

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ КОМИ НАУЧНОГО ЦЕНТРА
УРАЛЬСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РАН

На правах рукописи

Шилова

Шилова Любовь Алексеевна

РОЛЬ МЕХАНИЗМОВ РЕПАРАЦИИ ДНК В
РАДИАЦИОННОМ АДАПТИВНОМ ОТВЕТЕ
DROSOPHILA MELANOGASTER

Специальность: 03.02.08 - экология (биология)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, доцент
А.А. Москалев

Сыктывкар, 2014

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1 Взаимосвязи факторов среды с продолжительностью жизни и старением	10
1.2. Влияние экологических факторов на продолжительность жизни.....	20
1.2.1. Окислительный стресс	23
1.2.1.1. Окислительное повреждение липидов	27
1.2.1.2. Окислительное повреждение белков.....	28
1.2.1.3. Окислительное повреждение нуклеиновых кислот	30
1.2.2. Ионизирующее излучение	31
1.2.2.1. Ответ клетки на повреждения, вызываемые ионизирующим излучением... 33	
1.2.2.2. Эффекты малых доз ионизирующего излучения	35
1.2.3. Гипертермия.....	41
1.2.4. Ограничение диеты	44
1.3. Репарация ДНК и её роль в обеспечении стрессоустойчивости	46
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	54
2.1. Линии <i>Drosophila melanogaster</i>	54
2.2. Условия содержания <i>Drosophila melanogaster</i>	54
2.3. Активация кондиционной повсеместной сверхэкспрессии генов репарации ДНК.....	59
2.4. Оценка стрессоустойчивости	60
2.5. Оценка выживаемости при действии облучения	61
2.6. Оценка возраст-зависимой динамики экспрессии изучаемых генов	61
2.7. Статистический анализ результатов.....	62
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	64
3.1. Радиоадаптивный ответ и эффект радиационного гормезиса по показателям продолжительности жизни у линии дикого типа <i>Canton-S</i> и линий с мутациями в генах репарации ДНК в ответ на γ -излучение.....	64
3.2. Возраст-зависимое изменение уровня экспрессии генов репарации ДНК у линии дикого типа <i>Canton-S</i> после хронического воздействия γ -излучения	73

3.3. Оценка выживаемости при остром облучении у линий со сверхэкспрессией генов репарации ДНК.....	75
3.4. Влияние кондиционной повсеместной сверхэкспрессии генов репарации ДНК на устойчивость особей <i>Drosophila melanogaster</i> к действию стресс-факторов различной природы (прооксиданту параквату, гипертермии, голоданию).....	89
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	93
ВЫВОДЫ	108
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	111

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Основной задачей факториальной экологии является изучение механизмов ответа биологических систем на стрессовые воздействия окружающей среды, которые отражают возможности данных систем использовать эволюционно возникшие адаптивные морфогенетические программы (Васильев, 1988, 2005). Основной целью естественного отбора является обеспечение воспроизводства вида, в связи с чем, генетические программы ограничивают жизнь репродуктивным периодом (Skulachev, 2001). Однако существуют разногласия относительно существования специальных генетических программ (Мыльников, 1997).

Эндогенные и экзогенные факторы приводят к большому количеству повреждений, при этом повреждения молекул ДНК наиболее опасны вследствие угрозы нарушения генетической информации. Например, облучение или поступление ионов тяжелых металлов в организм животных приводит к дозозависимому увеличению количества ДНК-белковых сшивок в клетках головного мозга (Осипов, Сыпин, 1999). Накопление большого количества не восстановленных повреждений ДНК, особенно в участках, которые кодируют жизненно-важные белки, снижает приспособленность особи. Репарация ДНК является одним из ключевых механизмов ответа на повреждения ДНК. На данный момент имеется небольшое количество данных о роли генов репарации ДНК в обеспечении стрессоустойчивости целого организма.

Известно, что с возрастом происходит снижение эффективности репарации ДНК. С возрастом в клетках различных тканей наблюдается снижение активности ферментов эксцизионной репарации оснований – ДНК-гликозилаз (например, 8-оксогуанин ДНК-гликозилазы-1), АП-эндонуклеазы-1, полимеразы β и γ (Atamna et al., 2000; Does oxidative damage..., 2001; Intano et al., 2003; Age-related loss..., 2006). С возрастом происходит снижение уровня белков эксцизионной репарации нуклеотидов – ERCC3, PCNA, RPA, XPA и p53 (Mechanisms and implications..., 2000), и скорости удаления димеров циклобутанового пиримидина (Guo et al., 1998; Boyle et al., 2005). Также снижается способность клеток восстанавливать повреждения ДНК по типу негомологичного воссоединения концов (Vujayanti, Rao, 2006). Возможной причиной этого является снижение активности белков Ku70 и

Ku80, Mre11, ДНК-зависимой протеинкиназы, PARP-1 и Rad51 (Down-regulation of..., 1997; Tissue-specific changes..., 2003; Decreased expression of..., 2006; Seluanov et al., 2007; Gorbunova et al., 2007).

Также установлено, что мутации некоторых генов репарации ДНК могут приводить к снижению продолжительности жизни (ПЖ), преждевременному старению и гиперчувствительности к стрессовым воздействиям. Существуют несколько наследственных синдромов, связанных с нарушением синтеза белков эксцизионной репарации нуклеотидов, это пигментная ксеродерма (ПК, аномалии пигментации покровов тела и высокая частота рака кожи), синдром Кохейна (СК, аномалии развития нервной системы) и трихотиодистрофия (ТТД, преждевременное старение). Все три заболевания связаны с мутациями геликаз XPB и XPD. У мышей с мутацией XPD^{ТТД} трихотиодистрофия является частичным синдромом ускоренного старения. Их ПЖ составляет полтора года. Люди, страдающие ТТД, живут менее пяти лет. Мыши с двойной мутацией XPD^{ПК/СК} предрасположены к опухолям и ускоренному старению одновременно. Такие мыши гибнут в возрасте трех-шести недель (Restoring DNA repair..., 2005). Нарушение экспрессии генов, участвующих в репарации двуцепочечных разрывов ДНК, приводит к синдромам преждевременного старения: синдрому Вернера (аутосомно-рецессивная мутация в гене *Wrn*) и синдрому Блума (аутосомно-рецессивная мутация в гене *Blm*) (Carter et al., 2005; Kujoth et al., 2005). Ген синдрома Вернера у человека кодирует геликазу семейства RecQ (Sekelsky et al., 2000). Нокаут гена *Wrn* у мышей не приводит к ускоренному старению. Однако мутации *Wrn* и *Blm* усиливают патологические проявления ускоренного старения у мышей, которые потеряли ген теломеразной РНК матрицы *Terc* (Du et al., 2004).

Увеличение устойчивости живых организмов часто сопряжено с увеличением ПЖ. В нашей лаборатории было показано достоверное увеличение медианной и максимальной ПЖ у особей *Drosophila melanogaster* с конститутивной, кондиционной и отсроченной кондиционной сверхэкспрессией гена *D-Gadd45* в нервной системе, по сравнению с особями без сверхэкспрессии. Параллельно с этим данные особи более устойчивы к действию окислительного стресса, теплового шока и голодания (Plyusnina et al., 2011; The role of D-GADD45..., 2012).

Для выявления роли генов в регуляции ПЖ и стрессоустойчивости, обычно используют экспериментальные подходы, заключающиеся в снижении активности или полном выключении исследуемых генов, либо в искусственной сверхактивации (сверхэкспрессии) этих генов. В качестве фенотипических показателей повышения устойчивости на фоне измененной активности гена исследуют выживаемость при воздействии стрессоров. Поэтому в нашей работе для исследования роли генов репарации ДНК в ответе на действие различных факторов окружающей среды (ионизирующее излучение (ИИ), действие прооксидантов, гипертермия, голодание) проводили кондиционную (мифепристон-индуцибельную) повсеместную (в каждой клетке) сверхактивацию генов репарации ДНК, а также использовали линии с мутациями в изучаемых генах. Удобным объектом подобных исследований является плодовая мушка *Drosophila melanogaster*, находящаяся в контролируемых лабораторных условиях, которые позволяют оценивать действие исследуемого фактора в «чистом» виде. Наряду с этим, наличие полной информации о геноме и обширной коллекции лабораторных линий с различными генетическими модификациями, простоте содержания и короткому жизненному циклу позволяют не только исследовать механизмы действия фактора, но и оценить роль генотипа.

Цель и задачи исследования. Цель исследования заключалась в изучении роли генов репарации ДНК в обеспечении устойчивости *Drosophila melanogaster* к различным повреждающим факторам окружающей среды (ионизирующее излучение, действие прооксидантов, гипертермия, голодание). Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1) исследовать радиоадаптивный ответ и эффект радиационного гормезиса по продолжительности жизни у особей *Drosophila melanogaster* линии дикого типа *Canton-S* и линий с мутациями генов репарации ДНК (*D-Gadd45*, *mei-9*, *Mus209*, *mus210*, *Mus309*, *okr*, *spn-B*);

2) оценить влияние хронического (40 сГр) воздействия γ -излучения на предимагинальных стадиях развития на изменение уровня экспрессии генов репарации ДНК (*D-Gadd45*, *mei-9*, *Mus209*, *mus210*, *Mus309*, *okr*, *spn-B*) у имаго линии дикого типа *Canton-S* с возрастом;

3) проанализировать выживаемость после острого (30 Гр) воздействия γ -излучения у дрозофил со сверхэкспрессией генов репарации ДНК (*Brca2*, *D-Gadd45*, *Hus1*, *Ku80*, *mei-9*, *mnk*, *mus210*, *Rrp1*, *spn-B*, *WRNexo*);

4) изучить устойчивость к действию прооксидантов, гипертермии и голодания у дрозофил со сверхэкспрессией генов репарации ДНК (*Brca2*, *D-Gadd45*, *Hus1*, *Ku80*, *mei-9*, *mnk*, *mus210*, *Rrp1*, *spn-B*, *WRNexo*).

Положения, выносимые на защиту.

1) У особей с мутациями в генах, которые участвуют в распознавании повреждений ДНК (*D-Gadd45*, *Mus309*), эксцизионной репарации нуклеотидов (*mei-9*) и гомологичной рекомбинации (*Mus309*) радиоадаптивный ответ отсутствует. У особей-гетерозигот с мутацией в генах эксцизионной репарации и репарации двуцепочечных разрывов радиоадаптивный ответ проявляется в меньшей степени, чем у особей линии дикого типа *Canton-S*.

2) Хроническое воздействие γ -излучения в малой дозе на предимагинальных стадиях развития приводит к увеличению экспрессии генов эксцизионной репарации ДНК и репарации двуцепочечных разрывов ДНК, которая сохраняется на протяжении всей жизни дрозофил.

3) Кондиционная повсеместная сверхэкспрессия исследуемых генов репарации ДНК не индуцирует устойчивость к γ -излучению. Кондиционная повсеместная сверхэкспрессия генов, участвующих в распознавании повреждений ДНК (*D-Gadd45*, *Hus1*, *mnk*), эксцизионной репарации ДНК (*mus210*, *Rrp1*), репарации двуцепочечных разрывов ДНК (*Brca2*, *Ku80*, *spn-B* и *WRNexo*) повышает устойчивость дрозофил к действию прооксидантов, гипертермии и голодания.

Научная новизна. Впервые в комплексных экспериментах *in vivo* доказана роль генов, участвующих в распознавании повреждений ДНК (*D-Gadd45*, *Hus1*, *mnk*, *Mus309*), генов эксцизионной репарации нуклеотидов (*mei-9*, *mus210*, *Mus209*) и оснований (*Mus209*, *Rrp1*), генов репарации двуцепочечных разрывов ДНК по типу гомологичной рекомбинации (*Brca2*, *Mus309*, *okr*, *spn-B*) и негомологичного воссоединения концов (*Ku80*, *WRNexo*) в обеспечении устойчивости целостного организма к стресс-факторам различной природы – ионизирующему излучению, действию прооксидантов, гипертермии, голоданию. Доказано, что хроническое воздействие γ -излучения в малой дозе (40 сГр) на предимагинальных стадиях

развития особей линии дикого типа *Canton-S* приводит к увеличению экспрессии большинства изученных генов репарации ДНК у имаго, которая сохраняется на протяжении всей жизни дрозophil. Показано, что кондиционная повсеместная сверхэкспрессия исследуемых генов репарации ДНК не индуцирует устойчивость к γ -излучению, но сверхактивация генов *Brca2*, *D-Gadd45*, *Hus1*, *mnk*, *mus210*, *Ku80*, *Rrp1*, *spn-B* и *WRNexo* повышает устойчивость дрозophil к действию прооксидантов, гипертермии и голоданию.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты исследования раскрывают роль исследуемых механизмов репарации ДНК в ответе целого организма на такие факторы среды как, ионизирующее излучение, действие прооксидантов, гипертермия, голодание. С помощью доступных демографических методов анализа изучены и изложены связи между отдельными клеточными процессами в изменении параметров жизнедеятельности целого организма, в частности, продолжительности жизни.

Наличие ортологов исследуемых генов в геноме человека и млекопитающих позволяет рассматривать их в качестве мишеней для разработки препаратов фармакологического и генотерапевтического улучшения стрессоустойчивости организма в целях радиопротекции, геропротекции и цитопротекции, а также для прогнозирования отдаленных последствий облучения организма.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, четырех глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов), выводов, приложения и списка цитируемой литературы, содержащего 432 источника публикаций, в том числе 378 публикаций из зарубежных изданий. Работа изложена на 150 страницах машинописного текста и содержит 12 таблиц и 23 рисунка.

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 20 работ, в том числе 5 статей в рецензируемых журналах из списка изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Апробация и реализация диссертации. Результаты работы докладывались на научных конференциях молодых ученых Института биологии (Сыктывкар, 2012; 2013), на международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века» (Пущино, 2012; 2014), на международной

конференции «Генетика старения и долголетия» (Москва, 2012; Сочи, 2014), на Ежегодном съезде европейского общества по радиационным исследованиям (Италия, 2012; Ирландия, 2013, Греция 2014), на международной школе молодых учёных по молекулярной генетике «Непостоянство генома» (Звенигород, 2012), на международном съезде геронтологов и гериатров (Сеул, 2013), на международной конференции «БИОРАД-2014» (Сыктывкар, 2014).

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность руководителю диссертации д.б.н. Мосвалеву А.А. за идею, лежащую в основе данной работы, за надежное руководство, полезные советы и предложения. Особую благодарность автор выражает коллегам по работе к.б.н. Шапошникову М.В., к.б.н. Плюсниковой Е.Н., лаб-иссл. Земской Н.В. за консультации и помощь в осуществлении экспериментов. Коллективу отдела радиоэкологии Института биологии Коми НЦ УрО РАН за полезные советы и замечания в ходе работы над текстом диссертации. Автор благодарен своим родителям и близким людям за их всестороннюю поддержку на протяжении всего исследовательского процесса.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе рассмотрены данные литературы по основным механизмам влияния экологических факторов (ионизирующее излучение, голодание, гипертермия и окислительный стресс) на ПЖ и старение организма. Рассмотрены эффекты окислительного стресса основных клеточных структур (окислительное повреждение липидов, белков, нуклеиновых кислот). В разделе об ионизирующих излучениях рассмотрены вопросы ответа клетки на повреждения, вызываемые ионизирующим излучением и эффекты малых доз ионизирующего излучения. В заключительном разделе рассмотрены вопросы репарации ДНК.

1.1 Взаимосвязи факторов среды с продолжительностью жизни и старением

Средняя ожидаемая продолжительность жизни при рождении является одним из основных показателей уровня социально-экономического развития, индикатором качества жизни населения стран и регионов. То обстоятельство, что мировое население доживает до преклонных лет, является одним из главных достижений современного общества. Вместе с тем старение создает серьезные проблемы и будет главным вопросом в области социально-экономического развития стран в XXI веке. По данным ООН к 2050 году около 2 млрд. человек достигнут возраста шестидесяти лет и старше, причем восемьдесят процентов из них будут жить в развивающихся странах; в то же время будет происходить сокращение трудовых ресурсов, которые должны поддерживать постоянно растущее пожилое население (Развитие в условиях..., 2008). Старение населения - процесс глобальный и закономерный. Этот процесс имеет место во всех странах и обусловлен влиянием особенностей динамики рождаемости, смертности и миграции населения. Для России к 2050 году ожидается монотонное сокращение общей численности населения, 95 % доверительный интервал составит 94.4–122.8 млн. человек. В то же время будет неуклонно возрастать доля пожилого населения. (Сафарова, 2009). В ходе второй Всемирной ассамблеи по проблемам старения, состоявшейся в 2002 году, правительства, признавая сложность проблем, возникающих в результате старения населения, приняли Мадридский международный план действий по проблемам старения.

Приоритетным направлением дальнейшего развития биологических наук являются исследования в области генетики долголетия, целью которых является изучение механизмов старения, чтобы разработать вмешательства, направленные на увеличение периода активного долголетия. Выявление генов долголетия в исследованиях на модельных животных позволит достигать замедления старения человека путем воздействия (ингибирования или индукции) на уровень экспрессии генов, ассоциированных с ускоренным старением или долголетием, либо через фармакологическую регуляцию их белковых продуктов. Старение организма представляет собой медленное угасание транскрипционной активности генома, дегенерацию его транскриптома (Баранов, Баранова, 2007). В процессе старения происходит снижение экспрессии ключевых генов, которые имели высокую экспрессию в молодости и наоборот. Таким образом, одним из способов решения проблемы старения является сохранение того уровня экспрессии генов, который был в молодости. Один из разделов диссертационной работы посвящен исследованию возможности продления жизни на модели дрозофилы с помощью сверхэкспрессии генов репарации ДНК.

Первые работы в области генетики долголетия были проведены Ваттиаксом. Ему удалось увеличить ПЖ особей *Drosophila subobscura*, полученных от старых, долгоживущих родителей по сравнению с потомками молодых родителей (Wattiaux, 1968). Михаэль Роуз и Брайн Чарлсворт провели серию экспериментов по селекции на долгожительство особей *Drosophila melanogaster* и вывели долгоживущую линию мух (Rose, Charlesworth, 1981). Группа Томаса Джонсона в 1988 году обнаружила, что мутация единичного гена *age-1* у нематоды *Caenorhabditis elegans* увеличивает ПЖ на 70% (Friedman, Johnson, 1988). Несколько позже, Майкл Язвинский с соавторами идентифицировали несколько генов, которые обеспечивают продление жизни дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, и в частности ген *LAG1* (Cloning and characterization..., 1994). Дополнительная индукция активности *LAG1* в постаревших клетках продлевает жизнь этих клеток примерно на треть (Jazwinski, 2002).

Так согласно версии 17 GenAge от 18.12.2013 (<http://genomics.senescence.info/genes/>), у модельных организмов всего насчитывается

1818 геронтогенов. При этом у *Mus musculus* известно – 112 таких генов, *Drosophila melanogaster* - 140, *Caenorhabditis elegans* - 741, *Saccharomyces cerevisiae* - 825 генов.

ПЖ представляет собой совокупную приспособленность организма. При этом под приспособленностью понимают требования, предъявляемые в определенных условиях окружающей средой к определенному генотипу. Средняя продолжительность жизни зависит от условий обитания представителей группы, чувствительности к болезням, числа несчастных случаев, самоубийств и убийств, тогда как максимальная продолжительность жизни практически исключительно определяется скоростью старения. Существует множество факторов окружающей среды, которые влияют на ПЖ. При этом наибольшим эффектом обладают факторы, которые оказывают влияние на обмен веществ. Это температура, длина светового дня, особенности питания.

ПЖ особей одного вида, живущих в сходных условиях, колеблется в очень широких пределах. С одной стороны, смерть организма может происходить на эмбриональной стадии. Например, на стадии зиготы гибнет около 70-80 % эмбрионов (Diamond, 1987). С другой стороны, длительность жизни отдельных индивидуумов может значительно превышать соответствующие средние значения для всей популяции (Гаврилов, Гаврилова, 1991). Внутривидовое варьирование может определяться случайными причинами, а также особенностями жизненного цикла, различиями в онтогенетических программах (матки и рабочие особи общественных перепончатокрылых), и полиморфизмом генов ПЖ (Москалев, 2008б).

Существование генетической компоненты, обуславливающей ПЖ, подтверждается большим количеством фактов. Например, существует конкордантность между ПЖ монозиготных (генетически идентичных) близнецов, а также положительная корреляция между ПЖ долгожителей (живущих 90 и более лет) и кровными родственниками (Individual differences..., 1989; McGue et al., 1993; Genetic influence..., 2006). Известны линии инбредных (генетически идентичных) мышей, отличающиеся ПЖ (в интервале от 120 до 700 дней) (Gruneberg, 1955). ПЖ дрозофил зависит от таких генетических эффектов как инбредная депрессия и гетерозис. При инбредной депрессии наблюдается снижение ПЖ и, а также плодовитости, скорости развития. Гетерозис проявляется в увеличении

составляющих приспособленности (Mather, 1955; Hutchinson, Rose, 1991; Хаустова и др., 2006).

Наличие межвидовых различий в ПЖ иногда рассматривается как доказательство ее генетической обусловленности (Москалев, 2008б). Среди млекопитающих рекорд долгожительства принадлежит гренландскому киту, ПЖ которого превышает 200 лет (Красная книга РФ, 2002). Известны деревья, продолжающие плодоносить в возрасте, превышающем несколько тысяч лет, например, тис ягодный (*Taxus baccata*), фисташка туполистная (*Pistacia mutica*), можжевельник высокий (*Juniperus excelsa*), земляничник мелкоплодный (*Arbutus andrachne*), дуб скальный (*Quercus petraea*), сосна долгоживущая (*Pinus longaeva*) (Мечников, 1988; Москалев, 2008б). У черепах, некоторых видов рыб и птиц ПЖ может превышать 150 лет (Новосельцев и др., 2003). В то время как, например, самцы некоторых коловраток завершают свой полный жизненный цикл, от яйца до смерти, в течение 50 – 60 часов. Человек может сравниться с долгоживущими рыбами, рептилиями и птицами и по ПЖ, и по способности сохранять высокую жизненную активность в старом возрасте (Воейков, 2002). Максимальная зафиксированная ПЖ человека 122 года и 164 дня (Growing old..., 2004; Fahy et al., 2010).

Старение является фактором, определяющим биологическую компоненту смертности (Гаврилов, Гаврилова, 1991). Таким образом, старение обуславливает ПЖ в отсутствие внешних или случайных причин. Возрастные структурные и функциональные изменения возникают в течение жизни любого организма на всех уровнях организации – молекулярном, клеточном, тканевом и на уровне целого организма. Изменения, которые появляются после достижения половой зрелости, составляют феномен старения. В качестве измеряемых показателей старения предлагается использовать различные параметры: скорость деления клеток и заживления ран, эластичность тканей, изменение массы органов, репродуктивную способность, снижение обмена веществ и многие другие. Любой из этих параметров не удовлетворяет требованиям единой меры старения. Старение сообщества организмов можно оценивать по кривой выживаемости в зависимости от возраста. Этот статистический метод оценки старения отражает основной признак старости – снижение жизнеспособности организма, приводящее к

увеличению вероятности гибели. У человека старость проявляется, прежде всего, в снижении и изменении функций организма. Снижаются плодовитость, работоспособность, устойчивость к различным повреждающим факторам внешней среды. В старости падает общий синтез белков и нуклеиновых кислот, уменьшается уровень окислительного фосфорилирования, активность многих ферментов, уменьшается число митозов (Ванюшин, Бердышев, 1977).

Именно в период старения уменьшается приспособляемость к внешним и внутренним стресс-факторам, разрушается механизм гомеостаза и увеличивается подверженность болезням. Смерть наступает в какой-либо момент этого периода, потому что одно или несколько заболеваний или стрессов действуют на тот или иной орган(ы) настолько глубоко, что его (их) восстановление к норме становится невозможным (Канунго, 1982).

С эволюционной и генетической точки зрения старение – это неадаптивный процесс, который является следствием накопления повреждений и случайных мутаций с отсроченными вредными побочными эффектами. Эта идея получила развитие в эволюционных теориях накопления мутаций, антагонистической плейотропии и отработанной сомы. Теорию накопления мутаций предложил Питер Медавар (Medawar, 1952). Он считал, что старение – это случайное неадаптивное явление. Причиной смерти для большинства видов животных, обитающих в дикой природе, как правило, являются случайные внешние повреждения, в результате чего в природе старые индивидуумы встречаются редко и незначительно влияют на генофонд популяции. Изменения, которым подвергается организм после завершения репродуктивной функции, не имеют значения для эволюции, а потому нет необходимости закрепления механизмов эффективного устранения вредных мутаций, проявляющихся в позднем возрасте. В этом случае старение обусловлено стохастическим снижением функциональности и действием мутаций, оказывающих негативный эффект в пострепродуктивном возрасте. Джордж Уильямс является автором теории антагонистической плейотропии, согласно которой аллели, увеличивающие выживаемость или репродукцию на ранних этапах жизненного цикла, но при этом снижающие их на поздних этапах, могут накапливаться в популяциях, поскольку селективные преимущества ранней пользы перевешивают поздний ущерб

(Williams, 1957). В результате реализации подобных мутаций происходит старение организма. Частным случаем теории антагонистической плейотропии является предложенная Томасом Кирквудом теория отработанной сомы, которая предполагает существование генов, контролирующих перераспределение энергии от самоподдержания соматических функций к репродукции (Kirkwood, 1977). При благоприятных условиях организм расходует энергию на поддержание жизнеспособности для увеличения длительности репродуктивной жизни, а при неблагоприятных условиях выгоднее направить ресурсы на быстрое размножение, чтобы успеть оставить потомство до своей гибели.

Некоторые исследования опровергают основные положения эволюционных гипотез старения. В основном это касается постулируемой облигатной взаимосвязи между ПЖ и репродукцией. Кэрол Финч при сравнении видов, которые имеют разное развитие (с превращением и без превращения) и ПЖ, показывает, что существует мало доказательств того, что воспроизводство влияет на скорость старения (Finch, 1994). Стефен Стернс на примере разных видов животных показал отсутствие жесткой корреляции между ПЖ и ранней или поздней плодовитостью животных (Stearns, 1992). Эрик Ле Борг, основываясь на демографических данных по человеку показал, что эволюционные теории не всегда справедливы (Le Bourg, 2001). Исследования норвежских мужчин и женщин (Grundy, Kravdal, 2008) и североамериканского племени индейцев амишей (Does having children..., 2006) показали, что наличие потомства может продлевать жизнь. Матки пчел, термитов и муравьев имеют и высокую плодовитость, но при этом их ПЖ выше, чем у рабочих особей, которые являются стерильными.

Денхам Харман и Николай Эммануэль предложили свободнорадикальную теорию старения (Эммануэль, 1975; Harman, 1956). Согласно этой теории старение и болезни, ассоциированные со старением, обусловлены накоплением с возрастом окислительных повреждений клеточных структур. Эта теория старения прогнозирует, что разница в ПЖ может быть обусловлена видоспецифическим антиоксидантным потенциалом клеток. То есть, у долгоживущих видов антиоксидантная система защищает от окислительных повреждений клеточных компонентов более эффективно, чем у короткоживущих. Линнан с коллегами предложили митохондриальную теорию старения, согласно

которой ведущей причиной старения является затухание клеточной биоэнергетики. Это затухание связано с накоплением повреждений в мтДНК, вызываемых активными формами кислорода (АФК). Поскольку АФК генерируются электрон-транспортной цепью (ЭТЦ) самих митохондрий, то образуется порочный цикл, ведущий к прогрессивному увеличению АФК, нарастанию количества поврежденных ими биополимеров и, как следствие, снижению биоэнергетики. (Linnane et al., 1989).

Свободнорадикальная теория господствовала в геронтологии долгие годы. Однако на сегодняшний день существует некоторое количество публикаций, опровергающих основные положения свободнорадикальной теории старения. Например, в работах Янгмока Янга и соавторов, а также Вивианы Перез и коллег показано, что сверхэкспрессия антиоксидантных ферментов CuZnSOD, MnSOD не приводит к увеличению ПЖ у мышей (Overexpression of Mn..., 2009; The overexpression of..., 2009). Обнаружена положительная корреляция между окислительным стрессом и увеличением ПЖ (Ristow, Schmeisser, 2011). Кроме того, недавние исследования показали, что увеличение генерации активных форм кислорода, в некоторых случаях, увеличивает ПЖ (Ranjan et al., 2013). Эпидемиологические исследования последних лет показывают, что добавки на основе антиоксидантов не снижают риск проявления возраст-зависимых заболеваний, в том числе рака (Fusco et al., 2007) .

На сегодняшний день получено множество экспериментальных данных, которые опровергают основной механизм митохондриальной теории старения. Накопленные данные позволяют сделать вывод о том, что в процессе старения организма не происходит потеря активности ферментов респираторной цепи (Absence of..., 1996; Lightowlers et al., 1999; Maklashina, Ackrell, 2004). Эти данные также подтверждаются экспериментами не касающимися непосредственно ЭТЦ. Было показано, что перенесенные митохондрии от старых доноров в р0 клетки HeLa (клетки HeLa без мтДНК) полностью восстанавливают свою функциональную активность (Nuclear but not..., 1994). В другой работе было показано, что перенос ядер клеток HeLa в клетки старых доноров, также устраняет все митохондриальные дисфункции (Imai, Nakagawa, 2003; Identification of..., 1997)

Таким образом, экспериментальные данные последних лет ставят под сомнение митохондриальную и свободнорадикальную теории старения. На смену им приходят новые теории, которые базируются на том, что активные формы кислорода играют роль сигнальных молекул, которые опосредуют стресс-реакции, необходимые для обеспечения долголетия (Thannickal, Fanburg, 2000; Bhattacharjee, 2012; Lagouge, Larsson, 2013; Liochev, 2013; The free radical..., 2013).

Также к стохастическим теориям старения относится теория старения в результате накопления ошибок в молекуле ДНК, выдвинутая Лео Сциллардом (Szilard, 1959). Исследуя эффекты воздействия радиации на живые организмы, было показано, что действие ионизирующего излучения в больших дозах существенно сокращает срок жизни людей и животных. Под воздействием радиации в большой дозе происходят многочисленные мутации в молекуле ДНК и инициируются некоторые симптомы старения, такие как преждевременное поседение или раковые опухоли. Из своих наблюдений Лео Сциллард сделал вывод, что мутации являются непосредственной причиной старения живых организмов. Лесли Оргель считал, что основной причиной старения является накопление с возрастом генетических повреждений в результате мутаций. Эти мутации могут быть спонтанными, а также вызванными различными повреждающими факторами (например, ионизирующая радиация, стрессы, ультрафиолетовые лучи, вирусы, накопление в организме побочных продуктов химических реакций и другие). При этом гены, в связи с накоплением повреждений ДНК, теряют способность правильно регулировать клеточные процессы (Orgel, 1963).

В современных работах указывается на существование количественной связи между уровнем повреждений ДНК, их репарацией и скоростью старения (The oxidative DNA..., 2012; The role of DNA..., 2013). Известно, что с возрастом происходит снижение эффективности репарации ДНК в тканях (Gottschling, 2006; Coppedè, Migliore, 2010; Couzin-Frankel, 2013). Шивон Грегг с соавторами на клетках печени молодых и старых мышей показали наличие выраженного сходства функциональных и гистопатологических изменений между нормальным старением, и ускоренным старением, обусловленным дефектом репарации ДНК (A mouse model..., 2012).

Нейроэндокринные теории старения также связывают процесс старения с нарушением функционирования биологических систем, в частности, с нарушением нейроэндокринной регуляции гомеостаза. Владимир Михайлович Дильман в начале 50-х годов XX века выдвинул и обосновал идею о том, что причиной старения может быть повышение порога чувствительности гипоталамуса к регуляторным гомеостатическим сигналам (Дильман, 1986). Это приводит, например, к возрастному выключению функции репродуктивной системы, к возрастным изменениям в гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системе (Анисимов, 2000; Анисимов, 2008). Стероидные гормоны, в частности кортизол, ускоряют процессы старения (Фролькис, 1988; Хаснулин и др., 2006). Поскольку кортизол является гормоном стресса, развитие преждевременного старения связывают со стрессом (дезадаптивными расстройствами). Формирование стресс-ответа обеспечивает приспособленность организма к факторам среды, но взамен происходит быстрое изнашивание всех систем и как следствие этого – старение. Всё больше сведений накапливается о роли эпифиза в процессах старения. При старении его функция снижается, что выражается, прежде всего, в нарушении ритма и уровня секреции мелатонина (Дильман, 1982; Melatonin prevents..., 1997).

Нейроэндокринные теории старения являются достаточно хорошо обоснованными. Хорошо известно, что нейроэндокринная ось регулирует процесс развития организма, а также процессы инволюции яичников и функции яичек (Анисимов, 2007). Кроме того, доказана связь нарушения с возрастом выработки гормона роста (Association of insulin..., 1997), дегидроэпиандростерона (Birkenhäger-Gillesse et al., 1994) и вторичных половых стероидов (Relations of endogenous..., 1994). Элева с соавторами показали, что существует возраст-зависимое снижение эффективности работы кортикотропин-рилизинг-гормона (Elewa et al., 2012).

С другой стороны, ряд исследователей рассматривают старение как адаптивный процесс, обусловленный особой генетической программой, сформировавшейся под действием селективных механизмов надындивидуального характера, таких как родственный отбор. Основная идея данных теорий заключается на том, что все видовые и индивидуальные признаки организма определяются заложенной при оплодотворении генетической программой.

Поэтому изменения, имеющие фундаментальное значение для всех проявлений старения, также происходят на генетическом уровне.

В XIX веке Август Вейсман предположил существование программы онтогенеза, направленной на освобождение жизненного пространства и ресурсов для молодых поколений (Weismann, 1889). В качестве биологического механизма запрограммированного старения было предложено ограничение числа делений соматических клеток. При этом межвидовые различия в ПЖ животных он объяснял числом клеточных генераций. Леонард Хейфлик и Пол Мурхед выявили старение фибробластов в культуре клеток человека, выразившееся в их ограниченной способности к делению, получившее название лимита Хейфлика (Hayflick, Moorhead, 1961). Снижение числа клеточных делений, с одной стороны, уменьшает вероятность развития рака, однако также ограничивает ПЖ из-за накопления старых клеток и снижения способности их возобновления с возрастом, что приводит к ухудшению функционирования тканей, органов и организма в целом (Campisi, 2005). В качестве механизма ограничения числа делений клетки, Алексей Оловников предположил существование «митотических часов», функционирование которых обусловлено укорочением концевых участков хромосом при митотическом делении нормальных соматических клеток. Также он высказал гипотезу о том, что в нестареющих клетках (раковых, зародышевых, стволовых и другие) должна существовать специализированная ферментативная система, которая контролирует и поддерживает длину теломерной ДНК. (Оловников, 1971). Открытие фермента теломеразы у низших эукариот (Greider, Blackburn, 1985) показало, что существуют механизмы, противостоящие старению клеток через укорочение теломер.

В лаборатории Элизабет Блекберн показали, что у людей, находящихся под воздействием длительного стресса, теломеры укорачиваются гораздо быстрее, чем у их ровесников, находящихся в обычной ситуации (Accelerated telomere..., 2004). Также было показано, что главные категории факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний связаны с низкой активностью теломеразы (Cell aging in..., 2005).

Не смотря на существование доказательств обратной корреляции между длиной теломер и ПЖ клеток и организма, существуют также экспериментальные

данные, опровергающие теломерную теорию старения. Например, показано, что старение клеток в некоторых видах тканей не сопровождается укорочением теломер (Analysis of telomere..., 1998; Telomere lengths are..., 2002; Kang et al., 2003). Известно, что у многих модельных организмов (дрожжей, мышей) теломера-ассоциированное репликативное старение удается обнаружить лишь в случае вмешательств, приводящих к выключению механизмов, достраивающих теломеры. Поврежденные теломеры в стареющих клетках удалось обнаружить только у человека (Martin, Buckwalter, 2001; Chai et al., 2005), также в большинстве соматических клеток людей активность теломеразы репрессирована. Некоторые эпидемиологические исследования, проведенные в последние годы разными группами авторов, не обнаружили связи длины теломер с когнитивными, физическими или социальными признаками (Is Socioeconomic..., 2013; Telomere length and..., 2012).

Таким образом, старение – это универсальный и комплексный процесс, связанный с действием факторов среды на живые организмы, ответа биологических систем на них и процессами онтогенеза. Оно представляет собой многоуровневый процесс возрастзависимого фрактального роста количества отклонений гомеостаза на молекулярном, субклеточном, клеточно-тканевом и системном уровнях (Москалев, 2010).

1.2. Влияние экологических факторов на продолжительность жизни

Клетки часто подвергаются действию различных эндогенных и экзогенных стрессоров, которые прямо или опосредованно могут приводить к нарушениям протекания процессов метаболизма. Неблагоприятные обстоятельства, вызывающие стрессовое состояние называют стресс-факторами. К экологическим факторам, вызывающие стресс относят гипер- и гипотермию, гипо- и гипероксию, ионизирующие излучения, УФ, голодание, перенаселение. Стресс был определен как неспецифический ответ организма на любой внешний раздражитель (Ганс Селье, 1926 год) или любое изменение в психологических гомеостатических процессах (Сьюзан Берчфилд, 1979). (Burchfield, 1979; Weissmann, 2007). В современном понимании, стресс это внезапное изменение, индуцирующее повреждения на молекулярном, клеточном и организменном уровнях (Москалев,

2008б). По длительности воздействия стресс классифицируют на острый и хронический. Острый стресс возникает при неожиданном воздействии стрессового фактора, сверхсильного по своей значимости и интенсивности. Хронический стресс возникает под влиянием постоянно действующих раздражителей, однако, умеренной интенсивности. В ответ на стрессовые воздействия в организме происходит комплекс реакций под общим названием адаптационный синдром. Ганс Селье выделил 3 стадии общего адаптационного синдрома: реакция тревоги, стадия сопротивляемости и стадия истощения. На первой стадии происходит мобилизация адаптационных возможностей. В ходе этой стадии активируются анаболические процессы, ведущие к развитию следующей стадии – стадии сопротивляемости. Биологическое значение ее заключается в том, что на этой стадии повышается резистентность организма к стресс-фактору. При длительном действии повреждающего агента адаптация нарушается и наступает третья стадия – стадия истощения, когда наступают необратимые изменения в процессах метаболизма клетки. Гибель может наступить на стадии резистентности, если повреждающее воздействие было настолько сильным, что адаптация к нему оказалась невозможной, но обычно это происходит именно на стадии истощения. Адаптационный синдром при умеренном и не длительном стрессе приводит к повышению резистентности организма к вызвавшему его стресс-фактору, а также может приводить к резистентности в ответ на некоторые другие стресс-факторы (Weissmann, 2007).

Наиболее фундаментальными и общими для всех живых организмов являются молекулярно-генетические механизмы ответа на стресс. Основными макромолекулами, реализующими стресс-реакцию клетки, являются белки (Welch, 1992; Feder, 1996; Турышева и др., 2008; The role of..., 2012; Methionine sulfoxide reductase..., 2012). Формирование клеточного ответа на воздействие стрессового фактора происходит в три этапа: восприятие первичного сигнала, внутриклеточная передача этого сигнала и его усиление и ответная реакция клетки на молекулярном, метаболитном и физиологическом уровнях. Стресс-сигналинг строится на белках-рецепторах (сенсорах), трансдукторах, транскрипционных факторах, эффекторах. Стресс-факторы активируют рецепторы в плазматической мембране или вызывают повреждения клеточных структур и макромолекул, которые распознаются

сенсорами в цитоплазме. Далее через различные медиаторы (трансдукторы) – протеинкиназы, фосфатазы, деацетилазы и другие белки происходит индукция одного или нескольких транскрипционных факторов. Активированный транскрипционный фактор перемещается из цитоплазмы в ядро, где связывается со специфическим промотором стресс-индуцируемого гена и запускает синтез его мРНК. Далее по матрице мРНК синтезируется белок, выполняющий определенную функцию в ответе на стресс. В результате ранее неактивные гены начинают активно экспрессироваться, а некоторые активные гены теряют свою активность (Cellular stress responses..., 2010; Berridge, 2012).

Положительная корреляция между ПЖ и стрессоустойчивостью предполагает, что способность распознавать и отвечать на внешнесредовые воздействия важна для регулирования ПЖ. Устойчивость к любому физическому стрессу коррелирует с ПЖ у многих видов. Например, оксидативное повреждение ускоряет старение, тогда как устойчивость к данному виду повреждения удлиняет жизнь. Поэтому долгоживущие мутанты *Caenorhabditis elegans* устойчивы к оксидативному повреждению (Москалев, 2008б). Скорость старения и проявление возраст-зависимых патологий связаны со стрессоустойчивостью организма. Для нематод, дрозофил, мышей, крыс, шимпанзе и человека показано возраст-зависимое изменение экспрессии генов в ответ на стресс (Yankner et al., 2008; Bishop et al., 2010). Ответ клетки на стресс на молекулярном уровне контролируется с помощью высоко консервативных сигнальных молекул и транскрипционных факторов, таких как инсулиновый сигналинг, сиртуины, TOR-сигналинг и AMP-активируемой киназы сигнальный путь (Kenyon, 2010). Скоординированные действия этих сигнальных путей приводят к гомеостазу в стрессовых условиях, например, при изменении в составе пищи, температуре и уровне кислорода, а также из-за внутренних ошибок, например, при неправильном сворачивании белков, повреждении ДНК. Исследования, проведенные на модельных организмах, показывают, что изменения в сигналинге может повысить эффективность системы стресс-ответа и тем самым увеличить ПЖ и снизить риск проявления возрастных патологий (Haigis, Yankner, 2010).

В этой главе рассмотрены основные механизмы ответа клетки на стрессовые воздействия разной природы (окислительный стресс, ионизирующее

излучение, гипертермия, ограничение диеты), а также, зависимость ПЖ от действия данных стресс-факторов окружающей среды.

1.2.1. Окислительный стресс

Одним из механизмов, через которые реализуется воздействие факторов окружающей среды на организм, является окислительный стресс. Его можно определить как результат нарушения баланса между продукцией оксидантов и эффективностью работы антиоксидантной системы, приводящий к повреждениям ДНК (Crawford, Davies, 1994; Sies, 1997). Главной составляющей окислительного стресса являются активные формы кислорода (АФК) и азота (Free radicals and..., 2007; Inflammatory cytokines..., 2013; Tripathi, Pandey, 2013; Oxidative stress status..., 2014). Индукторами свободных радикалов могут быть как факторы внешней, так и внутренней среды. Они возникают под воздействием ионизирующего и ультрафиолетового излучений, химических окислителей, загрязнителей воздуха, воды, почв и продуктов питания, а также при повышенном потреблении кислорода (например, при физической нагрузке) (Скулачев, 2001; Sies, 1997). А также в ходе обычных процессов клеточного метаболизма: в процессе окислительного фосфорилирования в митохондриях, в реакциях с участием цитохрома P450, белками плазматической мембраны НАДФ-оксидазами, в результате липидного метаболизма в пероксисомах и активности различных цитозольных ферментов, например циклооксигеназы (Анисимов, 2008; Porter, Coon, 1991; Ayala, Cutler, 1997; Finkel, Holbrook, 2000; Balaban et al., 2005).

Повреждения в клетке, вызванные окислением, запускают каскад реакций через такие белки трансдукции сигнала как c-Jun-N-концевая киназа (JNK) и p38 митоген-активируемая протеинкиназа (МАРК) (Redox control..., 2002). Белки p38 и МАРК имеются у всех эукариот. Они необходимы для эффективной активации ответа клетки на различные стрессоры, тем самым она обеспечивает выживаемость клеток (Wagner, Nebreda, 2009). Сигналом для активации служат различные стрессы, в ответ на которые происходит фосфорилирование субстратов МАРК (Shiozaki, Russell, 1995; Nguyen et al., 2000). Недавние исследования показывают, что АФК, образующиеся в митохондриях, служат сигнальными молекулами, способными активировать JNK (Finkel, 2011). Активация JNK

происходит за счет того, что АФК инактивируют цистеинзависимую фосфатазу, которая регулирует c-Jun (Kamata, 2005). В трансдукции сигнала об окислительном повреждении у *Saccharomyces cerevisiae* принимают участие CWI, TOR и RAS пути. У млекопитающих этот список дополняет протеинкиназа С (Nitti et al., 2008).

Свободные радикалы синтезируются в самих клетках, поскольку они необходимы для нормального протекания некоторых физиологических процессов. Это передача клеточного сигнала (выступают в качестве вторичных внутриклеточных мессенджеров при трансдукции сигнала от рецепторов некоторых цитокинов, факторов роста, гормонов и медиаторов), защита от заражения патогенами (выделяются нейтрофилами, эозинофилами, макрофагами, моноцитами), участие в биохимических процессах, сопровождающихся модификацией молекул, участие в регуляции клеточной пролиферации и индукции транскрипции определенных генов (Маянский, Маянский, 1983; Effects of UVB-induced..., 2010). В ходе выполнения последней функции АФК активируют компоненты трансдукции сигнала, а именно, транскрипционные факторы p53 и члены семейства NF-κB. В результате происходит экспрессия генов, приводящая либо к увеличению антиоксидантной защиты, либо к активации апоптоза (Finkel, Holbrook, 2000; The antioxidant function..., 2005).

Вследствие своей высокой реакционной способности, при высоких концентрациях свободные радикалы потенциально токсичны, мутагены и канцерогенны. Служат причиной различных повреждений макромолекул и нарушений метаболических путей. Они вызывают одиночные или двойные разрывы ДНК, агрегацию и денатурацию белков, сшивки белковых молекул и нитей ДНК, перекисное окисление липидов, укорочение теломер, подавление гликолиза, апоптоз или некроз (Кольтовер, 1998; Orr, Sohal, 1994; Vayssier, Polla, 1998; Oxidative DNA damage..., 2001; Mitochondria, aging and..., 2001; Skulachev, 2001; Effects of UVB-induced..., 2010; Биологическая роль..., 2012). Именно поэтому для защиты клеток от свободных радикалов в процессе эволюции развивались механизмы их эффективной детоксикации. К ним относят: ферменты антиоксидантной защиты: супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза и каталаза; гидрофильные вещества-антиоксиданты, такие как глутатион и аскорбиновая кислота; липофильные антиоксиданты, такие как токоферолы, флавоноиды,

каротиноиды и убихинон; белки, участвующие в восстановлении окисленных антиоксидантов и ферментов глутатион-редуктазы (Halliwell, Gutteridge, 2007).

Свободным радикалом называется молекула, которая содержит один или более неспаренных электронов на внешней атомной орбитали. Существуют следующие типы АФК: синглетный кислород ($^1\text{O}_2$), супероксид-анион (O_2^-), перекись водорода (H_2O_2), высоко реакционно-способный гидроксильный радикал ($\text{HO}\bullet$), алкоксильный радикал ($\text{RO}\bullet$), пергидроксильный радикал ($\text{HO}_2\bullet$), оксид азота ($\bullet\text{NO}$), нитроксильный радикал ($\text{NO}_2\bullet$), перекисный радикал ($\text{RO}_2\bullet$), а также производные галогенов: HOCl , HOI , HOBr , HOCN (Halliwell, Gutteridge, 2007).

Дыхательная цепь митохондрий является основным источником АФК (Finkel, Holbrook, 2000). В аэробных клетках 90 % поступающего кислорода используется в электрон-транспортных цепях (ЭТЦ) митохондрий. Молекулы НАД(Ф) и ФАД переносят электроны по цепи четырех белковых комплексов: НАДН-оксидазы, сукцинатдегидрогеназы, цитохром-редуктазы и цитохром-оксидазы. Биологическая функция, которую выполняют эти окислительно-восстановительные цепи, заключается в создании протонного градиента в межмембранном пространстве митохондрий, который расходуется АТФ-синтазой для запасания энергии в виде АТФ. Побочными продуктами данной реакции являются оксид углерода (IV) и вода. Однако небольшой процент электронов может вытекать из комплекса I или III и приводить к образованию супероксид-радикалов вместо воды (Balaban et al., 2005).

