

СОДЕРЖАНИЕ

Том 87, № 12, 2022

ФЕНОПТОЗ (специальный выпуск)

Приглашённые редакторы: **А.М. Оловников**, **Б.В. Черняк**, **Г.А. Шиловский**

От редакции	1765
Программа адаптации на основе способности к эволюции контролирует старение млекопитающих (обзор) <i>Т.С. Голдсмит</i>	1766
Старение – неизбежное свойство живой материи или эволюционная адаптация? (обзор) <i>П.В. Лидский, Ц. Юань, Ж.М. Рулисон, Р. Андино-Павловский</i>	1777
Является ли старение человека формой фенотоза? (обзор) <i>G. Libertini, G. Corbi, O. Shubernetskaya, and N. Ferrara</i>	1818
Является ли Nrf2 основным регулятором старения млекопитающих? (обзор) <i>Р.А. Зиновкин, Н.Д. Кондратенко, Л.А. Зиновкина</i>	1842
Транскрипционный фактор Nrf2 и митохондрии – друзья или противники в редокс-регуляции темпов старения (обзор) <i>Г.А. Шиловский, В.В. Ашапкин</i>	1856
Не настало ли время слома митохондриальной парадигмы и установления митохондриальной номенклатуры? (обзор) <i>Д.Б. Зоров, Л.Д. Зорова, Н.В. Андрианова, В.А. Бабенко, С.Д. Зоров, И.Б. Певзнер, Г.Т. Сухих, Д.Н. Силачев</i>	1868
Старение является побочным эффектом реализации программы онтогенеза многоклеточных (обзор) <i>Л.В. Сальников</i>	1881
Роль мёртвых клеток в коллективной устойчивости к стрессу микробных сообществ на примере дрожжей (обзор) <i>Н.А. Киреева, К.В. Галкина, С.С. Соколов, Д.А. Кнорре</i>	1888
Возрастные изменения внеклеточного матрикса (обзор) <i>З.Г. Гуватова, П.В. Борисов, А.А. Алексеев, А.А. Москалев</i>	1897
SkQ1 как инструмент воздействия на программу преждевременного старения: опыт исследований на крысах Охус (обзор) <i>Н.Г. Колосова, О.С. Кожевникова, Н.А. Муралёва, Е.А. Рудницкая, Ю.В. Румянцева, Н.А. Стефанова, Д.В. Телегина, М.А. Тюменцев, А.Ж. Фурсова</i>	1916
Многогранный нотобранхиус (обзор) <i>Е.В. Булавкина, А.А. Кудрявцев, М.А. Гончарова, М.С. Ланцова, А.И. Шувалова, М.А. Ковалев, А.В. Кудрявцева</i>	1928
Эволюция долголетия как видового признака у млекопитающих <i>Г.А. Шиловский, Т.С. Путьгина, А.В. Марков</i>	1947
Дисфункция ламина В и физиологическое старение приводят к дестабилизации теломер в герминальных клетках <i>Drosophila</i> <i>В.В. Моргунова, О.А. Соколова, Т.В. Сизова, Л.Г. Малаев, Д.С. Бабаев, Д.А. Квон, А.И. Калмыкова</i>	1972

СОДЕРЖАНИЕ

Том 87, № 12, 2022

- Ген *shuttle craft* влияет на продолжительность жизни *Drosophila melanogaster*, контролируя раннее развитие и модифицируя программу старения
А.В. Симоненко, Н.В. Рощина, А.В. Кременцова, О.Ю. Рыбина, Е.Г. Пасюкова 1985
- Исторические тренды видовой продолжительности жизни человека и актуарной скорости старения
Л.А. Гаврилов, Н.С. Гаврилова 1998

ГИПОТЕЗЫ

- Врождённый иммунитет и фенотоз
Б.В. Черняк, К.Г. Лямзаев 2012
- Планетарный метроном как регулятор продолжительности жизни и темпа старения: метрономная гипотеза
А.М. Оловников 2019

РЕГУЛЯРНЫЕ СТАТЬИ

- Выяснение роли адаптерного белка Anks1a в регуляции подвижности клеток рака молочной железы
А.О. Жолудева, М.Е. Ломакина, Е.А. Орлова, Я. Ванг, А. Фокин, А. Полеская, А.М. Готро, А.Ю. Александрова 2033
- Биология коронавируса SARS-CoV-2 (обзор)
Р.Н. Мингалеева, Н.А. Нигматулина, Л.М. Шарафетдинова, А.М. Ромозанова, А.Г. Габдулхакова, Ю.В. Филина, Р.Ф. Шавалиев, А.А. Ризванов, Р.Р. Мифтахова 2046
- Поляризационный флуоресцентный иммуноанализ лактоферрина человека в молоке с использованием однодоменных антител
Л.И. Мухаметова, С.А. Еремин, Д.А. Арутюнян, О.С. Горайнова, Т.И. Иванова, С.В. Тиллиб 2065
- Насколько часто фильтрация колонок выравнивания улучшает реконструкцию филогении двухдоменных белков?
А.И. Сигорских, Д.Д. Латорцева, А.С. Карягина, С.А. Спирин 2078
- Индукция экспрессии фотозащитных белков PsbS и LhcSR в клетках зелёной микроводоросли *Lobosphaera incisa* IPPAS C-2047 под действием низкой положительной температуры
В.В. Птушенко, Г.Н. Бондаренко, Е.Н. Виноградова, Е.С. Глаголева, О.В. Карпова, О.С. Птушенко, К.А. Шибзухова, А.Е. Соловченко, Е.С. Лобакова 2089

НЕКРОЛОГ

- Алексей Матвеевич Оловников 2099

CONTENTS

Vol. 87, Issue 12, 2022

PHENOPTOSIS (Special Issue)

Guest Editors **A. M. Olovnikov**, **B. V. Chernyak**, and **G. A. Shilovsky**

Editorial	1765
Mammal Aging Is Controlled by an Evolvability-Based Adaptive Program (Review) <i>T. C. Goldsmith</i>	1766
Is Aging an Inevitable Characteristic of Organic Life or an Evolutionary Adaptation? (Review) <i>P. V. Lidsky, J. Yuan, Jacob M. Rulison, and R. Andino-Pavlovsky</i>	1777
Is Human Aging a Form of Phenoptosis? (Review) <i>G. Libertini, G. Corbi, O. Shubernetskaya, and N. Ferrara</i>	1818
Does Nrf2 Appear to Be a Master Regulator of Mammalian Aging? (Review) <i>R. A. Zinovkin, N. D. Kondratenko, and L. A. Zinovkina</i>	1842
Transcription Factor Nrf2 and Mitochondria – Friends or Foes in the Aging Pace Regulation (Review) <i>G. A. Shilovsky and V. V. Ashapkin</i>	1856
Isn't It Time for Establishing Mitochondrial Nomenclature to Break Mitochondrial Paradigm? (Review) <i>D. B. Zorov, L. D. Zorova, N. V. Andrianova, V. A. Babenko, S. D. Zorov, I. B. Pevsner, G. T. Sukhikh, and D. N. Silachev</i>	1868
Aging Is a Side Effect of the Ontogenesis Program of Multicellular Organisms (Review) <i>L. Salnikov</i>	1881
Role of Dead Cells in Collective Stress Tolerance in Microbial Communities: Evidence from Yeast (Review) <i>N. A. Kireeva, K. V. Galkina, S. S. Sokolov, and D. A. Knorre</i>	1888
Age Related Changes of the Extracellular Matrix (Review) <i>Z. G. Guvatova, P. V. Borisov, A. A. Alekseev, and A. A. Moskalev</i>	1897
SkQ1 as a Tool for Influence on the Accelerated Senescence Program: Experience in Oxys Rats (Review) <i>N. G. Kolosova, O. S. Kozhevnikova, N. A. Muraleva, E. A. Rudnitskaya, Yu. V. Rummyantseva, N. A. Stefanova, D. V. Telegina, M. A. Tyumentsev, and A. Zh. Fursova</i>	1916
Multifaceted Notohobranchius (Review) <i>E. V. Bulavkina, A. A. Kudryavtsev, M. A. Goncharova, M. S. Lantsova, A. I. Shuvalova, M. A. Kovalev, and A. V. Kudryavtseva</i>	1928
Evolution of Longevity as a Species-Specific Trait in Mammals <i>G. A. Shilovsky, T. S. Putyatina, and A. V. Markov</i>	1947
Lamin B Dysfunction and Physiological Aging Cause Telomere Instability in the <i>Drosophila</i> Germline <i>V. V. Morgunova, O. A. Sokolova, T. V. Sizova, L. G. Malaev, D. S. Babaev, D. A. Kwon, and A. I. Kalmykova</i>	1972

