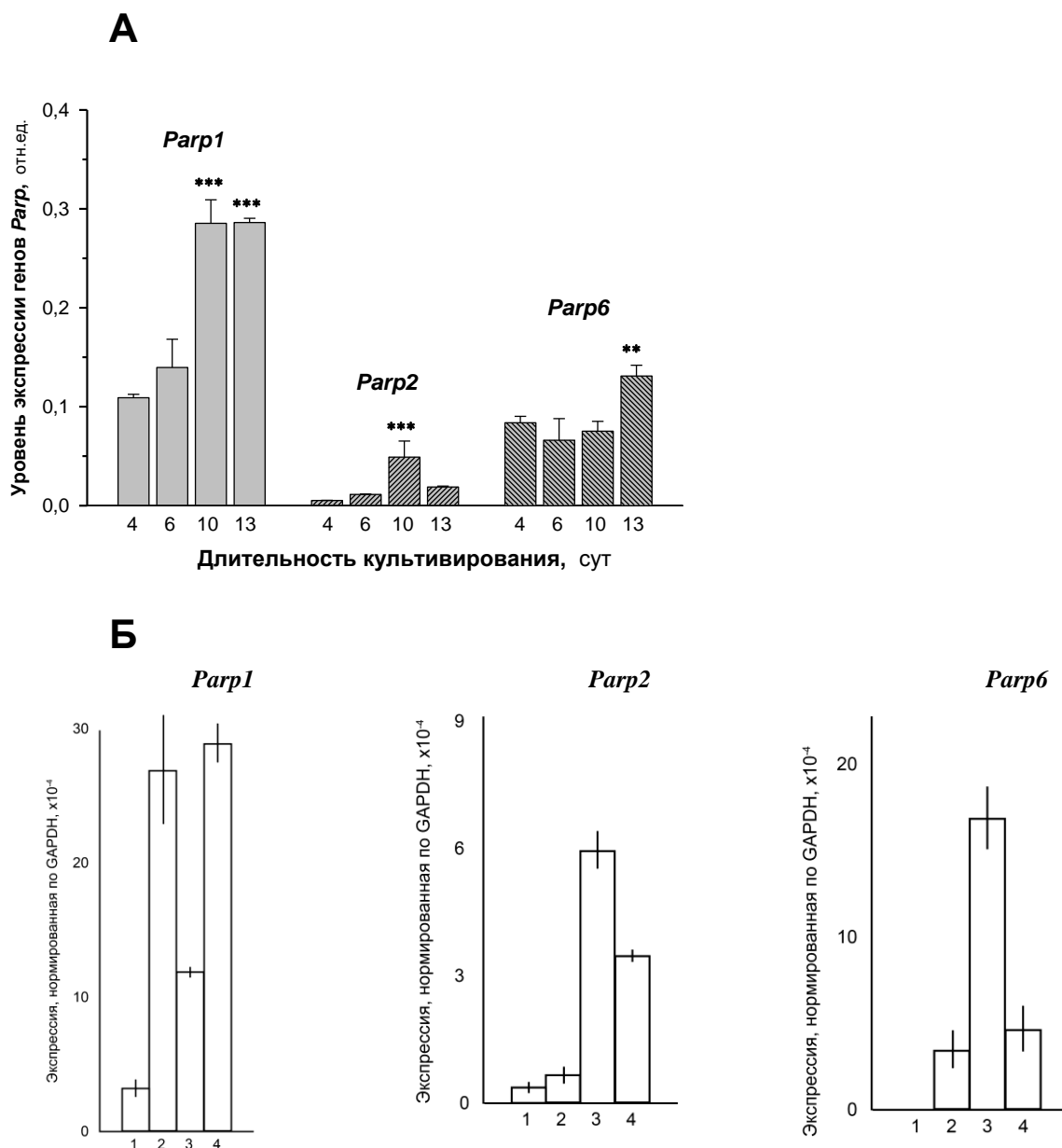
Внесение в среду культивирования 3-AB существенно не повлияло на рост и выживаемость клеток ВП-dii-FAF28 в стационарной культуре. Матуока и соавт. показали, что никотинамид (НА), обладающий PARP-ингибирующей активностью, может препятствовать развитию сенесцентного фенотипа в ДФЧ, определяемого по морфологии клеток и активности SA- $\beta$ -Gal [288]. При этом, хотя НА и увеличивал число УКП, он мало влиял на скорость роста. Этот эффект был специфичным: ни одно из рассмотренных родственных НА соединений (предшественник NAD /ниацин, аналоги NAD и ингибиторы PARP) не оказывали такого эффекта. Авторы делают вывод, что действие НА связано, скорее, не с метаболизмом NAD и поли(ADP-рибозил)ированием, а с изменением генной экспрессии, так как НА вызывал повышение активности гистоновой ацетилтрансферазы, активность которой в старых клетках была снижена.

### **3.8. Изменение уровней экспрессии генов семейства PARP при «стационарном старении» клеток ВП-dii-FAF28**

Как было указано выше, одной из возможных причин наблюдаемого в процессе «стационарного старения» клеток ВП-dii-FAF28 снижения СА и СА–НСА являться снижение уровня экспрессии генов, кодирующих белки PARP-1 и PARP-2. С использованием количественной ПЦР в режиме реального времени было установлено, что уровни экспрессии генов *Parp1*, *Parp2* и *Parpб* (другое обозначение – *Tnks2*) в клетках ВП-dii-FAF28 значительно возрастали с увеличением «возраста» стационарных культур. При этом экспрессия указанных генов характеризуется различной временной динамикой (рис. 6). На 10 сутки обнаруживали достоверное увеличение экспрессии *Parp1* и *Parp2* – в 2,6 и 9,4 раза, соответственно, по сравнению с этим показателем на 4-е сутки (начальная стадия стационарной фазы роста), а на 13-е сутки – достоверное увеличение экспрессии *Parp1* и *Parpб* – в 2,6 и 1,6 раза, соответственно, по сравнению с этим показателем на 4-е сутки. Полученные данные согласуются с результатами другого исследования, выполненного на фибробластах мыши NIH/3T3, «стационарное старение» которых вызывали депривацией сыворотки, что приводило к приостановке клеточных делений [289]. Полученные результаты указывают на то, что снижение СА и показателя 1–НСА/СА не вызвано падением уровня экспрессии генов, кодирующих белки PARP-1 и PARP-2. Сходные по направленности изменения уровней экспрессии ортологов этих же генов у человека были нами выявлены в «стационарно стареющей» культуре мезенхимальных стволовых клеток человека.



**Рисунок 26.** Влияние ингибитора поли(ADP-рибоза)-полимераз 3-аминобензамида (3-AB, 0.5 мМ) на выживаемость стационарной культуры клеток ВП-dii-FAF28. **А** – общее число клеток на 1см<sup>2</sup> поверхности роста ( $N_t$ ; плотность культуры); **Б** – число живых клеток на 1см<sup>2</sup> поверхности роста ( $N_v$ ); **В** - процент мертвых клеток в культурах (выявляли окрашиванием красителем трипановым синим).



**Рисунок 27.** Временная динамика экспрессии генов белков семейства PARP при длительном культивировании клеток ВП-dii-FAF28 в стационарной фазе роста (А) и изменение уровня экспрессии PARP-1 с «возрастом» культивируемых мезенхимальных стволовых клеток человека (Б).

Обозначения для Б: 1 - 7-ой пассаж (до культивирования), 2 - 14-ый пассаж (до культивирования), 3 - 7-ой пассаж (стационарная 7-суточная культура), 4 - 14-ый пассаж (стационарная 7-суточная культура).

\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  – по сравнению со значениями на 4 сут (ANOVA, однофакторный анализ).

Интересно отметить, что *in vivo* вследствие взаимного влияния двух разнонаправленных процессов (снижения уровня экспрессии PARP-1 с возрастом из-за снижения доли делящихся клеток и «стационарного старения» неделящихся, против роста экспрессии и активности PARP-1 в условиях развивающихся возрастных патологий [226] *общее* изменение уровня экспрессии PARP-1 практически не выражено [212, 283] или выражено слабо [73, 225, 290, 291], в отличие от его динамики в клеточной культуре. Известно, что для активации каталитической функции PARP необходимо связывание ее с одно- или двунитевыми разрывами ДНК [283]. Можно предположить, что вначале он растёт до определенного уровня из-за накопления повреждений ДНК в процессе старения. Это сопровождается накоплением с возрастом поли(ADP-рибозил)ированных белков (включая и сами PARP), функционирование которых вследствие такой модификации частично или полностью нарушено. Однако затем «цена» реагирования на повреждения ДНК становится «непомерно высокой» для клеток стареющего организма (так как при этом затрачивается большое количество NAD и АТФ). Вследствие этого клетка начинает терять свою способность к синтезу поли(ADP-рибозы) (видимо, не только за счет снижения экспрессии фермента, но и за счет перевода его в неактивную форму с помощью различных посттрансляционных модификаций и, возможно, снижения активности ферментов, расщепляющих этот полимер).

### **3.9. Влияние флавоноидов на активность поли(ADP-рибоза)-полимераз и выживаемость культивируемых клеток в условиях окислительного стресса**

#### **3.9.1. Ингибирование PARP тимуса теленка флавоноидами**

Структура флавоноидов имеет некоторые сходства со структурой известных ингибиторов PARP – аналогов никотинамида. Исходя из этого нами проанализировано влияние ряда флавоноидов различной структуры на активность частично очищенной PARP-1 тимуса теленка. Показано, что наибольшей PARP-ингибиторной активностью обладает байкалеин (5,6,7-тригидроксифлаван), который в концентрации 100 мкМ практически наполовину подавляет активность PARP (**рис. 28**).

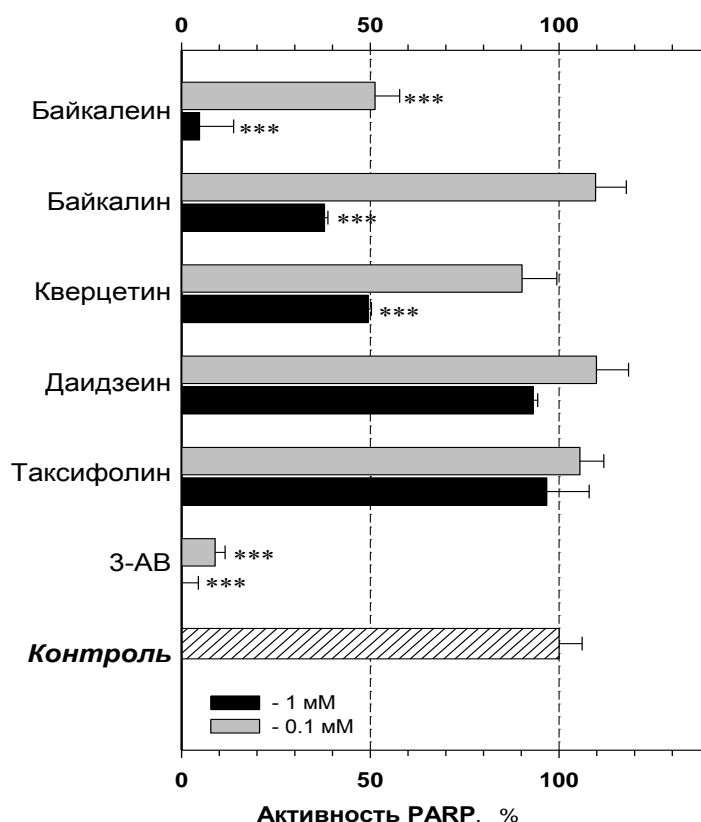
Кверцетин (3',4',5,7-тетрагидроксифлаван) и байкалин проявляли сильное ингибиторное действие только в концентрации 1 мМ, а даидзеин и таксифолин не оказывали никакого ингибиторного действия на PARP. Сопоставление структуры и ингибиторной активности протестированных соединений позволяет сделать ряд заключений:

1)- изофлавоны (даидзеин) и флаваны (таксифолин), в отличие от флавонов (кверцетин, байкалеин), не способны ингибировать PARP;

2)- гликозилированные производные флавонов (байкалин) менее активны по сравнению с негликозилированными аналогами (байкалеин);

3)- расположение гидроксильных групп в молекуле флавона имеет важное значение для PARP-ингибиторной активности соединения (кверцетин - байкалеин).

Таким образом, нами была протестирована PARP-ингибиторная активность ряда природных флавоноидов. На основе полученных данных проведен анализ взаимосвязи структура-активность. Показано, что байкалеин обладает выраженным PARP-ингибирующим действием, соизмеримым по своей эффективности с известными синтетическими ингибиторами, производными никотинамида. Известно, что PARP-ингибирующее действие демонстрируют и некоторые другие флавоноиды - рутин, мальтоглокозил- и моноглокозилрутин и др. [179-184]. Также известно, что байкалеин снижает истощение восстановленного глутатиона, повреждение ДНК и гибель клеток, подавляет активацию каспазы-8 и Bid-зависимых путей, видимо, за счет его ингибирующего действия на образование АФК и истощение восстановленного глутатиона [177, 178]. Даидзеин способен снижать уровень воспаления *in vivo* и *in vitro* [180], подавляя экспрессию Cxcl2 и транскрипционную активность NF-κB.



**Рисунок 28.** Сравнение PARP-ингибиторной активности ряда флавоноидов.

Обозначения: 3-AB – 3-аминобензамид (положительный контроль). \*\*\* $p < 0,001$  по сравнению с контролем (ANOVA, однофакторный анализ).

Известно, что действие ингибиторов PARP на клетку связано не только с ослаблением надежности PARP-зависимых систем репарации ДНК, но также с подавлением транскрипции провоспалительных генов и прерыванием путей клеточной гибели, что может иметь положительное терапевтическое и профилактическое действие при многих патологиях, включая ишемии органов, хронические воспалительные и нейродегенеративные заболевания и др.

### 3.9.2. Влияние экстракта *Ginkgo biloba* EGb 761 на стимулированную активность PARP и выживаемость клеток PC12 после воздействия окислительного стресса

Было исследовано влияние на активность PARP экстракта *Ginkgo biloba* EGb 761, в состав которого входят флавоноиды. Известно, что этот препарат эффективен при лечении некоторых возрастных расстройств, в том числе нарушений когнитивных функций при БА [292] и возрастной макулярной дегенерации у человека [293]. Мы предположили, что эти эффекты экстракта *Ginkgo biloba* EGb 761, по крайней мере частично, могут быть обусловлены его влиянием на активность PARP.

