

УДК 671.713:611.018.74-053.9

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭНДОТЕЛИЯ РОГОВИЦЫ КАК ОТРАЖЕНИЕ УНИВЕРСАЛЬНОГО МЕХАНИЗМА СТАРЕНИЯ (В ПОРЯДКЕ ОБСУЖДЕНИЯ)**А. В. Артемов**, канд. мед. наук

ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В. П. Филатова АМН Украины»

Теоретично обґрунтована і практично підтверджена на прикладі ендотелію рогівки невідома раніше закономірність старіння, яка полягає в тому, що вікове зниження функціональних і адаптаційних можливостей тканин, органів і організму в цілому, яке вважається одним з головних проявів вказаного процесу, є наслідком поступового і рівномірного зменшення чисельності клітин без попереднього пошкодження, захворювання або якоїсь іншої патологічної зміни в самих клітинах. Таким чином, старіння є унікальним патологічним процесом, характерним тільки клітинним асоціаціям, що створюють тканини, але не властивим одноклітинним організмам і окремим клітинам, що входять до складу тканин. Старіння організму відбувається без старіння клітин.

Ключевые слова: эндотелий роговицы, возрастные изменения, механизмы старения.**Ключові слова:** ендотелій рогівки, вікові зміни, механізм старіння.**ОБЩИЕ ПРЕДПОСЫЛКИ К СОЗДАНИЮ
КОНЦЕПЦИИ**

Проблема старения почти полтора столетия находится в центре внимания не только медицины и биологии, но и всего естествознания. Этот интерес в значительной мере обусловлен тем, что до сих пор остается нераскрытым принципиальный механизм возрастных изменений. Так, несмотря на наличие нескольких сотен теорий старения, наиболее полное определение процесса звучит крайне обтекаемо: старение — это естественный биологический процесс постепенного снижения функциональных и адаптационных возможностей организма в целом, а также его органов и тканей, в результате чего увеличивается вероятность развития различных заболеваний и смерти [7].

В данной формулировке зафиксированы лишь видимые проявления старения, а именно: снижение функциональных и адаптационных возможностей. Но как и почему это происходит, остается неясным. Единственное, с чем согласны практически все исследователи, — старение является патологическим процессом. В противном случае оно не вело бы к снижению функциональных и адаптационных возможностей, а в конечном итоге — к смерти. Большинство исследователей согласно также, что процесс старения нельзя отождествлять с болезнью. Болезнь развивается случайно и не имеет обязательной связи с возрастом, старение же происходит медленно, на протяжении всей жизни и, в отличие от болезни, касается всех.

Интересно отметить, что на уровне организма нетрудно составить определенный клинико-патологический профиль (набор патологических признаков), характеризующий различные возрастные группы. Вместе с тем, хотя и известно немало патологических отклонений, сопровождающих старение, как то: изменение соотношения между паренхимой и соединительной тканью в органах, нарастание уровня липофусцина в некоторых типах клеток и др., — универсального структурного эквивалента старения до сих пор не найдено.

Действительно, если с возрастом происходит снижение функциональных возможностей, то ему должны соответствовать определенные структурные изменения. Ни одно из известных патологических изменений (воспалительные, опухолевые или иммунные процессы) не может претендовать на эту роль в силу своей случайности и необязательности. В связи с тем, что универсальных возрастных патологических изменений на уровне тканей и органов не было замечено, все усилия исследователей стали фокусироваться на изучении процессов внутри клетки. Именно на уровне субклеточных структур, как полагали в начале прошлого века, должны находиться те возрастные структурные изменения, которые не удавалось обнаружить на уровне световой микроскопии.

Однако за истекшее столетие ни ультраструктурные, ни молекулярно-биологические открытия не смогли предъявить структурный эквивалент ста-

© А. В. Артемов, 2009.

рения: как и столетие назад, мы можем определить возраст на уровне целого организма, но не можем сделать это на уровне клетки.

ГЕРОНТОЛОГИЧЕСКАЯ ДОГМА

Представление об изначальном старении клетки стало своеобразной догмой геронтологии. Несмотря на то что структурный эквивалент старения не удалось определить даже на молекулярно-биологическом уровне, его продолжают искать внутри клетки. Конечно, невозможность обнаружения универсальных возрастных изменений внутриклеточных структур и макромолекул не означает их принципиального отсутствия. Однако дело даже не в этом: с принятием клеточной патологии сложился стереотип научного мышления, не допускающий, что старение целого, т. е. организма, может происходить без старения составляющих его элементарных частиц, т. е. клеток.

Действительно, наш организм возникает из одной оплодотворенной клетки, давшей начало множеству других разнообразных клеток, и все, что происходит в организме в течение жизни, начинается внутри этих клеток. Отсюда напрашивается логический вывод, что старение может начинаться только внутри клетки, ведь все, что находится вне ее — это продукты ее жизнедеятельности. Иначе говоря, старый организм — ничто иное, как совокупность состарившихся клеток.

Нельзя сказать, что не было попыток выйти за рамки сложившейся геронтологической догмы. Еще в начале прошлого века получили распространение исследования, в которых впервые было обращено внимание на принципиальное бессмертие отдельной клетки. Так, в начале прошлого века стали широко известны работы Метальникова и Вудрофа, показавшие принципиальное бессмертие одноклеточных организмов [4]. Позднее А. Каррель на культуре эмбриональных клеток показал способность последних к неограниченно долгой пролиферации без признаков вырождения. Это исследование проводилось на протяжении 34 лет и стало одним из наиболее цитируемых в геронтологической литературе [7].