CONTENTS

Vol. 87, Issue 12, 2022

The Gene *shuttle craft* Affects the Lifespan of *Drosophila melanogaster* by Controlling Early Development and Modifying the Aging Program
A. V. Symonenko, N. V. Roshuna, A. V. Kremntsova, O. Y. Rybina, and E. G. Pasyukova 1985

Trends in Human Species-Specific Lifespan and Actuarial Aging Rate
L. A. Gavrilov and N. S. Gavrilova 1998

HYPOTHESES

Innate Immunity and Phenoptosis
B. V. Chernyak and K. G. Lyamzaev 2012

Planetary Metronome as a Regulator of Lifespan and Aging Rate: Metronomic Hypothesis
A. M. Olovnikov 2019

REGULAR PAPERS

Role of the Adapter Protein Anks1a in Regulating Breast Cancer Cell Motility
A. O. Zholudeva, M. E. Lomakina, E. A. Orlova, Y. Wang, A. Fokin, A. Polesskaya, A. M. Gautreau, and A. Y. Alexandrova 2033

Biology of the SARS-CoV-2 Coronavirus (Review)
R. N. Mingaleeva, N. A. Nigmatulina, L. M. Sharafetdinova, A. M. Romozanova, A. G. Gabdulkhakova, Yu. V. Filina, R. F. Shavaliyev, A. A. Rizvanov, and R. R. Miftakhova 2046

Fluorescence Polarization Immunoassay of Human Lactoferrin in Milk Using Small Single-Domain Antibodies
L. I. Mukhametova, S. A. Eremin, D. A. Arutyunyan, O. S. Goryainova, T. I. Ivanova, and S. V. Tillib 2065

How Often Does Filtering Alignment Columns Improve Phylogenetic Inference of Two-Domain Proteins?
A. I. Sigorskikh, D. D. Latortseva, A. S. Karyagina, and S. A. Spirin 2078

Chilling Upregulates Expression of the PsbS and LhcSR Genes in the Chloroplasts of the Green Microalga *Lobosphaera incisa* IPPAS C-2047
V. V. Ptushenko, G. N. Bondarenko, E. N. Vinogradova, E. S. Glagoleva, O. V. Karpova, O. S. Ptushenko, K. A. Shibzukhova, A. E. Solovchenko, and E. S. Lobakova 2089

OBITUARY

Alexey Matveyevich Olovnikov 2099

ОТ РЕДАКЦИИ

DOI: 10.31857/S0320972522120016, EDN: NFNAA

В этом году исполняется 25 лет с тех пор, как Владимир Петрович Скулачёв на страницах «Биохимии» сформулировал концепцию феноптоза – альтруистической программированной гибели организма на благо популяции и вида. Редколлегия и редакция этого выпуска от всей души поздравляют Владимира Петровича с этим замечательным юбилеем. За этот немалый срок концепция феноптоза не потеряла свою актуальность и постоянно развивается. Доказательством этого служит разнообразие отраслей биологических наук, представители которых откликнулись на приглашение написать теоретическую или экспериментальную статью о своих исследованиях в этой области для юбилейного выпуска «Биохимии».

Уже четверть века неуклонно расширяется (в том числе и за рубежом) число исследований, находящихся и подтверждающих всё новые случаи программированной гибели в чрезвычайно широком спектре живых организмов, начиная от бактерий и дрожжей (системы токсин–анти-токсин, кворум–сенсинг и т.д.) и заканчивая высшими позвоночными. Многообразие путей клеточной гибели у бактерий, у которых гибель клетки равна гибели организма, свидетельствует о древности такого пути адаптации к неблагоприятным условиям существования и защиты

бактериальных сообществ от заражения бактериофагами. Кроме того, у Metazoa, от нематод и моллюсков до млекопитающих, этот вид гибели зачастую связан с оптимизацией стратегий размножения. С практической точки зрения, изучение механизмов реализации программы феноптоза позволяет надеяться на разработку средств, которые смогут отменить действие этой контрпродуктивной программы. Для этого необходимо проведение комплексных исследований молекулярных механизмов феноптоза. На их основе под руководством В.П. Скулачёва уже ведётся разработка и тестирование новых митохондриально-направленных антиоксидантов (SkQ), которые предположительно способны не только прерывать исполнение программ острого и медленного феноптоза (старения), но также активировать программы антистарения (витаукта), лежащие в основе достижения долголетия и повышения продолжительности здоровой жизни.

Хочется особенно отметить, что Владимир Петрович всегда открыт к новым идеям в биологии вообще и в геронтологии в частности. Именно это является истинным мотивом превращения декабрьских выпусков «Биохимии» в то, чем они стали – в интеллектуальную площадку для геронтологов всего мира.

Приглашённые редакторы
А.М. Оловников,
Б.В. Черняк,
Г.А. Шиловский

ПРОГРАММА АДАПТАЦИИ НА ОСНОВЕ СПОСОБНОСТИ К ЭВОЛЮЦИИ КОНТРОЛИРУЕТ СТАРЕНИЕ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Обзор

© 2022 Т.С. Голдсмит

Azinet LLC, Annapolis, USA; E-mail: TGoldsmith@azinet.com

Поступила в редакцию 06.06.2022

После доработки 06.06.2022

Принята к публикации 14.06.2022

Ещё в 2002 г. большинство геронтологов предполагало, что программа старения, которая намеренно вызывала бы старение у млекопитающих, невозможна и, следовательно, нелепа с научной точки зрения, поскольку она нарушает общепринятые представления о природе процесса эволюции. Однако ряд концепций современной эволюционной механики, таких как групповой отбор и эволюционируемость, предполагают, что неблагоприятная для индивида особенность, такая как его старение, может развиваться, если она создаёт преимущество (снижение вероятности вымирания) для популяции. Открытия современной генетики предполагают, что старение создаёт для популяции многочисленные преимущества, и поэтому у млекопитающих были выработаны программы, которые намеренно вызывают и регулируют старение. Это привело к возникновению различных концепций, касающихся природы программы. Одна из таких концепций состоит в том, что старение — это полностью генетически обусловленная функция возраста, по сути, биологические часы. Однако в настоящей статье представлены доказательства и теоретическое обоснование идеи о том, что функция запрограммированного старения контролируется механизмом адаптации, который может определять локальные или временные условия, влияющие на оптимальную функцию старения, и корректировать её, чтобы компенсировать эти условия. Эта проблема важна для медицинской науки, поскольку сенсорные механизмы и связанная с ними передача сигналов обеспечивают дополнительные точки, через которые можно попытаться вмешаться в процесс старения и связанные с ним возрастные заболевания.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: запрограммированное старение, физиологическое старение, эволюция, теории старения, эволюционируемость, антивозрастная медицина, старение.

DOI: 10.31857/S0320972522120028, **EDN:** NFRUON

ВВЕДЕНИЕ

Общепризнано, что проявления старения у млекопитающих вызваны многочисленными разнообразными типами повреждений, возникающих в различных типах клеток и тканей. В этом контексте термин «Повреждение» относится к любому снижению нормальной юношеской функции, а возрастные заболевания и состояния, возникающие в результате различных типов повреждений, — это те, при которых заболеваемость и смертность резко увеличиваются с возрастом (например, рак, сердечно-сосудистые заболевания и болезнь Альцгеймера). Многие возрастные заболевания иногда проявляются у молодых людей, и поэтому могут иметь другие причины, помимо старения. «Возрастные состояния» по своей сути универсальны и включают упадок сил,

ослабление сенсорных функций и иммунитета, снижение репродуктивной функции, изменение кожи и волос и «смерть от старости».

