

ДЕЙСТВИЕ АНТИОКСИДАНТА ФУКОКСАНТИНА В СОСТАВЕ ПРЕПАРАТА MESO-XANTIN F199 НА КЛЕТКИ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ ПРОГЕРИН

Работа выполнена в НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского, МГУ
Научный руководитель проф. Поляков В.Ю.

**Курчашова
Светлана
Юрьевна**

к. б. н., старший
научный сотрудник
НИИ ФХБ
им. А.Н. Белозерского,
МГУ, Москва



**Киреев
Игорь Игоревич**

д. б. н., зав. отделом
электронной
микроскопии
НИИ ФХБ
им. А. Н. Белозерского
МГУ, Москва



**Волкова
Елена
Николаевна**

д. м. н., профессор,
врач высшей
категории,
директор научно-
образовательного
департамента,
директор учебно-
методического
центра Premierpharm,
Москва



**Мазур
Минара
Абдусаламовна**

к.м.н., врач-
дерматовенеролог,
врач-косметолог,
сертифицированный
тренер компании
Premierpharm,
Москва



В настоящее время в литературе появляются достаточно аргументированные данные, согласно которым пространственная (3D) структура интерфазного ядра является одним из определяющих эпигенетических факторов, контролирующих нормальное функционирование клетки [1].

По одной из распространенных гипотез, 3D-организация и, соответственно, структурно-функциональная стабильность интерфазного ядра поддерживается белками негистонового типа, в интерфазе формирующими ядерный остов (матрикс) [2].

Особенно важная роль приписывается белкам ядерного матрикса, ассоциированным с ядерной оболочкой, так называемым ламинам. В состав ламин входят несколько типов белков, из них мажорными считаются ламины типа А, В и С [3]. По некоторым данным, ламины А и В типов формируют отдельные, но взаимосвязанные комплексы на внутренней мембране ядерной оболочки и обладают различной подвижностью в нуклеоплазме [4, 5].

Согласно общепринятой точки зрения, ламины создают особый слой микрофиламентов – ламину, которая

Ядерный остов (матрикс)

– взаимосвязанная система структур, остающихся после экстракции большей части гистонов 2 М NaCl, в состав которой входит около 450 различных белков негистонового типа с различной молекулярной массой (5–200 кДа). Функции многих белков негистонового типа, формирующих ядерный матрикс, остаются малоизученными

является своего рода «каркасом» ядра, обеспечивая его устойчивость к механическим воздействиям и поддерживая определенную (чаще всего сферической) формы.

Другие возможные функции ламин до конца не изучены. Предполагается, что они участвуют в эпигенетической модификации хроматина, которая приводит к подавлению экспрессии генов и иммобилизации инактивированных сайтов хромосом на ядерной оболочке [6]. В геноме *Drosophila* идентифицировано около 500 «молчащих» генов, которые преимущественно взаимодействуют с ламин В [7].

Имеются данные, в соответствии с которыми комплексы ламин принимают активное участие в репликации ДНК.

Относительно недавно было показано, что ламины играют существенную роль в процессе старения клетки. В 2003 году обнаружена мутация гена, кодирующего ламин А, которая

Интерфазное ядро

– ядро клетки в период интерфазы, когда оно не претерпевает митотических делений, а выполняет лишь свои специфические рабочие функции

Сплайсинг

(от англ. *splice* – сращивать или склеивать концы чего-либо) – процесс вырезания определенных нуклеотидных последовательностей из молекул РНК и соединения последовательностей, сохраняющихся в «зрелой» молекуле, в ходе процессинга РНК

является причиной развития синдрома преждевременного старения, известного как прогерия Хатчинсона-Гилфорда. При этом очень редком наследственном заболевании у детей развиваются симптомы преждевременного старения: выпадение волос, уменьшение слоя подкожной жировой клетчатки, атеросклероз и изменения скелета. Такие дети обычно умирают от болезни сердечно-сосудистой системы в раннем возрасте.

Более чем в 80% случаев дефект гена, отвечающий за появление прогерии, – это одиночная самопроизвольная мутация в кодоне 608 гена LMNA, который кодирует как ламин А, так и ламин С. Результатом этого изменения является замена третьего нуклеотида кодона. Мутация не приводит к замене аминокислоты, но активирует скрытый сайт сплайсинга в LMNA, что приводит к aberrantному удалению части РНК LMNA во время процесса сплайсинга и образованию белка, укороченного на 50 аминокислот около С-терминального конца.