Конечно, сам факт существования одноклеточных организмов, бактерий и вирусов может служить иллюстрацией идеи, что геном не накапливает необратимых возрастных изменений. Однако, здесь речь идет о поддержании вида, т. е. о замене одной индивидуальности двумя другими. При переходе к многоклеточному уровню жизни происходит разделение между клеточными линиями, поддерживающими продолжение вида (герминативными клетками), и клетками, обеспечивающими индивидуальное существование отдельной особи. Иными словами, жизнедеятельность отдельного много-

клеточного организма поддерживается в основном клетками, входящими в состав дифференцированных тканей, выполняющих определенные функции и не вступающих в деление при физиологических обстоятельствах (т. н. постмитотические клетки).

Все эти известные факты сформировали убеждение, что старение многоклеточных организмов является неизбежной расплатой за высокую дифференцировку тканей, клетки которых находятся в стационарном (неделяющемся) состоянии. Так, обсуждение вопроса о возможности нестарения клетки стало игнорироваться как имеющее отношение лишь к постоянно пролиферирующим клеточным системам и прокариотам.

Конечно, на уровне дифференцированных тканей, когда мы видим лишь неуклонное возрастное снижение их функций, трудно сделать вывод о принципиальном нестарении клетки. Однако, если мы обратимся к системе герминативных тканей, то можем усомниться в безупречности геронтологической догмы.

Так, известно, что продукция половых клеток у человека начинается с 12-15 лет и происходит у мужчин практически в течение всей жизни, а у женщин лимитируется количеством заложенных при рождении первичных фолликулов. Система герминативных клеток — не непрерывно пролиферирующая линия наподобие эмбриональных стволовых клеток, а обычная тканевая система, большинство клеток которой находится в интермитотическом состоянии. Только небольшая часть клеток этой тканевой системы вступает в каждый момент времени на путь деления и дифференцировки, которая у сперматозоидов проходит в течение двух месяцев, а у яйцеклеток — одного месяца. Как нетрудно заметить, возраст герминативной клетки, готовой к оплодотворению, фактически равен возрасту организма на данный момент времени и, следовательно, эта клетка должна накопить и, соответственно, передать определенный возрастной негатив.

Если учесть, что пик фертильности у человека приходится на 25-30 лет, то надо признать, что до этого срока клетки герминативных тканей не успевают состариться. В противном случае накопленный возрастной потенциал передан бы потомству и через ряд поколений привел бы к вырождению рода. Сюда надо добавить и редкие случаи мужской фертильности в 50-60 лет, за которыми никоим образом не прослеживаются признаки дегенерации рода.

Таким образом, совершенно очевидно, что, дожидаясь момента вступления на путь мейотического деления и дифференцировки, клетки герминативной ткани не накапливают никаких признаков старения, хотя к тому времени организм уже несет явные черты возрастного угасания функций (а ведь известно немало примеров рождения совершенно нормальных детей даже от 90-летних мужчин).

Следовательно, есть основания усомниться в том, что клетки герминативной ткани, в течение многих десятилетий находящиеся в стационарном (интермитотическом) состоянии, накапливают возрастные изменения.

Надо отметить, что клетки, взятые из тканей старого организма, не обнаруживают утраты пролиферативных способностей при культивировании *in vitro*. Именно на этом и основано распространенное сейчас в регенерационной медицине получение культур т. н. взрослых стволовых клеток. В частности, есть сообщение о получении стволовых клеток из пигментного эпителия сетчатки, взятой у 90-летнего мужчины [5]. Это еще один демонстративный пример, ставящий под сомнение старение постмитотических клеток в целостном организме.

И хотя попытки поставить под сомнение пролиферативные возможности клеток старого организма иногда возникают для оправдания геронтологической догмы, они не имеют конкретных доказательств. В этой связи стоит процитировать известного патолога прошлого столетия И. В. Давыдовского: «Практика современной хирургии отвергла какую-то опасность операций у старых людей по мотивам ослабления регенерации...» [4]. Это мнение авторитетный ученый основывает не только на собственных наблюдениях, но и подкрепляет ссылками на литературные источники.

СТАРЕНИЕ ТКАНЕЙ — БЕЗ СТАРЕНИЯ КЛЕТОК

Суть предлагаемой концепции заключается в разрушении сложившегося стереотипа, что старение организма начинается со старения клетки. Конечно, приведенные выше рассуждения о принципиальной возможности нестарения неделящихся клеток сами по себе могут показаться недостаточными для отказа от геронтологической догмы. Но именно через эти сомнения легче увидеть, что открытия современной патологии выводят нас на допущение совершенно иных взаимоотношений между целым (организмом) и единичным (клетка). В этом необычном взаимоотношении и лежит ключ к разгадке старения как уникального патологического процесса, который не поддавался анализу в рамках геронтологической догмы.

Согласно предлагаемой здесь концепции, старение — это феномен, возникающий на уровне клеточных ассоциаций (тканевых систем), присущий многоклеточным организмам и несвойственный отдельным клеткам. Этот процесс, происходящий в течение всей жизни, не связан с повреждением или накоплением патологических изменений в клетке. Клетки лишь стохастически подвергаются апоптотической элиминации. В результате этого численность клеток в тканях организма неуклонно снижается, одновременно снижаются функциональные и

адаптационные возможности этих тканей и образуемых ими органов, а, следовательно, и организма в целом.

Таким образом, старение организма можно представить как следствие сокращения численности клеток в тканях, а не как результат возрастного изменения самих клеток. Именно представление об апоптозе — одном из выдающихся медико-биологических открытий последних десятилетий — ведет нас к пониманию основной идеи концепции. Действительно, наши прежние знания клеточной патологии допускали гибель клетки лишь в результате патологического воздействия, одним из которых предполагался возрастной негатив, накапливаемый во внутриклеточных структурах в течение длительного времени. Современная патология устраняет главное препятствие на пути к отказу от геронтологической догмы: для того чтобы клетки гибли в течение жизни, им нет необходимости накапливать повреждения.

