

УДК 577.24:57.017.67

РОЛЬ ТЕЛОМЕР В ПРОЦЕССЕ КЛЕТОЧНОГО СТАРЕНИЯ

Берестяная А.Н., Гродзинский Д.М.

Роль теломер в процессе клеточного старения. – А.Н. Берестяная, Д.М. Гродзинский. - Обзор посвящен рассмотрению структуры теломер – концевых участков линейной хромосомной ДНК в контексте проблемы старения. Приводятся особенности функционирования теломеразного комплекса, рассмотрены механизмы регуляции длины теломер. Проанализирован ряд современных гипотез и теорий старения, среди которых особое внимание уделено теломерной теории старения.

Ключевые слова: теломерная теория старения, теломеры, теломераза, пролиферативный потенциал, недорепликация, недорепарация, клеточный цикл.

Адрес: Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, ул. академика Заболотного, 148, Киев 03143, Украина; e-mail: a.berestyayana@yandex.ru

The role of telomere in the senescence of cell. - A.N. Berestyayana, D.M. Grodzinsky. - A review of the publications regarding a structure of telomere – terminal sequences of linear chromosomal DNA in the context of senescence. Describes the features of the functioning telomerase complex, the mechanisms of regulation telomere length are considered. A number of modern hypothesis and theories of senescence are analyzed, which among special attention was paid to telomere theory of senescence.

Key words: telomere theory of senescence, telomeres, telomerase, proliferative potential, incomplete replication, incomplete reparation, cell cycle.

Address: Institute of cell biology and genetic engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine, 148 Akademika Zabolotnoho st., Kiev, Ukraine, 03143; e-mail: a.berestyayana@yandex.ru

Вступление

Исследование механизмов старения стало одной из наиболее актуальных тем современной биологии и медицины. Нарастающий интерес к этой проблеме определяется рядом факторов. Среди них и вопрос постарения современного общества, и появление возрастных патологий, вызывающих тяжелые заболевания.

Старение многогранно и нуждается в фундаментальном исследовании, которое даст возможность получать более обоснованные выводы о причинах развития этого процесса.

Старение присуще практически всем живым организмам. Оно возникло в ходе эволюции живых существ, как фактор, обеспечивающий генетическую изменчивость популяции и вида в целом. Протекает на всех уровнях организации живых систем, от молекулярно-генетического до организменного. Эта тождественность позволяет исследовать разные аспекты старения на любых объектах, независимо от уровня их развития. Существует несколько теорий старения, основное место среди

которых занимают: генетическая теория старения (молекулярно-генетическая и мутационная), эпигенетическая, хромосомная, теломерная. Несмотря на разнообразие подходов, все они сводятся к тому, что первичные механизмы старения связаны с изменениями состояния генетического аппарата клетки. По мнению одних ученых – это запрограммированный процесс снижения активности генома, по мнению других – старение является результатом повреждения генетического аппарата, накопления ошибок в системе генетической информации. Первая концепция связывает старение с экспрессией т.н. генов старости на определенном этапе онтогенеза, что ведет к развитию ряда деградиционных изменений в клетке. В пользу этой концепции свидетельствует наличие лимита Хейфлика и теломерного счетчика деления клеток. Вторая концепция объясняет причину старения тем, что неотрепарированные ошибки ДНК, появляющиеся в ходе онтогенеза под воздействием мутагенных факторов, постепенно переходят в стойкие мутации, которые по мере

накопления приводят клетки к гибели, а организм к постепенному угасанию жизненно важных функций. Обе концепции логически оправданны, так как подтверждаются достаточным числом экспериментальных данных. Однако в настоящее время все еще не названы конкретные гены запуска программы старения и не выяснена до конца роль соматических мутаций в развитии этого процесса. По всей вероятности, необходимо рассматривать данную проблему, путем комплексного подхода к первичным запрограммированным генетическим изменениям, на которые воздействуют повреждающие факторы экзо и эндогенной природы.

Изучение процессов старения на генетическом уровне с учетом воздействия различных мутагенных факторов, позволяет определить закономерности возникновения изменений, связанных со старением организма. В данном аспекте механизм возрастного укорочения теломера представляет интерес с точки зрения установления общих принципов развития возрастных деградиционных изменений.

Современные концепции старения

Старение представляет собой закономерный процесс развития с постепенным необратимым снижением функциональных и адаптационных возможностей, конечным этапом которого является полное прекращение жизнедеятельности организма. Изменения, сопровождающие организм в процессе старения, носят повреждающий, прогрессирующий, имманентный, универсальный характер, и приводят к наступлению заключительного этапа онтогенеза - старости. Темпы старения определяются продолжительностью жизни особи. Несмотря на качественное многообразие фенотипических признаков, старение животных организмов характеризуется рядом простых и универсальных закономерностей. Доказано, что даже в идеальных лабораторных условиях животные, в том числе одноклеточные, а также микроорганизмы, стареют и умирают. В настоящий момент не прекращаются дискуссии вокруг вопроса, чем вызвано старение, генетической программой или воздействием на геном мутагенных факторов на фоне ослабления репарационных систем. Рассмотрим наиболее обоснованные гипотезы и теории старения.

Молекулярно-генетическая теория старения опирается на то, что существуют гены, запускающие механизм старения, и так называемые «гены долголетия», обеспечивающие поддержку клеточного равновесия, способность клетки противостоять повреждающим воздействиям. Между этими генами существует определенный баланс в экспрессии, который с возрастом сдвигается в сторону более активной работы генов, запускающих старение. Экспрессия

генов поддержки клеточного равновесия закономерно понижается, в результате чего происходят присущие старению патологические изменения тканей и органов. На сегодня еще не найден конкретный ген, который бы запускал этот механизм. Предложена такая классификация генов-кандидатов на роль в развитии старения: это гены, гомологичные генам, определяющим долголетие животных других видов; гены, участвующие в поддержании клеточного равновесия и репарации; гены, отвечающие за развитие основных заболеваний, связанных со старением [39]. Основанием для поиска генов старости, в свое время послужило обнаружение генетических заболеваний – прогерии, симптомами которых являются ускоренное старение в молодом возрасте. Так, например, синдром Хатчинсона – Гилфорда является следствием мутации в гене *LMNA*, отвечающего за нормальное строение ядерной мембраны. В мутантном состоянии этот ген дает аномальный продукт, в результате чего образуется дефектная мембрана, которая становится более чувствительной к веществам, повреждающим генетический материал и провоцирующим преждевременное старение и клеточную гибель. Синдром Вернера – является результатом мутации гена *WRN*, который в норме отвечает за сборку репаративной машины. В результате некорректной сборки репаративной машины не происходит репарации повреждений ДНК, что ведет к образованию мутаций, способствующих ускорению процессов старения [19].