Этот мутантный белок получил название прогерин. Поскольку фарнезильная группа отвечает за локализацию на ядерной периферии, прогерин аккумулируется в ламине. Этот процесс сопровождается проявлением негативных функциональных эффектов: нарушением структуры клеточного ядра, изменениями в системе эпигенетической регуляции [8, 9] и накоплением поврежденных ДНК [10].

В настоящее время установлено, что прогерин может накапливаться в стареющих клетках даже в отсутствие мутации в гене, который кодирует ламин А.

В соответствии с одной из многочисленных теорий этот факт означает, что возможной причиной старения является накопление ошибок не

только в результате мутаций генов, но и при транскрипции и трансляции генетической информации («катастрофа ошибок»), что ведет к образованию дефектных белков и многочисленным нарушениям в регуляторных системах клетки. Недавно были получены интригующие данные, по которым экспрессия прогерина в стареющих фибробластах человека коррелирует с укорочением теломерных регионов хромосом, что, по многим предположениям, является одной из наиболее доказанных причин старения клеток [11]. И хотя эти данные не дают ответа на вопрос, является ли альтернативный сплайсинг ламина А (и, возможно, других ключевых для нормального функционирования клетки белков) причиной старения или его следствием, прогерин можно рассматривать как надежный маркер стареющих клеток.

Аберрантный

(лат. *aberrans, aberrantis* отклоняющийся) – отклоняющийся от нормального строения, расположения или состояния

Докторами Тестер Э. и Петриковским Б. в лабораторных исследованиях было показано, что одним из факторов, «замедляющих» процесс старения фибробластов человека, является препарат Meso-Xantin F199, основу которого составляет каратиноид фукоксантин (согласно имеющимся отчетам). По их данным, Meso-Xantin F199 оказывает широкий спектр действий на фибробласты кожи человека:

- активирует экспрессию генов, кодирующих коллагены типа 1, 2 и 3, поддерживающую ДНК-метилтрансферазу, ацетилазу гистонов и факторы роста фибробластов. Примерно в два раза возрастает уровень экспрессии генов – регуляторов репаративного синтеза ДНК и увеличивается экспрессия гена, кодирующего белок PCNA, который непосредственно участвует в репликации ДНК;
- ингибирует экспрессию генов, кодирующих деацетилазы гистонов; гена, кодирующего метилтрансферазу, осуществляющую метилирование гистона H3 и ДНК-метилтрансферазу,

осуществляющую метилирование ДНК *de novo*;

- с помощью УЗ-сканирования кожи показано, что инъекции препарата вызывают увеличение количества коллагена в подкожной соединительной ткани.

Полученные данные представляют не только сугубо практический, но и большой научный интерес, так как дают возможность выяснить, как влияет активация ключевых для цитофизиологии фибробластов генов на процессы, связанные со старением клетки.

В настоящей работе проведен анализ эффектов действия фукоксантина на клетки, трансфицированные геном, кодирующим «белок старения» – прогерин.

Описание объекта разработки

В качестве экспериментальной модели использовались клетки почки эмбриона свиньи (СПЭВ), экспрессирующие человеческий прогерин, связанный с зеленым флуоресцентным белком.

Цель работы и основные задачи исследования

Целью работы является выявление эффектов действия фукоксантина как ключевого компонента препарата Meso-Xanthin F199 на культивируемые *in vitro* клетки СПЭВ, экспрессирующие прогерин. Модель культивируемых клеток исключает многие трудноучитываемые факторы, опосредующие действие биопрепаратов на уровне целого организма, и позволяет тестировать ряд функциональных показателей эффективности их действия в строго контролируемых и воспроизводимых условиях.

В работе были поставлены следующие задачи:

- 1) изучить влияние экспрессии прогерина на структуру ядер и пролиферативную активность клеток СПЭВ, экспрессирующих прогерин;
- 2) изучить действие фукоксантина на пролиферацию и жизнеспособность клеток СПЭВ, экспрессирующих прогерин.

Трансфeкция

– процесс введения нуклеиновой кислоты в клетки эукариот невирусным методом. Аналогичный процесс в отношении прокариот называется трансформацией

Методы исследования

Трансфeкция клеток.

Клетки СПЭВ трансфeцировали плазмидой, кодирующей GFP-прогерин человека под контролем цитомегаловирусного промотора (CMV). Клетки рассаживали по 1 на лунку и через 1 месяц клон подвергали криоконсервации. Клонированные клетки культивировали и использовали для дальнейших экспериментов.

Инсталляция фукоксантина.

Клетки, трансфeцированные плазмидой, кодирующей ген прогерина, высевали в чашки Петри на покровные стекла и выращивали при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Через 24 часа к культивируемым клеткам добавляли фукоксантин в концентрациях 10, 20 и 40 микромолей, и затем клетки выращивали в течение 48 часов при 37°C и 5% CO₂.