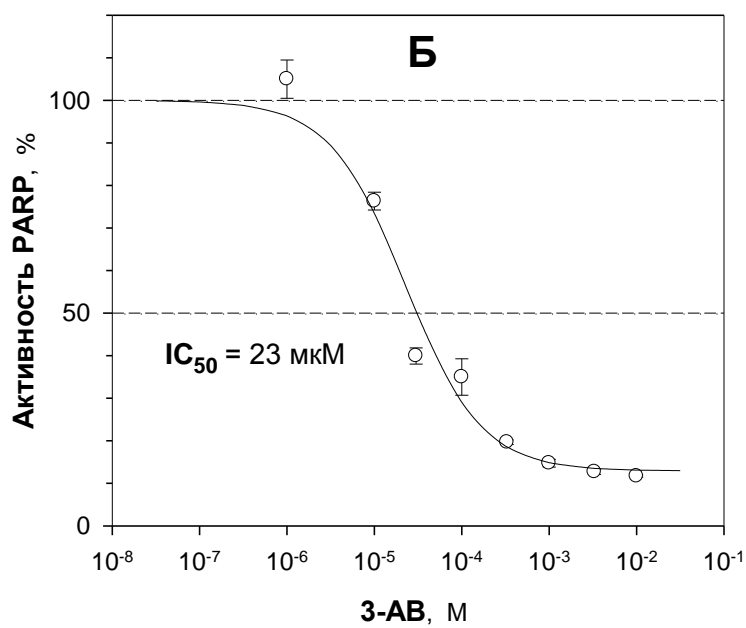
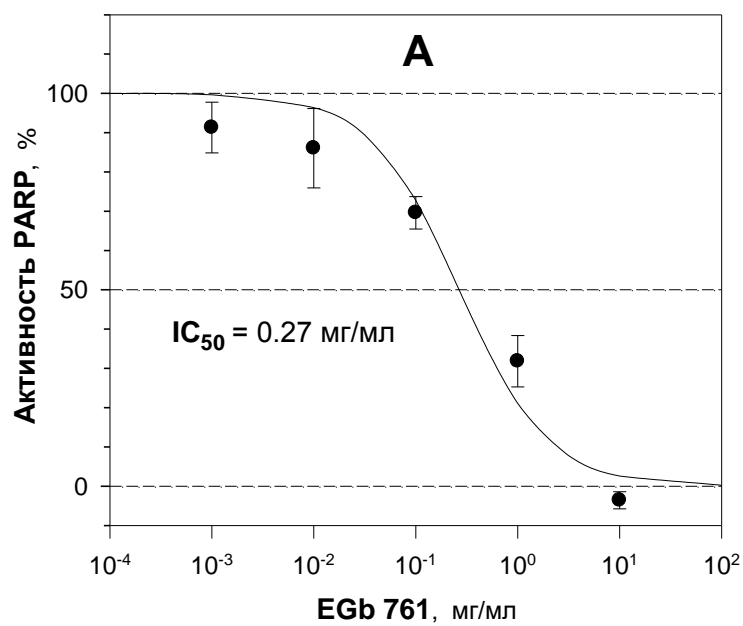
Было обнаружено, что EGb 761, как и некоторые флавоноиды, обладает способностью ингибировать активность изолированной PARP тимуса телят (рис. 29).

Рассчитанное значение  $IC_{50}$  равнялось 0,27 мг/мл. Показано, что при высоких концентрациях он полностью подавлял активность PARP. Нами также исследовалось влияние EGb 761 на СА в пермеабелизованных клетках PC12. EGb 761 дозозависимым образом подавлял СА (**рис. 30А**). Кроме того, EGb 761 увеличивал выживаемость клеток PC12 при окислительном стрессе, подобно используемому в качестве положительного контроля ингибитору PARP - 3-AB (**рис. 30Б**). В исследуемом диапазоне концентраций EGb 761 происходило синхронно. Следует отметить, что соотношение эффективности цитопротекторного действия и ингибиторной активности (в отношении PARP) у EGb 761 значительно выше, чем у 3-AB. Это указывает на то, что цитопротекторная активность экстракта обусловлена не только его ингибирующим действием на PARP, но и другими свойствами.

Таким образом, нами впервые продемонстрирована способность EGb 761 эффективно подавлять активность PARP. Видимо, это свойство экстракта связано с присутствием в его составе флавоноидов, которые, как было показано в предыдущем разделе, являются неплохими ингибиторами PARP. Наличие у EGb 761 PARP-ингибирующей активности во многом определяет способность этой субстанции оказывать выраженное цитопротекторное действие в условиях окислительного стресса.

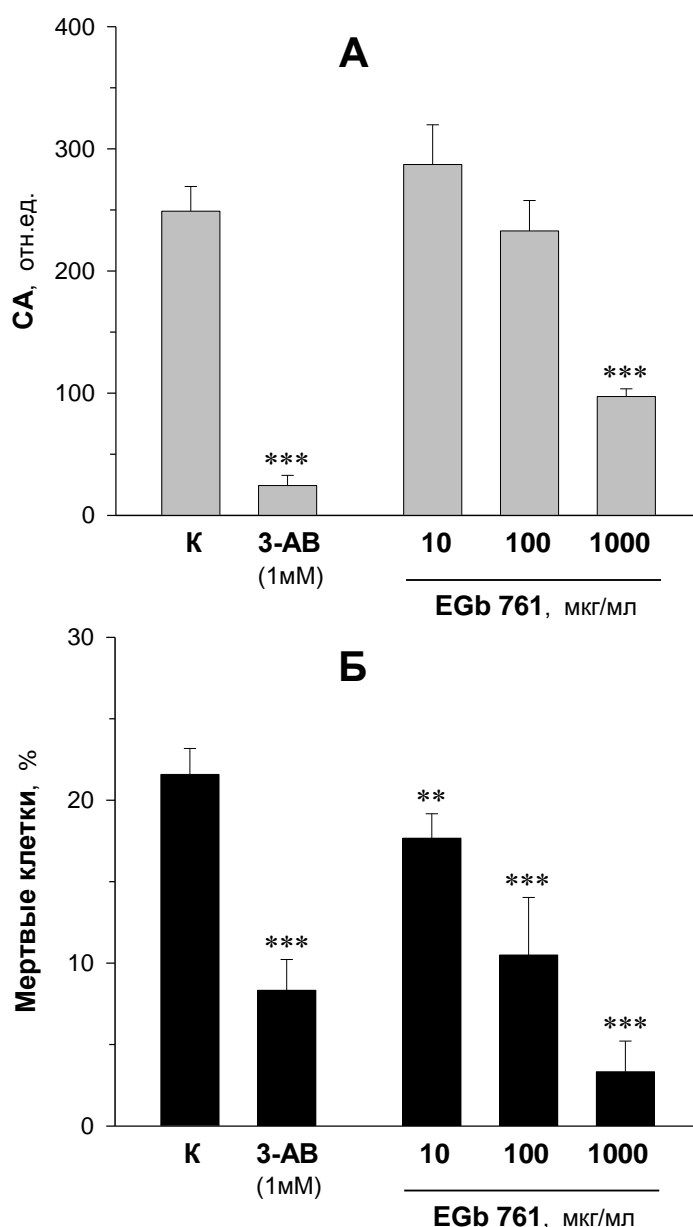
Биогенные вещества, присутствующие в различных пищевых продуктах играют важную роль в поддержании различных функций человеческого тела. Некоторые биологически активные пищевые компоненты, известные как «фитонутриенты», играют положительную роль в поддержании и модуляции иммунной функции, что способствует снижению риска определенных заболеваний. Будучи натуральными продуктами, они имеют большие перспективы в клинической терапии, поскольку не обладают побочными нежелательными эффектами, характерными для химио- или лучевой терапии. Они сравнительно дешевы и, следовательно, существенно сокращают стоимость лечения [294].

Фитонутриенты, включая и флавоноиды, являются растительными веществами с определенной биологической активностью, с полезными для здоровья человека фармакологическими активностями, такими как антимикробное, антиоксидантное, противовоспалительное, противоаллергическое, противоспазматическое, противоопухолевое, гепатопротекторное, гиполлипидемическое, нейропротекторное, гипотензивное, иммуномодулирующее, обезболивающее. Они также успешно применяются для стимуляции центральной нервной системы, защиты от вызванного UV канцерогенеза, при лечении диабета и остеопороза, в качестве «anti-aging» препаратов [295]. Дополнительной выгодой от использования флавоноидов может быть их способность ингибировать PARP и подавлять экспрессию провоспалительных генов.



**Рисунок 29.** Влияние экстракта *G. biloba* EGb 761 (А) и ингибитора поли(ADP-рибоза)-полимераз 3-аминобензамида (3-AB; Б) на активность PАРР тимуса телят.





**Рисунок 30.** Влияние экстракта *Ginkgo biloba* EGb 761 на стимулированную активность PARP (А) и гибель клеток PC12, индуцированную окислительным стрессом (Б).

Окислительный стресс вызывали 30-минутной обработкой клеток  $H_2O_2$  (1мМ). Обозначения: К - отрицательный контроль; СА – стимулированная активность PARP; \*\* -  $p < 0.01$ , \*\*\* -  $p < 0.001$  – по сравнению с контролем (t-критерий Стьюдента).

Одним из таких широко применяемых нутриентов является экстракт *Ginkgo biloba* – EGb 761. В состав EGb 761 входят флавоноидные гликозиды – 24%, (в том числе производные кемпферола и кверцетина), терпеновые вещества – 6%, включая гингколиды А, В, С, а также билобалиды, проантоцианиды, органические кислоты [293, 296, 297]. Это растительный препарат, действие которого обусловлено влиянием на процессы обмена веществ в клетках, реологические свойства крови и микроциркуляцию, а также

вазомоторные реакции кровеносных сосудов. Он нормализует метаболические процессы, оказывает антигипоксическое действие на ткани, препятствует образованию свободных радикалов и перекисному окислению липидов клеточных мембран. EGb 761 эффективен при лечении возрастных расстройств, связанных с нарушением когнитивных функций, в том числе при БА [292]. В клинических исследованиях было показано, что EGb 761 (60-240 мг/день ежедневно в течение 6 мес.) препятствует возрастной макулярной дегенерации у человека [293].

В модели хронического повреждения кожи («photoaging») у мышей BALB/c, вызванного облучением UVB (90 мДж/см<sup>2</sup> три раза в неделю в течение 3 мес.) EGb 761 (2 мг/см<sup>2</sup>) при наружном применении снижал повреждение кожи, гиперплазию эпителия и дегенерацию эластических волокон [297]. Кроме того, в культивируемых фибробластах показали, что при предварительной обработке клеток EGb 761 заметно уменьшается активация MMP-1, индуцированную UVB избыточную экспрессию провоспалительных цитокинов, таких как IL-1, IL-6 и TNF- $\alpha$ , а также фосфорилирование компонентов пути трансдукции сигнала митоген-активируемой протеинкиназы, включая регулируемую внеклеточными сигналами киназу C-Jun, N-концевую киназу и p38, *in vivo* и *in vitro*, а также снижает образование АФК [297].

Известно, что накопление конечных продуктов гликирования имеет место при старении и развитии возрастных нейродегенеративных заболеваний [298, 299]. В модели индуцированного «старения», вызванного добавлением в культуральную среду D-галактозы (5 г/л; 2 ч), одновременное добавление EGb 761 (20 мкг/мл) значительно снижало процент клеток, окрашивающихся на SA- $\beta$ -Gal, и уровень конечных продуктов гликирования в первичной культуре кардиомиоцитов крысы. Кроме того, EGb 761 восстанавливал нарушение захвата кальция в саркоплазматическом ретикулуме и работу кальциевых насосов [296]. EGb 761 (100 мг/кг массы тела/сут в течение 4 мес.) подавлял возрастное увеличение апоптоза в слуховой улитке крыс Sprague-Dawley, снижая активность и экспрессию каспазы-3, и замедлял возрастное ухудшение слуха [300].

Также ранее, с использованием модели PARP-1<sup>-/-</sup> мышей было показано, что PARP-1 является коактиватором NF- $\kappa$ B, хотя это, видимо, не требует ее ферментативной активности [184]. Кроме того, ингибирование активности PARP-1 снижает продукцию провоспалительных медиаторов. Ингибирование PARP-1 может оказывать благоприятное воздействие при таких болезнях, как ХОБЛ и диабет, за счет сохранения уровня клеточного NAD<sup>+</sup> и уменьшения воспаления [184]. Выше (табл. 4) уже отмечалось, что ингибиторы PARP являются перспективными препаратами для проведения противоопухолевой терапии лиц с мутантным аллелем гена BRCA2 [182].

В настоящее время лекарственные препараты на основе ингибиторов PARP находятся на стадии клинических исследований. Причем разрабатываемые препараты предназначены исключительно для увеличения эффективности химиотерапевтических средств в противоопухолевой терапии раковых заболеваний различной этиологии. В свете полученных нами данных и учитывая ряд последних публикаций [166, 175, 178, 182, 184, 295] можно предположить, что ингибиторы PARP могут также быть успешно использованы в гериатрии для лечения и профилактики ряда ассоциированных со старением заболеваний. В данном исследовании нами было установлено, что ряд флавоноидов и содержащий флавоноиды экстракт *Ginkgo biloba* (EGb 761) способны эффективно подавлять активность PARP. Однако следует обратить внимание на то, что длительное подавление активности PARP может, наряду с их положительными терапевтическими эффектами (ослабление последствий ишемии, хронического окислительного стресса и хронического воспаления), способствовать увеличению нестабильности генома и вероятности возникновения злокачественных новообразований.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Актуальной проблемой биоинженерии является разработка удобных тест-систем, включая и клеточные, для оценки фармакологических активностей природных и синтетических веществ. Изучение действия «антивозрастных» препаратов предполагает моделирование на клеточных культурах деструктивных изменений, ведущих к увеличению вероятности смерти с возрастом (т.е. к старению). В данном исследовании для моделирования таких процессов нами была выбрана описанная ранее и хорошо охарактеризованная клеточная модель «стационарного старения» [8, 241, 301]. В экспериментах были использованы стационарные культуры клеток китайского хомячка ВП-dii-FAF28 [302].

В работе впервые было подробно изучено влияние «возраста» культуры на показатели активности PARP в стационарной фазе роста животных клеток [303]. Показано, что в процессе «стационарного старения» СА PARP, отражающая общее количество каталитически активных молекул фермента в клетке, неуклонно снижается, причем на фоне усиления экспрессии генов, кодирующих белки семейства PARP [304]. Обнаруженный феномен может быть обусловлен одной из следующих причин: накоплением в клетке неактивных модифицированных молекул PARP [227, 305, 306], снижением активности ядерной PAR-гликогидролазы [220] и неферментативным повреждением белков PARP активными формами кислорода и азота вследствие развития хронического окислительного и/или нитрозилирующего стресса. Кроме того, существует положительная, хоть и слабо выраженная, корреляция между СА PARP и содержанием цинка в РВМС человека ( $r^2=0,1779$ ,  $p<0,05$ ) [307, для обзора см. 308].

Можно предположить, что вызываемое этими факторами снижение общего пула каталитически активных молекул PARP на ранних стадиях стационарной фазы роста компенсируется увеличенной экспрессией генов, кодирующих PARP, а на более поздних сроках процесс инактивации PARP значительно усиливается, что приводит к развитию дефицита каталитически активной PARP. В результате этого даже спонтанно возникающие в клетке повреждения ДНК остаются «нераспознанными» PARP (снижение НСА PARP и PAR<sub>b</sub> после 7-8 сут культивирования). Это указывает на возможное ослабление контроля PARP над основными системами репарации ДНК.

Для корректной оценки способность системы PARP реагировать на вновь возникающие повреждения ДНК в клетках, мы предложили использовать безразмерные показатели: 1-НСА/СА - в пермеабелизованных клетках, и 1-PAR<sub>b</sub>/PAR<sub>s</sub> - в живых клетках, которые (показатели), как оказалось, хорошо коррелировали с использовавшимися ранее показателями СА-НСА и PAR<sub>s</sub>-PAR<sub>b</sub>, соответственно.