Супероксид-анион радикал, будучи заряженным, не может переходить через биологические мембраны. В процессе его протонирования образуется пергидроксильный радикал, который легко проходит эти барьеры. Дальнейшее добавление одного электрона приводит к образованию пероксида водорода, который является электронейтральной молекулой, благодаря чему легко проникает через биологические мембраны. Удаление одного электрона у пероксида водорода в присутствии Fe^{3+} (реакция Фентона) вызывает образование гидроксильного радикала и гидроксильных анионов ($\text{HO}\bullet$, HO^-). Основным ферментом, нейтрализующим свободный радикал супероксид является супероксиддисмутаза (SOD). Существует три фермента супероксиддисмутазы: SOD1, содержащий медь и цинк фермент цитозоля, SOD2, марганец-содержащий фермент в матриксе

митохондрий, а также, SOD3. содержащий медь и цинк внеклеточный фермент. Ферменты SOD восстанавливают супероксид до перекиси водорода H_2O_2 . Далее перекись водорода может расщепляться несколькими ферментами. Каталаза расщепляет ее до молекулярного кислорода и воды, в то время как глутатион-зависимая пероксидаза, используя в качестве кофактора антиоксидант глутатион, до воды. (Balaban et al., 2005; Landis, Tower, 2005). Имеются данные о том, что клетки со сверхэкспрессией генов данных ферментов более устойчивы к окислительному стрессу (Blass, 2001). У мышей *Mus musculus* с делецией гена *sod-2* в соединительной ткани обнаружили снижение ПЖ и преждевременное старение (Accelerated aging..., 2011). На мутантах *Drosophila melanogaster* по гену супероксиддисмутазы показано сокращение ПЖ за счет увеличения уровня свободных радикалов (Null mutation of..., 1989; RNA interference-mediated..., 2002; Шосталь, Москалев, 2013). Однако мутация в генах *sod-1* и *sod-2* у *Caenorhabditis elegans* увеличивает их максимальную ПЖ на 30 %, несмотря на увеличение доли поврежденных белков в клетке (Yang et al., 2007; Van Raamsdonk, Hekimi, 2009).

Таким образом, ферменты антиоксидантной защиты играют важную роль в защите клетки и клеточных органелл от повреждений, которые вызываются АФК. Тем самым они оказывают влияние на ПЖ особей и участвуют в процессах преждевременного старения.

Защита клеток от окислительных повреждений не ограничивается ферментативными антиоксидантными системами, а осуществляется также большим количеством репарационных систем. Действие репарационных ферментов направлено на удаление и восстановление поврежденных молекул и структур. Как правило, с возрастом активность репарационных систем снижается, что является одной из причин накопления поломок биологических структур в пожилом возрасте (Gottschling, 2006; Kerzendorfer, O'Driscoll, 2009; Best, 2009; Gredilla et al., 2010; Coppedè, Migliore, 2010).

Таким образом, свободные радикалы возникают под воздействием разнообразных факторов внешней и внутренней среды, в предотвращении выработки участвует множество ферментов антиоксидантной защиты, а также система репарации. Ферменты антиоксидантной защиты обладают высокой специфичностью к субстрату. Их главная функция – немедленная остановка

образования и распространения АФК. Истощение антиоксидантной защиты может привести к повреждению важных биомолекул, таких как липиды, белки и нуклеиновые кислоты.

1.2.1.1. Окислительное повреждение липидов

Липиды являются основным компонентом биологических мембран, которые выполняют жизненно-необходимые функции. Наличие двойной связи у ненасыщенных жирных кислот делает липиды чувствительными к окислению.

Окислительное повреждение липидов или перекисное окисление липидов (ПОЛ) происходит прямо (например, повреждения, наносимые H_2O_2 или O_2), либо опосредованно (реакционноспособными альдегидами). ПОЛ является одним из самых разрушительных процессов, которые происходят в каждом живом организме. В процессе ПОЛ из полиненасыщенных предшественников формируются конечные продукты окисления, такие как кетоны, малоновый диальдегид. Перекисное окисление липидов наступает, когда в клеточной мембране и мембране органелл достигнут пороговый уровень АФК. Окисление липидов приводит к образованию гидропероксидов и эндопероксидов, которые, в свою очередь, могут подвергаться фрагментации, образуя большое количество промежуточных продуктов, таких как алканыли, алкеныли, гидроксилалкеныли, малоновый диальдегид и гидроксиноненаль. Все эти карбонильные соединения неустойчивы и легко вступают в химические реакции с компонентами клеток (Владимиров, Арчаков, 1972). Например показано, что малоновый диальдегид приводит к образованию аддуктов в аминокислотных последовательностях и перекрестных сшивок с другими белками и продуктами их окисления и гликозилирования, а также с фосфолипидами (Bhuyan et al., 1996; Ganea, Harding, 2000; Slatter et al., 2000). Нарушается текучесть и пластичность мембраны, повреждаются мембраносвязанные белки, как результат изменяется пропускная способность мембраны к веществам, которые при нормальных условиях не проходят через нее, кроме как через специальные каналы; происходит инактивация рецепторов, ферментов и ионных каналов (Gill, Tuteja, 2010). Все это влияет на процессы метаболизма в клетках.

С возрастом наблюдается увеличения уровня ПОЛ в клетках, происходит накопление липофусцина, малондиальдегида, гидроперекисей липидов, F2-изопростанов (Slatter et al., 2000; Effects of age..., 2005; Hulbert et al., 2007). Низкий уровень полиненасыщенных жирных кислот в плазме мембраны это характерная черта всех долгоживущих теплокровных позвоночных, по сравнению с близкими короткоживущими видами (крысами и мышами), и это может быть одной из основных причин низкой скорости старения у этих животных. На этом базируется гипотеза об однородной вязкости в качестве адаптации, способствующей долголетию (Pamplona et al., 2002).

Однако есть примеры, опровергающие данную гипотезу. Например, в молодых возрастных группах уровень ПОЛ у долгоживущих грызунов голых слепышей, основанный на измерении аддуктов малондиальдегида и изопростанов, в 2 и в 10 раз выше, соответственно, по сравнению с молодыми мышами (High oxidative damage..., 2006). Это пример видоспецифических различий в работе механизмов, способствующих повышению устойчивости к высоким уровням перекисного окисления (Andziak, Buffenstein, 2006).

1.2.1.2. Окислительное повреждение белков

Белки выполняют важные биологические функции и являются наиболее распространенными макромолекулами, присутствующими в клетках.

Окисление белков АФК или другими окислителями приводит к фрагментации полипептидной цепи, окислению аминокислот и образованию межбелковых сшивок (Stadtman, 2006). В результате повреждения белков изменяется их ферментативная активность, аффинность и способность распознавать участки других взаимодействующих с ними белков. Поэтому окисление белков необратимый процесс, за исключением, окисления серосодержащих аминокислот (Ghezzi, Bonetto, 2003). При этом наиболее восприимчивыми к окислению являются именно серосодержащие части белка. Среди всех видов модификаций, карбонилирование белков происходит чаще других видов окисления (Biochemistry and pathology..., 1997).

В клетках существуют надежные механизмы, восстанавливающие окислительные повреждения белков, это ферменты семейства метионин-

сульфоксид-редуктаз (Peptide methionine sulfoxide..., 2002). Они катализируют восстановление свободного и связанного с белком метионинсульфоксида до метионина. В зависимости от природы окислителей, метионин может подвергаться двухэлектронному окислению до метионинсульфоксида или одноэлектронному окислению до метионинкатион-радикала. Такое структурное изменение может приводить к нарушению функционирования белка (Enzymatic reduction..., 1981; Oxidation of either..., 2000; Jones et al., 2008; Methionine oxidation..., 2008). Существуют два фермента, ответственных за восстановление окисленного метионина в белках: метионин-сульфоксид-редуктазы А и В. Считается, что все гены семейства *Msr* вовлечены в различные возраст-зависимые заболевания (Gabbita et al., 1999; Kim, Gladyshev, 2005; Pal et al., 2007; Brennan, Kantorow, 2009). Показано, что сверхэкспрессия генов *msrA* и *msrB* у *Drosophila melanogaster* увеличивает ПЖ мух, повышает устойчивость к окислительному стрессу, задерживает возрастное снижение двигательной активности и плодовитости (High-quality life..., 2002; Methionine sulfoxide reductase..., 2012).

Основываясь на свободно-радикальной теории старения можно предположить, что долгоживущие животные будут иметь меньше окислительных повреждений вследствие сниженной продукции АФК или более эффективной утилизацией поврежденных белков. Например, многие исследования показывают, что с возрастом в различных тканях и органах увеличивается доля карбонилированных белков (Reversal of age-related..., 1991; Dubey et al., 1995; Jana et al., 2002; Detection of protein..., 2006). В работах Раджиндара Сохала и коллег, выполненных на домовый мухе, показано, что карбонилирование белков существенно увеличивается с возрастом, после облучения или гипероксии, а также степень карбонилирования белков имеет обратную корреляцию с видовой ПЖ (Sohal, 1993). В исследованиях на млекопитающих и птицах показано, что максимальная ПЖ обратно пропорциональна восприимчивости к острому окислительному стрессу, который отражается в увеличении доли карбонилированных белков (Agarwal, Sohal, 1996).

Несмотря на рассмотренные выше примеры обратной зависимости уровня повреждений белков и ПЖ, существуют виды-исключения, для которых эти параметры не взаимосвязаны. Например, голый землекоп, а также некоторые

долгоживущие виды летучих мышей имеют высокий уровень окислительного повреждения белков (Andziak et al., 2006; Buffenstein, 2008) и при этом большую ПЖ. Таким образом, причинно-следственная связь между окислительным повреждением белков и максимальной ПЖ остается неясной.

1.2.1.3. Окислительное повреждение нуклеиновых кислот

Среди всех молекул, претерпевающих изменения в результате окислительного стресса, повреждения ДНК – наиболее опасные вследствие угрозы нарушения генетической информации. Окислительное повреждение ДНК включает в себя ДНК-аддукты, одно- и двуцепочечные разрывы сахаро-фосфатного остова, а также перекрестные сшивки нитей ДНК между собой и с другими молекулами (Oxidative DNA damage..., 2003).

Оксидативное повреждение ДНК происходит за счет атаки ДНК АФК ($\text{HO}\cdot$, $\text{O}_2\cdot^-$ и $\cdot\text{NO}$). Наиболее реакционно способным является гидроксил-радикал, он способен вызывать повреждения всех компонентов в молекуле ДНК: это пурины, пиримидины и сахаро-фосфатный остов. Это приводит к снижению синтеза белка, разрушению клеточных мембран, и как следствие, к росту и развитию патологий (Britt, 1999; Oxidative DNA damage..., 2003).

Уровень окислительного повреждение ДНК и активность эксцизионной репарации оценивают по наличию продуктов 8-оксо-7.8-дигидрогуанина, 8-оксо-7.8-дигидро-2-деоксигуанозина (8-оксоГ) и 5-гидроксиметилурацила (Bjelland, 2003; Cadet et al., 2008). Долгоживущие млекопитающие и птицы имеют намного ниже уровень 8-оксоГ в митохондриальной ДНК мозга и сердца, чем короткоживущие (Herrero, Barja, 1999; Cadet et al., 2008). Вероятно, это связано с тем, что долгоживущие виды имеют большую ёмкость репарации ДНК, в сравнении с короткоживущими (Hart et al., 1979; Cortopassi, Wang, 1996). Короткоживущие виды за свой небольшой период жизни успевали достичь полового созревания и оставить потомство, по этой причине у них не было необходимости развивать мощные системы репарации ДНК. У животных с относительно большей ПЖ период полового созревания и вынашивание потомства отсрочены. Чтобы обеспечить выживаемость вида, им приходилось

совершенствовать механизмы репарации ДНК для борьбы с повреждающим действием эндо- или экзогенными свободными радикалами.

Таким образом, сила окислительного стресса зависит от количества оксидантов, внутриклеточных антиоксидантов и активности процессов репарации. Все формы АФК при повышении их стационарного уровня проявляют высокую цитотоксичность в отношении любых типов клеток. Можно выделить четыре наиболее вероятных мишени окислительной цитотоксической атаки АФК: повреждение мембраносвязанных белков, индукция процессов ПОЛ в биологических мембранах, инактивация цитозольных ферментов и повреждение митохондриальной и ядерной ДНК. Действие АФК на любой из перечисленных видов макромолекул может стать критическим для жизнедеятельности клетки. Окислительный стресс влияет на скорость старения и раннее проявление возраст-зависимых заболеваний. Чем выше уровень окислительного стресса, тем выше скорость возраст-зависимого накопления повреждений и старения. В ответ на окислительный стресс запускаются пути сигналинга и трансдукции сигнала. Основной целью данных реакций является обнаружение и элиминация АФК и поврежденного ею субстрата. Свободнорадикальный оксидативный стресс является основным механизмом действия малых доз ионизирующих излучений (Feinendegen et al., 1999). Поскольку действие свободных радикалов может быть двояким (повреждение макромолекул и активация сигнальных путей стрессоустойчивости), эффекты малых доз излучений на ПЖ могут варьировать от некоторого снижения до увеличения (радиационный гормезис по ПЖ).

1.2.2. Ионизирующее излучение

К радиации относят довольно широкий электромагнитный спектр, включающий излучения с различным уровнем энергии. В этом спектре выделяют два вида излучений: неионизирующее и ионизирующее. Существуют четыре основных вида ИИ: альфа-частицы, которые включают в себя два протона и два нейтрона; бета-частицы, которые являются высокоскоростными электронами; электромагнитные γ -лучи и рентгеновские лучи. Энергии ионизирующего излучения достаточно, чтобы выбивать электроны с орбит атомов, образуя ион

(процесс ионизации). В случае очень высокой энергии излучения происходит распад ядра атома. Ионизация приводит к образованию двух заряженных частиц или ионов: атома с суммарным положительным зарядом и свободного электрона с отрицательным зарядом.

ДНК, как и другие молекулы клетки, подвержена действию ионизирующих излучений. Биологическое действие излучения в основном связано с повреждениями наиболее чувствительной мишени – молекулы ДНК. ИИ может напрямую взаимодействовать с клеточными структурами, что приводит к биологическим изменениям (Valentin, 2005; Lehnert, 2007). Прямое действие излучения является основным эффектом для частиц с высокой линейной передачей энергии (α -частицы или нейтроны). При прямом повреждении ДНК, как правило, происходит двуцепочечный разрыв, ведущий к хромосомным aberrациям. Однако большая часть энергии, переданная клетке, поглощается первоначально водой, что приводит к быстрому образованию гидроксильных радикалов, которые могут взаимодействовать с ДНК и вызывать одноцепочечные разрывы сахаро-фосфатного остова, либо приводить к описанным в предыдущем разделе окислительным повреждениям оснований ДНК. Это явление называется косвенным действием излучения. Вклад свободнорадикальных процессов в эффекты малых доз ИИ выше, чем вклад прямого действия излучения.

ИИ приводит к таким повреждениям ДНК как отщепление аминокислотной группы от азотистого основания (дезаминирование), размыкание пуринового или пиримидинового кольца, разрывы гликозидных связей с отщеплением азотистых оснований и образованием AP-сайтов, разрыв фосфодиэфирной связи (одно- и двуцепочечные разрывы). Кроме того, ИИ индуцируют возникновение перекрестных сшивок ДНК-ДНК, а также между ДНК и другими внутриклеточными молекулами (белки, липиды, углеводы) (Chodosh, 2001). Все эти повреждения запускают в клетке различные механизмы ответа, которые рассмотрены в следующем разделе.

1.2.2.1. Ответ клетки на повреждения, вызываемые ионизирующим излучением

В ответ на воздействие ионизирующих излучений в клетках активируются различные сигнальные пути (Szumiel, 1998; Signal transduction..., 2000). Среди ключевых ферментов, запускающих данные реакции, можно выделить киназы ATM и ATR, ДНК-зависимую протеинкиназу, протеинкиназу C, MAPK, Chk1/Chk2 (Suzuki et al, 2001; Stress and radiation..., 2003).

Активные протеинкиназы в свою очередь активируют ядерный фактор κB (NF-κB) и транскрипционный фактор p53 (Schreck et al., 1992; Vogelstein et al., 2000). При малых дозах ИИ происходит активация экспрессии самого NF-κB в клетках лимфобластомы 244B человека (Mohan, Meltz, 1994). Транскрипционная активность p53 играет важную роль в радиационном адаптивном ответе, стимулируя экспрессию генов регуляции клеточного цикла (*p21*), репарации ДНК (*GADD45a*), клеточного старения (*p16*) и апоптоза (*BH3*, *PUMA*, *NOXA*).

В ответ на воздействие ИИ происходит остановка клеточного цикла в контрольных точках G1/S, S/G2, G2/M, M. Мишенью транскрипционного фактора p53, который участвует в G1 задержке клеточного цикла, является ингибитор циклин-зависимых киназ p21 (Herbig, Sedivy, 2006). Для перехода из G1- в S-фазу клеточного цикла необходима активация циклин-зависимых киназ Cdk4 и Cdk6 и их связывание с циклином D (CycD). Этот комплекс фосфорилирует белок ретинобластомы (Rb), приводя к активации транскрипционного фактора E2F и вступлению в S-фазу (Molecular mechanisms of..., 2004; Herbig, Sedivy, 2006). Киназа p21 связывается с комплексом Cdk4/CycD и инактивирует его. Таким образом, предотвращается E2F-зависимая активация транскрипции генов S фазы. Этот механизм служит для поддержания клетки в состоянии остановки в G1/S контрольной точке.

Остановка клеточного цикла в G2/M точке осуществляется посредством ATM-зависимого ATM-Chk2-Cdc25 (реагирует на повреждение быстро, однако не активируется при облучении в дозах ниже 40 сГр) и ATM-независимого ATR-Chk1-Cdc25 механизмов (предотвращает переход клеток к митозу только когда повреждения получены за несколько часов до начала конденсации хромосом) (Two Molecularly..., 2002). В обоих случаях киназы ATM и ATR с помощью белков

MDC1, BRCA1 и/или 53BP1 фосфорилируют киназы Chk1 и/или Chk2., которые фосфорилируют фосфатазы Cdc25A, Cdc25C и CDC25B, и повышают уровень белка Wee1, который контролирует активность комплекса Cdc2/CyclinB (Conservation of the..., 1997; Zhao et al., 2002; BRCA1 regulates..., 2002; Chk1 regulates..., 2003; Chk1 mediates S..., 2003; Sancar, 2004; Hip2 ubiquitin..., 2013). Инактивация фосфатаз Cdc25 приводит к накоплению Y15-фосфорилированных Cdc2 и остановке клеточного цикла в G2/M точке (Sancar, 2004). Таким образом, комплекс Cdc2/CyclinB, белки Wee1 и Cdc25 имеют решающее значение для выхода из G2/M контрольной точки. Переход на стадию митоза запускается при помощи киназ p38 (Involvement of..., 2000).

Остановка клеточного цикла необходима для инициации механизмов репарации ДНК.

Белки GADD45 α и β являются мишенями транскрипционных факторов p53 и FOXO, соответственно (Carrier et al., 1999; Furukawa-Hibi et al., 2002). В ответ на повреждение ДНК они быстро экспрессируются и контролируют активность белков эксцизионной репарации оснований и нуклеотидов – PCNA, XPC и XPG, а также они обеспечивают доступность поврежденных участков ДНК для ферментов репарации (Ma et al., 2009). Более подробно процессы репарации повреждений ДНК будут рассмотрены далее.

Если механизмам репарации не удалось восстановить повреждение ДНК, то клетка переходит в состояние стресс-индуцированного клеточного старения или идет по пути программируемой клеточной гибели – апоптоза (The pathological..., 2006; Probin et al., 2006).

Запуск радиационно-индуцированного апоптоза происходит в различных клеточных компартментах: в митохондриях (за счет работы каспаз) и на плазматической мембране (за счет рецепторов плазматической мембраны) (Verheij, Bartelink, 2000; Zhang et al., 2003). Клеточные реакции на радиационно-индуцированные повреждения ДНК регулируются с помощью p53-зависимых механизмов. Впервые это показали на клетках тимуса. У тимоцитов без фактора p53 отсутствует радиационно-индуцированный апоптоз, в то время как тимоциты дикого типа радиочувствительны и умирают в результате апоптоза после облучения низкой дозой 1 Гр (Thymocyte apoptosis..., 2003; P53 is required..., 1993).

В ответ на ИИ в клетке запускается стресс-активируемая протеинкиназа (Stress-Activated Protein Kinase) или сигнальный путь с-Jun-N-концевой киназы (SAPK/JNK). Данный комплекс активируют белки MEKK1, которые получают сигнал о повреждении от рецепторов церамида или CD95 (Ip, Davis, 1998; Requirement for ceramide..., 1996). В свою очередь, комплекс SAPK/JNK активирует эффекторные каспазы, транскрипционный фактор p53, белки Bcl-2, Bax, c-Jun и Rb (Bossy-Wetzel et al., 1997; Bcl-2 undergoes..., 1997; JNK targets p53..., 1998; Functional interaction..., 1999). Активация проапоптотического комплекса SAPK/JNK снижает проводимость получаемых мембраной сигналов, в том числе от рецепторов церамида, Daхх и CD95 (Ceramide activates the..., 1995; Requirement for ceramide..., 1996; Daхх, a novel..., 1997). Далее различные стимулы от проапоптотических белков BAX, АФК и прокаспазы-8 приводят к высвобождению ряда проапоптотических факторов из митохондрий (цитохрома С, Аraf-1, casp-9). Эти факторы влияют на активность цистеинзависимых аспаргат-специфичных протеаз семейства каспаз, которые перемещаются в ядро, где осуществляют основную работу в процессе саморазборки клетки (Zhang et al., 2003).

Таким образом, поступивший сигнал о повреждении ДНК может распознаваться и передаваться в клетке множеством различных путей, которые, в конечном счете, влияют на стрессоустойчивость и ПЖ организмов.

1.2.2.2. Эффекты малых доз ионизирующего излучения

Исследование механизмов формирования радиобиологических эффектов в диапазоне малых доз имеет два аспекта: физический и биологический (Современные аспекты..., 2001). С физической точки зрения, малые дозы соответствуют наименьшему воздействию на биологическую структуру, когда происходит только одно событие пролета ионизирующей частицы через заданный биологический объем (Спитковский, 1992). Принципиальная роль в биологических эффектах ИИ принадлежит повреждению генетических структур клетки (гены, хромосомы) (Москалев, Шапошников, 2009). В настоящее время наибольшее внимание уделяют биологическим эффектам, которые вызывают малые дозы ионизирующей радиации. К ним относят дозы с низкой величиной линейной

потери энергии и с накопленной дозой не более 100 мЗв (United Nations Scientific..., 2012).

Энергия ионизирующих излучений всегда превышает энергию межмолекулярных и внутримолекулярных связей, поэтому в природе не существует объектов, не подверженных действию ионизирующих излучений. При этом летальные дозы для разных видов колеблются в очень широких пределах. Каждому биологическому виду свойственна собственная радиочувствительность и радиоустойчивость. Радиочувствительность зависит от сложности организации живого организма. Наименее радиочувствительными являются бактерии, для которых показатель ЛД₅₀ составляет 1000 – 3000 Гр. Например, бактерии *Deinococcus radiodurans* выдерживают дозы более 10⁴ Гр (Studies on a radio-resistant..., 1956). Наиболее радиочувствительными являются человек (2.5-3 Гр), овцы (1.5-2 Гр), собаки (2.5-3 Гр) и обезьяны (2.5- 4 Гр) (Ярмоненко, 1988). Однако степень радиочувствительности варьирует в пределах одного вида, и таким образом складывается ее индивидуальная компонента. Кроме того, в пределах одного организма существуют клетки и ткани, отличающиеся между собой радиочувствительностью. Наиболее радиочувствительными в организме являются ткани, имеющие резерв активно размножающихся малодифференцированных клеток – это кроветворная ткань (1.5 Гр для радиоустойчивой фракции, 10 сГр для лимфоцитов), гонады (в дозах свыше 0.15 Гр происходит клеточное опустошение семенников, в дозах более 3.5 Гр возникает постоянная стерильность) и эпителий тонкого кишечника (1.8 - 2.9 Гр). К наименее радиочувствительным относят высокоспециализированные малообновляющиеся ткани, например, мышечная, костная, нервная. Сердце считается радиорезистентным органом, однако при локальном облучении в дозах 5 – 10 Гр можно обнаружить изменения миокарда, при дозе 20 Гр отмечается поражение эндокарда. Клетки ЦНС гибнут при дозах свыше 100 Гр. Кости и сухожилия в период роста обладают большей радиочувствительностью, во взрослом состоянии радиорезистентны (Puck, Marcus, 1956; Action of..., 1957; Prospective comparison..., 1993; <http://www.medical911.ru/>; <http://nuclphys.sinp.msu.ru/>).

Реакция клетки и организма на действие ИИ в малой дозе обусловлена стохастическими эффектами (возникновением мутаций, генетической

нестабильностью и т.д.) и эффектами, обусловленными активным ответом живой системы на воздействие. Последние зависят от способности транскрипционного аппарата клетки быстро реагировать на воздействие и изменять паттерны генной экспрессии (Non-targeted effects..., 2013). В результате воздействия ИИ в малой дозе часть генов увеличивает экспрессию, тогда как активность других генов снижается. При этом изменение транскрипционной активности может являться специфическим для определённого диапазона доз (Gene expression profiles..., 2007). Поскольку ИИ является, прежде всего, генотоксическим воздействием, одними из первых изменяют экспрессию гены ответа на повреждение ДНК. При действии ИИ начиная с 1 сГр наблюдают повышение количества транскриптов ATR, ATM, p53, FOXO и NF-κB (Low dose..., 2011). Под воздействием γ -излучения в дозе от 1 до 10 сГр усиливается экспрессия генов различных МАРК и гена транскрипционного фактора ATF1 в лимфоцитах человека (Wyrobek et al., 2011). Воздействие ИИ в дозах от 2 до 60 сГр на клетки млекопитающих индуцирует экспрессию генов контроля клеточного цикла и апоптоза (Gene expression profiles..., 2007; Wyrobek et al., 2011; Transcription profile..., 2012). ИИ в малой дозе вызывает значительные изменения профилей экспрессии генов, вовлеченных в метаболизм белков и аминокислот, нуклеиновых кислот, липидов и жирных кислот, гормонов и других веществ (Wyrobek et al., 2011). Облучение лимфоцитов человека в диапазоне доз от 1 до 10 сГр изменяет активность генов ответа на стресс эндоплазматической сети, продукты которых участвуют в формировании вторичной и третичной структуры белков (Wyrobek et al., 2011). Изменяют свою экспрессию структурные гены, что связано с радиационно-индуцированными преобразованиями тканей и клеток организма. Например, в клетках лёгких мышей в ответ на ИИ в дозе 1 сГр активируются гены, регулирующие синтез и метаболизм коллагена (Tian et al., 2013). Малые дозы ИИ влияют на гены, связанные с развитием организма, клеточной дифференциацией и пролиферацией, иммунным ответом (Transcriptional response..., 2012). Например, облучение мышей в дозе 5 сГр повысило экспрессию генов общего иммунного ответа и селекции Т-клеток в тимусе (Transcriptional response..., 2012).

Биологическое действие ИИ в области малых доз имеет две характерные особенности – немишеный характер и нелинейность эффектов. Немишеный

характер проявляется в возникновении радиационно-индуцированных эффектов в клетках (эффект свидетеля) и тканях (абскопальный эффект), напрямую не подвергавшихся облучению, и генетической нестабильности, которая способна сохраняться на протяжении нескольких клеточных делений или передаваться потомкам облучённых родителей и обуславливать отдалённые последствия генотоксического стресса. По сравнению с линейной зависимостью «доза-эффект» эффект воздействия ИИ в диапазоне малых доз может отклоняться как в сторону увеличения негативных последствий (гиперрадиочувствительность), так и в сторону их уменьшения до величин, находящихся ниже контрольного уровня (радиационный гормезис). Кроме того, после облучения в малой дозе у клеток и организмов может повышаться устойчивость к острому действию стрессоров радиационной и нерадиационной природы (радиоадаптивный ответ). Рассмотрим подробнее данные биологические эффекты.

Радиационно-индуцированный эффект свидетеля заключается в поражении клеток, находящихся вне зоны действия радиации, но контактирующих при этом с облучаемыми клетками (Mothersill, Seymour., 2006). Наличие ответа необлученных клеток на радиацию не зависит от их типа и не имеет доза-зависимой реакции (Pinto et al., 2006; Induction of a..., 2000). Эффект свидетеля индуцируют низкие дозы ИИ и дальнейшее дозы не приводят к увеличению эффекта. Ответ необлученных клеток включает в себя: обмен сестринскими хроматидами, образование микроядер, апоптоз, мутации генов, хромосомную нестабильность и перерождение клеток (Wright, 2010). Эффект свидетеля, вероятно, тесно связан с абскопальным эффектом, который наблюдается у больных раком, проходящих радиационную терапию. Абскопальный эффект ИИ определяется как радиационный ответ в ткани, которая пространственно обособлена от облучённой области. Воздействие, направленное на опухоль в определённом месте подавляет опухоли, расположенные в других местах тела (Vanguards of..., 2007).

Радиационно-индуцированная генетическая нестабильность характеризуется повышенной частотой цитогенетических аномалий и мутаций, повышенной или пониженной экспрессией некоторых генов и гибелью клеток в потомстве облученных клеток спустя многие поколения после первоначального облучения (Genomic Instability..., 1996). Отмеченные эффекты включают

изменение уровня активируемых повреждением или связанных со стрессом белков, увеличение уровня АФК внутри клеток, появление хромосомных aberrаций и воспалительный ответ (Morgan, Breit, 1995; Lorimore, Wright, 2003; A role for..., 2014). Митохондриальная ДНК также вносит вклад в радиационно-индуцированную генетическую нестабильность (Kam, Vanati, 2013). Воздействие малых доз облучения, вызывает постоянный окислительный стресс в течение длительного времени (Functional consequences of..., 2014; A role for..., 2014). Показано, что в ответ на малые дозы облучения (0, 0.1, 0.25, 0.5 Гр) у мышей линии СВА/СаJ наблюдается изменение экспрессии около 1300 уникальных белков. Они участвуют в процессах канцерогенеза, детоксификации свободных радикалов, клеточного цикла, репарации ДНК, сборки клеточных структур, воспалительных реакций (Protein expression..., 2014). До сих пор исследования *in vivo* и *in vitro* не выявили доза-зависимые эффекты радиационно-индуцированной генетической нестабильности. Игнация Брага Танака с коллегами обнаружили, что γ -излучение самцов и самок мышей в течение 400 дней при различных низких дозах, от 1.1 до 0.05 мГр в день, приводит к сокращению ПЖ только самок, облученных дозой 1.1 мГр в день по сравнению с контролем. При этом во всех экспериментальных группах мышей не наблюдалось увеличения доли опухолей (Cause of death..., 2007).

Под гиперчувствительностью к малым дозам радиации понимают более низкие показатели выживаемости клонов клеток в культуре, чем предсказываемые для данного диапазона доз линейно-квадратичной моделью (Bonner, 2004). Гиперчувствительностью к облучению обладают развивающиеся ткани. Например, облучение плода мыши на 11 – 17 день внутриутробного развития в дозах от 10 до 50 сГр приводит к нарушению развития белого вещества мозга, отдалённым проявлением генетической нестабильности нейронов (Neuron loss during..., 2001; Delayed effects of..., 1999). Как правило, гиперчувствительность наблюдают при дозах в диапазоне 10 – 40 сГр (Шапошников, Москалев, 2009).

Под радиационным гормезисом принято понимать благоприятный эффект ионизирующего облучения в малых дозах, выражающийся в стимулирующем действии облучения на организм. Гормезис инициируют адаптивную стресс-реакцию, обеспечивающую формирование устойчивости клеток и организмов к высоким дозам радиации (Martins et al., 2011).

Эпидемиологическими исследованиями доказано существование антиканцерогенного эффекта малых доз ионизирующего облучения (Little, 2000). Для данного эффекта характерна дозо-зависимая кривая. В нашей лаборатории экспериментально доказана роль радиационно-индуцированной элиминации клеток не справляющихся с повреждениями в процессе развития организма в гормезисе по ПЖ *Drosophila melanogaster* (Moskalev, 2007). Также нам удалось повысить медианную и максимальную ПЖ после облучения в диапазоне средних доз (Москалев, Яцкив, 2004). Александр Михайлович Вайсерман и коллеги исследовали долговременные эффекты R-облучения *Drosophila melanogaster* на стадии одночасового яйца в дозах 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 2.0 и 4.0 Гр. Они показали, что предимагинальная летальность мух повышалась с увеличением дозы облучения, при этом снижение имагинальной ПЖ наблюдалось только после облучения в наибольшей дозе. У самцов, облученных в дозах 0.25, 0.75 и 1 Гр происходило увеличение средней ПЖ, в дозах 0.25 и 0.5 Гр – максимальной ПЖ, у самок облучение в дозах 0.25, 0.75 и 2 Гр наблюдали увеличение максимальной ПЖ (Молекулярные и клеточные..., 2003). Существует и другая точка зрения, согласно которой повышенный уровень выживаемости не обязательно означает благоприятное действие облучения в малых дозах. Эффект гормезиса может быть результатом нарушения регуляции клеточного цикла на стадии G1 после облучения (Molecular analyses..., 1998).

Адаптивный ответ приводит к увеличению выживаемости клеток (Wang, Cai, 2000), и изменение других параметров жизнеспособности в ответ на острое облучение в высокой дозе, если ему предшествовало облучение в малой. В основе радиационного адаптивного ответа, вероятно, лежат те же механизмы, что и при эффекте гормезиса, однако, проявляющиеся не столько в увеличении жизнеспособности, сколько в более эффективной защите клетки от последующих пагубных воздействий. В нашей лаборатории было показано, что спленоциты мышей линии СВА, развивавшихся в условиях воздействия хронического низкоинтенсивного γ -излучения, мощностью 0.04 мГр/ч (накопленная доза 6 – 10 сГр), имеют повышенную способность предотвращения и репарации повреждений ДНК при остром облучении в дозе 2 Гр (Велегжанинов и др., 2009). Помимо этого в нашей лаборатории была экспериментально доказана роль активации белков

теплового шока в адаптивном ответе по ПЖ *Drosophila melanogaster*. Линии, гомозиготные по мутации белков теплового шока и факторов теплового шока не проявляют адаптивного ответа, в отличие от линии дикого типа и от линий, гетерозиготных по мутации в этих генах (Moskalev et al., 2009).

Таким образом, воздействие ионизирующего излучения обладает широким спектром ответа со стороны биологических систем. Оно вносит вклад в старение организма, оказывает дозозависимый эффект на ПЖ животных.

1.2.3. Гипертермия

Высокие температуры приводят к нарушению структуры и функции клеток, прежде всего, к потере третичной структуры и к агрегации белков. Поэтому в ходе эволюции был выработан комплекс приспособительных мер, приводящий к экспрессии защитных белков. В ответ на увеличение температуры происходит тримеризация и активация транскрипционного фактора теплового шока HSF (Shamovsky, Nudler, 2008), который приводит к транскрипции целого комплекса белков под общим названием белки теплового шока (БТШ) (Heat Shock..., 1982). В обычных условиях они уже присутствуют в клетке, однако их количества недостаточно, чтобы справиться с последствиями теплового шока. Бактерии, дрожжи, насекомые и человек имеют близкие по структуре БТШ. Известны следующие виды БТШ: *Hsp100*, *Hsp90*, *Hsp70*, *Hsp60*, *Hsp40*, малые *Hsps* (*sHsp*) и *Hsp10* (Nover, 1984). Дополнительный синтез этих белков осуществляется в клетках, в ответ на резкое увеличение температуры или под действием других повреждающих факторов. Белки семейства HSP принадлежат к группе молекулярные шаперонов. Их функция заключается в стабилизации, сохранении и восстановлении клеточных структур, а также они выполняют некоторые дополнительные функции, в частности, участвуют в фолдинге различных полипептидов, помогают белкам с ошибочной 3D структурой восстановить свою нативную структуру, регулируют деградацию белков и помогают перемещению белков между различными компартментами клеток (Hartl, Hayer-Hartl, 2002). Также HSP участвуют в процессе подавления апоптоза (Jacobson et al., 1997) и замедляют процессы старения организма (Lithgow et al., 1995).

Наиболее часто встречающимися являются белки подсемейства HSP70 (с молекулярной массой 70 кДа). Главным стимулом к их продукции является высокий уровень неполных, поврежденных или видоизмененных белков в клетке. Возраст-зависимое изменение способности клеток экспрессировать HSP70 в ответ на стресс вносит вклад в старение организма. В течение процесса старения происходят посттрансляционные изменения белков, например гликозилирование, проявляющееся в накоплении конечных продуктов гликирования в тканях, и служат стимулом для продукции HSP. В то же время способность к внеплановому индуцированному синтезу HSP снижается с возрастом (Malyshev, 2013).

Белки семейства HSP90 играют большую роль в процессах трансдукции сигнала в клетке. В исследованиях *in vivo* и *in vitro* было показано, что активность HSP90 зависит от его связывания с кошаперонами и кофакторами, которые вместе с ним образуют большие мульти-белковые комплексы, участвующие в процессах фолдинга белков (Makhnevych, Houry, 2012). Показано, что они связываются с неактивными формами белков-рецепторов стероидных гормонов и с тирозин – специфическими протеинкиназами, а также с другими стероидными рецепторами, в том числе, ответственных за связывание альдостерона, андрогенов, эстрогена, и прогестерона (Common non-hormone..., 1984; The common 90-kd..., 1985; Redeuilh et al., 1987; Mineralocorticosteroid receptor..., 1989; Pratt et al., 2004). Это необходимо для функционирования данных генов.

Экспериментально показано, что с возрастом происходит изменение ответа клеток на тепловой шок (Kauffman, 1992). У фибробластов, гепатоцитов и нейронов старение сопровождается падением способности продуцировать некоторые виды белков теплового шока в ответ на повреждение клеток. Для Т-лимфоцитов показана корреляция между эффективностью ответа на тепловой шок и состоянием клеточных часов. Чем ближе клетка к лимиту делений, тем ниже производство белков теплового шока при ее ответе на повреждение.

Образование HSF и HSP, особенно HSP70, снижается с возрастом (Richardson, Holbrook, 1996; Tower, 2009). Поскольку HSP участвует в осуществлении клеточных механизмов защиты от термального стресса, окислительного стресса и других видов стресса, снижение его продукции с возрастом уменьшает способность организма адекватно реагировать на изменения

окружающей среды. Однако существуют данные о том, что с возрастом происходит увеличение базального уровня HSP70 в тканях мозга мышей (Lee et al, 2000), крыс (Increase in basal..., 2000) и фибробластах человека (Fonager et al., 2002), что, по-видимому, носит компенсаторный характер.

Также увеличение экспрессии белков теплового шока с возрастом наблюдается и у плодовой мушки *Drosophila*. Это повышение экспрессии HSP происходит в ответ на накопление окисленных белков. В нашей лаборатории на линиях *Drosophila melanogaster* с нарушенной функцией гена транскрипционного фактора теплового шока и генов белков теплового шока было показано, что кратковременное низкоинтенсивное воздействие ионизирующего излучения (4 и 40 сГр) и теплового шока (29 °С, 2 ч и 35 °С, 1 ч) способствует повышению адаптационной устойчивости *Drosophila melanogaster* к последующему воздействию острого оксидативного стресса (параквата) и ионизирующего излучения (30 Гр) (Турышева и др., 2008; Moskalev et al., 2009). В лаборатории Джона Тауэра, при анализе изменений экспрессии генов у *Drosophila melanogaster* с возрастом и при окислительном стрессе, было обнаружено повышение экспрессии генов белков теплового шока (*Hsp70*, *Hsp83*) (Landis et al., 2012). Мишель Майелло и соавторы исследовали возраст-зависимое посттрансляционное изменение белка HSP70 в почках самцов крыс разного возраста (2-3 мес., 6-11 мес., 22-27 мес.). Измеряли стационарный уровень HSP70, мРНК, рРНК, и конечного продукта гликирования пентозидина. Их результаты показали, что количество мРНК гена *HSP70* значительно выше и у молодых, и у старых крыс, в сравнении со взрослыми крысами. Уровень пентозидина прогрессивно увеличивается с возрастом. Они показали, что у молодых и старых крыс существуют различные механизмы, отвечающие за основной синтез HSP70 – постоянно накапливающийся пентозидин приводит к усилению синтеза HSP70 у старых животных (Basal synthesis of..., 1998).

Таким образом, белки семейства HSP участвуют в защите клеток от перегрева, окислительного стресса и других видов стресса, с возрастом происходит снижение продукции данных белков, что снижает устойчивость организма к действию стрессоров и может приводить к преждевременному старению.

1.2.4. Ограничение диеты

Наличие питательных веществ играет важную роль среди всех факторов, которые влияют на старение. Достаточное количество энергии и необходимые питательные вещества являются обязательным условием для нормального роста и развития. В свою очередь, неограниченный доступ к высококалорийной пище не является благоприятным для долгожительства. В некоторых работах указывается на то, что линии крыс и мышей, содержащиеся в лабораторных условиях, живут значительно дольше, если количество потребляемой ими пищи ниже *ad libitum*. Это явление носит название «ограничение калорийности» или «ограничение диеты». Имеются убедительные данные о том, что вмешательство в пищевой рацион приводит к увеличению медианной, средней и максимальной ПЖ лабораторных животных (нематоды, дрозофила, грызуны) (Bodkin et al., 2003; Messaoudi et al., 2006; Caloric restriction and..., 2006; Holloszy, Fontana, 2007). Что касается приматов и человека, вопрос остается открытым.

Рассмотрим основные молекулярно-генетические механизмы влияния ограниченной диеты на ПЖ.

По одной из версий, увеличение ПЖ происходит за счет отсрочивания, снижения степени интенсивности рака и других, связанных с возрастом заболеваний. На лабораторных линиях мышей показано, что супрессия сигналинга гормона роста (GH) за счет мутаций генов *GH*, *IGF1* или связанных с ними генов может приводить к увеличению ПЖ. Ограничение калорийности питания улучшает чувствительность клеток к инсулину. Например, ограничение калорийности питания у мышей с нокаутом гена *Prop1^{df}* (гипофизарная карликовость) приводит к увеличению средней и максимальной ПЖ (35-70 %) (Bartke et al., 2008). Показано, что глюкоза укорачивает ПЖ *C. elegans* путем подавления активности комплекса DAF-16/FOXO и экспрессии гена аквапорина (DamID in..., 2010). Индукция SIRT1 способствует выживаемости клеток в ответ на ограничение диеты. Она деацетилирует белок репарации ДНК Ku70, который блокирует вход проапоптотического фактора Вах в митохондрии. Таким образом, происходит ингибирование апоптотической гибели клетки (Bordone, Guarente, 2005). У дрозофил с низкокалорийной диетой и долголетием ассоциированы сигнальные

механизмы, опосредуемыми белками Sir2 и p53 (Comparative transcriptional..., 2011), а также 4E-VP (VP extends..., 2009). Снижение активности Sir2 подавляет увеличение ПЖ при недостатке калорий. Экспрессия p53 у дрозофилы не увеличивает ПЖ мух, подвергшихся ограничению калорийности. Возможно, p53 является компонентом механизма влияния ограничения калорийности на долгожительство. У червей *C. elegans* с ограниченной диетой и долголетием в ассоциированы сигнальные механизмы, опосредуемые белками E3 убиквитин-лигазой (Carrano et al., 2009), а также компонентами TOR-сигналинга (Walker et al., 2005; Honjoh et al., 2009). У дрожжей существует SIR2-независимый путь ответа на низкокалорийное питание. Это TOR и SCH9 (гомолог киназ Akt и S6K млекопитающих) механизмы (Tor1/Sch9-regulated..., 2009). Ограничение калорий для *tor1D* и *sch9D* клеток далее не увеличивает ПЖ, что говорит об участии данных видов сигналинга в ответе на уменьшение количества пищи (Regulation of yeast..., 2005).

В вопросе обеспечения долголетия за счет ограничения диеты большое значение отводится какие именно компоненты питания мы ограничиваем (прежде всего белки и конкретные аминокислоты, после сахара). Ограничение поступления калорий без снижения поступления белков приводит к долгожительству. Снижение содержания одной только аминокислоты метионина увеличивает ПЖ мышей и крыс (Methionine-deficient..., 2005; Sun et al., 2009). Питание одинаковой по калорийности пищей, в которой мало либо жиров, либо минеральных компонентов не приводит к увеличению ПЖ. Мухи, питающиеся средой с одинаковой калорийностью, но разным компонентным составом, заметно различаются по ПЖ. При снижении количества пищи у дрозофилы, ПЖ сначала увеличивается, а затем снижается (голодание). К долгожительству у них приводит снижение в диете доли дрожжей или сахара (Helfand, Rogina, 2003; Min, Tatar, 2006).

Эксперименты на приматах показывают, что ограничение калорийности питания на 30 % отсрочивает возраст-зависимые заболевания, при этом смертность в экспериментальной группе обезьян не отличается от смертности в контрольной группе (Hansen, 1999; Maxmen, 2012).

Таким образом, снижение калорийности питания может отсрочивать старение и либо увеличивать ПЖ, либо не влиять на нее. К молекулярным

механизмам влияния низкокалорийной диеты на скорость старения следует отнести подавление инсулинового (снижение поступления углеводов) и TOR сигналинга (аминокислотное голодание), активация сиртуинов и FOXO, уменьшение интенсивности метаболизма (продукции свободных радикалов).

Итак, на все живые организмы воздействует целый комплекс абиотических и биотических факторов среды, обладающих как положительным (эффект гормезиса), так и отрицательным эффектами (генотоксическое воздействие). Многочисленные факторы действуют в комплексе и приводят к развитию заболеваний, преждевременному старению и ранней смертности. Среди основных повреждающих эффектов факторов окружающей среды выделяют повреждение генетических структур клеток, их дальнейшее накопление способствует ускоренному старению и сокращению ПЖ. Именно поэтому в ходе эволюции сформировались надежные механизмы репарации повреждений ДНК.

1.3. Репарация ДНК и её роль в обеспечении стрессоустойчивости

Репарация (лат. *reparatio* восстановление) – особая функция клетки, заключающаяся в способности исправлять химические повреждения в молекулах ДНК (БЭС, 1995). Репарация ДНК играет важную роль в обеспечении стабильности генома. Стареющие клетки накапливают большое количество повреждений ДНК, так как клетка не справляется с репарацией этих повреждений. В свою очередь это может способствовать накоплению мутаций (Age-dependent defitency..., 2003; Nagy, Soutoglou, 2009). Большинство мутаций не убивают клетки, но при их чрезмерном накоплении может произойти нарушение регуляции транскрипции, снижение резистентности клетки к внешним факторам (Increased cell-to-cell..., 2006) или бласттрансформация. Исследования мутаций в локусе *HPRT* в лимфоцитах показали накопление мутаций с возрастом, как у человека, так и у мышей (Dempsey, 1993; Impact of age..., 1995). В экспериментах с трансгенными мышами было показано, что с возрастом происходит накопление точечных мутаций (Stuart, 2000).

Спонтанные мутации приводят к дерегуляции транскрипции. Ухудшается стрессоустойчивость организма, снижается эффективность репарации

ДНК. Снижение эффективности и точности репарации ДНК приводит к новым мутациям, это в свою очередь ведет к снижению функционального состояния клеток и к ускорению старения организма (Gorbunova et al, 2007).

Именно поэтому в ходе эволюции сформировались надежные механизмы репарации повреждений ДНК. Причем, чем выше на эволюционной лестнице находится организм, тем эффективнее работают эти механизмы. В работе Вайга показано, что с возрастом мыши накапливают мутации с большей скоростью, чем человек. Это отражает более высокую способность репарационных систем человека качественно контролировать повреждения генома (Vijg, 2000).

Наиболее простым вариантом репарации ДНК является прямая репарация, где процесс распознавания повреждения и его восстановление осуществляется одним белком (Molecular mechanisms of..., 2004). Существует два механизма прямой репарации: фотореверсия УФ-индуцированных димеров пиримидина фотолиазой и удаление O⁶-метильных групп гуанина метилгуанин-ДНК-метилтрансферазой (Бондарчук, 2003). Фотолиаза отсутствует у многих видов животных, включая человека, тогда как метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза является широко распространенным ферментом.

Еще одним типом прямой репарации является репарация однонитевых разрывов ДНК. Этот тип репарации осуществляется при помощи ДНК-полинуклеотидлигазы, которая воссоединяет разорванные концы в ДНК.

Также существуют другие, более сложные механизмы репарации ДНК. При таких типах репарации ДНК происходит вырезание поврежденных участков из цепи, а затем происходит заполнение образовавшейся брешки. К данным типам репарации относятся эксцизионная репарация оснований (ЭРО) и нуклеотидов (ЭРН).