Пермеабиллизация

– от англ. permeabilization – изменение проницаемости мембраны клетки

Выявление синтеза ДНК.

Реплицирующиеся клетки выявляли по включению этинилдезоксисуридина (10 микромолей, 15 мин, 37°C, 5% CO₂). Клетки фиксировали 3% формальдегидом в PBS 10 минут при 37°C, пермеабилizовали 0,5% Тритоном X-100 в PBS 10 минут, промывали PBS 3 раза по 10 минут и выявляли этинилдезоксисуридин согласно стандартному протоколу Invitrogen. Клетки докрашивали флуорохромом DAPI в PBS (0,1 мкг/мл, 10 минут) и заключали в мовиол.

Светомикроскопические исследования и анализ данных.

Препараты изучали и фотографировали с использованием флуоресцентного микроскопа Axiovert 200M (Carl

Zeiss), оснащенного объективами 10x, 20x и 100x и цифровой камерой.

Для получения количественных данных фотографировали клетки с использованием малых увеличений и вели подсчет по фотографиям. На каждую точку подсчитывали не менее 1000 клеток в 20 полях зрения.

Клетки со слабым уровнем экспрессии EGFP-прогерина имеют округлые ядра, в которых белок выявляется на периферии ядерной оболочки в виде относительно гомогенного слоя (рис. 1А).

В клетках с высоким уровнем экспрессии белка EGFP-прогерин выяв-

ЧЕРЕДКО ДЛЯ РЕШЕНИЯ ПОСТАВЛЕННОЙ ЗАДАЧИ ИСПОЛЬЗУЕТСЯ ВВЕДЕНИЕ ДНК В КЛЕТКИ ТОЛЬКО НА ВРЕМЯ, ДОСТАТОЧНОЕ ДЛЯ ЕЕ ЭКСПРЕССИИ. ТАК КАК ТРАНСФЕЦИРОВАННАЯ ДНК ОБЫЧНО НЕ ВКЛЮЧАЕТСЯ В ЯДЕРНЫЙ ГЕНОМ И НЕ РЕПЛИЦИРУЕТСЯ, ЧУЖЕРОДНАЯ ДНК БЫСТРО ТЕРЯЕТСЯ ПО МЕРЕ РАЗМНОЖЕНИЯ КЛЕТОК. ТАКАЯ ТРАНСФЕКЦИЯ НАЗЫВАЕТСЯ ТРАНЗИЕНТНОЙ. ЕСЛИ НЕОБХОДИМО ЗАКРЕПИТЬ ВВЕДЕННЫЙ ГЕН В ПОТОМСТВЕ ТРАНСФЕЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК, ТО ЕГО СЛЕДУЕТ ВКЛЮЧИТЬ В ЯДЕРНЫЙ ГЕНОМ. ТАКАЯ ТРАНСФЕКЦИЯ НАЗЫВАЕТСЯ СТАБИЛЬНОЙ

Результаты

Морфологическая характеристика ядер нормальных и трансфeцированных клеток.

Через 24 часа после транзientной трансфeкции плазмидой, кодирующей прогерин, в популяции выявляются клетки с разным уровнем экспрессии экзогенного белка. Содержание белка может быть определено визуально либо полуколичественно по длительности экспозиции, необходимой для фотографирования клеток.

ляется на периферии ядер, где также наблюдаются ярко флуоресцирующие скопления прогерина различного размера и формы (рис. 1В).

Некоторые клетки, судя по интенсивности флуоресценции ядерной оболочки и по количеству и размеру нуклеоплазматических фокусов, имеют «промежуточный» уровень экспрессии прогерина (рис. 1Б).

Специальное внимание было уделено структурному состоянию хроматина в ядрах клеток с различным уровнем экспрессии белка. С этой целью проводилось окрашивание