Очевидно, что эти безразмерные показатели не должны зависеть от доли мертвых клеток в культуре, так как клетки, не участвующие в проявлении НСА PARP, также не будут участвовать в проявлении СА PARP. Таким образом, все индивидуальные различия, или различия в приготовлении проб, нивелируются при расчете этих показателей, что значительно снижает дисперсию значений в выборке. В данной работе было показано, что значения  $1-\text{НСА}/\text{СА}$  и  $1-\text{PAR}_b/\text{PAR}_s$ , отражающие фактически долю свободных (не связанных с ДНК), каталитически активных молекул PARP, снижается, тогда как показатели  $\text{НСА}/\text{СА}$  и  $\text{PAR}_b/\text{PAR}_s$  (доля свободных, каталитически активных молекул PARP, не связанных с ДНК в местах ее повреждения и другими эндогенными активаторами) наоборот, неуклонно увеличивались с «возрастом» культур клеток В11d-ii-FAF28. Расчет этих показателей из данных, приведенных в некоторых публикациях, посвященных аналогичным исследованиям показал, что у животных с возрастом, также как и в нашей модели *in vitro*, происходит снижение показателей, эквивалентных  $1-\text{НСА}/\text{СА}$  в клетках крови, мозга и селезенки [14, 212, 214, 215, 303]. Следовательно, безразмерные показатели  $1-\text{НСА}/\text{СА}$  или  $1-\text{PAR}_b/\text{PAR}_s$  могут быть успешно использованы в качестве биохимического маркера клеточного фенотипа «состарившихся» клеток. Основываясь на этом, мы предлагаем применить его для оценки геропротекторного/геропротекторного действия различных фармакологических веществ в клеточных тест-системах.

В настоящее время в клиническую практику активно внедряются лекарственные препараты на основе ингибиторов PARP. Их предлагают использовать преимущественно для сенситизации раковых клеток к химио- и радиотерапии. Однако из результатов экспериментальных исследований на животных известно также, что ингибиторы PARP могут предотвращать или замедлять развитие таких возрастных патологий как сердечная недостаточность, диабет, ишемия, нейродегенеративные заболевания [73, 309, 310]. Выявление различий между проявлениями нормального старения (*successful aging*) и возрастных заболеваний является одной из важных задач геронтологии. В экспериментах на клеточных культурах мы не обнаружили влияния ингибиторов PARP на выживаемость клеток при их длительном культивировании в стационарных культурах, тогда как при действии сильного окислительного/генотоксического стресса они проявляли ярко выраженное цитопротекторное действие.

Анализ литературы показывает, что для эффективного подавления активности PARP могут быть использованы не только лекарственные средства, содержащие синтетические ингибиторы PARP, но также и природные соединения, обладающие высоким PARP-ингибиторным потенциалом. Среди последних особого внимания, на наш

взгляд, заслуживают флавоноиды. Было показано, что прием с пищей флавоноидов положительно влияет на здоровье человека и способствует замедлению развития возрастных заболеваний [311]. Выявленные эффекты флавоноидов, как правило, связывают с их антиоксидантным и противовоспалительным действием [311, 312].

В данном исследовании нами было установлено, что ряд флавоноидов и содержащий флавоноиды экстракт *Ginkgo biloba* (EGb 761) способны эффективно подавлять активность PARP. Однако следует обратить внимание на то, что длительное подавление активности PARP может, наряду с их положительными терапевтическими эффектами (ослабление последствий ишемии, хронического окислительного стресса и хронического воспаления), способствовать увеличению нестабильности генома и вероятности возникновения злокачественных новообразований.

## ВЫВОДЫ

1. С увеличением длительности культивирования клеток китайского хомячка линии ВП-dii-FAF28 в стационарной фазе роста (при моделировании «стационарного старения» клеток *in vivo*) происходит постепенное увеличение базального уровня поли(ADP-рибозы) в клетках и снижение способности клеток к поли(ADP-рибозил)ированию белков в ответ на кратковременное действие высоких доз генотоксического агента H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Выявленные изменения в состоянии системы поли(ADP-рибозил)ирования белков указывают на снижение надежности функционирования поддерживаемых ею систем репарации ДНК при «стационарном старении» клеток.
2. По мере «стационарного старения» клеток ВПd-ii-FAF28 происходит постепенное снижение стимулированной дезоксиолигонуклеотидом активности поли(ADP-рибоза)-полимераз и увеличение их нестимулированной активности в пермеабелизованных клетках. Наблюдаемое снижение стимулированной активности поли(ADP-рибоза)-полимераз, преимущественно зависящей от содержания активных форм поли(ADP-рибоза)-полимераз-1 и -2, не связано со снижением уровней экспрессии кодирующих их генов. Обнаружено, что уровни экспрессии генов *Parp1* и *Parp2* в клетках ВПd-ii-FAF28 возрастают в ходе их «стационарного старения».
3. Выявленные изменения в показателях активности системы поли(ADP-рибозил)ирования белков хорошо коррелируют с известными проявлениями «стационарного старения» клеток в культуре: снижением жизнеспособности клеток и накоплением в культуре сенесцентных клеток. Предложено использовать безразмерные показатели, отражающие способность клетки активировать поли(ADP-рибозил)ирование белков в ответ на вновь возникающие повреждения ДНК (1-HCA/CA или 1-PAR<sub>b</sub>/PAR<sub>s</sub>), в качестве нового маркера возрастных изменений, характерных для старения организма, а также при тестировании биологически активных веществ на геропротекторное/геропроторное действие.
4. Фармакологическое ингибирование поли(ADP-рибоза)-полимераз не влияет на скорость развития и выраженность проявлений признаков «стационарного старения», но приводит к увеличению выживаемости клеток в условиях окислительного стресса.
5. Ряд флавоноид-содержащих лекарственных субстанций растительного происхождения (байкалеин, байкалин, кверцетин, экстракт *Ginkgo biloba* EGb 761) способны эффективно подавлять активность поли(ADP-рибоза)-полимераз. Показано, что гликозилированные производные флавонов менее активны в сравнении с их

негликозилированными аналогами. Производные изофлавонола и флавонола не оказывают ингибиторное действие на активность поли(ADP-рибоза)-полимераз.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Хочу выразить глубокую благодарность:

*Скулачеву Владимиру Петровичу* - за неоценимую помощь и советы в ходе написания работы;

*Ванюшину Борису Федоровичу* - за руководство научными исследованиями;

*Голиченкову Владимиру Александровичу* - за оказанную поддержку в течение всего времени обучения на кафедре;

*Хохлову Александру Николаевичу* - за руководство работой и обучение геронтологии в секторе эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ в течение многих лет;

*Шраму Станиславу Ивановичу* - за передачу навыков биохимической работы и неоценимую поддержку в ходе выполнения курсовой, дипломной и диссертационной работ;

*Ашапкину Василию Васильевичу* - за передачу навыков в области молекулярно-биологических исследований и за помощь в проведении ПЦР-анализа экспрессии генов;

*Кукушкиной (Владимировой) Инне Валерьевне и Ефремовой Анне Сергеевне* - за помощь в проведении экспериментов с культурами клеток;

*Доронину Юрию Константиновичу* - за рецензирование курсовой и дипломной работ и высказывание ценных критических замечаний, способствующих пониманию темы;

*Всем сотрудникам и коллегам по кафедре НИИФХБ имени АН. Белозерского* - за полученное образование и теплую дружескую атмосферу в процессе обучения и работы.

Кроме того, хочу выразить благодарность:

*Сидорову Денису Владимировичу* - за помощь в области компьютерной обработки данных;

*Чучиной Маргарите Игоревне* - за помощь в подготовке материалов;

*Любецкому Василию Александровичу* - за ценные советы и консультации.



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зайнуллин В.Г., Москалёв А.А. 2000. Роль генетической нестабильности в старении клетки // Генетика. Т. 36. № 8. С. 1013-1016.
2. Harman D. 1956. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry // J. Gerontol. Vol. 11. № 3. P. 298-300.
3. Fedintsev A., Kashtanova D., Tkacheva O., Strazhesko I., Kudryavtseva A., Baranova A., and Moskalev A. 2017. Markers of arterial health could serve as accurate non-invasive predictors of human biological and chronological age // Aging (Albany NY). Vol. 9. № 4. P. 1280-1292.
4. Hayflick L. 1976. The cell biology of human aging // New Engl. J. Med. Vol. 295. № 23. P. 1302–1308.
5. Kennedy B.K., Austriaco N. R. Jr, and Guarente L. 1994. Daughter cells of *Saccharomyces cerevisiae* from old mothers display a reduced life span // J. Cell. Biol. Vol. 127. № 6. Pt 2. P. 1985-1993.
6. Knorre D. A., Kulemzina I. A., Sorokin M. I., Kochmak S. A., Bocharova N. A., Sokolov S. S., and Severin F. F. (2010) Sir2-dependent daughter-to-mother transport of the damaged proteins in yeast is required to prevent high stress sensitivity of the daughters // Cell Cycle. Vol. 9. № 3. P. 4501-4505.
7. Kanungo M. 1980. *Biochemistry of Aging*. Academic Press, London.
8. Khokhlov A.N. 2013a. Does aging need its own program, or is the program of development quite sufficient for it? Stationary cell cultures as a tool to search for anti-aging factors // Curr. Aging Sci., Vol. 6. № 1. P. 14-20.
9. Gensler H.L., and Bernstein H. 1981. DNA damage as the primary cause of aging // Q. Rev. Biol. Vol. 56. № 3. P. 279-303.
10. d'Adda di Fagagna F. 2008. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response // Nat. Rev. Cancer. Vol. 8. № 7. P. 512-522.
11. Parsons J.L., Dianova I.I., Allinson S.L., and Dianov G.L. 2005. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 protects excessive DNA strand breaks from deterioration during repair in human cell extracts // FEBS J. Vol. 272. № 8. P. 2012-2021.
12. Lindahl T., Satoh M.S., Poirier G.G., and Klungland A. 1995. Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks // Trends Biochem. Sci. Vol. 20. № 10. P. 405-411.

13. Chatterjee S., Berger S.J., and Berger N.A. 1999. Poly(ADP-ribose) polymerase: a guardian of the genome that facilitates DNA repair by protecting against DNA recombination // *Mol. Cell. Biochem.* Vol. 193. № 1-2. P. 23-30.
14. Grube K., and Bürkle A. 1992. Poly(ADP-ribose) polymerase in mononuclear leukocytes of 13 mammalian species correlates with species-specific life span // *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 82. № 4. P. 11759-11763.
15. Dantzer F., Ménissier-de Murcia J., Barlow C., Wynshaw-Boris A., and de Murcia G. 1999a. Poly(ADP-ribose) polymerase activity is not affected in ataxia telangiectasia cells and knockout mice // *Carcinogenesis.* Vol. 20. № 1. P. 177–180.
16. Dantzer F., de La Rubia G., Ménissier-de Murcia J., Hostomsky Z., de Murcia G., and Schreiber V. 2000. Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking poly(ADP-ribose) polymerase-1 // *Biochemistry.* Vol. 39. № 25. P. 7559–7569.
17. Masutani M., Nozaki T., Nishiyama E., Shimokawa T., Tachi Y., Suzuki H., Nakagama H., Wakabayashi K., and Sugimura T. 1999. Function of poly (ADP-ribose) polymerase-in response to DNA damage: gene-disruption study in mice // *Mol. Cell. Biochem.* Vol. 193. № 1-2. P. 149-152.
18. Wang Z.-Q., Auer B., Stingl L. Berghammer H., Haidacher D., Schweiger M., and Wagner E.F. 1995. Mice lacking ADPRT and poly(ADP-ribosyl)ation develop normally but are susceptible to skin disease // *Genes Dev.* Vol. 9. № 5. P. 509–520.
19. Wang Z.-Q., Stingl L., Morrison C., Jantsch M., Los M., Schulze-Osthoff K., and Wagner E.F. 1997. PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis // *Genes Dev.* Vol. 11. № 18. P. 2347–2358.
20. Yélamos J., Monreal Y., Saenz L., Aguado E, Schreiber V., Mota R., Fuente T., Minguela A., Parrilla P., de Murcia G., Almarza E., Aparicio P., and Ménissier-de Murcia, J. 2006. PARP-2 deficiency affects the survival of CD4+CD8+ double-positive thymocytes // *EMBO J.* Vol. 25. № 18. P. 4350-4360.
21. Piskunova T.S., Yurova M.N., Ovsyannikov A.I., Semenchenko A.V., Zabezhinski M.A., Popovich I.G., Wang Z.-Q, and Anisimov V.N. 2008. Deficiency in Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) accelerates aging and spontaneous carcinogenesis in mice // *Curr. Gerontol. Geriatr. Res.* 2008. Article ID 754190.
22. Ménissier-de Murcia J., Ricoul M., Tartier L., Niedergang C., Huber A., Dantzer F., Schreiber V., Amé J.C., Dierich A., LeMeur M., Sabatier L., Chambon P., and de Murcia G. 2003. Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse // *EMBO J.* Vol. 22. № 9. P. 2255-2263.

23. Szabó C., and Dawson V.L. 1998. Role of poly(ADP-ribose) synthetase in inflammation and ischaemia-reperfusion // *Trends Pharmacol. Sci.* Vol. 19. № 7. P. 287-298.
24. Rouleau M., Patel A., Hendzel M.J., Kaufmann S.H., and Poirier G.G. 2010. PARP inhibition: PARP1 and beyond // *Nat. Rev. Cancer.* Vol. 10. №4. P. 293-301.
25. Кужир Т.Д. 1999. *Антимутагены и химический мутагенез в системах высших эукариот*, Изд-во Тэхналогія, Минск.
26. Shall S. 1995. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions // *Biochimie.* Vol.77. № 5. P. 313-318.
27. Hakmé A., Wong H.K., Dantzer F., and Schreiber V. 2008. The expanding field of poly(ADP-ribosyl)ation reactions. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' Review Series // *EMBO Rep.* Vol. 9. № 11. P. 1094-1100.
28. Luo X., and Kraus W.L. 2012. On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1 // *Genes Dev.* Vol. 26. № 5. P. 417-432.
29. Chambon P., Weill J. D., Doly J., Strosser M.T., and Mandel P. 1966. On the formation of novel adenylic compound by enzymatic extracts of liver nuclei // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 25. P. 638-643.
30. Chambon P., Weill J.D., and Mandel P. 1963. Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 11. P. 39-43.
31. Ueda K., and Hayaishi O. 1985. ADP-ribosylation // *Annu. Rev. Biochem.* Vol. 54. P. 73-100.
32. Gaal J.C., and Pearson C.K. 1985. Eukaryotic nuclear ADP-ribosylation reactions // *Biochem. J.* Vol. 230. № 1. P. 1-18.
33. Althaus F.R., and Richter C. 1987. ADP-ribosylation of proteins. Enzymology and biological significance // *Mol. Biol. Biochem. Biophys.* Vol. 37. P. 1-237.
34. Beneke S., Diefenbach J., and Bürkle A. 2004. Poly(ADP-ribosyl)ation inhibitors: promising drug candidates for a wide variety of pathophysiologic conditions // *Int. J. Cancer.* Vol. 111. № 6. P. 813–818.
35. D'Amours D., Desnoyers S., D'Silva I. and Poirier G.G. 1999. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions // *Biochem. J.* Vol. 342. Pt. 2. P. 249-268.
36. Auer B., Nagl U., Herzog H., Schneider R., and Schweiger M. 1989. Human nuclear NAD<sup>+</sup> ADP-ribosyltransferase(polymerizing): organization of the gene // *DNA.* Vol. 8. № 8. P. 575-580.