Среди генов, исследованных путем сравнения разницы экспрессии у людей разного возраста, существуют некоторые гены, экспрессия которых запускает каскад реакций, сопровождающих старение. Ген *Bcl-2* – кодирует белок мембраны митохондрии, который нейтрализует гидроксильные радикалы, предотвращает окислительный стресс. Экспрессируясь в трансформированных клетках *Bcl-2* вызывает блокировку апоптоза, чем благоприятствует выживанию раковых клеток. Изменение экспрессии этого гена наблюдается при старении и сопровождается повышением окислительного стресса. Трансфекция гена *Bcl-2* в стареющие эндотелиальные клетки мышей, приводила к уменьшению митохондриального окислительного стресса и восстановлению потенциала мембраны митохондрий, что улучшало ангиогенную способность клеток [60]. Ген *P53* - контролирует целостность ДНК. Когда в процессе старения клетки в ее ДНК накапливается много мутаций, этот ген либо необратимо блокирует деление на стадии G1 клеточного цикла, либо запускает процесс апоптоза. Таким образом, он удаляет не функционирующие, старые и раковые клетки. При трансформации

культуры клеток, прекращается деление последних.

С возрастом ослабляется экспрессия генов контроля и поддержания клеточного равновесия, что ведет к накоплению клеток с мутациями, вызывающими постепенные изменения стареющего организма [55]. Так, например, накопление стойких к апоптозу фибробластов в коже людей пожилого возраста сопровождается накоплением множественных повреждений, которые приводят к образованию неоплазий, нейродегенеративных процессов и инфаркта миокарда [27].

Еще одной разновидностью генов-кандидатов являются ген апополипротеина Е (*АПОе*) и ангиотензинпереваривающего фермента (*АПФ*). Они играют важную роль в липидном метаболизме и защищают клетку от окислительного стресса. Изменение экспрессии этих генов наблюдается при старении [58]. Гены *HLA*: полигенная система главного комплекса гистосовместимости может играть важную роль среди генетических факторов долголетия. У столетних людей в сравнении с более молодыми возрастными группами в 2 раза чаще встречаются некоторые аллели *HLA-A*, *HLA-C* и др. Таким образом можно предположить наличие определенных аллельных вариантов разных генов, которые будут ускорять старение или предотвращать его [5, 24].

Недавно стали известны другие гены, которые непосредственно влияют на продолжительность жизни. У *Drosophila melanogaster* найдены гены *per* (от *period*) и *tim* (от *time*), активность которых циклически регулируется на протяжении суток. К их числу относится известный ген *INDY*, мутация в котором приводила к увеличению продолжительности жизни мух в два раза. У *Cenorabditis elegans* аналогичные гены названы *clk-1*, *2*, *3*. На данном этапе еще до конца не выяснена функция этих генов, однако известно, что мутации, элиминирующие экспрессию этих генов, способствуют увеличению продолжительности жизни. Лабораторные черви с блокированной экспрессией одного из генов *clk-1*, вместо десяти дней жили пятьдесят дней [12]. На мышах исследован продукт гена *pbb-shc*, который при окислении липидов клеточных мембран принимает участие в клеточном ответе, запуская механизм апоптоза, сопровождающий большинство патологических состояний при старении. Элиминация этого гена вызывает увеличение продолжительности жизни подопытных мышей [1].

Высказывалось предположение, что гены старения локализованы в одной определенной хромосоме. Проведены исследования, показывающие, что при удалении таких хромосом из ядер клеточной культуры *in vitro*, процессы

старения не наступают [7]. Деление клеток в культуре становится неограниченным, а клоны - бессмертными (без онкологической трансформации). Так, например, при соматической гибридизации нормальных человеческих фибробластов с раковыми клетками сирийских хомячков происходит иммортализация некоторых гибридов. Детальный анализ показал, что эти клетки преодолели лимит Хейфлика, и в их кариотипе отсутствовали обе копии первой хромосомы человека. Введение в такую гибридную клетку хотя бы одной копии первой хромосомы вызывало типичную картину клеточного старения, что не было присуще введению какой-либо другой хромосомы. Этот опыт, поставленный американскими биологами, свидетельствует о наличии генов старения именно в этой хромосоме и подтверждает генетическую теорию о том, что клеточное старение является результатом реализации генетической программы, которая осуществляется путем активации определенных генов, ограничивающих генетическую пролиферацию [46].

Согласно другой гипотезы, гены старости локализованы в 4-й хромосоме человека. К этому выводу пришли американские ученые, исследуя группу людей в возрасте 90-100 лет. У всех исследованных пациентов именно в 4-й хромосоме был найден идентичный участок генов, вероятно отвечавший за способность организма противостоять вредным факторам внешней и внутренней среды [43]. Гены, отвечающие за работу механизмов старения, не распределены случайно по всем хромосомам. В наши дни ведется интенсивная работа по идентификации таких генов и определению мест их локализации. Таким образом, уже описан ряд генов, влияющих на продолжительность жизни. Некоторые из них могут оказаться гипотетическими генами. Существует определенное взаимодействие между генами репарационной системы. От их аллельных вариантов, от их функциональной способности будет зависеть баланс экспрессии [38].

Мутационная теория старения опирается на то, что накопление хромосомных aberrаций в ходе онтогенеза является следствием старения и вызывает клеточную гибель, за которой следует гибель всего организма. С возрастом снижается частота ассоциаций акроцентрических хромосом, это связано с изменениями активности синтеза рРНК, со снижением уровня биосинтетических процессов в клетке. У долгожителей уровень ассоциаций акроцентрических хромосом на 10% выше, чем у контрольной группы особей, которые не имеют склонности к долголетию. У людей, не склонных к долголетию, с возрастом падает уровень ассоциаций акроцентрических хромосом и уменьшается число окрашенных серебром участков ядрышкового организатора, что

свидетельствует об ослаблении биосинтетических процессов в клетке и одряхлении в целом [5, 53].

Одной из причин увеличения с возрастом повреждений генома, может быть снижение эффективности систем репарации. Во многих опытах установлена положительная корреляция между продолжительностью жизни и скоростью репарации ДНК. При старении изменяется не только структура генов, но и направление их функционирования. С возрастом в соматических клетках накапливается много хромосомных аберраций. Большинство поврежденных репарируется, но не все. Инактивация систем репарации вызывает деструкцию генома [6]. Частота спонтанных повреждений генома весьма значительна, у крыс происходит примерно 10 окислительных повреждений ДНК в день в расчете на клетку. Ведутся активные исследования воздействия возраста на транскрипцию и трансляцию. В целом транскрипционная активность клеток во время старения организма снижается [54].

Одним из факторов, влияющим на экспрессию генов, является химическая модификация ДНК. Старческие изменения организма, согласно одной из гипотез, связаны с нарушениями в ходе модификации основ ДНК, такими, как метилирование и гликозилирование. Метилирование, например, защищает ДНК от разрушающего действия клеточных рестрикционных эндонуклеаз – ферментов, способных к необратимому расщеплению ДНК. С возрастом степень метилирования падает и немодифицированная ДНК становится уязвимой к действию эндонуклеаз, что ведет к нарушению экспрессии необходимых генов и деградации молекул. Впервые возрастное деметилирование было описано в 1973 году. Было установлено снижение содержания 5-метилцитозина в ДНК клеток легких и культурах фибробластов кожи. Возрастное деметилирование способствует раковой трансформации клеток. Но причины этого до сих пор неизвестны [17].

Гликозилирование белков и нуклеиновых кислот, в отличие от метилирования ведет к негативным последствиям. С возрастом его степень повышается. Такие моносахара как D-глюкоза или D-галактоза запускают цепочку химических событий, продуцирующих метаболиты, которые создают ковалентные связи внутри белковых молекул и связывают разные белки между собой. В коллагене, содержащем большое количество глюкозы, обнаружено увеличение ковалентных связей, снижающих его эластичность, что и наблюдается в коже пожилых людей. Гликозилирование ДНК – ведет к мутациям через прямое повреждение и инактивацию систем репарации ошибок рекомбинации, а также вызывает повышение ломкости хромосом [57].