Как видно, приведенные выше рассуждения опираются на современный уровень знаний общей патологии и не лишены логики. Тем не менее, при всей популярности темы апоптоза и многократных обращений к ней, в том числе и в геронтологии, до сих пор не было попытки использования этих знаний для пересмотра нашего взгляда на процесс старения. Вероятно, это связано с тем, что геронтологические исследования уже давно обособились от общей патологии и ее основы — морфологии, а сконцентрировались на цитогенетических, биохимических и молекулярно-биологических поисках. Сведя проблему старения к сугубо клеточному феномену, современная геронтология перестала уделять внимание системным изменениям, свойственным старению.

Вместе с тем, стоит заметить, что если структурного эквивалента возрастных изменений клетки до сих пор не найдено, то сам факт уменьшения с возрастом численности клеток в тканях и органах известен уже давно. Еще И. Мечников связывал старение с уменьшением численности «благородных» (паренхиматозных) клеток, а А. Богомолец считал уменьшение числа клеток ретикуло-эндотелиальных тканей основным фактором снижения возрастной резистентности организма. Все эти факты снижения численности клеток различных тканей и органов неоднократно приводились в геронтологической литературе [4, 7].

Так, один из авторитетных геронтологов прошлого века В. В. Фролькис отмечал, что «уменьшение количества клеточных элементов само по себе может сказаться на деятельности органа, ткани, изолированной группы клеток, а из-за уменьшения количества клеточных элементов при старении могут снижаться резервные возможности органов» [7].

В последнем высказывании прямое указание на связь старческой немощности с потерей клеточных элементов. Надо сделать всего лишь один шаг, чтобы сказать: именно потеря клеток и есть единственная причина старения, та причина, что отличает этот неотвратимый патологический процесс от различных случайных и необязательных повреждений и заболеваний.

Однако, никоим образом не отрицая сам факт снижения численности клеток в течение жизни, исследователи не видели универсальности и закономерности в этом явлении, продолжая считать, что старение происходит внутри клетки, а уменьшение клеточной численности есть одно из следствий накопления незаметных возрастных внутриклеточных повреждений. Теперь, когда мы знаем об апоптозе, можно связать возрастное уменьшение клеток именно с ним, т. е. вне связи с накоплением возрастного негатива внутри самих клеток.

Все перечисленное выше и стало тем основанием, которое было положено в основу новой концепции старения, рассматривающей этот процесс как элиминацию клеток в тканевых системах, обусловленную регулярно (стохастически) возникающим апоптозом. Уменьшение клеток в тканевых системах само по себе ведет к потере интегральных функциональных возможностей органов. И этого вполне достаточно, чтобы понять, как без всякого презумптивного возрастного повреждения клеток наш организм становится ущербным в функциональном и адаптивном плане.

Хотя приведенные выше логические рассуждения, основывающиеся на анализе медико-биологических достижений, лежат в основе предлагаемой концепции, ее идея возникла не из них, а при рассмотрении конкретной (частой) проблемы, связанной с оценкой возрастной пригодности донорской роговицы. Именно на этой тканевой системе удается увидеть суть феномена старения — стохастичность элиминации клеток на протяжении жизни. А вот понять причину этой стохастической элиминации без упомянутых выше данных, среди которых основное место занимает представление об апоптозе, было бы невозможным.

ЭНДОТЕЛИЙ РОГОВИЦЫ КАК ЕСТЕСТВЕННАЯ МОДЕЛЬ СТАРЕНИЯ

Неоспоримые преимущества роговицы — простота ее строения и доступность изучения *in vitro* и *in vivo* — позволили из частной задачи выйти на решение общебиологической проблемы. Стохастичность возрастной потери клеток, которую сложно было увидеть в целом организме за хитросплетением множественных изменений разнородных органов и тканей, предстает с очевидностью на примере роговичного эндотелия.

Если старение, как это признает большинство исследователей, обусловлено накоплением патологических изменений во времени, то его структурный эквивалент нельзя обнаружить как конкретный феномен. Иначе говоря, ни одно из зафиксированных изменений в самой клетке или образуемых ею внеклеточных биомолекулах, не может быть связано со старением до тех пор, пока не будет доказано постоянство и регулярность их накопления во времени. Так, если мы обратимся к конкретным заболеваниям, даже таким как, например, злокачественные новообразования, которые имеют связь с возрастом, то обнаружим, что вероятность их появления в различные возрастные периоды описывается кривой Гаусса. Иначе говоря, частота любого заболевания с возрастом не нарастает, а, достигая своего возрастного пика, идет на убыль. В противоположность этому старческие структурные изменения с возрастом неуклонно увеличиваются.

Именно этот принцип в первой половине 19 века был взят Б. Гомперцем за основу при создании математической модели старения. Его задачей было найти оптимальную формулу для расчета страхового риска и определения вероятности смерти в различных возрастных группах. Предложенная им формула, позднее дополненная Мейкемом, до сих пор, по мнению геронтологов, является наиболее удачным математическим описанием, отражающим связь между старением и смертностью [7].

Она имеет вид:

$$M(t) = A + R \exp(at),$$

где M — смертность, t — время жизни, A — постоянная, предложенная Мейкемом, R — начальный уровень смертности, a — коэффициент нарастания смертности во времени.

Эмпирический эквивалент этой математической модели, графическим выражением которой является экспонента с изломом (ректангуляцией) на возрастном отрезке 60-70 лет, можно выразить тезисом: хотя процесс старения идет постоянно с момента рождения, для его проявления необходим определенный отрезок времени. Как видно, эта модель отражает не причину старения (она для нее скрыта), а сам его принцип. Иными словами, она отражает вероятность реализации во времени старческого патогенного потенциала, но не показывает «как» и «где» он накапливается.

Если с указанных математических позиций мы обратимся к геронтологической догме, исходящей из старения клетки как основной причины старения организма, то должны констатировать, что исчезновение (смертность) клеток в наших тканях на протяжении жизни должно отвечать тому же принципу, что и смертность в человеческой популяции. Так, мы опускаем саму причину старения клетки (она не обнаружена, но ее присутствие подразуме-

вается) и обращаемся к анализу смертности (элиминации) клеточной популяции в течение жизни.

