

УДК 577.3+577.158.1+575.113+577.71

## Митохондрии: окислительный стресс и мутации митохондриальной ДНК в развитии патологий, процессе старения и апоптозе

И. Н. Тодоров

*ИГОРЬ НИКОЛАЕВИЧ ТОДОРОВ — доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник Института проблем химической физики РАН (ИПХФ РАН). Область научных интересов: биохимия, молекулярная и субклеточная биология явлений стресса и старения, молекулярная радиобиология.*

142432 Московская область, Черноголовка, просп. Акад. Семенова, д. 1, ИПХФ РАН, E-mail int@icp.ac.ru

Исследования роли свободных радикалов в различных областях биологии и медицины, фундамент которых был более 40 лет назад заложен приоритетными работами школы академика Н.М. Эмануэля, раскрыли не только физико-химическую природу взаимодействия этих частиц с компонентами живых систем на всех уровнях их организации, но и позволили создать основу для поиска эффективных путей противодействия таким явлениям, как старение, состояние стресса, лучевая и дегенеративные болезни и многие другие патологии, в развитие которых свободные радикалы вносят подчас решающий вклад.

За истекшие 15–20 лет изучению окислительного стресса и его влияния на разные уровни организации целостного организма было посвящено огромное количество работ [см., например, 1, 2]. В данной статье сосредоточено внимание на «авансцене» событий, определяющих развитие окислительного стресса в клетке, т.е. на клеточных органеллах, где протекают основные реакции энергетического метаболизма, — митохондриях — этих эволюционных симбионтов эукариотических клеток [3].

Список использованных сокращений и обозначений

### Вещества

АТФ, АТР — аденозинтрифосфорная кислота  
 АДФ, АДР — аденозиндифосфорная кислота  
 GPX — глутатионпероксидаза  
 FADH<sub>2</sub> — восстановленная форма флавинадениндинуклеотида  
 NADH — восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотида  
 FAD — флавиномононуклеотид  
 F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>АТФ-синтетаза — крупный ферментный комплекс, образуемый девятью полипептидными цепями. Пять из них составляют сферическую головку комплекса, называемую F<sub>1</sub>-АТФ-синтетазой, где и происходит синтез АТФ. Четыре оставшиеся полипептидные цепи формируют гидрофобную субструктуру F<sub>0</sub>, встроенную во внутреннюю митохондриальную мембрану, и представляют собой «канал», через который протоны переходят к активному центру АТФ-синтетазы, т.е. к F<sub>1</sub>.  
 ND<sub>1–6</sub> — субъединицы фермента NADH-дегидрогеназы

### Термины

bp — пара азотистых оснований (base pair)  
 КБ — тысяча пар оснований (kilobase)  
 Транзиция — замена одного пиримидина на другой пиримидин или одного пурина на другой пурин  
 Трансверсия — замена пиримидина на пурин или, наоборот, пурина на пиримидин  
 Турновер — постоянное самообновление предсуществующих субклеточных структур, макромолекул и их комплексов путем распада и последующей замены их на синтезированные *de novo* аналоги  
 Процессинг — высокоспецифичное расщепление крупного транскрипта — предшественника — на входящие в его состав функционально активные молекулы РНК  
 Wobble позиция — «качание» или неоднозначное соответствие третьего основания антикодона. Если первые два основания антикодона спариваются с соответствующими основаниями кодона строго по правилу Уотсона—Крика, то в третьем положении допускается нарушение этого правила комплементарности, что является одной из причин вырожденности генетического кода.

### Митохондриальные болезни

MELAS — митохондриальная энцефаломиопатия, молочный ацидоз и случаи, подобные припадку  
 MERRF — миоклональная эпилепсия с красными шероховатыми фибриллами  
 LHON — наследственная мышечная оптическая невропатия Лебера  
 NARP — неврогенная слабость, атаксия (неспособность к координации мышц при произвольных движениях) и пигментозный ретинит  
 NIDDM — независимый от инсулина диабет mellitus  
 Миоклония — подергивания или судороги мышцы или группы мышц  
 Leigh-синдром — митохондриальная болезнь, связанная с мутацией ядерного гена, кодирующего сукцинатдегидрогеназу, и с мутацией митохондриального гена, кодирующего одну из субъединиц цитохром *c*-оксидазы  
 DS — синдром Дауна.

### Окислительный стресс

Традиционно митохондрии рассматривались как «электростанции» клетки, производящие основную массу АТФ. В течение более пяти десятилетий многие исследования, проведенные на этих органеллах, фокусировались на объяснении молекулярных событий, связанных с синтезом АТФ путем окислительного фосфорилирования, и на изучении биогенеза механизмов этого сложного процесса.

В последние годы биологи и биомедики осознали, что митохондрии вовлечены также и в другие процессы, крайне важные для жизни высших организмов. Окислительный стресс, клеточная смерть, старение, митохондриальные болезни, канцерогенез, как это ни удивительно, связаны по крайней мере частично с процессами окислительного фосфорилирования, структурной целостностью митохондрий и информационной идентичностью их генетического аппарата — митохондриальной ДНК (мтДНК).

Как главный внутриклеточный поставщик энергии в форме АТФ, митохондрии поглощают более 90% кислорода, потребляемого клетками высших животных и человека. При нормальных физиологических условиях 1—5% кислорода, используемого митохондриями, преобразуется в супероксидные анион-радикалы ( $O_2^{\bullet-}$ ), которые, будучи относительно инертными, являются предшественниками других активных форм кислорода, таких как пероксид водорода и радикалы гидроксила [2].

Активные формы кислорода способны повреждать жизненно важные структуры клетки, особенно мембраны, где они индуцируют процессы пероксидного окисления липидов, и информационные макромолекулы — белки, РНК и ДНК.

Митохондриальная цепь электронного транспорта является мощным источником активных форм кислорода. Чем выше уровень функционирования этой цепи, т.е. продукции АТФ, тем выше уровень генерации этих активных частиц. Возможность развития окислительного стресса зависит от уровня продукции каждой из активных форм кислорода, скорости их относительной нейтрализации и эффективности их поражающего действия на репарирующие системы клетки. Дисбаланс этих факторов может вызвать серьезную дисфункцию митохондрий. Для каждой индивидуальной активной формы кислорода характерен собственный механизм образования и детоксикации, собственный профиль реакции с биологическими реагентами, что и определяет специфику патологического эффекта [2, 4, 5].

Образованию этих вредоносных побочных продуктов дыхания в нормальных физиологических условиях, как правило, противостоят защитные системы митохондрий, включающие антиокислительные ферменты — марганцевую супероксиддисмутазу (MnСОД), каталазу и глутатионпероксидазу — и целый комплекс эндогенных низкомолекулярных антиоксидантов. Однако, как при нормальных физиологических условиях, так и особенно при функциональных перегрузках, старении клеток и тканей и некоторых патологических состояниях, существенная доля активных форм кислорода может «избегать» систем антиокисления и индуцировать окислительные повреждения макромолекул (полисахаридов, липидов, белков, нуклеиновых кислот) и их надмолекулярных комплексов различной

сложности (клеточных и субклеточных мембран, элементов клеточного «скелета» и т.п.), т.е. вызывать состояние окислительного стресса [6—9]. Как следствие этих и других повреждений биоэнергетические функции митохондрий ослабевают с возрастом, становятся дефектными у пациентов, страдающих митохондриальными болезнями, а в критической ситуации могут вовлекаться в процесс запрограммированной клеточной смерти — апоптоз. Все эти явления есть интегральный результат как увеличения производства активных форм кислорода, так и недостаточной продукции АТФ в митохондриях [5, 10].

*Митохондриальная дыхательная цепь.* Работу дыхательной цепи митохондрий обеспечивают четыре ферментных комплекса:

NADH-убихинон (CoQ)-оксиредуктаза (Комплекс I), сукцинат-убихинон (CoQ)-оксиредуктаза (Комплекс II), убихинол-цитохром *c*-оксиредуктаза (Комплекс III), цитохром *c*-оксидаза (Комплекс IV).

NADH и FADH<sub>2</sub>, которые непрерывно продуцируются различными дегидрогеназами при биологическом окислении моносахаридов, жирных кислот и аминокислот, служат источниками электронов для Комплекса I или II дыхательной цепи. Кофермент Q (убихинон или CoQ) челочно переносит электроны между этими двумя комплексами и Комплексом III, и молекулярный кислород в конечном счете принимает электроны от Комплекса IV [10]. Митохондрии продуцируют АТФ при связывании генерируемого при работе дыхательной цепи протонного градиента с управляемым протонами фосфорилированием АДФ под действием комплекса F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>АТФ-синтазы (Комплекс V, рис. 1).

По дыхательной цепи передаются электроны от восстановленного субстрата к кислороду, а протоны под действием разности окислительно-восстановительного потенциала «прокачиваются» через внутреннюю мембрану митохондрии, стабилизируя градиент протонного электрохимического потенциала, который запускает синтез АТФ с помощью F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>АТФ-синтазы в комплексе V (см. рис. 1). Градиент электрохимического протонного потенциала связан как с мембранным потенциалом, так и с градиентом рН. Ряд дефектов в комплексах I, III или IV (как и в комплексе V) возникает в результате окислительного стресса, вызывающего мутации в генах мтДНК, кодирующих полипептиды, которые функционируют в составе данных комплексов. Эти дефекты нарушают работу дыхательной цепи, уменьшают градиент митохондриального протонного потенциала и препятствуют синтезу АТФ в митохондриях, даже если сама АТФ-синтаза не затронута [10]. Напротив, мутации в одном гене АТФ-синтазы не влияют на способность митохондриальной дыхательной цепи стабилизировать градиент электрохимического протонного потенциала, но предотвращают синтез АТФ.

*Комплекс I как источник супероксидных радикалов.* Имеются две главные области дыхательной цепи, где генерируются активные формы кислорода: одна — это Комплекс I [11, 12], другая — Комплекс III [13]. При нормальных физиологических условиях одна митохондрия печени крыс может генерировать приблизительно  $3 \cdot 10^7$  супероксидных анион-радикалов в сутки [6].