Увеличение частоты нарушений сегрегации хромосом с возрастом обусловлено снижением активности репарации ДНК, изменениями макромолекулярного состава и физико-химических свойств хроматина. Изменения заключаются в возрастном повышении содержания негистоновых белков и фракций гистонов в составе хроматина, в уровне постсинтетических модификаций белков, в снижении фракций фосфолипидов ДНП, в нарастании минорных основ ДНК, в повышении концентрации железа, что сопровождается фрагментацией макромолекул. Это вызывает нарушения структурной организации хроматина. Следствием возрастной реорганизации структуры хроматина является модификация активности систем репарации и транскрипции на протяжении онтогенеза [4].

Согласно другой гипотезы механизм старения клеток основан на горизонтальном межклеточном перенесении генетической информации, т.е. как бы межклеточное возрастное метастазирование генами. При старении и гибели клеток происходит фрагментация ДНК, возникают мелкие обломки хроматина и генов в комплексе с регуляторным механизмом. Они попадают в межклеточное отделение и оттуда через истонченную от возраста плазматическую мембрану попадают внутрь соседних клеток, где вмешиваются в регуляцию биосинтеза белков, приводя к накоплению функциональных сбоев и синтеза дефектного продукта генов. Безусловно, в организме есть системы ремонта, которые способны восстанавливать повреждения. Однако с возрастом репарационные возможности организма снижаются [62].

Функции теломерного аппарата в развитии процессов старения

Чем глубже биологи проникают в механизм функционирования живых систем, тем больше они убеждаются, что природа старается держать под строжайшим контролем все процессы, идущие в организме, особенно связанные с его развитием и наследственностью. В этой связи представляется маловероятным, что природа отдала такой важнейший этап, как старение организма, на откуп случайным обстоятельствам и не запрограммировала в геноме управление этим процессом.

В современной геронтологии становится доминирующей точка зрения, что первичные причины старения имеют молекулярную природу. Среди разнообразия теорий и гипотез старения, особое место занимает теломерная теория, которую ряд исследователей считают наиболее убедительной. Именно эту теорию постараясь рассмотреть как можно подробнее.

История изучения теломер берет начало в 1971 г., когда Оловников установил, что ДНК-

полимеразы при каждом акте клеточного деления не в состоянии полностью реплицировать концы хромосом, в результате чего происходит недорепликация ДНК. Суть теории сводится к тому, что ведущую роль в возрастном ослаблении жизненных функций играет укорочение концевых участков хромосом – теломер после каждого цикла репликации ДНК. Укорочение происходит в нормальных делящихся клетках *in vivo* и *in vitro*, не является хронометрическим механизмом, т.к. зависит не от времени, а от циклов репликации ДНК и может служить репликометром, определяющим количество делений, которые способна совершить клетка. Проблема концевой репликации представляет собой феномен старения на клеточном уровне [30, 48].

Анализ длины теломерных повторов выявил, что соматические клетки теряют от 50 до 200 нуклеотидов во время каждого клеточного деления. Было экспериментально подтверждено, что в процессе старения снижается способность клетки к самовоспроизведению за счет концевой недорепликации хромосом. Недореплицированным остается 5'-конец ДНК, что спустя 50 клеточных делений по достижению порогового числа теломерных последовательностей TTAGGG приводит к полному прекращению клеточной пролиферации. Клетка не может преодолеть лимит Хейфлика, так как, достигая состояния пролиферативного старения, перестает делиться и погибает. Этим может быть обусловлено наличием программы, запускающей каскад процессов, ведущих к возрастному снижению структур и функций живого организма. Механизм концевой недорепликации объясняется предположительным отсутствием в соматических клетках фермента теломеразы, который в стволовых и половых клетках достраивает нуклеотиды, теряющиеся после репликации [38]. Согласно одной из гипотез, длинные теломеры молодых клеток находятся в области гетерохроматина, а ген-супрессор программы клеточного старения, локализован в субтеломерном районе. По мере укорачивания теломер область гетерохроматина включает в себя все больше субтеломерной ДНК. Включение в эту область гена-супрессора приводит к его инактивации и запуску механизма клеточного старения. Однако, причины, запускающие механизм укорочения теломер еще не выяснены до конца. Вероятно эволюционная роль недорепликации заключается в предотвращении онкологического перерождения стареющих клеток. Для построения экспериментально-теоретических представлений важно исходить из таких фундаментальных закономерностей, которые позволяют выделить возможные элементарные события и процессы, лежащие в основе старения [45, 47].

Теломеры представляют собой нуклеопротеидные структуры, расположенные на концах линейных хромосом, состоят из тысяч высококонсервативных тандемных повторов TTAGGG. Предотвращают рекомбинацию и позволяют концам хромосом крепиться к ядерной оболочке. Теломеры не несут кодирующих последовательностей. Они выполняют ряд клеточных функций. В частности, выступают в роли буфера, защищая гены от потери при каждом цикле репликации ДНК. Доказано участие теломер в стабилизации линейных эукариотических хромосом путем элонгации и экпирования [23, 56]. Теломеры принципиально отличаются от концов разорванных хромосом. Хромосомы, лишённые теломер вследствие разрывов, претерпевают слияние, деградацию и перестают выполнять свои функции. В частности, разрывы хромосом вызывают задержку в клеточном цикле и подвергаются репарации, которая приводит к экзонуклеолитической атаке или лигированию с другими хромосомными фрагментами. Последнее вызывает образование дицентриков, кольцевых хромосом, транслокаций, делеций. Частота появления дицентрических хромосом резко повышается по мере укорочения теломер в процессе концевой недорепликации стареющих клеток [34]. Эти хромосомы рвутся в последующем митотическом цикле и данный разлом приводит к активации белка p53, запускающего каскад реакций в ответ на повреждение ДНК с последующей суперэкспрессией белка p21, который может связываться с CDK2 и CDK4, подавляя их активность, что может привести к остановке клеточного цикла в G1. Такие белки могут нейтрализовать митогенетическую активность ростовых факторов. Частично этим можно объяснить отсутствие реакции стареющих клеток на факторы роста. Суперэкспрессия других белков, например p16, также может приводить к неспособности пройти через G1. Все вместе эти механизмы нужны для того, чтобы обеспечить старение, а значит, и ограниченную продолжительность жизни клеток человека [13, 35, 52].

Хотя последовательность TTAGGG присуща как примитивным организмам (беспозвоночным, трипаносомам, слизевикам), так и высшим животным, размеры теломерных участков хромосом гетерогенны в разных клетках и тканях даже одного организма. Длина ДНК в теломерах хромосом человека варьирует: в клетках зародышевой линии составляет 10-15 т.п.о, а в лейкоцитах периферической крови - 5-12 т.п.о. Еще более разительными оказываются межвидовые различия в длине теломер - от примерно 50 п.о. в клетках жгутиковых до 50 т.п.о. у одного из видов мышей. У дрожжей длина теломер приближается к 300 п.о. У большинства

организмов присутствуют простые повторы на концах хромосом, но некоторые организмы вроде *D. Melanogaster* лишены теломерных последовательностей. Их эквиваленты представлены длинными повторами ДНК, которые являются мобильными элементами, выполняющими функции теломер [11, 21].