Как уже отмечалось, сам факт уменьшения клеток в различных тканях организма известен уже давно, однако до сих пор количественные параметры возрастной клеточной элиминации не изучались. Так, гистологи и патоморфологи основное внимание уделяют качественным характеристикам патологических процессов. Кроме того, существуют известные методические трудности для полного подсчета клеток в многомерных тканевых системах, что также не способствовало появлению указанных сведений, а конкретной задачи, по указанным выше причинам, не возникало — старение искали внутри клетки.

Технические возможности, возникшие в офтальмологии в 70-80 годах прошлого века с появлением совершенных методов зеркальной микроскопии, дающих комплексную оценку состояния роговичного эндотелия, позволили получить уникальные сведения о возрастных изменениях этой клеточной системы. Действительно, никакая другая тканевая система не была прослежена в течение жизни не только *in vitro*, но и *in vivo* в адекватной мере как роговичный эндотелий. Во всяком случае, можно утверждать, что феномен старения вряд ли где еще мог предстать в таком ракурсе, как это позволила офтальмология.

Необходимо отметить, что интерес к изучению роговичного эндотелия обусловлен не только техническими возможностями спектральной микроскопии, но и практическими потребностями кератопластики. Так, в 70-х годах прошлого века было показано, что уменьшение численности эндотелиальных клеток, определяемой как плотность клеток на кв. мм, до уровня 400-500 клеток на кв. мм несовместимо с осуществлением барьерной функции эндотелиального монослоя и приводит к необратимому помутнению роговицы [8]. Позднее было показано, что минимальная плотность эндотелиальных клеток, допускающая использование роговицы для кератотрансплантации (сквозной пересадки) находится в пределах 2000-2500 кл. на кв. мм. Этот предел рассчитан эмпирически и обусловлен тем, что за первые дни, недели и месяцы после кератотрансплантации происходит потеря до 60% эндотелиальных клеток. Поэтому исходная плотность должна обеспечить запас эндотелиальных клеток на случай постоперационной потери и дальнейшего функционирования в течение многих десятилетий [16].

Последнее обстоятельство, т. е. возрастная потеря эндотелиальных клеток в нормальных условиях, было также подобно изучено и нашло отражение во многих работах [9, 11, 12, 14]. Так, многочисленные исследования показали, что плотность эндотелиальных клеток роговицы в промежутке от 20 до

100 лет снижается равномерно: примерно 0,6% в год (от рождения до 20 лет, когда происходит рост роговицы, снижение плотности происходит более интенсивно). Эти сведения уже стали академическим фактом и отражены в фундаментальных офтальмологических руководствах [3].

Таким образом, у нас есть многочисленные данные, чтобы дать характеристику возрастной элиминации эндотелиальных клеток. Ее можно представить в виде кривой 1 (рис. 1). Теперь, если мы возьмем известные (усредненные) данные о плотности роговичного эндотелия к моменту прекращения роста роговицы (т. е. 20 лет) и попытаемся спрогнозировать возрастное уменьшение плотности согласно формуле Гомперца-Мейкема, то получим кривую 2 (рис. 1).

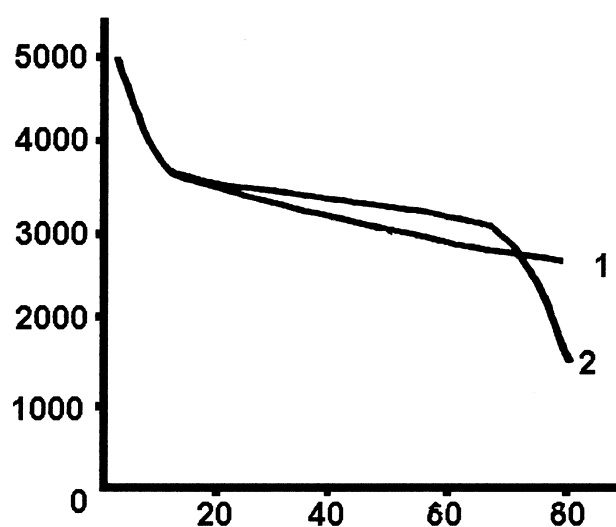


Рис. 1.

Линия 1 отражает реальное уменьшение плотности эндотелиальных клеток, подтвержденное статистически. Как видно из графика, потеря эндотелиальных клеток не имеет критической точки излома. Напротив, уменьшение клеток происходит равномерно на протяжении всего обозримого отрезка жизни — от 20 до 100 лет.

Экспонента 2 отражает ожидаемое возрастное уменьшение численности (плотности) эндотелиальных клеток (в абсолютных единицах). Так должно происходить уменьшение плотности эндотелиальных клеток, если следовать математическому принципу Гомперца-Мейкема. Конечно, точка излома экспоненты может смещаться по отношению оси абсцисс, но сам принцип остается неизменным: после достижения определенного возрастного рубежа количество исчезающих (погибающих) клеток должно каскадно нарастать.

Как видно из рис. 1, кривая 1, характеризующая действительную потерю эндотелиальных клеток после 20 лет, принципиально не совпадает с кривой, математически отражающей механизм

первоначального старения клеток и последующей их гибели. Иными словами, мы должны признать, что клетки эндотелия роговицы регулярно теряются прямо пропорционально их численности, т. е. действует какой-то стохастический механизм их уничтожения на протяжении всей жизни. Во всяком случае, на реально обозримом отрезке жизни (от 20 до 100 лет) его удалось обнаружить многим исследователям, примерно на одном уровне — 0,6% в год [9, 13, 14]. Расхождение реальных показателей возрастной элиминации роговичного эндотелия с принципом старения, определяемым формулой Гомперца-Мейкема, является неоспоримым математическим опровержением геронтологической догмы. Основанием для такого утверждения является сама статистика, указывающая на возраст-независимый характер элиминации эндотелиальных клеток. Если бы исчезновение клеток было связано с накоплением поломок, то с возрастом (когда число таких клеток возрастает), их исчезло бы значительно больше. Иными словами, действует какой-то стохастический принцип, определяющий неустойчивость тканевой ассоциации. И эта неустойчивость не связана с накоплением повреждений в клетках.