37. Sallmann F.R., Vodenicharov M.D., Wang Z.-Q., and Poirier G.G. 2000. Characterization of sPARP-1. An alternative product of PARP-1 gene with poly(ADP-ribose) polymerase activity independent of DNA strand breaks // *J. Biol. Chem.* Vol. 275. № 20. P. 15504-15511.
38. Amé J.-C., Rolli V., Schreiber V., Niedergang C., Apiou F., Decker P., Müller S., Hoger T., Ménissier-de Murcia J., and de Murcia G. 1999. Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is a novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase // *J. Biol. Chem.* Vol. 274. № 25. P. 17860-17868.
39. Smith S., Gariat I., Schmitt A., and de Lange T. 1998. Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres // *Science.* Vol. 282. № 5393. P. 1484-1487.
40. Kaminker P.G., Kim S.H., Taylor R.D., Zebarjadian Y., Funk W.D., Morin G.B., Yaswen P., and Campisi J. 2001. TANK2, a new TRF1-associated poly(ADP-ribose) polymerase, causes rapid induction of cell death upon overexpression // *J. Biol. Chem.* Vol. 276. № 38. P. 35891-35899.
41. Augustin A., Spenlehauer C., Dumond H., Ménissier-De Murcia J., Piel M., Schmit A.C., Apiou F., Vonesch J.L., Kock M., Bornens M., and De Murcia G. 2003. PARP-3 localizes preferentially to the daughter centriole and interferes with the G1/S cell cycle progression // *J. Cell. Sci.* Vol. 116. № 8. P. 1551-1562.
42. Kickhoefer V.A., Siva A.C., and Kedersha N.L. 1999. The 193-kD vault protein, VPARP, is a novel poly(ADP-ribose) polymerase // *J. Cell. Biol.* Vol. 146. № 5. P. 917-928.
43. Ogata N., Ueda K., Kawaichi M., and Hayaishi O. 1981. Poly(ADP-ribose) synthetase, a main acceptor of poly(ADP-ribose) in isolated nuclei // *J. Biol. Chem.* Vol. 256. № 9. P. 4135-4137.
44. Nakajima H., Nagaso H., Kakui N., Ishikawa M., Hiranuma T., and Hoshiko S. 2004. Critical role of the automodification of PARP-1 in nuclear factor-kappa B-dependent gene expression in primary cultured mouse glial cells // *J. Biol. Chem.* Vol. 279. № 41. P. 42774-42786.
45. Gagnè J.P., Isabelle M., Lo K.S., Bourassa S., Hendzel M.J., Dawson V.L., Dawson T.M., and Poirier G.G. 2008. Proteome-wide identification of poly(ADP-ribose) binding proteins and poly(ADP-ribose)-associated protein complexes // *Nucleic Acids Res.* Vol. 36. № 22. P. 6959-6976.
46. Brochu G., Duchaine C., Thibeault L., Lagueux J., Shah G.M., and Poirier, G.G. 1994. Mode of action of poly(ADP-ribose) glycohydrolase // *Biochim. Biophys. Acta.* Vol. 1219. № 2. P. 342-350.

47. Desnoyers S., Shah G.M., Brochu G., Hoflack J.C, Verreault A., and Poirier G.G. 1995. Biochemical properties and function of poly(ADP-ribose) glycohydrolase // *Biochimie*. Vol. 77. № 6. P. 433-438.
48. Meyer-Ficca M.L., Meyer R.G., Coyle D.L., Jacobson E.L., and Jacobson M.K. 2004. Human poly(ADP-ribose) glycohydrolase is expressed in alternative splice variants yielding isoforms that localize to different cell compartments // *Exp. Cell. Res.* Vol. 297. № 2. P. 521-532.
49. Oka S., Kato J., and Moss J. 2006. Identification and characterization of a mammalian 39-kDa poly(ADP-ribose) glycohydrolase // *J. Biol. Chem.* Vol. 281. № 2. P. 705–713.
50. Niere M., Kernstock S., Koch-Nolte F. and Ziegler M. 2008. Functional localization of two poly(ADP-ribose)-degrading enzymes to the mitochondrial matrix // *Mol. Cell. Biol.* Vol. 28. № 2. P. 814-824.
51. Niere M., Mashimo M., Agledal L., Dölle C., Kasamatsu A., Kato J., Moss J. and Ziegler M. 2012. ADP-ribosylhydrolase 3 (ARH3), not poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) isoforms, is responsible for degradation of mitochondrial matrix-associated poly(ADP-ribose) // *J. Biol. Chem.* Vol. 287. № 20. P. 16088-16102.
52. Okayama H., Honda M., and Hayaishi O. 1978. Novel enzyme from rat liver that cleaves an ADP-ribosyl histone linkage // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 75. № 5. P. 2254-2257.
53. Oka J., Ueda K., Hayaishi O., Hayaishi O., Komura H., and Nakanishi K. 1984. ADP-ribosyl protein lyase. Purification, properties, and identification of the product // *J. Biol. Chem.* Vol. 259. № 2. P. 986–995.
54. Meyer R.G., Meyer-Ficca M.L., Jacobson E.L., and Jacobson M.K. 2003. Human poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) gene and the common promoter sequence it shares with inner mitochondrial membrane translocase 23 (TIM23) // *Gene.* Vol. 314. P. 181–190.
55. Wang Y., Kim N.S., Haince J.F. Kang H.C., David K.K, Andrabi S.A, Poirier G.G., Dawson V.L., and Dawson T.M. 2011. Poly(ADP-ribose) (PAR) binding to apoptosis-inducing factor is critical for PAR polymerase-1-dependent cell death (parthanatos) // *Sci. Signal.* Vol. 4. № 167. P. 1-13.
56. Davidovic L., Vodenicharov M., Affar E.B., and Poirier G.G. 2001. Importance of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the control of poly(ADP-ribose) metabolism // *Exp. Cell. Res.* Vol. 268. № 1. P. 7-13.

57. Kaiser P., Auer B., and Schweiger M. 1992. Inhibition of cell proliferation in *Saccharomyces cerevisiae* by expression of human NAD<sup>+</sup> ADP-ribosyltransferase requires the DNA binding domain ("zinc fingers") // *Mol. Gen. Genet.* Vol. 232. № 2. P. 231-239.
58. Koh D.W., Lawler A.M, Poitras M.F., Sasaki M., Wattler S., Nehls M.C., Stöger T., Poirier G.G., Dawson V.L., and Dawson T.M. 2004. Failure to degrade poly(ADP-ribose) causes increased sensitivity to cytotoxicity and early embryonic lethality // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 101. № 51. P. 17699-17704.
59. Cortes U., Tong W.M., Coyle D.L., Meyer-Ficca M.L., Meyer R.G., Petrilli V., Herceg Z., Jacobson E.L., Jacobson M.K., and Wang Z.-Q. 2004. Depletion of the 110-kilodalton isoform of poly(ADP-ribose) glycohydrolase increases sensitivity to genotoxic and endotoxic stress in mice // *Mol. Cell. Biol.* Vol. 24. № 16. P. 7163-7178.
60. Burns D.M., Ying W., Kauppinen T.M., Zhu K., and Swanson R.A. 2009. Selective down-regulation of nuclear poly(ADP-ribose) glycohydrolase // *PLoS One.* Vol. 4. № 3. e4896.
61. Gao H., Coyle D.L., Meyer-Ficca M.L., Meyer R.G., Jacobson E.L., Wang Z.-Q, and Jacobson, M.K. 2007. Altered PAR metabolism impairs cellular responses to genotoxic stress in a hypomorphic mutant of PARG // *Exp. Cell. Res.* Vol. 313. № 5. P. 984-996.
62. Ménissier-de Murcia J., Niedergang C., Trucco C., Ricoul M., Dutrillaux B., Mark M., Oliver F.J., Masson M., Dierich A., LeMeur M., Walztinger C., Chambon P., and de Murcia G. 1997. Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 94. № 14. P. 7303–7307.
63. Trucco C., Oliver F.J., de Murcia G., and Ménissier-de Murcia J. 1998. DNA repair defect in poly(ADP-ribose) polymerase-deficient cell lines // *Nucleic Acids Res.* Vol. 26. № 11. P. 2644-2649.
64. Simbulan-Rosenthal C.M., Haddad B.R., Rosenthal D.S., Weaver Z., Coleman A., Luo R., Young H.M., Wang, Z.-Q., Ried T., and Smulson M.E. 1999. Chromosomal aberrations in PARP(-/-) mice: genome stabilization in immortalized cells by reintroduction of poly(ADP-ribose) polymerase cDNA // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 96. № 23. P. 13191–13196.
65. Пискунова Т.С. Юрова М.Н., Забежинский М.А., Анисимов В.Н. 2007. Поли(АДФ-рибоза) полимеразы – связь с продолжительностью жизни и канцерогенезом // *Успехи геронтол.* Т. 20. № 2. С. 82–90.
66. Пискунова Т.С., Забежинский М.Л., Попович И.Г., Семенченко А.В., Коваленко И.Г., Порошина Т.Е., Тындык М.Л., Анисимов В.Н. 2010. Особенности канцерогенеза и старения у мышей-самцов, нокаутных по гену ПАРП-1 // *Вопр. онкол.* Т. 56. №3. С. 321–326.

67. Shieh W.M., Amé J.-C., Wilson M.V., Wang Z.-Q., Koh D.W., Jacobson M.K., and Jacobson E.L. 1998. Poly(ADP-ribose) polymerase null mouse cells synthesize ADP-ribose polymers // *J. Biol. Chem.* Vol. 273. № 46. P. 30069–30072.
68. Schreiber V., Amé J.-C., Dollé P., Schultz I., Rinaldi B., Fraulob V., Ménissier-de Murcia J., and de Murcia, G. 2002. Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1 // *J. Biol. Chem.* Vol. 277. P. 23028–23036.
69. Raval-Fernandes S., Kickhoefer V.A., Kitchen C., and Rome L.H. 2005. Increased susceptibility of vault poly (ADP-ribose) polymerase-deficient mice to carcinogen-induced tumorigenesis // *Cancer Res.* Vol. 65. № 19. P. 8846–8852.
70. Chiang Y.J., Nguyen M.L., Gurunathan S., Kaminker P., Tessarollo L., Campisi J., and Hodes R.J. 2006. Generation and characterization of telomere length maintenance in tankyrase 2-deficient mice // *Mol. Cell. Biol.* Vol. 26. № 6. P. 2037–2043.
71. Chiang Y.J., Hsiao S.J., Yver D., Cushman S.W., Tessarollo L., Smith S., and Hodes R.J. 2008. Tankyrase 1 and tankyrase 2 are essential but redundant for mouse embryonic development // *PLoS ONE.* Vol. 3. № 7. e2639.
72. Tanigawa Y., Kawamura M., Kitamura A., and Shimoyama M. 1978. Suppression and stimulation of DNA synthesis by ADP-ribosylation of nuclear proteins from adult hen and chick embryo liver // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 81. № 4. P. 1278-1285.
72. Yeh T.Y., Beiswenger K.K., Li P., Bolin K.E., Lee R.M., Tsao T.S., Murphy A.N., Hevener A.L., and Chi N.W. 2009. Hypermetabolism, hyperphagia, and reduced adiposity in tankyrase-deficient mice // *Diabetes.* Vol. 58. № 11. P. 2476-2485.
73. Berger N.A. 1985. Poly(ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage // *Radiat. Res.* Vol. 101. № 1. P. 4-15.
74. Chiarugi A. 2002. Poly(ADP-ribose) polymerase: killer or conspirator? The 'suicide hypothesis' revisited // *Trends Pharmacol. Sci.* Vol. 23. № 3. P. 122-129.
75. Yu S.W., Wang H., Poitras M.F., Coombs C., Bowers W.J., Federoff H.J., Poirier G.G., Dawson T.M. and Dawson V.L. 2002. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor // *Science.* Vol. 297. № 48. P. 259-263.
76. David K.K., Andrabi S.A. Dawson T.M., and Dawson V.L. 2009. Parthanatos, a messenger of death // *Front. Biosci.* Vol. 14. P. 1116-1128.
77. Meli E., Pangallo M., Baronti R., Chiarugi A., Cozzi A., Pellegrini-Giampietro D.E., and Moroni F. 2003. Poly(ADP-ribose) polymerase as a key player in excitotoxicity and post-ischemic brain damage // *Toxicol. Lett.* Vol. 139. № 2-3. P. 153-162.

78. Zheng J., Devalaraja-Narashimha K., Singaravelu K., and Padanilam B.J. 2005. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 gene ablation protects mice from ischemic renal injury // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* Vol. 288. № 2. P. 387-398.
79. Cantó C., and Auwerx J. 2009. Caloric restriction, SIRT1 and longevity // *Trends Endocrinol. Metab.* Vol. 20. № 7. P. 325-331.
80. Li X., Klaus J.A., Zhang J., Xu Z., Kibler K.K., Andrabi S.A., Rao K., Yang Z.J., Dawson T.M., Dawson V.L., and Koehler R.C. 2010. Contributions of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and -2 to nuclear translocation of apoptosis-inducing factor and injury from focal cerebral ischemia // *J. Neurochem.* Vol. 113. № 4. P. 1012-1022.
81. Суханова М.В., Лаврик О.И., Ходырева С.Н. Поли(ADP-рибозо)полимераза-1 – регулятор белково-нуклеиновых взаимодействий в процессах, возникающих при генотоксическом воздействии // *Мол. биол. (Москва)*. 2004. Т. 38. № 5. С. 834-847.
82. Mortusewicz O., Amé J.-C., Schreiber V., and Leonhardt H. 2007. Feedback-regulated poly(ADP-ribosylation) by PARP-1 is required for rapid response to DNA damage in living cells // *Nucleic Acids Res.* Vol. 35. № 22. P. 7665-7675.
83. Althaus F.R., Kleczkowska H.E., Malanga M., Müntener C.R., Pleschke J.M., Ebner M., and Auer B. 1999. Poly ADP-ribosylation: a DNA break signal mechanism // *Mol. Cell. Biochem.* Vol. 193. №1-2. P. 5-11.
84. Pleschke J.M., Kleczkowska H.E., Strohm M., and Althaus F.R. 2000. Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins // *J. Biol. Chem.* Vol. 275. № 52. P. 40974-40980.
85. Dantzer F., Schreiber V., Niedergang C., Trucco C., Flatter E., De La Rubia G., Oliver J., Rolli V., Ménissier-de Murcia J., and de Murcia G. 1999b. Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase in base excision repair // *Biochimie.* Vol. 81. № 1-2. P. 69-75.
86. Allinson S.L., Dianova I.I., and Dianov G.L. 2003. Poly(ADP-ribose) polymerase in base excision repair: always engaged, but not essential for DNA damage processing // *Acta Biochim.* Vol. 50. № 1. P. 169–179.
87. Woodhouse B.C., and Dianov G.L. 2008. Poly ADP-ribose polymerase-1: an international molecule of mystery // *DNA Repair (Amst.)*. Vol. 7. № 7. P. 1077-1086.
88. Caldecott K.W., Aoufouchi S., Johnson P., and Shall S. 1996. XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' *in vitro* // *Nucleic Acids Res.* Vol. 24. № 22. P. 4387-4394.