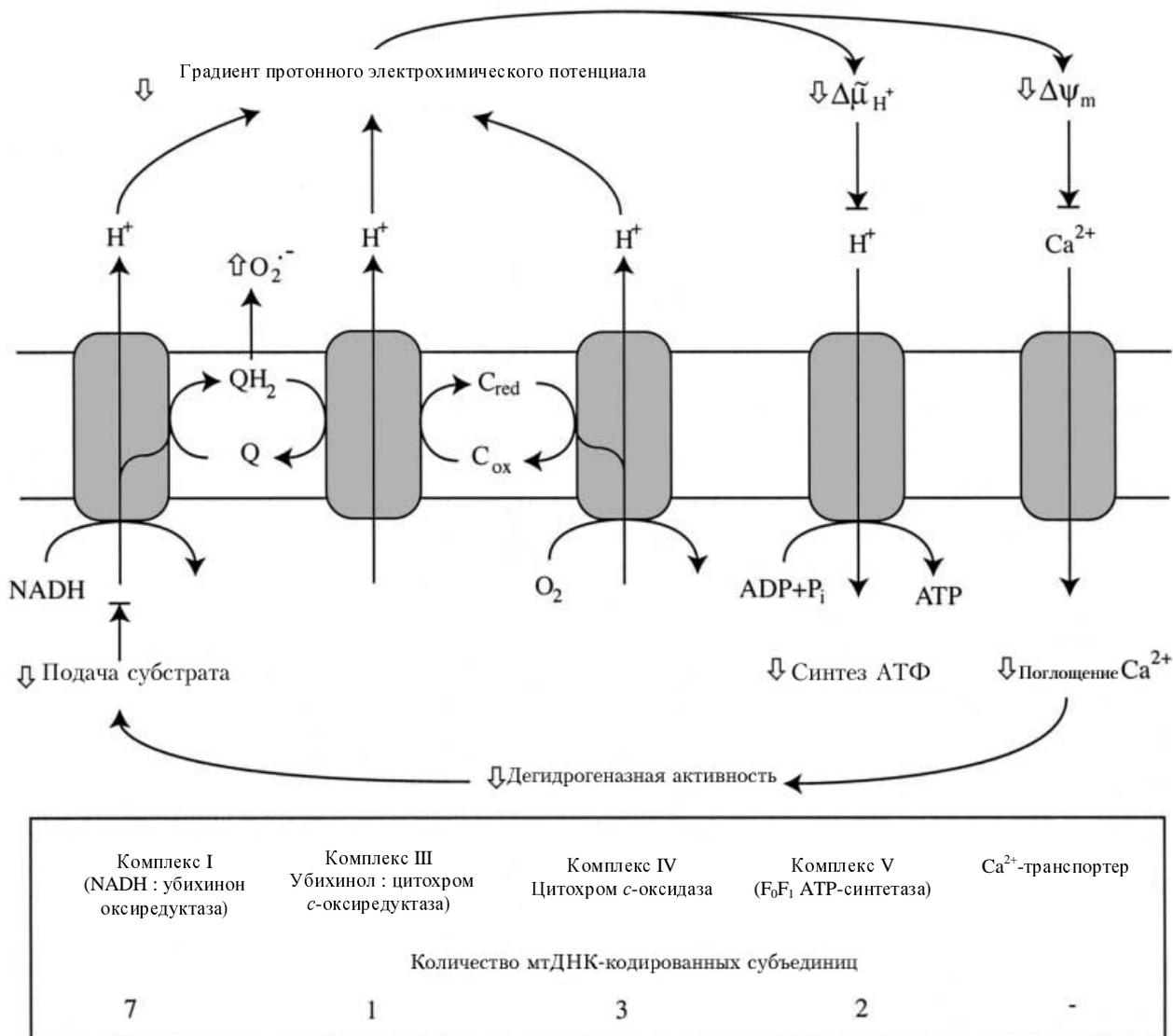


Рис. 1. Влияние мутаций мтДНК на окислительное фосфорилирование и поглощение кальция.

Q — убинон; QH<sub>2</sub> — убинол; C<sub>ox</sub> — окисленный феррицитохром с; C<sub>red</sub> — восстановленный феррицитохром с; Δμ<sub>H<sup>+</sup></sub> — движущая сила протона; Δψ<sub>m</sub> — потенциал митохондриальной мембраны; P<sub>i</sub> — неорганический фосфат. Адаптированный вариант рисунка из [13]

Наибольший вклад в производство супероксида вносит Комплекс I, который представляет собой первый локальный участок окислительного фосфорилирования (см. рис. 1). Этот еще мало понятый, сложный и совершенный ферментный комплекс (43 субъединицы у млекопитающих, семь из которых закодировано в мтДНК, несколько простетических групп, включая FMN и, по крайней мере, семь железосерных кластеров, а также несколько молекул CoQ, связанных с белками) является одноэлектронным донором, передающим электрон кислороду, и редокс-центром, локализованным перед участком, содержащим три различных связанных типа CoQ. Поскольку семь из 13 структурных генов в мтДНК кодируют полипептиды для Комплекса I, следовательно, Комплекс I с наибольшей вероятностью может подвергаться функциональным изменениям. По-видимому, именно здесь происходит процесс восстановления кислорода и об-

разуются супероксидные анион-радикалы. Очевидно, в этом месте цепь электронного транспорта оказывается несколько «негерметичной» (рис. 2) [14, 15].

Группа итальянских исследователей [15] предложила интересную модель локализации конкретного участка цепи электронного транспорта в Комплексе I, с которого происходит утечка электронов в окружающее пространство. Согласно их результатам, функционирование комбинации специфических ингибиторов, действующих на трех различных участках Комплекса I, связывающих хиноны, приводит к повышению генерации супероксида. Это указывает на то, что участок восстановления кислорода находится выше участков Комплекса I, связывающих хиноны (см. рис. 2). По всей вероятности, FeS-кластер (N2) является донором электронов для первой молекулы связанного убинона [16, 17]. Этот центр (N2), по-видимому, также поставляет электроны к кислороду непосред-

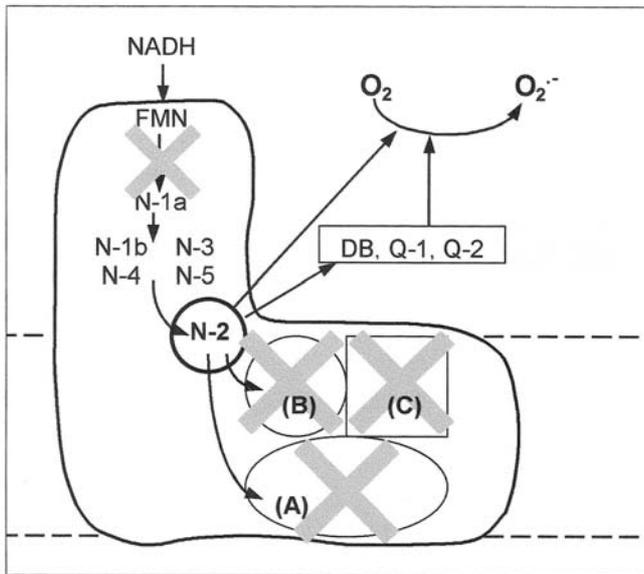


Рис. 2. Модель электронного транспорта и участка Комплекса I, продуцирующего супероксидные анион-радикалы.

Для построения схемы использована модель *Degli Esposti* [12]. Центр N-2 — FeS-кластер, источник электронов для связанного убихинона (центр В) и для молекулы убихинона, поступающей из пула (центр А). Эти два «полувосстановленных» убихинона (убисемихиноны) дисмутируют так, чтобы центр В содержал окисленный убихинон, а восстановленный убисемихинон (убихинол) переместился к центру С, из которого он выделяется в пул. Эффекты различных ингибиторов (на схеме отмечены знаком X) и акцепторов (FMN, N-1a, N-1b, N-3, N-4, N-5) сопряжены с FeS-кластером как источником одного электрона, поставляемого к кислороду или к экзогенным хинонам (DB — децилубихинон, Q-1, Q-2 и др.) которые восстанавливают кислород

венно или через одноэлектронное восстановление нескольких экзогенных хинонов. В согласии с этой гипотезой находятся результаты исследования CoQ-обедненных и восстановленных митохондрий, которые показали, что эндогенный CoQ не требуется для генерации супероксида. Таким образом, экзогенные хиноны предпочтительно восстанавливаются в пуле убихинона, но низкая, хотя и существенная доля молекул хинона может прямо реагировать на месте эндогенных хинонов, связанных с N2 (см. рис. 2) [15].

Комплекс I в наибольшей мере подвержен возрастным изменениям, что приводит к жесткому ограничению скорости электронного транспорта и, соответственно, к повышенной генерации активных форм кислорода. Помимо радикала  $O_2^{\bullet-}$ , который под действием супероксиддисмутазы дисмутирует в пероксид водорода, из  $H_2O_2$  в присутствии двухвалентного железа образуется в высокоактивный радикал гидроксила  $\cdot OH$ . Дополнительно существенным источником  $H_2O_2$  является окислительное дезаминирование биогенных аминов, протекающее во внутренней митохондриальной мембране под действием фермента моноаминоксидазы, что способствует увеличению стабильной концентрации активных форм кислорода в пределах матрикса митохондрий и цитозоля [19]. Кроме того, активные формы кислорода реагируют с оксидом азота внутри митохондрий, повышая концентрацию высокоактивного пероксинитрита ONOO [20].

Постепенно вырисовывается следующая общая картина: субклеточная сигнализация, связанная с активными формами кислорода и азота, важна как для клеточной физиологии, так и патологии, при этом изменения в скорости потока NO либо  $O_2^{\bullet-}$  могут сдвигать биологические сигналы в направлении, характерном для коммуникаций при патологиях, что будет определять возникновение и развитие болезней [21].

### Мутации митохондриальной ДНК

ДНК может испытывать множество различных повреждений, способных аккумулироваться, но окислительные повреждения среди них, как полагают, наиболее важные. Согласно расчету, за сутки клетка может подвергаться 10000 окислительным ударам [22]. Особое значение имеют окислительные повреждения клеточной ДНК, связанные с повреждениями ядерной ДНК и их репарацией (исправление повреждений), опосредованной путем активации поли(АДФ)полимеразы-1 [23], с повреждениями теломерной ДНК и их вкладом в управляемое теломером клеточное старение и патологии [24] и с накоплением повреждений и мутаций в митохондриальной ДНК, значительно превосходящими повреждения ядерной и теломерной ДНК [25].

*Генетическая карта, информационная емкость и особенности структуры мтДНК.* Система окислительного фосфорилирования содержит более 80 полипептидов, но только 13 из них закодированы в мтДНК. Все другие белки, содержащиеся в митохондриях, — продукты ядерных генов (более 600) — транслируются в цитоплазме и затем транспортируются в митохондрии [26]. Поэтому функции митохондрии зависят от импорта этих белков, в частности, ферментов для репликации, транскрипции [27], трансляции и репарации мтДНК [28]. Синтез гема, окисление субстратов в цикле трикарбонных кислот (цикл Кребса), деградация жирных кислот путем  $\beta$ -окисления, цикл мочевины и регуляция апоптоза — все эти процессы и реакции также осуществляются под действием белков и ферментов, закодированных в генах ядерной ДНК, хотя локализуется и функционируют они в митохондриях [25].

Митохондриальная ДНК человека — представляет собой двуниевую молекулу ДНК в форме замкнутого круга с 16569 парами азотистых оснований (bp), ее полностью расшифрованная нуклеотидная последовательность опубликована в 1981 году [29]. В отличие от ядерной ДНК, мтДНК не имеет интронов (т.е. участков, не кодирующих структуру белка или РНК). Смещенная петля (Д-петля) — единственная не кодирующая область мтДНК человека, приблизительно 1,1 КБ (KiloBase — тысяча пар оснований). Эта область содержит иницирующий участок (On) для репликации мтДНК и промоторы транскрипции как тяжелой (H), так и легкой (L) нитей мтДНК. В мтДНК закодированы 13 полипептидов, которые вместе с полипептидами, закодированными в ядерной ДНК, формируют в митохондриях дыхательные ферменты Комплексов I, III, IV и V. Только Комплекс II полностью закодирован в ядерной ДНК. В промежутках внутри последовательности, кодирующей полипептиды, находятся 22 гена тРНК и 2 гена рРНК, продукты которых существенны для белкового синтеза в мито-

хондриях [30, 31]. Все гены, закодированные в мтДНК, весьма важны для митохондриального дыхания и окислительного фосфорилирования, и любая мутация в мтДНК, которая ведет к нарушению экспрессии этих генов, в будущем может вызвать недостаточность энергетического метаболизма.