Первые работы в области геронтологии были направлены на выявление наиболее общих причин возникновения возрастных заболеваний. Возможно, различные типы повреждений в конечном счёте вызваны окислением, свободными радикалами, укорочением теломер или многими другими предполагаемыми биохимическими процессами. Несмотря на то что некоторые из этих процессов, вероятно, связаны со старением, они не могут объяснить, почему сроки старения очень специфичны для конкретных видов млекопитающих, хотя известно, что для млекопитающих характерна сходная картина биохимических процессов. Различные виды млекопитающих, как правило, имеют одни и те же возрастные забо-

левания и состояния (и, следовательно, типы повреждений), но в очень разных графиках старения.

Точно так же попытки объяснить старение как неизбежный результат какого-то закона физики или химии не смогли объяснить огромные различия в продолжительности жизни между физически и химически сходными видами.

Эти наблюдения привели к мысли, что старение и внутренне детерминированная продолжительность жизни — это признаки или видоспецифичные особенности строения организма, которые были определены в процессе эволюции. Млекопитающие очень сильно отличаются друг от друга по внутренне предопределённой продолжительности жизни (~200 : 1 между отдельными китами и мышами) и, как будет описано далее, старение очень тесно связано с другими эволюционировавшими признаками, которые контролируются сложными биологическими механизмами.

Следует отметить, что у некоторых немлекопитающих существование эволюционировавшего механизма самоубийства, который преднамеренно ограничивает продолжительность жизни, часто можно объяснить в рамках традиционной теории эволюционной механики как компромисс между усилением текущего воспроизводства (как одним из вариантов) и вкладом в выживание для создания возможности воспроизведения в будущем (как другим вариантом). Например, отдельные представители лососёвых (*Oncorhynchus*), по-видимому, запрограммированы на смерть вскоре после размножения [1], чтобы их трупы реально служили в качестве пищи для их потомков. Некоторые немлекопитающие размножаются только один раз в жизни (семеларность), что также приводит к аналогичным объяснениям. Другие немлекопитающие (например, птицы) производят многочисленное потомство, долго находятся в состоянии молодости, постепенно стареют и сходны с млекопитающими с точки зрения эволюции.

ЗАГАДКА ИНДИВИДУАЛЬНОЙ ВЫГОДЫ

Попытки объяснить старение млекопитающих в эволюционном контексте столкнулись с непосредственными трудностями, которые до сих пор вызывают споры. Дарвин (традиционная теория эволюционной механики) предположил, что эволюция очень тесно связана с *мутациями* и, следовательно, с *особями* [2]. Эту идею можно резюмировать следующим

образом: наследуемое *мутационное изменение* иногда происходит у одной особи; если это изменение приводит к тому, что особи, обладающие этим изменением, производят больше потомков, чем особи, не обладающие этим изменением, то это изменение далее распространяется в популяции.

Эта гипотеза обеспечивала правдоподобные объяснения подавляющему большинству характеристик строения организма, но сразу же стало очевидно [3], что она не объясняет старение млекопитающих, рассматриваемое как эволюционный признак. Старение явно уменьшало возможности особи размножаться из-за ухудшения её физического состояния, вызванного старением. Следовательно, согласно традиционной теории, сила эволюции млекопитающих направлена на *внутреннее бессмертие* или отсутствие какого-либо внутреннего ограничения продолжительности жизни, потому что это максимизирует возможности особи к воспроизведению. Последующие десятилетия усилий не привели к созданию теорий старения, основанных на традиционной механике, которые давали хотя бы полуправдоподобные объяснения процесса старения млекопитающих. Старение было «нерешённой проблемой биологии» [4].

В 1952 г. Medawar [4] выдвинул концепцию, ориентированную на популяцию, согласно которой старение, хотя и катастрофическое, с точки зрения отдельной особи, мало повлияло на дикие популяции определённого вида млекопитающих. Очевидно, это было правдой, поскольку стареющие популяции млекопитающих, предположительно, существовали миллионы лет. Продолжительность жизни диких млекопитающих ограничена такими условиями, как хищничество, голод, отсутствие среды обитания, инфекционные заболевания, внутривидовая борьба и другие внешние причины, которые, как правило, маскируют внутреннюю смертность от старения. Если бы все мыши в определённой популяции при достижении возраста X умерли по внешним причинам, то для этой популяции не было бы никакой пользы от наличия внутренней способности жить дольше X и, следовательно, не было бы эволюционной мотивации для развития и поддержания этой способности.

В 1957 г. Williams [5] предположил, что наблюдаемые неблагоприятные для физической формы последствия старения, такие как снижение физической силы или скорости в очень раннем возрасте (например, у человека — приблизительно в 25 лет), оказывают нулевой неблагоприятный эффект на всю

популяцию. Исследования популяций диких млекопитающих показали, что смертность с возрастом увеличивалась [6], подтверждая эту идею. Williams [5] предположил, что, следовательно, *старение должно иметь некоторый положительный эффект* для популяции, который объясняет его эволюцию и сохранение. Он предложил в качестве решения *теорию антагонистической плейотропии*, согласно которой старение постоянно связано с некоторыми полезными признаками, тем самым компенсируя относительно мягкий неблагоприятный эффект старения, предложенный Medawar [4].

Далее необходимо упомянуть ряд традиционных концепций эволюционной механики, которые имеют широкую поддержку и влияют на последующее обсуждение.

Дарвин предположил, что процесс эволюции был крайне постепенным и двигался «крошечными шагами» [2]. Процесс эволюции является чрезвычайно накопительным и может собирать в себе крошечные постепенные достижения. Млекопитающие произошли от своих самых ранних одноклеточных предков, а также от последующих предков и включают в себя черты строения, унаследованные от них.

Организмы – это системы, состоящие из множества структурных элементов, которые вместе обеспечивают результирующее физическое состояние. Способность производить потомство зависит от комбинированного чистого эффекта всех унаследованных характеристик строения (признаков) организма. Например, большая скорость могла бы принести пользу антилопе, а более длинные ноги могли бы увеличить её скорость. Однако существенное увеличение длины бедренной кости было бы неблагоприятным, если только оно не сочеталось бы со многими дополнительными изменениями в других костях, мышцах, суставах и т.д. Концепция крошечных шагов приводит к статистическим проблемам, описанным ниже.

Эволюция не происходит в течение жизни организма [2]. Во время его жизни происходит закрепление наследуемых признаков.

Эволюционный отбор строения организма зависит от его *эффективности* в производстве потомков. Следовательно, скрытые характеристики не могут участвовать в процессе отбора. Поэтому для развития характеристик строения взрослого организма требуются взрослые особи.

В настоящее время существует два класса очень похожих теорий *эволюционного старения*, совместимых с концепцией Medawar–Williams.

Теории непрограммированного старения, основываясь на концепциях Medawar–Williams,

предполагают, что сила эволюции, направленная на то, чтобы жить дольше, снижается после достижения определённого для данного вида возраста. Поскольку эти теории предполагают, что слишком долгая жизнь не приносит эволюционного вреда, то они зависят от существования универсальных процессов естественного износа (таких как случайные мутации) или законов физики (как, например, энтропия), чтобы объяснить, почему у млекопитающих такая большая разница в продолжительности жизни. Следовательно, эволюционная адаптация не сопротивлялась изменениям, которые сокращали продолжительность жизни и вызывали проявления старения после этого возраста.

Теории программированного старения, также совместимые с вышеупомянутыми концепциями Medawar–Williams, предполагают, что вне определённого для конкретного вида возраста, на самом деле, существует эволюционная польза от ограничения продолжительности жизни и эволюционная сила, вызывая проявления старения. Эти теории предполагают, что старение, хотя и неблагоприятное, с точки зрения особи, способствует выживанию (не вымиранию) популяции самыми разнообразными способами. Старение – это особенность, а не дефект эволюционного строения диких млекопитающих. Следовательно, были выработаны сложные биологические механизмы или программы, чтобы упорядочить проявления старения в необходимой видоспецифичной функции возраста.

Первая теория запрограммированного старения (по существу, основанная на эволюционности) была предложена Weismann [7] в 1882 г., но она была повсеместно отвергнута из-за конфликта с традиционной теорией. Идеи Weismann [7] и некоторые последующие концепции, ориентированные на популяцию, широко критиковал Williams [8].