89. Kubota Y., Nash R.A., Klungland A., Schär P., Barnes D.E., and Lindahl T. 1996. Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase  $\beta$  and XRCC1 protein // *EMBO J.* Vol 15. № 23. P. 6662-6670.
90. Masson M., Niedergang C., Schreiber V., Muller S., Ménissier-de Murcia J., and de Murcia G. 1998. XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage // *Mol. Cell. Biol.* Vol. 18. № 6. P. 3563-3571.
91. Lavrik O.I., Prasad R., Sobol R.W., Horton J.K., Ackerman E.J., and Wilson S.H. 2001. Photoaffinity labeling of mouse fibroblast enzymes by a base excision repair intermediate. Evidence for the role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in DNA repair // *J. Biol. Chem.* Vol. 276. № 27. P. 25541-25548.
92. Okano S., Lan L., Caldecott K.W., Mori T., and Yasui A. 2003. Spatial and temporal cellular responses to single-strand breaks in human cells // *Mol. Cell. Biol.* Vol. 23. № 11. P. 3974-3981.
93. Molinete M., Vermeulen W., Bürkle A., Ménissier-de Murcia J., Küpper J.-H., Hoeijmakers J.H., and de Murcia G. 1993. Overproduction of the poly(ADP-ribose) polymerase DNA-binding domain blocks alkylation-induced DNA repair synthesis in mammalian cells // *EMBO J.* Vol. 12. № 5. P. 2109–2117.
94. Schreiber V., Hunting D., Trucco C., Gowans B., Grunwald D., de Murcia G., and Ménissier-de Murcia J. 1995. A dominant-negative mutant of human poly(ADP-ribose) polymerase affects cell recovery, apoptosis, and sister chromatid exchange following DNA damage // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 92. № 11. P. 4753-4757.
95. Maruta H., Matsumura N., and Tanuma S. 1997. Role of (ADP-ribose)<sub>n</sub> catabolism in DNA repair // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 236. № 2. P. 265-269.
96. Maruta H., Okita N., Takasawa R., Uchiumi F., Hatano T., and Tanuma S. 2007. The involvement of ATP produced via (ADP-Ribose)<sub>n</sub> in the maintenance of DNA replication apparatus during DNA repair // *Biol. Pharm. Bull.* Vol. 30. № 3. P. 447–450.
97. Oei S.L., and Ziegler M. 2000. ATP for the DNA ligation step in base excision repair is generated from poly(ADP-ribose) // *J. Biol. Chem.* Vol. 275. № 30. P. 23234-23239.
98. Alvarez-Gonzalez R., and Althaus F.R. 1989. Poly(ADP-ribose) catabolism in mammalian cells exposed to DNA-damaging agents // *Mutat. Res.* Vol. 218. №2. P. 67-74.
99. Jacobson E.L., Giacomoni P.U., Roberts M.J., Wondrak G.T., and Jacobson M.K. 2001. Optimizing the energy status of skin cells during solar radiation // *J. Photochem. Photobiol. B.* Vol. 63. № 1-3. P. 141-147.

100. Vodenicharov M.D., Ghodgaonkar M.M., Halappanavar S.S., Shah R.G., and Shah G.M. 2005. Mechanism of early biphasic activation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in response to ultraviolet B radiation // *J. Cell. Sci.* Vol. 118. Pt. 3. P. 589-599.
101. Ghodgaonkar M.M., Zagal N., Kassam S., Rainbow A.J., and Shah G.M. 2008. Depletion of poly(ADP-ribose) polymerase-1 reduces host cell reactivation of a UV-damaged adenovirus-encoded reporter gene in human dermal fibroblasts // *DNA Repair (Amst.)*. Vol. 7. № 4. P. 617-632.
102. Fahrner J., Kranaster R., Altmeyer M., Marx A., and Bürkle A. 2007. Quantitative analysis of the binding affinity of poly(ADP-ribose) to specific binding proteins as a function of chain length // *Nucleic Acids Res.*, Vol. 35. № 21. e143.
103. King B.S., Cooper K.L., Liu K.J., and Hudson L.G. 2012. Poly(ADP-ribose) contributes to an association between poly(ADP-ribose) polymerase-1 and xeroderma pigmentosum complementation group A in nucleotide excision repair // *J. Biol. Chem.* Vol. 287. № 47. P. 39824-39833.
104. Fitch M.E., Nakajima S., Yasui A., and Ford J.M. 2007. *In vivo* recruitment of XPC to UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers by the DDB2 gene product // *J. Biol. Chem.* Vol. 278. № 47. P. 46906-46910.
105. Pines A., Vrouwe M.G., Martejijn J.A., Typas D., Luijsterburg M.S., Cansoy M., Hensbergen P., Deelder A., de Groot A., Matsumoto S., Sugawara K., Thoma N., Vermeulen W., Vrieling H., and Mullenders L. 2012. PARP1 promotes nucleotide excision repair through DDB2 stabilization and recruitment of ALC1 // *J. Cell. Biol.* Vol. 199. № 2. P. 235-249.
106. Mao Z., Hine C., Tian X., Van Meter M., Au M., Vaidya A., Seluanov A., and Gorbunova V. 2011. SIRT6 promotes DNA repair under stress by activating PARP1 // *Science*. Vol. 332. № 6036. P. 1443-1446.
107. Magnusson J., and Ramel C. 1990. Inhibitor of poly(ADP-ribose)transferase potentiates the recombinogenic but not the mutagenic action of alkylating agents in somatic cells *in vivo* in *Drosophila melanogaster* // *Mutagenesis*. Vol. 5. № 5. P. 511-514.
108. Morgan W.F., and Cleaver J.E. 1982. 3-Aminobenzamide synergistically increases sister-chromatid exchanges in cells exposed to methyl methanesulfonate but not to ultraviolet light // *Mutat. Res.* Vol. 104. № 6. P. 361-366.
109. Bürkle A., Meyer T., Hilz H., and zur Hausen H. 1987. Enhancement of N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced DNA amplification in a Simian Virus 40-transformed Chinese Hamster cell line by 3-aminobenzamide // *Cancer Res.* Vol. 47. № 14. P. 3632-3636.

110. Waldman A.S., and Waldman B.C. 1991. Stimulation of intrachromosomal homologous recombination in mammalian cells by an inhibitor of poly(ADP-ribosylation) // *Nucleic Acids Res.* Vol. 19. № 21. P. 5943–5947.
111. Tatsumi-Miyajima J., Küpper J.-H., Takebe H., and Bürkle A. 1999. Trans-dominant inhibition of poly(ADP-ribosylation) potentiates alkylation-induced shuttle-vector mutagenesis in Chinese hamster cells // *Mol. Cell. Biochem.* Vol. 193. № 1-2. P. 31-35.
112. Küpper J.-H., Müller M., and Bürkle A. 1996. Trans-dominant inhibition of poly(ADP-ribosylation) potentiates carcinogen induced gene amplification in SV40-transformed Chinese hamster cells // *Cancer Res.* Vol. 56. № 12. P. 2715-2717.
113. Ding R., Pommier Y., Kang V.H., and Smulson M. 1992. Depletion of poly (ADP-ribose) polymerase by antisense RNA expression results in a delay in DNA strand break rejoining // *J. Biol. Chem.* Vol. 267. № 18. P. 12804-12812.
114. Stevnsner T., Ding R., Smulson M., and Bohr V.A. 1994. Inhibition of gene-specific repair of alkylation damage in cells depleted of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nucleic Acids Res.* Vol. 22. № 22. P. 4620-4624.
115. Bürkle A. 2000. Poly(ADP-ribosylation): a posttranslational protein modification linked with genome protection and mammalian longevity // *Biogerontology.* Vol. 1. № 1. P. 41-46.
116. Semighini C.P., Savoldi M., Goldman G.H., and Harris,S.D. 2006. Functional characterization of the putative *Aspergillus nidulans* poly(ADP-ribose) polymerase homolog PrpA // *Genetics.* Vol. 173. № 1. P. 87-98.
117. Kothe G.O., Kitamura M., Masutani M., Selker E.U., and Inoue H. 2010. PARP is involved in replicative aging in *Neurospora crassa* // *Fungal Genet. Biol.* Vol 47. № 4. P. 297-309.
118. Espejel S., Klatt P., Ménissier-de Murcia J., Martín-Caballero J., Flores J.M., Taccioli G., de Murcia G., and Blasco M.A. 2004. Impact of telomerase ablation on organismal viability, aging, and tumorigenesis in mice lacking the DNA repair proteins PARP-1, Ku86, or DNA-PKcs // *J. Cell. Biol.* Vol. 167. № 4. P. 627–638.
119. Dantzer F., Giraud-Panis M.J., Jaco I., Amé J.-C., Schultz I., Blasco M., Koering C.E., Gilson E., Ménissier-de Murcia J., de Murcia G., and Schreiber V. 2004. Functional interaction between poly(ADP-Ribose) polymerase 2 (PARP-2) and TRF2: PARP activity negatively regulates TRF2 // *Mol. Cell. Biol.* Vol. 24. № 4. P. 1595-1607.
120. O'Connor M.S., Safari A., Liu D., Qin J., and Songyang Z. 2004. The human Rap1 protein complex and modulation of telomere length // *J. Biol. Chem.* Vol. 279. № 27. P. 28585-28591.

121. Goodarzi A.A., and Lees-Miller S.P. 2004. Biochemical characterization of the ataxia-telangiectasia mutated (ATM) protein from human cells // *DNA Repair (Amst)*. Vol. 3. № 7. P. 753-767.
122. von Kobbe C., Harrigan J.A., May A., Opresko P.L., Dawut L., Cheng W.H., and Bohr V.A. 2003. Central role for the Werner syndrome protein/poly(ADP-ribose) polymerase 1 complex in the poly(ADP-ribosyl)ation pathway after DNA damage // *Mol. Cell. Biol.* Vol. 23. № 23. P. 8601-8613.
123. Bürkle A., Brabeck C., Diefenbach J., and Beneke S. 2005. The emerging role of PARP-1 in longevity // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* Vol. 37. № 5. P. 1043-1053.
124. Deschênes F., Massip L., Garand C., and Lebel M. 2005. *In vivo* misregulation of genes involved in apoptosis, development and oxidative stress in mice lacking both functional Werner syndrome protein and PARP-1 // *Hum. Mol. Genet.* Vol. 14. № 21. P. 3293-3308.
125. Lavoie J., Carter R., Drouin R., and Lebel M. 2005. Increased frequency of multiradial chromosome structures in mouse embryonic fibroblasts lacking functional Werner syndrome protein and PARP-1 // *Cancer Genet. Cytogenet.* Vol. 156. № 2. P. 134-143.
126. Thorslund, T., von Kobbe, C., Harrigan, J.A., Indig, F.E., Christiansen, M., Stevnsner, T., and Bohr, V.A. 2005. Cooperation of the Cockayne syndrome group B protein and PARP-1 in the response to oxidative stress // *Mol. Cell. Biol.* Vol. 25. № 17. P. 7625-7636.
127. Oshima J. 2000. The Werner syndrome protein: an update // *BioEssays*. Vol. 22. № 10. P. 894-901.
128. Lebel M., Lavoie J., Gaudreault I., Bronsard M., and Drouin R. 2003. Genetic cooperation between the Werner syndrome protein and poly(ADP-ribose) polymerase-1 in preventing chromatid breaks, complex chromosomal rearrangements, and cancer in mice // *Am. J. Pathol.* Vol. 162. № 5. P. 1559-1569.
129. Vijg J. 2000. Somatic mutations and aging: a re-evaluation // *Mutat. Res.* Vol. 447. № 1. P. 117-135.
130. Анисимов В.Н. (2008) *Молекулярные и физиологические механизмы старения*. Изд-во Наука, Санкт-Петербург.
131. Rajaei-Behbahani N., Schmezer P., Ramroth H., Bürkle A., Bartsch H., Dietz A., and Becher H. 2002. Reduced poly(ADP-ribosyl)ation in lymphocytes of laryngeal cancer patients: results of a case-control study // *Int. J. Cancer.* Vol. 98. № 5. P. 780-784.
132. Epstein J.H., and Cleaver J.E. 1992. 3-Aminobenzamide can act as a cocarcinogen for ultraviolet light-induced carcinogenesis in mouse skin // *Cancer Res.* Vol. 52. № 14. P. 4053-4054.

133. Bürkle A., Beneke S., Brabeck C., Leake A., Meyer R., and Muir M.-L. 2002. Poly(ADP-ribose) polymerase-1, DNA repair and mammalian longevity // *Exp. Gerontol.* Vol. 37. № 10-11. P. 1203-1205.
134. Csiszar A., Pacher P., Kaley G., and Ungvari Z. 2005. Role of oxidative and nitrosative stress, longevity genes and PARP in cardiovascular dysfunction associated with aging // *Curr. Vasc. Pharmacol.* Vol. 3. № 3. P. 285-291.
135. Jones D.S., Podolsky S.H., and Greene J.A. 2012. The burden of disease and the changing task of medicine // *N. Engl. J. Med.* Vol. 366. № 25. P. 2333-2338.
136. Pacher P., Vaslin A., Benko R., Mabley J.G., Liaudet L., Haskó G., Marton A., Bátkai S., Kollai M., and Szabó C. 2004. A new, potent PARP inhibitor improves cardiac and vascular dysfunction associated with advanced aging // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* Vol. 311. № 2. P. 485-491.
137. Radovits T., Seres L., Gero D., Berger I., Szabó C., Karck M., and Szabó G. 2007. Single dose treatment with PARP-inhibitor INO-1001 improves aging-associated cardiac and vascular dysfunction // *Exp. Gerontol.* Vol. 42. № 7. P. 676-685.
138. Koh D.W., Coyle D.L., Mehta N., Ramsinghani S., Kim H., Slama J.T., and Jacobson M.K. 2003. SAR analysis of adenosine diphosphate (hydroxymethyl)pyrrolidinediol inhibition of poly(ADP-ribose) glycohydrolase // *J. Med. Chem.* Vol. 46. № 20. P. 4322-4332.
139. Keil C., Petermann E., and Oei S. L. 2004. Tannins elevate the level of poly(ADP-ribose) in HeLa cell extracts // *Arch. Biochem. Biophys.* Vol. 425. № 1. P. 115-121.
140. Tanuma S., Tsai Y.J., Sakagami H., Konno K., and Endo H. 1989. Lignin inhibits (ADP-ribose)n glycohydrolase activity // *Biochem. Int.* Vol. 19. № 6. P. 1395-1402.
141. Formentini L., Arapistas P., Pittelli M., Jacomelli M., Pitozzi V., Menichetti S., Romani A., Giovannelli L., Moroni F., and Chiarugi A. 2008. Mono-galloyl glucose derivatives are potent poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) inhibitors and partially reduce PARP-1-dependent cell death // *Br. J. Pharmacol.* Vol. 155. № 8. P. 1235-1249.
142. Sun Y., Zhang T., Wang B., Li H., and Li P. 2012. Tannic acid, an inhibitor of poly(ADP-ribose) glycohydrolase, sensitizes ovarian carcinoma cells to cisplatin // *Anticancer Drugs.* Vol. 23. № 9. P. 979-990.
143. Steffen J.D., Coyle D.L., Damodaran K., Beroza P., and Jacobson M.K. 2011. Discovery and structure-activity relationships of modified salicylanilides as cell permeable inhibitors of poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) // *J. Med. Chem.* Vol. 54. №15. P. 5403-5413.
144. Albert J.M., Cao C., Kim K.W., Willey C.D., Geng L., Xiao D., Wang H., Sandler A., Johnson D.H., Colevas A.D., Low J., Rothenberg M.L., and Lu B. 2007. Inhibition of

poly(ADP-ribose) polymerase enhances cell death and improves tumor growth delay in irradiated lung cancer models // *Clin. Cancer Res.* Vol. 13. № 10. P. 3033-3042.

145. Clarke M.J., Mulligan E.A., Grogan P.T., Mladek A.C., Carlson B.L., Schroeder M.A., Curtin N.J., Lou Z., Decker P.A., Wu W., Plummer E.R., and Sarkaria J.N. 2009. Effective sensitization of temozolomide by ABT-888 is lost with development of temozolomide resistance in glioblastoma xenograft lines // *Mol. Cancer Ther.* Vol. 8. № 2. P. 407-414.