С помощью ЭРО удаляется большинство однонитевых разрывов и повреждённых оснований. ЭРО осуществляется ДНК-гликозилазами, которые распознают окисленные или восстановленные основания, алкилированные (обычно метилированные) основания, дезаминированные основания и мисматчи. К настоящему времени описано много типов ферментов ДНК-гликозилаз, каждый из которых распознает различные повреждения оснований ДНК: метилированные, окисленные, восстановленные, дезаминированные и другие. Гликозилазы

присоединяются к такому поврежденному основанию и надрезают гликозидную связь между основанием и дезоксирибозой. В результате образуется АП-сайт (апурин/апериимидиновые сайты). Далее фосфодиэстераза расщепляет в этом участке сахаро-фосфатный остов. Такие разрывы в ДНК распознаются ферментом АП-эндонуклеазой, выщепляющей остаток нуклеотида. Поскольку напротив бреши в противоположной нити ДНК располагается неповрежденный нуклеотид, согласно принципу комплементарности при помощи ДНК-полимеразы I в данную брешь к свободному 3'ОН-концу присоединяется нужный нуклеотид. Полинуклеотидлигаза соединяет свободные 3'ОН-конец и 5'-конец, который образовался при разрыве нити ДНК АП-эндонуклеазой (Сойфер, 1997).

Обширные повреждения ДНК, появляющиеся в результате воздействия ионизирующего излучения или химических агентов, а также все виды повреждённых оснований, которые приводят к значительным конформационным изменениям, распознаются и репарируются эксцизионной нуклеазой, осуществляющей ЭРН. Система ЭРН состоит из двух путей. Глобальная репарация генома (ГРГ) – репарирует поврежденные ДНК в транскрипционно неактивных областях генома (A multistep damage..., 2001). Второй путь ЭРН ответственен за репарацию транскрибируемых ДНК, и называется репарацией, связанной с транскрипцией (РСТ) (Fousteri, Mullenders, 2008; Hanawalt, Spivak, 2008). ЭРН представляет собой цепь последовательных сложных реакций, в которых участвуют целые комплексы белков. В ГРГ повреждения ДНК распознаются с помощью комплекса ХРС-HR23В и белка ХРА. Если в сайте имеется повреждение, то ХРВ и ХРD (ERCC3 и ERCC2) геликазы в комплексе с ТФИИН раскручивают ДНК, надрез поврежденных нитей делается при помощи ХРF и ХРG. Образующуюся брешь заполняет ДНК-полимераза и сшивает ДНК-лигаза, при содействии вспомогательных белков репликации PCNA и RFC. В РСТ пути повреждение ДНК распознается с помощью РНК-PolII, эта полимераз также необходима для инициации репарации. Далее повреждение удаляется при помощи РСТ-специфических белков CSB и CSA. (Hanawalt, 2002. Molecular mechanisms of..., 2004).

Наибольшую опасность для клетки представляют двухнитевые разрывы ДНК (ДРД) (Ohnishi et al., 2009; Kass, Jasin, 2010), которые возникают в результате

воздействия внешних и внутренних факторов, например, в ответ на радиацию (Kass, Jasin, 2010). У эукариот существует четыре пути репарации двуцепочечных разрывов: гомологичная рекомбинация, ДНК-ПК-зависимое негомологичное соединение концов ДНК (НГСК), негомологичное соединение концов ДНК с использованием РНК-матриц и одонитевой отжиг.

Гомологичная рекомбинация происходит в течение S – G2 фаз клеточного цикла (O’Driscoll, Jeggo, 2006; Kass, Jasin, 2010). В качестве матрицы для репарации поврежденного участка используется сестринская хроматида (Kass, Jasin, 2010). На первом этапе рецепторы MRN комплекса связываются с разрывами ДНК и разрезают их, создавая одонитевую ДНК. Одонитевые участки распознаются белком RPA, который затем привлекает белки Rad51, Rad52, Rad54, BRCA1, BRCA2, которые обеспечивают слияние поврежденной молекулы ДНК с гомологичной неповрежденной. После этого полимераза ϵ при участии белков PCNA, RFC, LigIII, MMS4 и MUS81 достраивает поврежденный участок ДНК по матрице. Затем происходит разъединение слившихся нитей с помощью резолвазы. По завершению процесса фосфатаза PP2A дефосфорилирует гистон H2AX (Molecular mechanisms of..., 2004).

Альтернативным путём репарации ДРД, начинающимся также как и гомологичная рекомбинация, является одонитевой отжиг. При такой репарации комплекс Mre11/Rad50/NBCS1 при содействии Rad52 и RPA расплетает нити ДНК вплоть до участков, обладающих некоторой гомологичностью друг к другу. Затем с помощью белков ERCC1 и XPF эти участки ДНК гибридизуются и негомологичные выступы удаляются. Таким образом, два дуплекса воссоединяются. При таком варианте репарации происходит потеря части информации. Однако значительной потери не происходит, если ДРД произошёл в участке с повторами последовательности ДНК (Molecular mechanisms of..., 2004; Kinner et al., 2008).

Другой путь репарации ДРД – это ДНК-ПК-зависимое негомологичное соединение концов ДНК. Данный путь репарации возможен в любую фазу клеточного цикла. Репарация заключается в воссоединении концов ДНК, которые имеют негомологичные последовательности (Kass, Jasin, 2010). Этот тип репарации вызывает генетические перестройки. Восстановление исходной структуры ДНК

возможно только в случае, если воссоединение происходит между концами одной и той же нити ДНК. Распознавание свободных концов ДНК осуществляется белками Ku70 и Ku80, которые затем присоединяют к себе каталитическую субъединицу ДНК-ПК, образуя гетеротример ДНК-ПК (Molecular mechanisms of..., 2004). Активированный ДНК-ПК способен фосфорилировать соседние гистоны H₂AX. Далее ДНК-ПК сменяет комплекс белков, состоящий из XRCC4, Лигазы IV и XLF, которые осуществляют лигирование концов ДНК (Zhang, Powell, 2005; Kinner et al., 2008; Nagy, Soutoglou, 2009).

Существуют сведения, что в клетках высших эукариот, лишённых факторов ДНК-ПК-зависимого негомологичного воссоединения концов, происходит альтернативное негомологичное воссоединение концов с использованием РНК-матриц, обусловленное функцией белков PARP-1, Лигазы III и XRCC1, обычно функционирующих при репарации однонитевых разрывов. Роль сенсора повреждений при таком механизме играет PARP-1, который присоединяется к свободным концам ДНК (PUMA is directly..., 2009).

В клетках часто возникают различные виды повреждения ДНК, но есть механизмы репарации ДНК, которые необходимы для устранения этих повреждений. Определённый вид повреждения ДНК репарируются специфическими системами, а в некоторых случаях – совместным или последовательным действием нескольких систем репарации.

Особо опасны повреждения ДНК в промоторных областях, поскольку это приводит к неправильному синтезу белков. Такие изменения проявляются уже в ранней зрелости, приводя к снижению с возрастом ряда функций клетки (Gene regulation..., 2004). Показано, что стабильно экспрессируемые или увеличивающие свою экспрессию в процессе старения гены демонстрируют меньшее количество повреждений ДНК, чем гены с возрастзависимым снижением активности (Tu et al., 1996).

С возрастом в клетках различных тканей наблюдается снижение активности ферментов эксцизионной репарации оснований – ДНК-гликозилаз (например, 8-оксогуанин ДНК-гликозилазы-1), АП-эндонуклеазы-1, полимеразы β и γ (Atamna et al., 2000; Hamilton et al., 2001; Intano et al., 2003; Cabelof et al., 2006). Происходит увеличение количества различных типов повреждения ДНК, наиболее

распространенные из которых 8-оксоГ и АП-сайты (Atamna et al., 2000; Hamilton et al., 2001). В лейкоцитах старых людей частота 8-оксоГ и образование АП-сайтов выше, чем у молодых людей (Atamna et al., 2000). На угнетение активности ЭРО также влияет наличие в ДНК атипичных пар Гуанин – Урацил (В норме урацил в ДНК отсутствует) и Гуанин - Тимин (Pfeifer, 2006). Предполагается, что данное изменение образуется за счет деаминирования 5-метилцитозина (Pfeifer, 2006).

Также значительные изменения с возрастом происходят в эксцизионной репарации нуклеотидов. С возрастом происходит снижение уровня белков ERCC3, PCNA, RPA, XPA и p53 (Goukassian et al., 2000). С возрастом снижается скорость удаления димеров циклобутанового пиримидина (ДЦП) (Guo et al., 1998; Boyle et al., 2005). Существуют несколько наследственных синдромов, связанных с нарушением синтеза белков ЭРН: пигментная ксеродерма (ПК, аномалии пигментации покровов тела и высокая частота рака кожи), синдром Кохейна (СК, аномалии развития нервной системы) и трихотриодистрофия (ТТД, преждевременное старение). Все три заболевания связаны с мутациями ЭРН геликаз XPB и XPD, являющихся частью репарационного и транскрипционного комплекса TFIIH. У мышей с мутацией XPD^{ТТД} трихотриодистрофия является частичным синдромом ускоренного старения. Их ПЖ составляет всего 1.5 года. Люди, страдающие ТТД, живут менее пяти лет. Однако при этом синдроме частота онкогенеза не повышается. Напротив, мыши с двойной мутацией XPD^{ПК/СК} предрасположены к опухолям и ускоренному старению одновременно. Такие мыши гибнут в возрасте трех-шести недель (Restoring DNA repair..., 2005).

С возрастом происходит снижение эффективности репарации двухнитевых разрывов ДНК. Снижается способность клеток восстанавливать повреждения ДНК по типу негомологичного воссоединения концов (Vujayanti, Rao, 2006). Возможной причиной этого является снижение активности белков Ku70 и Ku80, Mre11, ДНК-зависимой протеинкиназы и PARP-1 (Down-regulation of..., 1997; Tissue-specific changes..., 2003; Decreased expression..., 2006; Seluvanov et al., 2007). Стареющие клетки не используют путь репарации ДРД по типу гомологичной рекомбинации (Orr et al., 2006), возможно это связано с тем, что экспрессия белка Rad51 снижается по мере старения организма (Gorbunova et al., 2007). Нарушение экспрессии генов, участвующих в репарации ДРД, приводит к

синдромам преждевременного старения: синдрому Вернера (аутосомно-рецессивная мутация в гене *Wrn*) и синдрому Блума (аутосомно-рецессивная мутация в гене *Blm*) (Carter et al., 2005; Kujoth et al., 2005). Ген синдрома Вернера у человека кодирует геликазу семейства RecQ (Sekelsky et al., 2000). В отличие от геликазы синдрома Блума, белок синдрома Вернера обладает 3'-5'-экзонуклеазной активностью (Du et al., 2004). Данный вид активности необходим для расчистки участка ДНК вокруг неспаренного основания и для его ресинтеза. Геликаза RecQ и 3'-5' ДНК геликаза принимают участие в поддержании длины теломер. И таким образом, могут влиять на процессы старения (Bitterman et al., 2003; Evidence that the..., 2006). Благодаря длинным теломерам и относительно высокой теломеразной активности, нокаут гена *Wrn* у мышей не приводит к ускоренному старению. Однако мутации *Wrn* и *Blm* усиливают патологические проявления ускоренного старения у мышей, которые потеряли ген теломеразной РНК матрицы *Terc* (Du et al., 2004). Установлено, что основная функция белка WRN в клетке – реиницирование заблокированных репликационных вилок (Scaffidi et al., 2005).

Возраст-зависимое снижение репарации ДНК также связано с дерегуляцией эпигенетических механизмов. Так, при старении происходит гиперметилирование Ц-Г участков промоторов генов, вовлеченных в репарацию ДНК, в частности, *hMLN*, *MGMT*, *ERCC1*, *RAD50*, *BRCA1*, *WRNexo* (Esteller, 2002; Aging and environmental..., 2009). Снижение эффективности репарации ДНК также происходит в результате нарушения функционирования модификаторов хроматина, например, деацетилазы гистонов SIRT1 (Fraga, Esteller, 2007) и SIRT6 (Sirtuin 6..., 2012; The sirtuin..., 2012).

Таким образом, скорость и точность репарации ДНК изменяется с возрастом. В первую очередь ее правильное функционирование зависит от наличия неповрежденных белков, которые обслуживают тот или иной вид репарации. Также большое значение имеет уровень экспрессии данных генов. В данной работе мы исследовали роль мутации и сверхэкспрессии генов репарации ДНК в обеспечении устойчивости *Drosophila melanogaster* к различным повреждающим факторам окружающей среды (ИИ, голодание, температурный и окислительный стрессы). Список исследуемых генов представлен в табл. 1.

Исследуемые в работе гены репарации ДНК

Процесс	Ген дрозофилы	Гомолог белка млекопитающих	Литературный источник
Ответ на повреждение ДНК	<i>Hus1</i>	HUS1	An essential role..., 2007
	<i>D-Gadd45</i>	GADD45	Ma et al., 2009
	<i>mnk</i>	CHK2	Takada et al., 2003; A network of..., 2009
	<i>Mus309</i>	BLM	Kusano et al., 1999; McVey et al., 2007
Экцизионная репарация нуклеотидов	<i>mei-9</i>	XPF	Boyd et al., 1976
	<i>mus210</i>	XPC	Henning et al., 1994
	<i>Mus209</i>	PCNA	Henderson et al., 1994
Экцизионная репарация оснований	<i>Mus209</i>	PCNA	Henderson et al., 1994
	<i>Rrp1</i>	APE1	Drosophila DNA..., 2006
Репарация мисматчей	<i>mei-9</i>	XPF	Bhui-Kaur et al., 1998
	<i>Mus209</i>	PCNA	Sekelsky et al., 1998
Репарация двуцепочечных разрывов			
Гомологичная рекомбинация	<i>Mus309</i>	BLM	Johnson-Schlitz, Engels, 2006
	<i>Brca2</i>	BRCA2	Klovstad et al., 2008
	<i>okr</i>	RAD54	Alexiadis et al., 2004
	<i>spn-B</i>	XRCC3	Lee, Orr-Weaver, 2003
Негомологичное воссоединение концов	<i>Ku80</i>	KU80	Ku80: product..., 1994
	<i>WRNexo</i>	WRNexo	Sekelsky et al., 2000

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Плодовая мушка *Drosophila melanogaster* является удобным модельным организмом для изучения роли конкретных генов в обеспечении стрессоустойчивости и регуляции продолжительности жизни. У *Drosophila melanogaster* короткий жизненный цикл (около 12 суток) и относительно небольшая максимальная продолжительность жизни (около 100 дней); полностью отсеквенирован геном, в котором значительная часть генов является ортологами генов человека; доступны линии с измененным генотипом, а также с наличием балансерных хромосом и маркерных признаков; разработаны технологии молекулярной генетики, позволяющие создавать собственные трансгенные линии с заданными свойствами; отработаны средовые и генетические манипуляции, влияющие на продолжительность жизни и другие параметры приспособленности (Helfand, Rogina, 2003; Москалев, Яцкив, 2004).

2.1. Линии *Drosophila melanogaster*

Для проведения экспериментов использовали линию дикого типа *Canton-S* и линии с мутациями в генах репарации ДНК, а также линии, несущие дополнительную копию исследуемых генов под контролем промотора UAS (табл. 2).

2.2. Условия содержания *Drosophila melanogaster*

Особи содержались в термостате при 25°C и 12-часовом режиме освещения в баночках объемом 100 мл с 20 мл агарно-дрожжевой питательной среды. Использовали питательную среду следующего состава (на 1 л): дрожжи сухие - 8 г, агар - 7 г, сахар - 30 г, крупа манная - 30 г, кислота пропионовая - 8 капель (Ashburner, 1989). Для получения экспериментальной выборки дрозофил, родительских особей предварительно рассаживали в баночки с питательной средой в количестве по 10 - 15 пар самцов и самок на баночку и оставляли на 48 ч для откладки яиц. После появления имаго мух наркотизировали парами эфира и разделяли по полу, далее рассаживали в баночки с питательной средой по 30 штук для экспериментов по стрессоустойчивости или по 50 штук для анализа продолжительности жизни и динамики экспрессии генов.

Характеристика использованных в работе линий *D. melanogaster*

Генотип	Наше обозначение	Характеристика	Источник
– <i>P{Act5C(-FRT) GAL4.Switch.PR}3/TM6B, Tb¹</i>	<i>GS-GAL4</i>	Драйверная (тестерная) линия, содержащая транскрипционный фактор дрожжей GAL4, который служит индуктором экспрессии исследуемых трансгенов, находящихся под промотором <i>UAS</i>	Bloomington Stock Center, США
Линии с дополнительными копиями генов под контролем промотора <i>UAS</i>			
– <i>w¹¹¹⁸, UAS-Brca2</i>	<i>Brca2</i>	Локализован на 2 хромосоме. Несет дополнительную копию гена репарации двуцепочечных разрывов ДНК <i>Brca2</i> (Functional analysis of..., 2008; Klovstad et al., 2008; A network of..., 2009) под контролем промотора <i>UAS</i>	Любезно предоставлены Dr. Schupbach, Princeton University, Princeton, США
– <i>w¹¹¹⁸, UAS-Hus1</i>	<i>Hus1</i>	Локализован на 2 хромосоме. Несет дополнительную копию белка сенсора повреждения ДНК <i>Hus1</i> (Kadir et al., 2012) под контролем промотора <i>UAS</i> , который является составной частью комплекса 9-1-1, необходимого для активации контрольной точки S-фазы клеточного цикла (An essential role..., 2007) и репарации двуцепочечных	

		разрывов ДНК по типу гомологичной рекомбинации (Peretz et al., 2009)	
– w^{1118} , <i>UAS-mnk</i>	<i>mnk</i>	Локализован на 2 хромосоме. Несет дополнительную копию ортолога гена сенсора повреждения ДНК млекопитающих <i>chk2</i> (Sekelsky et al., 2000) под контролем промотора <i>UAS</i>	
– w^{1118} , <i>UAS-spn-B</i>	<i>spn-B</i>	Локализован на 2 хромосоме. Несет дополнительную копию ортолога гена репарации двуцепочечных разрывов ДНК млекопитающих <i>XRCC3</i> (Sekelsky et al., 2000) под контролем промотора <i>UAS</i>	
– w^{1118} , <i>UAS-D-Gadd45</i>	<i>D-Gadd45</i>	Локализован на 2 хромосоме. Несет дополнительную копию гена <i>D-Gadd45</i> под контролем промотора <i>UAS</i> , ортолог данного гена у млекопитающих контролирует активность белков эксцизионной репарации нуклеотидов и оснований (Ma et al., 2009)	Любезно предоставлена Dr. Uri Abdu, Ben-Gurion University, Израиль
– w^{1118} , <i>UAS-Ku80</i>	<i>Ku80</i>	Локализован на 3 хромосоме. Несет дополнительную копию гена <i>Ku80</i> , который участвует в репарации двуцепочечных разрывов ДНК по типу негомологичного	Созданы с передачей авторских прав под заказ в Genetivision, Хьюстон, США

		воссоединения концов (Ku80: product..., 1994) под контролем промотора <i>UAS</i>	
– w^{1118} , <i>UAS-me1-9</i>	<i>me1-9</i>	Локализован на 2 хромосоме. Несет дополнительную копию ортолога гена эксцизионной репарации ДНК млекопитающих <i>XPF</i> под контролем промотора <i>UAS</i> (<i>Drosophila ERCC1...</i> , 2007)	
– w^{1118} , <i>UAS-mus210</i>	<i>mus210</i>	Локализован на 3 хромосоме. Несет дополнительную копию ортолога гена эксцизионной репарации ДНК млекопитающих <i>XPC</i> под контролем промотора <i>UAS</i> (Henning et al., 1994).	
– w^{1118} , <i>UAS-Rrp1</i>	<i>Rrp1</i>	Локализован на 2 хромосоме. Несет дополнительную копию ортолога гена эксцизионной репарации ДНК млекопитающих <i>APE1</i> (Sander, Huang, 1995; <i>Drosophila DNA...</i> , 2006) под контролем промотора <i>UAS</i>	
– w^{1118} , <i>UAS-WRNexo</i>	<i>WRNexo</i>	Локализован на 3 хромосоме. Несет дополнительную копию гомолога 3'-5' экзонуклеазного домена гена репарации двуцепочечных разрывов млекопитающих <i>WRNexo</i> (<i>DmWRNexo is...</i> , 2009) под контролем промотора	

		UAS	
Линии с мутациями в изучаемых генах			
– $w^1 mei-9^{A1}$	$mei-9/$	Локализован на X-хромосоме. Несет замену аминокислоты в гомологе гена эксцизионной репарации ДНК млекопитающих <i>XPF</i> (<i>Drosophila</i> ERCC1..., 2007)	Bloomington Stock Center, США
– $w^1 mei-9^{A2}/C(1)DX, y^1 f^1$	$mei-9/+$		
– $Mus209^{B1} b pr cn/CyO$	$Mus209/+$	Локализован на 2 хромосоме. Несет замену аминокислоты в гомологе гена репарации ДНК млекопитающих <i>PCNA</i> (Characterization of a..., 2006)	
– $Mus309^{D3} ry^{506}/ TM3, Sb^1 ry^{RK}$	$Mus309/+$	Локализован на 3 хромосоме. Несет замену аминокислоты в гомологе гена синдрома Блума млекопитающих <i>RecQ-геликазы</i> (Weinert, Rio, 2007)	
– $Dp(1;Y)B^S, B^+; ru^1 st^1 spn-B^1 e^1 ca^1/TM3, Sb^1$	$spn-B/+$	Локализован на 3 хромосоме. Несет замену аминокислоты в гомологе гена репарации двуцепочечных разрывов ДНК млекопитающих <i>XRCC3</i> (Sekelsky et al., 2000)	
– $okr^{A19-10} cn^1 bw^1/CyO$	$okr/+$	Локализован на 2 хромосоме. Несет замену нуклеотидов в гомологе гена репарации двуцепочечных разрывов ДНК <i>Rad54</i> (<i>The Drosophila melanogaster</i> ..., 1999)	
– y^*w^* ; $P\{GawB\}Gadd45^{NP0351}/CyO,$	$D-$ $Gadd45/D-$	Локализован на 2 хромосоме.	Kyoto Stock Center, Япония

<i>P{UAS-lacZ.UW14}UW14</i>	<i>Gadd45, D-Gadd45/+</i>	кодирующем участке гена <i>D-Gadd45</i> находится инсерция Р мобильного элемента	
– <i>mus210^{G1}/CyO</i>	<i>mus210/+</i>	Локализован на 2 хромосоме. Несет замену аминокислоты в гомологе гена эксцизионной репарации ДНК млекопитающих <i>XPC</i> (Henning et al., 1994)	

2.3. Активация кондиционной повсеместной сверхэкспрессии генов репарации ДНК

Для сверхактивации генов репарации ДНК использовали RU486-активируемый GeneSwitch (A conditional..., 2001; P[Switch]..., 2001). Для получения особей дрозофил с кондиционной (мифепристон-индуцибельной) повсеместной сверхактивацией изучаемых генов, самцов линии *GS-GAL4*, несущих активатор транскрипции GAL4 от дрожжей, скрещивали с виргинными самками, имеющими дополнительную копию исследуемого гена под контролем промотора *UAS*. При добавлении в корм потомкам скрещивания этих двух линий агониста прогестерона мифепристона (RU486) активируется экспрессия GAL4, в результате чего запускается транскрипция генов под контролем промотора *UAS*. В качестве контроля использовали мух с тем же генотипом, живущих на питательной среде без добавления мифепристона (рис. 1).

Для приготовления стокового раствора RU486 с концентрацией 25 мг/мл разводили мифепристон (Sigma) в 96% этаноле. К дрожжевой пасте (вода:дрожжи = 4:1) добавляли 1 мл стокового раствора RU486 на 100 мл дрожжевой пасты. Полученную смесь наносили на поверхность питательной среды (Characterization of the..., 2008). На среду для вариантов без обработки мифепристоном наносили дрожжевую пасту с добавлением этанола (1 мл 96% этанола на 100 мл пасты).

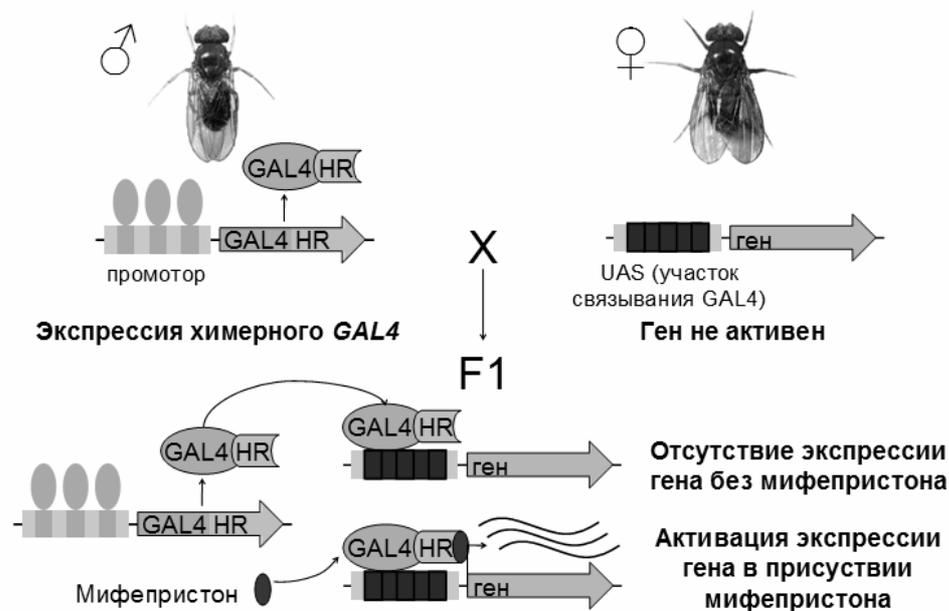


Рис. 1. Схема активации кондиционной повсеместной сверхэкспрессии генов.

2.4. Оценка стрессоустойчивости

Для оценки влияния кондиционной повсеместной сверхэкспрессии генов репарации ДНК на устойчивость особей *Drosophila melanogaster* к действию стресс-факторов различной природы (действию прооксидантов, гипертермии, голоданию) в каждый вариант эксперимента отбирали по 120 мух и рассаживали в баночки (по 30 особей) с контрольной дрожжевой пастой или пастой с добавлением мифепристона. Самцов и самок анализировали отдельно. Спустя 5 сут дрозофил помещали в условия острого стресса. Для определения устойчивости к действию прооксидантов дрозофил рассаживали в банки с фильтровальной бумагой, пропитанной раствором 20 мМ параквата (Methyl Viologen, Sigma) в 5 % сахарозе и содержали в термостате при 25 °С. Для оценки устойчивости к гипертермии мух содержали на стандартной агарно-дрожжевой питательной среде при 35 °С. Для определения устойчивости к голоданию дрозофил помещали в банки с фильтровальной бумагой, пропитанной водой, при температуре 25 °С. В условиях стресса мух содержали до конца жизни. Два раза в день подсчитывали количество умерших особей, после чего анализировали показатели выживаемости: медианная и средняя продолжительность жизни, процент умерших особей через 48 ч и 24 ч после начала воздействия. Эксперимент проведен в одной биологической повторности.

2.5. Оценка выживаемости при действии облучения

Хроническое воздействие ИИ в дозе 40 сГр осуществляли от внешнего источника ^{226}Ra (от стадии яйца до вылета имаго, в среднем 12 сут) при мощности дозы 0.14 сГр/ч. Острое воздействие в дозе 30 Гр осуществляли от внешнего источника ^{60}Co (50 мин) при мощности дозы 0.6 Гр/мин (Рокус АМ).

Для оценки влияния искусственной индукции генов репарации ДНК на радиоустойчивость исследовали выживаемость облученных в дозе 30 Гр (50 мин, источник ^{60}Co) молодых имаго (2-3 сут после вылета) с кондиционной повсеместной сверхэкспрессией генов репарации ДНК. Для этого особи каждого варианта были разделены на четыре группы: 1) без облучения, без сверхэкспрессии; 2) без облучения со сверхэкспрессией; 3) 30 Гр без сверхэкспрессии; 4) 30 Гр со сверхэкспрессией.

Для исследования радиоадаптивного ответа у дрозофил линии дикого типа *Canton-S* и линий с мутациями в генах репарации ДНК особи каждого из изучаемых генотипов были разделены на четыре группы: 1) без облучения; 2) особи, подвергшиеся на предимагинальных стадиях развития хроническому (12 сут) воздействию ИИ в дозе 40 сГр от источника с ^{226}Ra ; 3) особи, подвергшиеся острому (50 мин) воздействию ИИ в дозе 30 Гр от источника с ^{60}Co сразу после вылета имаго; 4) особи, последовательно подвергшиеся хроническому и острому облучению (40 сГр + 30 Гр).

На каждый вариант эксперимента отбирали по 200 мух. Ежедневно проводили подсчет числа умерших мух. Два раза в неделю дрозофил переносили на свежую питательную среду без наркотизации. По полученным данным строили кривые выживаемости и рассчитывали среднюю, медианную, минимальную, максимальную продолжительность жизни, возраст 90 % смертности и время удвоения интенсивности смертности (MRDT). Эксперименты были проведены в две независимые повтоности. В работе представлены объединенные данные.

2.6. Оценка возраст-зависимой динамики экспрессии изучаемых генов

Возраст-зависимое изменение экспрессии генов репарации ДНК в ответ на хроническое и острое облучение изучали у особей линии дикого типа *Canton-S*. На каждый вариант эксперимента отбирали 300 особей по 50 штук на баночку, между

измерениями мух содержали в стандартных условиях. На каждую точку эксперимента использовали по 10 мух одного пола. Хроническое воздействие ИИ в дозе 40 сГр осуществляли от внешнего источника ^{226}Ra (от стадии яйца до вылета имаго, в среднем 12 сут) при мощности дозы 0.14 сГр/ч. Анализ экспрессии проводили на 1, 14, 28, 42 и 56 сут после вылета имаго. Эксперимент проведен в одной биологической повторности.

Экспрессию генов измеряли методом количественного ПЦР в «реальном времени» с этапом обратной транскрипции (ОТ-ПЦР). РНК выделяли с помощью Aurum Total RNA mini kit (Bio-Rad) по инструкции изготовителя. Из полученного раствора РНК синтезировали кДНК по инструкции SuperScript III First Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). Реакционную смесь для проведения реакции ПЦР готовили по инструкции изготовителя Applied Biosystems (Invitrogen) с красителем SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) и праймеров (СИНТОЛ) (табл. 3). Полимеразную цепную реакцию проводили в амплификаторе CFX96 (Bio-Rad), используя следующую программу: 1) 95 °С в течение 10 мин, 2) 95 °С в течение 15 с, 3) 60 °С в течение 60 с, 4) этапы 2-3 повторяли 50 раз.

Экспрессию исследуемых генов рассчитывали относительно экспрессии гена домашнего хозяйства β -Tubulin с использованием программного обеспечения CFX Manager (Bio-Rad).

2.7. Статистический анализ результатов

Продолжительность жизни и стрессоустойчивость не подчиняются нормальному закону распределения (Гаврилов, Гаврилова, 1991). Поэтому для оценки достоверности различий по ПЖ в опыте и контроле применяли непараметрические критерии: Колмогорова-Смирнова (для сравнения распределения смертности в выборках) (Fleming et al., 1980) и Гехана-Бреслоу-Вилкоксона (для сравнения различий по медианной ПЖ) (Breslow, 1970). Достоверность различий по максимальной ПЖ оценивали с помощью метода Ванг-Аллисона (Statistical methods..., 2004).

Для оценки достоверности различий по стрессоустойчивости в опыте и контроле применяли критерий Гехана-Бреслоу-Вилкоксона (для сравнения различий по медианной ПЖ) (Breslow, 1970) и ϕ -критерий Фишера для

выборочных долей (для сравнения доли умерших особей спустя 24 или 48 ч) (Fisher, 1915).

Достоверность различий между значениями относительной экспрессии генов оценивали с помощью t-критерия Стьюдента для независимых выборок (Student, 1908). Анализ данных выполняли в статистических пакетах Statistica 8.0 (StatSoft), WinModest 1.0.2 (Pletcher, 1999) и R 3.0.1 (R Core Team).

Таблица 3

Нуклеотидная последовательность прямого и обратного праймеров

Мишень	Прямой праймер	Обратный праймер
<i>β-Tubulin</i>	5'-GCAACTCCACTGCCATCC-3'	5'-CCTGCTCCTCCTCGAACT-3'
<i>Brca2</i>	5'-TCGTCGCCGTGGAGGATCTTATTT-3'	5'-TCTGCGTATGTTGGAGACGAGCAA-3'
<i>Gadd45</i>	5'-GCAAACGCACAACCAAAC-3'	5'-GGCCATCAGGCAGAAGAG-3'
<i>Hus1</i>	5'-TGATGCAGGATCCGCTGTACATGA-3'	5'-TCCTCAGCTGTAATTCCTGCCCAA-3'
<i>Ku80</i>	5'-GAGCTTCAGAATGTCGCAACTACC-3'	5'-GGAAAGTCGTTGAAATCGAAGAGC-3'
<i>mei-9</i>	5'-TCCTCAAGGCCTACAGCGATTC-3'	5'-TCCAGATAAACGCGCTCTCTTTC-3'
<i>Mus209</i>	5'-TCTGCTCAATGAGGCAACCTTCG-3'	5'-TGTCATGGCCTGTAGCTGAATG-3'
<i>mus210</i>	5'-AGAAGACGGTGCATTTGAGATTGC-3'	5'-CCTCGCAAACAATGAAGCCATCG-3'
<i>Mus309</i>	5'-CCAGAGTCAACCTAAGAGCAGAGC-3'	5'-ACGCGTCCAGAAAGATGGGATTG-3'
<i>mnk</i>	5'-ATGTGCCATGCCGTCAAGTACCTA-3'	5'-TCCTCGTCATTGGTCTCCAGCAAA-3'
<i>okr</i>	5'-AGTCGGCCGAGAAGCATTTCAC-3'	5'-GCAGCGCTTACACTTGAGCTTG-3'
<i>Rrp1</i>	5'-AGGATGGTCTGCAGTTGATTGAC-3'	5'-GTTTGCGCACTTGGTTTCCTG-3'
<i>spn-B</i>	5'-AGATTGCTGCAGATGAGCAAAGCC-3'	5'-TTTATAACGCACGCCAGGAGAGGT-3'
<i>WRNexo</i>	5'-TGGTGGCCCTTATCAATCATCCC-3'	5'-GTGCCAGCTTTCGGAAATCGTTC-3'

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Радиоадаптивный ответ и эффект радиационного гормезиса по показателям продолжительности жизни у линии дикого типа *Canton-S* и линий с мутациями в генах репарации ДНК в ответ на γ -излучение

Исследование влияния ионизирующей радиации на ПЖ ведется уже несколько десятилетий. В исследованиях, выполненных на клеточных культурах, удалось выявить основные ферментативные пути, участвующие в данном процессе. Однако до сих пор нет единого мнения по поводу того, что является ключевым механизмом изменения ПЖ организма при действии радиации. Повреждения генетического аппарата клетки является одним из наиболее значимых эффектов биологического действия ИИ (Современные аспекты..., 2001). Среди всех типов биологических реакций, которые наблюдаются в ответе на облучение, наибольший интерес представляют эффекты, связанные с повышением устойчивости организма к действию повреждающего ИИ. Среди них выделяют адаптивный ответ (Радиационно-индуцированный..., 1999) и эффект гормезиса (Calabrese et al., 1999). Одним из основных молекулярно-клеточных механизмов ответа на ИИ, является репарация ДНК. Поэтому исследовали влияние генов репарации ДНК в ответе целостного организма на действие ИИ. Для этого использовали линию дикого типа *Canton-S* и линии с мутациями в генах ответа на повреждение ДНК (*D-Gadd45*), эксцизионной репарации ДНК (*mei-9*, *mus210*, *Mus209*), репарации двуцепочечных разрывов ДНК (*okr*, *spn-B*, *Mus309*). Эксперимент проводили по следующей схеме (рис. 2).

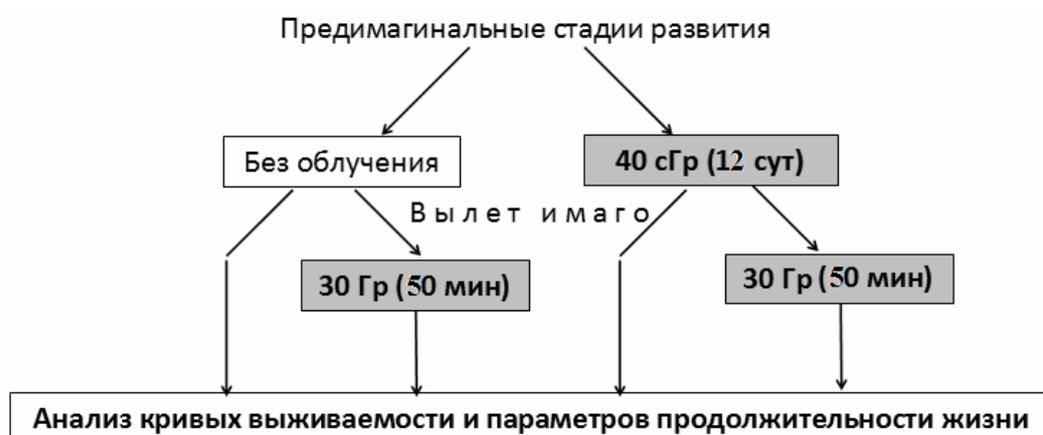


Рис. 2. Схема эксперимента по изучению радиоадаптивного ответа по показателям продолжительности жизни у линии дикого типа *Canton-S* и линий с мутациями в генах репарации ДНК.

Хроническое воздействие γ -излучения в малых дозах на предимагинальных стадиях развития индуцировало радиоадаптивный ответ на острое воздействие γ -излучения у особей дикого типа *Canton-S*. Если воздействие острого облучения в дозе 30 Гр снизило медианную ПЖ самцов и самок на 51 – 57 %, возраст 90 % смертности на 34 – 55 % ($p < 0.001$), время удвоения интенсивности смертности (MRDT) на 9 %, то предварительное хроническое воздействие γ -излучения в дозе 40 сГр привело к тому, что после острого облучения медианная ПЖ снизилась только на 6 – 21 %, возраст 90 % смертности на 3 – 12 % ($p < 0.001$), а MRDT достоверно не изменилось (рис. 3). Также обнаружено проявление радиационного гормезиса у особей дикого типа *Canton-S*. Воздействие в дозе 40 сГр на предимагинальных стадиях развития способствовало увеличению медианной ПЖ на 12 – 15 % ($p < 0.001$). Анализ других параметров ПЖ (средняя ПЖ, MRDT, возраст гибели 90 % особей) подтвердил данный результат (рис. 3, табл. 4).

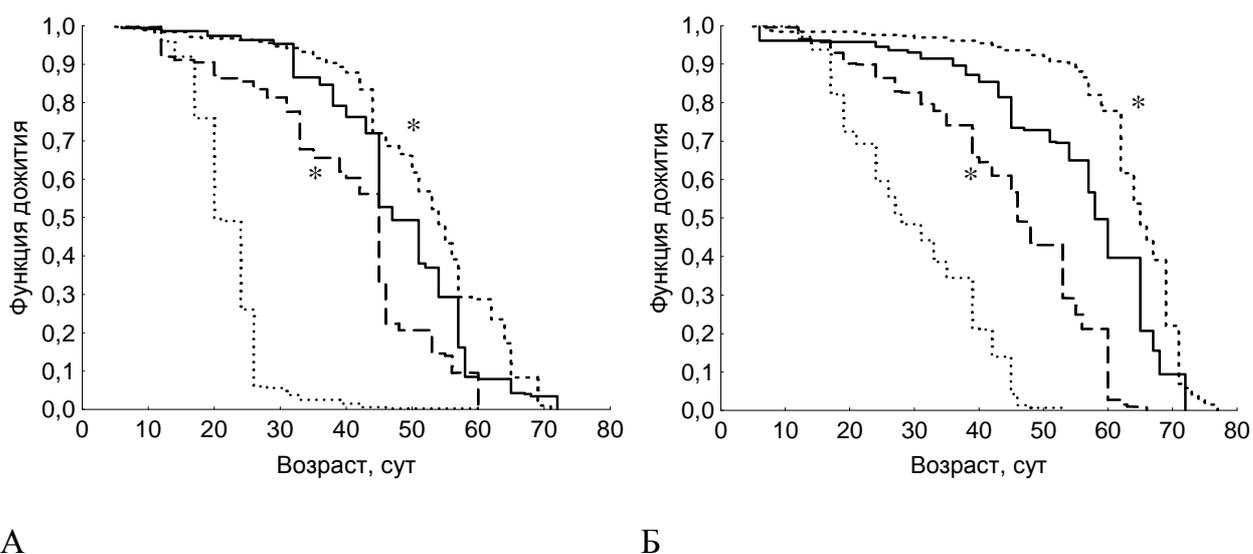


Рис. 3. Влияние различных режимов воздействия γ -излучения на продолжительности жизни самцов (А) и самок (Б) дрозофил линии дикого типа *Canton-S*.

Обозначения: Здесь и далее: — Без облучения, --- 40 сГр, 30 Гр, — — 40 сГр + 30 Гр; * - $p < 0.001$, ** - $p < 0.05$ по критерию Колмогорова-Смирнова.

Радиоадаптивный ответ и радиационный гормезис сохранялся у особей-гетерозигот с мутациями генов эксцизионной репарации ДНК *Mus209* (гомолог гена *PCNA* млекопитающих) и *mus210* (*XPC*). Различия по медианной ПЖ между

вариантами эксперимента с острым облучением в дозе 30 Гр и последовательным воздействием излучения при дозах 40 сГр и 30 Гр у этих генотипов составил 5 – 21 % ($p < 0.001$) (рис. 4). Эффект гормезиса был выражен слабо. Предварительное облучение в дозе 40 сГр на предимагинальных стадиях развития способствовало увеличению медианной ПЖ самок *Mus209* на 8 % и самцов *mus210* на 3 %, по сравнению с необлученными особями (табл. 5).

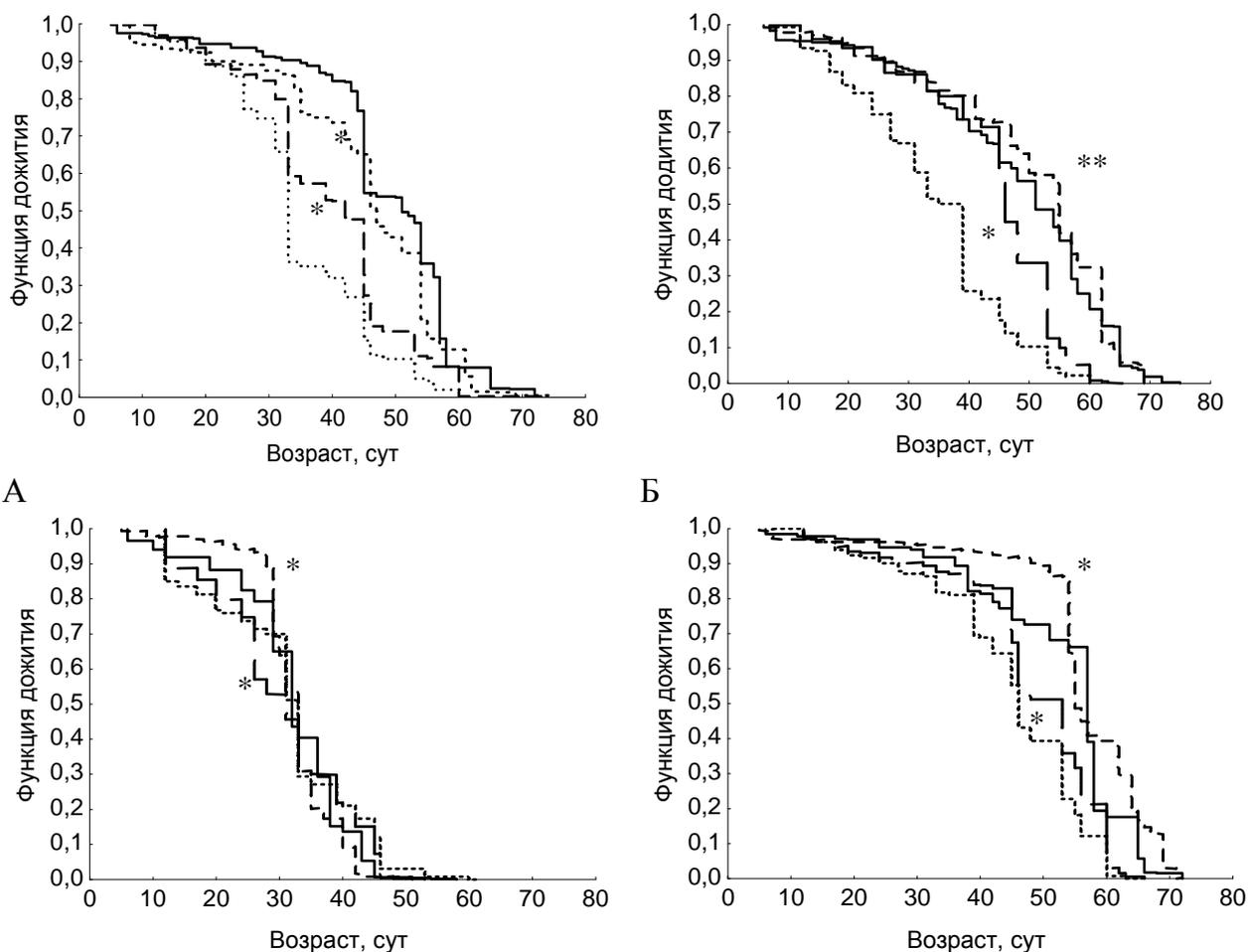


Рис. 4. Влияние различных режимов воздействия γ -излучения на продолжительности жизни дрозофил с мутациями в генах эксцизионной репарации ДНК (*Mus209*, *mus210*). А - самцы *Mus209*/+, Б - самки *Mus209*/+, В – самцы *mus210*/+, Г - самки *mus210*/+.

У самцов и самок дрозофил с мутациями гена эксцизионной репарации нуклеотидов *mei-9* (*XPF*) и гена ответа на повреждение ДНК *D-Gadd45* (*Gadd45*) радиоадаптивный ответ и эффект гормезиса отсутствовали. Напротив,

предварительное хроническое воздействие γ -излучения усиливало негативное влияние на ПЖ острого воздействия в дозе 30 Гр (рис. 5, Рис. 6). У гомо- и гемизигот с мутацией гена *mei-9*, подверженных острому облучению с предоблучением относительно особей без предварительного облучения наблюдали снижение медианной ПЖ на 18 – 34 % ($p < 0.001$), возраста 90 % смертности на 7 – 9 %. У особей-гетерозигот с мутацией по данному гену наблюдали снижение медианной ПЖ на 18 %, возраста 90 % смертности на 5 %. (рис. 5, табл. 5). У особей-гомозигот с мутациями в гене *D-Gadd45*, подверженных острому облучению с предварительным хроническим облучением, медианная ПЖ снизилась на 10 – 30 %, возраст 90 % смертности на 19 %, по сравнению с необлученными мухами. Здесь же у гетерозигот наблюдали снижение медианной ПЖ лишь на 5 – 14 %, возраста 90 % смертности на 8 – 19 % ($p < 0.001$) (рис. 6). Таким образом, у особей-гетерозигот наблюдали меньшее снижение параметров ПЖ, чем у гомо- и гемизигот.

У дрозофил-гетерозигот с мутацией в гене репарации двуцепочечных разрывов ДНК *Mus309 (Blm)* в ответ на острое облучение в дозе 30 Гр радиоадаптивного ответа не наблюдали (рис. 5). Однако у самцов данной линии проявлялся эффект гормезиса. Наблюдали увеличение медианной ПЖ на 16 %, возраста 90 % смертности – на 21 % и MRDT – на 44 % ($p < 0.001$) по сравнению с необлученными особями (рис.5, табл. 6).