Оба класса теорий включают концепции эволюции, которые в большей степени, чем традиционные концепции, ориентированы на популяцию и в меньшей степени – на индивида. Оба класса включают модификации традиционной теории. Они гораздо лучше подходят для наблюдения за млекопитающими, чем простые теории повреждений или теории фундаментальных ограничений.

Однако есть большая разница во взглядах. Теории незапрограммированного старения основаны на идее о том, что разные клетки и ткани демонстрируют различные незначительные дефекты или снижение функции, которые в основном возникают у пожилых людей и в совокупности оказывают незначительное влияние на популяции доисторических животных.

С этой точки зрения идея о том, что млекопитающие обладают сложным эволюционным механизмом, вызывающим старение, явно ложна. Старение – это проблема клеточного уровня.

Теории запрограммированного старения основаны на идее, что старение – это биологическая функция, необходимая для процесса эволюции. Подобно другим функциям, таким как пищеварение или размножение, функция старения требует координации действий между различными клетками и тканями для выполнения этой функции. Хотя, когда множество различных клеток и тканей вовлечены в выполнение функции, логически централизованный *контроль* имеет важное значение. Эти идеи подразумевают, что передача сигналов внутри организма (например, гормональная и/или нервная) необходима как часть схемы координации. Некоторые функции (например, половое размножение) включают передачу сигналов между организмами (например, феромоны и брачное поведение) для координации действий разных особей.

Практически на протяжении 160 лет, прошедших со времён появления теории Дарвина, идея о том, что млекопитающие обладают механизмом самоубийства, многими считалась нелепой с научной точки зрения. В 2002 г. сообщество геронтологов выпустило заявление, подписанное 51 геронтологом, с изложением позиции о том, что запрограммированное старение «невозможно» [9]. Эта позиция основывалась исключительно на соображениях теории эволюционной механики (в отличие от прямых доказательств). Однако различий между теориями запрограммированной и незапрограммированной эволюции меньше, чем может показаться. Главный вопрос – снижается ли сила эволюции, направленная на увеличение продолжительности жизни, практически до нуля в момент достижения организмом определённого для вида возраста и после него или она снижается хотя бы до минутного отрицательного значения (т.е. сила становится направленной на ограничение продолжительности жизни). Как правило, трудно получить ответ на такой эфемерный теоретический вопрос. Кроме того, господствующая парадигма медицинских исследований поддерживает идею о том, что у каждой болезни своя причина и, следовательно, различное лечение, и в значительной степени рассматривает старение как «нормальное» неизменное свойство жизни.

Между тем прямые доказательства, в том числе продолжающиеся открытия в области генетики, явно говорят в пользу запрограммированного старения.

Некоторые генетические заболевания человека, такие как прогерия Хатчинсона–Гилфорда [10] и синдром Вернера [11], ускоряют многие или большинство проявлений старения, что предполагает существование общей причины. Это прямо противоречит представлениям о том, что многие проявления старения не зависят друг от друга.

Некоторые немлекопитающие, по-видимому, не стареют, т.е. не проявляют измеримых проявлений старения и являются примерами *незначительного старения* [12]. Поскольку предполагается, что запрограммированное старение контролируется сложным общим механизмом, эти организмы могли утратить свою функцию старения (следовательно, утратить эволюционные преимущества старения) из-за дефекта в общем механизме. Незначительное старение противоречит незапрограммированным теориям, которые склонны игнорировать биологические виды, отличные от млекопитающих.

У человека концентрация некоторых гормонов с возрастом не меняется, однако концентрация других гормонов с возрастом уменьшается или, наоборот, увеличивается [13]. Возрастные гормоны могут быть частью запрограммированной сигнальной схемы старения. Conboy et al. [14] показали, что воздействие молодой крови на старые клетки млекопитающих приводит к существенному омоложению, ещё раз демонстрируя сигнальный сценарий.

Кроме того, в литературе появились как существенная критика различных конкретных теорий незапрограммированного старения [15, 16], так и описание многочисленных разнообразных предполагаемых эволюционных преимуществ запрограммированного старения [17–20].

Таким образом, с 2002 г. запрограммированное старение вызывает повышенный интерес. Эта точка зрения встречает меньше противодействия и обсуждается наряду с теориями незапрограммированного старения в «основных» геронтологических центрах. В настоящее время существует несколько теорий старения в каждом классе, и среди геронтологов нет широкого согласия по какой-либо конкретной теории или классу. Современные аргументы в пользу теорий старения, на самом деле, являются спорами о загадочных деталях процесса эволюции.

Основным практическим следствием для медицины является то, что, как описано Williams [5], теории незапрограммированного старения предполагают, что не существует *излечимой общей причины* многих различных

проявлений старения, каждое из которых имеет разные механизмы повреждения на клеточном уровне. Теории запрограммированного старения предполагают существование потенциально излечимой общей причины (общий программный механизм), которая, по сути, регулирует различные механизмы повреждения на клеточном уровне, чтобы создать уникальный для вида график старения.

Кроме концепции Medawar–Williams, также был предложен ряд других теорий эволюционной механики, ориентированных на популяцию, которые поддерживают запрограммированное старение.

Групповой отбор (1962) [21] предполагает, что польза для группы может развиваться, несмотря на определённый уровень индивидуального неблагополучия. Родственный отбор (1963) [22] предполагает, что выгода для родственников, не являющихся прямыми потомками, может влиять на эволюцию. Теории, ориентированные на гены [23], предполагают, что процесс эволюции ограничен природой генов, так что он гораздо продолжительнее, чем считалось ранее. Теории эволюционности (1996) [20, 24] предполагают, что выгоду от способности популяции эволюционировать (генетически адаптировать) можно выбирать (см. ниже).

Более подробную информацию об истории и статусе теории биологического старения можно найти в других опубликованных материалах (например, в Энциклопедии геронтологии и старения населения [25]).

В настоящей статье обсуждается особый тип программы старения, основанной на эволюционности, которая может быть адаптирована к локальным или временным условиям, влияющим на её оптимальное функционирование.

СПОСОБНОСТЬ К ЭВОЛЮЦИОНИРОВАНИЮ

Эволюционность [20, 24] является самой последней и наименее известной современной концепцией эволюционной механики, ориентированной на популяцию. Мы можем определить эволюционность, которой обладает вид/популяция, как быстроту и точность, с которой популяция может генетически адаптироваться к изменениям внешнего мира. Популяция, которая могла бы адаптироваться к изменениям быстрее или всестороннее, имела бы эволюционное преимущество, которое привело бы к эволюции признаков, повышающих эволюционность. По сути,

организмы могут развить свою способность к эволюции, и эта идея значительно усложняет эволюционную механику.

Теории запрограммированного старения, основанные на способности к эволюционированию, предполагают, что *старение увеличивает* эту способность несколькими способами. Особенно это касается более сложных организмов и затрагивает такие функции, как интеллект, иммунитет, социальная структура и даже языковые способности.

Традиционная теория предполагает, что способность к эволюции (развитию) является неотъемлемым свойством жизни и, по существу, является константой. Все живые организмы подвержены мутациям и естественному отбору. Теория эволюционности предполагает, что у млекопитающих и других диплоидных организмов способность к эволюционированию в основном является результатом подвергшихся явному эволюционированию и очень сложных конструктивных особенностей их схемы воспроизводства, которые были обнаружены открытиями генетики [26]. Многие другие характеристики организма также могут влиять на эволюционность.

СТАТИСТИКА И ЭВОЛЮЦИЯ

Эволюция подчиняется законам статистики. Например, ответ на вопрос о том, произведёт ли особь с определённым унаследованным строением больше потомства, чем особь с немного другим дизайном, является делом случая. Статистически определяемым фактором является то, воспроизводит ли большое количество особей определённого строения больше, чем большое количество особей, имеющих несколько иной дизайн.