146. Donawho C.K., Luo Y., Penning T.D., Bauch J.L., Bouska J.J., Bontcheva-Diaz V.D., Cox B.F., DeWeese T.L., Dillehay L.E., Ferguson D.C., Ghoreishi-Haack N.S., Grimm D.R., Guan R., Han E.K., Holley-Shanks R.R., Hristov B., Idler K.B., Jarvis K., Johnson E.F., Kleinberg L.R., Klinghofer V., Asko L.M., Liu X., Marsh K.C., McGonigal T.P., Meulbroek J.A., Olson A.M., Palma J.P., Rodriguez L.E., Shi Y., Stavropoulos J.A., Tsurutani A.C., Zhu G.D., Rosenberg S.H., Giranda V.L., and Frost D.J. 2007. ABT-888, an orally active poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor that potentiates DNA-damaging agents in preclinical tumor models // *Clin. Cancer Res.* Vol. 13. № 9. P. 2728-2737.

147. Horton T.M., Jenkins G., Pati D., Zhang L., Dolan M.E., Ribes-Zamora A., Bertuch A.A., Blaney S.M., Delaney S.L., Hegde M., and Berg S.L. 2009. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor ABT-888 potentiates the cytotoxic activity of temozolomide in leukemia cells: influence of mismatch repair status and O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity // *Mol. Cancer Ther.* Vol. 8. № 8. P. 2232-2242.

148. Liu S.K., Coackley C., Krause M., Jalali F., Chan N., and Bristow R.G. 2008a. A novel poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor, ABT-888, radiosensitizes malignant human cell lines under hypoxia // *Radiother. Oncol.* Vol. 88. № 2. P. 258–268.

149. Liu X., Shi Y., Guan R., Donawho C., Luo Y., Palma J., Zhu G.D., Johnson E.F., Rodriguez L.E., Ghoreishi-Haack N., Jarvis K., Hradil V.P., Colon-Lopez M., Cox B.F., Klinghofer V., Penning T., Rosenberg S.H., Frost D., Giranda V.L., and Luo Y. 2008b. Potentiation of temozolomide cytotoxicity by poly(ADP)ribose polymerase inhibitor ABT-888 requires a conversion of single-stranded DNA damages to double-stranded DNA breaks // *Mol. Cancer Res.* Vol. 6. № 10. P. 1621-1629.

150. Penning T.D., Zhu G.D., Gandhi V.B., Gong J., Liu X., Shi Y., Klinghofer V., Johnson E.F., Donawho C.K., Frost D.J., Bontcheva-Diaz V., Bouska J.J., Osterling D.J., Olson A.M., Marsh K.C., Luo Y., and Giranda V.L. 2009. Discovery of the poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor 2-[(R)-2-methylpyrrolidin-2-yl]-1H-benzimidazole-4-carboxamide (ABT-888) for the treatment of cancer // *J. Med. Chem.* Vol. 52. № 2. P. 514-523.

151. Plummer R., Jones C., Middleton M., Wilson R., Evans J., Olsen A., Curtin N., Boddy A., McHugh P., Newell D., Harris A., Johnson P., Steinfeldt H., Dewji R., Wang D.,

Robson L., and Calvert H. 2008. Phase I study of the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor, AG014699, in combination with temozolomide in patients with advanced solid tumors // Clin. Cancer Res. Vol. 14. № 23. P. 7917-7923.

152. Daniel R.A., Rozanska A.L., Thomas H.D., Mulligan E.A., Drew Y., Castelbuono D.J., Hostomsky Z., Plummer E.R., Boddy A.V., Tweddle D.A., Curtin N.J., and Clifford S.C. 2009. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase-1 enhances temozolomide and topotecan activity against childhood neuroblastoma // Clin. Cancer Res. Vol. 15. № 4. P. 1241-1249.

153. Thomas H.D., Calabrese C.R., Batey M.A., Canan S., Hostomsky Z., Kyle S., Maegley K.A., Newell D.R., Skalitzky D., Wang L.Z., Webber S.E., and Curtin N.J. 2007. Preclinical selection of a novel poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor for clinical trial // Mol. Cancer Ther. Vol. 6. № 3. P. 945-956.

154. Dungey F.A., Caldecott K.W., and Chalmers A.J. 2009. Enhanced radiosensitization of human glioma cells by combining inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase with inhibition of heat shock protein 90 // Mol. Cancer Ther. Vol. 8. № 8. P. 2243-2254.

155. Dungey F.A., Loser D.A., and Chalmers A.J. 2008. Replication-dependent radiosensitization of human glioma cells by inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase: mechanisms and therapeutic potential // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. Vol. 72. № 4. P. 1188-1197.

156. Evers B., Drost R., Schut E., de Bruin M., van der Burg E., Derksen P.W., Holstege H., Liu X., van Drunen E., Beverloo H.B., Smith G.C., Martin N.M., Lau A., O'Connor M.J., and Jonkers J. 2008. Selective inhibition of BRCA2-deficient mammary tumor cell growth by AZD2281 and cisplatin // Clin. Cancer Res. Vol. 14. № 12. P. 3916-3925.

157. Hay T, Matthews J.R., Pietzka L., Lau A., Cranston A., Nygren A.O., Douglas-Jones A., Smith G.C., Martin N.M., O'Connor M., and Clarke A.R. 2009. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor treatment regresses autochthonous Brca2/p53-mutant mammary tumors *in vivo* and delays tumor relapse in combination with carboplatin // Cancer Res. Vol. 69. № 9. P. 3850-3855.

158. Menear K.A., Adcock C., Boulter R., Cockcroft X.L., Copsey L., Cranston A., Dillon K.J., Drzewiecki J., Garman S., Gomez S., Javaid H., Kerrigan F., Knights C., Lau A., Loh V.M. Jr., Matthews I.T., Moore S., O'Connor M.J., Smith G.C., and Martin N.M. 2008. 4-[3-(4-cyclopropanecarbonylpiperazine-1-carbonyl)-4-fluorobenzyl]-2H-phthalazin-1-one: a novel bioavailable inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase-1 // J. Med. Chem. Vol. 51. № 20. P. 6581-6591.

159. Rottenberg S., Jaspers J.E., Kersbergen A., van der Burg E., Nygren A.O., Zander S.A., Derksen P.W., de Bruin M., Zevenhoven J., Lau A., Boulter R., Cranston A., O'Connor

M.J., Martin N.M., Borst P., and Jonkers J. 2008. High sensitivity of BRCA1-deficient mammary tumors to the PARP inhibitor AZD2281 alone and in combination with platinum drugs // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 105. № 44. P. 17079-17084.

160. Mendeleyev J., Kirsten E., Hakam A., Buki K.G., and Kun E. 1995. Potential chemotherapeutic activity of 4-iodo-3-nitrobenzamide. Metabolic reduction to the 3-nitroso derivative and induction of cell death in tumor cells in culture // *Biochem. Pharmacol.* Vol. 50. № 5. P. 705-714.

161. Annunziata C.M., and O'Shaughnessy J. 2010. Poly (ADP-ribose) polymerase as a novel therapeutic target in cancer // *Clin. Cancer Res.* Vol. 16. № 18. P. 4517-4526.

162. Melisi D., Ossovskaya V., Zhu C., Rosa R., Ling J., Dougherty P.M., Sherman B.M., Abbruzzese J.L., and Chiao P.J. 2009. Oral poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor BSI-401 has antitumor activity and synergizes with oxaliplatin against pancreatic cancer, preventing acute neurotoxicity // *Clin. Cancer Res.* Vol. 15. № 20. P. 6367-6377.

163. Miknyoczki S., Chang H., Grobelny J., Pritchard S., Worrell C., McGann N., Ator M., Husten J., Deibold J., Hudkins R., Zulli A., Parchment R., and Ruggeri B. 2007. The selective poly(ADP-ribose) polymerase-1(2) inhibitor, CEP-8983, increases the sensitivity of chemoresistant tumor cells to temozolomide and irinotecan but does not potentiate myelotoxicity // *Mol. Cancer Ther.* Vol. 6. № 8. P. 2290-2302.

164. Jones P., Altamura S., Boueres J., Ferrigno F., Fonsi M., Giomini C., Lamartina S., Montegudo E., Ontoria J.M., Orsale M.V., Palumbi M.C., Pesci S., Roscilli G., Scarpelli R., Schultz-Fademrecht C., Toniatti C., and Rowley M. 2009. Discovery of 2-{4-[(3S)-Piperidin-3-yl] phenyl}-2H-indazole-7-carboxamide (MK-4827): a novel oral poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) inhibitor+ efficacious in BRCA-1 and -2 mutant tumors // *J. Med. Chem.* Vol. 52. № 22. P. 7170-7185.

165. Bravo L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance // *Nutr. Rev.* Vol. 56. № 11 P. 317-333.

166. Middleton E., Kandaswami C., and Theoharides T. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart diseases and cancer // *Pharmacol. Rev.* Vol. 52. № 4. P. 673-751.

167. Geraets L., Moonen H.J., Brauers K., Gottschalk R.W., Wouters E.F., Bast A., and Hageman G.J. 2007a. Flavone as PARP-1 inhibitor: its effect on lipopolysaccharide induced gene-expression // *Eur. J. Pharmacol.* Vol. 573. №1-3. P. 241-248.

168. Nakayama T., Yamada M., Osawa T., and Kawakishi S. 1993. Suppression of active oxygen-induced cytotoxicity by flavonoids // *Biochem. Pharmacol.* Vol. 45. №1. P. 265-267.



169. Contestabile A. 2001. Oxidative stress in neurodegeneration: mechanisms and therapeutic perspectives // *Curr. Top. Med. Chem.* Vol. 1. № 6. P. 553-568.
170. Paladini A.C., Marder M., Viola H., Wolfman C., Wasowski C., and Medina J.H. 1999. Flavonoids and the central nervous system: from forgotten factors to potent anxiolytic compounds // *J. Pharm. Pharmacol.* Vol. 51. №5. P. 519-526.
171. Hertog M., Feskens E., Hollman P., Katan M.B, and Kromhout D. 1993. Dietary antioxidant flavonoids and the risk of coronary heart disease // *Lancet.* Vol. 342. №8878. P. 1007-1011.
172. Hirvonen T., Pietinen P., Virtanen M., Ovaskainen M.L., Häkkinen S., Albanes D., and Virtamo J. 2001. Intake of flavonols and flavonones and the risk of coronary heart disease in male smokers // *Epidemiology.* Vol. 12. №1. P. 62-67.
173. Gramaglia A., Loi G., Mongioj V., and Baronzio G. 1999. Increased survival in metastatic patients treated with stereotactic radiotherapy, omega three fatty acids and bioflavonoids // *Anticancer Res.* Vol. 19. № 6C. P. 5583-5586.
174. Yule D.L., Rim E.T., and Williams J.A. 1994. Tyrosine kinase inhibitors attenuate capacitive Ca influx in rat pancreatic acinar cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 202. №3. P. 1697-1764.
175. Catarino M.D., Alves-Silva J.M., Pereira O.R., and Cardoso S.M. 2015. Antioxidant capacities of flavones and benefits in oxidative-stress related diseases // *Curr. Top. Med. Chem.* Vol. 15. №2. P. 105-119.
176. Yuan J., and Yancner B. 2000. Apoptosis in the nervous system // *Nature.* Vol. 407. № 6805. P. 802-809.
177. Serrano-García N., Pedraza-Chaverri J., Mares-Sámano J.J., Orozco-Ibarra M., Cruz-Salgado A., Jiménez-Anguiano A., Sotelo J., and Trejo-Solís C. 2013. Antiapoptotic Effects of EGb 761 // *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* Vol. 2013. P. 495703.
178. Jung E.B., and Lee C.S. 2014. Baicalein attenuates proteasome inhibition-induced apoptosis by suppressing the activation of the mitochondrial pathway and the caspase-8- and Bid-dependent pathways // *Eur. J. Pharmacol.* Vol. 730. P. 116-124.
179. Fatokun A.A., Liu J.O., Dawson V.L., and Dawson T.M. 2013. Identification through high-throughput screening of 4'-methoxyflavone and 3',4'-dimethoxyflavone as novel neuroprotective inhibitors of parthanatos // *Br. J. Pharmacol.* Vol. 169. №6. P. 1263-1278.
180. Li H.Y., Pan L., Ke Y.S., Batnasan E., Jin X.Q., Liu Z.Y., and Ba X.Q. 2014. Daidzein suppresses pro-inflammatory chemokine Cxcl2 transcription in TNF-O-stimulated murine lung epithelial cells via depressing PARP-1 activity // *Acta Pharmacol. Sin.* Vol. 35. №4. P. 496-503.

181. Yang H.H., Hwangbo K., Zheng M.S., Son J.K., Kim H.Y., Baek S.H., Choi H.C., Park S.Y., and Kim J.R. 2014. Inhibitory effects of juglanin on cellular senescence in human dermal fibroblasts // *J. Nat. Med.* Vol. 68. №3. P. 473-480.
182. Maeda J., Roybal E.J., Brents C.A., Uesaka M., Aizawa Y., and Kato T.A. 2014. Natural and glucosyl flavonoids inhibit poly(ADP-ribose) polymerase activity and induce synthetic lethality in BRCA mutant cells // *Oncol. Rep.* Vol. 31. №2. P. 551-556.
183. Narwal M., Fallarero A., Vuorela P., and Lehtiö L. 2012. Homogeneous screening assay for human tankyrase // *J. Biomol. Screen.* Vol. 17. № 5. P. 593-604.
184. Geraets L., Moonen H.J., Brauers K., Wouters E.F., Bast A., and Hageman G.J. 2007b. Dietary flavones and flavonoles are inhibitors of poly(ADP-ribose)polymerase-1 in pulmonary epithelial cells // *J. Nutr.* Vol. 137 №10. P. 2190-2195.
185. Weseler A.R., Geraets L., Moonen H.J., Manders R.J., van Loon L.J., Pennings H.J., Wouters E.F., Bast A., and Hageman G.J. 2009. Poly (ADP-ribose) polymerase-1-inhibiting flavonoids attenuate cytokine release in blood from male patients with chronic obstructive pulmonary disease or type 2 diabetes // *J. Nutr.* Vol. 139. №5. P. 952-957.
186. Wang H., and Joseph J.A. 1999. Structure-activity relationships of quercetin in antagonizing hydrogen peroxide-induced calcium dysregulation in PC 12 cells // *Free Radic. Biol. Med.* Vol. 27. № 5-6. P. 683-694.
187. Shinya K., Kumigami T., Kim J. S. and Seto H.; 1997. Protective effect of catechin against beta-amyloid toxicity in hippocampal-neurons and PC12 cells // *J. Neurochem.* Vol. 69. P. 41-42.
188. Doré S., Bastianetto S., Kar S., and Quirion R. 1999. Protective and rescuing abilities of IGF-1 and some putative free radical scavengers against beta-amyloid toxicity in neurons // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* Vol. 890. P. 356-364.
189. Bastianetto S. Ramassamy C., Doré S., Christen Y., Poirier J., and Quirion R. 2000. The ginkgo biloba extract (Erb 761) protects hippocampal neurons against cell death induced by beta-amyloid // *Eur. J. Neurosci.* Vol. 12. № 6. P. 1882-1890.
190. Hart R.W., and Setlow R.B. 1974. Correlation between deoxyribonucleic acid excision-repair and life-span in a number of mammalian species // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 71. № 6. P. 2169-2173.
191. Francis A.A., Lee W.H., and Regan J.D. 1981. The relationship of DNA excision repair of ultravioletinduced lesions to the maximum life span of mammals // *Mech. Ageing Dev.* Vol. 16. № 2. P. 181-189.