*Восприимчивость мтДНК к поражениям и мутациям.* Мутации в митохондриальном геноме заслуживают особого внимания, поскольку они возникают со скоростью в 16 раз большей, чем в ядерной ДНК (в печени крыс одно поражение на 8000 против одного поражения на 130000 пар нуклеотидов [6]), хотя согласно более поздним оценкам число повреждений значительно больше [25, 39]. Активные формы кислорода играют первостепенную роль в повреждении мтДНК. Наиболее обильным среди продуктов окисления нуклеотидов является 8-гидрокси-20-дезоксигуанозин, присутствие которого в ДНК обычно служит индикатором окислительных повреждений ДНК [6].

Экстраординарную способность мтДНК к мутагенезу связывают с рядом ее специфических особенностей. В отличие от ядерной ДНК, мтДНК не защищена гистонами и не имеет эффективной системы репарации, аналогичной системе репарации ядерной ДНК. Известно, что мтДНК прикреплена к внутренней митохондриальной мембране, в которой дыхательной цепью непрерывно продуцируется значительное количество активных форм кислорода [8, 32]. Сверх того показано, что некоторые области мтДНК (например, Д-петля — контрольная область инициации репликации) особенно чувствительны к окислительной атаке активных радикалов и склонны к повышению уровню мутагенеза [33, 34]. Многие из соматических мутаций мтДНК в раковых опухолях человека локализованы именно в Д-петле и в особенности на протяжении полицитидинового тракта (С-тракт), названного D310. Область D310 обнаруживает вариабельность полиморфной длины у разных индивидов: она описана как «горячее пятно» для соматических мутаций мтДНК во многих типах рака [35]. Например, многократные мутации в контрольной области мтДНК фиксировались в опухоли простаты человека, что позволило предположить существование уникального митохондриального гипермутагенеза, опосредованного, вероятно, окислительным стрессом [36].

Данные о высоком уровне мутагенеза в контрольной области репликации мтДНК хорошо объясняют впервые обнаруженный еще в 60-х годах прошлого века А.П. Галкиным и И.Н. Тодоровым эффект исключительно высокой радиационной уязвимости биосинтеза мтДНК по сравнению с биосинтезом ядерной ДНК печени (опыты на крысах с  $\gamma$ -облучением в сублетальной дозе) [37], что фактически равноценно поражающему действию активных форм кислорода.

Показано также, что «горячие точки» для окислительной модификации и мутаций мтДНК локализованы в/или около необычных структур, включая скрученную, антискрученную и отличные от В-формы структуры мтДНК человека [33, 34]. Эти структурные особенности делают мтДНК уязвимой для воздействий свободных радикалов.

Ряд наблюдений показывает, что высокая восприимчивость мтДНК к окислительному повреждению и мутациям индуцируется широким набором как эндо-

генных, так и экзогенных стрессогенных факторов. Дефекты мтДНК способствуют аккумуляции изменений ее структуры и функции и, соответственно, прогрессии болезней и старению [38].

*Мультикопийная природа и внутриклеточное распределение мтДНК.* Ввиду большого количества молекул мтДНК, которое оценивается в несколько сотен или тысяч на клетку, митохондриальную генетику по существу следует признать внутриклеточной популяционной генетикой, связанной с высокой изменчивостью, дивергенцией, а также с явлениями отбора и сегрегации, что и определяет мультикопийную природу «интегрального» митохондриального генома клетки. Кроме того, внутриклеточное распределение молекул мтДНК играет важную роль в проявлении мутаций. Благодаря динамичной компартиментализации молекул мтДНК внутри митохондрии, которая обуславливает способность этих молекул и/или их продуктов взаимодействовать друг с другом, существует возможность функциональных различий между митохондриями, локализованными в разных участках клетки [39]. Это обстоятельство впечатляюще иллюстрируется функциональными различиями между синаптическими митохондриями и митохондриями клеточного тела нейронов [40]. Локальные различия во внутриклеточной и изменения во внеклеточной средах могут определять генетические и функциональные пороги чувствительности органеллы, зависящей от специфики субклеточного компартамента, который в данный момент является «резиденцией» митохондрии [39].

*Межклеточная мозаичность.* Другим важным фактором, который нужно учитывать при анализе роли мутаций мтДНК в процессах старения, болезней [43] и апоптоза, является особенность их внутриклеточной локализации, в частности, локализации дефектов активности дыхательных ферментов, наблюдавшихся в ряде исследований [41, 42].

Межклеточная мозаичность мутаций мтДНК позволяет оценить влияние данной мутации на межклеточную кооперацию с точки зрения функционального состояния ткани.

*Материнская наследственность.* Митохондрии и мтДНК человека наследуются по материнской линии [44, 45]. В зрелом ооците млекопитающих число копий мтДНК увеличивается приблизительно до 100000, тогда как в сперматозоидах содержится всего до 100 копий [46]. Тем не менее в яйцеклетку при оплодотворении может входить некоторое количество отцовских митохондрий [47]. Однако эта малая доля отцовской мтДНК в оплодотворенном ооците быстро деградирует и элиминируется после оплодотворения и на ранней стадии эмбриогенеза [48]. Так, большинство (но не все) мутации мтДНК передается по материнской линии, но при мужских митохондриальных болезнях генетический дефект мтДНК не может передаваться следующему поколению [49]. Почти все патогенные точечные мутации мтДНК наследуются по материнской линии.

*Гетероплазмия, сортировка, пороговый эффект.* Типичная клетка человека обычно содержит сотни митохондрий и тысячи копий мтДНК [50]. Теоретически все индивидуальные молекулы мтДНК идентичные — так называемые гомоплазмические. Однако два или более разных генотипов мтДНК (их примерно 10

на митохондрию) может сосуществовать в пределах одной митохондрии, клетки, органа, индивида — явление гетероплазмии. Хотя патогенные точечные мутации мтДНК, связанные с наследственной оптической невропатией Лебера, почти неизменно являются гомоплазмическими, большинство патогенных мутаций мтДНК человека гетероплазмические [51].

В результате клеточного деления некоторые доли мутантной мтДНК могут быть переданы к дочерним клеткам случайным способом. Случайная сортировка молекул мтДНК в процессе митоза и в период развития может приводить как к высокому уровню мутантной мтДНК в одних клетках, так и к низкому их уровню в других клетках [52]. Неравное разделение митохондриальных геномов в ходе цитокинеза может вызвать различия в митохондриальных генотипах между дочерними клетками, а также случайный генетический дрейф [53]. Кроме того, степень гетероплазмии в пределах клеток одной ткани может изменяться на протяжении всей жизни индивида [8]. Поврежденная митохондрия с высоким уровнем мутантных ДНК способна к пролиферации в постмитотических клетках ткани путем неизвестного пока механизма и, таким образом, увеличивать вклад мутантных мтДНК. Напротив, в быстро делящихся клетках мутантные мтДНК обычно встречаются в относительно более низком соотношении [54].

Крупномасштабные делеции, вставки и тандемные дубликации мтДНК обычно не обнаруживаются в клетках крови, а пропорция мтДНК с точечными мутациями в них вообще ниже, чем таковая в мышце пациентов с митохондриальными болезнями [8, 38]. Следовательно, отсутствие мутаций мтДНК в пробах крови не может служить основанием для исключения митохондриальной болезни [55]. Напротив, высокие уровни мутаций мтДНК обычно регистрируют в постмитотических тканях, таких как сердечная и скелетная мышцы и кожные ткани больных. Крупномасштабные делеции или точечные мутации мтДНК вообще обнаруживаются в биопсиях мышцы приблизительно у 70% больных митохондриальными болезнями [55].

Надежно установлено, что митохондриальные функциональные дефекты не представляют серьезной опасности, пока пропорция мутантных мтДНК не достигает высокого уровня, который определяется на основе концепции «порогового эффекта». У больных с синдромом MELAS уровень A3243G мутации в скелетной мышце строго связан с проявлениями этой митохондриальной болезни (припадки, эпилепсия и деменция) [56, 57]. Точно так же уровень мутации A8344G коррелирует со степенью мозжечковой атаксии и миоклонии больных с MERRF синдромом [58]. Молекулярный генетический анализ мутаций мтДНК в биопсиях мышцы обычно дает более точную диагностику митохондриальной болезни. Однако для большинства патогенных мутаций соотношения между генотипом мтДНК и клиническим фенотипом более сложные [59].

Следует отметить, что значительные различия по степени гетероплазмии отмечаются обычно у родовых носителей патогенных мутаций мтДНК. Женщина с гетероплазмическими мутантами мтДНК вообще передает переменное количество мутантной мтДНК каждому

из своих детей. Это может приводить в широких пределах к различным клиническим фенотипам в следующих поколениях — от бессимптомных индивидов до значительно пораженных потомков с прогрессирующей фатальной нервно-мышечной болезнью [57].

Органы с высокоэнергетическими потребностями (скелетные и сердечные мышцы и центральная нервная система) значительно чаще затрагиваются митохондриальными болезнями [25]. Таким образом, порог чувствительности зависит не только от типа мутаций мтДНК, но также от энергопотребления индивидуальных клеток и тканей [38, 55].

Итак, вариабельность гетероплазмических мутаций мтДНК в различных тканях вместе с тканеспецифичными различиями в пороге чувствительности к мутациям мтДНК и в энергетических потребностях может привести к высокопеременным клиническим фенотипам, наблюдаемым у пациентов с митохондриальными болезнями [60, 61].

#### **Классификация мутаций мтДНК, связанных с митохондриальными болезнями**

Митохондриальные болезни могут возникнуть в любой ткани тела, но в мозге и скелетных мышцах эти болезни развиваются наиболее часто, очевидно, вследствие значительно более высокого, чем в других тканях, уровня метаболизма. Расстройства митохондриальной дыхательной системы часто вызывают митохондриальную миопатию (мышечная дистрофия), которая может быть первичным клиническим проявлением или связанным симптомом митохондриальной болезни [47, 62]. Нарушение процесса окислительного фосфорилирования у больных также ассоциируется с общими неврологическими расстройствами, включая парез глазных мышц, пигментозный ретинит, глухоту, атаксию, припадки, деменцию и периферийную невропатию [63—68]. Кроме того, у больных без неврологических симптомов могут развиваться кардиомиопатия, диабет или эндокринная дисфункция [69—71]. Следует отметить, что хотя мутации ядерной ДНК также могут вызывать митохондриальную дисфункцию, причиной большей части митохондриальных болезней являются мутации именно в мтДНК [72].