Укорочение теломер, наблюдаемое при старении нормальных фибробластов человека, происходит *in vivo* в клетках эпидермиса кожи, лейкоцитах периферической крови, эпителии слизистой оболочки толстого кишечника. Существует корреляция между пролиферативной способностью клеток и длиной теломер. Клеточные штаммы с короткими теломерами производят меньше удвоений по сравнению со штаммами, имеющими более длинные теломеры. Длина теломер является биологическим маркером старения соматической клетки человека. У одноклеточных и вирусов хромосомы имеют кольцевую форму, за счет этого не происходит недорепликации. Фибробласты больных прогерией Хачкинсона-Гилфорда имеют короткие теломеры и низкий потенциал клеточных делений *in vitro*. Теломеры ДНК сперматозоидов не укорачиваются с возрастом в связи с наличием механизма поддержания длины теломер в половых клетках. У больных синдромом Дауна наблюдается более высокая скорость потери длины теломер, взятых из лимфоцитов периферической крови (133-15 п.о. в год), чем у здоровых доноров (41+7,7 п.о. в год) [33].

Обнаружено значительное число белков, связывающихся с ДНК теломерных повторов или с их белковыми комплексами, формирующимися на концах хромосом. Теломеры имеют тенденцию образовывать ассоциаты друг с другом. Эти ассоциаты вовлечены в формирование ядерных доменов, которые могут быть важны для регуляции транскрипции, спаривания сестринских хроматид в митозе и для гомологичного синapsиса в мейозе. Теломерные концы хромосом не подвергаются репарации ДНК в отличие от разорванных концов хромосом. Теломеры также обеспечивают особый механизм введения дополнительных копий теломерной ДНК к концам хромосом, это необходимо для компенсации потери последовательностей ДНК вследствие неполной репликации [26].

Хэйфлик доказал, что нормальные эмбриональные клетки, произрастая в благоприятных условиях, неизбежно стареют и умирают спустя 50 удвоений. Долгое время существовала догма о том, что культура клеток способна к неограниченному размножению до тех пор, пока культуре предоставлена правильная среда. Эта догма эквивалентна мнению о том, что человек может жить вечно, если ему предоставить подходящие условия существования. Данное ошибочное представление послужило отказом к

публикации работы Хэйfliка об ограниченном числе делений клеточной культуры.

Существует обратная пропорция между возрастом донора и числом удвоений популяции. В 1965 г. Хэйfliк доказал, что культуры фибробластов, выделенные из тканей стариков, осуществляют меньше репликаций, чем эмбриональные фибробласты. Хэйfliк проводил исследование на фибробластах, т.к. они имеют наибольшую продолжительность жизни *in vitro*, и именно старение этих клеток изучено наиболее плотно. Другие дифференцированные клетки в культуре также имеют предел в способности к размножению, которая ниже данной способности фибробластов. При размножении *in vitro* они не приобретают специализированных свойств, не обретают новых физиологических функций, как при размножении *in vivo*. Вместо этого в данных клетках наблюдается потеря физиологических функций, которая ведет клетки к смерти, т.е. по сути является старением. Дифференцировка клеток – это процесс прогрессивных изменений, в ходе которых примитивный тип клеток приобретает способность к дифференцированным видам деятельности. Этого не происходит с клетками, стареющими *in vitro*. Дифференцировка продолжается до конечной точки или терминации, когда клетка достигает максимальной интенсивности развития функции. Способность к удвоению клеток (репликативный потенциал) как многие другие функции, снижается при старении. В процессе старения организма не происходит обновления клеточной популяции во многих тканях, а клеточная пролиферация не бесконечна [18].

Для активной пролиферации клеток теломерные последовательности не должны становиться короче определенного порогового размера. После достижения критической длины теломерной ДНК запускаются процессы остановки клеточного цикла. Сигнал укорочения теломер воспринимается клеткой как повреждение ДНК. Белки АТМ и p53, участвующие в мониторинге и регуляции теломерной ДНК, воспринимают и передают этот сигнал в клеточный цикл. После чего соматические клетки совершают ограниченное число делений в культуре и приходят в состояние необратимой остановки в фазах клеточного цикла G1 и G2/M, которое и называется старением. Доказательством этому служат взятые у больных с атаксией-телангиэктазией фибробласты, которые ускоренно теряют теломерную ДНК, что активирует белок p53 и ведет к преждевременному старению в культуре [9, 35, 51].

Ограниченность пролиферативной способности нормальных клеток постоянно обнаруживается как *in vivo*, так и *in vitro*. Бессмертие популяции базируется на постоянном

обмене или перестройке генетической информации. Популяции бактерий бессмертны, а одноклеточный организм смертен. Физиологические нарушения, накапливающиеся в организме, предрасполагают животное к смерти раньше, чем исчерпывается лимит клеточных делений. Происходит это за счет того, что в организме происходят изменения биологической активности в процессе старения, что повышает вероятность возрастных заболеваний и смерти. По мнению Хэйfliка старение является результатом потери потенциала клеточного деления. Максимальное число клеточных делений можно продемонстрировать только *in vitro*, но не *in vivo* [31].

Старение как пострепродуктивный этап жизни, сопровождающийся нарастанием хаоса в системе и повышением вероятности смерти. Нарастает молекулярный беспорядок на фоне ослабления репаративных процессов. Все это демонстрирует действие второго закона термодинамики, согласно которому в процессе увеличения хаоса происходит возрастание энтропии. По мере укорачивания теломер происходит повышение молекулярного беспорядка. Сотни биологических изменений, происходящих в нормальных клетках при старении *in vitro*, повышают молекулярный беспорядок и вместе с тем нарушают внутреннюю среду, приводя к развитию клеточного старения. Эти изменения повышают вероятность развития патологических процессов, которые приводят к завершению онтогенеза, задолго до достижения максимальной продолжительности жизни [16, 18].

Академик Скулачев считает возрастное укорочение теломер программой феноптоза – генетически управляемым механизмом смерти организма. Феноптоз стимулирует прогрессивную эволюцию, элиминируя из популяции особи, достигшие пострепродуктивной стадии. Очевидно, множественность механизмов старения обусловлена тем, что природа словно боится от проявления долгоживущих особей. Наличие ряда механизмов старения повышает вероятность выполнения организмом данной биологической функции [8].

Функции теломеразного комплекса и механизмы его регуляции

Существует корреляция между сокращением длины теломерного участка и лимитом Хэйfliка. Для преодоления лимита клетки должны активировать ген теломеразы. Учитывая, что ДНК-полимераза не может реплицировать линейную хромосому полностью, требуется специальный механизм для поддержания концевых участков хромосом. В большинстве организмов эту функцию выполняет теломераза. Стоит отметить, что выключение гена теломеразы не является случайным событием, а

представляет собой результат развития заложенной в него программы [20].

В 1985 – было экспериментально доказано наличие фермента теломеразы, отвечающего за синтез последовательности TTAGGG, которая присоединяется к 3'-концу ДНК, за счет чего происходит достраивание недостающих концов хромосом. Теломераза – терминальная трансфераза, представляет собой рибонуклеопротеидный комплекс. Для проявления ферментативной активности теломеразе нужны РНК и белковые компоненты. В качестве каталитической белковой субъединицы содержит обратную транскриптазу и матрицу РНК для синтеза комплементарных цепей теломерной ДНК. Данный тип белковой структуры необходим как для репликации ретровирусов, так и для репликации хромосомных теломер эукариот.