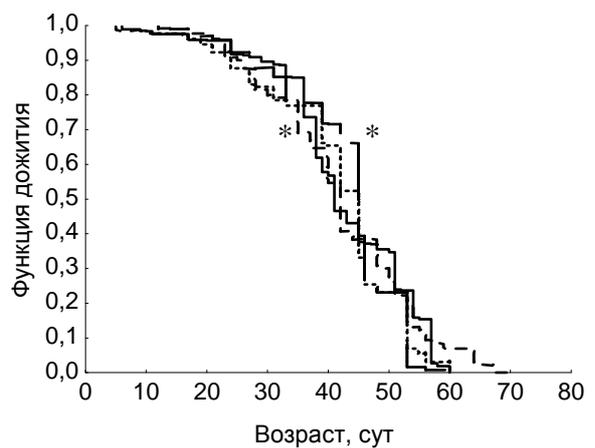
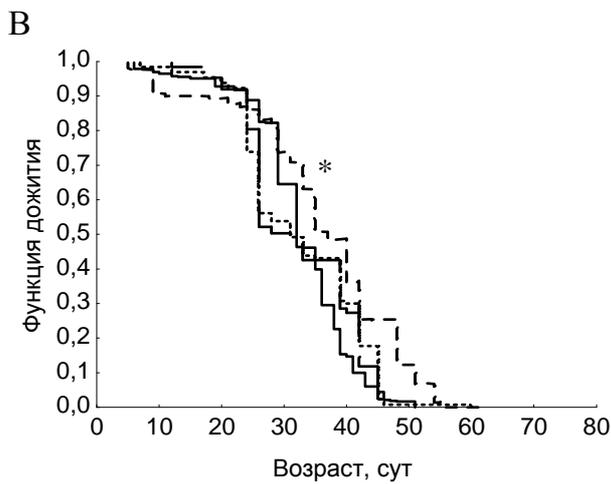
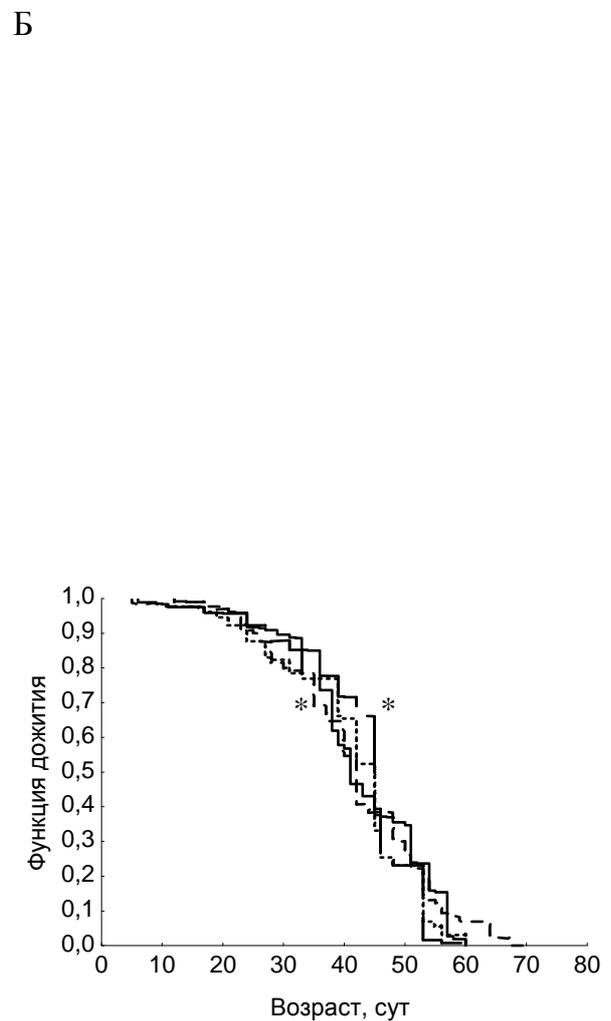
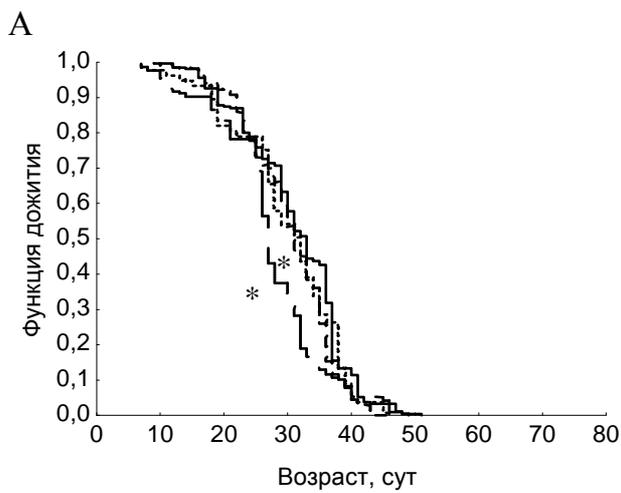
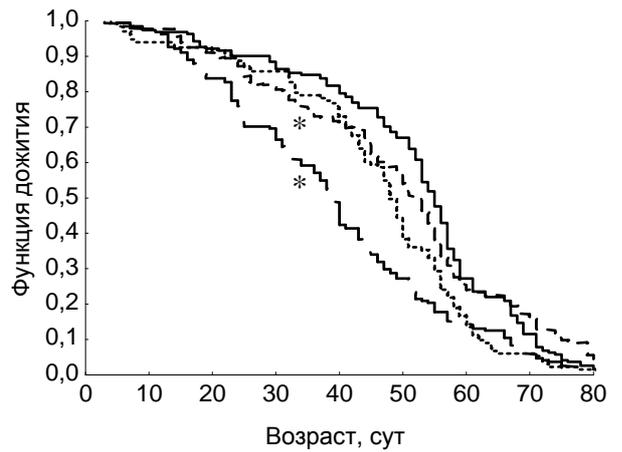
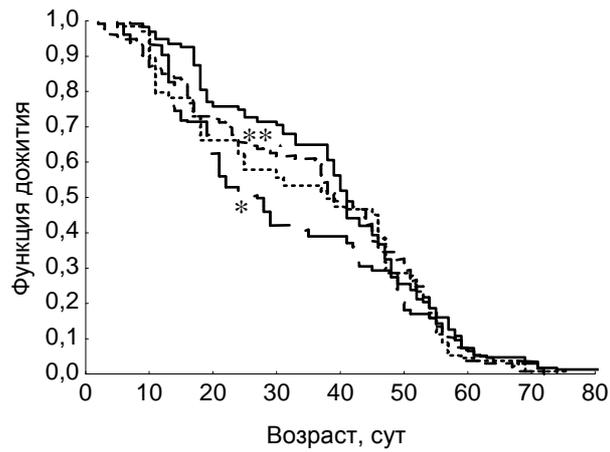
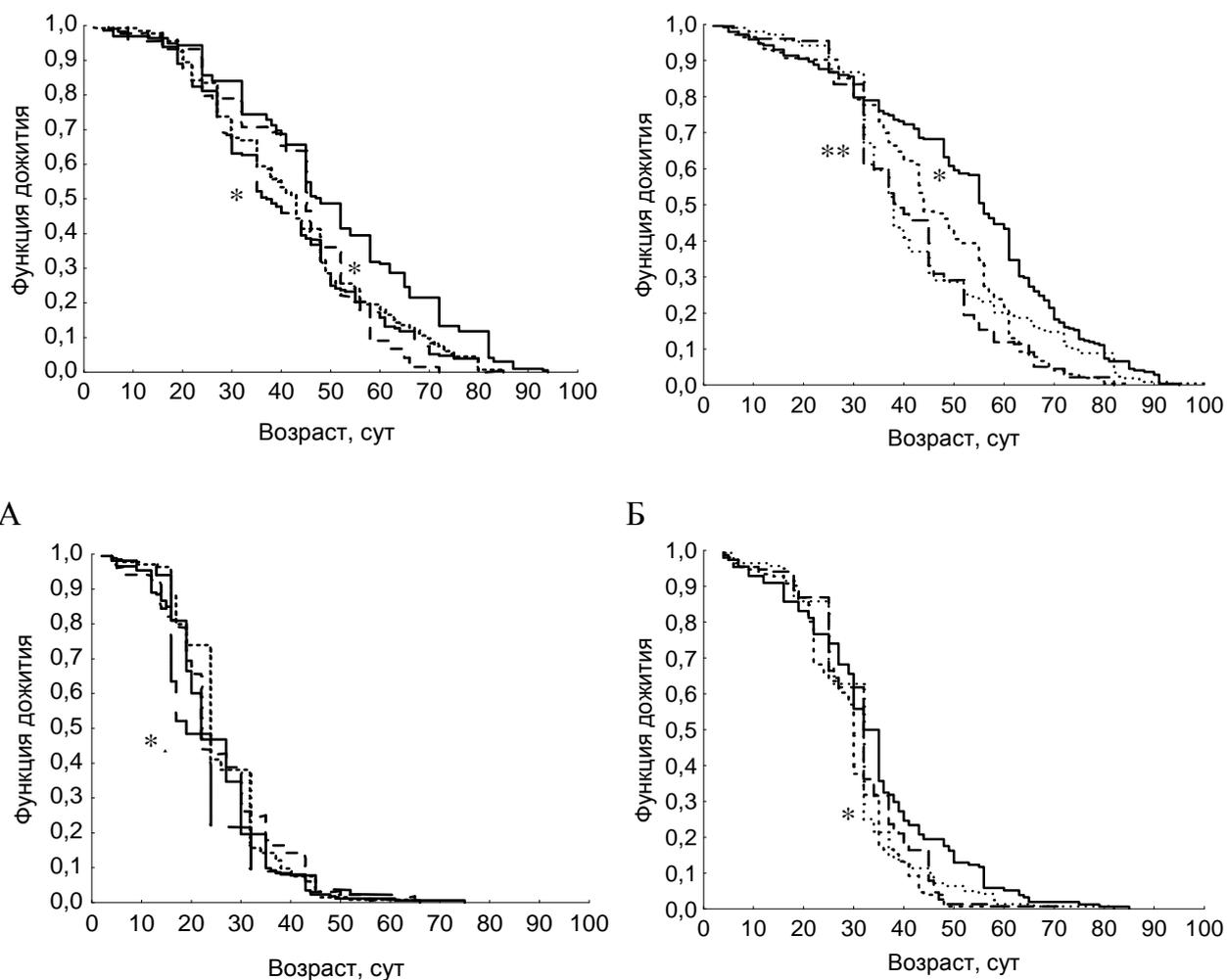
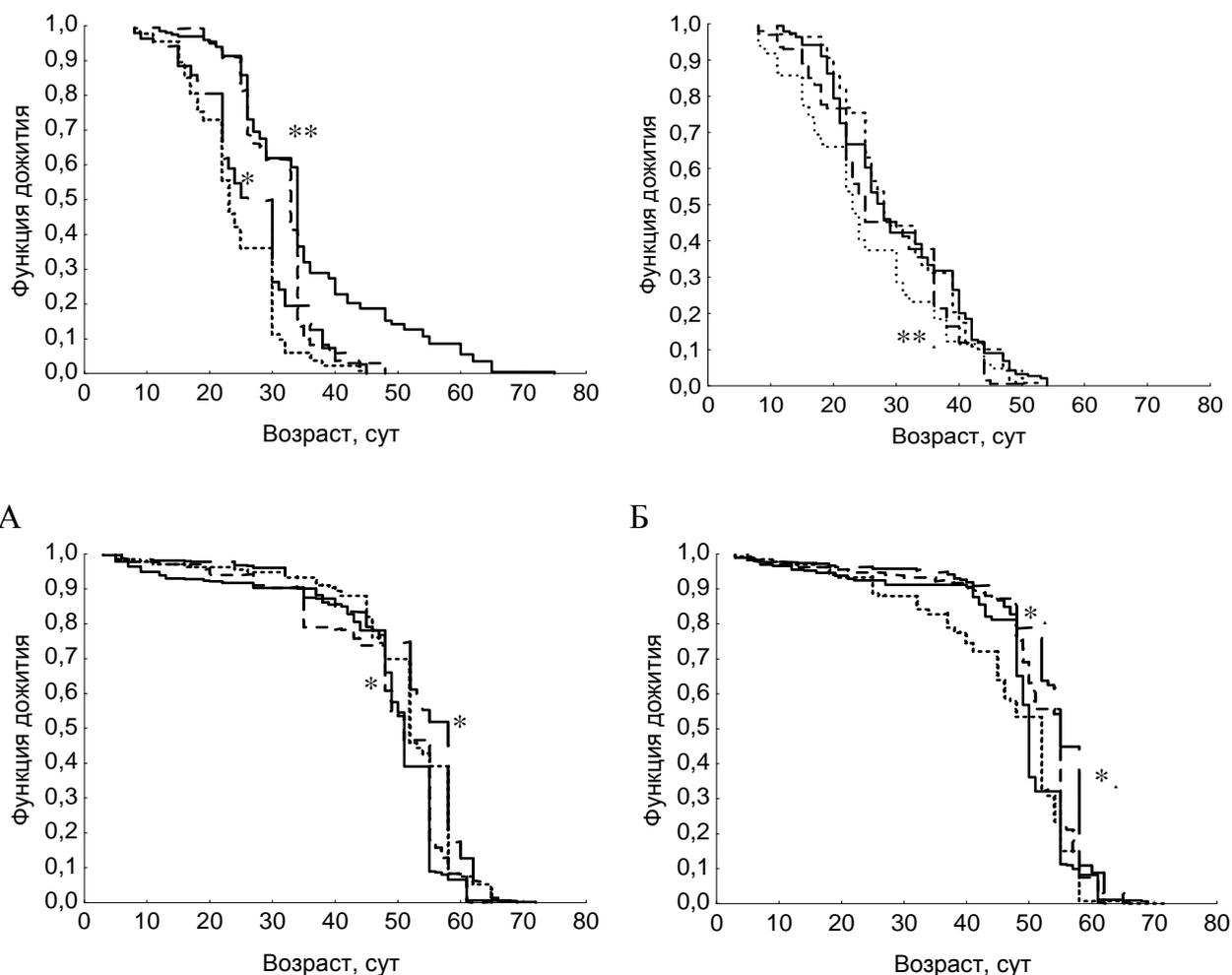


Рис. 5. Влияние различных режимов воздействия γ -излучения на продолжительности жизни дрозофил с мутациями в генах репарации ДНК (*mei-9*, *Mus309*). А - самцы *mei-9*, Б – самки *mei-9/mei-9*, В – самки *mei-9/+*, Г – самцы *Mus309/+*, Д – самки *Mus309/+*



В Г
 Рис. 6. Влияние различных режимов воздействия γ -излучения на продолжительности жизни дрозофил с мутациями в гене *D-Gadd45*. А - самцы *D-Gadd45/D-Gadd45*, Б - самки *D-Gadd45/D-Gadd45*, В - самцы *D-Gadd45/+*, Г - самки *D-Gadd45/+*

Радиоадаптивный ответ сохранялся у самцов и самок-гетерозигот с мутациями в генах репарации ДНК по типу гомологичной рекомбинации *spn-B* (*XRCC3*) и *okr* (*RAD54*), но, как и в случае с генами эксцизионной репарации ДНК, проявлялся в меньшей степени по сравнению с особями линии дикого типа *Canton-S*. Медианная ПЖ увеличилась на 10 – 14 %, возраст 90 % смертности на 5 – 13 % (рис. 7, табл. 6). Эффекта радиационного гормезиса у данных линий не обнаружено.



В Г
 Рис. 7. Влияние различных режимов воздействия γ -излучения на продолжительность жизни дрозофил с мутациями в генах двухнитевых разрывов ДНК (*spn-B*, *okr*). А – самцы *spn-B/+*, Б – самки *spn-B/+*, В – самцы *okr/+*, Г – самки *okr/+*.

Таким образом, хроническое воздействие γ -излучения в малой дозе индуцирует адаптивный ответ на острое воздействие γ -излучения у особей линии дикого типа *Canton-S*. У особей с мутациями в генах эксцизионной репарации ДНК и генов репарации двухнитевых разрывов ДНК радиоадаптивный ответ отсутствует, либо проявляется в меньшей степени, чем у особей линии дикого типа *Canton-S*. Это говорит о важной роли исследуемых генов в формировании радиоадаптивного ответа на уровне организма по такому показателю приспособленности как ПЖ.

Влияние хронического и острого γ -излучения на продолжительность жизни особей *Drosophila melanogaster* линии дикого типа *Canton-S*

Вариант эксперимента	<i>M</i>	$\bar{X} \pm \Delta m$	90%	<i>min</i>	<i>max</i>	<i>MRDT</i>	<i>N</i>
♂ <i>Canton-S</i> Без облучения	47	47.9±0.6	58	6	72	7.40	379
♂ <i>Canton-S</i> 40 сГр *	54*	52.2±0.6	65**	5	71	6.70	478
♂ <i>Canton-S</i> 30 Гр	20	22±0.3	26	7	60	6.73	399
♂ <i>Canton-S</i> 40 сГр + 30 Гр*	45*	40.2±0.7	56*	7	60	7.95	358
♀ <i>Canton-S</i> Без облучения	58	55±0.8	68	6	72	7.05	328
♀ <i>Canton-S</i> 40 сГр *	65	63±0.6	71	5	77	4.41	378
♀ <i>Canton-S</i> 30 Гр	28	29.8±0.5	45	7	53	7.52	420
♀ <i>Canton-S</i> 40 сГр + 30 Гр *	46*	44.4±0.7	60	7	66	7.78	397

Обозначения: Здесь и далее: *M* – медианная продолжительность жизни (сут); $\bar{X} \pm \Delta m$ – средняя продолжительность жизни (сут) и ошибка средней; 90 % – возраст 90 % смертности (сут); *min* – минимальная продолжительность жизни (сут); *max* – максимальная продолжительность жизни (сут); *MRDT* – время удвоения интенсивности смертности; *N* – количество мух в выборке; ♂ – самцы; ♀ – самки; * и ** – различия достоверны при $p < 0.001$ и $p < 0.05$ соответственно между вариантами «Без облучения» и «40 сГр» и между вариантами «30 Гр» и «40 сГр + 30 Гр» (первый столбец – по критерию Колмогорова-Смирнова, второй столбец – по критерию Гехана-Бреслоу-Вилкоксона; четвертый столбец –). Данные двух повторностей были объединены.

Таблица 5

Влияние хронического и острого γ -излучения на продолжительность жизни линий с мутациями в генах *D-Gadd45*, *mei-9*, *mus210*, *Mus209*

Вариант эксперимента	<i>M</i>	$\bar{X} \pm \Delta m$	90%	<i>min</i>	<i>max</i>	<i>MRDT</i>	<i>N</i>
♂ <i>D-Gadd45/D-Gadd45</i> Без облучения	48	50.2±1.5	82	6	94	15.27	195
♂ <i>D-Gadd45/D-Gadd45</i> 40 cГр *	45*	43±1.2	58*	4	72	9.21	144
♂ <i>D-Gadd45/D-Gadd45</i> 30 Гр	43	42.7±1.3	69	2	85	14.92	197
♂ <i>D-Gadd45/D-Gadd45</i> 40 cГр + 30 Гр **	37.5**	40.5±1.2	67	5	85	15.69	228
♀ <i>D-Gadd45/D-Gadd45</i> Без облучения	56	52.6±1.4	80	2	95	14.46	242
♀ <i>D-Gadd45/D-Gadd45</i> 40 cГр *	44*	45.1±1.2	63*	4	85	11.58	193
♀ <i>D-Gadd45/D-Gadd45</i> 30 Гр	38	43.8±1.3	74	4	100	18.41	203
♀ <i>D-Gadd45/D-Gadd45</i> 40 cГр + 30 Гр **	39	41.5±1.2	65*	4	82	12.92	175
♂ <i>D-Gadd45/+</i> Без облучения	22	24.9±0.8	35	4	75	12.23	173
♂ <i>D-Gadd45/+</i> 40 cГр	22	25.8±0.9	43	2	63	10.92	180
♂ <i>D-Gadd45/+</i> 30 Гр	24	26.6±0.7	39	4	65	8.97	190
♂ <i>D-Gadd45/+</i> 40 cГр + 30 Гр*	19*	23.1±0.8	32	4	66	14.97	167
♀ <i>D-Gadd45/+</i> Без облучения	33.5	33.8±1.2	56	4	85	15.15	154
♀ <i>D-Gadd45/+</i> 40 cГр *	30*	28.8±0.8	41*	4	61	7.61	151
♀ <i>D-Gadd45/+</i> 30 Гр	32	31.1±1	46	4	82	12.33	140
♀ <i>D-Gadd45/+</i> 40 cГр + 30 Гр	32	31.4±0.9	45	4	72	9.01	152
♂ <i>mei-9</i> Без облучения	43	39.0±1.1	59	7	65	1.01	219
♂ <i>mei-9</i> 40 cГр **	42**	38.9±1.1	57*	6	61	0.81	186
♂ <i>mei-9</i> 30 Гр	45	36.7±1.7	57	10	67	1.10	108
♂ <i>mei-9</i> 40 cГр + 30 Гр *	29.5*	30.2±1.6	52*	9	60	1.43	125
♀ <i>mei-9/mei-9</i> Без облучения	39	37.2±1.2	58	5	64	12.71	201
♀ <i>mei-9/mei-9</i> 40 cГр *	31.5*	35.5±1.7	60*	7	67	15.40	115
♀ <i>mei-9/mei-9</i> 30 Гр	40	37.9±1.7	60	7	67	13.20	117
♀ <i>mei-9/mei-9</i> 40 cГр + 30 Гр *	33*	33.5±1.1	56*	8	69	12.71	177
♀ <i>mei-9/+</i> Без облучения	33	31.4±0.5	41	10	51	5.04	270
♀ <i>mei-9/+</i> 40 cГр *	31*	30.4±0.3	38*	9	47	4.19	543
♀ <i>mei-9/+</i> 30 Гр	32	30.0±0.6	39	7	46	5.00	204
♀ <i>mei-9/+</i> 40 cГр + 30 Гр *	27*	27.4±0.6	39	7	49	6.28	216
♂ <i>mus210/+</i> Без облучения	32	31.7±0.4	43	6	58	12.71	468
♂ <i>mus210/+</i> 40 cГр *	33	32.3±0.3	40	5	51	15.40	352
♂ <i>mus210/+</i> 30 Гр	33	30.9±0.5	46	12	62	13.20	469
♂ <i>mus210/+</i> 40 cГр + 30 Гр *	31	30.4±0.5	45	12	53	12,71	412
♀ <i>mus210/+</i> Без облучения	57	52.4±0.6	65	6	72	6.01	453
♀ <i>mus210/+</i> 40 cГр *	55**	56.3±0.6	69	5	72	5.33	429
♀ <i>mus210/+</i> 30 Гр	46	44.7±0.5	60	7	66	6.59	537
♀ <i>mus210/+</i> 40 cГр + 30 Гр *	53*	48.1±0.5	60	12	66	5.79	511
♂ <i>Mus209/+</i> Без облучения	51	48.6±0.6	58	5	72	6.81	413
♂ <i>Mus209/+</i> 40 cГр *	47*	45.1±0.6	61	8	75	7.65	515
♂ <i>Mus209/+</i> 30 Гр	33	35±0.5	53	12	60	8.11	479
♂ <i>Mus209/+</i> 40 cГр + 30 Гр*	42*	39.5±0.6	56	7	73	8.11	363
♀ <i>Mus209/+</i> Без облучения	51	48.1±0.8	65	6	75	8.49	367
♀ <i>Mus209/+</i> 40 cГр **	55	50.1±0.8	64	7	69	7.37	370
♀ <i>Mus209/+</i> 30 Гр	39	34.3±0.6	53	7	60	8.57	453
♀ <i>Mus209/+</i> 40 cГр + 30 Гр *	46*	44.1±0.5	55	7	68	5.96	491

Влияние хронического и острого γ -излучения на продолжительность жизни линий с мутациями в генах *okr*, *spn-B*, *Mus309*

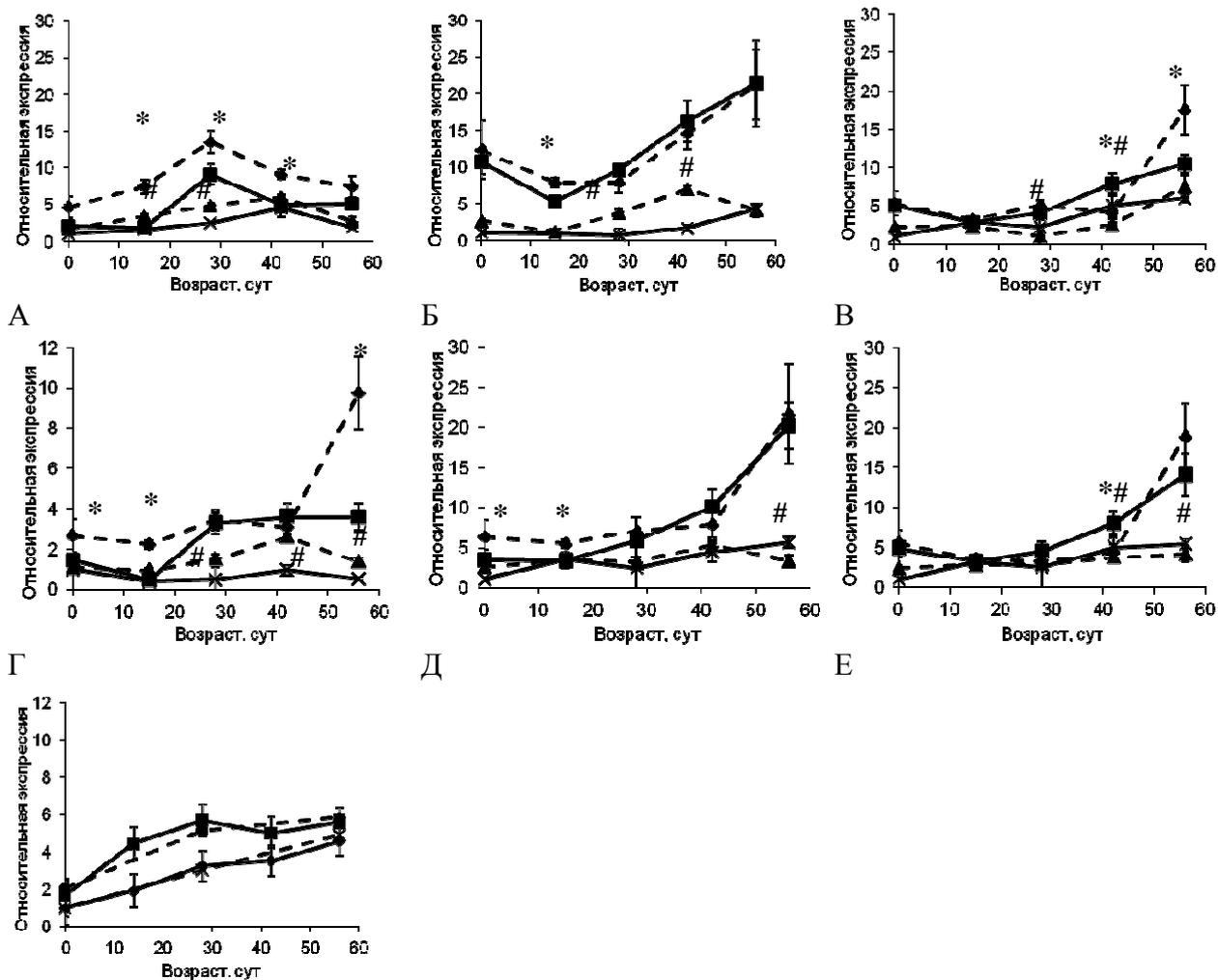
Вариант эксперимента	<i>M</i>	$\bar{X} \pm \Delta m$	90%	<i>min</i>	<i>max</i>	<i>MRDT</i>	<i>N</i>
♂ <i>okr</i> /+ Без облучения	51	47.5±0.6	55	5	69	5.32	471
♂ <i>okr</i> /+ 40 сГр *	51	47.7±0.5	58	5	65	5.39	500
♂ <i>okr</i> /+ 30 Гр	52	51±0.5	58	6	66	4.88	465
♂ <i>okr</i> /+ 40 сГр + 30 Гр*	58*	52.1±0.5	62	3	72	5.01	525
♀ <i>okr</i> /+ Без облучения	50	48±0.6	57	5	85	6.23	464
♀ <i>okr</i> /+ 40 сГр *	55*	50.4±0.5	58	5	63	4.07	501
♀ <i>okr</i> /+ 30 Гр	52	45.9±0.6	58	3	72	5.92	503
♀ <i>okr</i> /+ 40 сГр + 30 Гр *	55*	52.6±0.5	60	3	66	4.08	544
♂ <i>spn-B</i> /+ Без облучения	34	35.5±0.9	55	11	75	11.12	197
♂ <i>spn-B</i> /+ 40 сГр **	33*	31±0.6	36*	15	48	4.49	109
♂ <i>spn-B</i> /+ 30 Гр	23	24.1±0.6	32	8	45	5.55	150
♂ <i>spn-B</i> /+ 40 сГр + 30 Гр *	28**	26.7±0.6	38**	8	45	6.30	190
♀ <i>spn-B</i> /+ Без облучения	28	30.3±0.8	44	11	54	8.15	189
♀ <i>spn-B</i> /+ 40 сГр **	28	30.6±0.8	45	11	53	7.03	138
♀ <i>spn-B</i> /+ 30 Гр	23	25.2±0.9	44	8	51	10.22	147
♀ <i>spn-B</i> /+ 40 сГр + 30 Гр	25**	27.9±0.7	44	8	50	7.37	201
♂ <i>Mus309</i> /+ Без облучения	32	32.7±0.4	42	6	51	5.10	429
♂ <i>Mus309</i> /+ 40 сГр *	37*	36±0.6	51**	5	62	7.34	416
♂ <i>Mus309</i> /+ 30 Гр	31	32.7±0.5	45	7	60	6.53	373
♂ <i>Mus309</i> /+ 40 сГр + 30 Гр	31	32.3±0.5	45	12	46	5.69	322
♀ <i>Mus309</i> /+ Без облучения	41	42.6±0.5	57	6	60	6.52	481
♀ <i>Mus309</i> /+ 40 сГр *	42	41.9±0.7	56	5	71	8.47	342
♀ <i>Mus309</i> /+ 30 Гр	45	41.5±0.5	53	12	60	6.25	412
♀ <i>Mus309</i> /+ 40 сГр + 30 Гр *	46*	44.1±0.5	55	7	68	5.96	491

3.2. Возраст-зависимое изменение уровня экспрессии генов репарации ДНК у линии дикого типа *Canton-S* после хронического воздействия γ -излучения

Изменения экспрессии генов оказывают большой эффект на процессы адаптации организма к повреждающим факторам среды. Репарация ДНК является важнейшим механизмом адаптации клетки к неблагоприятным изменениям окружающей среды. С этой целью оценивали возраст-зависимое изменение экспрессии генов эксцизионной репарации ДНК (*mei-9* (гомолог гена *XPF* млекопитающих), *mus210* (*XPC*), *Mus209* (*PCNA*)), генов репарации двуцепочечных разрывов ДНК (*spn-B* (*XRCC3*), *okr* (*RAD54*), *Mus309* (*BLM*)) и генов, которые участвуют в распознавании повреждений ДНК (*D-Gadd45*), у облученных в дозе 40 сГр на предимагинальных стадиях развития и необлученных особей линии дикого типа *Canton-S* на 1, 14, 28, 42 и 56 сут после вылета имаго.

После хронического воздействия ИИ в дозе 40 сГр у особей линии дикого типа *Canton-S* наблюдали повышение экспрессии генов репарации ДНК *mei-9*,

mus210, *Mus209*, *Mus309*, *spn-B* и *okr* в 1.6 – 2.6 раза по сравнению с необлученными животными ($p < 0.05$ по t-критерию Стьюдента). Повышенные уровни экспрессии генов *mei-9*, *Mus209* и *Mus309* сохранялись до 56 сут жизни (рис. 8). Активность гена *D-Gadd45* на протяжении всей жизни не различалась между контрольными и облученными животными.



Ж
Рис. 8. Возраст-зависимое изменение экспрессии генов репарации ДНК у особей линии дикого типа *Canton-S* после хронического воздействия на предимагинальных стадиях развития γ -излучения в дозе 40 сГр. А- *mei-9* (*XPF*), Б - *Mus209* (*PCNA*), В - *mus210* (*XPC*), Г - *Mus309* (*BLM*), Д - *spn-B* (*XRCC3*), Е - *okr* (*RAD54*), Ж - *D-Gadd45*.

Обозначения: самцы – —▲— без облучения, - -x - - 40 сГр; самки – —■— без облучения, - -♦ - - 40 сГр. Различия достоверны при $p < 0.05$ по t-критерию Стьюдента для самок (*) и самцов (#).

Таким образом, хроническое воздействие ионизирующего излучения в малой дозе на предимагинальных стадиях развития приводит к увеличению экспрессии большинства изученных генов ответа на повреждение ДНК, эксцизионной репарации ДНК, которая сохраняется на протяжении всей жизни мухи.

3.3. Оценка выживаемости при остром облучении у линий со сверхэкспрессией генов репарации ДНК

В следующей серии экспериментов для изучения роли генов репарации ДНК в ответе на ИИ исследовали влияние искусственной индукции дополнительных копий генов репарации ДНК в геноме дрозофил на устойчивость последних к острому облучению дозе 30 Гр. С этой целью изучали изменения показателей продолжительности жизни у особей со сверхэкспрессией генов, которые участвуют в распознавании повреждений ДНК (*D-Gadd45*, *Hus1*, *mnk*), генов эксцизионной репарации нуклеотидов (*mei-9*, *mus210*) и оснований (*Rrp1*), генов репарации двуцепочечных разрывов ДНК по типу гомологичной рекомбинации (*Brca2*, *spn-B*) и негомологичного воссоединения концов (*Ku80*, *WRNexo*) в ответ на острое воздействие γ -излучения в дозе 30 Гр. Использовали следующую схему (рис. 9).

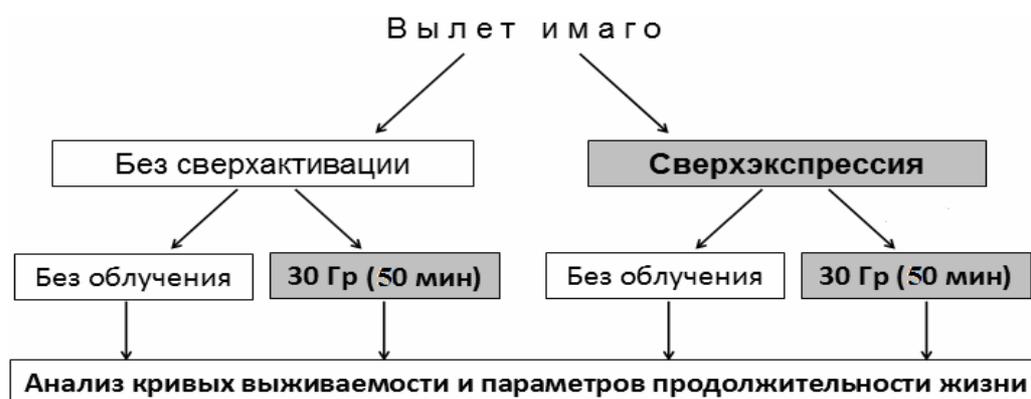


Рис. 9. Схема эксперимента по изучению выживаемости при остром облучении у линий со сверхэкспрессией генов репарации ДНК.

Воздействие острого облучения в дозе 30 Гр на особей без сверхэкспрессии гена *D-Gadd45* увеличило возраст 90 % смертности у самок на 9 % и снизило его на 13 % у самцов, относительно мух без облучения. Медианная ПЖ увеличилась на 25 % у самок и снизилась на 7 % у самцов. Наблюдали снижение MRDT на 6 % у

самок и на 5 % у самцов. Предварительная сверхэкспрессия привела к тому, что после острого облучения возраст 90 % смертности снизился на 31 % у самок и на 25 % у самцов, относительно облученных мух со сверхэкспрессией. Медианная ПЖ уменьшилась на 10 % у самок и на 24 % у самцов, MRDT уменьшилось на 35 – 40 % у самок и на 20 % у самцов. При сравнении облученного контроля и облученных мух со сверхэкспрессией гена *D-Gadd45* получили, что возраст 90 % смертности уменьшился на 67 % у самок и на 73 % у самцов ($p < 0.05$). Медианная ПЖ уменьшилась на 72 % у самок и на 75 % у самцов ($p < 0.05$), MRDT увеличилось на 8 % у самок и на 512 % у самцов (табл. 7). Анализ кривых выживаемости подтвердил полученные данные. Кривые выживаемости облученных мух со сверхэкспрессией гена *D-Gadd45* проходят ниже кривой облученных мух без сверхэкспрессии ($p < 0.05$) (рис. 10).

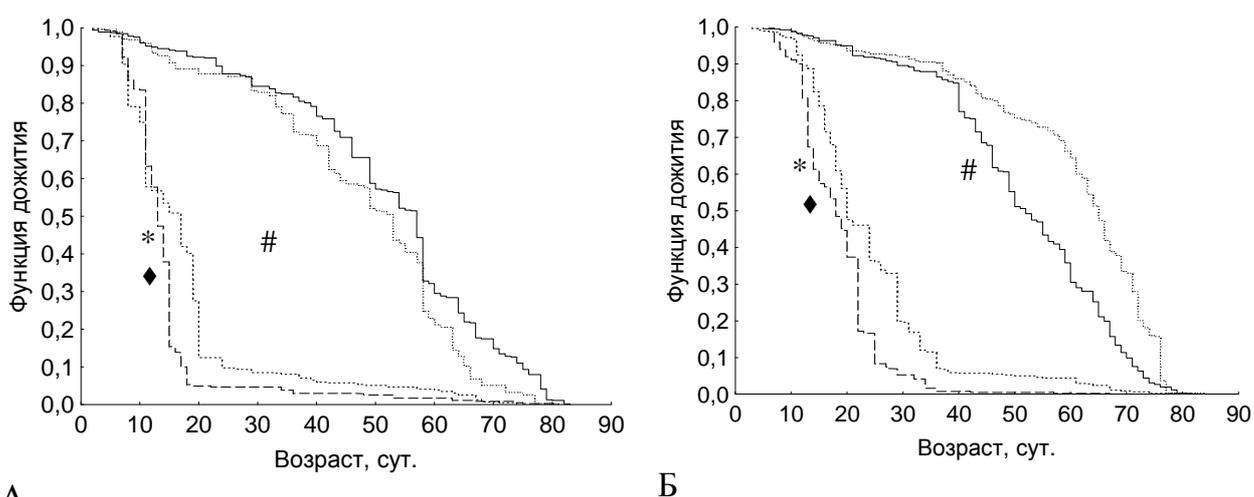


Рис. 10. Влияние сверхэкспрессии гена *D-GADD45* на продолжительность жизни самцов (А) и самок (Б) *Drosophila melanogaster*, подверженных γ -излучению в дозе 30 Гр.

Обозначения: Здесь и далее: — без сверхэкспрессии, --- сверхэкспрессия, 30 Гр без сверхэкспрессии, — — 30 Гр со сверхэкспрессией; * – $p < 0.05$ без сверхэкспрессии, 30 Гр относительно сверхэкспрессия, 30 Гр, ♦ – $p < 0.05$ сверхэкспрессия относительно сверхэкспрессия, 30 Гр, # – $p < 0.05$ без сверхэкспрессии относительно без сверхэкспрессии, 30 Гр по критерию Колмогорова-Смирнова.

При облучении мух без сверхэкспрессией гена *Hus1* наблюдали снижение

возраста 90 % смертности у самок на 6 % и на 30 % у самцов в среднем по обеим повторностям, относительно необлученных мух без сверхэкспрессии. Медианная ПЖ увеличилась на 6 % у самок и снизилась на 31 % у самцов, MRDT у самок увеличился на 29 % и снизился на 13 – 28 % у самцов. Сверхэкспрессия гена *Hus1* привела к тому, что после острого облучения возраст 90 % смертности уменьшился на 14 % у самок и на 21 % у самцов. Медианная ПЖ уменьшилась на 13 % у самцов, у самок не изменилась. При этом у самок наблюдали снижение MRDT на 72 %. У самцов MRDT увеличилось на 176 %. При сравнении мух без и со сверхэкспрессией данного гена получили, что острое облучение способствовало уменьшению возраста 90 % смертности на 34 % у самок и на 55 % у самцов ($p < 0.05$). Медианная ПЖ уменьшилась на 71 % у самок и на 55 % у самцов ($p < 0.05$), MRDT увеличилось на 31 % у самок на 488 % у самцов (табл. 7). Анализ кривых выживаемости подтвердил полученные данные. Кривые выживаемости облученных мух со сверхэкспрессией гена *Hus1* проходят ниже кривой облученных мух без сверхэкспрессии ($p < 0.05$) (рис. 11).

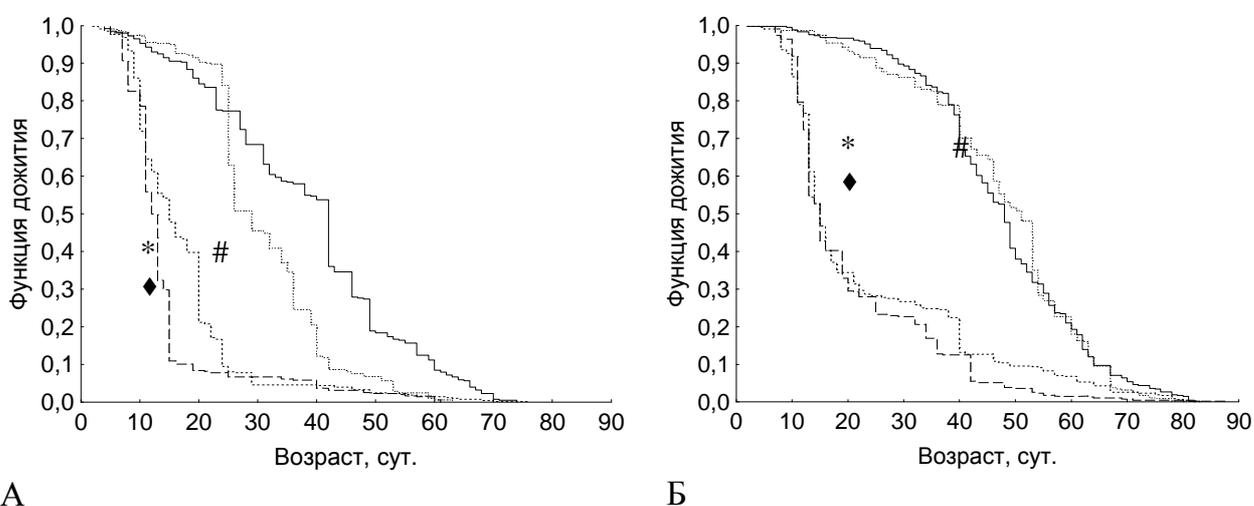
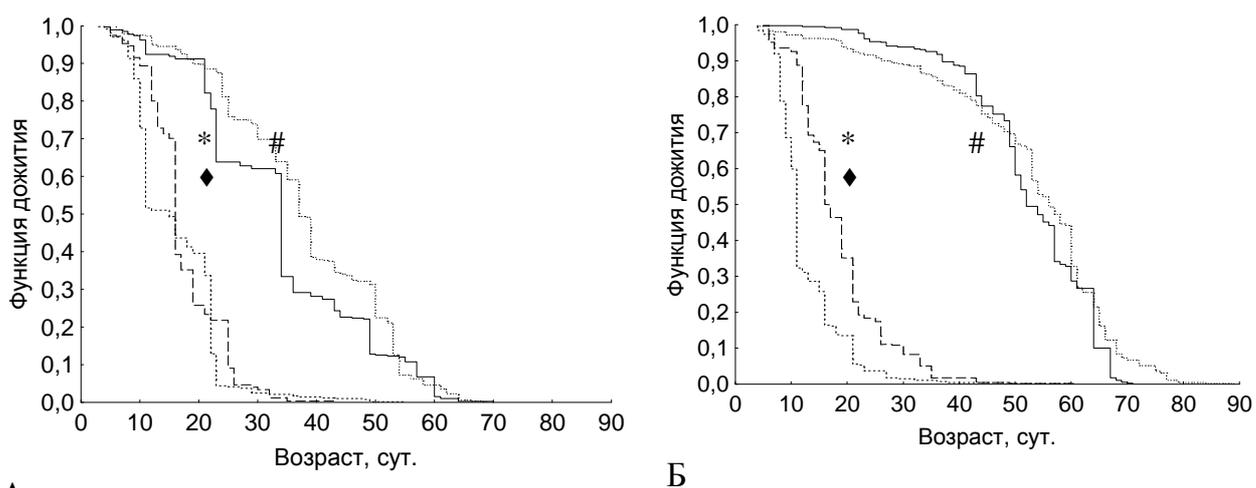


Рис. 11. Влияние сверхэкспрессии гена *Hus1* на продолжительность жизни самцов (А) и самок (Б) *Drosophila melanogaster*, подверженных γ -излучению в дозе 30 Гр.

Острое облучение мух без сверхактивации гена *mnk* не вызвало достоверных изменений в возрасте 90 % смертности, медианной ПЖ и MRDT у самок и самцов. Возраст 90 % смертности у самок увеличился лишь на 5 %, у самцов снизился на 5 %. Медианная ПЖ у самок увеличилась на 8 % и на 9 % у самцов. Значение MRDT у самок увеличилось на 29 % и уменьшились на 15 % у самцов. У мух со

сверхэкспрессией гена *mnk* после облучения возраст 90 % смертности увеличился на 43 % у самок и на 9 % у самцов. Медианная ПЖ у самок увеличилась на 45 % и на 7 % у самцов, MRDT снизилось на 65 % у самок и самцов. Острое облучение самцов и самок со сверхэкспрессией *mnk* привело к снижению возраста 90 % смертности на 54 – 56 % ($p < 0.05$) и медианной ПЖ на 57 – 71 %, относительно облученных мух без сверхэкспрессии ($p < 0.05$). Сверхактивация гена *mnk* снизила MRDT на 39 % у самок и на 33 – 47 % у самцов, относительно облученных мух без сверхэкспрессии (табл. 7). Анализ кривых выживаемости подтвердил данные результаты. Кривая выживаемости самцов и самок, подверженных облучению с предварительной сверхэкспрессией гена *mnk*, смещена влево, относительно кривой выживаемости облученных самцов и самок без сверхэкспрессии данного гена ($p < 0.05$) (рис. 12).



А
 Рис. 12. Влияние сверхэкспрессии гена *mnk* (гомолог *chk2*) на продолжительность жизни самцов (А) и самок (Б) *Drosophila melanogaster*, подверженных γ -излучению в дозе 30 Гр.

Таким образом, кондиционная повсеместная сверхэкспрессия генов, участвующих в распознавании повреждений ДНК (*D-Gadd45*, *Hus1*, *mnk*) не повышала устойчивость дрозофил к действию облучения в дозе 30 Гр, а наоборот, усиливала негативное влияние острого облучения на ПЖ.