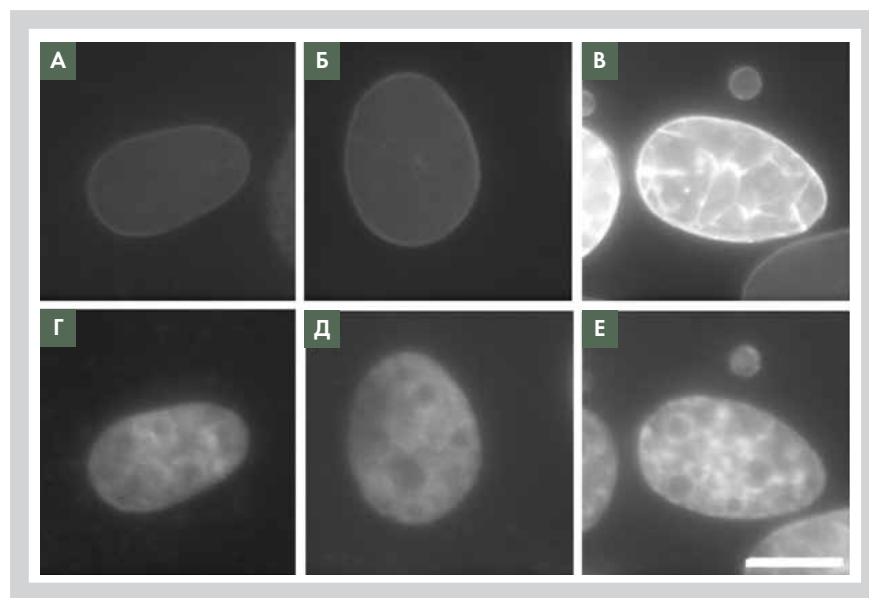


Рис. 1. Ядра клеток культуры СПЭВ, трансфeцированных плазмидой, содержащей ген человеческого прогерина, с низким (А), средним (Б) и высоким (В) уровнем экспрессии белка. А-В флуоресценция GFP; Г-Е – окрашивание флуорохромом DAPI. Масштабный отрезок – 10 мкм

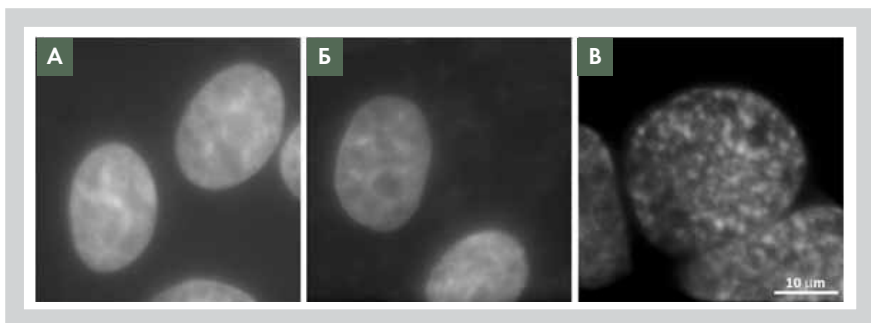


Рис. 2. Размеры ядер и структура хроматина в ядрах клеток исходной, не трансфицированной культуры (А) и в ядрах клеток с низким (Б) и высоким (В) уровнем экспрессии прогерина

трансфицированных клеток ДНК-связывающим флуорохромом DAPI. В ядрах клеток с низким и средним уровнем экспрессии прогерина флуорохром выявляет диффузно окрашенные зоны кариоплазмы и протяженные фибриллы конденсированного хроматина различных размеров и формы (рис. 1Г, Д).

В ядрах с высоким уровнем экспрессии белка хроматин представлен ярко флуоресцирующими дискретными глобулами, часто располагающимися в центральной зоне кариоплазмы (рис. 1Е).

Особенно наглядно изменения структуры хроматина в клетках, экспрессирующих прогерин, демонстрирует сравнительный анализ морфологии ядер контрольных (не трансфицированных) (рис. 2А) и трансфицированных клеток (рис. 2Б, В). При этом в клетках с высоким уровнем экспрессии прогерина значительно увеличивается размер ядер по сравнению с клетками исходной культуры (рис. 3).

Объективную характеристику влияния экспрессии прогерина на структуру хроматина дает сравнительный денситометрический анализ изображения ядер (рис. 3).

В целом полученные данные показывают, что структурное состояние хроматина в ядрах клеток, экспрессирующих прогерин, а именно его аномальная конденсация – надежный показатель включения прогерина в метаболизм клетки.

Влияние прогерина на цитокинетические параметры трансфицированных клеток.

По данным светооптического анализа, клетки, экспрессирующие прогерин, сохраняют способность к синтезу ДНК (рис. 4Б). При этом в клетках, экспрессирующих прогерин, были обнаружены все пять известных паттернов репликации,

а также необычные паттерны, не свойственные нормальным клеткам (рис. 4А).

По данным светооптического анализа, клетки, экспрессирующие прогерин, сохраняют способность к делению (не иллюстрировано).

Влияние фукоксантина на популяцию клеток, экспрессирующих прогерин.

Для оценки влияния фукоксантина на состояние клеток, экспрессирующих прогерин, проводился подсчет доли клеток с нормальными и измененными ядрами; доли клеток, включивших

этинилдезоксисуридин, и доли митотических клеток. Полученные результаты представлены на рис. 5–7.