Механизм удлинения теломер (элонгация) происходит путем связывания G-богатой цепи теломеры с матричным участком теломеразной РНК, после чего осуществляется РНК-зависимый синтез теломерной ДНК, затем идет транслокация, перемещение ДНК, удлиненной на один повтор относительно фермента. Далее, комплементарная цепь достраивается с помощью ДНК-полимеразы [8, 20, 45].

Таким образом, цикл работы теломеразы включает две стадии – элонгацию и транслокацию. Чередую их, фермент пристраивает к старой цепи несколько десятков или сотен теломерных повторов. При этом оказывается, что теломерная РНК не только матрица, но и важнейшая часть каталитической машины. При замене в ней нескольких нуклеотидов происходит не синтез дефектных повторов, а потеря теломеразной активности.

Теломеразная активность культуры раковых клеток многократно выше, чем в нормальных. Экспрессия теломераз также найдена в клетках плода, стволовых клетках костного мозга, селезенки, ЛПК, эпидермиса кожи. Эти клетки имеют высокие темпы обновления. На определенном этапе происходит выключение гена, кодирующего теломеразу, практически у всех соматических клеток. В результате геном оказывается подвержен укорочению в процессе концевой недорепликации. Теломера укорачивается, что ведет к ухудшению функционирования хромосом. Когда запас теломерных последовательностей исчерпывается – происходит деградация смысловых участков ДНК [10, 51].

Эксперименты *in vitro* показали, что делегирование гена белка теломеразы, ведет к прекращению теломеразной активности. Этот белок формирует активный центр фермента. Существует несколько белков, необходимых для проявления теломеразной активности. Одни из

них связываются с теломеразным субстратом, регулируют присоединение теломеразы, участвуют в синтезе отстающей цепи, после действия теломеразы. Белковая субъединица теломерная обратная транскриптаза универсальна для эукариот.

Теломеразные РНК гораздо лучше изучены, чем теломеразные белки. Синтез теломеразных РНК у человека осуществляется с помощью РНК-полимеразы III. Ген теломеразной РНК представлен одной копией на клетку. Первичная структура теломеразных РНК у человека достигает 450 нуклеотидных остатков. Длина теломеразной РНК возрастает от низших организмов к высшим. Разные организмы имеют различную по структуре РНК. Последовательность РНК различается не только у эволюционно далеких организмов, но и у родственных. Нуклеотидные последовательности теломеразных РНК разнятся уже в пределах рода. В то время как нуклеотидные последовательности генов рибосомальных РНК у эволюционно далеких организмов совпадают между собой на 90%. Теломеразный комплекс состоит из якорного участка, образованного белком p123 и теломеразной РНК. У дрожжей присутствуют гомологичные белки EST1 и EST2. Делеция генов этих белков приводит к укорочению теломер. У человека обнаружен теломеразный белок TP1, взаимодействующий с теломеразной РНК [3, 22].

Теломеразная РНК диктует последовательность хромосомных теломер. Экспериментально доказано, что теломеразный ген белка p123 при воздействии на него ионизирующей радиации претерпевает изменения. В результате аминокислотные замены остатков аспарагиновой кислоты, необходимые для проявления активности обратной транскриптазы, при репликации теломер вели к дефектам. Клетки, содержащие мутантные белки, претерпевают резкое старение за счет прогрессивного укорочения теломер [28].

Концевые участки теломер, удлиняющихся теломеразой, имеют ненуклеосомную организацию, в отличие от других областей ДНК, которым присуща нуклеосомная организация. У млекопитающих ненуклеосомную организацию имеет лишь небольшое количество теломерных последовательностей, расположенных в терминальной части теломерной ДНК. Все остальные теломерные последовательности, расположенные в направлении к центромере, имеют нуклеосомную организацию [15, 59].

В клетках млекопитающих присутствует теломерсвязывающий белок TRF1 (его дрожжевой аналог – Rap1). Предполагается, что с участием этого белка осуществляется негативный контроль длины теломер. Белок TRF1 создает плотную упаковку теломер, благодаря чему они относятся к фракции гетерохроматина. Такая

структура стабилизирует теломеры и делает недоступным для взаимодействия с теломеразой крайний повтор на конце теломеры в течение большей части клеточного цикла. Когда возникает мутация в гене теломеразной РНК, синтезирующей повторяющиеся последовательности, происходит изменение дистальных теломерных повторов, что не позволяет белку TRF1 занять место на этих повторах, в результате чего теломера становится способной их удлинять. В S-фазе в ответ на некий сигнал белок TRF1 диссоциирует от теломеры, после чего начинается ее удлинение. Стабилизирующие белки делают малодоступной теломерную ДНК действию ДНК-метиляз и эндонуклеаз. Это обеспечивает низкую частоту появления двухцепочных разрывов в мейозе [25, 37, 42].

Как показывают данные исследований, увеличение продукции TRF1 приводит к прогрессивному укорочению теломер в человеческих клетках, в то время как уменьшение продукции ведет к их удлинению. Был сделан вывод о том, что TRF1 является супрессором элонгации теломер и отрицательным регулятором их длины. Так как его влияние на уровень активности теломеразы не наблюдалось, исследователи предположили, что он ингибирует действие теломеразы на концах отдельных теломер.

Согласно другому предположению белок TRF1 напрямую управляет доступом теломеразы к теломерам, регулируя негативную работу данного фермента. Считается, что данный белок связывается с теломерной ДНК, чем индуцирует конформационные изменения в теломеразе, ведущие к ингибированию ее полимеразной активности. Согласно данным экспериментов при добавлении мутантных теломерных повторов на теломерный конец, теломерный комплекс становится доступен действию теломеразы. Теломерный комплекс с белком TRF1 может существовать как в доступной, так и в недоступной для теломеразы форме [14, 36].

В соответствии с третьим предположением, белок TRF1 может регулировать теломеразную активность с помощью взаимодействия с белком PinX1, который способен связывать каталитическую субъединицу теломеразы и таким образом ингибировать ее активность [63].

У дрожжей аналогом главного теломерного белка человека TRF1, регулирующим длину теломер, является белок Rap1. Механизм его регуляции заключается в участии в образовании структуры, подобной т-петле млекопитающих, и блокировании доступа теломеразы. Белок Rap1 способствует изгибанию двухцепочечной теломерной ДНК, что облегчает образование т-петли. Кроме регулятора длины теломер белок

Rap1 выполняет функции транскрипционного активатора и репрессора одновременно [44].

Следовательно, длина теломер контролируется противоположным действием двух клеточных комплексов, комплексом теломерной ДНК со структурно связывающим белком Rap1, и ферментативной машиной элонгации теломер – теломеразой. Оба этих комплекса взаимодействуют с теломерной ДНК и контролируются ею [40].

Мутации в теломерной ДНК ведут к блокированию деления ядра. Синтез правильной теломерной последовательности зависит от структуры теломеразной РНК. В противораковой терапии возможно применение индукции изменений теломеразной РНК, которые вызывают появление аномальных теломер, что ведет к остановке клеточного деления.