Таблица 7

Влияние сверхэкспрессии генов ответа на повреждение ДНК на продолжительность жизни особей *Drosophila melanogaster*, подверженных γ -излучению в дозе 30 Гр

Вариант эксперимента	<i>M</i>	$\bar{X} \pm \Delta m$	90%	<i>min</i>	<i>max</i>	<i>MRDT</i>	<i>N</i>
♂ <i>UAS-D-Gadd45/GS-GAL4</i> (-)	57	51.9±0.9	76	2	88	11.43	455
♂ <i>UAS-D-Gadd45/GS-GAL4</i> (-) 30 Гр #	53#	47.3±1.0	66#	6	88	11.07	313
♂ <i>UAS-D-Gadd45/GS-GAL4</i> (+)	17	17.8±0.6	24	2	85	44.49	506
♂ <i>UAS-D-Gadd45/GS-GAL4</i> (+) 30 Гр * ♦	13*♦	14.5±0.5	18*♦	4	81	34.92	338
♀ <i>UAS-D-Gadd45/GS-GAL4</i> (-)	52	51.4±0.8	70	5	81	9.46	413
♀ <i>UAS-D-Gadd45/GS-GAL4</i> (-) 30 Гр #	65#	59.5±1.0	76#	10	84	7.89	275
♀ <i>UAS-D-Gadd45/GS-GAL4</i> (+)	20	24.0±0.5	36	3	82	19.00	573
♀ <i>UAS-D-Gadd45/GS-GAL4</i> (+) 30 Гр * ♦	18*	18.3±0.4	25*♦	6	67	10.39	361
♂ <i>UAS-Hus1/GS-GAL4</i> (-)	42	38.3±0.8	60	4	74	12.08	402
♂ <i>UAS-Hus1/GS-GAL4</i> (-) 30 Гр #	29#	31.0±0.6	42#	5	63	9.04	321
♂ <i>UAS-Hus1/GS-GAL4</i> (+)	15	17.3±0.5	24	2	76	22.71	433
♂ <i>UAS-Hus1/GS-GAL4</i> (+) 30 Гр * ♦	13*♦	15.0±0.6	19*♦	5	63	38.74	361
♀ <i>UAS-Hus1/GS-GAL4</i> (-)	48	47.6±0.7	64	2	83	10.22	409
♀ <i>UAS-Hus1/GS-GAL4</i> (-) 30 Гр #	51	47.5±0.8	64	5	82	9.05	348
♀ <i>UAS-Hus1/GS-GAL4</i> (+)	15	23.4±0.9	49	2	83	43.21	415
♀ <i>UAS-Hus1/GS-GAL4</i> (+) 30 Гр * ♦	15*	20.7±0.7	42*♦	7	88	26.19	383
♂ <i>UAS-mnk/GS-GAL4</i> (-)	34	33.8±0.7	57	4	70	11.53	398
♂ <i>UAS-mnk/GS-GAL4</i> (-) 30 Гр #	37#	38.1±0.6	54	6	69	9.39	498
♂ <i>UAS-mnk/GS-GAL4</i> (+)	15	16.0±0.4	23	3	55	9.92	321
♂ <i>UAS-mnk/GS-GAL4</i> (+) 30 Гр * ♦	16*♦	17.4±0.3	25*♦	5	43	5.73	321
♀ <i>UAS-mnk/GS-GAL4</i> (-)	52	52.5±0.6	65	5	71	7.09	390
♀ <i>UAS-mnk/GS-GAL4</i> (-) 30 Гр #	56	52.5±0.7	68#	4	89	8.84	480
♀ <i>UAS-mnk/GS-GAL4</i> (+)	11	12.6±0.3	21	4	60	11.85	408
♀ <i>UAS-mnk/GS-GAL4</i> (+) 30 Гр * ♦	16*♦	18.4±0.4	30*♦	5	61	9.29	472

Обозначения: Здесь и далее: *M* – медианная продолжительность жизни (сут); $\bar{X} \pm \Delta m$ – средняя продолжительность жизни (сут) и ошибка средней; 90 % – возраст 90 % смертности (сут); *min* – минимальная продолжительность жизни (сут); *max* – максимальная продолжительность жизни (сут); *MRDT* – время удвоения интенсивности смертности; *N* – количество мух в выборке; ♂ – самцы; ♀ – самки; (-) – без сверхэкспрессии, (+) – со сверхэкспрессией; * – $p < 0.05$ без сверхэкспрессии, 30 Гр относительно сверхэкспрессии, 30 Гр, ♦ – $p < 0.05$ сверхэкспрессия относительно сверхэкспрессии, 30 Гр, # – $p < 0.05$ без сверхэкспрессии относительно без сверхэкспрессии, 30 Гр (первый столбец – по критерию Колмогорова-Смирнова, второй столбец – по критерию Гехана-Бреслоу-Вилкоксона; четвертый столбец –). Данные двух повторностей были объединены.

Воздействие острого облучения в дозе 30 Гр на самок без сверхэкспрессии гена эксцизионной репарации оснований *Rrp1* увеличило возраст 90 % смертности на 5 %, относительно необлученных мух. Медианная ПЖ при этом увеличилась на 15 %, а MRDT снизился на 4 %. Предварительная сверхэкспрессия данного гена до облучения привела к снижению возраста 90 % смертности у самок на 61 %, медианная ПЖ увеличилась на 8 – 33 % и MRDT уменьшилось на 18 – 78 % . При сравнении облученного контроля и облученных мух со сверхэкспрессией гена *Rrp1* получили, что возраст 90 % смертности уменьшился на 72 % ($p < 0.05$), медианная ПЖ уменьшилась на 74 % ($p < 0.05$), а MRDT снизилось на 64 – 71 % (табл. 8). Анализ кривых выживаемости подтвердил полученные данные. Кривые выживаемости облученных с самок со сверхэкспрессией гена *Rrp1* проходят ниже кривой облученных самок без сверхэкспрессии ($p < 0.05$) (рис. 13).

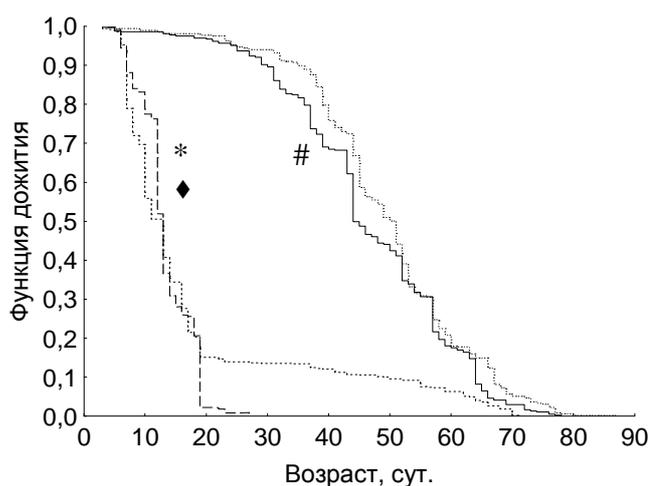


Рис. 13. Влияние сверхэкспрессии гена *Rrp1* (гомолог *APE1*) на продолжительность жизни самок (А, Б) *Drosophila melanogaster*, подверженных γ -излучению в дозе 30 Гр.

При облучении мух без сверхэкспрессией гена *mei-9* наблюдали увеличение возраста 90 % смертности у самок на 7 % и на 22 % у самцов, относительно необлученных мух без сверхэкспрессии в обеих повторностях. Медианная ПЖ увеличилась на 26 % у самок и снизилась на 60 % у самцов. Значения MRDT в среднем по обеим повторностям у самок не изменилось, а у самцов увеличилось на 97 %. Сверхэкспрессия гена *mei-9* привела к тому, что после острого облучения возраст 90 % смертности увеличился на 35 % у самок и снизился на 60 % у самцов, относительно необлученных мух со сверхэкспрессией данного гена. Медианная

ПЖ снизилась на 11 % у самок, и на 24 % у самцов. Наблюдали увеличение MRDT на 42 % у самок и снижение на 21 % у самцов. В ответ на острое облучение предварительная сверхактивация *mei-9* привела к уменьшению возраста 90 % смертности на 21 % у самок и на 63 % у самцов ($p < 0.05$). Медианная ПЖ уменьшилась на 67 % у самок и 65 % у самцов ($p < 0.05$), MRDT увеличилось на 175 % у самок и снизилось на 87 % у самцов (табл. 8). Анализ кривых выживаемости подтвердил полученные данные. Кривые выживаемости облученных мух со сверхэкспрессией гена *mei-9* проходят ниже кривой облученных мух без сверхэкспрессии ($p < 0.05$) (рис. 14).

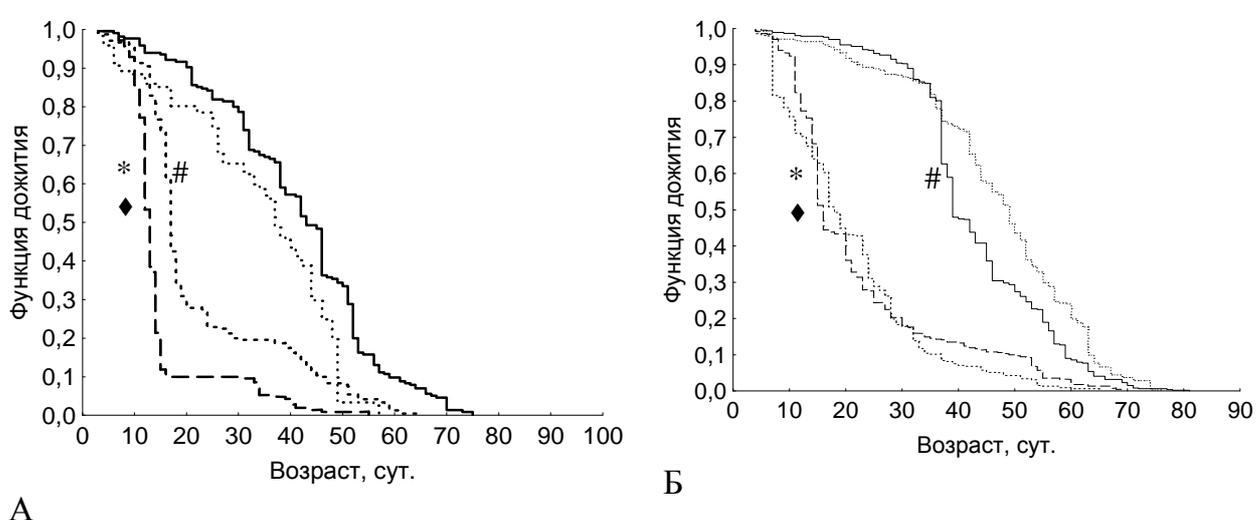
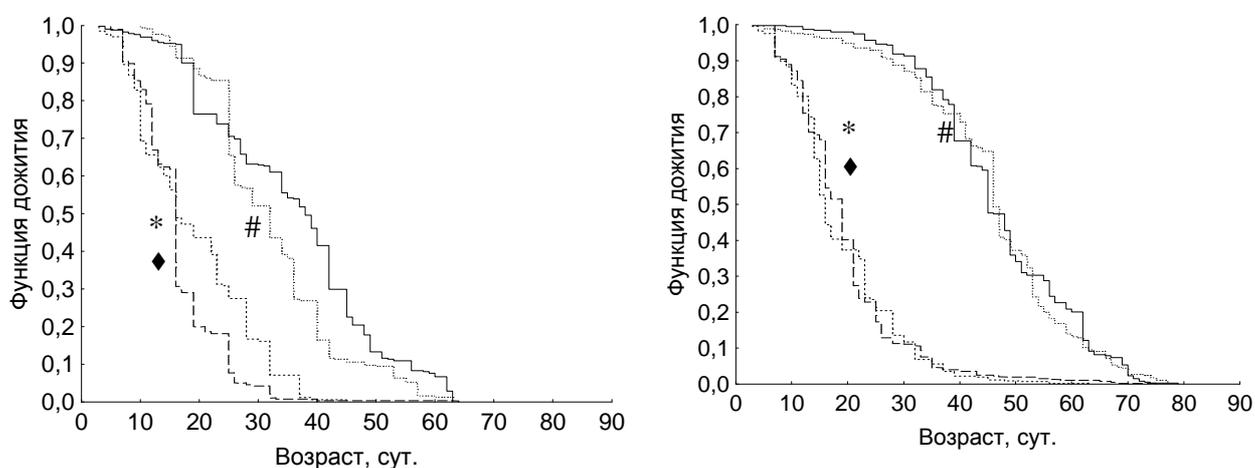


Рис. 14. Влияние сверхэкспрессии гена *mei-9* (гомолог *XPF*) на продолжительность жизни самцов (А) и самок (Б) *Drosophila melanogaster*, подверженных γ -излучению в дозе 30 Гр.

Острое облучение мух без сверхактивации гена *mus210* не вызвало достоверных изменений в возрасте 90 % смертности, медианной ПЖ и MRDT у самок и самцов. Возраст 90 % смертности у самок увеличился лишь на 2 %, у самцов снизился на 19 %. Медианная ПЖ у самок уменьшилась на 2 % и на 18 % у самцов. Значение MRDT у самок увеличилось на 25 % и уменьшились на 35 – 36 % у самцов. У мух со сверхэкспрессией данного гена после облучения возраст 90 % смертности увеличился на 3 % у самок и снизился на 22 % у самцов. Медианная ПЖ у самок увеличилась на 19 % и не изменилась у самцов в среднем по двум повторностям, MRDT увеличилось на 107 % у самок и на 86 % у самцов. Острое

облучение самцов и самок со сверхэкспрессией *mus210* привело к снижению возраста 90 % смертности у самцов и самок на 48 % ($p < 0.05$). Медианная ПЖ уменьшилась на 59 % у самок и на 50 % у самцов, относительно облученных мух без сверхэкспрессии ($p < 0.05$). Сверхактивация *mus210* увеличила MRDT на 48 – 105 % у самок и на 111 % у самцов, относительно облученных мух без сверхэкспрессии (табл. 8). Анализ кривых выживаемости подтвердил данные результаты. Кривая выживаемости самцов и самок, подверженных облучению с предварительной сверхэкспрессией гена *mus210*, смещена влево относительно кривой выживаемости облученных самцов и самок без сверхэкспрессии данного гена ($p < 0.05$) (рис. 15).



А Б
Рис. 15. Влияние сверхэкспрессии гена *mus210* (гомолог *XPC*) на продолжительность жизни самцов (А) и самок (Б) *Drosophila melanogaster*, подверженных γ -излучению в дозе 30 Гр.

Таким образом, кондиционная повсеместная сверхэкспрессия генов, участвующих в эксцизионной репарации ДНК (*Rrp1*, *mei-9*, *mus210*) не приводила к увеличению устойчивости особей дрозофил к облучению в дозе 30 Гр по исследуемым параметрам ПЖ.

Облучение дозой 30 Гр самцов и самок без сверхактивации гена, который участвует в репарации двуцепочечных разрывов ДНК по типу гомологичной рекомбинации *Brc2* не привело к достоверным изменениям в возрасте 90 % смертности, медианной ПЖ и MRDT. Возраст 90 % смертности уменьшился на 3 % у самок и на 17 % у самцов, медианная ПЖ в среднем по двум повторностям

уменьшилась на 2 % у самок и на 3 % у самцов. Значение MRDT уменьшилось на 8 % у самок и на 16 % у самцов. У мух со сверхэкспрессией данного гена после облучения возраст 90 % смертности увеличился на 10 % у самок и снизился на 3 % у самцов. Медианная ПЖ у самок увеличилась на 19 % и на 8 % у самцов, MRDT уменьшилось на 3 – 48 % у самок и на 53 – 64 % у самцов. Острое облучение самцов и самок со сверхэкспрессией гена *Brca2* привело к снижению возраста 90 % смертности на 48 % у самок и на 42 % у самцов ($p < 0.05$). Медианная ПЖ уменьшилась на 60 % у самок и на 67 % у самцов ($p < 0.05$). Сверхактивация *Brca2* увеличила MRDT на 8 – 12 % у самок и на 31 % у самцов (табл. 9). Анализ кривых выживаемости подтвердил данные результаты. Кривая выживаемости самцов и самок, подверженных облучению с предварительной сверхэкспрессией гена *Brca2*, смещена влево относительно кривой выживаемости облученных самцов и самок без сверхэкспрессии данного гена ($p < 0.05$) (рис. 16).

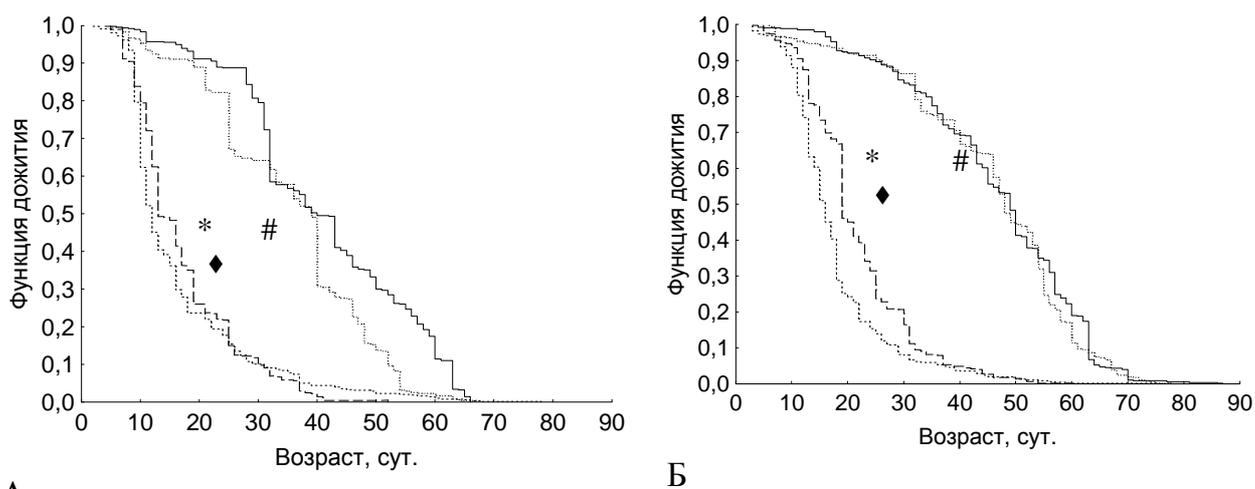
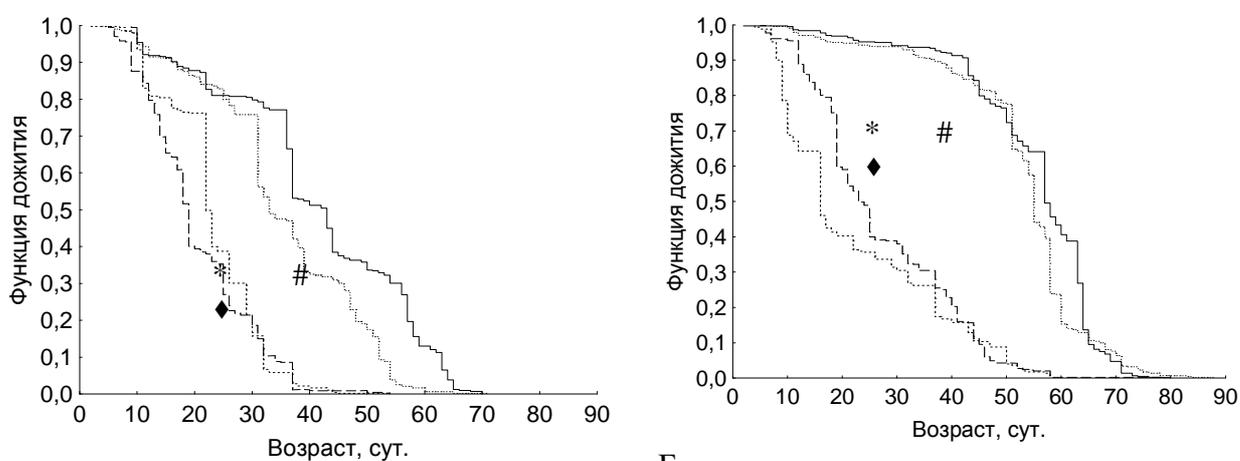


Рис. 16. Влияние сверхэкспрессии гена *Brca2* на продолжительность жизни самцов (А) и самок (Б) *Drosophila melanogaster*, подверженных γ -излучению в дозе 30 Гр.

Воздействие острого облучения в дозе 30 Гр на особей без сверхэкспрессии гена *spn-B*, который участвует в процессах гомологичной рекомбинации, увеличило возраст 90 % смертности на 5 % у самок и снизило на 17 % у самцов, относительно мух без облучения. Медианная ПЖ снизилась на 4 % у самок и на 23 % у самцов. Наблюдали снижение MRDT на 5 % у самок и на 27 % у самцов. Предварительная сверхэкспрессия *spn-B* привела к тому, что после острого облучения возраст 90 % смертности у самок снизился на 4 % и увеличился на 6 % у

самцов. Медианная ПЖ увеличилась на 44 % у самок и снизилась на 14 % у самцов ($p < 0.05$), MRDT увеличилось на 24 – 52 % у самок и на 40 – 106 % у самцов. При сравнении облученного контроля и облученных мух со сверхэкспрессией гена *spn-B* получили, что возраст 90 % смертности уменьшился на 34 % у самок и на 35 % у самцов ($p < 0.05$). Медианная ПЖ уменьшилась на 58 % у самок и на 42 % у самцов ($p < 0.05$), MRDT увеличилось на 27 % у самок и на 30 % у самцов (табл. 9). Анализ кривых выживаемости подтвердил полученные данные. Кривые выживаемости облученных мух со сверхэкспрессией гена *spn-B* проходят ниже кривой облученных мух без сверхэкспрессии ($p < 0.05$) (рис. 17).



А
 Рис. 17. Влияние сверхэкспрессии гена *spn-B* (гомолог *XRCC3*) на продолжительность жизни самцов (А) и самок (Б) *Drosophila melanogaster*, подверженных γ -излучению в дозе 30 Гр

Таблица 8

Влияние сверхэкспрессии генов эксцизионной репарации оснований и нуклеотидов на продолжительность жизни особей *Drosophila melanogaster*, подверженных γ -излучению в дозе 30 Гр

Вариант эксперимента	<i>M</i>	$\bar{X} \pm \Delta m$	90%	<i>min</i>	<i>max</i>	MRDT	<i>N</i>
♂ <i>UAS-me1-9/GS-GAL4</i> (-)	43	41.4±1.1	59	3	75	10.86	385
♂ <i>UAS-me1-9/GS-GAL4</i> (-) 30 Гр #	37	34±1.4	49	3	57	8.86	222
♂ <i>UAS-me1-9/GS-GAL4</i> (+)	17	22.5±0.9	46	3	65	21.11	411
♂ <i>UAS-me1-9/GS-GAL4</i> (+) 30 Гр * ♦	13*♦	14.9±0.6	18*♦	4	55	16.56	335
♀ <i>UAS-me1-9/GS-GAL4</i> (-)	39	43.0±0.6	59	5	81	9.38	463
♀ <i>UAS-me1-9/GS-GAL4</i> (-) 30 Гр #	49#	46.7±0.9	63#	4	76	9.31	271
♀ <i>UAS-me1-9/GS-GAL4</i> (+)	18	20.7±0.6	37	4	65	18.08	439
♀ <i>UAS-me1-9/GS-GAL4</i> (+) 30 Гр * ♦	16*	22.1±0.7	50*♦	4	69	25.64	369
♂ <i>UAS-mus210/GS-GAL4</i> (-)	39#	36.5±0.7	59#	3	81	11.96	431
♂ <i>UAS-mus210/GS-GAL4</i> (-) 30 Гр #	32	32.2±0.6	48	10	63	9.71	377
♂ <i>UAS-mus210/GS-GAL4</i> (+)	16	18.9±0.5	32	3	45	9.19	396
♂ <i>UAS-mus210/GS-GAL4</i> (+) 30 Гр * ♦	16*♦	16.3±0.4	25*♦	5	64	10.00	375
♀ <i>UAS-mus210/GS-GAL4</i> (-)	45	46.9±0.7	63	3	79	8.89	393
♀ <i>UAS-mus210/GS-GAL4</i> (-) 30 Гр #	46	46.1±0.8	64	5	80	9.68	298
♀ <i>UAS-mus210/GS-GAL4</i> (+)	16	18.9±0.5	32	3	63	11.93	426
♀ <i>UAS-mus210/GS-GAL4</i> (+) 30 Гр * ♦	19*	19.5±0.5	33*	7	75	16.59	398
♀ <i>UAS-Rrp1/GS-GAL4</i> (-)	44	46.7±0.7	64	3	78	9.07	365
♀ <i>UAS-Rrp1/GS-GAL4</i> (-) 30 Гр #	50.5#	49.5±0.7	67#	4	87	9.18	355
♀ <i>UAS-Rrp1/GS-GAL4</i> (+)	13	17.7±0.7	49	3	71	171.57	522
♀ <i>UAS-Rrp1/GS-GAL4</i> (+) 30 Гр * ♦	13*♦	13.3±0.2	19*♦	4	27	3.44	320

Острое облучение мух без сверхактивации гена *Ki80*, который участвует в репарации двуцепочечных разрывов ДНК по типу негомологичного воссоединения концов, не вызвало достоверных изменений в возрасте 90 % смертности, медианной ПЖ и MRDT у самок и самцов. Возраст 90 % смертности у самок снизился лишь на 3 %, и на 11 % у самцов. Медианная ПЖ уменьшилась на 17 % у самок и на 18 % у самцов. Значение MRDT увеличилось на 14 – 18 % у самок и на 15 – 38 % у самцов. У мух со сверхэкспрессией данного гена после облучения возраст 90 % смертности уменьшился на 22 % у самок и на 14 % у самцов. Медианная ПЖ уменьшилась на 21 % у самок и на 6 % у самцов средним по двум повторностям, MRDT уменьшилось на 64 % у самок и увеличилось на 129 – 146 % у самцов. Острое облучение самцов и самок со сверхэкспрессией *Ki80* привело к снижению возраста 90 % смертности на 59 % у самок и на 65 % у самцов ($p < 0.05$). Медианная ПЖ уменьшилась на 60 % у самок и на 61 % у самцов ($p < 0.05$). При

сверхэкспрессии *Ku80* снизилось MRDT на 39 – 46 % у самок и на 47 % у самцов (табл. 10). Анализ кривых выживаемости подтвердил данные результаты. Кривая выживаемости самцов и самок, подверженных облучению с предварительной сверхэкспрессией гена *Ku80*, смещена влево относительно кривой выживаемости облученных самцов и самок без сверхэкспрессии данного гена ($p < 0.05$) (рис. 18).

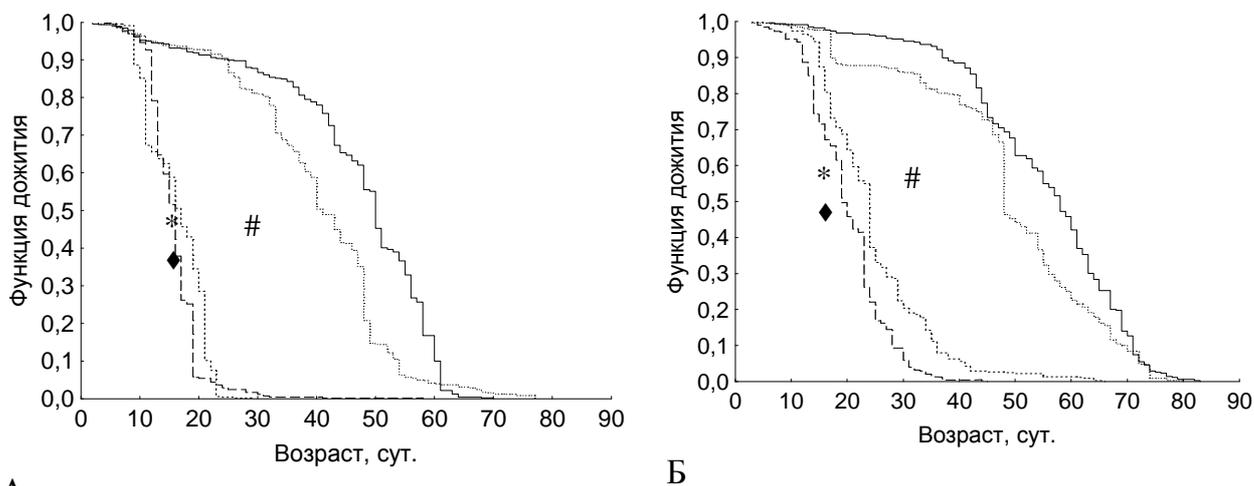


Рис. 18. Влияние сверхэкспрессии гена *Ku80* на продолжительность жизни самцов (А) и самок (Б) *Drosophila melanogaster*, подверженных γ -излучению в дозе 30 Гр.

При воздействии острого облучения в дозе 30 Гр на особи без сверхэкспрессии гена *WRNexo*, который участвует в репарации двуцепочечных разрывов ДНК по типу негомологичного воссоединения концов, наблюдали уменьшение возраста 90 % смертности на 7 % у самок и на 13 % у самцов, относительно мух без облучения. Медианная ПЖ у самок не изменилась, у самцов наблюдали ее снижение на 14 %. Наблюдали снижение MRDT на 14 % у самок и на 37 % у самцов. Предварительная сверхэкспрессия гена *WRNexo* привела к тому, что после острого облучения возраст 90 % смертности уменьшился на 24 % у самок и на 5 % у самцов. Медианная ПЖ уменьшилась на 11 % у самок и увеличилась на 7 % у самцов, MRDT уменьшилось на 24 – 77 % у самок и на 17 – 75 % у самцов. При сравнении облученного контроля и облученных мух со сверхэкспрессией данного гена получили, что возраст 90 % смертности у самок уменьшился на 55 % и на 64 % у самцов ($p < 0.05$). Медианная ПЖ уменьшилась на 63 % у самок и на 59 % у самцов ($p < 0.05$), MRDT уменьшилось на 43 % у самок и на 70 % у самцов (табл. 10). Анализ кривых выживаемости подтвердил полученные данные. Кривые

выживаемости облученных мух со сверхэкспрессией гена *WRNexo* проходят ниже кривой облученных мух без сверхэкспрессии ($p < 0.05$) (рис. 19).

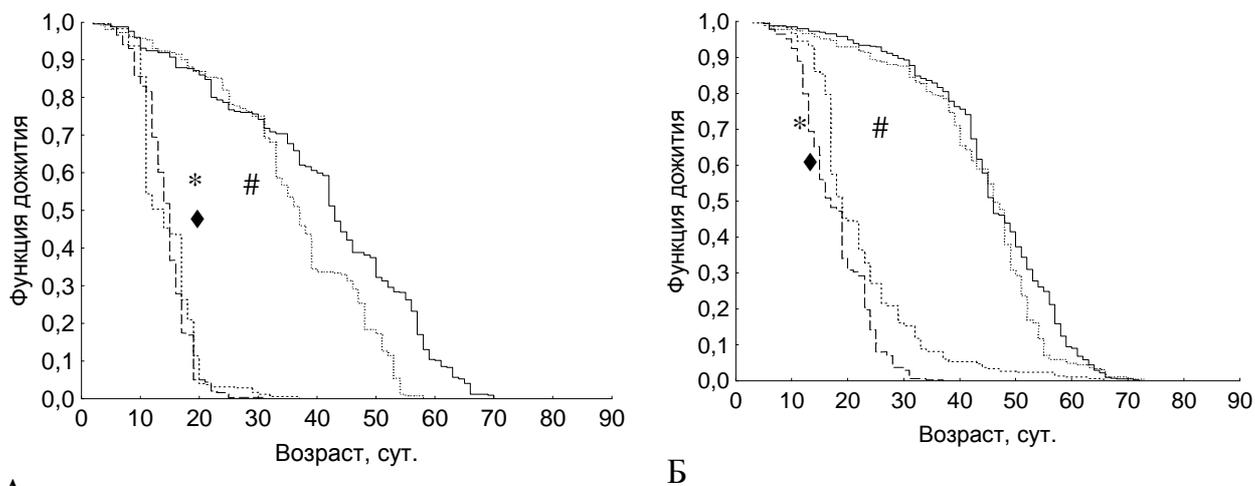


Рис. 19. Влияние сверхэкспрессии гена *WRNexo* на продолжительность жизни самцов (А) и самок (Б) *Drosophila melanogaster*, подверженных γ -излучению в дозе 30 Гр.

Таким образом, кондиционная повсеместная сверхэкспрессия генов, участвующих в репарации двуцепочечных разрывов ДНК (*Brca2*, *spn-B*, *Ku80* и *WRNexo*) не приводила к повышению устойчивости особей дрозофил к острому γ -излучению в дозе 30 Гр по исследуемым параметрам продолжительности жизни.

В целом, кондиционная повсеместная сверхэкспрессия исследуемых генов репарации ДНК не индуцировала устойчивость *Drosophila melanogaster* к острому воздействию γ -излучения, а наоборот усиливала негативное влияние острого воздействия в дозе 30 Гр на ПЖ. Также выявлено, что кондиционная повсеместная активация генов репарации ДНК приводит к снижению медианной ПЖ на 49 – 72 % и возраста 90 % смертности дрозофил на 23 – 68 %, относительно мух без сверхэкспрессии ($p < 0.05$).

Таблица 9

Влияние сверхэкспрессии генов репарации двуцепочечных разрывов ДНК по типу гомологичной рекомбинации на продолжительность жизни особей *Drosophila melanogaster*, подверженных γ -излучению в дозе 30 Гр

Вариант эксперимента	<i>M</i>	$\bar{X} \pm \Delta m$	90%	<i>min</i>	<i>max</i>	<i>MRDT</i>	<i>N</i>
♂ <i>UAS-Brca2/GS-GAL4</i> (-)	40	41.2±0.7	63	4	66	10.19	499
♂ <i>UAS-Brca2/GS-GAL4</i> (-) 30 Гр #	39#	35.4±0.6	52#	5	67	9.23	424
♂ <i>UAS-Brca2/GS-GAL4</i> (+)	12	16.5±0.5	31	2	78	28.43	473
♂ <i>UAS-Brca2/GS-GAL4</i> (+) 30 Гр *♦	13*♦	17.1±0.4	30*	5	52	10.91	408
♀ <i>UAS-Brca2/GS-GAL4</i> (-)	49	46.5±0.6	63	3	87	9.55	552
♀ <i>UAS-Brca2/GS-GAL4</i> (-) 30 Гр #	48	45.7±0.7	61	6	78	8.98	412
♀ <i>UAS-Brca2/GS-GAL4</i> (+)	16	17.8±0.4	29	3	75	15.93	449
♀ <i>UAS-Brca2/GS-GAL4</i> (+) 30 Гр *♦	19*♦	21.5±0.4	32*♦	5	60	10.32	455
♂ <i>UAS-spn-B/GS-GAL4</i> (-)	43	41.6±0.8	63	9	70	10.36	416
♂ <i>UAS-spn-B/GS-GAL4</i> (-) 30 Гр #	33	35.4±0.6	52	4	71	9.18	503
♂ <i>UAS-spn-B/GS-GAL4</i> (+)	22	23.1±0.4	32	2	54	6.49	408
♂ <i>UAS-spn-B/GS-GAL4</i> (+) 30 Гр *♦	19*♦	20.5±0.4	34*	5	54	9.02	434
♀ <i>UAS-spn-B/GS-GAL4</i> (-)	57	55.1±0.6	65	2	79	6.05	438
♀ <i>UAS-spn-B/GS-GAL4</i> (-) 30 Гр #	55#	52.9±0.6	68#	7	88	7.69	467
♀ <i>UAS-spn-B/GS-GAL4</i> (+)	16	22.6±0.8	47	4	58	20.23	350
♀ <i>UAS-spn-B/GS-GAL4</i> (+) 30 Гр *♦	23*♦	27.1±0.6	45*	5	80	12.95	447

Таблица 10

Влияние сверхэкспрессии генов репарации двуцепочечных разрывов ДНК по типу негомологичного воссоединения концов на продолжительность жизни особей *Drosophila melanogaster*, подверженных облучению 30 Гр

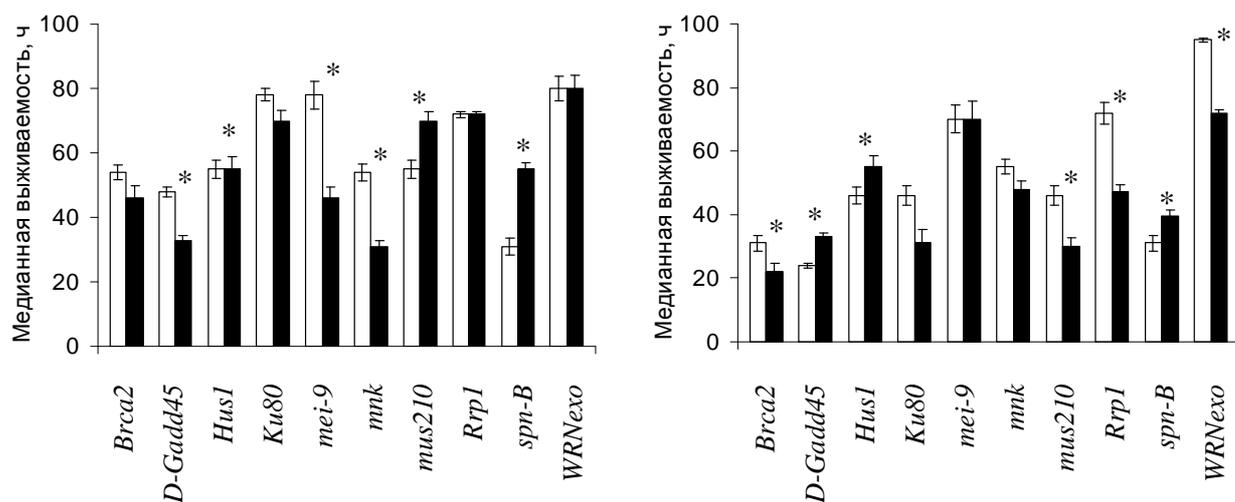
Вариант эксперимента	<i>M</i>	$\bar{X} \pm \Delta m$	90%	<i>min</i>	<i>max</i>	<i>MRDT</i>	<i>N</i>
♂ <i>UAS-Ku80/GS-GAL4</i> (-)	50	46.6±0.7	61	2	70	6.79	459
♂ <i>UAS-Ku80/GS-GAL4</i> (-) 30 Гр #	41#	40.1±0.6	54#	3	77	9.48	456
♂ <i>UAS-Ku80/GS-GAL4</i> (+)	17	16.1±0.2	22	6	29	3.07	459
♂ <i>UAS-Ku80/GS-GAL4</i> (+) 30 Гр *♦	16*♦	15.7±0.2	19*♦	4	58	7.79	409
♀ <i>UAS-Ku80/GS-GAL4</i> (-)	58	55.1±0.8	71	6	83	7.93	349
♀ <i>UAS-Ku80/GS-GAL4</i> (-) 30 Гр #	48#	48.6±0.8	69	3	80	9.94	432
♀ <i>UAS-Ku80/GS-GAL4</i> (+)	24	24.6±0.4	36	3	66	10.99	588
♀ <i>UAS-Ku80/GS-GAL4</i> (+) 30 Гр *♦	19*♦	20.1±0.3	28*♦	4	45	5.56	408
♂ <i>UAS-WRNexo/GS-GAL4</i> (-)	43	41.0±0.8	61	2	70	10.61	422
♂ <i>UAS-WRNexo/GS-GAL4</i> (-) 30 Гр #	37#	36.1±0.8	53#	3	58	7.95	261
♂ <i>UAS-WRNexo/GS-GAL4</i> (+)	14	14.5±0.3	20	2	37	5.30	353
♂ <i>UAS-WRNexo/GS-GAL4</i> (+) 30 Гр *♦	15*	14.3±0.2	19*♦	5	31	3.22	384
♀ <i>UAS-WRNexo/GS-GAL4</i> (-)	46	45.6±0.6	59	6	72	7.23	410
♀ <i>UAS-WRNexo/GS-GAL4</i> (-) 30 Гр #	46#	43.3±0.8	55#	4	73	7.53	266
♀ <i>UAS-WRNexo/GS-GAL4</i> (+)	19	22.3±0.6	33	3	66	13.26	296
♀ <i>UAS-WRNexo/GS-GAL4</i> (+) 30 Гр *♦	17*♦	17.8±0.3	25*♦	5	37	4.75	373

3.4. Влияние кондиционной повсеместной сверхэкспрессии генов репарации ДНК на устойчивость особей *Drosophila melanogaster* к действию стресс-факторов различной природы (прооксиданту параквату, гипертермии, голоданию)

Продолжительность жизни, как правило, сопряжена с увеличением устойчивости живых организмов к различным видам стресса. Поскольку гены репарации ДНК вовлечены в механизмы ответа на действие экзогенных и эндогенных факторов, предположили, что их сверхэкспрессия приведет к повышению устойчивости особей к различным видам стресса. Для этого исследовали влияние сверхэкспрессии генов, которые участвуют в распознавании повреждений ДНК (*D-Gadd45*, *Hus1*, *mnk*), генов эксцизионной репарации ДНК (*mei-9*, *mus210*, *Rrp1*) и генов репарации двуцепочечных разрывов ДНК (*Brca2*, *Ku80*, *spn-B*, *WRNexo*) на устойчивость дрозофил к действию прооксидантов (20 μ M раствор параквата в 5 % сахарозе), гипертермии (35°C) и голодания.

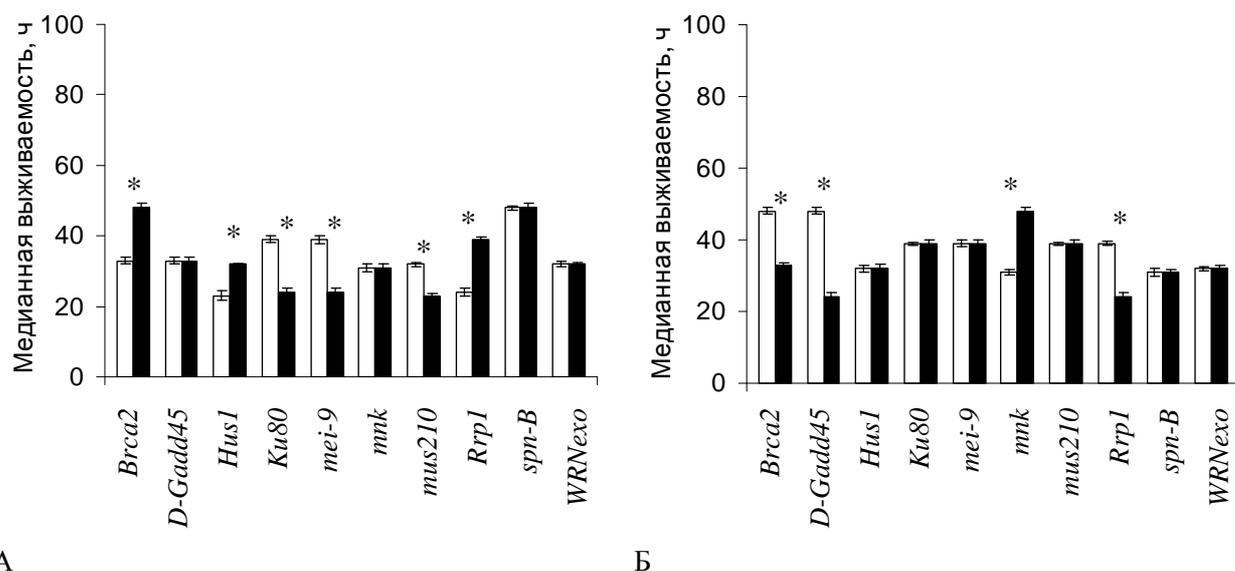
В большинстве случаев сверхэкспрессия генов репарации ДНК не приводила к достоверным изменениям, либо снижала медианную длительность жизни самцов и самок в условиях действия индуктора свободных радикалов параквата на 7 – 30 % по сравнению с особями без сверхэкспрессии ($p < 0.05$) (рис. 20). Анализ других показателей выживаемости показал аналогичный результат (табл. 11). Исключением являются самцы со сверхэкспрессией генов *spn-B* и *mus210* и самки с повышенной активностью генов *D-Gadd45*, *Hus1* и *spn-B* – их медианная ПЖ в условиях прооксиданта была выше на 15 – 77 % ($p < 0.05$).

Повышенная транскрипция генов репарации ДНК для многих генов повысила устойчивость дрозофил к гипертермии. Так, у самцов со сверхэкспрессией генов *Brca2*, *Hus1* и *Rrp1*, а также самок со сверхэкспрессией *mnk* медианная ПЖ при 35 °C была выше на 7 – 55 % по сравнению с контрольными особями ($p < 0.05$). С другой стороны, увеличение транскрипции таких генов *Ku80*, *mei-9*, *mus210* у самцов и *D-Gadd45*, *Ku80*, *Brca2*, *Rrp1* у самок сопровождалось снижением медианной длительности жизни на 8 – 24 % ($p < 0.05$) (рис. 21). Оценка других показателей выживаемости показала аналогичный результат (табл. 11).



А Б
Рис. 20. Влияние кондиционной повсеместной сверхэкспрессии генов репарации ДНК на устойчивость самцов (А) и самок (Б) к прооксиданту параквату.

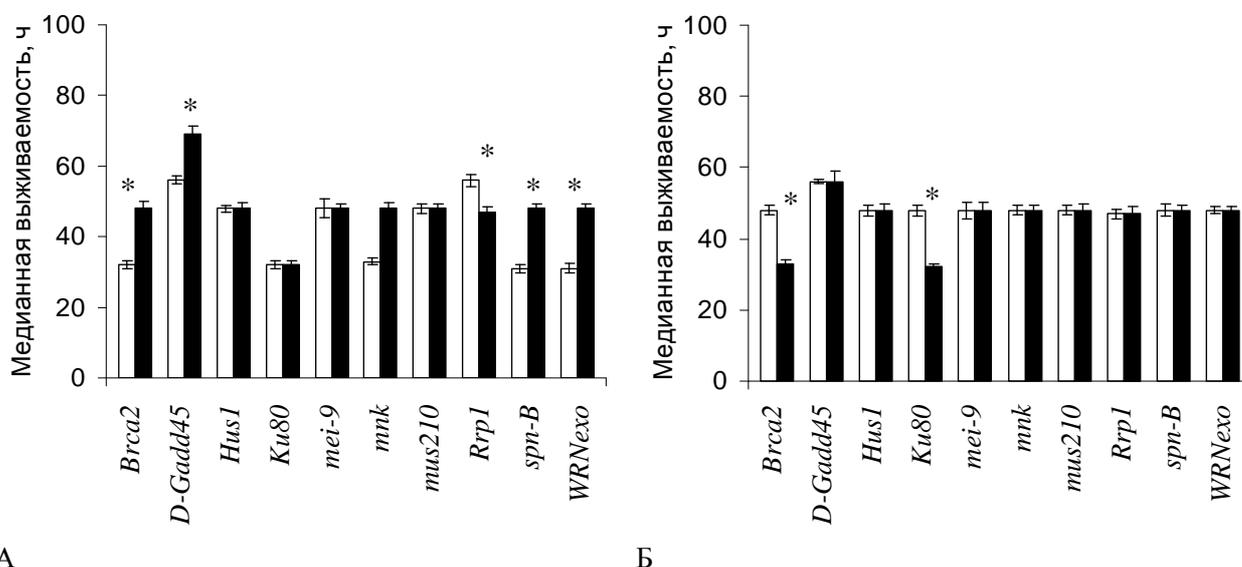
Здесь и далее: □ - без сверхэкспрессии, ■ - сверхэкспрессия; * - $p < 0.05$ по критерию Гехана-Бреслоу-Вилкоксона.



А Б
Рис. 21. Влияние кондиционной повсеместной сверхэкспрессии генов репарации ДНК на устойчивость самцов (А) и самок (Б) к гипертермии.

Повышенная транскрипционная активность генов *Brca2*, *D-Gadd45*, *spn-B*, *WRNexo* у самцов привела к повышению медианной длительности жизни в условиях голодания на 8 – 45 % ($p < 0.05$) (рис. 22). Анализ других показателей соответствовал этим данным. Однако сверхэкспрессия генов репарации ДНК в

остальных вариантах эксперимента с воздействием голодания не повлияла на выживаемость, либо вызвала негативный эффект (табл. 11).



А Б
Рис. 22. Влияние кондиционной повсеместной сверхэкспрессии генов репарации ДНК на устойчивость самцов (А) и самок (Б) к голоданию.

Таким образом, кондиционная повсеместная сверхэкспрессия генов *Brca2*, *D-Gadd45*, *Hus1*, *mnk*, *mus210*, *Ku80*, *Rrp1*, *spn-B* и *WRNexo* повышает устойчивость (повышение одного или нескольких параметров выживаемости) дрозофил к исследуемым стресс-факторам. В остальных вариантах экспериментов наличие в геноме дрозофил дополнительных активных копий генов репарации ДНК либо не стимулировало стрессоустойчивость особей, либо ухудшало ее.