Мутации мтДНК человека подвержены реаранжировке, когда гены мтДНК оказываются удаленными или дублированными, возникают точечные мутации в генах тРНК или рРНК, а также точечные мутации в генах, программирующих полипептиды, что вызывает нарушение генетического смысла и приводит к изменениям функции действующих полипептидов, которые составляют систему окислительного фосфорилирования.

В последующих разделах на молекулярном уровне описаны биологические, биохимические и патологические последствия некоторых типов мутаций мтДНК.

*Делеции мтДНК.* Крупномасштабные делеции были первыми мутациями в мтДНК, которые связывали с человеческими болезнями [73]. Эти делеции мтДНК, обычно гетероплазмические, как правило, удаляют несколько генов, кодирующих субъединицы дыхательных ферментов, и гены тРНК в митохондриальном геноме [69]. Установлено, что мтДНК с делециями редко передаются от матерей к их детям и обычно являются спорадическими [51]. В ряде случаев продукт

дупликации мтДНК оказывался более протяженным, чем дикий тип мтДНК и содержал две тандемно расположенные молекулы, состоящие из мтДНК полной длины и делетированной мтДНК [74].

Наибольшая вариабельность в количестве делеций величиной в 5 КБ наблюдается в различных областях мозга (субстанция *nigra*, хвостатое ядро и «скорлупа» [75]), наименьшая — в мозжечке [76]. Биохимические дефекты и клинические признаки были не очевидны до тех пор, пока количество геномов, имеющих делецию мтДНК, не достигало критической величины, которая по некоторым данным составляет 50% [77].

Интересные результаты были получены при исследовании окислительных повреждений мтДНК в скелетной мышце больных хронической уремией [78]. Установлено, что у этих больных крупномасштабные делеции мтДНК с высокой частотой происходят между позициями 7900 и 16300 bp. Среди них делеция в позиции 4977 bp наиболее частая и наиболее масштабная в уремиической скелетной мышце. Уровень делеций мтДНК в 4977 bp положительно коррелирует с содержанием 8-гидрокси-20-дезоксигуанозина в тотальной ДНК мышцы. Методами PCR-амплификации и секвенирования мтДНК были распознаны и охарактеризованы многократные делеции у 16 из 19 уремиических больных. Наиболее крупная делеция величиной в 8041 bp локализована между 8035 и 16075 bp и ограничена с обоих концов прямыми повторами 5'-СССАТ-3' [78]. Следует подчеркнуть, что с этой крупной делецией из генома элиминируются гены, кодирующие структуру пяти субъединиц NADH-дегидрогеназы, двух субъединиц АТФ-синтетазы, субъединицы цитохром *c*-оксидазы и цитохрома *b*, а также гены нескольких тРНК.

*Точечные мутации в генах тРНК, кодируемых в мтДНК.* Ряд определенных синдромов оказался связанным с конкретными точечными мутациями мтДНК [51, 72, 74]. Несколько точечных мутаций возникает в генах тРНК. Например, мутация А8344G присутствует у больных с MERRF-синдромом, при котором дефект белкового синтеза в митохондриях был идентифицирован как результат точечной мутации в гене тРНК [68]. Более чем 80% больных MERRF несут А8344G мутацию в гене тРНК<sub>Leu</sub> мтДНК человека. Точечные мутации в позициях 3271 и 3291 bp в гене тРНК<sub>Leu</sub> (UUR) были связаны с MELAS [79].

У больных диабетом в мтДНК также наблюдалось увеличение точечных соматических трансверсий, что рассматривалось в качестве нового биомаркера повреждений мтДНК, связанных с гипергликемией и возможно вызванных окислительным стрессом [80].

*Точечные мутации в генах рРНК, кодируемых в мтДНК.* Гомоплазмическая мутация А1555G в гене 12S рибосомной РНК была сначала обнаружена у больных с нейро-сенсорным расстройством слухового аппарата [67], однако не у всех индивидов, имевших такую мутацию мтДНК, развивалась глухота. Наряду с этим была выявлена новая точечная мутация С3093G в митохондриальном гене 16S рРНК у больных с MELAS-синдромом, диабетом mellitus, гипертиреозом и кардиомиопатией [57].

*Точечные мутации в белках, программируемых генами мтДНК.* Несколько точечных мутаций в митохондриальном геноме воздействуют на гены, программирую-

щие белки. Мутации Т→G или Т→С в гене 6-ой субъединицы АТФ-синтетазы в позиции 8993 bp мтДНК — одна из патогенных мутаций, которая вызывает болезнь Leigh. Мутации G11778A, G3460A и T14484C были связаны с синдромом LHON [38, 51]. Помимо болезни Лебера, NARP-синдром — другая болезнь, вызванная мутацией T8993G в гене АТФ-синтетазы 6 мтДНК. Синдром NARP характеризуется неврогенной слабостью мышцы, сенсорной невропатией, атаксией и пигментозным ретинитом, а в некоторых случаях также и деменцией. Мутации мтДНК, вызывающие дефект в Комплексе I дыхательных ферментов [92], сопряжены с синдромом LHON. Первичная мутация, связанная с LHON, — это мутация G→A в гене ND4 в позиции 11778 bp [68], которая определяет более 50% случаев этой болезни.

Надо сказать, что число болезней, связанных с мутациями мтДНК, неуклонно увеличивается, однако вся цепь молекулярных механизмов, приводящих к развитию этих патологий, в настоящее время понята лишь частично. Но главное звено этой цепи уже известно. Это — окислительное поражение и мутации генов мтДНК, кодирующих структуру субъединиц дыхательных ферментов, приводящие к неправильной сборке дыхательной цепи, которая при турновере вызывает генерацию еще большего количества активных форм кислорода. Повторение этого цикла со всегда увеличивающимися дисфункциями дыхательных цепочек сопряжено не только с усилением генерации активных форм кислорода, но и с замедлением производства АТФ, что ведет к дальнейшему поражению как самой митохондрии и ее генома, так и всей клетки в целом. В этом состоит так называемая теория «порочного круга» окислительных повреждений мтДНК [81], которые, по-видимому, вносят значительный вклад в развитие митохондриальных болезней, возрастных дегенеративных болезней, самого процесса старения и апоптоза [82].

### Мутации мтДНК и старение

*Делеции мтДНК.* Первое доказательство повреждений в мтДНК при старении было получено при открытии крупных делеций в мтДНК в различных тканях взрослых людей, а также крыс и их прогрессивного увеличения по мере старения [83, 84]. Крупная делеция в 7,4 КБ обнаружена в миокардиальной ткани [85], в коре мозга и «скорлупе» [76] у старых индивидов, и количество таких делеций увеличивается с возрастом.

Такое же возрастное увеличение делеций в 5 и 6 КБ обнаружено в мтДНК печени [86] и других тканях организма человека [87]. Предполагается, что накопление точечных мутаций 8-гидрокси-20-дезоксигуанозина и других окислительных аддуктов может служить причиной возникновения длинных делеций мтДНК. И действительно, четкая корреляция между накоплением больших делеций и возрастным увеличением количества 8-гидрокси-20-дезоксигуанозина наблюдалось в мтДНК сердца и мышц диафрагмы [85].

В работе [88] продемонстрировано (путем PCR-амплификации и секвенирования полной длины мтДНК одиночного кардиомиоцита) присутствие в клетках четырех долгожителей больших делеций

мтДНК (до 64%) и их отсутствие в клетках организма трех субъектов в возрасте 31–72 года. Межклеточная или внутриклеточная мозаичность в распределении делеций позволяет допустить, что дисфункция ткани может возникать даже тогда, когда общий уровень делеций относительно низкий.

**Точечные мутации мтДНК.** Первое сообщение о значительном возрастном накоплении точечных мутаций в мтДНК человека появилось в 1999 г. [89]. В этой работе сегмент мтДНК, выбранный для анализа, был главным контрольным регионом, содержащим участок, инициирующий транскрипцию тяжелой (H) нити и промотор транскрипции легкой (L) нити мтДНК [90]. Считалось, что этот главный контрольный регион является эволюционно наиболее вариабельным сегментом митохондриального генома человека [91], и казалось вероятным, что механизмы, присутствующие эволюции, могут также действовать и в процессах старения. Наиболее частая мутация в этом классе — **T414G** трансверсия — была найдена у 8 из 14 индивидов старше 65 лет (57%) и отсутствовала у 13 молодых людей. Мутация **T414G** находится в середине промотора для синтеза H-нити, в то время как мутации в позициях нуклеотидов 189, 195, 146 и 152 лежат очень близко к первичному ориджину  $O_{H1}$  (участок инициирования репликации) (позиция 191) или ко вторичному ориджину  $O_{H2}$  (позиции 147–151) синтеза H-нити мтДНК.

Скрининг распределения указанных мутаций в нескольких тканях у старых индивидов показал их тканевую специфичность [92–94].

Интересно, что анализ контрольного региона мтДНК фибробластов у больных с Down-синдромом (DS), которые, как известно, подвергаются ускоренному старению, выявил ожидаемое накопление **T414G** трансверсий. В частности, у пяти из девяти больных DS старше 45 лет обнаружены мутации на уровне 5–70%, тогда как у всех 12 DS больных в возрасте младше 45 лет эта трансверсия отсутствовала [95].

**Мутации мтДНК и продолжительность жизни.** Исходя из функциональной значимости мутаций мтДНК (о чем свидетельствует появление специфичных для фибробластов трансверсий **T414G** в пределах промотора РНК-заправки синтеза H-нити мтДНК у четырех из шести долгожителей [96]) Дж. Аттарди и сотр. [39] впервые выдвинули гипотезу о том, что эти и другие зависимые от старения мутации могут положительно влиять на продолжительность жизни организма. В пользу этой гипотезы говорят результаты анализа главной контрольной области мтДНК в лейкоцитах большой группы итальянских долгожителей и более молодых индивидов контрольной группы [94]. В частности, гомоплазмическая **C150T**-транзиция наблюдалась около ориджина синтеза H-нити мтДНК у 17% в группе из 52 субъектов в возрасте 99–106 лет и только 3,4% у 117 молодых индивидов. Таким образом, селекция ремоделированного ориджина репликации, приобретенная наследственно или соматически, по-видимому, дает с точки зрения продолжительности жизни определенное преимущество, в основе которого лежит наблюдаемая корреляция между высоким содержанием **C150T**-транзиции и долголетием обследованных индивидов.

В заключение этого раздела обратим особое внимание на экспериментальное исследование Ларссона и сотр., наблюдавших преждевременное старение у мышей, экспрессирующих дефектную ДНК-полимеразу митохондрий [97]. Используя трансгенный подход, исследователи создали линию гомозиготных мышей, которые экспрессировали дефектную версию кодируемой ядром каталитической субъединицы мтДНК-полимеразы, выполняющей в норме корректирующую функцию при репликации мтДНК. Четко показано, что у этих мышей развивается мутантный фенотип мтДНК с 3–5-кратным увеличением как точечных мутаций, так и делеций мтДНК. Это увеличение соматических мутаций мтДНК приводит к уменьшению продолжительности жизни животных и преждевременному возникновению фенотипов, связанных со старением, таких как потеря веса, уменьшение подкожного жира, облысение, искривление спинного хребта, остеопороз, анемия, редукция плодовитости и расширение сердца. Таким образом, полученные результаты впервые указали на прямую причинную связь между мутациями мтДНК и фенотипами старения у млекопитающих [97].