Следовательно, мы можем рассматривать жизнь организма как испытание унаследованного строения этой особи: является ли этот дизайн более вероятным для производства большего количества потомков. Следовательно, как скорость, так и точность, с которой номинально будет происходить эволюция (эволюционность), будут пропорциональны скорости проведения испытаний, которая, в свою очередь, будет пропорциональна размеру популяции и обратно пропорциональна средней продолжительности жизни, или, проще говоря, пропорциональна смертности. Поскольку смерть подростка не способствует эволюции признаков, которые полностью выражены только у взрослых, мы могли бы вместо этого сказать «уровень смертности взрослых».

Ещё одна трудность заключается в том, что все более сложные организмы имеют всё больше взаимодействий между признаками (см. пример с антилопой выше), для разрешения которых, как правило, требуется ещё больше времени.

Эти концепции предполагают, что более крупные и сложные организмы с меньшим размером популяции и более продолжительным временем жизни номинально эволюционировали бы гораздо медленнее, чем более мелкие и простые организмы с более короткой продолжительностью жизни и более крупными популяциями.

Теория эволюционированности предполагает, что это произошло не из-за факторов, повышающих эволюционированность. Например, внутренне ограничивая продолжительность жизни организма (и, следовательно, продолжительность испытаний) за пределами определённого для конкретного вида возраста, можно увеличить эволюционированность.

ЭВОЛЮЦИОНИРУЕМОСТЬ И МЕХАНИКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ

Генетические открытия [26] выявили основные проблемы традиционной эволюционной механики, особенно в отношении эволюционированности.

Как предполагает традиционная теория, гаплоидная репродукция, ориентирована исключительно на мутации. Для любого наследуемого фенотипического изменения требуется новая мутация.

Млекопитающие и другие диплоидные виды, размножающиеся половым путём, произошли от более ранних гаплоидных видов и выработали гораздо более сложную схему биологической наследственности, которая несколькими способами значительно повышает эволюционированность [20].

ВОПРОСЫ, СВЯЗАННЫЕ СО СПОСОБНОСТЬЮ К ЭВОЛЮЦИИ

Концепция способности к эволюции логически ведёт к другим проблемам и вопросам.

Потребность в эволюционированности может быть разной. Отдельные организмы с очень большой продолжительностью жизни, такие как некоторые моллюски и деревья (например, океанический куахог (*Arctica islandica*), продолжительность жизни ~500 лет; сосны Бристлекон (*Pinus longaeva*), продолжительность жизни

ни ~5000 лет) существовали в течение очень долгого времени, по-видимому, без существенных изменений. Млекопитающие были вынуждены быстро адаптироваться к изменениям других млекопитающих. Происходящие у хищников изменения (становятся быстрее, умнее и т.д.) вызовут изменения в добыче. А изменения в добыче вызовут изменения в хищниках.

Требование индивидуальной выгоды, основанное на традиционной концепции, построенной исключительно на мутациях, может быть главным образом применимо к простым гаплоидным видам, таким как бактерии. Однако открытия генетики показали [26], что у диплоидных видов, размножающихся половым путём, развилась совершенно иная репродуктивная схема, которая гораздо меньше зависит от мутаций в отдельных особях и индивидуальной выгоды. Например, селекционное разведение создало очень большие фенотипические различия между породами собак за очень короткое время (по стандартам эволюции). Все эти внутривидовые различия могли быть созданы путем *диплоидной рекомбинации* существующих мутационных различий, унаследованных от предка-волка. Для их появления не требуются никакие новые мутации, в то время как создание нового биологического вида потребовало бы возникновения новых мутаций. Обратите также внимание на то, что унаследованные мутационные различия предположительно существовали у значительной части популяции волков и, следовательно, были предварительно проверены, чтобы исключить те мутации, которые в отдельности вызывают серьёзные изменения и, следовательно, могут быть неблагоприятными.

Концепции Дарвина были направлены на объяснение происхождения видов, и поэтому были ориентированы на мутации. Однако ясно, что на процесс эволюции существенно влияют диплоидные механизмы и внутривидовые изменения. Обратите внимание, что различия пород животных включают также существенные различия в продолжительности жизни, случайно вызванные селекционным размножением. Генетические открытия [26] в конечном итоге раскрыли многие другие детали диплоидного полового размножения, которые, вероятно, усиливают процесс эволюции, включая рецессивные гены, существование сцепленных хромосом, транспозицию, интроны, эффект генетического расстояния и способность млекопитающих выбирать себе пару [20].

СТАРЕНИЕ ОБЕСПЕЧИВАЕТ ЭВОЛЮЦИЮ ПРИОБРЕТЁННЫХ ПРИЗНАКОВ

Мы можем определить *приобретённые признаки* как признаки, которые зависят от эволюционной ценности чего-то, что накапливается в течение жизни организма, но затем через гены не передаётся потомкам. Например, *опыт* может быть определён как накопительный и поступательный сбор и сохранение (память) информации об окружающем животном мире, и он номинально пропорционален возрасту. *Интеллект* можно описать как способность обрабатывать эту накопленную информацию таким образом, чтобы изменить поведение животных в сторону повышения приспособленности. *Мудрость*, по сути, является продуктом интеллекта и возраста, т.е. возникает понятие коэффициента интеллекта (IQ). Мудрость увеличивает способность животного к выживанию и размножению и является тем свойством, которое будет отобрано путём естественного отбора. Проблема здесь в том, что в нестареющей популяции пожилой, менее умный, но более опытный индивид может быть мудрее более умного, но менее опытного индивида, что вступает в противоречие с эволюцией интеллекта. Таким образом, постепенное старение способствует эволюции интеллекта (а также иммунитета и способностей к языкам).

ИЗМЕНЧИВОСТЬ И ЦИФРОВАЯ ГЕНЕТИКА

Дарвин указал, что вариации унаследованных характеристик строения между членами популяции вида важны для процесса эволюции и, следовательно, являются проблемой эволюционируемости [2]. Без изменчивости не было бы наследуемых различий для естественного отбора! Дарвин предположил, что изменчивость была вызвана мутациями, каждая из которых изначально происходила у одной особи, и что *естественная* изменчивость была фундаментальным свойством жизни. Обратите внимание, что изменчивость является популяционной характеристикой.

Однако открытия генетики, особенно открытие роли ДНК [27], показали, что биологическая наследственность включает передачу информации о строении организма в цифровой форме между родителем и потомком. Цифровая передача информации имеет преимущества и ограничения, общие для всех цифровых информационных схем [28].

Одно из основных преимуществ заключается в том, что она обеспечивает постепенную и накопительную эволюцию, так что современные организмы включают в себя особенности строения, унаследованные от предков, живших миллиарды лет назад. Одно ограничение: изменчивость не является естественным свойством цифровых информационных схем [28]. Проиллюстрируем: изменчивость, которую мы наблюдаем между братьями и сёстрами млекопитающих, является результатом сложных и явно эволюционировавших диплоидных механизмов, таких как половое размножение, диплоидная структура генома, рекомбинация на основе сопоставления с образцом (неравный кроссинговер) и рецессивные гены. Однояйцевые близнецы возникают в результате случайных сбоях в работе этих развившихся механизмов.

Большое влияние на эволюцию оказывают огромные, очевидно выработанные в процессе эволюции различия в механизмах наследования между гаплоидными и диплоидными видами, размножающимися половым путём.

ЛОКАЛЬНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ

Факт, что белки в Европе быстрее, умнее или лучше лезут по деревьям, чем белки в Северной Америке, по-видимому, оказывает гораздо более медленное влияние на эволюцию данного вида млекопитающих, чем наблюдаемая *локальная изменчивость*, вызванная механизмами диплоидной изменчивости у братьев и сестёр и других представителей вида млекопитающих, которые могли бы напрямую конкурировать друг с другом. Процесс эволюции у диплоидных организмов, размножающихся половым путём, отличается от процесса эволюции у гаплоидных организмов.