Иммортализацию культуры клеток можно вызвать путем воздействия облучения, химических канцерогенов и онковирусов. При воздействии радиации наблюдается переход от регулируемого к нерегулируемому состоянию теломер. Если теломера стала доступной действию теломеразы, этот процесс нелегко обратить назад. Это ведет к потере контроля над длиной возрастающего числа теломер. Белок TRF1, связавшись с дуплексом теломерной ДНК, индуцирует на теломере формирование структурированного, более упорядоченного хроматина. Данный комплекс выполняет важную биологическую функцию по экпированию концов хромосом [14, 61].

Поиск ингибиторов и активаторов обратных транскриптаз активно ведется с момента открытия взаимосвязи теломеразной активности с процессами онкогенеза и старения. Высокая теломеразная активность присутствует во всех тканях млекопитающих, подверженных раковой трансформации. Ингибирование теломеразы в раковых клетках может останавливать онкологическую трансформацию [29]. *In vitro* теломеразу могут ингибировать модифицированные олигонуклеотиды, комплементарные матричной области теломеразной РНК, обладающие устойчивостью к действию протеаз и нуклеаз. Однако, использование подобных олигонуклеотидов *in vivo* ограничено из-за проблемы транспорта ингибиторов через клеточную мембрану и доставкой в клеточное ядро. Экспрессия белка Е6 вируса папилломы человека вела к активации теломеразы в кератиноцитах и клетках эпителия молочной железы. Поддержание определенной длины теломер зависит от взаимодействия с ними теломеразы, теломерных белков, и других факторов, регулирующих синтез компонентов теломерного комплекса [41, 49]. Изучение функционирования теломеразного комплекса представляет интерес с точки зрения установления связи теломеразной

активности с процессами онкогенеза и старения. Поскольку теломеразная активность присутствует во всех раковых опухолях и иммортализованных линиях, изучение структуры, функции, механизма работы и регуляции активности теломераз представляет важнейшую задачу современной биологии [16].

Однако, не во всех трансформированных клетках и опухолях содержится активная теломераза. Оказалось, что в некоторых из них длина теломер поддерживается за счет рекомбинационного механизма образования теломерной ДНК. Ведутся работы над внедрением методов избирательного подавления теломеразной активности в раковых клетках на основании ингибиторов обратных транскриптаз. Основная трудность заключается в том, что каталитическая субъединица теломеразы – это одна из ДНК полимераз и искомый ингибитор должен быть направлен на подавление теломеразной ДНК-синтезирующей активности, иначе он будет токсичен для нормальных клеток. Наиболее обнадеживающими кажутся недавние работы, в которых описано избирательное подавление теломеразной РНК, вызывающее гибель раковых клеток в культуре [2].

Наличие теломеразы в биологических объектах определяют с помощью методов молекулярного анализа. Один из них т.н. прямой метод представляет собой следующее. В инкубационную смесь с исследуемым образцом вносят меченые дНТФ и добавляют олигонуклеотид, содержащий несколько теломерных повторов. Праймер выступает в роли G-цепи, с которой связывается теломераза. О наличии теломеразной активности в образце судят по включению радиоактивности в состав олигонуклеотида. Второй метод заключается в использовании полимеразной цепной реакции. В смесь, содержащую образец добавляют G-праймер, C-праймер, ДНК-полимеразу и меченые нуклеотиды. Многократно чередующиеся циклы включают взаимодействие C-праймера или G-праймера с одиночной цепью, далее идет ДНК-полимеразное образование новой цепи и последующее разделение двух цепей путем нагревания. Это позволяет в ходе реакции амплифицировать удлиненный теломеразой олигонуклеотид. После этого продукты реакции подвергают гель-электрофору и получают спектр радиоактивных полос, соответствующих удлиненным олигонуклеотидам. Данный метод высокочувствителен и позволяет определить наличие теломеразы в разных биологических объектах [3].

Ключевой вопрос теломерной биологии состоит в определении взаимосвязи между типом клеток, наличием в них функционально активной теломеразы и процессами старения. До недавнего времени считалось, что теломеразная активность

отсутствует в здоровых соматических клетках взрослого организма и присутствует только в клетках зародышевого пути (в линии половых клеток). Однако с изобретением высокочувствительных методов анализа теломеразы была экспериментально обнаружена в митотических и условно постмитотических клетках и тканях, содержащих такие клетки. В постмитотических клетках фермент теломеразы не содержится [50].

Так, с наибольшим постоянством теломеразы обнаруживаются в органах кроветворения – костном мозгу и лимфоузлах. В исходных стволовых клетках костного мозга (редко делящихся) активность теломеразы практически отсутствует, но достигает высокого уровня в активно делящихся стволовых клетках данного органа. Клетки периферической крови (гранулоциты и лимфоциты) содержат теломеразу. Хотя ее активность здесь невелика, но при стимуляции делений лимфоцитов различными митогенами значительно увеличивается. В эпителии кожи и слизистых оболочек организма теломеразы встречается в активно пролиферирующих клетках. В эндометрии пик активности фермента приходится на конец фазы пролиферации, а в последующую фазу секреции содержание фермента резко снижается. Эпителлиальные клетки, вступающие в терминальную дифференцировку, утрачивают активность теломеразы. Значительно реже теломеразы обнаруживаются в органах с условно постмитотическими клетками и тканями (стволовые клетки предстательной железы, клетки печени, поджелудочной железы, респираторных отделов легких). В мозгу и в мышечных тканях теломеразы полностью отсутствуют. Это дает основание говорить о взаимосвязи наличия теломеразы и способности соматических клеток к делению. Стоит отметить, что наличие теломеразной активности в делящихся клетках не спасает теломеры от постепенного укорочения. Отмечено укорочение теломер в кроветворных клетках, и в лимфоцитах по мере увеличения календарного возраста организма, что может быть связано со снижением теломеразной активности, либо ее ингибированием различными факторами [32].

Однако не стоит утверждать, что старение и смерть целостного организма определяются исключительно укорочением теломер соматических клеток. Помимо делящихся, в организме имеется масса неделящихся клеток, которые тоже стареют, не медленней, а по многим данным даже быстрее делящихся клеток. Так, например, клетки мозга, печени, мышечных волокон, существуют не делясь и тем не менее функционируют десятки лет подряд, накапливая в себе возрастные изменения. В данном случае неприменима концепция о том, что старение и

гибель клеток обусловлены достижением лимита делений. Проявление эффекта Хейфлика в обновляющихся тканях эпидермиса *in vivo* отличается от аналогичного эффекта в культуре. В случае *in vitro* наблюдается скачкообразный эффект: на протяжении нескольких десятков делений нет никаких изменений, и лишь в самом конце состояние клеток резко ухудшается. В живом организме старение эпидермиса происходит не скачкообразно, а постепенно, что и позволяет рассматривать состояние кожи как индикатор биологического возраста особи. Исходя из этого, можно предположить, что старение эпидермиса обусловлено не приближением к критическому пределу деления, а другими, постоянно действующими причинами. В пользу этого предположения свидетельствует и тот факт, что у пожилых людей репликативный потенциал делящихся клеток не исчерпан полностью. Экспериментально доказано, что фибробласты, выделенные у 90-летних доноров, способны делиться в культуре всего на 20 раз меньше, чем фибробласты, взятые у эмбриона. Вероятно, старение делящихся клеток организма вызвано не только множественной серией делений. Известно, что многие делящиеся клетки наделены теломеразной активностью, в зависимости от уровня которой, в одних клетках критическое укорочение теломер наступает после меньшего, а в других – после большего числа делений. Можно предположить, что лимит Хейфлика для разных типов клеток тоже является разным. По мнению академика-первооткрывателя теломерной теории А.М. Оловникова, укорочение теломерных повторов с возрастом может происходить не только в делящихся клетках – из-за концевой недорепликации, но и в неделящихся клетках – из-за концевой недорепарации. Имеется в виду недорепарация участков на 5'-конце поврежденной цепи, по причине отсутствия второй цепи, необходимой в качестве матричной для синтеза [7].