Влияние сверхэкспрессии генов репарации ДНК на устойчивость особей *Drosophila melanogaster* к действию прооксидантам, гипертермии и голоданию

Вариант эксперимента	Действие прооксиданта параквата				Гипертермия				Голодание			
	M	$\bar{X} \pm \Delta m$	48 ч	N	M	$\bar{X} \pm \Delta m$	24 ч	N	M	$\bar{X} \pm \Delta m$	48 ч	N
♂ <i>UAS-Brca2/GS-GAL4</i> (-)	54	53.3±1.7*	46	153	33	36.6±0.9	6	111	32	36.4±1.0	98	129
♂ <i>UAS-Brca2/GS-GAL4</i> (+)	46	49.6±3.0	59*	101	48*	39.6±1.0*	12	109	48*	44.1±1.5*	81*	33
♀ <i>UAS-Brca2/GS-GAL4</i> (-)	31	40.9±2.0	73	111	48	41.8±0.8	5	112	48	42.3±1.1	80	130
♀ <i>UAS-Brca2/GS-GAL4</i> (+)	22*	35.1±2.1*	82*	99	33*	34.5±0.6*	14*	110	33*	38.8±1.0	96*	102
♂ <i>UAS-D-Gadd45/GS-GAL4</i> (-)	48	42±1.2	92	144	33	34.7±0.8	31	160	56	62.9±0.9	85	170
♂ <i>UAS-D-Gadd45/GS-GAL4</i> (+)	33*	33.9±1*	97*	138	33	37±0.7 *	30	210	69*	57±1.9*	33*	128
♀ <i>UAS-D-Gadd45/GS-GAL4</i> (-)	24	29.4±0.6	100	150	48	39.9±0.7	13	156	56	55.6±0.5	24	168
♀ <i>UAS-D-Gadd45/GS-GAL4</i> (+)	33*	34.8±0.9 *	96*	162	24*	33.8±1.1*	54*	100	56	60±2.4*	49*	136
♂ <i>UAS-Hus1/GS-GAL4</i> (-)	55	62.4±2.3	28	104	23	29.8±1.0	9	117	48	40.6±0.8	86	220
♂ <i>UAS-Hus1/GS-GAL4</i> (+)	55*	51.6±3.1*	50*	107	32*	34.6±1.1*	31*	117	48	48.9±1.2*	78*	112
♀ <i>UAS-Hus1/GS-GAL4</i> (-)	46	45.9±2.0	66	142	32	29.5±0.8	45	115	48	52.1±1.2	59	112
♀ <i>UAS-Hus1/GS-GAL4</i> (+)	55*	62.3±2.8*	46*	107	32	37.0±0.9*	9*	103	48	44.6±1.3*	71*	134
♂ <i>UAS-Ku80/GS-GAL4</i> (-)	78	80.0±1.5	9	220	39	32.8±0.8	38	96	32	38.9±1.0	30	160
♂ <i>UAS-Ku80/GS-GAL4</i> (+)	70	76.7±2.6	18*	102	24*	26.3±0.8*	76*	106	32	34.9±1.1*	99*	93
♀ <i>UAS-Ku80/GS-GAL4</i> (-)	46	58.3±2.4	56	205	39	38.9±0.3	2	99	48	42.1±1.2	100	110
♀ <i>UAS-Ku80/GS-GAL4</i> (+)	31	56.1±3.5	58	123	39	35.8±0.7*	17*	98	32*	36.6±0.9*	76*	107
♂ <i>UAS-mei-9/GS-GAL4</i> (-)	78	84.9±3.5	25	110	39	32.2±0.9	40	98	48	42.2±2.1	66	92
♂ <i>UAS-mei-9/GS-GAL4</i> (+)	46*	59.1±2.6*	52*	116	24*	28.0±0.8*	69*	104	48	40.3±1.0*	87*	140
♀ <i>UAS-mei-9/GS-GAL4</i> (-)	70	69.9±3.5	41	112	39	36.7±0.7	14	113	48	53.4±1.8	68	157
♀ <i>UAS-mei-9/GS-GAL4</i> (+)	70	73.7±4.4	43	113	39	39.6±0.7*	9	107	48	48.6±1.6*	65	108
♂ <i>UAS-mnk/GS-GAL4</i> (-)	54	54.3±2.2	26	93	31	33.8±0.9	23	143	33	37.9±0.8	93	118
♂ <i>UAS-mnk/GS-GAL4</i> (+)	31*	38.3±1.6*	66*	151	31	32.5±0.8	20	120	48	40.9±1.4*	73*	131
♀ <i>UAS-mnk/GS-GAL4</i> (-)	55	51.4±1.8	46	144	31	36.1±0.6	4	230	48	43.2±1.1	84	103
♀ <i>UAS-mnk/GS-GAL4</i> (+)	48	50.9±2.1	60*	166	48*	40.1±0.8*	5	115	48	39.3±1.1	94	124
♂ <i>UAS-mus210/GS-GAL4</i> (-)	55	60.4±2.3	32	111	32	27.4±0.5	49	96	48	43.1±1.1	88	108
♂ <i>UAS-mus210/GS-GAL4</i> (+)	70*	69.5±2.4	30	128	23*	23.7±0.4*	85*	151	48	38.1±1.1	99*	103
♀ <i>UAS-mus210/GS-GAL4</i> (-)	46	49.1±2.3	67	119	39	39.4±0.3	2	132	48	41.4±1.0	93	115
♀ <i>UAS-mus210/GS-GAL4</i> (+)	30*	42.6±2.1	81*	114	39	32.6±0.8*	34*	119	48	44.7±1.3*	69*	109
♂ <i>UAS-Rrp1/GS-GAL4</i> (-)	72	63.2±1.9	31	132	24	27.5±0.8	67	132	56	60.1±1.4	29	110
♂ <i>UAS-Rrp1/GS-GAL4</i> (+)	72	62.3±2.2	33	133	39*	34.4±0.7*	26*	133	47*	50.7±1.3*	62*	108
♀ <i>UAS-Rrp1/GS-GAL4</i> (-)	72	68.0±2.7	38	120	39	38.6±0.5	7	119	47	55.0±1.1	55	115
♀ <i>UAS-Rrp1/GS-GAL4</i> (+)	47*	48.2±2.0*	73*	120	24*	29.3±0.9*	57*	107	47	49.8±1.6*	51	100
♂ <i>UAS-spn-B/GS-GAL4</i> (-)	31	38.4±2.2	4	103	48	28.7±0.5	5	105	31	34.6±0.9	100	92
♂ <i>UAS-spn-B/GS-GAL4</i> (+)	55*	61.4±1.5	4	117	48	32.2±0.9	4	96	48 *	40.9±1.1	91 *	106
♀ <i>UAS-spn-B/GS-GAL4</i> (-)	31	38.3±1.9	4	97	31	42.2±0.8	2	117	48	50.2±1.4	5	97
♀ <i>UAS-spn-B/GS-GAL4</i> (+)	40*	38.3±1.7	5	92	31	44.1±0.7	1	113	48	52.1±1.1	4	127
♂ <i>UAS-WRNexo/GS-GAL4</i> (-)	80	81.6±3.0	26	117	32	29.4±0.6	42	102	31	32.2±1.1	98	98
♂ <i>UAS-WRNexo/GS-GAL4</i> (+)	80	64.9±3.3*	37	90	32	30.4±0.5	26*	100	48*	46.8±1.0*	75*	102
♀ <i>UAS-WRNexo/GS-GAL4</i> (-)	95	91.1±4.0	28	102	32	29.8±0.5	37	120	48	44.4±0.8	93	112
♀ <i>UAS-WRNexo/GS-GAL4</i> (+)	72*	77.9±3.5*	36*	100	32	33.6±0.8	21*	110	48	43.0±0.9	91	118

Обозначения: ♂ - самцы; ♀ - самки; (-) – без сверхэкспрессии; (+) – сверхэкспрессия; *M* – медианная выживаемость (ч); $\bar{X} \pm \Delta m$ – средняя выживаемость (ч); 48 ч и 24 ч – процент умерших особей через 48 ч и 24 ч после начала воздействия; *N* – количество мух в выборке; * – $p < 0.05$ (*M* – критерий Гехана-Бреслоу-Вилкоксона; $\bar{X} \pm \Delta m$ – критерий Колмогорова-Смирнова, 48 ч и 24 ч – ϕ -критерий Фишера).

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На сегодняшний день остаются нерешенными вопросы о вкладе молекулярно-клеточных процессов в эффекты, наблюдаемые на организменном уровне. В то же время это именно те изменения, которые играют определяющую роль в приспособленности особи и популяции к условиям окружающей среды. Согласно данным Лауры Саундерс и Эрика Вердина, неблагоприятные условия среды вызывают активацию внутриклеточных механизмов стрессоустойчивости и формирование адаптивного ответа по ПЖ у *Caenorhabditis elegans* (Saunders, Verdin, 2009). Мутации гомологов генов *ATR*, *ATM*, *SIRT1*, *JNK*, *p53* и *GADD45* приводят к нарушению биологических ответов на хроническое воздействие ИИ в малой дозе по ПЖ у *Drosophila melanogaster* (Moskalev et al., 2011; The role of..., 2012). Для выявления роли определенных генов в регуляции стрессоустойчивости целого организма, используют экспериментальные подходы, заключающиеся в снижении или полном выключении активности исследуемых генов, либо в искусственной сверхактивации (сверхэкспрессии) этих генов. Данный подход длительное время используется в нашей лаборатории. Например, нами было показано, что особи с конститутивной, кондиционной и отсроченной кондиционной сверхэкспрессией гена *D-Gadd45* в нервной системе более устойчивы к действию окислительного стресса, теплового шока и голодания (Plyusnina et al., 2011; The role of D-GADD45..., 2012). У особей *Drosophila melanogaster* с нарушенной функцией гена транскрипционного фактора теплового шока и генов белков теплового шока кратковременное низкоинтенсивное воздействие ИИ и теплового шока способствует повышению адаптационной устойчивости к последующему воздействию острого оксидативного стресса и ионизирующего излучения по ПЖ (Турышева и др., 2008; Moskalev et al., 2009).

В природных популяциях животных и растений, подверженных облучению в малых дозах, наблюдается дестабилизация генома, которая проявляется в виде изменений показателей плодовитости и жизнеспособности потомства, а также мутационного груза (доминантных и рецессивных летальных мутаций) (Зайнуллин, 1998). Хроническое воздействие ионизирующей радиации в малых дозах (0.25 мГр/ч) индуцирует нестабильность генома популяций *Drosophila melanogaster*,

которая выражается в достоверном повышении плотности населения популяций, частоты эмбриональной смертности и доминантных леталей, повышении уровня смертности на стадии куколки, понижении уровня жизнеспособности и плодовитости, изменении частоты атрофии гонад самок и стерильности (Юранева, 2002).

Стресс-факторы прямо или опосредованно приводят к повреждениям ДНК, которые являются критическим событием для клетки и организма. Например, в малых концентрациях нитрат свинца вызывает повышение уровня доминантных и рецессивных летальных мутаций у дрозофилы (Ракин, 1990). В клетках имеются механизмы, которые предотвращают и репарируют повреждения ДНК. При прямом повреждении ДНК индуцируются повреждения оснований, сшивки ДНК-ДНК и ДНК-белок, одно- и двунитевые разрывы ДНК (Prise, 1993). Повреждения ДНК, индуцируемые косвенным способом, имеют природу, сходную со спонтанными нарушениями, и в основном представлены модифицированными основаниями и однонитевыми разрывами ДНК (Targeted cytoplasmic..., 1999). Существует несколько механизмов ответа клетки на повреждение ДНК (рис. 23). Важнейшим из них является репарация ДНК. Поэтому, используя линии *Drosophila melanogaster* с мутациями и сверхэкспрессией генов репарации ДНК и применяя ПЖ в качестве интегрального показателя стрессоустойчивости организма, мы изучили роль данных генов в обеспечении устойчивости дрозофил к действию различных факторов окружающей среды (ионизирующее излучение, действие прооксидантов, гипертермия и голодание).



Рис. 23. Цепь реакций в ответ на повреждение ДНК в клетке.

Исследовали влияние генов эксцизионной репарации ДНК (гомологи *PCNA*, *XPC*, *XPF*, *APE1*), генов репарации двухнитевых разрывов ДНК (гомологи *BRCA2*, *KU80*, *WRNexo*, *XRCC3*, *RAD54*, *BLM*), а также генов, которые являются сенсорами повреждения ДНК (гомологи *GADD45*, *HUS1* и *CHK2*) на устойчивость особей *Drosophila melanogaster* к действию ИИ, прооксиданта параквата, гипертермии и голодания. Для выявления роли генов репарации ДНК в формировании радиоадаптивного ответа мы использовали линии мух с мутациями в генах-мишенях. Для исследования устойчивости к острому воздействию ИИ в дозе 30 Гр, а также, устойчивости к действию прооксидантов, гипертермии и голодания проводили искусственную сверхактивацию дополнительных копий исследуемых генов репарации ДНК в геноме дрозофил.

Вначале, провели исследование изменения показателей ПЖ у особей линии дикого типа *Canton-S* и линий с мутациями в генах ответа на повреждение ДНК (*D-Gadd45*), эксцизионной репарации ДНК (*mei-9*, *mus210*, *Mus209*), репарации двуцепочечных разрывов ДНК (*okr*, *spn-B*, *Mus309*) в ответ на действие ИИ в острой и хронической дозах. Эксперимент проводили по схеме, представленной на рис. 2.

Реакция на облучение организма определяется такими клеточными механизмами стрессоустойчивости как: репарация ДНК, контроль клеточного цикла, обезвреживание свободных радикалов и ответ на тепловой шок (Шапошников и др., 2009; Moskaliev et al., 2009). Формирование адаптивного ответа в популяциях, подвергавшихся хроническому воздействию ионизирующего излучения, происходит на уровне повреждений ДНК (Юшкова, 2008). Ключевую роль в радиационном гормезисе и адаптивном ответе на уровне целого организма может играть FOXO-зависимый механизм активации генов стресс-ответа (Москалев, 2008а). Показано, что у гомозигот по гипоморфным аллелям гена *FOXO* отсутствует гормезис и адаптивный ответ, проявляющийся в увеличении длительности личиночной стадии развития и ПЖ при воздействии малых доз γ -излучения, в отличие от линии дикого типа *Canton-S* и FOXO-гетерозигот (Шапошников, Москалев, 2010). Транскрипционный фактор FOXO обеспечивает баланс между процессами роста и размножения, с одной стороны, и стрессоустойчивостью и долгожительством, с другой (Москалев, 2008б). В

зависимости от интенсивности неблагоприятного воздействия происходит его посттрансляционная модификация и связывание со специфическими белками-мишенями, что определяет дифференциальную реакцию клетки: слабый стресс приводит к интенсификации метаболизма, умеренный – запускает процессы восстановления, сильный – индуцирует апоптоз (Calnan, Brunet, 2008).

Полученные в работе данные (табл. 4, Рис. 3) свидетельствуют о том, что хроническое воздействие γ -излучения в дозе 40 сГр на предимагинальных стадиях развития индуцирует радиоадаптивный ответ (РАО) и эффект радиационного гормезиса на острое воздействие γ -излучения у особей дикого типа *Canton-S*.

Для выяснения механизмов наблюдаемых у линии дикого типа изучили роль в РАО генов ответа на повреждение и различных типов репарации ДНК.

В отличие от особей линии дикого типа у гомо- и гетерозигот с мутациями в гене *D-Gadd45*, который контролирует активность белков эксцизионной репарации нуклеотидов и оснований, а также обеспечивает доступность поврежденных участков ДНК для ферментов репарации (Ma et al., 2009), РАО и эффект гормезиса отсутствовали. Более того, предварительное хроническое воздействие γ -излучения усиливало негативное влияние на ПЖ острого воздействия в дозе 30 Гр (рис. 6). Таким образом, ген *D-Gadd45* имеет ключевое значение в ответе на действие ИИ, и даже частичного снижения его активности достаточно для утраты организма способности проявлять РАО и эффект гормезиса. Ранее в нашей лаборатории было показано, что конститутивная сверхэкспрессия гена *D-Gadd45* в нервной системе, повышает ПЖ дрозофилы в стандартных условиях, а также под действием γ -излучения в острой и хронической дозах (The role of D-GADD45..., 2012). Салли Амундсон и коллеги показали, что облучение радиочувствительной линии клеток *ML-1* в диапазоне доз между 2 и 50 сГр приводит к достоверному изменению экспрессии гена *GADD45*, которая нарастает линейно (Differential responses..., 2003). Транскрипция мРНК генов семейства *GADD45* происходит в ответ на разнообразные виды стресса: окислительный, гиперосмотический, воспалительный и онкогенный, на гипоксию, низкочастотные электромагнитные поля, воздействие ксенобиотиков (например, мышьяк) и алкилирующих агентов (например, сульфонат метил метан), соединения хрома (VI), цисплатин, а также на другие загрязнители почв, воздуха и воды (Induction by ionizing..., 1991; Price, Calderwood,

1992; Zhang et al., 2001; DeHaan et al., 2001; Bulavin et al., 2003; Induction of proapoptotic..., 2004; Bower et al., 2006; Electromagnetic fields..., 2005; Low pH induces..., 2006; Sen et al., 2007; The transcription..., 2009).

Исследовали роль генов эксцизионной репарации ДНК (гомологи *PCNA*, *XPC*, *XPF*) в РАО. В отличие от особей линии дикого типа у особей-гомозигот с мутацией гена *mei-9* – гомолог *XPF*, отвечающего за эксцизионную репарацию нуклеотидов (Boyd et al., 1976), наблюдали снижение параметров ПЖ, а также отсутствие радиоадаптации и эффекта радиационного гормезиса ($p < 0.001$) (рис. 5). У особей-гетерозигот с мутацией по данному гену РАО и эффект гормезиса также не проявлялся (рис. 5), наблюдали еще большее снижение параметров ПЖ, чем у особей линии дикого типа ($p < 0.001$), что свидетельствует важной роли гена *mei-9* в защите биологической системы от радиационных повреждений. Из литературных данных известно, что рентгеновское облучение личинок третьего возраста (перед стадией куколки) с мутацией в гене *mei-9^{A1}* индуцирует остановку клеточного цикла в клетках крыла имагинального диска (Kondo, Perrimon, 2011) и возникновение апоптотических участков в клетках сетчатки (Jassim et al., 2003). Гомо- и гемизиготы с мутацией *mei-9^{A1}* и *mei-9^{A2}* чувствительны к таким факторам среды, как метил-метансульфонат и γ -лучи (Gatti, 1979; Smith, 1976; Flores, Engels, 1999; Radford et al., 2007).

Показано, что у дрозофил с мутацией в генах *mus210* и *Mus209* сохраняется РАО и проявляется эффект радиационного гормезиса, но в меньшей степени, чем у особей линии дикого типа (рис. 4). Таким образом, у особей-гетерозигот с мутацией генов *mus210* и *Mus209* сохраняется функционирование систем репарации ДНК, но на более низком уровне, чем у особей линии дикого типа. Ген *mus210* является гомологом гена белка ХРС млекопитающих, который необходим для инициации эксцизионной репарации нуклеотидов (Henning et al., 1994). Известно, что мутанты *mus210^{G1}* чувствительны к метил-метансульфонату и УФ-свету, при этом скорость удаления УФ-индуцированных пиримидиновых димеров у них значительно ниже, чем у мух линии дикого типа (Luchkina et al., 1982). Гомозиготные личинки *mus210^{G1}* чувствительны к химическим соединениям, таким как анальгин, амидопирин и антипирин, по сравнению с гетерозиготами (Mikheev, Imianitov, 1990). Ген *Mus209* кодирует гомолог белка млекопитающих PCNA и

участвует в эксцизионной репарации оснований и нуклеотидов, а также в гомологичной рекомбинации (Henderson et al., 1994; Characterization of a..., 2006). Известно, что мутанты *Mus209^{B1}* чувствительны к перепадам температуры и к ДНК-повреждающим агентам, таким как ИИ и метил-метансульфонат (Henderson et al., 1994).

Таким образом, при исследовании роли генов эксцизионной репарации ДНК (гомологи *PCNA*, *XPC*, *XPF*) в радиоадаптивном ответе получили, что у особей мутации генов *mei-9* в гомо- геми- и гетерозиготах приводят к выключению способности проявлять эффект гормезиса и к отсутствию радиоадаптивного ответа (как и у особей с мутацией в гене *D-Gadd45*). У гетерозигот происходит меньшее снижение параметров ПЖ, чем у гомо- и гемизигот. У особей-гетерозигот с мутациями в генах *Mus209* и *mus210* РАО и эффект гормезиса сохранялись, но проявлялись в меньшей степени, чем у мух линии дикого типа *Canton-S*. Таким образом, гены эксцизионной репарации ДНК (*mei-9*, *mus210*, *Mus209*) участвуют в формировании радиоадаптивного ответа и эффекта радиационного гормезиса по ПЖ у *Drosophila melanogaster*.

Исследовали роль генов репарации двуцепочечных разрывов ДНК (гомологи *XRCC3*, *RAD54*, *BLM*) в радиоадаптивном ответе. У дрозофил-гетерозигот с мутацией в гене репарации двуцепочечных разрывов ДНК *Mus309* РАО отсутствовал (рис. 5). Однако у самцов данной линии сохранялся эффект гормезиса, но на меньшем уровне, чем у линии дикого типа *Canton-S*. Таким образом, ген *Mus309* участвует в формировании устойчивости к действию ИИ. Ген *Mus309* кодирует гомолог RecQ-геликазы синдрома Блума (*BLM*), которая осуществляет раскручивание двойной спирали ДНК (Weinert, Rio, 2007). Данный процесс необходим для различных видов репарации одно- и двунитевых разрывов ДНК. Известно, что личинки с мутацией *Mus309^{D2}/Mus309^{D3}* обладают повышенной чувствительностью к таким факторам, как метил-метансульфонат и γ -излучение (Beall, Rio, 1996; McVey et al., 2007). Они в 3 раза более чувствительны к рентгеновским лучам, чем мухи дикого типа (The *Drosophila melanogaster*..., 1999).

РАО сохранялся у самцов и самок линий с мутациями в генах *spn-B* и *okr*, но, проявлялся в меньшей степени по сравнению с особями линии дикого типа *Canton-S*. Ген *spn-B* является гомологом гена белка репарации двунитевых разрывов ДНК

XRCC3 млекопитающих, который отвечает за гомологичную рекомбинацию и негомологичное воссоединение концов ДНК (Lee, Orr-Weaver, 2003). Согласно данным литературы, мутанты *spn-B¹* малочувствительны к рентгеновскому облучению в период от 24 до 72 ч после откладки яиц. Небольшая разница в жизнеспособности потомства проявляется при облучении в период от 0 до 24 ч после откладки яиц (Staeva-Vieira et al., 2003). Личинки *spn-B¹/spn-B²* чувствительны к метил-метансульфонату (Ghabrial et al., 1998). Ген *okr* является ортологом гена *RAD54* млекопитающих. Продуктом данного гена является АТФ-зависимая ДНК-геликаза, которая участвует в гомологичной рекомбинации при репарации двухнитевых разрывов ДНК (The *Drosophila melanogaster*..., 1999). Мутанты *okr^{A19-10}/Df(2L)JS17* и *okr^{A19-10}/okr¹⁷⁻¹¹* характеризуются гиперчувствительностью к метил-метансульфонату и рентгеновскому облучению (The *Drosophila melanogaster*..., 1999).

Таким образом, при исследовании роли генов репарации двуцепочечных разрывов ДНК (*Mus309*, *spn-B*, *okr*) в ответе на ИИ получили, что у особей-гетерозигот с мутацией гена *Mus309* РАО и радиационный гормезис не сохранялись, за исключением самцов с мутацией *Mus309*, у которых наблюдали эффект гормезиса. Радиоадаптивный ответ сохранялся у особей-гетерозигот с мутациями в генах *spn-B* и *okr*, но в меньшей степени, чем у особей линии дикого типа *Canton-S*. Проявление эффекта радиационного гормезиса у данных линий не обнаружено.

Используя мух с мутациями (замена, инсерция) в генах ответа на повреждение ДНК (*D-Gadd45*), эксцизионной репарации ДНК (*mei-9*, *mus210*, *Mus209*), репарации двуцепочечных разрывов ДНК (*okr*, *spn-B*, *Mus309*), показали, что исследуемые гены необходимы для формирования радиоадаптивного ответа и эффекта радиационного гормезиса. Особи с мутациями в генах *mei-9*, *D-Gadd45* и *Mus309* не проявляли радиоадаптивный ответ и эффект радиационного гормезиса, за исключением самцов с мутацией в гене *Mus309*, у которых наблюдали эффект гормезиса (табл. 12). У особей с мутациями в генах *Mus209*, *mus210*, *spn-B* и *okr* радиоадаптивный ответ сохранялся, но проявлялись в меньшей степени, чем у особей линии дикого типа *Canton-S*.

Феномен радиационного гормезиса и радиоадаптивного ответа связан с активацией защитных систем клетки и организма в ответ на воздействия радиоактивного излучения в малой дозе. В результате организм становится подготовленным к последующему острому повреждающему воздействию. В пользу данного общепринятого объяснения говорят полученные нами результаты по возрастзависимому изменению экспрессии генов репарации ДНК. После хронического воздействия γ -излучения в дозе 40 сГр у особей линии дикого типа *Canton-S* наблюдали повышение экспрессии генов эксцизионной репарации оснований и нуклеотидов (гомологи *PCNA*, *XPC*, *XPF*), репарации двунитевых разрывов ДНК (гомологи *XRCC3*, *RAD54*, *BLM*) по сравнению с необлученными животными (рис. 8). Повышенные уровни экспрессии генов гомологов *XPF*, *PCNA* и *BLM* у самцов и самок, подвергавшихся воздействию γ -излучения, сохранялся до 56 сут жизни. Вероятно, увеличение активности этих генов способствует устойчивости организма к последующему воздействию спонтанных и индуцированных стресс-факторов, и обеспечивает долгосрочные эффекты хронического облучения в малой дозе, в частности, гормезис по ПЖ. Активность гена *D-Gadd45* на протяжении всей жизни не различалась между контрольными и облученными животными. Возможно, адекватный ответ на действие ИИ у *Drosophila melanogaster* обеспечивается поддержанием постоянного уровня экспрессии гена *D-Gadd45*.

Прямым подтверждением защитных свойств белков распознавания и репарации повреждений ДНК в адаптации к неблагоприятным условиям среды могли бы служить экспериментальные данные по увеличению длительности жизни в результате повышенной активности их генов. Однако на сегодняшний день имеется небольшое количество данных по влиянию сверхэкспрессии генов репарации ДНК на ПЖ организмов. Предположили, что избыточная экспрессия генов репарации ДНК приведет к повышению устойчивости к действию ИИ, прооксидантов, гипертермии и голоданию. Использовали линии дрозофил, в геном которых встроены дополнительные копии исследуемых генов под контролем промотора UAS, индуцируемого драйвером GAL4. Сверхактивацию генов проводили с использованием системы GAL4/UAS (Brand, Perrimon, 1993).

В первой серии экспериментов изучили роль кондиционной повсеместной

сверхэкспрессии генов, которые участвуют в распознавании повреждений ДНК (*D-Gadd45*, *Hus1*, *mnk*), генов эксцизионной репарации нуклеотидов (*mei-9*, *mus210*) и оснований (*Rrp1*), генов репарации двуцепочечных разрывов ДНК по типу гомологичной рекомбинации (*Brca2*, *spn-B*) и негомологичного воссоединения концов (*Ku80*, *WRNexo*) в ответ на острое воздействие γ -излучения в дозе 30 Гр. Эксперимент проводили по схеме, представленной на рис. 9.

Несвоевременное распознавание повреждения жизненно-необходимой информации, заключенной в молекуле ДНК, может привести к гибели клетки. Именно поэтому в процессе эволюции сформировались надежные механизмы сенсирования данных повреждений. Белки, участвующие в данном процессе распознают поврежденную ДНК, а также обеспечивают доступность данных участков для ферментов репарации. В наших экспериментах, кондиционная повсеместная сверхэкспрессия генов ответа на повреждение ДНК *D-Gadd45*, *Hus1* и *mnk* не повысила устойчивость дрозофил к острому облучению в дозе 30 Гр (рис. 10). Наблюдал снижение медианной ПЖ и возраста 90 %. Как уже было сказано выше, ген *D-Gadd45* является ортологом генов семейства *GADD45*, которые у млекопитающих участвует в ответе на повреждение ДНК и регуляции репарации ДНК. Белки *GADD45* контролируют активность белков эксцизионной репарации ДНК – PCNA, XPC, XPG, и обеспечивают доступность поврежденных участков ДНК для ферментов репарации. Ранее в нашей лаборатории было показано, что конститутивная сверхэкспрессия гена *D-Gadd45* в нервной системе приводит к увеличению средней ПЖ после хронического и острого γ -излучения по сравнению с родительскими линиями (Plyusnina et al., 2011; The role of D-GADD45..., 2012). Белок *Hus1* является составной частью комплекса 9-1-1 (Kadir et al., 2012), который играет центральную роль в сенсировании повреждений ДНК, индуцированных ответом на остановку клеточного цикла. Ури Абду и коллеги показали, что дрозофилы с мутацией в гене *Hus1* чувствительны к действию гидроксисурина и метил-метансульфоната, но не к рентгеновским лучам (An essential role..., 2007). Ген *mnk* является гомологом *chk2* киназы млекопитающих, которая участвует в распознавании повреждений ДНК, и остановке клеточного цикла в ответ на повреждение ДНК (Sekelsky et al., 2000). Лю Као и коллеги показали, что мыши *Mus musculus* с мутацией гена *chk2* проявляют признаки преждевременного

старения (ATM–Chk2–p53..., 2006). Облучение дозой 40 Гр личинок с мутацией *mnk*⁶⁰⁰⁶ не приводит к индукции апоптоза, в сравнении с линией дикого типа (*Drosophila melanogaster* MNK..., 2004; Klovstad et al., 2008). Также у данных мутантов обнаруживают снижение радиационной гибели клеток (Wichmann et al., 2006). Эмбрионы с мутацией *mnk*⁶⁰⁰⁶ устойчивы к ДНК-повреждающим агентам, таким как, блеомицин и камптотецин (Takada et al., 2003).

Важным свойством живых организмов является способность восстанавливать повреждения ДНК, которые можно разделить на пять категорий: прямая репарация, эксцизионная репарация оснований, эксцизионная репарация нуклеотидов, репарация двуцепочечных разрывов и репарация перекрестных сшивок (Molecular mechanisms of..., 2004). С помощью эксцизионной репарации оснований удаляется большинство однонитевых разрывов и повреждённых оснований. Обширные повреждения ДНК, появляющиеся в результате воздействия ИИ или химических агентов, а также все виды повреждённых оснований, распознаются и репарируются системой эксцизионной репарации нуклеотидов (Prise, 1993). В проведенных экспериментах, у особей с кондиционной повсеместной сверхэкспрессией генов эксцизионной репарации (гомологи *Rrp1*, *mei-9*, *mus210*), также как и у особей со сверхэкспрессией генов ответа на повреждение ДНК, повышения устойчивости к действию облучению в дозе 30 Гр по исследуемым параметрам ПЖ не наблюдали. Также обнаружили, что невозможно получить самцов с кондиционной повсеместной сверхэкспрессией гена *Rrp1*. На сегодняшний день мы не можем объяснить причину этого феномена. Ген *Rrp1* является ортологом гена эксцизионной репарации оснований млекопитающих *APE1*, а также обладает 3'-экзонуклеазной, 3'-фосфодиэстеразной и 3'-фосфатазной активностями (Sander, Huang, 1995; Sander, Benhaim, 1996; *Drosophila* DNA..., 2006), которые необходимы ферменту АП-энонуклеаза для выщепления остатка нуклеотида в АП-сайте. Известно, что сверхэкспрессия трансгенов *Rrp1* у дрозофил снижает уровень соматических мутации и частоту рекомбинаций, вызванных окислительным повреждением ДНК (Overexpression of a..., 1996). Ген *mei-9* является ортологом гена эксцизионной репарации ДНК млекопитающих *XPF*, который необходим для инициации эксцизионной репарации нуклеотидов. Умеренные мутации в гене *XPF* способствуют развитию заболевания

пигментная ксеродерма, при тяжелых мутациях наблюдаются типичные симптомы прогерии. Так, например, мышцы *Mus musculus* с мутацией в данном гене характеризуются повышенной гибелью клеток, сдвигом метаболизма в сторону анаболизма и снижением сигналинга от оси GH/IGF1 (гормон роста/инсулиноподобный фактор роста 1). При этом аналогичные изменения наблюдаются у мышей дикого типа в ответ на воздействие хронического генотоксического стресса, ограничения калорийности питания или с возрастом (A new progeroid..., 2006). Продукт гена *mus210* является ортологом белка эксцизионной репарации ДНК млекопитающих ХРС. В ответ на действие ИИ происходит активация данных белков, которые распознают повреждения, а также, участвуют в процессе его удаления (Long-term ХРС..., 2007; In vitro radiation..., 2007).

Наибольшую опасность для клетки представляют двухнитевые разрывы ДНК (Ohnishi et al., 2009; Kass, Jasin, 2010), которые возникают в результате воздействия внешних и внутренних факторов, например, в ответ на радиацию (Kass, Jasin, 2010). Как и для вышеперечисленных генов репарации ДНК, сверхэкспрессия генов репарации двуцепочечных разрывов ДНК (гомологи *Brc2*, *spn-B*, *Ku80*, *WRNexo*) не способствовала повышению устойчивости дрозофил к действию γ -излучения в острой дозе. Продукт гена *Brc2* участвует в распознавании и репарации двуцепочечных разрывов ДНК по типу гомологичной рекомбинации (Functional analysis of..., 2008; Klovstad et al., 2008; A network of..., 2009). У дрозофил с различными мутациями в данном гене обнаружено снижение скорости процессов однонитевого отжига, гомологичной рекомбинации и негомологичного воссоединения концов (Functional analysis of..., 2008; Klovstad et al., 2008). Известно, что дрозофилы с мутациями *Brc2*⁴⁷, *Brc2*^{56E} чувствительны к таким факторам среды, как ионизирующая радиация, топотекан (ингибитор топоизомеразы) и алкалоид камптотецин (ингибитор ДНК-топоизомеразы I) (Thomas et al., 2013), а личинки с мутациями *Brc2*^{56E} и *Brc2*^{KO}/*Brc2*^{56E} чувствительны к рентгеновским лучам и метил-метансульфонату. Ген *spn-B* у дрозофил кодирует гомологом белка млекопитающих XRCC3, который участвует в репарации двуцепочечных разрывов ДНК по типу гомологичной рекомбинации (Lee, Orr-Weaver, 2003). Известно, что дрозофилы с мутацией *spn-B*^{BU}

чувствительны к ИИ в дозе 25 Гр, после такого воздействия выживает только 19 % мух (An essential role..., 2007). Продукт гена *Ku80* участвует в репарации двуцепочечных разрывов ДНК по типу негомологичного воссоединения концов (Ku80: product..., 1994) Валерии Холокомб с коллегами показали, что делеция данного гена у *Mus musculus* сокращает длительность жизни до 40 % (Ku80 deletion..., 2008). Ген *WRNexo* несет гомолог 3'-5' экзонуклеазного домена гена репарации двуцепочечных разрывов млекопитающих *WRNexo* (DmWRNexo is..., 2009). Синдром преждевременного старения человека (синдром Вернера) обусловлен мутацией RecQ-WRN-геликазы, которая является уникальной и обладает 3'-5' экзонуклеазной активностью. Данный вид активности необходим для расчистки участка ДНК вокруг неспаренного основания и для его ресинтеза. Недостаточная продукция геликазы в клетках приводит к геномной нестабильности. Дрозофилы с мутацией *WRNexo*^{e04496} чувствительны к камптотецину. Кроме того, у мух с данной мутацией резко повышен уровень митотической рекомбинации ДНК (Saunders et al., 2008).

Таким образом, кондиционная повсеместная сверхэкспрессия как генов-сенсоров повреждения ДНК, так и генов, участвующих в репарации одно- и двухнитевых разрывов ДНК у *Drosophila melanogaster* не индуцировала устойчивость дрозофил к острому воздействию γ -излучения в дозе 30 Гр. При этом кондиционная повсеместная активация генов репарации ДНК приводила к снижению медианной ПЖ на 49 – 72 % и возраста 90 % смертности дрозофил на 23 – 68 %, относительно мух без сверхэкспрессии ($p < 0.05$).

Увеличение ПЖ, как правило, сопряжено с увеличением устойчивости живых организмов к различным видам стресса. Поскольку гены репарации ДНК вовлечены в механизмы ответа на действие экзогенных и эндогенных факторов, предположили, что их сверхэкспрессия приведет к повышению устойчивости особей *Drosophila melanogaster* к различным видам стресса. Для этого мух подвергали острому воздействию индуктора свободных радикалов параквата, гипертермии и голоданию.

Взаимодействие активных форм кислорода с нуклеиновыми кислотами приводит к образованию широкого спектра повреждений, включая модификации сахаров, разрывы цепей и аддукты оснований (Age-associated increase..., 1999).

Поэтому в стресс-ответе на действие прооксидантов ключевую функцию выполняют механизмы эксцизионной репарации оснований и нуклеотидов. В большинстве случаев сверхэкспрессия генов репарации ДНК не приводила к достоверным изменениям, либо снижала среднюю длительность жизни самцов и самок в условиях действия индуктора свободных радикалов параквата, по сравнению с особями без сверхэкспрессии. Исключением являются самцы со сверхэкспрессией генов *spn-B* и *mus210* и самки с повышенной активностью генов *D-Gadd45*, *Hus1* и *spn-B* – их медианная ПЖ в условиях данного фактора была выше (табл. 12). Основным типом повреждений при тепловом шоке являются повреждения белков, однако под его влиянием в результате увеличения темпов метаболизма и выработки свободных радикалов также происходит повреждение ДНК. Обнаружено, что повышенная транскрипция генов репарации ДНК для многих генов повысила устойчивость дрозофил к гипертермии. Так, у самцов со сверхэкспрессией генов *Brca2*, *Hus1* и *Rrp1*, а также самок со сверхэкспрессией *mnk* средняя ПЖ при 35 °С была выше, по сравнению с контрольными особями (табл. 12). С другой стороны, увеличение транскрипции таких генов репарации, как *Ku80*, *mei9*, *mus210* у самцов и *Ku80*, *Brca2*, *Rrp1* у самок сопровождалось снижением средней длительности жизни. Чрезмерное снижение потребления пищи помимо прочих негативных эффектов также вызывает окислительный стресс и дефекты репарации ДНК. Повышенная транскрипционная активность генов *Brca2*, *D-Gadd45*, *spn-B*, *WRNexo* у самцов привела к повышению средней длительности жизни в условиях голодания (табл. 12). Сверхэкспрессия генов репарации ДНК в остальных вариантах эксперимента с воздействием голодания не повлияла на медианную выживаемость, либо вызвала негативный эффект.

Таким образом, кондиционная повсеместная сверхэкспрессия генов *Brca2*, *D-Gadd45*, *Hus1*, *mnk*, *mus210*, *Ku80*, *Rrp1*, *spn-B* и *WRNexo* повышает устойчивость (повышение одного или нескольких параметров выживаемости) дрозофил к действию прооксидантов, гипертермии и голодания. Как было описано выше, белки, кодируемые этими генами необходимы для инициации и координации различных механизмов эксцизионной репарации ДНК и репарации двунитевых разрывов ДНК. По-видимому, эти процессы играют важную роль в обеспечении устойчивости дрозофил к данным факторам. В остальных вариантах экспериментов

наличие в геноме дрозофил дополнительных активных копий генов репарации ДНК либо не стимулировало стрессоустойчивость особей, либо ухудшало ее.

Таблица 12

Гены, которые повышали устойчивость дрозофил к изучаемым стресс-факторам

Процесс	Ген	ИИ	Действие прооксиданта	Гипертермия	Голодание
Ответ на повреждение ДНК	<i>Hus1</i>		✓	✓	✓
	<i>D-Gadd45</i>	✓	✓		✓
	<i>mnk</i>			✓	✓
	<i>Mus309</i>	✓			
Экцизионная репарация нуклеотидов	<i>mei-9</i>	✓			
	<i>mus210</i>		✓		
	<i>Mus209</i>				
Экцизионная репарация оснований	<i>Mus209</i>				
	<i>Rrp1</i>			✓	
Репарация мисматчей	<i>mei-9</i>	✓			
	<i>Mus209</i>				
Гомологичная рекомбинации	<i>Mus309</i>	✓			
	<i>BrcA2</i>			✓	✓
	<i>okr</i>				
	<i>spn-B</i>		✓		✓
Негомологичное воссоединение концов	<i>Ku80</i>				✓
	<i>WRNexo</i>			✓	✓

В целом, кондиционная повсеместная сверхэкспрессия генов репарации ДНК не индуцировала устойчивость особей *Drosophila melanogaster* к острому воздействию γ -излучения, а наоборот усиливала негативное влияние острого воздействия в дозе 30 Гр на ПЖ. В некоторых случаях наличие в геноме дрозофил дополнительных активных копий генов репарации ДНК не стимулировало стрессоустойчивость особей, а, напротив, ухудшало ее. Причиной отсутствия или слабой выраженности стимулирования стрессо- и радиоустойчивости может быть недостаточная эпигенетическая регуляция процесса репарации ДНК. Например, показано, что в фибробластах человека повышенная активность генов репарации ДНК замедляет клеточное старение только на фоне одновременной сверхэкспрессии гена деацетилазы гистонов SIRT6 (Sirtuin 6..., 2012). Другой причиной снижения ПЖ может быть нарушение баланса между различными внутриклеточными путями и энергетическое истощение, поскольку репарация ДНК – это процесс, требующий больших энергетических затрат (Effect of poly..., 2001).

Следовательно, сверхактивация изучаемых генов могла привести к чрезмерному расходу энергии в ущерб другим жизненно важным процессам. При этом наши данные согласуются с теорией Михаила Благодосклонного, согласно которой, старение организма и возраст-зависимые болезни начинаются с гиперфункций клетки (Blagosklonny, 2009).

Полученные данные свидетельствуют о том что, у особей *Drosophila melanogaster* с мутациями в исследуемых генах репарации ДНК радиоадаптивный ответ отсутствует, либо проявляется в меньшей степени, чем у особей линии дикого типа *Canton-S*. Исследуемые гены ответа на повреждение ДНК (*D-Gadd45*), эксцизионной репарации ДНК (*mei-9, mus210, Mus209*), репарации двуцепочечных разрывов ДНК (*okr, spn-B, Mus309*) необходимы для формирования радиоадаптивного ответа и эффекта радиационного гомезиса. Хроническое воздействие ионизирующего излучения в малой дозе на предимагинальных стадиях развития приводит к увеличению экспрессии большинства изученных генов репарации ДНК, которая сохраняется на протяжении всей жизни дрозофил. Показано, что кондиционная повсеместная сверхэкспрессия исследуемых генов репарации ДНК не индуцирует устойчивость к острому воздействию γ -излучения, а наоборот усиливает негативное влияние острого воздействия в дозе 30 Гр на ПЖ. Показано, что кондиционная повсеместная активация генов репарации ДНК приводит к достоверному снижению исследуемых параметров ПЖ, относительно мых без сверхэкспрессии. Кондиционная повсеместная сверхэкспрессия генов *Brc2, D-Gadd45, Hus1, mnk, spn-B* и *WRNexo* повышает устойчивость дрозофил к исследуемым стресс-факторам. В остальных вариантах экспериментов наличие в геноме дрозофил дополнительных активных копий генов репарации ДНК либо не стимулирует стрессоустойчивость особей, либо ухудшает ее.

ВЫВОДЫ

1) Хроническое воздействие γ -излучения в малых дозах (40 сГр) на предимагинальных стадиях развития индуцировало эффект радиационного гормезиса и радиоадаптивный ответ на острое (30 Гр) воздействие излучения у особей линии дикого типа *Canton-S*. Особи с мутациями в генах, которые участвуют в распознавании повреждений ДНК (*D-Gadd45*), эксцизионной репарации нуклеотидов (*mei-9*) и репарации по типу гомологичной рекомбинации (*Mus309*) радиоадаптивный ответ и эффект радиационного гормезиса не проявляли, за исключением самцов с мутацией в гене *Mus309*, у которых наблюдали эффект гормезиса. У особей с мутациями в остальных генах радиоадаптивный ответ и эффект радиационного гормезиса сохранялся, но проявлялся в меньшей степени, чем у особей линии дикого типа *Canton-S*.

2) Хроническое воздействие ионизирующего излучения в малой дозе (40 сГр) на предимагинальных стадиях развития особей линии дикого типа *Canton-S* привело к увеличению экспрессии генов эксцизионной репарации ДНК (*mei-9*, *mus210*, *Mus209*) и репарации двуцепочечных разрывов (*Mus309*, *spn-B*, *okr*) у имаго, которая сохранялась до конца жизни дрозофил. Экспрессия гена *D-Gadd45* между облученными и необлученными особями с возрастом не изменялась.

3) У трансгенных линий дрозофил, кондиционно-индуцированная повсеместная сверхэкспрессия генов эксцизионной репарации (*mei-9*, *mus210*, *Rrp1*), репарации двуцепочечных разрывов (*Brca2*, *spn-B*, *Ku80*, *WRNexo*) и генов распознавания повреждений (*D-Gadd45*, *Hus1*, *mnk*) снижала устойчивость дрозофил к гамма-излучению в дозе 30 Гр по параметрам продолжительности жизни, относительно облученных особей без сверхэкспрессии.

4) Кондиционная повсеместная сверхэкспрессия генов, которые участвуют в распознавании повреждений ДНК (*D-Gadd45*, *Hus1*, *mnk*), генов эксцизионной репарации нуклеотидов (*mus210*) и оснований (*Rrp1*), генов репарации двуцепочечных разрывов ДНК по типу гомологичной рекомбинации (*Brca2*, *spn-B*) и негомологичного воссоединения концов (*Ku80*, *WRNexo*) повышает устойчивость дрозофил к исследуемым стресс-факторам. В остальных вариантах экспериментов наличие в геноме дрозофил дополнительных активных копий генов репарации ДНК либо не стимулировало стрессоустойчивость особей, либо ухудшало ее.

Приложение

СПИСОК ТЕРМИНОВ, ИСПОЛЬЗОВАННЫХ В РАБОТЕ И ИХ ОПРЕДЕЛЕНИЙ

ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ – длительность существования особи или клона, являющаяся результатом взаимодействия группы фенотипических и генотипических факторов

СТАРЕНИЕ – это разрушительный процесс, который развивается из-за накапливающегося с возрастом повреждения организма внешними и внутренними факторами.

РЕПАРАЦИЯ – функция клетки, заключающаяся в способности исправлять химические повреждения в молекулах ДНК, то есть препятствовать появлению мутаций

ЭКСЦИЗИОННАЯ РЕПАРАЦИЯ ОСНОВАНИЙ – разновидность репарации ДНК, при которой происходит восстановление поврежденного основания

ЭКСЦИЗИОННАЯ РЕПАРАЦИЯ НУКЛЕОТИДОВ – разновидность репарации ДНК, при которой происходит восстановление поврежденного нуклеотида

РЕПАРАЦИЯ МИСМАТЧЕЙ – восстановление неправильно спаренных оснований

ГОМОЛОГИЧНАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ – разновидность репарации двунитевых разрывов ДНК, при которой происходит восстановление повреждения по матрице сестринской хроматиды

НЕГОМОЛОГИЧНОЕ ВОССОЕДИНЕНИЕ КОНЦОВ – разновидность репарации двунитевых разрывов ДНК, при которой процесс восстановления идет за счет воссоединения концов ДНК, которые имеют негомологичные последовательности

КОНДИЦИОННАЯ ПОВСЕМЕСТНАЯ СВЕРХЭКСПРЕССИЯ – разновидность сверхэкспрессии, которая заключается в неспецифической продукции исследуемого гена при определенных условиях

СВЕРХЭКСПРЕССИЯ – значительное превышение уровня продукции определенного гена

ГЕНЫ ДОМАШНЕГО ХОЗЯЙСТВА – гены, необходимые для поддержания важнейших жизненных функций организма, которые экспрессируются практически во всех тканях и клетках на относительно постоянном уровне. Функционируют повсеместно, на всех стадиях жизненного цикла организма.

РАДИОАДАПТИВНЫЙ ОТВЕТ – повышение устойчивости организма к повреждающему действию излучений в больших дозах после предварительного низкоинтенсивного облучения

ЭФФЕКТ РАДИАЦИОННОГО ГОРМЕЗИСА – стимулирующий эффект воздействия излучений в малых дозах на организм

ФУНКЦИЯ ДОЖИТИЯ – доля выживших мух во времени

ДРАЙВЕРНАЯ ЛИНИЯ – линия, запускающая экспрессию гена

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Анисимов, В. Н. Мелатонин – роль в организме, применение в клинике [Текст] / В. Н. Анисимов. – СПб: Изд-во Система, 2007. – 40 с.

Анисимов, В. Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения [Текст]: В 2 т. / В. Н. Анисимов. – СПб.: Наука, 2008. – Т.2. – 434 с.

Анисимов, В. Н. Современные представления о природе старения [Текст] / В. Н. Анисимов. – СПб.: Наука, 2000. – 208 с.

Баранов, В. С. Генетические аспекты старения [Текст] / В. С. Баранов, Е. В. Баранова // Успехи геронтологии. – 2007. – Т. 20. – №2. – С. 26–34.

Биологическая роль свободных радикалов в развитии патологических состояний [Текст] / А. О. Сырвая, Ф. С. Леонтьева, И. В. Новикова, С. В. Иванникова // Международный медицинский журнал. – 2012. – №3. – С. 98–104.

Большой энциклопедический словарь [Текст]. – М.: Большая российская энциклопедия, 1995. – 864 с.

Бондарчук, И. А. Анализ роли репарации ДНК, регуляции клеточного цикла и апоптоза в радиационно–индуцированном адаптивном ответе клеток млекопитающих [Текст] / И. А. Бондарчук // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2003. – Т. 43. – №1. – С. 19–28.

Ванюшин, Б. Ф. Молекулярно–генетические механизмы старения [Текст] / Б. Ф. Ванюшин, Г. Д. Бердышев. – М.: Медицина, 1977. – 296 с.