Еще раз подчеркнем, что первоначальной целью исследования была лишь оценка возрастной пригодности донорской роговицы. Она была связана с тем, что в некоторых офтальмологических школах еще сохранилась традиция неиспользования трупных роговиц от доноров старше 65 лет, особенно при проведении кератотрансплантационных операций, сопряженных с достижением высокого постоперационного оптического эффекта. Эта традиция возникла в тот период, когда еще не была известна ключевая роль роговичного эндотелия и не производился учет его плотности при отборе донорской роговицы для трансплантации. Вместе с тем, современная практика, основанная на учете плотности роговичного эндотелия, не отрицает возможности достижения высокого результата кератопластики при использовании трансплантатов от доноров даже старше 80 лет [2].

Анализ этой ситуации, включающий учет клинических результатов и морфологическую оценку качества трупной роговицы, показал, что нет никаких объективных критериев (кроме плотности эндотелиальных клеток), которые бы компрометировали качество донорской роговицы с возрастом. Конечно, речь идет о роговицах, отобранных по биомикроскопическим критериям и лишенных соответствующих патологических изменений, связанных с перенесенными заболеваниями. Многочисленные обобщения клинических данных, сделанные на довольно обширном материале, также не позволяют выявить сколь-либо заметного влияния возраста донорской роговицы на качество операции, тогда как аналогичная зависимость от эндоте-

лиальной плотности прослеживается постоянно [2, 11, 14].

Таким образом, мы можем сформулировать несколько исходных тезисов, имеющих неоспоримое эмпирическое подтверждение в офтальмологии:

— качество донорской роговицы зависит от возраста;

— качество донорской роговицы зависит от плотности эндотелиальных клеток;

— плотность эндотелиальных клеток зависит от возраста.

Сопоставление этих тезисов ведет к силлогизму: *возрастное снижение качества (т. е. функциональных возможностей) роговицы связано со снижением плотности эндотелиальных клеток, т. е. обусловлено их возрастной потерей*. Этот вывод очевиден для любого специалиста, связанного с кератотрансплантацией и в силу своей банальности, никогда специально не акцентировался.

Однако есть ничтожный нюанс, который отделяет этот вывод от коренного изменения нашего представления о старении. Он состоит в признании того, что уменьшение плотности эндотелиальных клеток — единственный объективный показатель, который отличает роговицу молодых людей от старых (случайные повреждения и перенесенные заболевания здесь не учитываются).

Чтобы сделать этот вывод, потребовался отказ от геронтологической догмы, настаивающей на старении клеток. Как уже отмечалось, признаков возрастного повреждения эндотелиальных клеток роговицы (как, впрочем, и других тканей) до сих пор не найдено. Но не это определило окончательное решение. Данному выводу способствовали собственные наблюдения, позволившие в различных возрастных паттернах, характеризующих плотность эндотелиальных клеток роговицы, заметить отклонение от того принципа старения, который заложен в известной формуле Гомперца-Мейкема. Иными словами, необходимо было обратить внимание на то обстоятельство, что возрастное изменение плотности эндотелиальных клеток (т. е. их возрастная элиминация) происходит равномерно, а не увеличивается к старости. Именно это кардинальное различие мы и обнаруживаем, когда сравниваем графики, представленные на рис. 1 и дающие оценку смертности в результате старения и случайных (стохастических) факторов. Если бы человек не старел, уменьшение численности популяции все равно имело бы место. Но осуществлялось это так же, как мы видим на примере элиминации роговичных клеток: количество погибших (элиминированных) в 20 и 80 лет было бы пропорционально численности популяции, т. е. не увеличивалось бы с возрастом. Однако человек — стареет, и его смертность зависит от возраста. А клетки — не стареют, и поэтому мы

не можем обнаружить аналогичной зависимости для них, во всяком случае, роговичный эндотелий нам такой возможности не представляет.

СТОХАСТИЧЕСКИЙ МЕХАНИЗМ СТАРЕНИЯ

Как отмечено выше, отказ от геронтологической догмы и осознание стохастического механизма старения произошло одновременно. В принятии окончательного решения, ставшего фундаментом предлагаемой концепции, ни одно из перечислявшихся выше обстоятельств самостоятельно не сыграло ведущей роли. В частности, приводившиеся в начале статьи фразы в пользу принципиального нестарения клетки не стали предикативом новой концепции до тех пор, пока в целом не был осознан сам принцип старения.

Действительно, даже если бы математическое истолкование статистических данных о возрастной потере эндотелиальных клеток роговицы было сделано в момент их первого получения (т. е. в начале 80-х годов прошлого века), вряд ли бы это стало поводом для создания новой концепции. Достаточно вспомнить в качестве примера менделевскую статистику о расщеплении признаков в потомстве 3:1, которая игнорировалась в течение тридцати с лишним лет. В данном случае также потребовался биологический механизм, который объяснял бы стохастический принцип возрастной элиминации клеток. В качестве такого механизма и выступил апоптоз.

Как уже отмечено выше, принципиальной особенностью апоптической гибели клетки является то, что она не связана с ее повреждением. Клетки могут в течение всей жизни апоптически элиминироваться и для этого не нужно накапливать никаких повреждений, в том числе и возрастных.