Помимо укорочения теломер в зависимости от возраста, существует множество механизмов, сопутствующих старению как делящихся, так неделящихся клеток. С возрастом происходит увеличение числа разрывов в цепях ДНК, а также накопление ряда структурных дефектов, уменьшается количество 5-метилцитозина, увеличивается число сшивок ДНК с белком, снижается активность ферментов, функционирующих на хромосомах, в частности ферментов репарации. Все эти изменения ведут к ухудшению состояния и функционирования генетического аппарата и действуют независимо от процессов концевой недорепликации и недорепарации ДНК. Вероятно, старение является результатом изменения эпигенома, который на определенном этапе онтогенеза запускает программу постепенного ослабления деятельности защитных

систем. Исходя из этого становится понятно, почему несмотря на эффективную систему репарации, в структуре ДНК с возрастом накапливаются разрывы и другие дефекты; в культуре фибробластов по мере делений белки теплового шока индуцируются все хуже и хуже; снижается активность теломеразы в делящихся клетках. Все это элементы единого много-сложного процесса эпигенетической регуляции процессов старения.

Заключение

Старение животной клетки представляет собой комплекс деградиционных изменений во множестве молекулярных и биохимических процессах. Невозможно однозначно связать причины возрастного ослабления структур и функций с тем или иным механизмом. Однако наибольшее экспериментальное подтверждение нашла теломерная теория старения, что в корне изменило общее представление о природе старения в XXI веке. На сегодняшний день существует целое направление, занимающееся исследованием природы старения на основании теломерных механизмов. Предпринимаются попытки остановить сокращение теломер путем безопасной активации теломеразы в клетках, где ее активность крайне низка или отсутствует вообще. Калифорнийская биотехнологическая

компания *Geron* разработала фармакологический продукт, известный как ТА-65 (активатор теломеразы). Это природное вещество было извлечено из китайской травы семейства астрагаловых, чему предшествовал длительный биохимический анализ тысячи природных соединений. В исследовании приняли участие выдающиеся биологи теломер Кельвин Херли, Мария Бласко и Уильям Эндрюс. В ноябре 2010 года были опубликованы данные об эффекте «обратного старения» у млекопитающих после применения активатора теломеразы. Экспериментально доказано, что ТА-65 активирует фермент теломеразу, удлиняет критически короткие теломеры, защищает клетки различных органов и систем. Препарат вызвал омоложение клеток головного мозга, селезенки и репродуктивных органов мышей, способствовал подъему их иммунной системы уже после годичного применения препарата. В одном из последних исследований ученые объявили, что считают сокращение теломер основной причиной старения животного организма [30]. Исходя из этого утверждения, старение можно считать разновидностью заболевания, против которого в скором времени будет изобретена вакцина. Какие последствия повлечет за собой вмешательство в естественный ход развития живого, пока неизвестно.

1. Анисимов В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения. – СПб.: Наука, 2003. – 468 с.
2. Богданов А.А. Теломеры и теломераза // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – 12. – С. 12-18.
3. Галицкий В.А. Эпигенетическая природа старения // Цитология. – 2009. – 51, №5. – С. 388-397.
4. Клименков А.М. Возрастные изменения кариотипа в соматических клетках человека: Автореф. дис. д-ра биол. наук. – Москва, 2000. – 40 с.
5. Кузнецова С.М. Средовые и генетические факторы феномена группового долгожительства // Здоров'я України. – 2003. – №10. – С. 28-32.
6. Малинкевич В.Г. Причины возрастного увеличения анеуплоидии в лейкоцитах человека: Автореф. дис. канд. биол. наук. – Минск, 2003. – 28 с.
7. Оловников А.М. Редусомная гипотеза старения и контроля биологического времени в индивидуальном развитии // Биохимия. – 2003. – 68, №1. – С. 7-41.
8. Скулачев В.П. Старение организма – особая биологическая функция, а не результат поломки сложной живой системы: биохимическое обоснование гипотезы Вейсмана // Биохимия. – 1997. – 62, №11. – С. 1394-1399.
9. Atadja P., Wong H., Garkavtsev I., at. al. Increased activity of p53 in senescing fibroblasts // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1995. – 92, N18. – P. 8348-8352.
10. Aubert G., Lansdorp P. Telomeres and aging // Physiol. Rev. – 2008. – 88, N2. – P. 577-579.
11. Azzalin C.M., Reichenbach P., Khoriaili L., at. al. Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends // Science. – 2007. – 318. – P. 798-801.
12. Bass T.M., Weinkove D., Houthoofd K., at. al. Effects of resveratrol on lifespan in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* // Mech. Ageing. Dev. – 2007. – 128, N10. – P. 546-552.
13. Baur J.A., Zou Y., Shay J.W., at. al. Telomere position effect in human cells // Science. – 2001. – 292. – P. 2075-2077.
14. Bianchi A., Stansel R.M., Fairall L., at. al. TRF1 binds a bipartite telomeric site with extreme spatial flexibility // EMBO J. – 1999. – 18. – P. 5735-5744
15. Blackburn E.H. Switching and signaling at the telomere // Cell. – 2001. – 106. – P. 661-673.
16. Blasco M.A. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond // Nat. Rev. Genet. – 2005. – 6, N8. – P. 611-622.
17. Carnero A., Leonart M. Epigenetic mechanisms in senescence, immortalization and cancer // Biological Reviews. – 2010. – 86, N2. – P. 443-455.
18. Cawthon, R.M., Smith, K.R., O'Brien, E., at. al. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older // Lancet. – 2003. – 361. – P. 393-395.
19. Choi D., Whittier P.S., Oshima J., at. al. Telomerase expression prevents replicative senescence but does not fully reset mRNA expression patterns in Werner syndrome cell strains // FASEB Journal. – 2001. – 15, N6. – P. 1014-1020
20. Collins K. and Mitchel, J.R. Telomerase in the human organism // Oncogene. – 2002. – 21, N4. – P. 564-579.
21. Danilevskaya O.N., Traverse K.L., Hogan N.C., at. al. The two *Drosophila* telomeric transposable elements have very different patterns of transcription // Mol. Cell. Biol. – 1999. – 19. – P. 873-881.
22. Dokudovskaya S.S., Petrov A.V., Dontsova O.A., at. al. Telomerase is an unusual RNA-containing enzyme. A review // Biochemistry. – 1997. – 62. – P. 1206-1215.
23. Dynek J.N., Smith S. Resolution of sister telomere association is required for progression through mitosis // Science. – 2004. – 304. – P. 97-100.
24. Effros R.B. Genetic alterations in the ageing immune system: Impact on infection and cancer // Mech. Ageing Dev. – 2003. – 124. – P. 71-77.
25. Evans S. K., Lundblad V. Positive and negative regulation of telomerase access to the telomere // J. Cell Sci. – 2000. – 113. – P. 3357-3364.