Как видно на графике, представленном на рис. 5, обработка фукоксантином приводит к существенному снижению доли клеток с аномально конденсированным хроматином. При этом проявляется четко выраженная зависимость от дозы препарата.

В трансфицированных клетках, обработанных фукоксантином, увеличивается количество клеток, синтезирующих ДНК (рис. 6).

Определение доли делящихся клеток показало, что фукоксантин практически не влияет на деление клеток, экспрессирующих прогерин (рис. 7).

Обсуждение

Прогерин представляет собой сплайс-вариант ламина А – белка, который служит своеобразной «платформой» для создания упорядоченной структуры интерфазного ядра. Показано, что экспрессия прогерина в

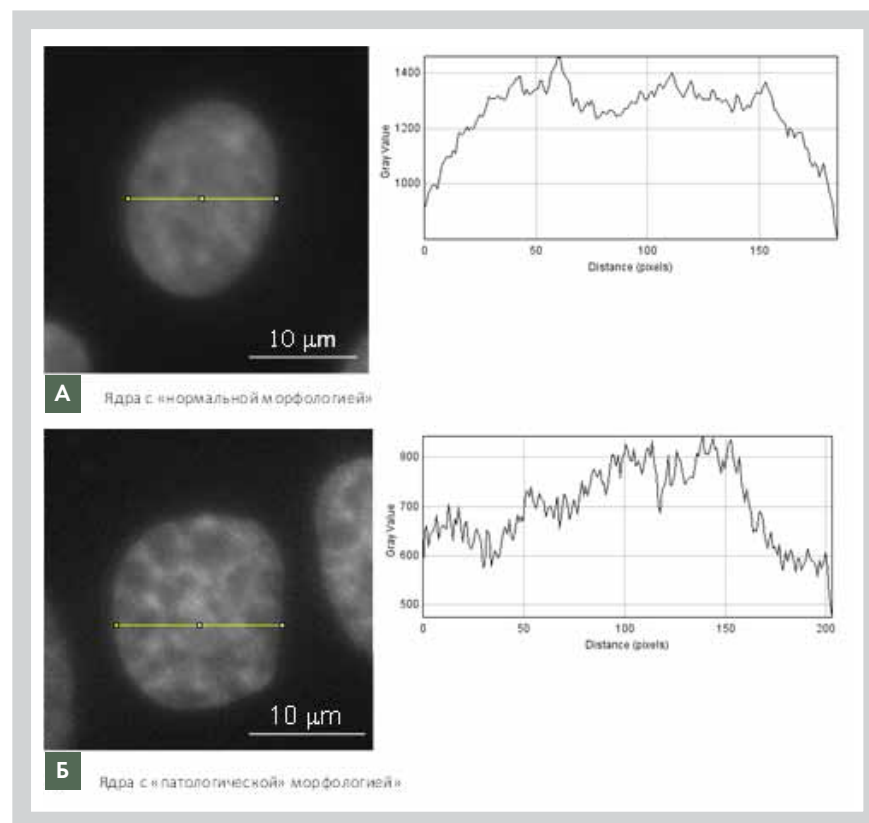


Рис. 3. Изображения ядер, типичных для клеток исходной культуры (А) и клеток, экспрессирующих прогерин (Б). Окраска ДНК-связывающим флуорохромом DAPI. Справа – денситометрические профили ядер. Множественные пики на денситограмме (Б) показывают аномальную конденсацию хроматина в клетках, экспрессирующих прогерин