Хотя апоптоз и называют часто информационной смертью или клеточным суицидом, в его инициации играют роль вполне материальные факторы: различные биомолекулы, физические и др. воздействия. Однако все эти воздействия не вызывают повреждения клетки, как мы привыкли это понимать в течение предшествующего столетия. Эти воздействия, через мембранные рецепторы, запускают внутри клетки ферментативный механизм, приводящий к ее фрагментации на нежизнеспособные клеточные осколки. Обнаружение прямой связи апоптоза с наличием в клетке теломер и теломеразной активности указывает на то, что апоптическая фрагментация — это деление клетки, которая не способна в данный моментделиться. Мы оставим здесь за рамками обсуждения множество обстоятельств, в связи с которыми изучается апоптоз применительно к проблеме злокачественного роста, хотя именно в связи с этой проблемой в последние годы проводится основная масса исследова-

ний. В данном случае для нас представляет интерес инициация апоптоза в физиологических условиях.

Апоптоз, действительно, вначале был обнаружен как вполне физиологический процесс, играющий роль в эмбриогенезе и постнатальном морфогенезе [6]. Надо также отметить, что почти столетие морфологи обсуждали феномен амитоза, который, как и обычное митотическое деление, можно иногда увидеть в различных тканях при вполне физиологических обстоятельствах. Однако к 70-80 гг. прошлого века стала окончательно понятна нефизиологичность амитоза: клетка не можетделиться без редупликации ДНК (а редупликация ДНК, в свою очередь, не может произойти без восстановления теломер). Таким образом, стало понятным — то, что мы наблюдали как амитоз, является вариантом апоптической фрагментации (только осколков образуется не 3 или 4, а 2 — как при обычном делении). Стало также понятно, почему при амитотическом делении иногда образуются несоразмерные по объему «дочерние» клеточные тела: ведь апоптические фрагменты получают разное количество ядерного и цитоплазматического материала.

Понимая значение амитоза как своеобразного варианта апоптической фрагментации, проще экстраполировать представление о его «физиологической» роли на весь апоптоз. Итак, нам осталось признать, что для возникновения апоптоза в условиях нормальной жизнедеятельности не требуется каких-то особых факторов, кроме возникающих в процессе самой этой жизнедеятельности. Иными словами, необходимо обосновать, что для постоянной апоптической элиминации клеток в физиологических условиях нет необходимости в накоплении повреждений. Выше было подчеркнуто, что для возникновения апоптоза необходимо два обстоятельства: возникновение стимула к делению, передаваемого через клеточную мембрану, и неготовность к делению (отсутствие теломеры и теломеразной активности). Одному из этих условий, как теперь установлено, отвечают все клетки дифференцированных тканей: в них отсутствует теломеразная активность и нет теломер (это — прерогатива лишь некоторых эмбриональных, раковых, герминативных и камбиальных клеток). Остается выяснить, какие обстоятельства обычной жизнедеятельности могут вызвать инициацию деления дифференцированной клетки.

Несмотря на потенциальную возможность к делению, обычно демонстрируемую *in vitro*, клетки, находящиеся в составе дифференцированных тканевых систем, не пролиферируют. Клеточная численность всех этих тканей, как хорошо видно на примере роговичного эндотелия, постоянно уменьшается в течение жизни, без пополнения новыми клетками. В последние годы установлена важнейшая роль межклеточного матрикса в функциони-

ровании тканевых систем. Как установлено, связь клетки с внеклеточным матриксом обеспечивает специфические белки, называемые интегринами. Характерной особенностью нескольких десятков изученных интегринов является их способность распознавать трипептид аргинин-глицин-аспарагиновая кислота (RGD) в белках внеклеточного матрикса [6].

С помощью пептидов, содержащих RGD последовательности, в экспериментах удавалось воспроизвести апоптоз, который развивался в результате блокирования связей клеток с интегринными внеклеточного матрикса. Способность RGD-содержащих пептидов (в частности, их растворимых форм) блокировать интегрины уже пытаются использовать в разработке препаратов противотромбозного действия, для ингибирования ангиогенеза и др. [6].

Как видно, экспериментальные модели инициации апоптоза в тканях основаны на блокировании белков межклеточного взаимодействия. На их примере мы убеждаемся, что развитие апоптоза инициируется потерей контактов, а сами контакты определяются белками, синтезируемыми клеткой. Как отмечено выше, для потери контактов и инициации апоптоза необходимо вывести из строя белки, которые осуществляют эти контакты.

Конечно, можно допустить, что в организме накапливаются какие-то антитела, которые, как показано выше, с помощью апоптоза разрушают тканевые системы. Первоначально именно на это обстоятельство было обращено внимание автора в ходе анализа механизма прионных инфекций [1]. Не оспаривая того, что и прионные, и медленные вирусные инфекции могут быть факторами старения, как это отмечали некоторые авторы, нужно все же исходить из физиологических обстоятельств. Однако ни прионы, ни вирусы не могут претендовать на универсальность. Тем более, что с ними связаны довольно тяжелые патологические процессы, которые встречаются лишь у незначительной части стареющего населения. С другой стороны, если до определенного момента не было контакта с подобными внешними агентами, то получается, что организм не старел?

Однако давно известно, что в самом организме могут возникать отклонения (путь и несущественные) в структуре и функции белков в результате ошибок в транскрипционно-трансляционном процессе. Подобный механизм известен еще с 60-х гг. прошлого века, когда стал понятен сам принцип генетического контроля синтеза белков. Тогда же было установлено, что в процессе репарации генома неизбежны стохастически возникающие замены нуклеотидов (а, следовательно, и аминокислотной последовательности в белках). Эти замены — транзиции и трансверсии — называют точечными мута-

циями, а сам процесс — мутационным шумом [15]. Мутационный шум никогда не претендовал на роль фактора старения, так как точечные мутации не накапливаются в геноме, они лишь с той или иной вероятностью, присущей каждому геному, повторяются при каждом репарационном витке.