192. Kato H., Harada M., Tsuchiya K., and Moriwaki K. 1980. Absence of correlation between DNA repair in ultraviolet irradiated mammalian cells and life span of the donor species // *Jpn. J. Genet.* Vol. 55. № 2. P. 99-108.
193. Pero R.W., Holmgren K., and Persson L. Gamma-radiation induced ADP-ribosyl transferase activity and mammalian longevity // *Mutat. Res.* 1985. Vol. 142. № 1-2. P. 69-73.
194. Bürkle A., Müller M., Wolf I., and Küpper J.-H. Poly(ADP-ribose) polymerase activity in intact or permeabilized leukocytes from mammalian species of different longevity // *Mol. Cell. Biochem.* 1994. Vol. 138. № 1-2. P. 85–90.
195. Muiras M.-L., Müller M., Schächter F., and Bürkle A. 1998. Increased poly(ADP-ribose) polymerase activity in lymphoblastoid cell lines from centenarians // *J. Mol. Med.* Vol. 76. № 5. P. 346-354.
196. Chevanne M., Calia C., Zampieri M., Cecchinelli B., Caldini R., Monti D, Bucci L., Franceschi C., and Caiafa P. 2007. Oxidative DNA damage repair and parp 1 and parp 2 expression in Epstein-Barr virus-immortalized B lymphocyte cells from young subjects, old subjects, and centenarians // *Rejuvenation Res.* Vol. 10. № 2. P. 191-204.
197. Lisa A., Monti D., Franceschi C., and Ivana Scovassi A. 2009. Autoantibodies to poly(ADP-ribose) polymerase in centenarians: a reappraisal of Grabar's hypothesis // *Gerontology.* Vol. 55. № 4. P. 427-429.
198. Hurme M., Korkki S., Lehtimäki T., Karhunen P.J., Jylhä M., Hervonen A., and Pertovaara M. 2007. Autoimmunity and longevity: presence of antinuclear antibodies is not associated with the rate of inflammation or mortality in nonagenarians // *Mech. Ageing Dev.* Vol. 128. № 5-6. P. 407-408.
199. Grabar P. 1975. Auto-antibodies and immunological theories: an analytical review // *Clin. Immunol. Immunopathol.* Vol. 4. № 4. P. 453-466.
200. Muiras M.-L., and Bürkle A. 2000. Defending genomic stability over life span: a proposed role for PARP- 1 // *Exp. Gerontol.* Vol. 35. №6-7. P. 703-709.
201. Muiras M.-L. 2003. Mammalian longevity under the protection of PARP-1's multifacets // *Ageing Res. Rev.* Vol. 2. № 2. P. 129-148.
202. Shaposhnikov M.V., Moskalev A.A., and Plyusnina E.N. 2011. Effect of PARP-1 overexpression and pharmacological inhibition of NF- $\kappa$ B on the lifespan of *Drosophila melanogaster* // *Успехи геронтол.* 24. № 3. Т. 405–419.
203. Mangerich A., Scherthan H., Diefenbach J., Kloz U., van der Hoeven F., Beneke S. and Bürkle A. 2009. A caveat in mouse genetic engineering: ectopic gene targeting in ES cells by bidirectional extension of the homology arms of a gene replacement vector carrying human PARP-1 // *Transgenic Res.* Vol. 18. № 2. P. 261-279.

204. Mangerich A., Herbach N., Hanf B., Fischbach A., Popp O., Moreno-Villanueva M., Bruns O.T., and Bürkle A. 2010. Inflammatory and age-related pathologies in mice with ectopic expression of human PARP-1 // *Mech. Ageing Dev.* Vol. 131. № 6. P. 389-404.
205. De Benedictis G., Carotenuto L., Carrieri G., De Luca M., Falcone E., Rose G., Cavalcanti S., Corsonello F., Ferraco E., Baggio G., Bertolini S., Mari S., Mattace R., Yasshin A.I., Bonafe M., and Franceschi C. 1998. Gene/longevity association studies at four autosomal loci (REN, THO, PARP, SOD2) // *Eur. J. Hum. Genet.* Vol. 6. № 6. P. 534-541.
207. Infante, J., Sánchez-Juan P., Mateo I., Rodríguez-Rodríguez E., Sánchez-Quintana C., Llorca J., Fontalba A., Terrazas J., Oterino A., Berciano J., and Combarros O. 2007a. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) genetic variants are protective against Parkinson's disease // *J. Neurol. Sci.* Vol. 256. № 1-2. P. 68-70.
208. Love S., Barber R., and Wilcock G.K. 1999. Increased poly(ADP-ribosyl)ation of nuclear proteins in Alzheimer's disease // *Brain.* Vol. 122. Pt 2. P. 247-253.
209. Kauppinen T.M., and Swanson R.A. 2007. The role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in CNS disease // *Neuroscience.* Vol. 145. № 4. P. 1267-1272.
210. Infante J., Llorca J., Mateo I., Rodríguez-Rodríguez E., Sánchez-Quintana C., Sánchez-Juan P., Fernández-Viadero C., Peña N., Berciano J., and Combarros O. 2007b. Interaction between poly(ADP-ribose) polymerase 1 and interleukin 1A genes is associated with Alzheimer's disease risk // *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* Vol. 23. №4. P. 215-218.
211. Strosznajder J. B., Ješko H., and Strosznajder R. P. 2000. Effect of amyloid beta peptide on poly(ADP-ribose) polymerase activity in adult and aged rat hippocampus // *Acta Biochim. Pol.* Vol. 47. № 3. P. 847-854.
212. Strosznajder R.P., Ješko H., and Adamczyk A. 2005. Effect of aging and oxidative/genotoxic stress on poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity in rat brain // *Acta Biochim. Pol.* Vol. 52. № 4. P. 909-914.
213. Strosznajder J.B., Ješko H., and Strosznajder R.P. 2000. Age-related alteration of poly(ADP-ribose) polymerase activity in different parts of the brain // *Acta Biochim. Pol.* Vol. 47. № 2. P. 331-337.
214. Malanga M., Romano M., Ferone A., Petrella A., Monti G., Jones R., Limatola E., and Farina B. 2005. Misregulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity and cell type-specific loss of poly(ADP-ribose) synthesis in the cerebellum of aged rats // *J. Neurochem.* Vol. 93. № 4. P. 1000-1009.
215. Ушакова, Т.Е., Плосконосова, И.И., Гуляева, Н.А., Рассказова, Е.А., Газиев А.И. 2004. АДФ-рибозилирование белков в ядрах и митохондриях из тканей крыс разного возраста после воздействия  $\gamma$ -излучения // *Радиационная Биология. Радиоэкология.* Т. 44. № 5. С. 509-525.

216. Messripour M., Weltin D., Rastegar A., Ciesielski L., Kopp P., Chabert M.D., and Mandel P. 1994. Age-associated changes of rat brain neuronal and astroglial poly(ADP-ribose) polymerase activity // *J. Neurochem.* Vol. 62. № 2. P. 502-506.
217. Mishra S.K., and Das B.R. 1992. (ADP-ribosyl)ation pattern of chromosomal proteins during ageing // *Cell. Mol. Biol.* Vol. 38. № 4. P. 457-462.
218. Braidy N., Guillemin G.J., Mansour H., Chan-Ling T., Poljak A., and Grant R. 2011. Age related changes in NAD<sup>+</sup> metabolism oxidative stress and Sirt1 activity in Wistar rats // *PLoS One.* Vol. 6. № 4. e19194.
219. Quesada P., Faraone-Mennella M.R., Jones R., Malanga M., and Farina, B. 1990. ADP-ribosylation of nuclear proteins in rat ventral prostate during ageing // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 170. № 2. P. 900–907.
220. Bizec J.C., Klethi J., and Mandel P. 1989. Regulation of protein adenosine diphosphate ribosylation in bovine lens during aging // *Ophthalmic Res.* Vol. 21. № 3. P.175-183.
221. Mandel P. 1991. ADP-ribosylation: approach to molecular basis of aging // *Adv. Exp. Med. Biol.* Vol. 296. P. 329-343.
222. Schröder H.C., Steffen R., Wenger R., Ugarković D., and Müller W.E. 1989. Age-dependent increase of DNA topoisomerase II activity in quail oviduct; modulation of the nuclear matrix-associated enzyme activity by protein phosphorylation and poly(ADP-ribosyl)ation // *Mutat. Res.* Vol. 219. № 5-6. P. 283-294.
223. Thakur M.K., and Prasad S. 1990. ADP-ribosylation of HMG proteins and its modulation by different effectors in the liver of aging rats // *Mech. Ageing Dev.* Vol. 53. № 1. P. 91-100.
224. Massudi H., Grant R., Braidy N., Guest J., Farnsworth B., and Guillemin G.J. 2012. Age-associated changes in oxidative stress and NAD<sup>+</sup> metabolism in human tissue // *PLoS One.* Vol. 7. № 7. e42357.
225. Zaremba T., Thomas H.D., Cole M., Coulthard S.A., Plummer E.R., and Curtin N.J. 2011. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) pharmacogenetics, activity and expression analysis in cancer patients and healthy volunteers // *Biochem. J.* Vol. 436. № 3. P. 671–679.
226. O'Valle, F., Del Moral, R.G., Benítez, M.C., Martín-Oliva, D., Gómez-Morales, M., Aguilar, D., Aneiros-Fernández, J., Hernández-Cortés, P., Osuna, A., Moreso, F., Serón, D., Oliver, F.J., and Del Moral, R.G. 2004. Correlation of morphological findings with functional reserve in the aging donor: role of the poly (ADP-ribose) polymerase // *Transplant. Proc.* Vol. 36. № 3. P. 733-735.

227. Wagner A.P., Psarrou E., and Wagner L.P. 1982. Age changes of the isoelectric points of non-histone chromosomal proteins from rat liver in the pH range 5 to 8 // *Exp. Gerontol.* Vol. 17. № 5. P. 359-364.
228. Sweigert S.E., Marston J.M., and Dethlefsen L.A. 1990. Poly(ADP-ribose) metabolism in proliferating versus quiescent cells and its relationship to their radiation responses // *Int. J. Radiat. Biol.* Vol. 58. № 1. P.111-123.
229. Kun E., Kirsten E., Bauer P.I., and Ordahl C.P. 2006. Quantitative correlation between cellular proliferation and nuclear poly (ADP-ribose) polymerase (PARP-1) // *Int. J. Mol. Med.* Vol. 17. № 2. P. 293-300.
230. Salminen A., Helenius M., Lahtinen Korhonen T.P., Tapiola T., Soininen H., and Solovyan V. 1997. Down-regulation of Ku autoantigen, DNA-dependent protein kinase, and poly(ADP-ribose) polymerase during cellular senescence // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 38. № 3. P. 712-716.
231. Spina Purrello V., Cormaci G., Denaro L., Reale S., Costa A., Lalicata C., Sabbatini M., Marchetti B., and Avola R. 2002. Effect of growth factors on nuclear and mitochondrial ADP-ribosylation processes during astroglial cell development and aging in culture // *Mech. Ageing Dev.* Vol. 123. №5. P. 511-520.
232. Porteous J.W., Furneaux H.M., Pearson C.K., Lake C.M., and Morrison A. 1979. Poly(adenosine diphosphate ribose) synthetase activity in nuclei of dividing and of non-dividing but differentiating intestinal epithelial cells // *Biochem. J.* Vol. 180. № 3. P. 455-461.
233. Müller W.E., Totsuka A., Nusser I., Obermeier J., Rhode H.J., and Zahn R.K. 1974. Poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase in quail oviduct. Changes during estrogen and progesterone induction // *Nucleic Acids Res.* Vol. 1. № 10. P. 1317-1327.
234. Jackowski G., and Kun E. 1981. Age-dependent variation of rates of polyadenosine-diphosphoribose synthesis by cardiocyte nuclei and the lack of correlation of enzymatic activity with macromolecular size distribution of DNA // *J. Biol. Chem.* Vol. 256. № 8. P. 3667-3670.
235. Sorokin, M. I., Knorre, D. A., and Severin, F. F. 2014.. Early manifestations of replicative aging in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbial Cell.* Vol. 1. № 1. - P. 37-42.
236. Comfort A. 1979. *The Biology of Senescence.* Churchill Livingstone. Edinburgh and London.
237. Хохлов А. Н. 1988. Пролиферация и старение. Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР. Сер. "Общие пробл. физ.-хим. биологии". М.: ВИНТИ. Т. 9. С. 176.
238. Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Karmushakov A.F., Shilovsky G.A., Nasonov M.M., and Morgunova G.V. 2014. Testing of geroprotectors in experiments on cell cultures: choosing the correct model system // *Mosc. Univ. Biol. Sci. Bull.* Vol. 69. № 1. P. 10-14.

239. Khokhlov A.N. 2003. Cytogerontology at the beginning of the third millennium: from "correlative" to "gist" models // Russ. J. Dev. Biol. Vol. 34 № 5. P. 321-326.
240. Khokhlov A.N. 1992. Stationary cell cultures as a tool for gerontological studies // Ann. N. Y. Acad. Sci. Vol. 663. P. 475-476.
241. Leontieva O.V., and Blagosklonny M.V. 2014. Gerosuppression in confluent cells // Aging (Albany NY). Vol. 6. № 12. P. 1010-1018.
242. Виленчик М.М., Хохлов А.Н., Бердышев Г.Д. 1979. Уменьшенная способность к репарации одностранных разрывов ДНК у фибробластов взрослых людей по сравнению с эмбриональными фибробластами // Докл. АН СССР. Т. 248. № 4. С. 993-997.
242. Хохлов А.Н. 2010. От Карреля к Хейфлику и обратно, или чему нас научили 100 лет цитогеронтологических исследований // Радиационная Биология. Радиоэкология. Т. 50. С. 304–311.
243. Хохлов А.Н., Ушаков В.Л., Капитанов А.Б., Наджарян Т.Л. 1984. Влияние геропротектора хлоргидрата 2-этил-6-метил-3-оксипиридина на пролиферацию клеток *Acholeplasma laidlawii* // Доклады АН СССР. Т. 274. № 4. С. 930-933.
244. Nagarajan S., Kruckeberg A. L., Schmidt K. H., Kroll E., Hamilton M., McInnerney K., Summers R., Taylor T., and Rosenzweig F. 2014. Uncoupling reproduction from metabolism extends chronological lifespan in yeast // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 111, № 15. P. 1538-1547.
245. Chen Q., Ding Q., and Keller J.N. 2005. The stationary phase model of aging in yeast for the study of oxidative stress and age-related neurodegeneration // Biogerontology. Vol. 6. № 1. P. 1-13.
246. Dimri G.P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E.E., Linskens M., Rubelj I., Pereira-Smith O., Peacocke M., and Campisi J. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 92. № 20. P. 9363-9367.
247. Гладнева А.Д., Моргунова Г.В., Шиловский Г.А., Шрам С.И., Хохлов А.Н. Бета-галактозидаза pH 6.0 - биомаркер старения или ограничения клеточной пролиферации? // Усп. геронтол. 2014, Т. 27. № 2 (Прилож.). С. 29.
248. Krishna D.R., Sperker B., Fritz P., and Klotz U. 1999. Does pH 6 beta-galactosidase activity indicate cell senescence? // Mech. Ageing Dev. Vol. 109. № 2. P. 113-123.
249. Моргунова Г.В., Колесников А.В., Клебанов А.А., Хохлов А.Н. 2015. Ассоциированная со старением бета-галактозидаза – биомаркер старения, повреждения ДНК или ограничения клеточной пролиферации? // Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 16: Биология. № 4. С. 15-18.