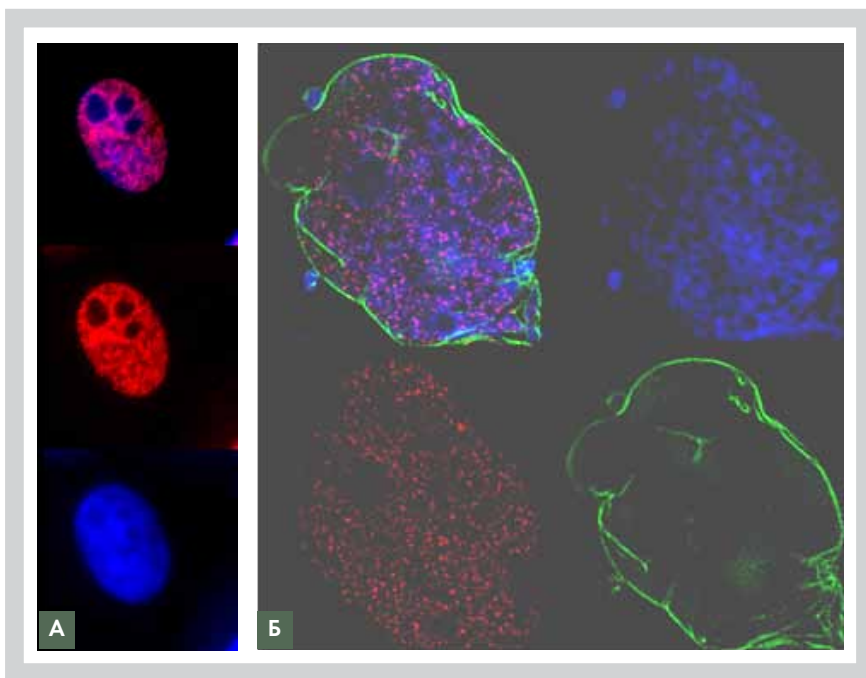


Рис. 4. Включение этинилдезоксисуридина в ядрах нормальных клеток (А) и клеток, экспрессирующих прогерин (Б). Выявление этинилдезоксисуридина проводили согласно стандартному протоколу Invitrogen. Паттерны репликации – красный цвет, прогерин – зеленый, хроматин – синий

стареющих фибробластах кожи человека коррелирует с появлением разрывов в ДНК, снижением экспрессии коллагена и с изменением энзиматического статуса некоторых белков хроматина. Считается, что прогерин, встраиваясь в ядерную оболочку вместо ламина А, приводит к резким изменениям в характере позиционирования хромосом в интерфазных ядрах и соответственно нарушает свойственную нормальным фибробластам (каноническую) оркестровку генов. Одной из причин этого феномена может служить «разобщение» метилирования гистонов и связанной с этим эпигенетической компактизацией хроматина.

Известны различные генетические заболевания, связанные с мутациями в гене ламина А/С, которые проявляются в изменениях в структуре кожи. К ним относятся несколько прогероидных синдромов, включая прогерия Хатчинсона-Гилфорда, мандибулоакральную дисплазию и рестриктивную дермопатию. В случае прогерии Хатчинсона-Гилфорда причиной фенотипических изменений является конститутивная экспрессия прогерина – мутантной формы ламина А (Ламин А-Δ50) [12, 13]. Экспрессия прогерина приводит к нарушениям структуры клеточного ядра, изменениям в сис-

теме эпигенетической регуляции [8, 9], накоплению повреждений ДНК [10].

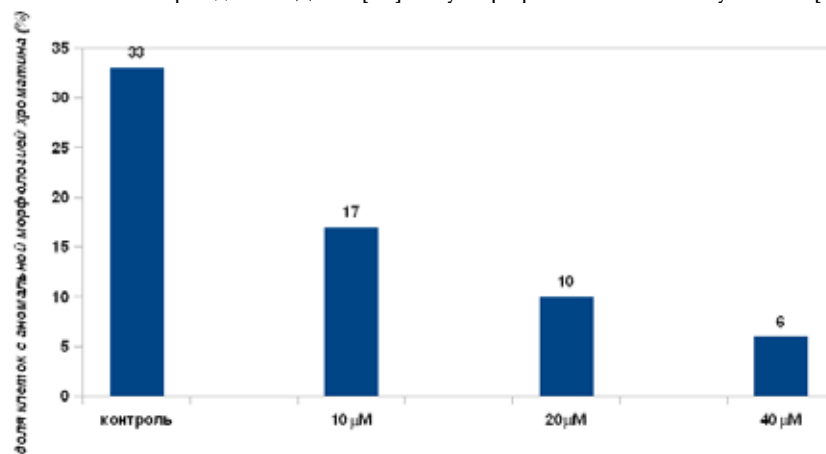


Рис. 5. Влияние фукоксантина на популяцию трансфицированных клеток с измененной морфологией хроматина

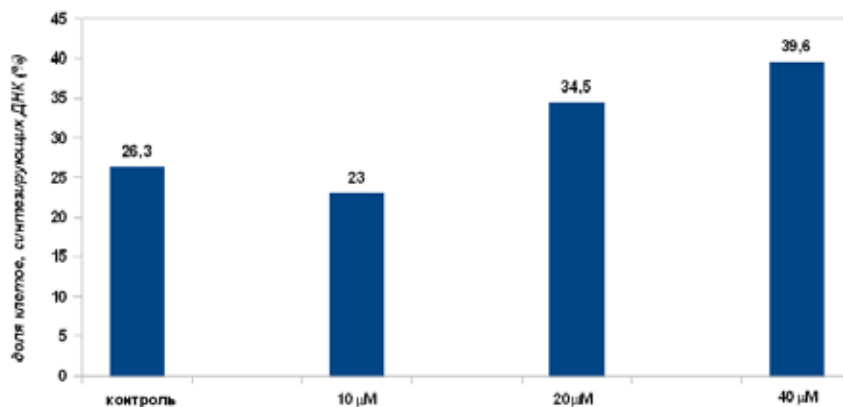


Рис. 6. Влияние фукоксантина на популяцию трансфицированных клеток, синтезирующих ДНК