Что же касается последствий этих точечных мутаций, то их нетрудно заметить на примере многообразия белков одного и того же класса, выполняющих одну и ту же функцию, но отличающихся по несущественным факторам (электрофоретическая подвижность, термоллабильность, устойчивость к тем или иным ингибиторам и т. п.). Подобные изменения в белке хотя и видоизменяют клеточный метаболизм, не могут быть губительными для клетки в силу своей малозначительности.

Вместе с тем, известны и довольно серьезные последствия, связанные с заменой всего одной аминокислоты в белковой последовательности. Классический пример: патологический гемоглобин при серповидноклеточной анемии, где замена одной аминокислоты из 146, образующих одну из цепей гемоглобина, приводит к тяжелой болезни. Такие последствия довольно редки, но и здесь они сопровождаются не немедленной смертью, а лишь длительным заболеванием.

С этих позиций легче понять уникальность ситуации, когда ничтожная замена в белке становится роковой для клетки. Она становится роковой потому, что нарушение (пусть и минимальное) касается функции, которую нельзя компенсировать ни нормальным функционированием других клеток, ни нормальным функционированием всех остальных метаболических систем в самой клетке.

Обратившись опять к упомянутой роли аргинин-глицин-аспарагинового триплета в обеспечении контактов, легко представить как одна случайная точечная замена в этом триplete может привести к потере клеткой контакта и вступлению ее на путь апоптической элиминации. Конечно, роковой может оказаться замена и в другом участке белковой молекулы, однако неизменным остается сам принцип. Клетка не «дожидается» накопления поломок. Одна случайная ошибка в белковом синтезе — и клетка вступает на путь апоптической элиминации. «Дожидаются» — другие клетки тканевой системы, когда опять же случайное нарушение в белковой молекуле выведет и их из состава тканевой системы. И скорость этой элиминации (как убеждает нас роговичный эндотелий) не увеличивается к старости. Не увеличивается потому, что никакого накопления повреждений внутри клетки не происходит, а существует только вероятность ошибки в синтезе белка, которая зависит не от возраста, а от эффективности механизма репарации ДНК.

Уникальность ситуации еще в том, что синтезируемый белок не просто должен выполнить ка-

кую-то функцию, он должен выполнить ее совместно с другим белком при условии их максимальной комплементарности. Только соблюдение этих требований обеспечит клетке поддержание контакта с межклеточным матриксом и сохранит ее в составе тканевой ассоциации. Иначе говоря, чтобы количество клеток в тканевых системах не уменьшалось, клетки должны постоянно синтезировать один и тот же белок, без отклонений в аминокислотной последовательности. Но именно в неизбежности таких отклонений и состоит суть одного из фундаментальных законов природы — второго закона термодинамики. Однако понимать его применительно к организму надо не в неизбежности старения клетки (этого как раз из данного закона никто не смог вывести), а в неизбежности ошибок в транскрипционно-трансляционном механизме, через которые и реализуется случайная (стохастическая) апоптическая гибель отдельных клеток. Еще раз возвращаем внимание к рис. 1, на котором этот стохастический принцип элиминации клеток демонстрирует нам роговичный эндотелий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, чтобы понять механизм старения нет необходимости искать какой-то необычный феномен. Составляющие компоненты этого процесса хорошо изучены и давно известны: это апоптоз и точечные мутации. Каждый из них в отдельности не способен объяснить механизм старения, пока мы не спроецируем их на другой известный факт — уменьшение количества клеток в тканях в течение жизни, и не увидим регулярности (стохастичности) этого явления, как это стало возможным на примере роговичного эндотелия.

Процесс старения заложен в самой клетке в виде апоптического механизма, инициируемого потерей контактов в результате точечных аминокислотных замен в обеспечивающих эти контакты белках, на основе шумовых мутаций, постоянно происходящих в клеточном геноме в процессе репарации ДНК. Иначе говоря, старение — это феномен, механизм которого заложен в клетке, но проявляется не в виде ее старения (т. е. накопления повреждений), а в виде стохастически возникающего апоптоза. Ткани, постоянно теряя клетки на протяжении жизни, становятся функционально слабее, что и составляет видимый нами результат старения.

Предлагаемая здесь концепция свидетельствует, что старый организм является не совокупностью состарившихся клеток, а результатом уменьшения их численности в тканевых системах. Ту взаимосвязь между возрастной потерей функции и численностью клеток, которую можно четко проследить на примере роговицы, еще предстоит увидеть

в других тканях, особенно тех, которые определяют лимит жизни (в сердце, например). Представленная здесь концепция старения дает ориентир для нового направления геронтологических поисков. Пока же, кроме роговичного эндотелия, можно сослаться лишь на один пример, где также зафиксирован принцип стохастичности потери клеток. Так, Т. Muller-Pedersen показала с помощью флуорометрического метода подсчета ядер, что плотность кератоцитов (клетки собственного вещества роговицы) уменьшается с 62200 на мм куб. в первой декаде жизни до 44800 на мм куб. на девятом десятке жизни. При этом автор подчеркивает, что годовая потеря в течение всего указанного срока жизни остается постоянной (т. е. видно проявление того же стохастического механизма как и в эндотелии роговицы!) и составляет 0,3% в год [10].