#### Молекулярные и биохимические аспекты влияния мутаций мтДНК на дисфункцию митохондрий

##### Молекулярные аспекты

**Мутация в участке терминации транскрипции.** Мутация **A3243G** возникает в терминирующей последовательности мтДНК, связывающей митохондриальный фактор терминации транскрипции (mTERF) [98]. Связывание mTERF на этом участке обычно вызывает выборочное увеличение скорости транскрипции 12S и 16S генов рРНК, но не генов тяжелой H-нити мтДНК. Это гарантирует достаточный синтез 12S и 16S рРНК для трансляции матричных РНК, кодирующих полипептиды митохондрий. Эксперименты *in vitro* показали, что мутация **A3243G** действительно уменьшает аффинное связывание mTERF с мтДНК и снижает скорость терминации транскрипции генов рРНК [99]. Кроме того, предполагается, что не полностью прошедший стадию процессинга транскрипт 19S пре-рРНК, содержащий 16S рРНК + тРНК*Leu* (UUR) + ND1, аккумулируется в клетках с мутантом **A3243G** [100], и это ведет к снижению скорости синтеза и стабильного уровня полипептидов, кодируемых мтДНК.

**Мутации в генах тРНК, кодируемых в мтДНК.** Эти мутации могут влиять на стабильность молекулы тРНК, что сказывается в резком снижении стационарного содержания аминоксил-тРНК [101]. Ясукава и др. сообщили, что мутанты тРНК*Leu* (UUR) в позициях 3243 (A→G) и 3271 (T→C), будучи заметно нестабильными в клетках, приводят к существенному уменьшению стационарного уровня тРНК. Общая сумма тРНК*Leu* (UUR) с **A3243G** или **T3271C** мутациями оказалась на 30% меньше, чем сумма таковых у интактных тРНК дикого типа [102]. При исследовании мутанта **A8344G** тРНК*Leu*, возникающего при MERRF-синдроме, было установлено, что снижение уровня аминоксил-тРНК*Leu* приблизительно на 50% ведет к серьезному ослаблению белкового синтеза и продукции еще не сформированных полипептидов

[103]. Вероятно мутации тРНК могут изменить кодон-антикодонное распознавание. Показано, что тРНК*Leu* (UUR) с мутациями А3243G или Т3271C [102] и тРНК*Lys* с точечной мутацией А8344G дефицитны по посттранскрипционной модификации в *wobble* позиции антикодона, что может вести к продукции abortивных полипептидов и снижению синтеза митохондриальных белков [104]. Возникновение дефектов модификации *wobble*, существенных для декодирования их смысловых партнеров, может интерпретироваться, по-видимому, как общий механизм в патогенезе митохондриальных болезней, вызванных мутациями в генах тРНК, кодируемых мтДНК.

**Мутации в генах мтДНК, кодирующих белки.** Мутация Т8993G трансформирует высококонсервативный лейцин в аргинин в субъединице 6 АТФ-синтетазы, которая является компонентом протонного канала проводимости (Fo) Комплекса V [60]. В клетках человека образование мутантной субъединицы 6 АТФ-синтетазы связано с нарушением сборки Комплекса V [105] и снижением скорости синтеза АТФ [106].

В клетках, несущих более 60% делетированных мтДНК, наблюдается резкое снижение активности дыхательных ферментов и скорости синтеза белков, кодируемых мтДНК [107]. У мыши с преобладающим в мтДНК количеством делеций величиной в 4696 bp обнаружено одновременное уменьшение активности цитохром *c*-оксидазы и ослабление митохондриальной трансляции [108].

Предполагается, что крупномасштабные делеции приводят к нарушению митохондриальной трансляции из-за потери генов тРНК, закодированных в элиминированных фрагментах мтДНК. Как только содержание делетированных молекул мтДНК достигнет критического уровня, митохондриальная трансляция может стать лимитирующим фактором из-за отсутствия достаточного количества тРНК.

### Биохимические аспекты

Недостаточность функции дыхательной цепи, вызванной мутациями мтДНК, может сказываться на различных биохимических функциях митохондрий, таких как потенциал митохондриальной мембраны, синтез АТФ, соотношение АТФ/АДФ (указывающее на состояние системы окислительного фосфорилирования), генерация активных форм кислорода, митохондриальный turnover и стационарная концентрация кальция («гомеостаз кальция») [74].

**Делеции мтДНК.** В клетках, содержащих менее 55% делеций размером в 4977 bp, скорость синтеза АТФ и соотношение АТФ/АДФ поддерживаются на уровне, подобном таковому в клетках с неповрежденными молекулами мтДНК. Как только пропорция делеций превысит этот порог чувствительности, потенциал митохондриальной мембраны, скорость синтеза АТФ и соотношение АТФ/АДФ резко уменьшаются [109]. При исследовании срезов скелетной мышцы мышей с митохондриальной дисфункцией, полученной в результате введения митохондрий с делецией мтДНК в 4696 bp в зиготы интактных мышей, обнаружилась хорошая корреляция между преобладанием делеций и дефицитом цитохрома *c*-оксидазы [110]. Авторы этой работы утверждают, что при высоком уровне накопления делетированных мтДНК (>91,6%) скорость мито-

хондриальной трансляции уменьшается из-за отсутствия шести генов тРНК в митохондриальном геноме в результате делеции в 4696 bp.

**Точечные мутации мтДНК.** Наличие мутации А3243G или А8344G в генах тРНК приводит к сборке энергетически неполноценных митохондрий, и как следствие возможны функциональные дефекты Комплексов I и IV, а также недостаток АТФ [111].

В [59] продемонстрировано, что у клеток, несущих более 90% мутаций А3243G в мтДНК, существенно снижаются интенсивность дыхания и активность цепи электронного транспорта и, следовательно, имеет место более низкое соотношение АТФ/АДФ и сокращенный расход энергии. Эти наблюдения позволяют предположить, что указанные мутации в генах тРНК нарушают митохондриальный белковый синтез и энергетический метаболизм митохондрий, а также уменьшают мембранный потенциал и градиент протонов через внутреннюю митохондриальную мембрану, что приводит к снижению максимальной скорости синтеза АТФ [59]. Кроме того, эти мутации, очевидно, обуславливают стимуляцию поглощения  $Ca^{2+}$ , буферизацию проходящего притока  $Ca^{2+}$  и изменение концентрации цитоплазматического  $Ca^{2+}$  [112]. Данные результаты наводят на мысль о важной роли фактора  $Ca^{2+}$  в патогенезе различных митохондриальных болезней, вызванных мутациями мтДНК.

### Окислительный стресс, мутации мтДНК и апоптоз

Апоптоз, или запрограммированная клеточная смерть, является эволюционно закрепленным механизмом, существенным для морфогенеза, развития и гомеостаза тканей [113]. Исследованию молекулярных механизмов апоптоза посвящено огромное количество исследований (см. например, [114–117]).

Апоптоз — исключительно сложный, многостадийный, каскадный процесс, в который вовлечена экспрессия многих десятков генов и биохимических процессов, находящихся под контролем клеточного белка p53, условно называемого супрессором опухолей. Здесь мы сосредоточим внимание главным образом на связи апоптоза с окислительным стрессом и мутациями мтДНК, поскольку было установлено, что митохондрии, испытывающие окислительный стресс, играют критическую роль в качестве триггера и медиатора апоптоза [118–120].

Транслокация проапоптозных белков к наружным митохондриальным мембранам, «открывающая» проницаемость их пор, стимулирует диффузию растворенных низкомолекулярных веществ через внутреннюю митохондриальную мембрану [121]. В свою очередь разбухание митохондрий может вызвать разрыв внешней митохондриальной мембраны и выделение локализованных между мембранами белков, таких как цитохром *c*, фактор, индуцирующий апоптоз, (AIF) и другие проапоптозные белки. Кроме того, развивающиеся в митохондриях процессы перекисного окисления липидов мембраны также способствуют ее деструкции и выходу в цитозоль вышеуказанных проапоптозных факторов (рис. 3), последующей фрагментации ядерной ДНК и апоптозу [119, 120]. По всей вероятности, апоптоз содействует патогенезу митохондриальных болезней [122].

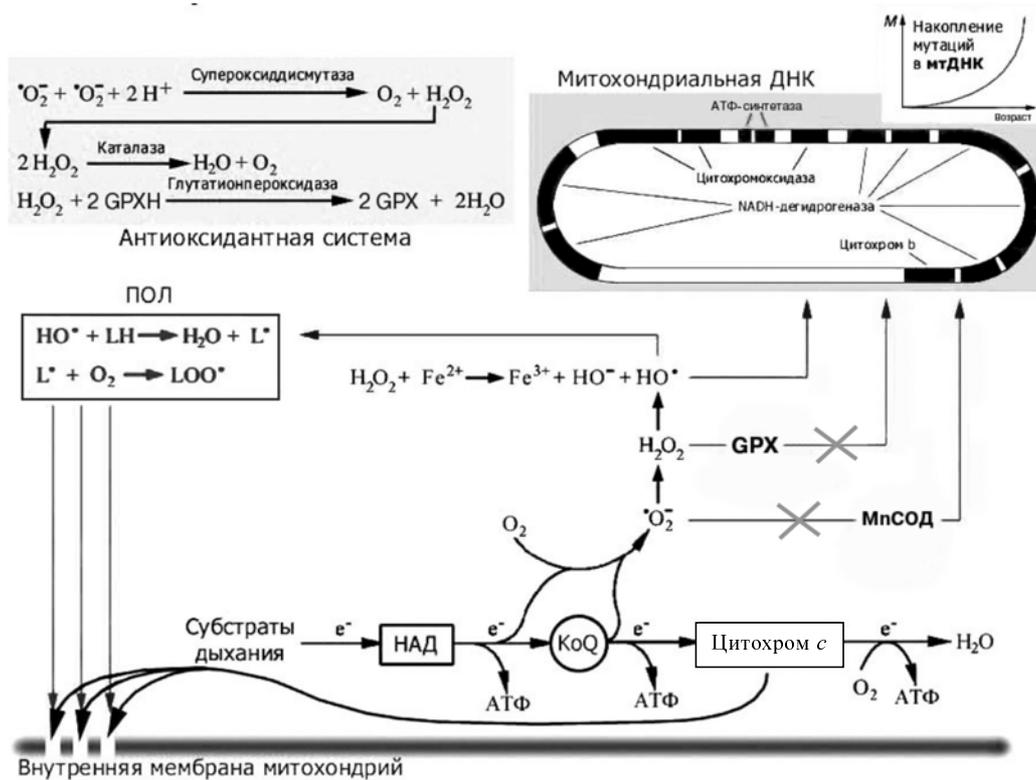


Рис. 3. Пути митохондриального метаболизма:

окислительное фосфорилирование, продукция активных форм кислорода ( $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $HO\cdot$ ), ферментативная антиоксидантная защита (MnСОД, глутатионпероксидаза GPX), пероксидное окисление липидов (ПОЛ), мутагенез мтДНК (его экспоненциальный рост с возрастом), некоторые элементы апоптоза, опосредованные митохондриями. Адаптированный вариант рисунка из [1]

*Апоптоз и митохондриальные болезни.* Установлено [123], что у больных, несущих одиночную делецию мтДНК или точечные мутации в генах тРНК (тРНК-*Lys*, тРНК-*Leu* (UUR), тРНК-*Ile* и тРНК-*Trp*), степень развития апоптоза в биопсиях мышцы соответствует числу мутантных геномов и серьезности как митохондриальной миопатии, так и неврологическому фенотипу больных [123].