Васильев, А. Г. Эпигенетическая изменчивость: неметрические пороговые признаки, фены и их композиции [Текст] / А. Г. Васильев. – Фенетика-природных популяций. М.: Наука, 1988. – С.158–169.

Васильев, А. Г. Эпигенетические основы фенетики: на пути к популяционной мерономии [Текст] / А. Г. Васильев. – Екатеринбург: Академкнига, 2005. – 640 с.

Велегжанинов, И. О. Сравнение адаптивного ответа спленоцитов мышей линии СВА и нейробластов личинок *Drosophila melanogaster*, развивавшихся в условиях воздействия хронического низкоинтенсивного γ -излучения [Текст] / И. О. Велегжанинов, В. Н. Мезенцева, А. А. Москалёв // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2009. – Т. 49. – №6. – С. 665–670.

- Владимиров, Ю. А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах [Текст] / Ю. А. Владимиров, А. И. Арчаков. – М.: Наука, 1972. – 252 с.
- Воейков, В. Л. Био–физико–химические аспекты старения и долголетия [Текст] / В. Л. Воейков // Успехи геронтологии. – 2002. – Т. 9. – №3. – С. 54–66.
- Гаврилов, Л. А. Биология продолжительности жизни [Текст] / Л. А. Гаврилов, Н. С. Гаврилова. – М.: Наука, 1991. – 280 с.
- Дильман, В. М. Большие биологические часы. Введение в интегральную медицину [Текст] / В.М Дильман. – М.: Знание, 1986. – 256 с.
- Дильман, В. М. Четыре модели медицины [Текст] / В. М. Дильман. – М.: Медицина, 1982. – 288 с.
- Зайнуллин, В. Г. Генетические эффекты хронического облучения в малых дозах ионизирующего облучения [Текст] / В.Г. Зайнуллин. – СПб.: Изд-во Наука, 1998. – 100 с.
- Канунго, М. С. Биохимия старения [Текст] / М. С. Канунго. – М.: Медицина, 1982. – 296 с.
- Кольтовер, В. К. Свободнорадикальная теория старения: современное состояние и перспективы [Текст] / В. К. Кольтовер // Успехи геронтологии. – 1998. – Вып. 2. – С. 37–42.
- Красная книга РФ. Животные [Текст]. – М.: Изд-во АСТ, 2002. – 864 с.
- Маянский, А. Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге [Текст] / А. Н. Маянский, Д. Н. Маянский. – Новосибирск: Изд-во Наука, 1983. – 340 с.
- Мечников, И. И. Этюды оптимизма [Текст] / И. И. Мечников. – М.: Изд-во Наука, 1988. – 328 с.
- Молекулярные и клеточные аспекты радиационного гормезиса у *Drosophila melanogaster* [Текст] / А. М. Вайсерман, А. Я. Литошенко, Т. Ю. Квитницкая–Рыжова и др. // Цитология и генетика. – 2003. – Т. 37. – №3. – С. 41–48.
- Москалев, А. А. Радиационно-индуцированное изменение продолжительности жизни *Drosophila melanogaster* [Текст] / А. А. Москалев, А. С. Яцкив // Проблемы геронтологии и гериатрии: матер. 2-й респ. науч.-практ. конф. с междунар. участием. – Сыктывкар, 2004. – С. 81.

Москалев, А. А. Генетические исследования влияния ионизирующей радиации в малых дозах на продолжительность жизни [Текст] / А. А. Москалев // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2008а. – Т. 48. – №2. – Р. 139–145.

Москалев, А. А. Старение и гены [Текст] / А. А. Москалев. – СПб.: Наука, 2008б. – 359 с.

Москалев, А. А. Генетические механизмы воздействия ионизирующих излучений в малых дозах [Текст] / А. А. Москалев, М. В. Шапошников – СПб.: Изд-во Наука, 2009. – 137 с.

Москалев, А. А. Эволюционные представления о природе старения [Текст] / А. А. Москалев // Успехи геронтологии. – 2010. – Т. 23. – №1. – С. 9-20.

Мыльников, С. В. Генетическая детерминация скорости старения в некоторых линиях *Drosophila melanogaster* [Текст] / С. В. Мыльников // Успехи геронтол. – 1997. – Вып. 3. – С. 50-56.

Новосельцев, В. Н. Математическое моделирование в геронтологии – стратегические перспективы [Текст] / В. Н. Новосельцев, Ж. А. Новосельцева, А. И. Яшин // Успехи геронтологии. – 2003. – Т. 12. – №6. – С. 80-87.

Оловников, А. М. Принцип маргинотомии в матричном синтезе полинуклеотидов [Текст] / А. М. Оловников // Докл. АН. – 1971. – Т. 201. – №6. – С. 1496–1499.

Осипов А. Н., Сыпин В. Д. Влияние ионов тяжелых металлов на ДНК-белковые сшивки в клетках головного мозга облученных мышей // II Съезд биофизиков России: Тез. докл. Москва. – 1999. – Т. 3. – С. 827.

Радиационная экология. Электронный учебник [Электронный ресурс]. URL: <http://nuclphys.sinp.msu.ru/> (дата обращения: 23.08.2014).

Радиационно-индуцированный адаптивный ответ у детей и эффект внешних и внутренних факторов [Текст] / И. И. Пелевина, Г. Г. Афанасьев, А. В. Алещенко. и др. // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1999. – Т. 39. – Вып. 1. – С. 106–112.

Радиочувствительность. Радиационное поражение человека. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.medical911.ru/?p=2207> (дата обращения: 23.08.2014).

Ракин, А. О. Хроническое действие тяжелых естественных радионуклидов и металлов на генетическую структуру популяции *Drosophila melanogaster*: автореф. дис. канд. биол. наук. – Минск: Ин-т генетики и цитологии, 1990. – 16 с.

Развитие в условиях старения населения мира. Обзор мирового экономического и социального положения – 2007 год [Текст]. – Нью-Йорк: Организация Объединенных Наций, 2008. –265 с.

Сафарова, Г. Л. Демография старения: современное состояние и приоритетные направления исследований [Текст] / Г. Л. Сафарова // Успехи геронтологии. – 2009. – Т. 22. – №1. – С.49–59.

Скулачев, В. П. Явления запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: роль активных форм кислорода [Текст] / В. П. Скулачев // Соровский образовательный журнал. – 2001. – Т. 7. – №6. – С. 4–10.

Современные аспекты радиобиологии *Drosophila melanogaster* [Текст] / В. Г. Зайнуллин, А. А. Москалев, М. В. Шапошников, А. И. Таскаев. – Екатеринбург: УрО РАН. – 2001. – 104 с.

Сойфер, В. Н. Репарация генетических повреждений [Текст] / В. Н. Сойфер // Соросовский образовательный журнал, 1997. – №8. – С. 4–13.

Спитковский, Д. М. Концепция действия низких доз ионизирующей радиации на клетки и ее возможное использование для интерпретации медико-биологических последствий аварий на ЧАЭС [Текст] / Д. М. Спитковский // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1992. – Т. 32. – Вып 3. – С. 382–400.

Турышева, Е. В. Адаптивный ответ на продолжительность жизни у линий *Drosophila melanogaster* с мутациями генов фактора теплового шока и белков теплового шока [Текст] / Е. В. Турышева, М. В. Шапошников, А. А. Москалев // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2008. – Т. 48. – №5. – С.580–587.

Фролькис, В. В. Старение и увеличение продолжительности жизни [Текст] / В. В. Фролькис. – Л.: Наука, 1988. – 239 с.

Хаснулин, В. И. Экологически обусловленный стресс и старение человека на севере [Текст] / В. И. Хаснулин, И. И. Чечеткина, П. В. Хаснулин, А. К. Собакин // Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Актуальные аспекты жизнедеятельности человека на Севере»: матер. конф. – Архангельск. – 2006. – С. 329–330.

Хаустова, Н. Д. Продолжительность жизни мутантов CN и VG *Drosophila melanogaster* в зависимости от условий среды и генотипа особей [Текст] / Н. Д.

Хаустова, С. В. Белоконь, В. Н. Тоцкий // VII Международный симпозиум «Биологические механизмы старения»: матер. конф. – Харьков. – 2006. – С. 68.

Шапошников, М. В. Радиационно-индуцированный гормезис, гиперчувствительность и адаптивный ответ у радиочувствительных линий *Drosophila melanogaster* [Текст] / М. В. Шапошников, Е. В. Турышева, А. А. Москалев // Радиационная биология. Радиационная экология. 2009. – Т. 49. – №7. – С. 46–54.

Шапошников, М. В. Роль транскрипционного фактора FOXO в радиоадаптивном ответе при хроническом облучении и гормезисе у *Drosophila melanogaster* [Текст] / М. В. Шапошников, А. А. Москалев // Радиационная биология. Радиационная экология. – 2010. – Т. 50. – №3. – С. 312–317.

Шапошников, М. Радиобиологический ответ на уровне целого организма у *Drosophila melanogaster* [Текст] / М. Шапошников, А. Москалев // Вестник Института биологии Коми НЦ УрО РАН. – 2009. – №12 (145). – С. 6–11.

Шосталь, О. А. Влияние различных условий освещения на продолжительность жизни *Drosophila melanogaster* с мутациями в генах супероксиддисмутазы [Текст] / О. А. Шосталь, А. А. Москалев // Вестник Новосибирского государственного педагогического университета. – 2013. – №5. – С.136.

Эммануэль, Н. М. Некоторые молекулярные механизмы и перспективы профилактики старения [Текст] / Н. М. Эммануэль // Изв. АН СССР. Сер. биол. – 1975. – №4. – С. 785–794.

Юраниева, И. Н. Динамика генотипической изменчивости экспериментальных популяций *Drosophila melanogaster* в условиях хронического облучения: автореф. дис. канд. биол. наук. – Сыктывкар: Коми науч. центр УрО РАН, 2002. – 22 с.

Юшкова, Е. А. Влияние хронического облучения в малых дозах на динамику изменчивости экспериментальных популяций *Drosophila melanogaster*, отличающихся по содержанию мобильных Р-элементов: автореф. дис. канд. биол. наук. – Москва: Моск. гос. ун-т им. М.В. Ломоносова, 2008. – 22 с.

Ярмоненко, С. П. Радиобиология человека и животных [Текст]: учебное пособие / С. П. Ярмоненко. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Высшая школа, 1988. – 424 с.

A conditional tissue-specific transgene expression system using inducible GAL4 [Текст] / T. Osterwalder, K. S. Yoon, B. H. White, H. Keshishian // PNAS. – 2001. – Vol. 98. – №22. – P. 12596–12601.

A mouse model of accelerated liver aging caused by a defect in DNA repair [Текст] / S. Q. Gregg, V. Gutiérrez, A. R. Robinson et al. // Hepatology. – 2012. – Vol. 55. – №2. – P. 609–621.

A multistep damage recognition mechanism for global genomic nucleotide excision repair [Текст] / K. Sugasawa, T. Okamoto, Y. Shimizu et al. // Genes Dev. – 2001. – Vol. 15. – №5. – P. 507–521.

A network of conserved damage survival pathways revealed by a genomic RNAi screen [Текст] / D. Ravi, A. M. Wiles, S. Bhavani et al. // PLoS Genet. – 2009. – Vol. 5. – I. 6. – P. e1000527.

A new progeroid syndrome reveals that genotoxic stress suppresses the somatotroph axis [Текст] / L. J. Niedernhofer, G. A. Garinis, A. Raams et al. // Nature. – 2006. – Vol. 444. – №7122. – P. 1038–1043.

A role for reactive oxygen species in the resolution of persistent genomic instability after exposure to radiation [Текст] / E. Werner, R. Kandimalla, H. Wang, P. W. Doetsch // J. Radiat. Res. – 2014. – Vol. 55. – Suppl 1. – P. i14.

Absence of relationship between the level of electron transport chain activities and aging in human skeletal muscle [Текст] / A. Barrientos, J. Casademont, A. Rötig et al. // Biochem Biophys Res Commun. – 1996. – Vol. 229. – №2. – P. 536–539.

Accelerated aging phenotype in mice with conditional deficiency for mitochondrial superoxide dismutase in the connective tissue [Текст] / N. Treiber, P. Maity, K. Singh et al. // Aging Cell. – 2011. – Vol. 10. – №2. – P. 239–254.

Accelerated telomere shortening in response to life stress [Текст] / E. S. Epel, E. H. Blackburn, J. Lin et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. – Vol. 101. – №49. – P. 17312–17315.

Action of X-rays on mammalian cells. II. Survival curves of cells from normal human tissues [Текст] / T. T. Puck, D. Morkovin, P. I. Marcus, S. J. Cieciura // J. Exp. Med. – 1957. – Vol. 106. – №4. – P. 485–500.

Agarwal, S. Relationship between susceptibility to protein oxidation, aging, and maximum life span potential of different species [Текст] / S. Agarwal, R. S. Sohal // Exp Gerontol. – 1996. – Vol. 31. – №3. – P. 365–372.

Age-associated increase in 8-oxo-deoxyguanosine glycosylase/AP lyase activity in rat mitochondria [Текст] / N. C. Souza-Pinto, D. L. Croteau, E. K. Hudson et al. // Nucl. Acids Res. – 1999. – Vol. 27– N 8. – P. 1935–1942.

Age-dependent deficiency in import of mitochondrial DNA glycosylases required for repair of oxidatively damaged bases [Текст] / B. Szczesny, T. K. Hazra, J. Papaconstantinou et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2003. – Vol. 100. – P. 10670–10675.

Age-related loss of the DNA repair response following exposure to oxidative stress [Текст] / D. C. Cabelof, J. J. Raffoul, Y. Ge et al. // J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. – 2006. – Vol. 61. – P. 427–434.

Aging and environmental exposures alter tissuespecific DNA methylation dependent upon CpG island context [Текст] / B. C. Christensen, E. A. Houseman, C. J. Marsit et al. // PLoS Genet. – 2009. – Vol. 5. – P. e1000602.

An essential role for *Drosophila* hus1 in somatic and meiotic DNA damage responses [Текст] / U. Abdu, M. Klovstad, V. Butin-Israeli et al. // J. Cell Sci. – 2007. – Vol. 15. – №120. – Pt 6. – P. 1042–1049.

Analysis of telomere lengths in human corneal endothelial cells from donors of different ages [Текст] / C. A. Egan, I. Savre-Train, J. W. Shay et al. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 1998. – Vol. 39. – №3. – P. 648–653.

Andziak, B. Disparate patterns of age-related changes in lipid peroxidation in long-lived naked mole-rats and shorter-lived mice [Текст] / B. Andziak, R. Buffenstein // Aging Cell. – 2006. – Vol. 5. – №6. – P. 525–532.

Ashburner, M. *Drosophila*: A laboratory manual [Текст] / M. Ashburner. – N.Y.: Cold Spring Harbor, 1989. – 434 p.

Association of insulin-like growth factor-I with body composition, weight history, and past health behaviors in the very old: the Framingham Heart Study [Текст] / T. B. Harris, D. Kiel, R. Roubenoff et al. // J. Am Geriatr. Soc. – 1997. – Vol. 45. – №2. – P. 133–139.

Atamna, H. A method for detecting abasic sites in living cells: age-dependent changes in base excision repair [Текст] / H. Atamna, I. Cheung, B. N. Ames // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – Vol. 97. – P. 686–691.

ATM–Chk2–p53 activation prevents tumorigenesis at an expense of organ homeostasis upon Brca1 deficiency [Текст] / L. Cao, S. Kim, C. Xiao et al. // EMBO J. – 2006. – Vol. 25. – №10. – P. 2167–2177.

Ayala, A. Preferential use of less toxic detoxification pathways by long-lived species [Текст] / A. Ayala, R. G. Cutler // Arch. Gerontol. Geriatr. – 1997. – Vol. 24. – P. 87–102.

Balaban, R. S. Mitochondria, oxidants, and aging [Текст] / R. S. Balaban, S. Nemoto, T. Finkel // Cell. – 2005. – Vol. 120. – №4. – P. 483–495.

Bartke, A. How diet interacts with longevity genes [Текст] / A. Bartke, M. Bonkowski, M. Masternak // Hormones. – 2008. – Vol. 7. – №1. – P. 17–23.

Basal synthesis of heat shock protein 70 increases with age in rat kidneys [Текст] / M. Maiello, D. Boeri, L. Sampietro et al. // Gerontology. – 1998. – Vol. 44. – P. 15–20.

Bcl-2 undergoes phosphorylation by c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase in the presence of the constitutively active GTP-binding protein rac1 [Текст] / K. Maundrell, B. Antonsson, E. Magrenat et al. // J. Biol. Chem. – 1997. – Vol. 272. – P. 25238–25242.

Beall, E. L. *Drosophila* IRBP/Ku p70 corresponds to the mutagen-sensitive *mus309* gene and is involved in P-element excision in vivo [Текст] / E. L. Beall, D. C. Rio // Genes Dev. – 1996. – Vol. 10. – №8. – P. 921–933.

Berridge, M. J. Cell Stress, Inflammatory Responses and Cell Death [Текст] / M. J. Berridge // Cell Signalling Biology. – 2012. – Module 11. – C. 29.

Bhattacharjee, S. The language of reactive oxygen species signaling in plants [Текст] / S. Bhattacharjee // Journal of Botany. – 2012. – Vol. 2012. – P. 1–22.

Bhuyan, D. K. Crosslinking of aminophospholipids in cellular membranes of lens by oxidative stress in vitro [Текст] / D. K. Bhuyan, R. W. Master, K. C. Bhuyan // Biochim. Biophys. Acta. – 1996. – Vol. 1285. – №1. – P. 21–28.

Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation [Текст] / R. T. Dean, S. Fu, R. Stocker, M. J. Davies // Biochem. J. – 1997. – Vol. 324. – P. 1–18.

Birkenhäger–Gillesse, E. G. Dehy droepiandrosterone sulphate (DHEAS) in the oldest old, aged 85 and over [Текст] / E.G. Birkenhäger–Gillesse, J. Derksen, A. M. Lagaay // *Ann NY Acad. Sci.* – 1994. – Vol. 31. – №719. – P. 543–552.

Bishop, N. A. Neural mechanisms of ageing and cognitive decline [Текст] / N. A. Bishop, T. Lu, B. A. Yankner // *Nature.* – 2010. – Vol. 464. – №7288. – P. 529–535.

Bitterman, K. J. Longevity regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: linking metabolism, genome stability and heterochromatin [Текст] / K. J. Bitterman, O. Medvedik, D. A. Sinclair // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2003. – Vol. 67. – №3. – P. 376–399.

Bjelland, S. Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation [Текст] / S. Bjelland, E. Seeberg // *Mutat. Res.* – 2003. – Vol. 531. – №1–2. – P. 37–80.

Blagosklonny, M. V. Aging-suppressants: cellular senescence (hyperactivation) and its pharmacologic deceleration [Текст] / M. V. Blagosklonny // *Cell Cycle.* – 2009 – Vol. 8. – №12. – P. 1883–1887.

Blass, J. P. Brain metabolism and brain disease: is metabolic deficiency the proximate cause of Alzheimer dementia [Текст] / J. P. Blass // *J. Neurosci. Res.* – 2001. – Vol. 66. – P. 851–856.

Bodkin, N. Mortality and morbidity in laboratory–maintained Rhesus monkeys and effects of long–term dietary restriction [Текст] / N. Bodkin, T. Alexander, H. Ortmeyer et al. // *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* – 2003. – Vol. 58. – P. 212–219.

Bonner, W. M. Phenomena leading to cell survival values which deviate from linear–quadratic models [Текст] / W. M. Bonner // *Mutat. Res.* – 2004. – Vol. 568. – №1. – P. 33–39.

Bordone, L. Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity [Текст] / L. Bordone, L. Guarente // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2005. – Vol. 6. – №4. – P. 298–305.

Bossy-Wetzell, E. Induction of apoptosis by the transcription factor c-Jun [Текст] / E. Bossy-Wetzell, L. Bakiri, M. Yaniv // *EMBO J.* – 1997. – Vol. 16. – P. 1695–1709.

Bower, J. J. As(III) transcriptionally activates the gadd45a gene via the formation of H₂O₂ [Текст] / J. J. Bower, S. S. Leonard, F. Chen, X. Shi // *Free. Radic. Biol. Med.* – 2006. – Vol. 41. – №2. – P. 285–294.

Boyle, J. Heterogeneity of dimmer excision in young and senescent human dermal fibroblasts [Текст] / J. Boyle, I. R. Kill., C. N. Parris // *Aging Cell*. – 2005. – Vol. 4. – P. 247–255.

BP extends lifespan upon dietary restriction by enhancing mitochondrial activity in *Drosophila* [Текст] / B. M. Zid, A. N. Rogers, S. D. Katewa et al. // *Cell*. – 2009. – Vol. 139. – №1. – P. 149–160.

Brand, A. H. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes [Текст] / A. H. Brand, N. Perrimon // *Development*. – 1993. – Vol. 118. – №2. – P. 401–415.

BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage [Текст] / R. I. Yarden, S. Pardo-Reoyo, M. Sgagias et al. // *Nat. Genet.* – 2002. – Vol. 30. – №3. – P. 285–289.

Brennan, L. A. Mitochondrial function and redox control in the aging eye: Role of MsrA and other repair systems in cataract and macular degenerations [Текст] / L. A. Brennan, M. Kantorow // *Exp. Eye Res.* – 2009. – Vol. 88. – №2. – P. 195–203.

Breslow, N. A generalized Kruskal–Wallis test for comparing K samples subject to unequal patterns of censorship [Текст] / N. Breslow // *Biometrika*. – 1970. – Vol. 57. – P. 579–594.

Britt, A. B. Molecular Genetics. of DNA repair in higher plants [Текст] / A. B. Britt // *Trends Plant Sci.* – 1999. – Vol. 4. – №1. – P. 20–25.

Buffenstein, R. Negligible senescence in the longest living rodent, the naked mole–rat: insights from a successfully aging species [Текст] / R. Buffenstein // *J Comp Physiol B*. – 2008. – Vol. 178. – №4. – P. 439–445.

Bulavin, D. V. Loss of oncogenic H–ras–induced cell cycle arrest and p38 mitogen–activated protein kinase activation by disruption of Gadd45 α [Текст] / D. V. Bulavin, O. Kovalsky, M. C. Hollander, A. J. Jr. Fornace // *Mol. Cell Biol.* – 2003. – Vol. 23. – №11. – P. 3859–3871.

Burchfield, S. R. The stress response: a new perspective [Текст] / S. R. Burchfield // *Psychosom. Med.* – 1979. – Vol. 41. – №8. – P. 661–672.

Cadet, J. Oxidatively generated damage to the guanine moiety of DNA: mechanistic aspects and formation in cells [Текст] / J. Cadet, T. Douki, J. L. Ravanat // *Acc. Chem. Res.* – 2008. – Vol. 41. – №8. – P. 1075–1083.

Calabrese, E. J. Hormesis: a highly generalizable and reproducible phenomenon with important implications for risk assessment [Текст] / E. J. Calabrese, L. A. Baldwin, C. D. Holland // *Risk Anal.* – 1999. – Vol 19. – №2. – P. 261–281.

Calnan, D. R. The FoxO code [Текст] / D. R. Calnan, A. Brunet // *Oncogene.* – 2008 – Vol. 27 – №16 – P. 2276–2288.

Caloric restriction and human longevity: what can we learn from the Okinawans? [Текст] / D. C. Willcox, B. J. Willcox, H. Todoriki et al. // *Biogerontology.* – 2006. – Vol. 7. – P. 173–177.

Campisi, J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors [Текст] / J. Campisi // *Cell.* – 2005. – Vol. 120. – P. 513–522.

Carrano, A. C. A conserved ubiquitination pathway determines longevity in response to diet restriction [Текст] / A. C. Carrano, Z. Liu, A. Dillin, T. Hunter // *Nature.* – 2009. – Vol. 460 . – P. 396–399.

Cause of death and neoplasia in mice continuously exposed to very low dose rates of gamma rays [Текст] / I. B. Tanaka 3d, S. Tanaka, K. Ichinohe et al. // *Radiat. Res.* – 2007. – Vol. 167. – P. 417–437.

Cell aging in relation to stress arousal and cardiovascular disease risk factors [Текст] / E. S. Epel, J. Lin, F. H. Wilhelm et al. // *Psychoneuroendocrinology.* – 2006. – Vol. 31. – №3. – P. 277–287.

Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death [Текст] / S. Fulda, A. M. Gorman, O. Hori, A. Samali // *Int. J. Cell. Biol.* – 2010 – Vol. 2010. – Article ID 214074. – 23 p.

Ceramide activates the stress-activated protein kinases [Текст] / J. K. Westwick, A. E. Bielawska, G. Dbaibo et al. // *J. Biol. Chem.* – 1995. – Vol. 270. – P. 22689–22692.

Chai, W. Human telomeres maintain their overhang length at senescence [Текст] / W. Chai, J. W. Shay, W. E. Wright // *Mol. Cell Biol.* – 2005. – Vol. 25. – №6. – P. 2158–2168.

Characterization of a second proliferating cell nuclear antigen (PCNA2) from *Drosophila melanogaster* [Текст] / T. Ruike, R. Takeuchi, K. Takata et al. // *FEBS J.* – 2006. – Vol. 273. – №22. – P. 5062–5073.

Characterization of the *Drosophila* Gene-Switch system in aging studies: A cautionary tale [Текст] / L. Poirier, A. Shane, J. Zheng et al. // *Aging Cell*. – 2008. – Vol. 7. – P. 758–770.

Chk1 mediates S and G2 arrests through Cdc25A degradation in response to DNA-damaging agents [Текст] / Z. Xiao, Z. Chen, A. H. Gunasekera et al. // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278. – P. 21767–21773.

Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A [Текст] / C. S. Sorensen, R. G. Syljuasen, J. Falck et al. // *Cancer Cell*. – 2003. – Vol. 3. – P. 247–258.

Chodosh, L. A. UV crosslinking of proteins to nucleic acids [Текст] / L. A. Chodosh // *Curr. Protoc. Mol. Biol.* – 2001. – Chapter 12. – Unit 12.5. – P. 8.

Cloning and characterization of LAG1, a longevity-assurance gene in yeast [Текст] / N. P. D'mello, A. M. Childress, D. S. Franklin et al. // *J. Biol. Chem.* – 1994. – Vol. 269. – №22. – P. 15451–15459.

Common non-hormone binding component in non-transformed chick oviduct receptors of four steroid hormones [Текст] / I. Joab, C. Radanyi, M. Renoir et al. // *Nature*. – 1984. – Vol. 308. – №5962. – P. 850–853.

Comparative transcriptional pathway bioinformatic analysis of dietary restriction, Sir2, p53 and resveratrol life span extension in *Drosophila* [Текст] / M. Antosh, R. Whitaker, A. Kroll et al. // *Cell Cycle*. – 2011. – Vol. 10. – №6. – P. 904–911.

Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25 [Текст] / Y. Sanchez, C. Wong, R. S. Thoma et al. // *Science (Wash DC)*. – 1997. – Vol. 277. – P. 1497–1501.

Coppedè, F. DNA repair in premature aging disorders and neurodegeneration [Текст] / F. Coppedè, L. Migliore // *Curr. Aging Sci.* – 2010. – Vol. 3. – №1. P. 3–19.

Cortopassi, G. A. There is substantial agreement among interspecies estimates of DNA repair activity [Текст] / G. A. Cortopassi, E. Wang // *Mech. Ageing Dev.* – 1996. – Vol. 91. – №3. – P. 211–218.

Couzin-Frankel, J. Reproductive Biology. Faulty DNA repair linked to ovarian aging in mice and humans [Текст] / J. Couzin-Frankel // *Science*. – 2013. – Vol. 339. – №6121. – P. 749.

Crawford, D. R. Adaptive response and oxidative stress [Текст] / D. R. Crawford, K. J. A. Davies // *Env. Health Perspect.* – 1994. – Vol. 102. – Suppl. 10. – P. 25–28.

DamID in *C. elegans* reveals longevity-associated targets of DAF-16/FoxO [Текст] / E. Schuster, J. J. McElwee, J. M. Tullet et al. // *Mol. Syst. Biol.* – 2010. – Vol. 6. – P. 399.

Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis [Текст] / X. Yang, R. Khosravi-Far, H. Y. Chang, D. Baltimore // *Cell.* – 1997. – Vol. 89. – P. 1067–1076.

Decreased expression of DNA repair proteins Ku70 and Mre11 is associated with aging and may contribute to the cellular senescence [Текст] / Y. J. Ju, K. H. Lee, J. E. Park et al. // *Exp. Mol. Med.* – 2006. – Vol. 38. – P. 686–693.

DeHaan, R. D. Regulation of p53 target gene expression by cisplatin-induced extracellular signal-regulated kinase [Текст] / R. D. DeHaan, E. M. Yazlovitskaya, D. L. Persons // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 2001. – Vol. 48. – P. 383–388.

Delayed effects of prenatal low-dose irradiation in the white matter of the rat brain [Текст] / H. Reyners, E. Gianfelici de Reyners, J. Yan et al. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 1999. – Vol. 75. – №10. – P. 1327–1334.

Dempsey, J. L. Effect of dietary restriction on in vivo somatic mutation in mice [Текст] / J. L. Dempsey, M. Pfeiffer, A. A. Morley // *Mutat. Res.* – 1993. – Vol. 291. – P. 141–145.

Detection of protein carbonyls in aging liver tissue: A fluorescence-based proteomic approach [Текст] / A. R. Chaudhuri, E. M. de Waal, A. Pierce et al. // *Mech. Ageing Dev.* – 2006. – Vol. 127. – №11. – P. 849–861.

Diamond, L. M. Causes of death before birth [Текст] / L. M. Diamond // *Nature.* – 1987. – Vol. 329. – P. 487–488.

Differential responses of stress genes to low dose-rate irradiation [Текст] / S. A. Amundson, R. A. Lee, C. A. Koch-Paiz et al. // *Mol. Cancer Res.* – 2003. – Vol. 1. – №6. – P. 445–452.

DmWRNexo is a 3'-5' exonuclease: phenotypic and biochemical characterization of mutants of the *Drosophila* orthologue of human WRN exonuclease [Текст] / I. Boubriak, P. A. Mason, D. J. Clancy et al. // *Biogerontology.* – 2009 – Vol. 10. – №3. – P. 267–277.

Does having children extend life span? A genealogical study of parity and longevity in the Amish [Текст] / P. F. McArdle, T. I. Pollin, J. R. O'Connell et al. // J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. – 2006. – Vol. 61. – P. 190–195.

Does oxidative damage to DNA increase with age? [Текст] / M. L. Hamilton, H. Van Remmen, J. A. Drake et al. // Proc. Natl Acad. Sci. USA. – 2001. – Vol. 98. – №18. – P. 10469–10474.

Down-regulation of Ku autoantigen, DNA-dependent protein kinase, and poly (ADP-ribose) polymerase during cellular senescence [Текст] / A. Salminen, M. Helenius, T. Lahtinen et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1997. – Vol. 238. – №3. – P. 712–716.

Drosophila DNA polymerase zeta interacts with recombination repair protein 1, the *Drosophila* homologue of human abasic endonuclease 1 [Текст] / R. Takeuchi, T. Ruike, R. Nakamura et al. // J. Biol. Chem. – 2006. – Vol. 281. – №17. – P. 11577–11585.

Drosophila ERCC1 is required for a subset of MEI-9-dependent meiotic crossovers [Текст] / S. J. Radford, E. Goley, K. Baxter et al. // Genetics. – 2005. – Vol. 170. – №4. – P. 1737–1745.

Drosophila melanogaster MNK/Chk2 and p53 regulate multiple DNA repair and apoptotic pathways following DNA damage [Текст] / M. H. Brodsky, B. T. Weinert, G. Tsang et al. // Mol. Cell. Biol. – 2004. – Vol. 24. – №3. – P. 1219–1231.

Dubey, A. Effect of the spin-trapping compound N-tertbutyl-alpha-phenylnitron on protein oxidation and life span [Текст] / A. Dubey, M. J. Forster, R. S. Sohal // Arch. Biochem. Biophys. – 1995. – Vol. 324. – №2. – P. 249–254.

Effect of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors on the ischemia-reperfusion-induced oxidative cell damage and mitochondrial metabolism in Langendorff heart perfusion system [Текст] / R. Halmosi, Z. Berente, E. Osz et al. // Mol. Pharmacol., – 2001. – Vol. 59. – №6. – P. 1497–1505.

Effects of age and caloric restriction on lipid peroxidation: measurement [Текст] / W. F. Ward, W. Qi, H. Van Remmen et al. // J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. – 2005. – Vol. 60. – №7. – P. 847–851.

Effects of UVB-induced oxidative stress on protein expression and specific protein oxidation in normal human epithelial keratinocytes: a proteomic approach [Текст] / M. Perluigi, F. Di Domenico, C. Blarzino et al. // Proteome Sci. – 2010. – Vol. 8:13. – 14 p.

Electromagnetic fields affect transcript levels of apoptosis-related genes in embryonic stem cell-derived neural progenitor cells [Текст] / T. Nikolova, J. Czyz, A. Rolletschek et al. // *FASEB J.* – 2005. – Vol. 19. – P. 1686–1688.

Elewa, R. M. Aging-related changes in cutaneous corticotropin-releasing hormone system reflect a defective neuroendocrine-stress response in aging [Текст] / R. M. Elewa, M. Abdallah, N. Youssef, C. C. Zouboulis // *Rejuvenation Res.* – 2012. – Vol. 15. – №4. – P. 366–373.

Enzymatic reduction of oxidized alpha-1-proteinase inhibitor restores biological activity [Текст] / W. R. Abrams, G. Weinbaum, L. Weissbach et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1981. – Vol. 78. – №12. – P. 7483–7486.

Esteller, M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future [Текст] / M. Esteller // *Oncogene* – 2002. – Vol. 21. – P. 5427–5440.

Evidence that the *S. cerevisiae* Sgs1 protein facilitates recombinational repair of telomeres during senescence [Текст] / M. Azam, J. Y. Lee, V. Abraham et al. // *Nucleic Acids Res.* – 2006. – Vol. 34. – №2. – P. 506–516.

Fahy, G. M. The future of aging. Pathways to human life extension [Текст] / G. M. Fahy, M. D. West, S. B. Harris. – New York: Springer, 2010. – 866 p.

Feder, M. E. Ecological and evolutionary physiology of stress proteins and the stress response: the *Drosophila melanogaster* model [Текст] / M. E. Feder // *Animals and temperature: Phenotypic and evolutionary Society for Experimental Biology Seminar Series (No. 59).* – 1996. – P. 79–102.

Feinendegen, L. E. Cellular signal adaptation with damage control at low doses versus the predominance of DNA damage at high doses [Текст] / L. E. Feinendegen, V. P. Bond, C. A. Sondhaus, K. I. Altman // *C R Acad. Sci. III.* – 1999. – Vol. 322. – №2–3. – P. 245–251.

Finch, C. E. Longevity, Senescence and the Genome [Текст] / C. E. Finch. – Chicago: University of Chicago Press, 1994. – 938 p.

Finkel, T. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing [Текст] / T. Finkel, N. J. Holbrook // *Nature.* – 2000. – Vol. 408. – P. 239–247.

Finkel, T. Signal transduction by mitochondrial oxidants [Текст] / T. Finkel // *The Journal of Biological Chemistry.* – 2011. – Vol. 287. – P. 4434–4440.

Fisher, R. A. Frequency distribution of the values of the correlation coefficient in samples from an indefinitely large population [Текст] / R. A. Fisher // *Biometrika*. – 1915. – Vol. 10. – №5. – 507–521.

Fleming, T. R. Modified Kolmogorov–Smirnov test procedures with application to arbitrarily right–censored data [Текст] / T. R. Fleming, J. R. O'Fallon, P. C. O'Brien et al. // *Biometrics*. – 1980. – Vol. 36. – P. 607–625.

Flores, C. Microsatellite instability in *Drosophila* spellchecker1 (MutS homolog) mutants [Текст] / C. Flores, W. Engels // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1999. – Vol. 96. – №6. – P. 2964–2969.

Fonager, J. Mild stress–induced stimulation of heat–shock proteinsynthesis and improved functional ability of human fibroblasts undergoing aging in vitro [Текст] / J. Fonager, R. Beedholm, B. F. Clark, S. I. Rattan // *Exp. Gerontol*. – 2002. – Vol. 37. – P. 1223–1228.

Fousteri, M. Transcription–coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects [Текст] / M. Fousteri, L. H. F. Mullenders // *Cell research*. – 2008. – Vol. 18. – P. 73–84.

Fraga, M. F. EpiGenetics. and aging: the targets and the marks [Текст] / M. F. Fraga, M. Esteller // *Trends Genet*. – 2007. – Vol. 23. – P. 413–418.

Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease [Текст] / M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol et al. // *Int. J. Biochem. Cell Biol*. – 2007. – Vol. 39. – №1. – P. 44–84.

Friedman, D. B. A mutation in the age–1 gene in *Caenorhabditis elegans* lengthens life and reduces hermaphrodite fertility [Текст] / D. B. Friedman, T. E. Johnson // *Genetics*. – 1988. – Vol. 118. – P. 75–86.

Functional analysis of *Drosophila melanogaster* BRCA2 in DNA repair [Текст] / R. Brough, D. Wei, S. Leulier et al. // *DNA Repair*. – 2008. – Vol. 7. – №1. – P. 10–19.

Functional consequences of radiation-induced oxidative stress in cultured neural stem cells and the brain exposed to charged particle irradiation [Текст] / B. P. Tseng, E. Giedzinski, A. Izadi et al. // *Antioxid Redox Signal*. – 2014. – Vol. 20. – №9. – P. 1410–1422.

Functional interaction between retinoblastoma protein and stress-activated protein kinase in multiple myeloma cells [Текст] / D. Chauhan, T. Hideshima, S. Treon, et al. // *Cancer Res.* – 1999. – Vol. 59. – P. 1192–1195.

Fusco, D. Effects of antioxidant supplementation on the aging process [Текст] / D. Fusco, G. Colloca, M. R. Lo Monaco, M. Cesari // *Clin. Interv. Aging.* – 2007. – Vol. 2. – №3. – P. 377–387.

Gabbita, S. P. Decrease in peptide methionine sulfoxide reductase in alzheimer's disease brain [Текст] / S. P. Gabbita, M. Y. Aksenov, M. A. Lovell, W. R. Markesbery // *J. Neurochem.* – 1999. – Vol. 73. – №4. – P. 1660–1666.

Ganea, E. Alpha-crystallin protects glucose 6-phosphate dehydrogenase against inactivation by malondialdehyde [Текст] / E. Ganea, J. J. Harding // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2000. – Vol. 1500. – №1. – P. 49–58.

Gatti, M. Genetic control of chromosome breakage and rejoining in *Drosophila melanogaster*: Spontaneous chromosome aberrations in X-linked mutants defective in DNA metabolism [Текст] / M. Gatti // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1979. – Vol. 76. – P. 1377–1381.

GenAge: The Ageing Gene Database [Электронный ресурс]. URL: <http://genomics.senescence.info/genes/> (дата обращения: 23.08.2014).

Gene expression profiles in human lymphocytes irradiated in vitro with low doses of gamma rays [Текст] / A. L. Fachin, S. S. Mello, P. Sandrin–Garcia et al. // *Radiat. Res.* – 2007. – Vol. 168. – №6. – P. 650–665.

Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain [Текст] / T. Lu, Y. Pan, S. Y. Kao et al. // *Nature.* – 2004. – Vol. 429. – P. 883–891.

Genetic influence on human lifespan and longevity [Текст] / J. B. Hjelmborg, I. Iachine, A. Skytthe et al. // *Hum. Genet.* – 2006. – Vol. 119. – №3. – P. 312–321.

Genomic Instability Induced by Ionizing Radiation [Текст] / W. F. Morgan, J. P. Day, M. I. Kaplan et al. // *Radiat Res.* – 1996. – Vol. 146. – №3. – P. 247–258.

Ghabrial, A. Okra and spindle–B encode components of the RAD52 DNA repair pathway and affect meiosis and patterning in *Drosophila* oogenesis [Текст] / A. Ghabrial, R. P. Ray, T. Schupbach // *Genes Dev.* – 1998. – Vol. 12. – №17. – P. 2711–2723.

Ghezi, P. Redox proteomics: identification of oxidatively modified proteins [Текст] / P. Ghezi, V. Bonetto // *Proteomics.* – 2003. – Vol. 3. – №7. – P. 1145–1153.

Gill, S. S. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants [Текст] / S. S. Gill, N. Tuteja // *Plant Physiol. Biochem.* – 2010. – Vol. 48. – №12. – P. 909–930.

Gorbunova, V. Changes in DNA repair during aging [Текст] / V. Gorbunova, A. Seluanov, Z. Mao, C. Hine // *Nucleic. Acids Res.* – 2007. – Vol. 35. – P. 7466–7474.

Gottschling, D. E. DNA repair: corrections in the golden years [Текст] / D. E. Gottschling // *Curr. Biol.* – 2006 – Vol. 16. – №22. – P. R956–R958.

Greider, C. W. Identification of a specific telomere terminal transferase enzyme with two kinds of primer specificity [Текст] / C. W. Greider, E. H. Blackburn // *Cell.* – 1985. – Vol. 51. – P. 405–413.

Growing old gracefully [Текст] // *Nature.* – 2004. – Vol. 428. – P. 116–118.

Grundy, E. Reproductive history and mortality in late middle age among Norwegian men and women [Текст] / E. Grundy, Ø. Kravdal // *Am J. Epidemiol.* – 2008. – Vol. 167. – №3. – P. 271–279.

Gruneberg, H. Heterosis and variability in the mouse [Текст] / H. Gruneberg // *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences.* – 1955. – Vol. 144. – №915. – P. 220–221.

Guo, Z. Nucleotide excision repair of actively transcribed versus nontranscribed DNA in rat hepatocytes: effect of age and dietary restriction [Текст] / Z. Guo, A. Heydari, A. Richardson // *Exp. Cell Res.* – 1998. – Vol. 245. – P. 228–238.

Haigis, M. C. The Aging Stress Response [Текст] / M. C. Haigis, B. A. Yankner // *Mol. Cell.* – 2010. – Vol. 40. – №2. – P. 333–344.

Halliwell, B. *Free Radicals in Biology and Medicine* [Текст] / B. Halliwell, M. C. Gutteridge. – Oxford: Oxford University Press, 2007. – 888 p.

Hanawalt, P. C. Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation [Текст] / P. C. Hanawalt // *Oncogene.* – 2002. – Vol. 21. – P. 8949–8956.

Hanawalt, P. C. Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises [Текст] / P. C. Hanawalt, G. Spivak // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2008. – Vol. 9. – P. 958–970.

Hansen, B. C. Calorie restriction in nonhuman primates: mechanisms of reduced morbidity and mortality [Текст] / B. C. Hansen, N. L. Bodkin, H. K. Ortmeyer // *Toxicol. Sci.* – 1999. – Vol. 52. – P. 56–60.

Harman, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry [Текст] / D. Harman // J. Gerontol. – 1956. – Vol. 11. – №3. – P. 298–300.

Hart, R. W. Longevity, stability and DNA repair [Текст] / R. W. Hart, S. M. D'Ambrosio, K. J. Ng, S. P. Modak // Mech. Ageing Dev. – 1979. – Vol. 9. – №3–4. – P. 203–223.

Hartl, F. U. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein [Текст] / F. U. Hartl, M. Hayer-Hartl // Science. – 2002. – Vol. 295. – P. 1852–1858.

Hayflick, L. The serial cultivation of human diploid cell strains [Текст] / L. Hayflick, P. S. Moorhead // Exp. Cell Res. – 1961. – Vol. 25. – P. 585–621.

Heat Shock: From bacteria to man [Текст] / Edited by M. J. Schlesinger, M. Ashburner, A. Tissiers. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. – 440 p.

Helfand, S. L. Molecular Genetics. of aging in the fly: is this the end of the beginning? [Текст] / S. L. Helfand, B. Rogina // BioEssays. – 2003. – Vol. 25. – P. 134–141.

Henderson, D. S. Mutagen sensitivity and suppression of position-effect variegation result from mutations in *mus209*, the *Drosophila* gene encoding PCNA [Текст] / D. S. Henderson, S. S. Banga, T. A. Grigliatti, J. B. Boyd // EMBO J. – 1994. – Vol. 13. – №6. – P. 1450–1459.

Henning, K. A. Cloning the *Drosophila* homolog of the xeroderma pigmentosum complementation group C gene reveals homology between the predicted human and *Drosophila* polypeptides and that encoded by the yeast RAD4 gene [Текст] / K. A. Henning, C. Peterson, R. Legerski, E. C. Friedberg // Nucleic. Acids Res. – 1994. – Vol. 22. – №3. – P. 257–261.

Herbig, U. Regulation of growth arrest in senescence: telomere damage is not the end of the story [Текст] / U. Herbig, J. M. Sedivy // Mech. Ageing Develop. – 2006. – Vol. 127. – P. 16–24.

Herrero, A. 8-oxo-deoxyguanosine levels in heart and brain mitochondrial and nuclear DNA of two mammals and three birds in relation to their different rates of aging [Текст] / A. Herrero, G. Barja // Aging (Milano). – 1999. – Vol. 11. – №5. – P. 294–300.

High oxidative damage levels in the longest-living rodent, the naked mole-rat [Текст] / B. Andziak, T. P. O'Connor, W. Qi et al. // *Aging Cell*. – 2006. – Vol. 5. – №6. – P. 463–471.

High-quality life extension by the enzyme peptide methionine sulfoxide reductase [Текст] / H. Ruan, X. D. Tang, M. L. Chen et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2002. – Vol. 99. – №5. – P. 2748–2753.

Hip2 ubiquitin-conjugating enzyme overcomes radiation-induced G2/M arrest [Текст] / Y. Bae, S. H. Jung, G. Y. Kim et al. // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2013. – Vol. 1833. – №12. – P. 2911–2921.

Holloszy, J. O. Caloric restriction in humans [Текст] / J. O. Holloszy, L. Fontana // *Exp Gerontol*. – 2007. – Vol. 42. – P. 709–712.

Honjoh, S. Signalling through RHEB-1 mediates intermittent fasting-induced longevity in *C. elegans* [Текст] / S. Honjoh, T. Yamamoto, M. Uno, E. Nishida // *Nature*. – 2009. – Vol. 457. – №7230. – P. 726–730.

Hulbert, A. J. Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals [Текст] / A. J. Hulbert, R. Pamplona, R. Buffenstein, W. A. Buttemer // *Physiol. Rev*. – 2007. – Vol. 87. – №4. – P. 1175–1213.

Hutchinson, E. W. Quantitative Genetics. of postponed aging in *Drosophila melanogaster*. I. Analysis of outbred populations [Текст] / E. W. Hutchinson, M. R. Rose // *Genetics*. – 1991. – Vol. 127. – P. 719–727.

Identification of inheritance modes of mitochondrial diseases by introduction of pure nuclei from mtDNA-less HeLa cells to patient-derived fibroblasts [Текст] / K. Isobe, S. Kishino, K. Inoue, D. Takai et al. // *Biol. Chem*. – 1997 – Vol. 272. – №19. P. 12606–12610.

Imai, H. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells [Текст] / H. Imai, Y. Nakagawa // *Free Radic. Biol. Med*. – 2003. – Vol. 34. – №2. P. 145–169.

Impact of age and environment on somatic mutation at the hprt gene of T lymphocytes in humans [Текст] / I. M. Jones, C. B. Thomas, B. Tucker et al. // *Mutat. Res*. – 1995. – Vol. 338. – P. 129–139.

In vitro radiation-induced expression of XPC mRNA as a possible biomarker for developing adverse reactions during radiotherapy [Текст] / K. Wiebalk, P. Schmezer, S. Kropp et al. // *Int. J. Cancer.* – 2007. – Vol. 121. – №10. – P. 2340–2345.

Increase in basal level of Hsp70, consisting chiefly of constitutively expressed Hsp70 (Hsc70) in aged rat brain [Текст] / K. Unno, H. Asakura, Y. Shibuya et al. // *J. Gerontol: Biol. Sci.* – 2000. – Vol. 55A. – P. B329–B335.

Increased cell-to-cell variation in gene expression in ageing mouse heart [Текст] / R. Bahar, C. H. Hartmann, K. A. Rodriguez et al. // *Nature.* – 2006. – P. 1011–1014.

Individual differences in locus of control during the second half of the life span for identical and fraternal twins reared apart and reared together [Текст] / N. L. Pedersen, M. Gatz, R. Plomin et al. // *J. Gerontol.* – 1989. – Vol. 44. – I. 4 – P. P100–P105.