Также наблюдается снижение пролиферативного потенциала клеток, что может быть прямо или косвенно связано с уменьшением длины теломера [14, 15]. В результате накопления прогерина в мезенхимных стволовых клетках изменяется их молекулярная идентичность и способность к дифференцировке [16]. Ряд наблюдений позволяет предположить, что молекулярный механизм, связанный с мутацией ламина А, функционирует и в процессе нормального старения. Так, прогерин экспрессируется в нормальных фибробластах кожи пожилых людей (хотя и на более низком уровне, чем у пациентов с HGPS) [17–19]. В настоящей работе в качестве потенциального реагента, способного нейтрализовать токсичное действие прогерина, использовался каротиноид фукоксантин в составе препарата Meso-Xantin F199. Полученные ранее данные показали, что фукоксантин предотвращает гибель фибробластов человека, индуцированную действием ультрафиолетового облучения [20].

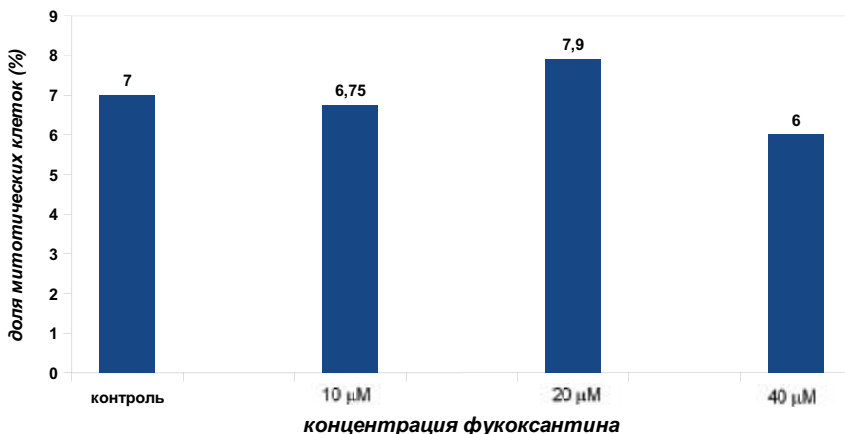


Рис. 7. Влияние фукоксантина на деление трансфицированных клеток

В настоящей работе в качестве модели использовались клетки, трансфицированные геном, кодирующим прогерин человека. Показано, что характерной особенностью этих клеток является аномальная конденсация хроматина и нарушение нормальной репликации ДНК.

Проведенные эксперименты показали, что фукоксантин нормализует

основные показатели жизнеспособности клеток, экспрессирующих прогерин – структуру хроматина и синтез ДНК, и не оказывает заметного влияния на деление клеток. При этом существенная нормализация структуры хроматина в трансфицированных клетках наблюдается при использовании дозы 10 μM, что соответствует концентрации фу-

коксантина в коммерческом препарате Meso-Xantin F199.

Выводы

1) В клетках СПЭВ, экспрессирующих прогерин человека, наблюдается аномальная компактизация хроматина интерфазных ядер. При этом популяция клеток сохраняет способность к синтезу ДНК и делению.

2) Инсталляция в трансфицированные клетки СПЭВ фукоксантина нормализует основные показатели жизнеспособности клеток, экспрессирующих прогерин – структуру хроматина и синтез ДНК. Возможно, это связано с селективным подавлением экспрессии прогерина.

3) Полученные данные показывают, что фукоксантин как при его индивидуальном применении, так и в составе препарата Meso-Xantin F199 может использоваться в качестве препарата геропротекторного действия на стареющие фибробласты кожи человека. ■