Дефицит цитохром *c*-оксидазы — один из наиболее общих ферментативных дефектов у больных с митохондриальными болезнями, возникающий независимо от присутствия или отсутствия известной мутации в митохондриальном или ядерном геноме [51]. При окислительном стрессе, вызванном супероксидными анионами, в фибробластах была найдена мутация T8993G в гене субъединицы 6 АТФ-синтетазы. Использование спиновых ловушек приводило к прекращению апоптоза в этих клетках [124].

Апоптоз может быть запущен различными механизмами, включая усиление генерации активных форм кислорода, окисление митохондриального пула глутатиона, хроническое повышение свободного  $Ca^{2+}$ , истощение АТФ или изменения внутриклеточного рН, т.е. обусловлен всеми теми процессами, на которые могут воздействовать мутации мтДНК, что ведет к митохондриальной дисфункции. Активные формы кислорода — важный проапоптотический сигнал в арсенале биологических систем, реагирующих на нарушение жизнедеятельности клеток, а в некоторых случаях он

даже может быть включен в сигнал, стимулирующий клеточную смерть [125].

Все эти результаты говорят о том, что усиление клеточного апоптоза — патогенное событие, включенное в патогенез митохондриальных болезней, связанных с мутациями мтДНК.

Если развитие апоптоза является патогенетическим фактором митохондриальных болезней, то, напротив, нарушение механизма апоптоза может играть роль в патогенезе совершенно другой группы человеческих болезней, таких как рак [126], аутоиммунные и нейродегенеративные болезни [127].

*Апоптоз и старение.* Из исследований, посвященных связи апоптоза и старения, наиболее интересной, на наш взгляд, но совершенно неожиданной, была работа Тайнера с соавт. [128]. Исследователям удалось показать, что р53-мутантные мыши оказывают повышенное сопротивление заболеванию раком, но вместе с тем проявляют фенотипы ускоренного старения. Созданные трансгенные мыши несли делецию первых шести (из одиннадцати) экзонов гена р53, что приводило к экспрессии «усеченных» мРНК. Хотя исследователи не смогли обнаружить белок, соответствующий этой «m»-мутации в тканях р53+/m мышей, они установили повышенный уровень регулируемой активности белка р53 у этих гетерозигот. Возможно, «m»-аллель увеличивал стабильность белка дикого типа р53, активируя NADH-хиноноксидоредуктазу 1, регулирующую стабильность этого белка [129]. Однако

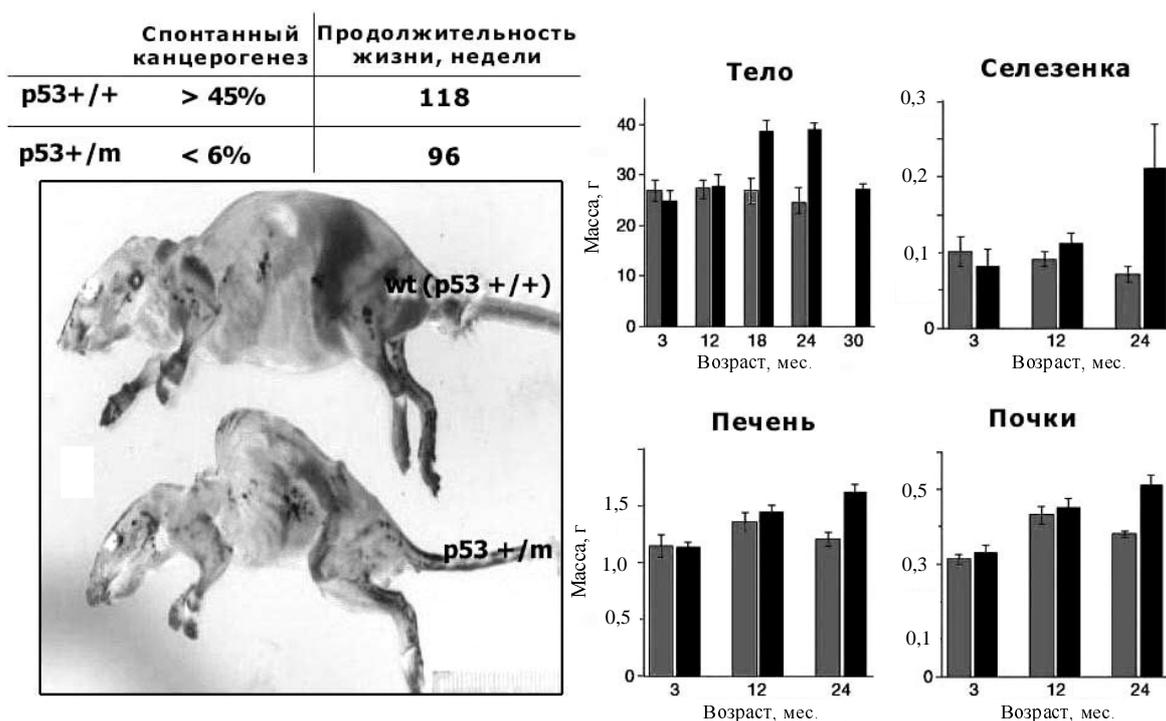


Рис. 4. Признаки старения мышей дикого типа (p53+/+) и мутантных мышей (p53+/m).

Слева — 20-ти месячные нормальные мыши (вверху), мутантные (внизу). Для p53+/m мышей характерно старческое искривление позвоночника (лордоз), потеря массы тела, мышечная атрофия и потеря жировой ткани. Справа — сравнение массы тела, селезенки, печени и почек p53+/+ животных (черные столбцы) и p53+/m животных (серые столбцы). Адаптированный рисунок из [128]

интригующий результат состоял в том, что у гетерозиготных p53+/m мышей развивалось меньшее количество спонтанных опухолей, чем у мышей с диким типом p53+/+ гомозиготы, и по целому ряду признаков первая группа животных была подвержена более быстрому старению (рис 4). У гетерозиготных p53+/m мышей зарегистрирована более быстрая зависящая от возраста потеря массы мышц, селезенки, печени, почек и яичек (см. рис. 4). Сокращение массы органов обусловлено общим уменьшением клеточности. Ускоренные возрастные потери были также отмечены в толщине кожи, росте волос, заживлении мелких ран, сопротивлении стрессу.

Главный вывод, которые сделали авторы этой крайне интересной работы, состоит в том, что p53 — супрессор опухоли — играет существенную роль в регуляции старения и продолжительности жизни у мышей. Кроме того, как полагают авторы, эти результаты поддерживают идею о том, что старение является механизмом подавления опухоли. При интерпретации данных результатов следует учитывать свидетельства негативного влияния p53 на экспрессию марганцевой супероксиддисмутазы (MnСОД).

Прямые доказательства существования взаимной отрицательной регуляции экспрессии генов MnСОД и p53 со стороны их белков получены в работе [130], где было показано, что дикий тип p53 подавляет экспрессию гена MnСОД на уровне промотора и что в свою очередь повышенная экспрессия MnСОД уменьшает транскрипцию гена p53 на уровне его промотора и ингибирует опосредованную белком p53 индукцию апоптоза.

Возвращаясь к вопросу об ускоренном старении, вызванном непрогнозируемым влиянием повышенной активности p53 [128], можно предложить следующее объяснение этих неожиданных эффектов. Как указано выше, p53 специфически (на уровне промотора) ингибирует экспрессию MnСОД митохондрий. Следовательно, повышенная активность белка p53 приведет к существенному снижению антиокислительных процессов в митохондриях и клетке в целом, что не может не увеличить разрушительное действие активных форм кислорода, которое в конце концов выразится в развитии апоптоза. Далее, неспецифический цитолиз первичных апоптотических клеток, как было показано в [131, 132], вызовет «цепную» кластеризацию апоптотических клеток, что, несомненно, должно привести к снижению массы и функции органов и тканей, степень которого будет зависеть как от степени активации p53, так и от общего антиокислительного потенциала в том или ином органе или ткани, т.е. от стимулированного ими уровня окислительного стресса. Именно такое сокращение клеточности и массы целого ряда органов и тканей наблюдали авторы [128] у мутантных мышей с повышенным уровнем белка p53. Все эти факторы, как нам кажется, и определяют существенное снижение продолжительности жизни у p53+/m гетерозиготных мышей.

*Возможная инверсия функций белка p53.* К обширной группе генов и продуктов их экспрессии, объединенных общей системой взаимной регуляции и вовлеченных в сложный процесс апоптоза, прежде всего следует отнести поли(АДФ-рибозо)полимеразу-1 и

ДНК-зависимые ферменты протеинкиназы [133], которые сигнализируют белок p53 о повреждениях ДНК и стимулируют его активность путем усиления экспрессии его гена, либо путем увеличения (или сокращения) времени жизни белка p53. Это ключевое событие включает механизм остановки клеточного цикла и/или сложный каскадный механизм деструкции субклеточных структур, приводящий клетку к апоптозу [114–117].

В последние годы, помимо указанной выше большой группы генов, вовлеченных в апоптоз, была открыта непосредственная регуляторная связь p53 с функционально другой группой генов, играющих важную роль в системах внутриклеточной защиты. Это прежде всего ферментная система антиокисления, система нейтрализации ксенобиотиков и, наконец, система репарации ДНК.

Об ингибирующем действии p53 на транскрипцию гена, кодирующего митохондриальную MnСОД [130], сказано выше в контексте клеточных механизмов, включающих каскад реакций, ведущих к апоптозу. Напротив, как было показано в [134], p53 активирует на уровне промотора транскрипцию гена глутатионпероксидазы (GPX), магистрального антиокислительного фермента, который нейтрализует пероксид водорода или органические гидропероксиды. Экспрессия эндогенной GPX существенно активируется как на уровне мРНК, так и на уровне ферментативной активности. Следовательно, глутатионпероксидаза является новым целевым геном для белка p53.

Еще одной мишенью белка p53, по-видимому, являются изоферменты P-450, нейтрализующие попавшие в организм ксенобиотики. Об этом косвенно свидетельствуют данные, согласно которым у мутантных (p53+/-) мышей отсутствует индукция синтеза изоферментов P-450 (по сравнению с уровнем синтеза у мышей дикого типа) в ответ на введение мощного ксенобиотика — нитрозамина [135].