ПРИРОДА ПРОГРАММЫ СТАРЕНИЯ

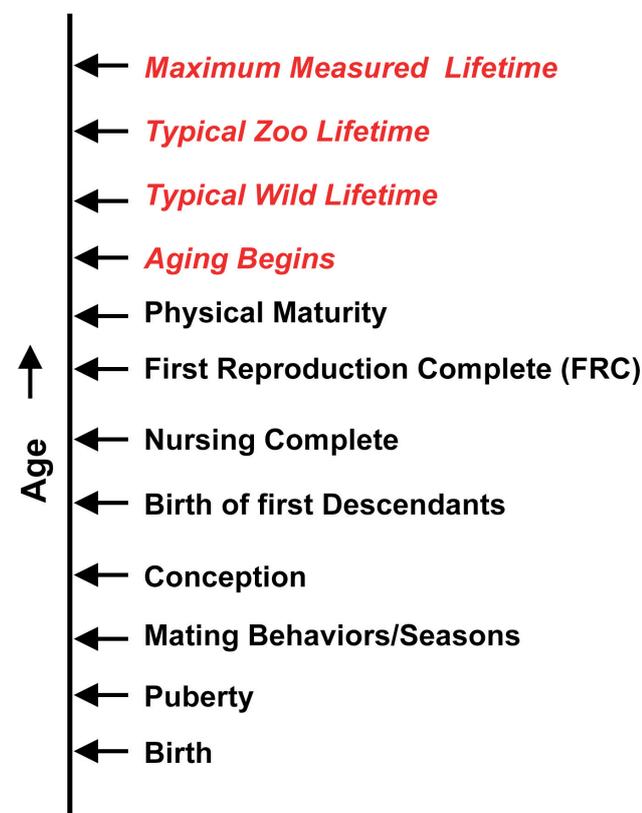
Существует ряд вариантов, описывающих подробности развившейся программы старения.

1. Одна из концепций программы старения состоит в том, что это механизм, который просто упорядочивает проявления старения как генетически заданную функцию возраста. Эта функция может сильно различаться у разных видов млекопитающих и в меньшей степени — у отдельных представителей определённого вида, что соответствует многим наблюдениям. Функция может работать на клеточном уровне, и при этом каждая клетка

определяет время выполнения функции старения с помощью часового механизма клеточно-го уровня, как, например, укорочение теломер.

2. Вторая концепция заключается в том, что клетки, у которых наблюдаются признаки старения, имеют всё необходимое для приёма и ответа на межклеточные сигналы о генетически обусловленном старении, которые поступают от какого-то общего (единственного для всего организма) часового механизма. Получение сигналов заставляет клетку реализовать в ней программу старения. Этот процесс может включать механизмы повреждения на клеточном уровне, подобные возрастным заболеваниями и состояниям.

3. Третья концепция заключается в том, что центральный (общий) часовой механизм может изменять генетически заданную функцию старения в ответ на обнаружение внутренних или внешних условий, влияющих на оптимальные значения функции старения. Это позволяет функции старения быстро реагировать на местные или временные условия, которые изменяют оптимальные значения. Как описано ниже, существует множество доказательств и теоретическая поддержка этого варианта.



Последовательность событий жизненного цикла млекопитающих в зависимости от возраста (самка)

СТАРЕНИЕ И РЕПРОДУКТИВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСНО СВЯЗАНЫ

Существует очень сильная связь между старением и репродуктивными характеристиками конкретного вида млекопитающих (рисунок). Например, если мы считаем приспособленность женской особи функцией возраста, то она будет равна нулю до самого раннего возраста, при котором особь может завершить первое воспроизводство (FRC – first reproduction). Этот момент будет определяться возрастом репродуктивной зрелости (половой зрелости), брачными ритуалами и процессами (которые задерживают спаривание), временем, необходимым для беременности, размером помета, зрелостью при рождении, временем, необходимым для стадии кормления, и другими деталями репродуктивной схемы конкретного млекопитающего.

Хотя функция приспособленности самцов может быть несколько иной в зависимости от деталей репродуктивной схемы, воспроизводство самцов зависит от самок.

ОБОСНОВАНИЕ ПРОГРАММЫ АДАПТИВНОГО СТАРЕНИЯ

Репродуктивные функции явно запрограммированы, и многие из них контролируются адаптивными программами. Например, брачный период требует способности ощущать сезонные изменения и реагировать на них. Природа программы старения сильно зависит от программы воспроизводства.

Адаптивные программы распространены у млекопитающих. Например, некоторые млекопитающие могут изменять генетически заданную плотность и цвет своей шубки в ответ на сезонные изменения [29]. Это позволяет животному существовать в более широком географическом диапазоне без сезонной миграции. Размер мышц, их кровоснабжение и сила могут быть увеличены в ответ на увеличение физической нагрузки. Отсутствие такой нагрузки может привести к уменьшению мышечной массы и, следовательно, требуемого этой особью запаса пищи, что является эволюционным преимуществом.

Репродуктивные программы, очевидно, очень адаптивны, и некоторые из них реагируют на сигналы между особями (феромоны).

Мы можем согласиться с тем, что способность к эволюции менее актуальна, чем более непосредственные локальные или временные угрозы для популяции, такие как голод,

повышенное хищничество и перенаселённость. Поэтому можно представить сценарии, в которых изменение функции старения в ответ на обнаружение внешних условий было бы полезным.

Теория запрограммированного старения Mitteldorf [17] предполагает, что старение может компенсировать неблагоприятные последствия перенаселённости. Эта идея предполагает, что метод обнаружения перенаселённости и временного сокращения продолжительности жизни в ответ был бы полезен. Такой метод может включать определение феромонов. Arfeld и Kenyon [30] продемонстрировали изменение продолжительности жизни *Caenorhabditis elegans* в ответ на феромоны.

Ограничение калорий (полуголодание) увеличивает продолжительность жизни у некоторых животных [31]. В этом случае адаптивный сценарий ответа на голод может включать увеличение продолжительности жизни при снижении воспроизводства, чтобы уменьшить потребность популяции в пище. На голодающие должны указывать внутренние сигналы. У людей временное ограничение потребления пищи может сигнализировать о голодании и вызывать реакцию ответа на ограничение калорий.

Логический адаптивный ответ на локальное или временное усиление хищничества может включать увеличение размножения и увеличение продолжительности жизни. Хищничество млекопитающих, вероятно, сопровождается резким, но кратковременным увеличением физической активности. Появление хищничества может включать проявление внутренних признаков крайней активности или возбуждения. Режимы упражнений, включая высокоинтенсивные интервальные тренировки, могут имитировать хищничество и в целом замедлять старение.

ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОЦЕССА СТАРЕНИЯ

Мышей часто используют в медицинских исследованиях, поскольку у них, как у млекопитающих, биохимия очень похожа на биохимию человека. Однако, как описано выше, репродуктивные характеристики и характеристики старения (например, продолжительность жизни) сильно различаются у различных видов млекопитающих и особенно – у человека и мыши. Таким образом, данные, полученные на мышах, могут быть неприменимы для определения эффективности антивозрастных препаратов у людей, хотя испытания безопас-

ности перспективных антивозрастных средств на мышах всё ещё актуальны.

Если старение контролируется эволюционировавшей биологической функцией, передача сигналов, вероятно, будет основным фактором. Вмешательство в сигнализацию – очевидный путь исследования.

Неблагоприятные эффекты старения включают экспоненциальное увеличение уровня смертности с возрастом, по крайней мере, примерно до 100 лет у людей [20]. Смерть – вполне определяемый фактор, не подлежащий интерпретации и эффекту плацебо, поэтому испытания на пожилых людях могут быть быстрым методом определения эффективности антивозрастных средств.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Старение – это особенность (а не дефект) строения эволюционировавших млекопитающих, которая служит эволюционной цели.

Старение млекопитающих логически контролируется центральным сложным эволюционным программным механизмом, который включает обнаружение внешних и внутренних условий, влияющих на оптимальную функцию старения.

Уникальная видоспецифичная функция старения в значительной степени зависит от репродуктивных характеристик конкретного вида млекопитающих, а также от внешних обстоятельств, окружающих конкретную популяцию.

В то время как многочисленные механизмы повреждения вызывают большинство случаев различных возрастных заболеваний и состояний, единый контролирующий механизм определяет время этих событий. Это может стать решением для расширения наших возможностей лечить или предотвращать болезни и состояния, вызванные старением.

Многочисленные характеристики диплоидного воспроизводства увеличивают эволюционированность.

Научные рассуждения о природе старения, длящиеся уже более века, прежде всего основаны на разногласиях относительно тонких деталей процесса эволюции.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов в финансовой или любой другой сфере.