Наконец, о термодинамической предопределенности старения. Действительно, все сложные объекты являются термодинамически неустойчивыми. В то же время, и физики, и биологи, соглашаются с тем, что клетка является открытой термодинамической системой, поддерживающей постоянный уровень энтропии за счет равновесия между процессами распада и синтеза путем постоянного обмена с окружающей средой. Получается, что старение и смерть нельзя предсказать на основе второго закона термодинамики. Однако этого нельзя сделать только в том случае, когда указанные процессы целиком фокусируются на клетке. Все становится на место, если мы отказываемся от геронтологической догмы. Только на уровне тканевой системы становится возможным увидеть термодинамическое предопределение старения. Тогда вытекающая из второго закона термодинамики неустойчивость транскрипционно-трансляционного воспроизведения (иначе говоря, сбой в информационном обеспечении), становится тем фактором, который (через апоптоз) и определяет возрастное разрушение биологической системы. Термодинамическая неустойчивость, заложенная в самой клетке, делает неустойчивыми тканевые системы, которые она образует. Для самой же клетки, в силу ее автономности, это не представляет фатальной угрозы. Клетки могут жить бесконечно, а ткани — неизбежно разрушаются. Разрушаются не потому, что стареют и гибнут клетки, а потому, что ткань — термодинамически неустойчивая система. И в основе этой неустойчивости тот биологический механизм старения, который описан выше.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Артемов А. В.** Донорская роговицы в аспекте современной патологии. — Одесса: Интерпринт, 2007. — 186 с.
2. **Борзенко С. А.** Медико-технологические и методологические основы эффективной деятельности глазных

- тканевых банков России в обеспечении операций по сквозной трансплантации роговицы // Автореф. дис. ... докт. мед. наук. — М., 2008. — 50 с.
3. **Вит В. В.** Строение зрительной системы человека. — Одесса: Астропринт, 2003. — 664 с.
 4. **Давыдовский И. В.** Геронтология. — М.: Медицина, 1966. — 300 с.
 5. **Запорожан В. Н., Бажора Ю. И.** Стволовые клетки. — Одесса: Одес. держ. мед. ун-т., 2004. — 228 с.
 6. **Фильченков А. А., Стойка Р. С.** Апоптоз и рак. — Киев: Морион, 1999. — 184 с.
 7. **Фролькис В. В.** Старение и увеличение продолжительности жизни. — Л.: Наука, 1988. — 239 с.
 8. **Hoffner K. J.** Corneal decompensation after corneal endothelium count // Amer. J. Ophthalmol. — 1979. — Vol. 87. — P. 252-253.
 9. **Mishima S.** Clinical investigation of the corneal endothelium // Amer. J. Ophthalmol. — 1982. — Vol. 93. — P. 1-29.
 10. **Muller-Pedersen T.** A comparative study of human corneal keratocyte and endothelial cell density during ageing // Cornea. — 1997. — Vol. 16. — P. 333-338.
 11. **Musch D. C., Meyer R. F., Sugar A.** Predictive factors for endothelial cell loss after penetrating keratoplasty // Arch. Ophthalmol. — 1993. — Vol. 101. — P. 80-93.
 12. **Murphy C., Alvarado J., Jester R., Maglio M.** Prenatal and postnatal cellularity of the human corneal endothelium: a quantitative histologic study // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 1984. — Vol. 25. — P. 312-332.
 13. **Probst L. E., Halfaker J. S., Holland E. J.** Quality of corneal donor tissue in the greater-than-75-year age group // Cornea. — 1997. — Vol. 16. — P. 507-511.
 14. **Sherrard E., Novakovic P., Speedwell L.** Age-related changes of the corneal endothelium and stroma as seen in vivo by specular microscopy // Eye. — 1987. — Vol. 1. — P. 197-208.
 15. **Stent G., Calendar R.** Molecular genetics. An introductory narrative. Philad., 1979. Русский перевод: Молекулярная генетика. Изд-во «Мир», М., 1981. — 646 с.
 16. **Vasara K., Setala K., Ruusuvaara P.** Follow-up study of human corneal endothelial cells, photographed in vitro before enucleation and 20 years later in grafts // Acta Ophthalmol. Scandinavica. — 1999. — Vol. 77. — P. 273-276.

Поступила 15.04.2009.

Рецензент д-р мед. наук Э. В. Мальцев

AGE CHANGES OF THE CORNEAL ENDOTHELIUM AS REFLECTION OF UNIVERSAL MECHANISM OF AGING

A. V. Artemov

Odessa, Ukraine

Laws of aging unknown earlier were theoretically substantiated and practically confirmed by the example of the corneal endothelium, consisting of the fact that age reduction in the functional and adaptive possibilities of the tissues, organs and organism on the whole that is considered one of the main manifestations of the process indicated, is the consequence of the gradual and uniform decrease of the number of cells without preliminary damage, disease or any other pathologic change in the cells themselves. Thus, aging is a unique pathologic process, characteristic only of cellular associations, which form the tissue, but not peculiar to unicellular organisms and to the separate cells, which form part of the tissues. Aging of the organism occurs without aging of the cells.



ТАК БЕССМЕРТНА ЛИ КЛЕТКА?

Э. В. Мальцев, д-р мед. наук, проф.

Несомненно, что канд. мед. наук А. В. Артемов в своей работе «Возрастные изменения эндотелия роговицы как отражение универсального механизма старения» высказывает весьма интересную и, по крайней мере, достойную обсуждения оригинальную точку зрения на проблему, древнюю как мир, и волнующую старого и малого, умного и не очень, великого и просто ученого.

Как бы приобрести бессмертие? И уподобиться богу. И что предусмотрено по этому поводу матушкой-природой, а что предполагают простые смертные ученые? Все это в той или иной мере лаконично рассматривает автор. Причем делает это с позиций офтальмопатоморфолога, к тому же много лет занимающегося консервацией тканей, в первую очередь — роговицы. Пересказывать статью здесь не

будем, каждый желающий, а их, надеемся, окажется немало, сможет ознакомиться с ней самостоятельно. Просто выскажем некоторые соображения, которые не позволяют безоговорочно разделить его взгляды на проблему в целом.

Итак, по мнению А. В. Артемова, клетки нашего организма не стареют вообще, просто на протяжении жизни их количество по разным причинам уменьшается, но свойства сохранившихся клеток остаются неизменными. Меняются лишь свойства межклеточного пространства, точнее, вещества. Т. е. субстанции, самими клетками и образуемой. А это и есть уже первое из возникающих при чтении статьи сомнений, которое только усиливается, если вспом-

© Э. В. Мальцев, 2009.