И наконец, Танака и др. [136] обнаружили, что при значительных повреждениях ДНК белок p53 специфически индуцирует экспрессию неизвестной ранее изоформы малой субъединицы рибонуклеотидредуктазы (R2). Эта форма фермента включается только в процесс репарации, локализуясь в ядре клетки и резко ускоряя превращение рибонуклеозиддифосфатов в дезоксирибонуклеозидтрифосфаты поблизости от участков поражения ДНК, после чего клетка продолжает свое существование. Следует отметить, что рибонуклеотидредуктаза является ключевым ферментом всей ферментной цепи репарации ДНК [137].

Определенная противоречивость результатов действия p53 на гены антиокислительных ферментов (ингибирование MnСОД и активация GPX), стимулирующее действие p53 на изоформы малой субъединицы рибонуклеотидредуктазы (R2) и P-450, отсутствие данных относительно концентрации зависимости в действии p53 на эти мишени, а также далеко еще не выясненная сложная совокупность функций p53 и его взаимосвязей с различными системами клетки, — все эти предпосылки позволили нам предложить гипотезу об инверсии действия p53 на защитные системы клетки.

В условиях нормального клеточного цикла и при невысоком уровне повреждений ДНК относительно низкие концентрации p53 постоянно стимулируют

внутриклеточные ферментные системы защиты — рибонуклеотидредуктазу (ключевой фактор репарации ДНК), MnСОД (первый барьер на пути потока активных форм кислорода), GPX (второй барьер для распространения активных форм частиц) и изоформы P-450 (барьер для проникших в клетку ксенобиотиков). Подобный оптимальный «тонус» функционирования защитных систем создает условия для длительного стационарного режима жизнедеятельности клетки (рис. 5А).

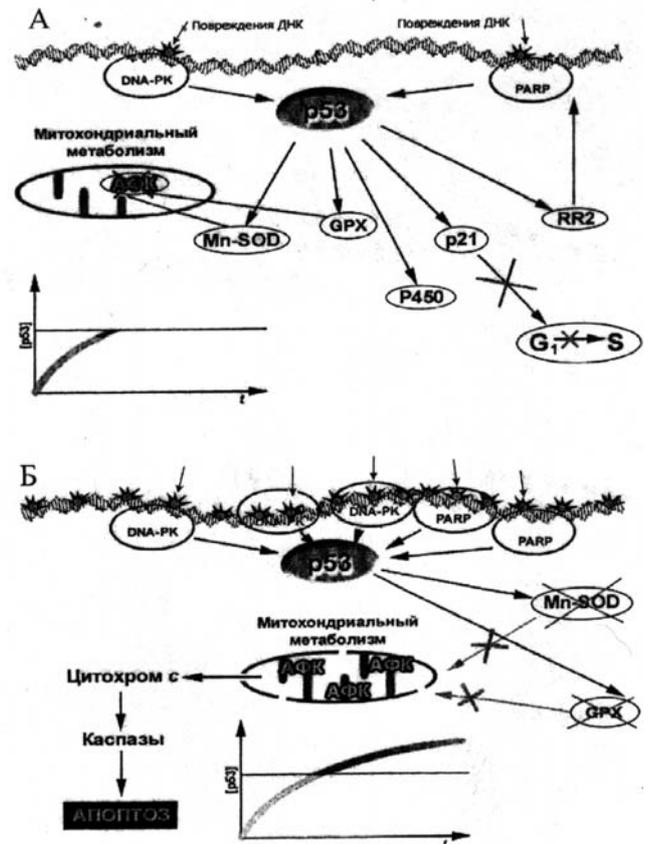


Рис. 5. Взаимосвязь p53 с защитными системами клетки

А — при низком уровне поражений ДНК невысокий уровень активности поли(АДФ-рибозо)полимеразы-1 (PARP) и ДНК-зависимой протеинкиназы (DNA-PK) индуцирует невысокий уровень активности p53. В этих условиях p53 оптимизирует функцию защитных механизмов клетки: антиокислительных — марганцевой супероксиддисмутазы (MnSOD) и глутатионпероксидазы (GPX), защиту от ксенобиотиков — изоферментов P-450, систему репарации — изоформу субъединицы рибонуклеотидредуктазы (RR2). Активность всех этих ферментов непосредственно регулируется p53, что обеспечивает стационарный режим функционирования клетки.

Б — при высоко уровне повреждений ДНК сигналы от PARP и DNA-PK стимулируют повышение содержания и активности p53, соответственно происходят ингибирование защитных систем (MnСОД и GPX), резкое увеличение генерации активных форм кислорода (АФК), активация ПОЛ, последующее нарушение структуры митохондриальной мембраны, выход в цитоплазму проапоптотных факторов — цитохрома с, фактора, индуцирующего апоптоз (AIF), и каспазы 3.

Адаптированный рисунок из [82].

Если в тех или иных условиях метаболизма под влиянием экзогенных или эндогенных поражающих факторов уровень повреждений ДНК начнет существенно повышаться, автоматически активируя поли(АДФ-рибозо)полимеразу-1 и ДНК-зависимые протеинкиназы, концентрация р53 будет неуклонно расти. При этом будут снижаться активность рибонуклеотидредуктазы и репарация ДНК, активность Р-450 и, главным образом, активность антиокислительных ферментов — MnСОD и GPX (рис. 5Б), что увеличит поток свободных радикалов, активируя все митохондриальные пути апоптоза.

Предложенная рабочая гипотеза, естественно, не претендует на полноту описания механизмов клеточной стабильности и механизмов запрограммированной клеточной смерти, однако она открывает возможные пути ее экспериментальной проверки.

Рассмотренные в обзоре многочисленные экспериментальные данные убедительно свидетельствуют о существенном прорыве в исследованиях природы митохондриального окислительного стресса, мутаций мтДНК и их роли в патогенезе митохондриальных болезней, ускорении старения и активации апоптоза. Исследования на молекулярном уровне процессов функционирования митохондрий не только значительно расширяют наши знания о живой природе, но и открывают широкие перспективы для поиска новых путей терапии болезней, замедления старения и ограничения запрограммированной смерти клеток.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Тодоров И.Н., Тодоров Г.И. Стресс, старение и их биохимическая коррекция. М.: Наука, 2003, 480 с.
2. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс. МАИК «Наука/Интерпериодика», 2001, 343 с.
3. Маргелис Л. Роль симбиоза в эволюции клеток. М.: Мир, 1983, 351 с.
4. Turrens J.F., Boveris A. *Biochem. J.*, 1980, v. 191, p. 421–427.
5. Beckman K.B., Ames B.N. *Physiol. Rev.*, 1998, v. 78, p. 547–581.
6. Richter C., Park J.W., Ames B.N. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, v. 85, p. 6465–6467.
7. Fridovich I. *J. Biol. Chem.*, 1997, v. 272, p. 18515–18517.
8. Wei Y.H. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1998, v. 217, p. 53–63.
9. Wei Y.H., Lu C.Y., Wei C.Y. *e. a. Chin. J. Physiol.*, 2001, v. 44, p. 1–11.
10. James A.M., Murphy M.P. *J. Biomed. Sci.*, 2002, v. 9, p. 475–487.
11. Turrens J.F., Alexandre A., Lehninger A.L. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1985, v. 237, p. 408–414.
12. Degli Esposti M. *e. a. Ibid.*, 1990, v. 283, p. 258–265.
13. Lenaz G. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, v. 1366, p. 53–67.
14. Barja G. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 1999, v. 31, p. 347–366.
15. Lenaz G. *e. a. Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2002, v. 959, p. 199–213.
16. Yagi T. *e. a. Biochim. Biophys. Acta*, 1998, v. 1364, p. 125–133.
17. Ohnishi T. *Ibid.*, 1998, v. 1364, p. 186–206.
18. Barja G. *Ageing Res. Rev.*, 2002, v. 1(3), p. 397–411.
19. Cadenas E., Davies K.J. *Free Radic. Biol. Med.*, 2000, v. 29(3-4), p. 222–230.
20. Sastre J., Pallardo F.V., Garcia de la Asuncion J. *e. a. Ibid.*, 2000, v. 32(3), p. 189–198.
21. Brune B., Zhou J., von Knethen A. *Kidney Int. Suppl.*, 2003, v. 84, p. S22–S24.
22. Kirkwood T.B.L. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 2002, v. 25, p. 189–196.
23. Burkle A. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2000, v. 908, p. 126–132.
24. Saretzki G., Zglinicki T. *Ibid.*, 2002, v. 959, p. 24–29.
25. Wei Y.H., Lee H.C. *Advances in Clinical Chemistry*, 2003, v. 37, p. 83–128.
26. Галкин А.П., Митрохин Ю.И., Тодоров И.Н. Докл. АН СССР, 1974, т. 217, 6, с. 1427–1430.
27. Галкин А.П., Митрохин Ю.И., Тодоров И.Н. Молекулярная биология, 1976, т. 10, 6, с. 1238–1248.
28. Taanman J.W. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, v. 1410, p. 103–123.
29. Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G. *e. a. Nature*, 1981, v. 290, p. 457–465.
30. Тодоров И.Н., Митрохин Ю.И., Галкин А.П. Биохимия, 1976, т. 41, № 4, с. 604–613.
31. Сингер М., Берг П. Гены и геномы. Том 2. М.: Мир, 1998, 390 с.
32. Wei Y. H., Scholes C. P., King T.E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1981, v. 99, p. 1411–1419.
33. Hou J.H., Wei Y.H. *Mutat. Res.*, 1998, v. 403, p. 75–84.
34. Michikawa Y., Mazzucchelli F., Bresolin N. *e. a. Science*, 1999, v. 286, p. 774–779.
35. Mambo E., Gao X., Cohen Y. *e. a. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, v. 100, p. 1838–1843.
36. Katiya J., Aoki Y. *Diabetologia*, 2003, v. 46, p. 1559–1566.
37. Галкин А.П., Тодоров И.Н. Радиобиология, 1969, т. 9, № 1, с. 21–25.
38. Pang C.Y., Huang C.C., Yen M.Y. *e. a. J. Formos. Med. Assoc.*, 1999, v. 98, p. 326–334.
39. Chomyn A., Attardi G. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, v. 30, p. 519–529.
40. Wong-Riley M.T. *Trends Neurosci.*, 1989, v. 12, p. 94–101.
41. Müller-Höcker J. *Mutat. Res.*, 1992, v. 275, p. 115–124.
42. Wanagat J., Cao Z., Pathare P. *e. a. FASEB J.* 2001, v. 15, p. 322–332.
43. Nekhaeva E., Bodyak Y.N., Kravtsov D. *e. a. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, v. 99, p. 5521–5526.
44. Giles R.E., Blanc H., Cann H.M. *e. a. Ibid.*, 1980, v. 77, p. 6715–6719.
45. Howell N., Chinnery P.F., Ghosh S.S. *e. a. Hum. Reprod.*, 2000, v. 15 (Suppl. 2), p. 235–245.
46. Jansen R.P. *Ibid.*, 2000, v. 15 (Suppl. 2), p. 112–128.
47. Ankel-Simons F., Cummins J.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, v. 93, p. 13859–13863.
48. Kaneda H., Hayashi J., Takahama S. *e. a. Ibid.*, 1995, v. 92, p. 4542–4546.
49. Egger J., Wilson J. *N. Engl. J. Med.*, 1983, v. 309, p. 142–146.
50. Robin E.D., Wong R. *J. Cell. Physiol.*, 1988, v. 136, p. 507–513.
51. Schon E.A., Bonilla E., Di Mauro S. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 1997, v. 29, p. 131–149.
52. Chinnery P.F., Thorburn D.R., Samuels D.C. *e. a. Trends Genet.*, v. 16, p. 500–505.
53. Jenuth J.P., Peterson A.C., Fu K. *e. a. Nat. Genet.*, 1996, v. 14, p. 146–151.
54. Shoffner J.M. *Lancet*, 1996, v. 348, p. 1283–1288.
55. Leonard J.V., Schapira A.V.H. *Ibid.*, 2000, v. 355, p. 299–304.
56. Chinnery P.F., Turnbull D.M. *Mol. Med. Today*, 2000, v. 6, p. 425–432.
57. Hsieh R.H., Li J.Y., Pang C.Y. *e. a. J. Biomed. Sci.*, 2001, v. 8, p. 328–335.
58. Chinnery P.F., Howell N., Lightowers R.N. *e. a. Brain*, 1997, v. 120, p. 1713–1721.
59. Pang C.Y., Lee H.C., Wei Y.H. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 2001, v. 54, p. S45–S56.
60. Schon E.A. *Trends Biochem. Sci.*, 2000, v. 25, p. 555–560.
61. Wallace D.C. *Science*, 1999, v. 283, p. 1482–1488.
62. Pulkes T., Hanna M.G. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2001, v. 49, p. 27–43.
63. Bohlega S., Tanji K., Santorelli F.M. *e. a. Neurology*, 1996, v. 46, p. 1329–1334.
64. Estivill X., Govea N., Barcelo E. *e. a. Am. J. Hum. Genet.*, 1998, v. 62, p. 27–35.