Соблюдение этических норм. Эта статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных, выполненных автором.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lackey, R., Lach, D., and Duncan, S. (2006) *Salmon 2100: The Future of Wild Pacific Salmon*, Bethesda, American Fisheries Society.
2. Darwin, C. (1859) *On the Origin of Species by Means of Natural Selection*, London Murray, London.
3. Darwin, C. (1872) *The Origin of Species 6th Edition*, London Murray, London.
4. Medawar, P. (1952) *An Unsolved Problem of Biology*, Lewis, London.
5. Williams, G. (1957) *Pleiotropy, Natural Selection and the Evolution of Senescence*. *Evolution* 11, pp. 398-411.
6. Loison, A., Festa-Bianchet, M., Gaillard, G.-M., Jorgenson, J., and Jullien, J.-M. (1999) Age-specific survival in five populations of ungulates: evidence of senescence, *Ecology*, **80**, 2539-2554, doi: 10.1890/0012-9658(1999)080[2539:ASSIFP]2.0.CO;2.
7. Weismann, A. (1882) *Über die Dauer des Lebens* [in Deutsch], Fischer, Jena.
8. Williams, G. (1966) *Adaptation and Natural Selection: A Critique of Some Current Evolutionary Thought*, Princeton UP.
9. Olshansky, S., Hayflick, L., and Carnes, B. (2002) No truth to the fountain of youth, *Sci. Am.*, **286**, 92-95, doi: 10.1038/scientificamerican0602-92.
10. Sinha, J. K., Ghosh, S., and Raghunath, M. (2014) Progeria: a rare genetic premature ageing disorder, *Ind. J. Med. Res.*, **139**, 667-674.
11. Coppedè, F. (2013) The epidemiology of premature aging and associated comorbidities, *Clin. Intervent. Aging*, **8**, 1023-1032, doi: 10.2147/CIA.S37213.
12. Guerin, J. (2004) Emerging area of aging research: long-lived animals with “negligible senescence”, *Ann. NY Acad. Sci.*, **1019**, 518-520, doi: 10.1196/annals.1297.096.
13. Aging Changes in Hormone Production, in *A.D.A.M Medical Encyclopedia*, URL: <https://medlineplus.gov/ency/article/004000.htm>.
14. Conboy, I., Conboy, M., Wagers, A. J., Girma, E. R., Weissman, I. L., et al. (2005) Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment, *Nature*, **433**, 760-764, doi: 10.1038/nature03260.
15. Skulachev, V. (2011) Aging as a particular case of phenoptosis, the programmed death of an organism (a response to Kirkwood and Melov “On the programmed/non-programmed nature of aging within the life history”), *Aging (Albany NY)*, **3**, 1120-1123, doi: 10.18632/aging.100403.
16. Goldsmith, T. (2013) Arguments against non-programmed aging theories, *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 971-978, doi: 10.1134/S0006297913090022.
17. Mitteldorf, J. (2006) Chaotic population dynamics and the evolution of ageing, *Evol. Ecol. Res.*, **8**, 561-574.
18. Skulachev, V. (1997) Aging is a specific biological function rather than the result of a disorder in complex living systems: biochemical evidence in support of Weismann’s hypothesis, *Biochemistry (Moscow)*, **62**, 1191-1195.
19. Libertini, G. (1988) An adaptive theory of increasing mortality with increasing chronological age in populations in the wild, *J. Theor. Biol.*, **132**, 145-162, doi: 10.1016/s0022-5193(88)80153-x.
20. Goldsmith, T. (2014) *The Evolution of Aging 3rd edition*, Azinet.
21. Wynne-Edwards, V. (1962) *Animal Dispersion in Relation to Social Behaviour*, Oliver & Boyd, Edinburgh.
22. Hamilton, W. (1963) The evolution of altruistic behavior, *Am. Naturalist*, **97**, 354-356.
23. Dawkins, R. (1976) *The Selfish Gene*, Oxford University Press.
24. Wagner, G., and Altenberg, L. (1996) Perspective: Complex adaptations and the evolution of evolvability, *Evolution*, **50**, 967-976, doi: 10.2307/2410639
25. Gu, D., and Dupre, M. (2020) *Encyclopedia of Gerontology and Population Aging*, Springer Cham, Biogerontology-General, doi: 10.1007/978-3-319-69892-2.
26. Krebs, J. E., Goldstein, E. S., and Kilpatrick, S. T. (2017) *Lewin’s GENES XII*, 12th Edn., Jones & Bartlett Learning, Burlington.
27. Watson, J., and Crick, F. (1953) A structure for deoxyribose nucleic acid, *Nature*, **171**, 737-738, doi: 10.1038/171737a0.
28. Goldsmith, T. C. (2019) Digital genetics, variation, evolvability, and the evolution of programmed aging, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1451-1457, doi: 10.1134/S0006297919120046.
29. Hart, J. (2011) Seasonal changes in insulation of fur, *Can. J. Zool.*, **34**, 53-57, doi: 10.1139/z56-007.
30. Apfeld, J., and Kenyon, C. (1999) Regulation of lifespan by sensory perception in *Caenorhabditis elegans*, *Nature*, **402**, 804-809, doi: 10.1038/45544.
31. Spindler, S. (2005) Rapid and reversible induction of the longevity, anticancer and genomic effects of caloric restriction, *Mech. Ageing Dev.*, **126**, 960-966, doi: 10.1016/j.mad.2005.03.016.

MAMMAL AGING IS CONTROLLED BY AN EVOLVABILITY-BASED ADAPTIVE PROGRAM

Review

T. C. Goldsmith

Azinet LLC, Annapolis, USA; E-mail: TGoldsmith@azinet.com

As recently as in 2002 gerontologists widely thought that an aging program that purposely caused aging in mammals was impossible and therefore scientifically ridiculous because it violated widely accepted concepts regarding the nature of the evolution process. However, a number of modern evolutionary mechanics concepts such as group selection and evolvability suggest that an individually adverse trait like aging can evolve if it creates an advantage (reduced probability of extinction) for a population. Genetics discoveries suggest that aging creates multiple population advantages and, therefore, aging programs that purposely cause and regulate aging evolved in mammals. This led to various concepts regarding the nature of the program. One such concept is that aging is a completely genetically specified function of age, essentially a biological clock. However, this article presents evidence and theoretical basis for the idea that the programmed aging function is controlled by an adaptive mechanism that can sense local or temporary conditions that affect the optimum aging function and adjust it to compensate for those conditions. This issue is important for medical research because the sensing mechanisms and associated signaling provide additional points at which intervention in the aging process and associated highly age-related diseases could be attempted.

Keywords: programmed aging, senescence, evolution, aging theories, evolvability, anti-aging medicine, ageing

СТАРЕНИЕ – НЕИЗБЕЖНОЕ СВОЙСТВО ЖИВОЙ МАТЕРИИ ИЛИ ЭВОЛЮЦИОННАЯ АДАПТАЦИЯ?

Обзор

© 2022 П.В. Лидский^{1*}, Ц. Юань¹, Ж.М. Рулисон^{1,2}, Р. Андино-Павловский^{1*}

¹ Department of Microbiology and Immunology, University of California San Francisco, CA, USA;
E-mail: peter.lidsky@ucsf.edu; raul.andino@ucsf.edu

² University of California Berkeley, CA, USA

Поступила в редакцию 27.09.2022

После доработки 27.09.2022

Принята к публикации 04.11.2022

*«О, Гильгамеш! Энлиль, Великая Гора,
Отец Богов сделал твоей судьбой царствование, но вечную жизнь...
не должно печалить тебя, не должно вводить в отчаяние, не должно вводить в уныние.
Тебе, должно быть, говорили, что именно в этом заключается проклятие человеческого бытия.
Тебе, должно быть, говорили, что это связано с перерезанием пуповины.
Самый темный день ожидает тебя».*

«Смерть Гильгамеша», вариант Нибру, сегмент E

Старение – эволюционный парадокс. Для его объяснения было предложено несколько гипотез, но ни одна из них полностью не объясняет биохимические и экологические данные, накопленные за десятилетия исследований. Мы предполагаем, что старение является примитивной иммунной стратегией, которая защищает родственные организмы от хронических инфекций. Более старые организмы экспонированы к потенциальным патогенам в течение более длительного периода времени и имеют более высокую вероятность заражения инфекционными заболеваниями. Соответственно, паразитарная нагрузка у пожилых особей выше, чем у молодых. Если принять, что вероятность передачи инфекций между родственниками выше, затраты на приспособление к хроническому патогену могут превышать пользу от более продолжительной жизни. В этом случае запрограммированное прерывание жизни может быть эволюционно стабильной стратегией. В этой статье мы обсуждаем классические эволюционные гипотезы старения и сравниваем их с гипотезой контроля инфекций, обсуждаем согласованность этих гипотез с существующими эмпирическими данными и представляем пересмотренную концептуальную основу для понимания эволюции старения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: старение, эволюция, инфекция, иммунитет, фенотоз.