250. Yegorov Y.E., Akimov S.S., Hass R., Zelenin A.V., and Prudovsky I.A. 1998. Endogenous beta-galactosidase activity in continuously nonproliferating cells // *Exp. Cell. Res.* Vol. 243. № 1. P. 207-211.
251. Severino J., Allen R.G., Balin S., Balin A., and Cristofalo V.J. 2000. Is beta-galactosidase staining a marker of senescence *in vitro* and *in vivo*? // *Exp. Cell. Res.* Vol. 257. № 1. P. 162-171.
252. Yang N.C., and Hu M.L. 2005. The limitations and validities of senescence associated-beta-galactosidase activity as an aging marker for human foreskin fibroblast Hs68 cells // *Exp. Gerontol.* Vol. 40. № 10. P. 813-819.
253. Noppe G., Dekker P., de Koning-Treurniet C., Blom J., van Heemst D., Dirks R.W., Tanke H.J., Westendorp R.G., and Maier A.B. 2009. Rapid flow cytometric method for measuring senescence associated beta-galactosidase activity in human fibroblasts // *Cytometry A.* Vol. 75. № 11. P. 910-916.
254. Gire V., and Wynford-Thomas D. 1998. Reinitiation of DNA synthesis and cell division in senescent human fibroblasts by microinjection of anti-p53 antibodies // *Mol. Cell. Biol.* Vol. 18. № 2. P. 1611-1621.
255. Serrano M., Lin A.W., McCurrach M.E., Beach D., and Lowe S.W. 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a // *Cell.* Vol. 88. № 5. P. 593-602.
256. Bassaneze V., Miyakawa A.A., and Krieger J.E. 2008. A quantitative chemiluminescent method for studying replicative and stress-induced premature senescence in cell cultures // *Anal. Biochem.* Vol. 372. № 2. P. 198-203.
257. Dell'Orco R.T., and Anderson L.E. 1991. Decline of poly(ADP-ribosyl)ation during *in vitro* senescence in human diploid fibroblasts // *J. Cell. Physiol.* Vol. 146. № 2. P. 216-221.
258. Zaniolo K., Rufiange A., Leclerc S., Desnoyers S., and Guérin S.L. 2005. Regulation of the PARP-1 gene expression by the transcription factors Sp1 and Sp3 is under the influence of cell density in primary cultured cells // *Biochem. J.* 2005. Vol.389. Pt 2. P. 423-433.
259. Акифьев А.П., Потапенко А.И. 2001. Ядерный генетический материал как инициальный субстрат старения животных // *Генетика.* Т. 37. № 11. С. 1445-1458.
259. Шрам С.И., Рыбакова И.Г., Лазуркина Т.Ю., Сидоров Г.В., Шиловский Г.А., Хохлов А.Н., Мясоедов Н.Ф. 1999. Ферментативный синтез селективно меченного тритием по аденину beta-NAD<sup>+</sup> и его использование для определения активности поли(ADP-рибоза)-полимеразы // *Прикл. биохим. микробиол.* Т. 35. № 6. С. 638-646
260. Greene L.A., and Tischler A.S. 1976. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor // *Proc. Natl. Acad.*



Sci. USA. Vol.73. №7. P. 2424-2428.

261. Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // *J. Immunol. Methods*. Vol. 65. №1-2. P.55-63.

262. Епифанова О.И., Терских В.В. 1969. Метод радиоавтографии в изучении клеточных процессов. М., Наука.

263. Ito S., Shizuta Y., and Hayaishi O. 1979. Purification and characterization of poly(ADP-ribose) synthetase from calf thymus / *J. Biol. Chem.* Vol. 254. № 9. P. 3647-3651.

264. Petzold S.J., Booth B.A., Leimbach G.A., Berger N.A. 1981. Purification and properties of poly(ADP-ribose) polymerase from lamb thymus // *Biochemistry*. Vol. 20. № 25. P. 7075-7081.

265. Hartree E.F. 1972. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response // *Anal. Biochem.* Vol. 48. № 2. P. 422-427.

266. Khokhlov A.N. 2013. Impairment of regeneration in aging: appropriateness or stochasticity? // *Biogerontology*. Vol. 14. № 6. P. 703-708.

267. Gompertz B. 1825. On the nature of the function expressive of the law of human mortality and on a new mode of determining life contingencies, *Philos. Trans. Roy. Soc. L. A.* Vol. 115. № 6. P. 513-585.

268. Моргунова Г.В., Клебанов А.А., Хохлов А.Н. 2016. Интерпретация данных о влиянии биологически активных препаратов на жизнеспособность культивируемых клеток разного происхождения с позиций геронтологии // *Вестн. Моск. Ун-та. Серия 16: Биология*. № 2. С. 3-7.

269. Хохлов А.Н. 2016. Какое старение у дрожжей “правильное”? // *Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 16: Биология*. № 1. С. 14-16.

270. Хохлов А.Н. 2016. Что мы обычно изучаем, когда думаем, что изучаем старение // *Клиническая геронтология*. Т.22. № 9-10. С. 69-70.

271. Vulić M., and Kolter R. 2002. Alcohol-induced delay of viability loss in stationary-phase cultures of *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* Vol. 184. № 11. P. 2898-2905.

272. Kapitanov A.B, and Aksenov M.Yu. 1990. Ageing of procaryotes. *Acholeplasma laidlawii* as an object for cell ageing studies: a brief note // *Mech. Ageing Dev.* Vol. 54. № 3. P. 249-258.

273. Епифанова О.И., Терских В.В., Полуновский В.А. 1983. Покоящиеся клетки. Свойства и функции в организме // М.: Наука.

274. Епифанова О.И., Терских В.В., Полуновский В.А. 1988. Регуляторные механизмы пролиферации клеток. Итоги науки и техники. Сер. "Общие проблемы физико-химической биологии". Т. 10. М.: ВИНТИ.
275. Hahn G.M., Stewart J. R., Yang S.-J., Parker V. 1967. Chinese hamster cell monolayer cultures. I. Changes in cell dynamics and modifications of the cell cycle with the period of growth // *Exp. Cell Res.* Vol. 9. № 4. P. 285-292.
276. Cuzzocrea S., McDonal, M.C., Mazzon E., Dugo, L., Serraino I., Threadgill M., Caputi A.P., and Thiemermann C. 2002. Effects of 5-aminoisoquinolinone, a water-soluble, potent inhibitor of the activity of poly (ADP-ribose) polymerase, in a rodent model of lung injury // *Biochem. Pharmacol.* Vol. 63. № 7. P. 293-304.
277. Jarrett S.G., and Boulton M.E. 2007. Poly(ADP-ribose) polymerase offers protection against oxidative and alkylation damage to the nuclear and mitochondrial genomes of the retinal pigment epithelium // *Ophthalmic Res.* Vol. 39. № 4. P. 213-223.
278. Reddan J.R., Sevilla M.D., Giblin F.J., Padgaonkar V., Dziedzic D.C., Leverenz V., Misra I.C., and Peters J.L. 1993. The superoxide dismutase mimic TEMPOL protects cultured rabbit lens epithelial cells from hydrogen peroxide insult // *Exp/ Eye Res.* Vol. 56. № 5. P. 543-554.
279. Lee Y.W., Ha M.S., and Kim Y.K. 2001. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death in human glioma cells: role of lipid peroxidation and PARP activation // *Neurochem. Res.* Vol. 26. № 4. P. 337-343.
280. Hivert B., Cerruti C., and Camu W. 1998. Hydrogen peroxide-induced motoneuron apoptosis is prevented by poly ADP ribosyl synthetase inhibitors // *Neuroreport.* Vol. 9. № 8. P. 1835-1838.
281. Zhang Z., Turner D.C., Drzewiecki G.J., Hinshaw D.B., and Hyslop P.A. 1994. Impairment of integrin-mediated cell-matrix adhesion in oxidant-stressed PC12 cells // *Brain Res.* Vol. 662. № 1-2. P. 189-197.
282. Aboul-Ela N., Jacobson E.L., and Jacobson M.K. 1988. Labeling methods for the study of poly- and mono(ADP-ribose) metabolism in cultured cells // *Anal. Biochem.* Vol. 174. № 1. P. 239-250.
283. Malanga M., and Althaus F.R. 2005. The role of poly(ADP-ribose) in the DNA damage signaling network // *Biochem. Cell. Biol.* Vol. 83. №3. P. 354-364.
284. Grube K., Küpper J.-H., and Bürkle A. 1991. Direct stimulation of poly(ADP-ribose) polymerase in permeabilized cells by double-stranded DNA oligomers // *Anal. Biochem.* Vol.193. № 2. P. 236-239.

285. Durkacz B.W., Irwin J., and Shall S. 1981. Inhibition of (ADP-ribose)<sub>n</sub> biosynthesis retards DNA repair but does not inhibit DNA repair synthesis // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 101. № 4. 1433–1441.
286. Rankin P.W., Jacobson E.L., Benjamin R.C., Moss J., and Jacobson M.K. 1989. Quantitative studies of inhibitors of ADP-ribosylation in vitro and in vivo // *J. Biol. Chem.* Vol. 264. № 8. P. 4312-4317.
287. Banasik M., Komura H., Shimoyama M., and Ueda K. 1992. Specific inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase and mono(ADP-ribosyl)transferase // *J. Biol. Chem.* Vol. 267. № 3. 1569-1575.
288. Matuoka K., Chen K.Y., and Takenawa T. 2001. Rapid reversion of aging phenotypes by nicotinamide through possible modulation of histone acetylation // *Cell. Mol. Life Sci.* Vol. 58. №14. P. 2108-2116.
289. Levros L.-C. Jr, Do Carmo S., Edouard E., Legault .P, Charfi C., and Rassart E. 2010. Characterization of nuclear factors modulating the apolipoprotein D promoter during growth arrest: implication of PARP-1, APEX-1 and ERK1/2 catalytic activities // *Biochim. Biophys. Acta.* Vol. 1803. № 9. P. 1062-1071.
290. Shambaugh G.E. 3rd, Koehler R.R. and Radosevich J.A. 1988. Developmental pattern of poly (ADP-ribose) synthetase and NAD glycohydrolase in the brain of the fetal and neonatal rat // *Neurochem. Res.* Vol. 13. № 10. P. 973-981.
291. Quesada P., Atorino L., Cardone A., Ciarcia G., and Farina B. 1996. Poly(ADP-ribosyl)ation system in rat germinal cells at different stages of differentiation // *Exp. Cell. Res.* Vol. 226. № 1. P. 183-190.
292. Heui S., and Lavretsky H. 2012. The aging brain: current concepts, intervention strategies and the role of Ginkgo biloba extract EGb 761. Introduction // *Int. Psychogeriatr.* Vol. 24. Suppl. 1. P. 1-2.
293. Evans J.R. 2013. Ginkgo biloba extract for age-related macular degeneration // *Cochrane Database Syst. Rev.* 1. CD001775.
294. Алинкина Е.С., Воробьева А.К., Мишарина Т.А., Фаткуллина Л.Д., Бурлакова Е.Б., Хохлов А.Н. 2012. Цитогеронтологические исследования биологической активности эфирного масла орегано // *Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 16: Биология.* № 2. С. 13-18.
295. Gupta C, and Prakash D. 2014. Phytonutrients as therapeutic agents // *J. Complement. Integr. Med.* Vol. 11. №3. P. 151-169.
296. Liu J., Wang J., Chen X., Guo C., Guo Y., and Wang H. 2012. Ginkgo biloba extract EGB761 protects against aging-associated diastolic dysfunction in cardiomyocytes of D-galactose-induced aging rat // *Oxid. Med. Cell. Longev.* Vol. 2012: 418748.

297. Chen C.C., Chiang A.N., Liu H.N., and Chang Y.T. 2014. EGb-761 prevents ultraviolet B-induced photoaging via inactivation of mitogen-activated protein kinases and proinflammatory cytokine expression // *J. Dermatol. Sci.* Vol. 75. № 1. P. 55-62.
298. Safciuc F., Constantin A., Manea A., Nicolae M., Popov D., Raicu M., Alexandru D., and Constantinescu E. 2007. Advanced glycation end products, oxidative stress and metalloproteinases are altered in the cerebral microvasculature during aging // *Curr. Neurovasc. Res.* Vol. 4. № 4. P. 228-234.
299. Mozet C., Martin R., Welt K., and Fitzl G. 2009. Cardioprotective effect of EGb 761 on myocardial ultrastructure of young and old rat heart and antioxidant status during acute hypoxia // *Aging Clin. Exp. Res.* Vol. 21. № 1. P. 14-21.
300. Nevado J., Sanz R., Sánchez-Rodríguez C., García-Berrocal J.R., Martín-Sanz E., González-García J.A., Esteban-Sánchez J., and Ramírez-Camacho R. 2010. EGb761 protects against aging-related caspase-mediated apoptosis in rat cochlea // *Acta Otolaryngol.* Vol. 130. № 10. P. 1101-1112.
301. Dell'Orco R.T. 1975. The use of arrested populations of human diploid fibroblasts for the study of senescence in vitro // *Adv. Exp. Med. Biol.* Vol. 53. № 1. P. 41-49.
302. Yerganian G., and Leonard M.J. 1961. Maintenance of normal in situ chromosomal features in long-term tissue cultures // *Science.* Vol. 133. № 3464. P. 1600-1601.
303. Shilovsky G.A., Shram S.I., Morgunova G.V., and Khokhlov A.N. 2017. Protein poly(ADP-ribosylation) system: Changes in development and aging as well as due to restriction of cell proliferation // *Biochemistry (Mosc.)*. Vol. 82. № 11. P. 1391-1401.
304. Shram S.I., Shilovsky G.A., Khokhlov A.N. 2006. Poly(ADP-ribose)-polymerase-1 and aging: experimental study of possible relationship on stationary cell cultures // *Bull. Exp. Biol. Med.* Vol. 141 № 5, P. 628-632.
305. Zilio N., Williamson C.T., Eustermann S., Shah R., West S.C., Neuhaus D., Ulrich H.D. 2013. DNA-dependent SUMO modification of PARP-1 // *DNA Repair (Amst.)*. Vol. 12. № 9. P. 761-773.
306. Zhao K., Ju Y., Li S., Altaany Z., Wang R., and Yang G. 2014. S-sulfhydration of MEK1 leads to PARP-1 activation and DNA damage repair // *EMBO Rep.* Vol. 15. № 7. P. 792-800.
307. Kunzmann A., Dedoussis G., Jajte J., Malavolta M., Mocchegiani E., and Bürkle A. 2008. Effect of zinc on cellular poly(ADP-ribosylation) capacity // *Exp. Gerontol.* Vol. 43. № 5. P. 409-414.

308. Shilovsky G.A., Khokhlov A.N., and Shram S.I. 2013. The protein poly(ADP-ribose)ation system: its role in genome stability and lifespan determination.// *Biochemistry (Mosc.)*. Vol. 78. № 5. P. 433-444.
309. Kirkland J.B. 2010. Poly ADP-ribose polymerase-1 and health // *Exp. Biol. Med.* (Maywood). Vol. 235. № 5. P. 561-568.
310. Henning R.J., Bourgeois M., Harbison R.D. 2018. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) and PARP inhibitors: mechanisms of action and role in cardiovascular disorders // *Cardiovasc. Toxicol.* Vol.18. № 6. P. 493-506.
311. Wang X., Ouyang Y.Y, Liu J., Zhao G. 2014. Flavonoid intake and risk of CVD: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies // *Br. J. Nutr.* Vol. 111. №1. P. 1-11.
312. Egert S., Bösby-Westphal A., Seiberl J. Kürbitz C., Settler U., Plachta-Danielzik S., Wagner A.E., Frank J., Schrezenmeir J., Rimbach G., Wolfram S., and Müller M.J. 2009. Quercetin reduces systolic blood pressure and plasma oxidised low-density lipoprotein concentrations in overweight subjects with a high-cardiovascular disease risk phenotype: a double-blinded, placebo-controlled cross-over study // *Br. J. Nutr.* Vol. 102. № 7. P. 1065-1074.