65. Goto Y., Nonaka I., Horai S. *Nature*, 1990, v. 348, p. 651–653.
66. Pastores G.M., Santorelli F.M., Shanske S. e. a. *Am. J. Med. Genet.*, 1994, v. 50, p. 265–271.
67. Prezant T.R., Agopian J.V., Bohlman M.C. e. a. *Nat. Genet.*, 1993, v. 4, p. 289–294.
68. Shoffner J.M., Lott M.T., Lezza A.M. e. a. *Cell*, 1990, v. 61, p. 931–937.
69. Kitaoka H., Kameoka K., Suzuki Y. e. a. *Diabet. Res. Clin. Pract.*, 1995, v. 28, p. 207–212.
70. Marin-Garcia J., Goldeal M.J., Amamthakrishnan R. e. a. *Cardiovasc. Res.*, 1996, v. 31, p. 306–313.
71. Wang J., Wilhelmsson H., Graff C. e. a. *Nat. Genet.*, 1999, v. 21, p. 133–137.
72. MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database. Center for Molecular Medicine, Emory University Atlanta, GA [http://www.gen.emory.edu/mitomap.html], 2001.
73. Holt I.J., Harting A.E., Morgan-Hughes J.A. *Nature*, 1988, v. 331, p. 717–719.
74. Smeitink J., van den Heuvel L., DiMauro S. *Nat. Rev. Genet.*, 2001, v. 2, p. 342–352.
75. Corral-Debrinski M., Horton T., Lott J.M. *Nat. Genet.*, 1992, v. 2, p. 324–329.
76. Soong N.W., Hinton G., Cortopassi D. e. a. *Ibid.*, 1992, v. 2, p. 318–323.
77. Hayashi J.I., Ohta S., Kikuchi A. e. a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, v. 88, p. 10614–10618.
78. Lim P.S., Ma Y.S., Cheng Y.M. e. a. *J. Biomed. Sci.*, 2002, v. 9 (6 Pt 1), p. 549–560.
79. Goto Y., Nonaka I., Horai S. *Biochim. Biophys. Acta*, 1991, v. 1097, p. 238–240.
80. Kamiya J., Aoki Y. *Diabetologia*, 2003, v. 46, p. 1559–1566.
81. Ozawa T. *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, v. 1271, p. 177–189.
82. Тодоров И.И. *Технологии живых систем*, 2006, т. 3, № 1, с. 19–50.
83. Cortopassi G.A., Arnheim N. *Nucleic Acids Res.*, 1990, v. 18, p. 6927–6933.
84. Cortopassi G.A., Shibata D., Soong N.W. e. a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, v. 89, p. 7370–7374.
85. Hayakawa M., Sugiyama S., Hattori K. e. a. *Mol. Cell. Biochem.*, 1993, v. 119, p. 95–103.
86. Yen T.C., Pang C.Y., Hsieh R.H. e. a. *Biochem. Int.*, 1992, v. 26, p. 457–468.
87. Zhang C., Bills M., Quigley A. e. a. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997, v. 230, p. 630–635.
88. Khrapko K., Bodyak N., Thilly W.G. e. a. *Nucleic Acids Res.*, 1999, v. 27, p. 2434–2441.
89. Michikawa Y., Mazzucchelli F., Bresolin N. e. a. *Science*, 1999, v. 286, p. 774–779.
90. Ghivizzani S.C., Madsen C.S., Nelen M.R. e. a. *Mol. Cell. Biol.*, 1994, v. 14, p. 7717–7730.
91. Stoneking M., Hedgecock D., Higuchi R.G. e. a. *Am. J. Hum. Genet.*, 1991, v. 48, p. 370–382.
92. Wang Y., Michikawa Y., Mallidis C. e. a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, v. 98, p. 4022–4027.
93. Murdock D.G., Christacos N.C., Wallace D.C. *Nucleic Acids Res.*, 2000, v. 28, p. 4350–4355.
94. Zhang J., Asin-Cayuela J., Fish J. e. a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, v. 100, p. 1116–1121.
95. Del Bo R., Comi G.P., Perini M.P. e. a. *Ann. Neurol.*, 2001, v. 49, p. 137–138.
96. Michikawa Y., Attardi G. *Methods Mol. Biol.*, 2002, v. 197, p. 75–92.
97. Trifunovic A., Werdenberg A., Falkenberg M., Spelbrink J.N., Rovio A.T., Bruder C.E., Bohlooly Y.M., Gidlof S., Oldfors A., Wibom R., Tornell J., Jacobs H.T., Larsson N.G. *Nature*, 2004, v. 429, p. 417–423.
98. Chomyn A., Enriquez J.A., Micol V. e. a. *J. Biol. Chem.*, 2000, v. 275, p. 19198–19209.
99. Hess J.F., Parisi M.A., Bennett J.L. e. a. *Nature*, 1991, v. 351, p. 236–239.
100. Schon E.A., Koga Y., Davidson M. e. a. *Biochim. Biophys. Acta*, 1992, v. 1101, p. 206–209.
101. Borner G.V., Zeviani M., Tiranti V. e. a. *Hum. Mol. Genet.*, 2000, v. 9, p. 467–475.
102. Yasukawa T., Suzuki T., Ueda T. e. a. *J. Biol. Chem.*, 2000, v. 275, p. 4251–4257.
103. Enriquez J.A., Chornyn A., Attardi G. *Nat. Genet.*, 1995, v. 10, p. 47–55.
104. Yasukawa T., Suzuki T., Ishii N. e. a. *EMBO J.*, 2001, v. 20, p. 4794–4802.
105. Nijtmans L.G., Henderson N.S., Attardi G. e. a. *J. Biol. Chem.*, 2001, v. 276, p. 6755–6762.
106. Baracca A., Barogi S., Carelli V. e. a. *Ibid.*, 2000, v. 275, p. 4177–4182.
107. Wei Y.H., Lee C.F., Lee H.C. e. a. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2001, v. 928, p. 97–112.
108. Inoue K., Ito S., Takai D. e. a. *J. Biol. Chem.*, 1997, v. 272, p. 15510–15515.
109. Porteous W.K., James A.M., Sheard P.W. e. a. *Eur. J. Biochem.*, 1998, v. 257, p. 192–201.
110. Inoue K., Nakada K., Ogura A. e. a. *Nat. Genet.*, 2000, v. 26, p. 176–181.
111. James A.M., Sheard P.W., Wei Y.H. e. a. *Eur. J. Biochem.*, 1999, v. 259, p. 462–469.
112. Gunter T.E., Gunter K.K., Sheu S.S. e. a. *Am. J. Physiol.*, 1994, v. 267, p. C313–C339.
113. Hockenbery D. *Am. J. Pathol.*, 1995, v. 146, p. 16–19.
114. Chinnaiyan A.M., Dixit V.M. *Curr. Biology*, 1996, v. 6(5), p. 555–564.
115. Nagata S. *Cell*, 1997, v. 88, p. 355–365.
116. Чумаков П.М. *Изв. АН, Сер. Биол.*, 1998, 2, с. 151–156.
117. Мазурик В.К. *Лабораторное дело*, 2001, т. 4, с. 33–43.
118. Green D.R., Reed J.C. *Science*, 1998, v. 281, p. 1309–1312.
119. Kroemer G., Reed J.C. *Nat. Med.*, 2000, v. 6, p. 513–519.
120. Lee H.C., Wei Y.H. *J. Biomed. Sci.*, 2000, v. 7, p. 2–15.
121. Crompton M. *Biochem J.*, 1999, v. 341, p. 233–249.
122. Raha S., Robinson B.H. *Am. J. Med. Genet.*, 2001, v. 106, p. 62–70.
123. Mirabella M., Di Giovanni S., Silvestri G. e. a. *Brain*, 2000, v. 123, p. 93–104.
124. Geromel V., Kadhom N., Cebalos-Picot I. e. a. *Hum. Mol. Genet.*, 2001, v. 10, p. 1221–1228.
125. Hwang P.M., Bunz F., Yu J. e. a. *Nat. Med.*, 2001, v. 7, p. 1111–1117.
126. Mathupala S.P., Ko Y.H., Pedersen P.L. *Oncogene*, 2006, v. 26, p. 4777–4786.
127. Thompson C.B. *Science*, 1995, v. 267, p. 1456–1462.
128. Tyner S.D., Venkatachalam S., Choi J. e. a. *Nature*, 2002, v. 415, p. 45–53.
129. Asher G., Lotem J., Sachs L. e. a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, v. 98, p. 1188–1193.
130. Drane P., Bravard A., Bouvard V. e. a. *Oncogene*, 2001, v. 20, p. 430–439.
131. Reznikov K., Kolesnikova L., Pramanik A. e. a. *FASEB J.*, 2000, v. 14, p. 1754–1764.
132. Скулачев В.П. *Мат. VI Межд. конф. «Биоантиоксидант», М.*, 2002, с. 533–534.
133. Burkle A. *BioEssays*, 2001, v. 23, p. 795–806.
134. Tan M., Li S., Swaroop M. e. a. *J. Biol. Chem.*, 1999, v. 274, p. 12061–12066.
135. Mori Y., Koide A., Fuwa K. e. a. *Mutagenesis*, 2001, v. 16, p. 377–383.
136. Tanaka H., Arakawa H., Yamaguchi T. e. a. *Nature*, 2000, v. 404, p. 42–49.
137. Thelander L. e. a. *Ann. Rev. Biochem.*, 1979, v. 48, p. 133–158.