Induction by ionizing radiation of the gadd45 gene in cultured human cells: lack of mediation by protein kinase C [Текст] / M. A. Papathanasiou, N. C. Kerr, J. H. Robbins et al. // *Mol. Cell. Biol.* – 1991. – Vol. 11. – №2. – P. 1009–10016.

Induction of a bystander mutagenic effect of alpha particles in mammalian cells [Текст] / H. Zhou, G. Randers-Pehrson, C. A. Waldren et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – Vol. 97. – P. 2099–2104.

Induction of pro-apoptotic and cell cycle-inhibiting genes in chromium (VI)-treated human lung fibroblasts: lack of effect of ERK [Текст] / S. Ceryak, C. Zingariello, T. O'Brien, S. R. Patierno // *Mol. Cell Biochem.* – 2004. – Vol. 255. – P. 139–149.

Inflammatory cytokines protect retinal pigment epithelial cells from oxidative stress-induced death [Текст] / H. B. Juel, C. Faber, S. G. Svendsen et al. // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8. – №5. – P. e64619.

Intano, G. W. Age-related base excision repair activity in mouse brain and liver nuclear extracts [Текст] / G. W. Intano, E. J. Cho, C. A. McMahan, C. A. Walter // *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* – 2003. – Vol. 58. – P. 205–211.

Involvement of the MKK6-p38gamma cascade in gamma-radiation-induced cell cycle arrest [Текст] / X. F. Wang, C. H. McGowan, M. Zhao et al. // *Mol. Cell Biol.* – 2000. – Vol. 20. – №13. – P. 4543–4552.

Ip, Y. T. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) – from inflammation to development [Текст] / Y. T. Ip, R. J. Davis // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 1998. – Vol. 10. – P. 205–219.

Is Socioeconomic Status Associated With Biological Aging as Measured by Telomere Length? [Текст] / T. Robertson, G. D. Batty, G. Der et al. // *Epidemiol. Rev.* – 2013. – Vol. 35. – №1. – P. 98–111.

Jacobson, M. D. Programmed cell death in animal development [Текст] / M. D. Jacobson, M. Weil, M. C. Raff // *Cell.* – 1997. – Vol. 88. – P. 347–354.

Jana, C. K. Specificity of age-related carbonylation of plasma proteins in the mouse and rat [Текст] / C. K. Jana, N. Das, R. S. Sohal // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2002. – Vol. 397. – №2. – P. 433–439.

Jassim, O. W. Dmp53 protects the *Drosophila* retina during a developmentally regulated DNA damage response [Текст] / O. W. Jassim, J. L. Fink, R. L. Cagan // *EMBO J.* – 2003. – Vol. 22. – №20. – P. 5622–5632.

Jazwinski, S. M. Growing old: metabolic control and yeast aging [Текст] / S. M. Jazwinski // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2002. – Vol. 56. – P. 769–792.

JNK targets p53 ubiquitination and degradation in nonstressed cells [Текст] / S. Y. Fuchs, V. Adler, T. Buschmann et al. // *Genes. Dev.* – 1998. – Vol. 12. – P. 2658–2663.

Jones, E. M. An altered mode of calcium coordination in methionine-oxidized calmodulin [Текст] / E. M. Jones, T. C. Squier, C. A. Sacksteder // *Biophys. J.* – 2008. – Vol. 95. – №11. – P. 5268–5280.

Kadir, R. Localization of the *Drosophila* rad9 protein to the nuclear membrane is regulated by the C-terminal region and is affected in the meiotic checkpoint [Текст] / R. Kadir, A. Bakhrat, R. Tokarsky, U. Abdu // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7. – №5. – P. e38010.

Kam, W. W. Effects of ionizing radiation on mitochondria [Текст] / W. W. Kam, R. B. Banati // *Free Radic. Biol. Med.* – 2013. – Vol. 65C. – P. 607–619.

Kang, M. K. Telomere shortening does not occur during postmaturation aging in situ in normal human oral fibroblasts [Текст] / M. K. Kang, A. Kameta, M. A. Baluda, N. H. Park // *Mech. Ageing Dev.* – 2003. – Vol. 124. – №8–9. – P. 873–876.

Kass, E. M. Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways [Текст] / E. M. Kass, M. Jasin // *FEBS Letters.* – 2010. – Vol. 584. – P. 3703–3708.

Kauffman, S. H. Heat shock proteins in health and disease [Текст] / S. H. Kauffman // *Intern. J. Clin. Labor. Res.* – 1992. – Vol. 21. – P. 221–226.

Kenyon, C. J. The genetics of ageing [Текст] / C. J. Kenyon // Nature. – 2010. – Vol. 464. – №7288. – P. 504–512.

Kim, H. Y. Role of structural and functional elements of mouse methionine-S-sulfoxide reductase in its subcellular distribution [Текст] / H. Y. Kim, V. N. Gladyshev // Biochemistry. – 2005. – Vol. 44. – P. 8059–8067.

Kinner, A. H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin [Текст] / A. Kinner, W. Wu, C. Staudt, G. Iliakis // Nucleic Acids Res. – 2008. – Vol. 36. – №17. – P. 5678–5694.

Kirkwood, T. B. Evolution of aging [Текст] / T. B. Kirkwood // Nature. – 1977. – Vol. 270. – P. 301–304.

Klovstad, M. *Drosophila* brca2 is required for mitotic and meiotic DNA repair and efficient activation of the meiotic recombination checkpoint [Текст] / M. Klovstad, U. Abdu, T. Schüpbach // PLoS Genet. – 2008. – Vol. 4. – №2. – P. e31.

Kondo, S. A genome-wide RNAi screen identifies core components of the G2-M DNA damage checkpoint [Текст] / S. Kondo, N. Perrimon // Sci. Signal. – 2011. – Vol. 4. – №154. – P. rs1–rs1.

Ku80 deletion suppresses spontaneous tumors and induces a p53-mediated DNA damage response [Текст] / V. B. Holcomb, F. Rodier, Y. Choi et al. // Cancer Res. – 2008. – Vol. 68. – №22. – P. 9497–9502.

Ku80: product of the XRCC5 gene and its role in DNA repair and V(D)J recombination [Текст] / G. E. Taccioli, T. M. Gottlieb, T. Blunt et al. // Science. – 1994. – Vol. 265. – №5177. – P. 1442–1445.

Lagouge, M. The role of mitochondrial DNA mutations and free radicals in disease and ageing [Текст] / M. Lagouge, N. G. Larsson // J. Intern. Med. – 2013. – Vol. 273. – №6. – P. 529–543.

Landis, G. Gene expression changes in response to aging compared to heat stress, oxidative stress and ionizing radiation in *Drosophila melanogaster* [Текст] / G. Landis, J. Shen, J. Tower // Aging (Albany NY). – 2012. – Vol. 4. – №11. – P. 768–789.

Landis, G. N. Superoxide dismutase evolution and life span regulation [Текст] / G. N. Landis, J. Tower // Mech. Ageing Dev. – 2005. – Vol. 126. – №3. – P. 365–379.

Le Bourg, E. A mini-review of the evolutionary theories of aging. Is it the time to accept them? [Текст] / E. Le Bourg // Dem Res. – 2001. – Vol. 4. – Article 1. – P. 1–28.

Lee, C. K. Gene-expression profile of the ageing brain in mice [Текст] / C. K. Lee, R. Weindruch, T. A. Prolla // Nat. Genet. – 2000. – Vol. 25. – P. 294–297.

Lee, L. A. Regulation of cell cycles in *Drosophila* development: intrinsic and extrinsic cues [Текст] / L. A. Lee, T. L. Orr-Weaver // Annu. Rev. Genet. – 2003. – Vol. 37. – P. 545–578.

Lehnert, S. Biomolecular Action of Ionizing Radiation (Series in Medical Physics and Biomedical Engineering) [Текст] / S. Lehnert. – Taylor and Francis Group, 2007. – 560 p.

Lightowers, R. N. Mitochondrial DNA — all things bad? [Текст] / R. N. Lightowers, H. T. Jacobs, O. A. Kajander // Trends Genet. – 1999. – Vol. 15. – P. 91–93.

Linnane, A. W. Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases [Текст] / A.W. Linnane, S. Marzuki, T. Ozawa, M. Tanaka // Lancet. – 1989. – Vol. 1. – №8639. – P. 642–645.

Liochev, S. I. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging [Текст] / S. I. Liochev // Free Radic. Biol. Med. – 2013. – Vol. 60. – P. 1–4.

Lithgow, G. J. Thermotolerance and extended life-span conferred by single gene mutations and induced by thermal stress [Текст] / G. J. Lithgow, T. M. White, S. Melov, T. E. Johnson // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1995. – Vol. 92. – P. 7540–7544.

Little, J. B. Radiation carcinogenesis [Текст] / J. B. Little // Carcinogenesis. – 2000. – Vol. 21. – №3. – P. 397–404.

Long-term XPC silencing reduces DNA double-strand break repair [Текст] / E. Despras, P. Pfeiffer, B. Salles et al. // Cancer Res. – 2007. – Vol. 67. – №6. – P. 2526–2534.

Lorimore, S. A. Radiation-induced genomic instability and bystander effects: related inflammatory-type responses to radiation-induced stress and injury? A review [Текст] / S. A. Lorimore, E. G. Wright // Int. J. Radiat. Biol. – 2003. – Vol. 79. – №1. – P. 15–25.

Low dose radiation response curves, networks and pathways in human lymphoblastoid cells exposed from 1 to 10cGy of acute gamma radiation [Текст] / A. J. Wyrobek, C. F. Manohar, V. V. Krishnan et al. // Mutat. Res. – 2011. – Vol. 722. – №2. – P. 119–130.

Low pH induces co-ordinate regulation of gene expression in oesophageal cells [Текст] / S. P. Duggan, W. M. Gallagher, E. J. Fox et al. // *Carcinogenesis*. – 2006. – Vol. 27. – P. 319–327.

Luchkina, L. A. Study of the radiosensitive *Drosophila* lines: V. Sensitivity of the mutant mus(2)201G1 to methylmethane sulfonate and UV radiation, and disturbance in DNA repair in the UV irradiated cells [Текст] / L. A. Luchkina, I. M. Khromykh, V. I. Sharygin // *Soviet Genet.* – 1982. – Vol. 18. – №4. – P. 462–469.

Ma, D. K. DNA excision repair proteins and Gadd45 as molecular players for active DNA demethylation [Текст] / D. K. Ma, J. U. Guo, G. Ming, H. Song // *Cell Cycle*. – 2009. – Vol. 8. – №10. – P. 1526–1531.

Makhnevych, T. The role of Hsp90 in protein complex assembly [Текст] / T. Makhnevych, W. A. Houry // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2012. – Vol. 1823. – №3. – P. 674–682.

Maklashina, E. Is defective electron transport at the hub of aging? [Текст] / E. Maklashina, B. A. Ackrell // *Aging Cell*. – 2004. – Vol. 3. – №1. P. 21–27.

Malyshev, I. Immunity, tumors and aging: the role of HSP70 [Текст] / I. Malyshev. – New York–London: Springer, 2013. – Vol. 6. – 141 p.

Martin, J. A. Telomere erosion and senescence in human articular cartilage chondrocytes [Текст] / J. A. Martin, J. A. Buckwalter // *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* – 2001. – Vol. 56. – №4. – P. 172–179.

Martins, I. Hormesis, cell death and aging [Текст] / I. Martins, L. Galluzzi, G. Kroemer // *Aging (Albany NY)*. – 2011. – Vol. 3. – №9. – P. 821–828.

Mather, K. The Genetical Basis of Heterosis [Текст] / K. Mather // *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* – 1955. – Vol. 144. – №915. – P. 143–150.

Maxmen, A. Calorie restriction falters in the long run [Текст] / A. Maxmen // *Nature*. – 2012. – Vol. 488. – №7413. – P. 569.

McGue, M. Longevity is moderately heritable in a sample of Danish twins born 1870–1880 [Текст] / M. McGue, J. W. Vaupel, N. Holm, B. Harvald // *J. Gerontol.* – 1993. – Vol. 48. – I. 6. – P. B237–B244.

McVey, M. Multiple functions of *Drosophila* BLM helicase in maintenance of genome stability [Текст] / M. McVey, S. L. Andersen, Y. Broze, J. Sekelsky // Genetics. – 2007. – Vol. 176. – №4. – P. 1979–1992.

Mechanisms and implications of the age-associated decrease in DNA repair capacity [Текст] / D. Goukassian, F. Gad, M. Yaar et al. // FASEB J. – 2000. – Vol. 14. – P. 1325–1334.

Medawar, P. B. An unsolved problem of biology / P. B. Medawar. – London: H.C. Lewis & Co LTD, 1952. – 24 p.

Melatonin prevents death of neuroblastoma cells exposed to the Alzheimer amyloid peptide [Текст] / M. A. Pappolla, M. Sos, R. A. Omar et al. // J. Neurosci. – 1997. – Vol. 17. – №5. – P. 1683–1690.

Messaoudi, I. Delay of T cell senescence by caloric restriction in aged long-lived nonhuman primates [Текст] / I. Messaoudi, J. Warner, M. Fischer et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2006. – Vol. 103. – P. 19448–19453.

Methionine oxidation impairs reverse cholesterol transport by apolipoprotein A-1 [Текст] / B. Shao, G. Cavigliolo, N. Brot et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2008. – Vol. 105. – №34. – P. 12224–12229.

Methionine sulfoxide reductase B in the endoplasmic reticulum is critical for stress resistance and aging in *Drosophila* [Текст] / D. H. Lim, J. Y. Han, J. R. Kim et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2012. – Vol. 419. – №1. – P. 20–26.

Methionine-deficient diet extends mouse lifespan, slows immune and lens aging, alters glucose, T4, IGF-I and insulin levels, and increases hepatocyte MIF levels and stress resistance [Текст] / R. A. Miller, G. Buehner, Y. Chang et al. // Aging Cell. – 2005. – Vol. 4. – №3. – P. 119–125.

Mineralocorticosteroid receptor of the chick intestine. Oligomeric structure and transformation [Текст] / M. E. Rafestin-Oblin, B. Couette, C. Radanyi et al. // J. Biol. Chem. – 1989. – Vol. 264. – №16. – P. 9304–9309.

Mitochondria, aging and longevity – a new perspective [Текст] / S. Salvioli, M. Bonafè, M. Capri et al. // FEBS Lett. 2001. – Vol. 492. – №1-2. – P. 9–13.

Mohan, N. Induction of nuclear factor κ B after low-dose ionizing radiation involves a reactive oxygen intermediate signaling pathway [Текст] / N. Mohan, M. L. Meltz // Radiat. Res. – 1994. – Vol. 140. – P. 97–104.

Molecular analyses of adaptive survival responses (ASRs): role of ASRs in radiotherapy [Текст] / D. A. Boothman, E. Odegaard, C. R. Yang et al. // Hum. Exp. Toxicol. – 1998. – Vol. 17. – №8. – P. 448–453.

Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints [Текст] / A. Sancar, L. A. Lindsey-Boltz, K. Unsal-Kacmaz, S. Linn // Annu. Rev. Biochem. – 2004. – Vol. 73. – P. 39–85.

Morgan, G. W. Radiation and the lung: a reevaluation of the mechanisms mediating pulmonary injury [Текст] / G. W. Morgan, S. N. Breit // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. – 1995. – Vol. 31. – P. 361–369.

Moskalev, A. A. Radiation hormesis and radioadaptive response in *Drosophila melanogaster* flies with different genetic backgrounds: the role of cellular stress-resistance mechanisms [Текст] / A. A. Moskalev, E. N. Plyusnina, M. V. Shaposhnikov // Biogerontology. – 2011. Vol. 12. – №3. – P. 253–263.

Moskalev, A. Life span alteration after irradiation in *Drosophila melanogaster* strains with mutations of Hsf and Hsps [Текст] / A. Moskalev, M. Shaposhnikov, E. Turyshcheva // Biogerontology. – 2009. – Vol. 10. – №1. – P. 3–11.

Moskalev, A. Radiation-induced life span alteration of *Drosophila* lines with genotype differences [Текст] / A. Moskalev // Biogerontology. – 2007. – Vol. 8. – №5. – P. 499–504.

Mothersill, C. Radiation-induced bystander effects and the DNA paradigm: an “out of field” perspective [Текст] / C. Mothersill, C. B. Seymour // Mutat. Res. – 2006. – Vol. 597. – P. 5–10.

Nagy, Z. DNA repair: easy to visualize, difficult to elucidate [Текст] / Z. Nagy, E. Soutoglou // Cell biology – 2009. – Vol. 19. – №11. – P. 617–629.

Neuron loss during early adulthood following prenatal low-dose X-irradiation in the mouse brain [Текст] / H. Korr, H. Thorsten-Rohde, J. Benders et al. // Int. J. Radiat. Biol. – 2001. – Vol. 77. – №5. – P. 567–580.

Nguyen, A. N. Multistep phosphorelay proteins transmit oxidative stress signals to the fission yeast stress-activated protein kinase [Текст] / A. N. Nguyen, A. Lee, W. Place, K. Shiozaki // Mol. Biol. Cell. – 2000. – Vol. 11. – №4. – P. 1169–1181.

Nitti, M. PKC signaling in oxidative hepatic damage [Текст] / M. Nitti, M. A. Pronzato, U. M. Marinari, C. Domenicotti // Mol. Aspects Med. – 2008. – Vol. 29. – №1–2. – P. 36–42.

Non-targeted effects of ionising radiation—Implications for low dose risk [Текст] / M. Kadhim, S. Salomaa, E. Wright et al. // Mutat. Res. – 2013. – Vol. 752. – №2. – P. 84–98.

Nover, L. Heat shock response of eukaryotic cells [Текст] / L. Nover. – New York: Springer, 1984. – P. 7–12.

Nuclear but not mitochondrial genome involvement in human age-related mitochondrial dysfunction. Functional integrity of mitochondrial DNA from aged subjects [Текст] / J. Hayashi, S. Ohta, Y. Kagawa et al. // J Biol Chem. – 1994. – Vol. 269. – №9. P. 6878–6883.

Null mutation of copper/zinc superoxide dismutase in *Drosophila* confers hypersensitivity to paraquat and reduced longevity [Текст] / J. P. Phillips, S. D. Campbell, D. Michaud et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1989. – Vol. 86. – №8. – P. 2761–2765.

O’Driscoll, M. The role of double-strand break repair – insights from human Genetics. [Текст] / M. O’Driscoll, P. A. Jeggo // Nature. Rev. – 2006. – Vol. 7. – P. 45–54.

Ohnishi, T. DNA double-strand breaks: Their production, recognition, and repair in eukaryotes [Текст] / T. Ohnishi, E. Mori, A. Takahashi // Mutat. Res. – 2009. – Vol. 669. – P. 8–12.

Orgel, L. E. The Maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to aging [Текст] / L. E. Orgel // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1963. – Vol. 49. – P. 517–521.

Orii, K. E. Selective utilization of nonhomologous end-joining and homologous recombination DNA repair pathways during nervous system development [Текст] / K. E. Orii, Y. Lee, N. Kondo, P. J. McKinnon // Proc. Natl Acad. Sci. USA. – 2006. – Vol. 103. – P. 10017–10022.

Orr, W. C. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster* [Текст] / W. C. Orr, R. S. Sohal // Science. – 1994. – Vol. 263. – №5150. – P. 1128–1130.

Osterwalder, T. A conditional tissue-specific transgene expression system using inducible GAL4 [Текст] / T. Osterwalder, K. S. Yoon, B. H. White, H. Keshishian // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – Vol. 98. – №22. – P. 12596–12601.

Overexpression of a Rrp1 transgene reduces the somatic mutation and recombination frequency induced by oxidative DNA damage in *Drosophila melanogaster* [Текст] / A. Szakmary, S. M. Huang, D. T. Chang et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1996. – Vol. 93. – №4. – P. 1607–1612.

Overexpression of Mn superoxide dismutase does not increase life span in mice [Текст] / Y. C. Jang, V. I. Pérez, W. Song et al. // J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. – 2009. – Vol. 64. – №11. – P. 1114–1125.

Oxidation of either methionine 351 or methionine 358 in alpha 1-antitrypsin causes loss of anti-neutrophil elastase activity [Текст] / C. Taggart, D. Cervantes-Laurean, G. Kim et al. // J. Biol. Chem. – 2000. – Vol. 275. – №35. – P. 27258–27265.

Oxidative DNA damage in cultured cells and rat lungs by carcinogenic nickel compounds [Текст] / S. Kawanishi, S. Inoue, S. Oikawa et al. // Free Radic. Biol. Med. – 2001. – Vol. 31. – №1. – P. 108–116.

Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease [Текст] / M. S. Cooke, M. D. Evans, M. Dizdaroglu, J. Lunec // FASEB J. – 2003. – Vol. 17. – №10. – P. 1195–1214.

Oxidative stress status in umbilical cord blood from neonates born to mothers with atopic asthma [Текст] / L. Yang, Y. S. Guo, H. W. Shan et al. // J. Matern. Fetal. Neonatal. Med. – 2014. – Vol. 27. – №2. – P. 192–196.

P[Switch], a system for spatial and temporal control of gene expression in *Drosophila melanogaster* / G. Roman, K. Endo, L. Zong, R. L. Davis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. Vol. – 98. – №22. – P. 12602–12607.

P53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes [Текст] / S. W. Lowe, E. M. Schmitt, S. W. Smith et al. // Nature. – 1993. – Vol. 362. – P. 847–849.

Pal, R. Elevated levels of brain-pathologies associated with neurodegenerative diseases in the methionine sulfoxide reductase-A knockout mouse [Текст] / R. Pal, D. B. Oien, F. Y. Ersen, J. Moskovitz // Exp. Brain Res. – 2007. – Vol. 180. – №4. – P. 765–774.

Pamplona, R. Membrane fatty acid unsaturation, protection against oxidative stress, and maximum life span: a homeoviscous–longevity adaptation [Текст] / R. Pamplona, G. Barja, M. Portero–Otin // Ann NY Acad. Sci. – 2002. – Vol. 959. – P. 475–490.

Peptide methionine sulfoxide reductase: Structure, mechanism of action, and biological function [Текст] / H. Weissbach, F. Etienne, T. Hoshi et al. // Arch. Biochem. Biophys. – 2002. – Vol. 397. – №2. – P. 172–178.

Peretz, G. The *Drosophila* hus1 gene is required for homologous recombination repair during meiosis [Текст] / G. Peretz, L. G. Arie, A. Bakhrat, U. Abdu // Mech. Dev. – 2009. – Vol. 126. – №8–9. – P. 677–686.

Pfeifer, G. P. Mutagenesis at methylated CpG sequences [Текст] / G. P. Pfeifer // Curr. Top. Microbiol. Immunol. – 2006. – Vol. 301. – P. 259–281.

Pinto, M. Bystander responses in three–dimensional cultures containing radiolabelled and unlabelled human cells [Текст] / M. Pinto, E. I. Azzam, R. W. Howell // Radiat. Prot. Dosimetry. – 2006. – Vol. 122. – P. 252–255.

Pletcher, S. D. Model fitting and hypothesis testing for age–specific mortality data [Текст] / S. D. Pletcher // J. Evol. Biol. – 1999. – Vol. 12. – P. 430–439.

Plyusnina, E. N. Increase of *Drosophila melanogaster* lifespan due to D–GADD45 overexpression in the nervous system [Текст] / E. N. Plyusnina, M. V. Shaposhnikov, A. A. Moskalev // Biogerontology. – 2011. – Vol. 12. – №3. – P. 211–226.

Porter, T. D. Cytochrome P–450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms [Текст] / T. D. Porter, M. J. Coon // J. Biol. Chem. – 1991. – Vol. 266. – P. 13469–13472.

Pratt, W. B. Role of molecular chaperones in steroid receptor action [Текст] / W. B. Pratt, M. D. Galigniana, Y. Morishima, P. J. Murphy // Essays Biochem. – 2004. – Vol. 40. – P. 41–58.

Price, A. The repair of ionising radiation–induced damage to DNA [Текст] / A. Price // Semin Cancer Biol. – 1993. – Vol. 4. – №2. – P. 61–71.

Price, B. D. Heat–induced transcription from RNA polymerases II and III and HSF binding activity are co–ordinately regulated by the products of the heat shock genes [Текст] / B. D. Price, S. K. Calderwood // J. Cell Physiol. – 1992. – Vol. 153. – №2. – P. 392–401.

Probin, V. Busulfan selectively induces cellular senescence but not apoptosis in WI38 fibroblasts via a p53-independent but extracellular signal-regulated kinase-p38 mitogenactivated protein kinase-dependent mechanism [Текст] / V. Probin, Y. Wang, A. Bai, D. Zhou // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2006. – Vol. 319. – P. 551–560.

Prospective comparison of in vitro normal cell radiosensitivity and normal tissue reactions in radiotherapy patients [Текст] / F. B. Geara, L. J. Peters, K. K. Ang et al. // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. – 1993. – Vol. 27. – №5. – P. 1173–1179.

Protein expression profiles in hematopoietic stem/progenitor cells after exposure of mice to silicon (²⁸Si) ions [Текст] / K. N. Rithidech, M. Tungjai, L. Honikel et al. // J. Radiat. Res. – 2014. – Vol. 55. – Suppl 1. P. i131–i132.

Puck, T. T. Action of X-rays on mammalian cells [Текст] / T. T. Puck, P. I. Marcus // J. Exp. Med. – 1956. – Vol. 103. – №5. – P. 653–666.

PUMA is directly activated by NF-kappaB and contributes to TNF-alpha-induced apoptosis [Текст] / P. Wang, W. Qiu, C. Dudgeon et al. // Cell Death Differ. – 2009. – Vol. 16. – №9. – P. 1192–1202.

Radford, S. J. Heteroduplex DNA in meiotic recombination in *Drosophila mei-9* mutants [Текст] / S. J. Radford, S. McMahan, H. L. Blanton, J. Sekelsky // Genetics. – 2007. – Vol. 176. – №1. – P. 63–72.

Ranjan, M. Repression of the mitochondrial peroxiredoxin antioxidant system does not shorten lifespan but causes reduced fitness in *C. elegans* [Текст] / M. Ranjan, J. Gruber, L. F. Ng, B. Halliwell // Free. Radic. Biol. Med. – 2013. – Vol. 63. – P. 381–389.

Reactive oxygen species promote TNF alpha-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases [Текст] / H. Kamata, S. Honda, S. Maeda et al. // Cell. – 2005. – Vol. 120. – №5. – P. 649–661.

Redeuilh, G. Subunit composition of the molybdate-stabilized "8–9 S" nontransformed estradiol receptor purified from calf uterus [Текст] / G. Redeuilh, B. Moncharmont, C. Secco, E. E. Baulieu // J. Biol. Chem. – 1987. – Vol. 262. – №15. – P. 6969–6975.

Redox control of cell death [Текст] / S. Ueda, H. Masutani, H. Nakamura et al. // Antioxid. Redox Signal. – 2002. – Vol. 4. – №3. – P. 405–414.

Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients [Текст] / M. Kaeberlein, R. W. Powers, K. K. Steffen et al. // Science. – 2005. – Vol. 310. – P. 1193–1196.

Relations of endogenous anabolic hormones and physical activity to bone mineral density and lean body mass in elderly men [Текст] / D. Rudman, P. J. Drinka, C. R. Wilson et al. // Clin Endocrinol (Oxf). – 1994. – Vol. 40. – №5. – P. 653–661.

Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis [Текст] / M. Verheij, R. Bose, X. H. Lin et al. // Nature. – 1996. – Vol. 380. – P. 75–79.

Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis [Текст] / A. Umar, A. B. Buermeier, J. A. Simon et al. // Cell. – 1996. – Vol. 87. – P. 65–73.

Restoring DNA repair capacity of cells from three distinct diseases by XPD gene-recombinant adenovirus [Текст] / M. G. Armelini, A. R. Muotri, M. C. Marchetto et al. // Cancer Gene Ther. – 2005. – Vol. 12. – №4. – P. 389–396.

Reversal of age-related increase in brain protein oxidation, decrease in enzyme activity, and loss in temporal and spatial memory by chronic administration of the spin-trapping compound N-tert-butyl- α -phenylnitron [Текст] / J. M. Carney, P. E. Starke-Reed, C. N. Oliver et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1991. – Vol. 88. – №9. – P. 3633–3636.

Richardson, A. Aging and the cellular response to stress: Reduction in the heat shock response [Текст] / A. Richardson, N. J. Holbrook // Cellular aging and cell death / Edited by N. J. Holbrook, G. R. Martin, R. A. Lockshin. – New York and Chichester: John Wiley & Sons Inc., 1996. – P. 67–80.

Ristow, M. Extending life span by increasing oxidative stress [Текст] / M. Ristow, S. Schmeisser // Free Radic. Biol. Med. – 2011. – Vol. 51. – №2. – P. 327–336.

RNA interference-mediated silencing of Sod2 in *Drosophila* leads to early adult-onset mortality and elevated endogenous oxidative stress [Текст] / K. Kirby, J. Hu, A. J. Hilliker, J. P. Phillips. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2002. – Vol. 99. – №25. – P. 16162–16167.

Roman, G. P[Switch], a system for spatial and temporal control of gene expression in *Drosophila melanogaster* [Текст] / G. Roman, K. Endo, L. Zong, R. L. Davis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – Vol. 98. – №22. – P. 12602–12607.

Rose, M. R. Genetics. of life history in *Drosophila melanogaster*. II. Exploratory selection experiments [Текст] / M. R. Rose, B. Charlesworth // Genetics. – 1981. – Vol. 97. – P. 187–196.

Sander, M. Characterization of the nuclease activity of *Drosophila* Rrp1 on phosphoglycolate- and phosphate-modified DNA 3'-termini [Текст] / M. Sander, S. M. Huang // Biochemistry. – 1995. – Vol. 34. – №4. – P. 1267–1274.

Sander, M. *Drosophila* Rrp1 3'-exonuclease: demonstration of DNA sequence dependence and DNA strand specificity [Текст] / M. Sander, D. Benhaim // Nucleic. Acids Res. – 1996. – Vol. 24. – №20. – P. 3926–3933.

Saunders, L.R. Cell biology. Stress response and aging [Текст] / L. R. Saunders, E. Verdin // Science. – 2009. – Vol. 323. – №5917. – P. 1021–1022.

Saunders, R. D. Identification and characterization of a *Drosophila* ortholog of WRN exonuclease that is required to maintain genome integrity [Текст] / R. D. Saunders, I. Boubriak, D. J. Clancy, L. S. Cox // Aging Cell. – 2008. – Vol. 7. – №3. – P. 418–425.

Scaffidi, P. The cell nucleus and aging: tantalizing clues and hopeful promises [Текст] / P. Scaffidi, L. Gordon, T. Misteli // PLoS Biol. – 2005. – Vol. 3. – №11. – P. 1855–1859.

Schreck, R. Nuclear factor κ B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review) [Текст] / R. Schreck, K. Albermann, P. A. Baeuerle // Free Radic. Res. Commun. – 1992. – Vol. 17. – P. 221–237.

Sekelsky, J. J. DNA repair in *Drosophila*: insights from the *Drosophila* genome sequence [Текст] / J. J. Sekelsky, M. H. Brodsky, K. C. Burtis // J. Cell Biol. – 2000. – Vol. 150. – №2. – P. F31–F36.

Seluanov, A. Changes in the level and distribution of Ku proteins during cellular senescence [Текст] / A. Seluanov, J. Danek, N. Hause, V. Gorbunova // DNA Repair. – 2007. – Vol. 6. – P. 1740–1748.

Sen, B. Transcriptional responses to complex mixtures: a review [Текст] / B. Sen, B. Mahadevan, D. M. DeMarini // Mutat. Res. – 2007. – Vol. 636. – №1–3. – P. 144–177.

Shamovsky, I. New insights into the mechanism of heat shock response activation [Текст] / I. Shamovsky, E. Nudler // Cell Mol. Life Sci. – 2008. – Vol. 65. – №6. – P. 855–861.

Shiozaki, K. Cell-cycle control linked to extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast [Текст] / K. Shiozaki, P. Russell // Nature. – 1995. – Vol. 378 – N6558. – P. 739–743.

Sies, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants [Текст] / H. Sies // Exp. Physiol – 1997. – Vol. 82. – P. 291–295.

Sies, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants [Текст] / H. Sies // Exp. Physiol. – 1997. – Vol. 82. – №2. – P. 291–295.

Signal transduction and cellular radiation responses [Текст] / R. K. Schmidt–Ullrich, P. Dent, S. Grant et al. // Radiat. Res. – 2000. – Vol. 153. – P. 245–257.

Sirtuin 6 (SIRT6) rescues the decline of homologous recombination repair during replicative senescence [Текст] / Z. Mao, X. Tian, M. Van Meter et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2012. – Vol. 109. – №29. – P. 11800–11805.

Skulachev V. P. The programmed death phenomena aging, and the Samurai law of biology [Текст] / V. P. Skulachev // Exp. Gerontol. – 2001. – Vol.36. – P. 995–1024.

Skulachev, V. P. NAD(P)(+) decomposition and antioxidant defense of the cell [Текст] / V. P. Skulachev // FEBS Lett. – 2001. – Vol. 492. – №1-2. – P. 1–3.

Slatter, D. A. The importance of lipid-derived malondialdehyde in diabetes mellitus [Текст] / D. A. Slatter, C. H. Bolton, A. J. Bailey // Diabetologia. – 2000 . – Vol. 43. – №5. – P. 550–557.

Smith, P. D. Mutagen sensitivity of *Drosophila melanogaster*. III. X-linked loci governing sensitivity to methyl methanesulfonate [Текст] / P. D. Smith // Mol. Gen. Genet. – 1976. – Vol. 149. – P. 73–85.

Sohal, R. S. Protein oxidative damage is associated with life expectancy of houseflies [Текст] / R. S. Sohal, S. Agarwal, A. Dubey, W. C. Orr // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1993. – Vol. 90. – №15. – P. 7255–7259.

Stadtman, E. R. Protein oxidation and aging [Текст] / E. R. Stadtman // Free Radic. Res. – 2006. – Vol. 40. – №12. – P. 1250–1258.

Staeva–Vieira, E. An essential role of DmRad51/SpnA in DNA repair and meiotic checkpoint control [Текст] / E. Staeva–Vieira, S. Yoo, R. Lehmann // EMBO J. – 2003. – Vol. 22. – №21. – P. 5863–5874.

Statistical methods for testing effects on "maximum lifespan" [Текст] / C. Wang, Q. Li, D. T. Redden et al. // Mech. Ageing Dev. – 2004. – Vol. 125. – P. 629–632.

Stearns, S. C. The evolution of life histories [Текст] / S. C. Stearns. – Oxford–New York: Oxford University Press, 1992. – 262 p.

Stress and radiation–induced activation of multiple intracellular signaling pathways [Текст] / P. Dent, A. Yacoub, J. Contessa et al. // Radiat. Res. – 2003. – Vol. 159. – P. 283–300.

Stuart, G. R. Mutation frequency and specificity with age in liver, bladder and brain of lacI transgenic mice [Текст] / G. R. Stuart, Y. Oda, J. G. de Boer, B. W. Glickman // Genetics. – 2000. – Vol. 154. – P. 1291–1300.

Student. The probable error of a mean [Текст] / Student // Biometrika. – 1908. – №6 (1). – P. 1–25.

Studies on a radio-resistant micrococcus. I. Isolation, morphology, cultural characteristics, and resistance to gamma radiation [Текст] / A. W. Anderson, H. C. Nordan, R. F. Cain et al. // Food Technol. – 1956. – №10. – P. 575–577.

Sun, L. Life–span extension in mice by preweaning food restriction and by methionine restriction in middle age [Текст] / L. Sun, A. A. Sadighi Akha, R. A. Miller, J. M. Harper // J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. – 2009. – Vol. 64. – №7. – P. 711–722.

Suzuki, K. Extremely low–dose ionizing radiation causes activation of mitogen–activated protein kinase pathway and enhances proliferation of normal human diploid cells [Текст] / K. Suzuki, S. Kodama, M. Watanabe // Cancer Res. – 2001. – Vol. 61. – P. 5396–5401.

Szilard, L. On the nature of the aging process [Текст] / L. Szilard // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1959. – Vol. 45. – №1. – P. 30–45.

Szumiel, I. Monitoring and signaling of radiation–induced damage in mammalian cells [Текст] / I. Szumiel // Radiat. Res. – 1998. – Vol. 150. – P. S92–S101.

Takada, S. *Drosophila* checkpoint kinase 2 couples centrosome function and spindle assembly to genomic integrity [Текст] / S. Takada, A. Kelkar, W. E. Theurkauf // Cell. – 2003. – Vol. 113. – №1. – P. 87–99.

Targeted cytoplasmic irradiation with alpha particles induces mutations in mammalian cells [Текст] / Wu L. J., Randers-Pehrson G., Xu A et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1999. – Vol. 96. – №9. – P. 4959–4964.

Telomere length and aging biomarkers in 70-year-olds: the Lothian Birth Cohort 1936 [Текст] / S. E. Harris, C. Martin-Ruiz, T. Von Zglinicki et al. // Neurobiol. Aging. – 2012. – Vol. 33. – №7. – P. 1486.e3–1486.e8.

Telomere lengths are characteristic in each human individual [Текст] / K. Takubo, N. Izumiyama-Shimomura, N. Honma et al. // Exp. Gerontol. – 2002. – Vol. 3. – №4. – P. 523–531.

Thannickal, V. J. Reactive oxygen species in cell signaling [Текст] / V. J. Thannickal, B. L. Fanburg // Am J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. – 2000. – Vol. 279. – №6. – P. L1005–L1028.

The antioxidant function of the p53 tumor suppressor [Текст] / A. A. Sablina, A. V. Budanov, G. V. Ilyinskaya et al. // Nat. Med. – 2005. – Vol. 11. – №12. – P. 1306–1313.

The common 90-kd protein component of non-transformed '8S' steroid receptors is a heat-shock protein [Текст] / M. G. Catelli, N. Binart, I. Jung-Testas et al. // EMBO J. – 1985. – Vol. 4. – №12. – P. 3131–3135.

The *Drosophila melanogaster* DmRAD54 gene plays a crucial role in double-strand break repair after P-element excision and acts synergistically with Ku70 in the repair of X-Ray damage [Текст] / R. Kooistra, A. Pastink, J. B. Zonneveld et al. // Mol. Cell. Biol. – 1999. – Vol. 19. – №9. – P. 6269–6275.

The free radical theory of aging revisited: the cell signaling disruption theory of aging [Текст] / J. Vina, C. Borras, K. Mohamed et al. // Antioxid. Redox Signal. – 2013. – Vol. 19. – №8. – P. 779–787.

The overexpression of major antioxidant enzymes does not extend the lifespan of mice [Текст] / V. I. Pérez, H. Van Remmen, A. Bokov et al. // Aging Cell. – 2009. – Vol. 8. – №1. – P. 73–75.

The oxidative DNA lesions 8,5'-cyclopurines accumulate with aging in a tissue-specific manner [Текст] / J. Wang, C. L. Clauson, P. D. Robbins et al. // Aging Cell. – 2012. – Vol. 11. – №4. – P. 714–716.

The pathological response to DNA damage does not contribute to p53-mediated tumour suppression [Текст] / M. A. Christophorou, I. Ringshausen, A. J. Finch et al. // Nature. – 2006. – Vol. 443. – P. 214–217.

The role of D-GADD45 in oxidative, thermal and genotoxic stress resistance [Текст] / A. Moskalev, E. Plyusnina, M. Shaposhnikov et al. // Cell Cycle. – 2012. – Vol. 11. – №22. – P. 4222–4241.

The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria [Текст] / A. A. Moskalev, M. V. Shaposhnikov, E. N. Plyusnina et al. // Ageing Res. Rev. – 2013. – Vol. 12. – №2. – P. 661–684.

The sirtuin SIRT6 regulates lifespan in male mice [Текст] / Y. Kanfi, S. Naiman, G. Amir et al. // Nature. – 2012. – Vol. 483. – №7388. – P. 218–221.

The transcription factor NFAT5 is required for cyclin expression and cell cycle progression in cells exposed to hypertonic stress [Текст] / K. Drews-Elger, M. C. Ortells, A. Rao et al. // PLoS One. – 2009. – Vol. 4. – P. e5245.

Thomas, A. M. Common variants of *Drosophila melanogaster* Cyp6d2 cause camptothecin sensitivity and synergize with loss of Brca2 [Текст] / A. M. Thomas, C. Hui, A. South, M. McVey // G3 (Bethesda). – 2013. – Vol. 3. – №1. – P. 91–99.

Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathway [Текст] / A. R. Clarke, C. A. Purdie, D. J. Harrison et al. // Nature. – 1993. – Vol. 362. – P. 849–851.

Tian, J. Comparison of acute proton, photon, and low-dose priming effects on genes associated with extracellular matrix and adhesion molecules in the lungs [Текст] / J. Tian, S. Tian, D. S. Gridley // Fibrogenesis Tissue Repair. – 2013. – Vol. 6. – №1. – P. 4.

Tissue-specific changes of DNA repair protein Ku and mtHSP70 in aging rats and their retardation by caloric restriction [Текст] / J. H. Um, S. J. Kim, D. W. Kim et al. // Mech. Ageing Dev. – 2003. – Vol. 124. – P. 967–975.

Tor1/Sch9-regulated carbon source substitution is as effective as calorie restriction in life span extension [Текст] / M. Wei, P. Fabrizio, F. Madia et al. // PLoS Genet. – 2009. – Vol. 5. – №5. – P. e1000467.

Tower, J. Hsps and aging [Текст] / J. Tower // Trends Endocrinol. Metab. – 2009. – Vol. 20. – №5. – P. 216–222.

Transcription profile of DNA damage response genes at G(0) lymphocytes exposed to gamma radiation [Текст] / D. Saini, S. Shelke, A. Mani Vannan et al. // Mol. Cell. Biochem. – 2012. – Vol. 364. – №1–2. – P. 271–281.

Transcriptional response of BALB/c mouse thyroids following in vivo astatine-211 exposure reveals distinct gene expression profiles [Текст] / N. Rudqvist, T. Z. Parris, E. Schuler et al. // EJNMMI Res. – 2012. – Vol. 2. – №1. – P. 32.

Tripathi, P. L-arginine attenuates oxidative stress condition during cardiomyopathy [Текст] / P. Tripathi, S. Pandey // Indian J. Biochem. Biophys. – 2013. – Vol. 50. – №2. – P. 99–104.

Tu, Y. DNA repair domains within a human gene: selective repair of sequences near the transcription initiation site [Текст] / Y. Tu, S. Tornaletti, G. P. Pfeifer // EMBO J. – 1996. – Vol. 15. – №3. – P. 675–683.

Two Molecularly Distinct G2/M Checkpoints Are Induced by Ionizing Irradiation [Текст] / B. Xu, S. T. Kim, D. S. Lim, M. B. Kastan // Molecular and cellular biology. – 2002. – Vol. 22. – №4. – P. 1049–1059.

United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. Sources and effects of ionizing radiation; UNSCEAR 2012. Report to the General Assembly, with scientific annexes [Текст] / NY: United Nations, 2012. – E.94. – IX.2. – P. 2.

Valentin, J. Low-dose extrapolation of radiation-related cancer risk [Текст] / J. Valentin // Ann ICRP. – 2005. – Vol. 35. – №4. – P. 1-140.

Van Raamsdonk, J. M. Deletion of the mitochondrial superoxide dismutase sod-2 extends lifespan in *Caenorhabditis elegans* [Текст] / J. M. Van Raamsdonk, S. Hekimi // PLoS Genet. – 2009. – Vol. 5. – №2. – P. e1000361.

Vanguards of paradigm shift in radiation biology: radiation-induced adaptive and bystander responses [Текст] / H. Matsumoto, N. Hamada, A. Takahashi et al. // J. Radiat. Res. – 2007. – Vol. 48. – №2. – P. 97–106.

Vayssier, M. Heat shock proteins chaperoning life and death [Текст] / M. Vayssier, B. S. Polla. // Cell Stress Chaperones. – 1998. – Vol. 3. – №4. – P. 221–227.

Verheij, M. Radiation-induced apoptosis [Текст] / M. Verheij, H. Bartelink // Cell Tissue Res. – 2000. – Vol. 301. – №1. – P. 33–42.

Vijg, J. Somatic mutations and aging: a re-evaluation [Текст] / J. Vijg // Mutat. Res. – 2000. – Vol. 447. – №1. – P. 117–135.

Vogelstein, B. Surfing the p53 network [Текст] / B. Vogelstein, D. Lane, A. J. Levine // Nature. – 2000. – Vol. 408. – P. 307–310.

Vyjayanti, V. N. DNA double strand break repair in brain: reduced NHEJ activity in aging rat neurons [Текст] / V. N. Vyjayanti, K. S. Rao // Neurosci. Lett. – 2006. – Vol. 393. – P. 18–22.

Wagner, E. F. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development [Текст] / E. F. Wagner, A. R. Nebreda // Nat. Rev. Cancer. – 2009. – Vol. 9 – №8. – P. 537–549.

Walker, G. Dietary restriction in *C. elegans*: from rate-of-living effects to nutrient sensing pathways [Текст] / G. Walker, K. Houthoofd, J. R. Vanfleteren, D. Gems // Mech. Ageing Dev. – 2005. – Vol. 126. – №9. – P. 929–937.

Wang, G. J. Induction of cell-proliferation hormesis and cell-survival adaptive response in mouse hematopoietic cells by whole-body low-dose radiation [Текст] / G. J. Wang, L. Cai // Toxicological Sciences. – 2000. – №53. – P. 369–376.

Wattiaux, J. M. Cumulative parental age effects in *Drosophila subobscura* [Текст] / J. M. Wattiaux // Evolution. – 1968. – Vol. 22. – P. 406–421.

Weinert, B. T. DNA strand displacement, strand annealing and strand swapping by the *Drosophila* Bloom's syndrome helicase [Текст] / B. T. Weinert, D. C. Rio // Nucleic. Acids Res. – 2007. – Vol. 35. – №4. – P. 1367–1376.

Weismann, A. Essays upon heredity and kindred biological problems [Текст] / A. Weismann. – Oxford: Claderon Press, 1889. – Vol. 1. – P. [xiii]-xv.

Weissmann, G. The experimental pathology of stress: Hans Selye to Paris Hilton [Текст] / G. Weissmann // FASEB J. – 2007. – Vol. 21. – №11. – P. 2635–2638.

Welch, W. J. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease [Текст] / W. J. Welch // Physiol. Rev. – 1992. – Vol. 72. – №4. – P. 1063–1081.

Wichmann, A. Ionizing radiation induces caspase-dependent but Chk2- and p53-independent cell death in *Drosophila melanogaster* [Текст] / A. Wichmann, B. Jaklevic, T. T. Su // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2006. – Vol. 103. – №26. – P. 9952–9957.

Williams, G. C. Pleiotropy – natural selection and the evolution of senescence [Текст] / G. C. Williams // Evolution. – 1957. – Vol. 11. – P. 398–411.

Wright, E. G. Manifestations and mechanisms of non-targeted effects of ionizing radiation [Текст] / E. G. Wright // *Mutat. Res.* – 2010. – Vol. 687. – №1–2. – P. 28–33.

Yang, W. A Measurable increase in oxidative damage due to reduction in superoxide detoxification fails to shorten the life span of long-lived mitochondrial mutants of *Caenorhabditis elegans* [Текст] / W. Yang, J. Li, S. Hekimi // *Genetics.* – 2007. – Vol. 177. – №4. – P. 2063–2074.

Yankner, B. A. The aging brain [Текст] / B. A. Yankner, T. Lu, P. Loerch // *Annu. Rev. Pathol.* – 2008. – Vol. 3. – P. 41–66.

Zhang, J. H. Caspases, apoptosis and aging [Текст] / J. H. Zhang, Y. Zhang, B. Herman // *Ageing Res. Rev.* – 2003. – №2. – P. 357–366.

Zhang, J. The role of the BRCA1 tumor suppressor in DNA double-strand break repair [Текст] / J. Zhang, S. N. Powell // *Mol. Cancer Res.* – 2005. – Vol. 3. – №10. – P. 531–539.

Zhang, W. Ectopic expression of MyD118/Gadd45/CR6 ($Gadd45\beta/\alpha/\gamma$) sensitizes neoplastic cells to genotoxic stress-induced apoptosis [Текст] / W. Zhang, B. Hoffman, D. A. Liebermann // *Int. J. Oncol.* – 2001. – Vol. 18. – P. 749–757.

Zhao, H. Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation-induced S and G2 checkpoints [Текст] / H. Zhao, J. L. Watkins, H. Piwnica-Worms // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – Vol. 99. – P. 14795–14800.