26. Forstemann K., Lingner J. Molecular basis for telomere repeat divergence in budding yeast // *Mol. Cell. Biol.* – 2001. – 21. – P. 7277-7286.
27. Gavrilov L.A., Gavrilova N.S. The reliability theory of aging and longevity // *Journal of Theoretical Biology.* – 2001. – 213, N4. – P. 527-45.
28. Hackett J.A., Feldser D.M., Greider C.W. Telomere dysfunction increases mutation rate and genomic instability // *Cell.* – 2001. – 106. – P. 275-286.
29. Hahn W.C. Role of telomeres and telomerase in the pathogenesis of human cancer // *J. Clin. Oncol.* – 2003. – 21. – P. 2034-2043.
30. Harley C., Liu W, Blasco M, et.al. A natural Product Telomerase Activator As Part of a Health Maintenance Program // *Rejuvenation Research.* – 2011. – 14, N1. P. 45-56.
31. Hayflic L. Biological Aging Is No Longer an Unsolved Problem // *Annals of the New York Academy of Sciences.* – 2007. – 1100, N1. – P. 1-13.
32. Hornsby. P. J. Telomerase and the aging process // *Exp Gerontol.* – 2007. – 42, N7. – P. 575–581.
33. Henson J.D., Neumann A.A., Yeager T.R., at. al. Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells // *Oncogene.* – 2002. – 21. – P. 598-610.
34. Jager D., Philippson P. Stabilization of dicentric chromosomes in *Saccharomyces cerevisiae* by telomere addition to broken ends or by centromere deletion // *EMBO J.* – 1989. – 8. – P. 247-254.
35. Karlseder J., Broccoli D., Dai Y., Hardy S., at. al. p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2 // *Science.* – 1999. – 283. – P. 1321-1325.
36. Kim S., Kaminker P., Campisi J. Telomeres, aging and cancer in search of a happy ending // *Oncogene.* – 2002. – 21. – P. 503-511.
37. Kirk K.E., Harmon B.P., Reichardt I.K., at. al. Block in anaphase chromosome separation caused by a telomerase template mutation // *Science.* – 1997. – 275. – P. 1478-1481.
38. Kirkwood T. Understanding the Odd Science of Aging // *Cell.* – 2005. – 120. – P. 437-447.
39. Knight J.A. The process and theories of aging // *Ann. Clin. Lab. Sci.* – 2005. – 25, N1. – P. 1 - 12.
40. Krauskopf A., Blackburn E.H. Rap1 protein regulates telomere turnover in yeast // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1998. – 95. – P. 12 486-12 491.
41. Kurenova E.V., Mason J.M. Telomere functions. A review // *Biochemistry.* – 1997. – 62. – P. 1242-1253.
42. Kyrion G., Boakye K.A., Lustig A.J. C-terminal truncation of RAP1 results in the deregulation of telomere size, stability, and function in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Mol. Cell. Biol.* – 1992. – 12. – P. 5159-5173.
43. Leroi A., Bartke A., Benedictis G., at. al. What evidence is there for the existence of individual genes with antagonistic pleiotropic effects // *Mechanisms of ageing and development.* – 2005. – 126, N3. – P. 421-429.
44. Li B., de Lange T. Rap1 affects the length and heterogeneity of human telomeres // *Mol. Biol. Cell.* – 2003. – 14. – P. 5060-5068.
45. Meyne J., Ratliff R.L., Moyzis R.K. Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1989. – 86. – P. 7049-7053.
46. Morgan W.F., Corcoran J., Hartmann A. DNA double-strand breaks, chromosomal rearrangements, and genomic instability // *Mutation Research.* – 1998. – 404. – P. 125-128.
47. Ohki R., Tsurimoto T., Ishikawa F. In vitro reconstitution of the end replication problem // *Mol. Cell. Biol.* – 2001. – 21. – P. 5753-5766.
48. Olovnikov A.I. A theory of marginotomy: the incomplete copying of template margin in enzymatic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon // *J. Theor. Biol.* – 1973. – 41. – P. 181-190.
49. Pardue M.L., Danilevskaya O.N., Traverse K.L., at. al. Evolutionary links between telomeres and transposable elements // *Genetica.* – 1997. – 100. – P. 73-84.
50. Raices M., Maruyama H., Dillin A. at. al. Uncoupling of Longevity and Telomere Length in *C. elegans* // *PLoS Genetics.* – 2005. – 1, N3. – P. 295–301.
51. Pardue M. L., Rashkova S., Casacuberta E., at. al. Two retrotransposons maintain telomeres in *Drosophila* // *Chromosome Res.* – 2005. – 13. – P. 443-453.
52. Pennaneach V., Putnam C.D., Kolodner R.D. Chromosome healing by de novo telomere addition in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Microbiol.* – 2006. – 59. – P. 1357-1368.
53. Rattan S. Theories of biological aging: Genes, proteins, and free radicals // *Free Radical Research.* – 2006. – 40, N12. – P.1230-1238.
54. Ray G, Husain S.A. Oxidants, antioxidants and carcinogenesis // *Ind. J. Exp. Biol.* – 2002. – 40. – P. 1213–1232.
55. Rincheval V., Renaud F., Lemaire C. at al. Bcl-2 can promote p53-dependent senescence versus apoptosis without affecting the G1/S transition // *Biochemical and Biophysical Research Communications.* – 2002. – 298, N2. – P. 282-288.
56. Rockmill B., Roeder G.S. Telomere-mediated chromosome pairing during meiosis in budding yeast // *Genes Develop.* – 1998. – 12. – P. 2574-2586.
57. Sullivan R. Contributions to senescence: non-enzymatic glycosylation of proteins // *Arch Physiol Biochem.* – 1996. – 104, N7. – P. 797-806.
58. Terman A., Brunk U. Aging as a catabolic malfunction // *The international journal of biochemistry and cell biology.* – 2004. – 36, N12. – P. 2365-2375.
59. Tommerup H., Dousmanis A., de Lange T. Unusual chromatin in human telomeres // *Mol. Cell. Biol.* – 1994. – 14. – P. 5777-5785.
60. Uraoka M., Ikeda K., Kurimoto-Nakano R. et al. Loss of Bcl-2 During the Senescence Exacerbates the Impaired Angiogenic Functions in Endothelial Cell by Deterating the Mitochondrial Redox State // *Blood Vessels.* – 2011. – 58, N2. – P. 254-263.
61. Van Steensel B., de Lange T. Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1 // *Nature.* – 1997. – 385. – P. 740-743.
62. Zhang R, Poleshko A, Einarson M. at. al. Identification of a functional network of human epigenetic silencing factors // *Biol. Chem.* – 2010. – 285. – P. 422-433.
63. Zhou X.Z., Lu K.P. The Pin2/TRF1-interacting protein PinX1 is a potent telomerase inhibitor // *Cell.* – 2001. – 107. – P. 347-359.

Отримано: 11 березня 2012 р.

Прийнято до друку: 21 листопада 2012 р.