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Rivera-Mulia J.C., Hernández-Muñoz R., Martínez F., Aranda-Anzaldo A. DNA moves sequentially towards the nuclear matrix during DNA replication in vivo. *BMC Cell Biol.* 2011 Jan 19; 12: 3.
- [2] Linnemann AK, Krawetz SA. Maintenance of a functional higher order chromatin structure: The role of the nuclear matrix in normal and disease states. *Gene Ther Mol Biol.* 2009; 13 (1): 231–243.
- [3] Krohne G., Benavente R., Scheer U., Dabauvalle MC. The nuclear lamina in Heidelberg and Würzburg: a personal view. *Eur J Cell Biol.* 2005 Mar; 84 (2–3): 163–79. Review.
- [4] Delbarre E., Tramier M., Coppey-Moisan M., Gaillard C., Courvalin J.C., Buendia B. The truncated prelamin A in Hutchinson-Gilford progeria syndrome alters segregation of A-type and B-type lamin homopolymers. *Hum Mol Genet.* 2006 Apr 1; 15 (7): 1113–22.
- [5] Shimi T., Pflieger K., Kojima S., Pack C.G., Solovei I., Goldman A.E., Adam S.A., Shumaker D.K., Kinjo M., Cremer T., Goldman R.D. The A- and B-type nuclear lamin networks: microdomains involved in chromatin organization and transcription. *Genes Dev.* 2008 Dec 15; 22 (24): 3 409–21.
- [6] Pickersgill H., Kalverda B., de Wit E., Talhout W., Fornerod M., van Steensel B. Characterization of the *Drosophila melanogaster* genome at the nuclear lamina. *Nat Genet.* 2006 Sep; 38 (9): 1005–14. Epub 2006 Jul 30.
- [7] Somech R., Shaklai S., Geller O., Amariglio N., Simon A.J., Rechavi G., Gal-Yam EN. The nuclear-envelope protein and transcriptional repressor LAP2beta interacts with HDAC3 at the nuclear periphery, and induces histone H4 deacetylation. *J Cell Sci.* 2005 Sep 1; 118 (Pt 17): 4017–25.
- [8] Scaffidi P., Gordon L., Misteli T. The cell nucleus and aging: tantalizing clues and hopeful promises. *PLoS Biol.* 2005 Nov; 3 (11): e395. Epub 2005 Nov 15.
- [9] Schumacher A., Petronis A. Epigenetics of complex diseases: from general theory to laboratory experiments // *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 2006. V. 310. P. 81–115.
- [10] Liu Y., Freedman B.I. Genetics of progressive renal failure in diabetic kidney disease // *Kidney Int.* 2005. V. 99. P. 94–97.
- [11] Huang S., Risques R.A., Martin G.M., Rabinovitch P.S., Oshima J. Accelerated telomere shortening and replicative senescence in human fibroblasts overexpressing mutant and wild-type lamin A. *Exp Cell Res.* 2008 Jan 1; 314 (1): 82–91. Epub 2007 Aug 16. PMID: 17870066
- [12] De Sandre-Giovannoli A., Bernard R., Cau P., Navarro C., Amiel J., Boccaccio I., Lyonnet S., Stewart C.L., Munnich A., Le Merrer M., Lévy N. Lamin A truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science.* 2003 Jun 27; 300 (5628): 2055.
- [13] Eriksson M., Brown W.T., Gordon L.B., Glynn M.W., Singer J., Scott L., Erdos M.R., Robbins C.M., Moses T.Y., Berglund P., Dutra A., Pak E., Durkin S., Csoka A.B., Boehnke M., Glover T.W., Collins F.S. Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature.* 2003 May 15; 423 (6937): 293–8.
- [14] Huang Y., Liang P., Liu D., Huang J., and Songyang Z. Telomere regulation in pluripotent stem cells. *Protein Cell.* Mar 2014; 5 (3): 194–202.
- [15] Decker M.L., Chavez E., Vulto I., Lansdorp P.M. Telomere length in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Mech Ageing Dev.* 2009 Jun; 130 (6): 377–83.
- [16] Scaffidi P., Misteli T. Lamin A-dependent misregulation of adult stem cells associated with accelerated aging. *Nat Cell Biol.* 2008 Apr; 10 (4): 452–9. Epub 2008 Mar 2.
- [17] Hasty P and Vijg J. Accelerating aging by mouse reverse genetics: a rational approach to understanding longevity. 2004. *Aging Cell.* 3 (2): 55–65.
- [18] Rodriguez S., Coppède F., Sagelius H. et al. 2009. Increased expression of the Hutchinson-Gilford progeria syndrome truncated lamin A transcript during cell aging. *Eur J Hum Genet* 17: 928–937.
- [19] Scaffidi P1, Misteli T. Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science.* 2006 May 19; 312 (5776): 1059–63. Epub 2006 Apr 27.
- [20] Heo S.J., Jeon Y.J. Protective effect of fucoxanthin isolated from *Sargassum siliquastrum* on UV-B induced cell damage. 2008. *J Photochem Photobiol B.* 2009 May 4; 95 (2): 101–7. doi: 10.1016/j.jphotobiol.11.011. Epub 2008 Dec 6.