DOI: 10.31857/S032097252212003X, **EDN:** NFSFAL

ВВЕДЕНИЕ

Старение, определяемое в широком смысле как увеличение смертности с возрастом, является одновременно эволюционным парадоксом и предметом жарких биологических и философских дискуссий. Традиционный взгляд, уходящий корнями в религиозные представления, рассматривает старение как сущность, органически вписанную в структуру Мироздания с заранее заданными параметрами продолжительности жизни: «...пусть

будут дни их сто двадцать лет» (Быт., 6:3), но со способностью индивидуума изменять свою продолжительность жизни в пределах определенного допустимого интервала: «*Почитай отца твоего и мать твою, чтобы продлились дни твои...*» (Исх., 20:12).

Первая попытка рационального взгляда на процесс старения была предпринята в самом начале дарвиновской эры. В 1881 году Weismann [1] писал, что старение может быть эволюционной адаптацией для избавления от травмированных особей, которые потребляют ценные ресурсы, но не способны к эффективному размножению. Позже эта точка зрения

* Адресат для корреспонденции.

была отвергнута как пример группового отбора, который не может объяснить, почему короткоживущие особи будут селективироваться в смешанной популяции, содержащей и долгоживущие варианты.

Следующая эволюционная концепция появилась на свет в 1930 году: Fisher [2] показал, что поскольку способность индивида к размножению с возрастом понижается, то уменьшается и его вклад в будущий генетический пул. Эта работа оказала большое влияние на Medawar [3] и Haldane [4], выдвинувших теорию под названием *selection shadow* (оттенения отбора). Согласно их гипотезе, поскольку индивиды часто умирают от неестественных внешних причин (например, от голода или хищников), то сила отбора с возрастом снижается. Если только незначительная часть особей доживает до старшего возраста, то старение может оказывать незначительное влияние на общую приспособленность животных. Medawar также предположил, что признаки старения могут быть связаны с адаптивными чертами, которые повышают приспособленность в раннем возрасте, тем самым повышая генетическую стабильность старения.

Последняя идея была исследована Hamilton [5] и в дальнейшем развита Williams [6] в его теории, получившей название «*antagonistic pleiotropy*» (антагонистической плеiotропии). Он подверг критике *selection shadow*, указав, что несмотря на ослабление отбора с возрастом, животные и люди все же доживают до возраста старения. Затем он предположил, что отбор может способствовать старению, если механизмы старения возникают в результате действия генов, которые полезны в раннем возрасте и вредны в более зрелом возрасте. Эта концепция была расширена Kirkwood и Holliday [7]. В их модели, названной «*disposable soma*» (одноразовой сомы), утверждалось, что «*смертность может быть связана со стратегией энергосбережения ... в соматических клетках*» и использованием сэкономленных ресурсов для размножения. Эта точка зрения нашла убедительное подтверждение в виде хорошо задокументированной отрицательной корреляции между плодовитостью и долголетием [8, 9].

Независимо были разработаны несколько механистических гипотез. В 1963 году Orgel [10] предположил, что, поскольку в процессе транскрипции и трансляции происходят ошибки, эти ошибки оказывают влияние на сам аппарат синтеза макромолекул, создавая петлю положительной обратной связи снижения эффективности синтетических процессов. В течение десятилетий в этой области иссле-

дований доминировала свободнорадикальная гипотеза Harman [11], которая предполагала, что старение является следствием возникновения окислительных повреждений. В других моделях также рассматривались различные повреждающие факторы или даже кумулятивное, хаотичное воздействие множества вредных процессов [12–19]. Группа особенно элегантных гипотез предполагает в качестве основных факторов старения эгоистическую эволюцию (*selfish evolution*) митохондрий [20], транспозонов [21] и раковых клеток [22]. Эти взгляды способствовали формированию концепции, сформулированной в публикации под названием «*Hallmarks of aging*» (Признаки старения) [23], в которой были обобщены результаты лабораторных исследований. Эта концепция часто упоминается как парадигма геронтологии, механистическое объяснение того, почему мы стареем [24]. Целый ряд механистических гипотез провозглашает как основную проблему при исследовании процесса старения сложность биологических систем. При этом предполагается, что старение связано с неспособностью сложных систем поддерживать гомеостаз [18, 25].

Несколько гипотез, поддерживаемых меньшинством исследователей, рассматривают старение как эволюционную адаптацию, а не как энтропийный процесс или же вредный побочный эффект полезных функций. Однако интуитивно старение, идущее с разной скоростью у разных видов и консервативное внутри одного вида, имеет сходство с другими явно адаптивными характеристиками, такими как размер тела или артериальное давление. Согласно теориям адаптивного старения, оно может играть экологическую роль в предотвращении мальтузианских катастроф [1, 26–30], способствовать более быстрой смене поколений, тем самым ускоряя эволюцию [31–33], либо является защитной стратегией для смягчения последствий инфекционных заболеваний [34, 35]. Совсем недавно появилась новая гипотеза, рассматривающая влияние воздействия патогенов и роль старения в предотвращении развития эпидемий. Она может стать более сильной и всеобъемлющей эволюционной гипотезой, которая преодолевает ограничения существующих моделей [36, 37].

В настоящей статье мы вновь вернемся к этому вопросу, чтобы сравнить различные эволюционные гипотезы и обсудить простоту их предпосылок, силу аргументации и точность предсказаний. «Ничто в биологии не имеет смысла, кроме как в свете эволюции» (Ф.Г. Добжанский). Наше обсуждение

представляет собой попытку систематизировать существующие идеи, проложить путь к пониманию эволюционного происхождения старения и, возможно, способствовать разработке терапевтических средств для его замедления.

ЭНТРОПИЧЕСКИЕ ГИПОТЕЗЫ: НЕВОЗМОЖНО ЛИ БЕССМЕРТИЕ?

Здесь и далее мы не используем термин «бессмертие» для обозначения организмов, которые существуют в окружающей среде в течение бесконечно долгого периода времени. Мы используем этот термин в смысле «биологического бессмертия», имея в виду, что вероятность смерти с возрастом не увеличивается. Базовый уровень смертности может быть существенным, но если он остается постоянным во времени, то организм следует считать биологически бессмертным или нестареющим.

У некоторых примитивных многоклеточных животных, таких как гидра [38], плоские черви планарии [39] и медузы [39], смертность не увеличивается с возрастом, и они считаются биологически бессмертными. Отдельные виды долгоживущих позвоночных, принадлежащих к разным таксонам, кажется, тоже имеют пренебрежимо малое старение [40–44]. Однако отсутствие старения у этих животных не является общепризнанным, поскольку обнаружение рота занимает очень много времени, и поэтому данные не кажутся достаточно полными.

Тем не менее старение может быть процессом, характерным для органической природы, основанным на фундаментальных биохимических реакциях, протекающих в живых организмах. Энтропия, проявляющаяся в форме молекулярных повреждений или эгоистичной эволюции, может ограничивать продолжительность жизни. Nelson и Masel [22] предположили, что внутриклеточная конкуренция в пролиферирующих тканях может быть эволюционно полезной за счет удаления плохо приспособленных и поврежденных клеток. Как неизбежный побочный эффект, конкуренция благоприятствует активно реплицирующимся клеткам, что часто приводит к неопластической трансформации. Таким образом, они предположили, что механизмы предотвращения рака определяют продолжительность жизни как неблагоприятный побочный эффект.

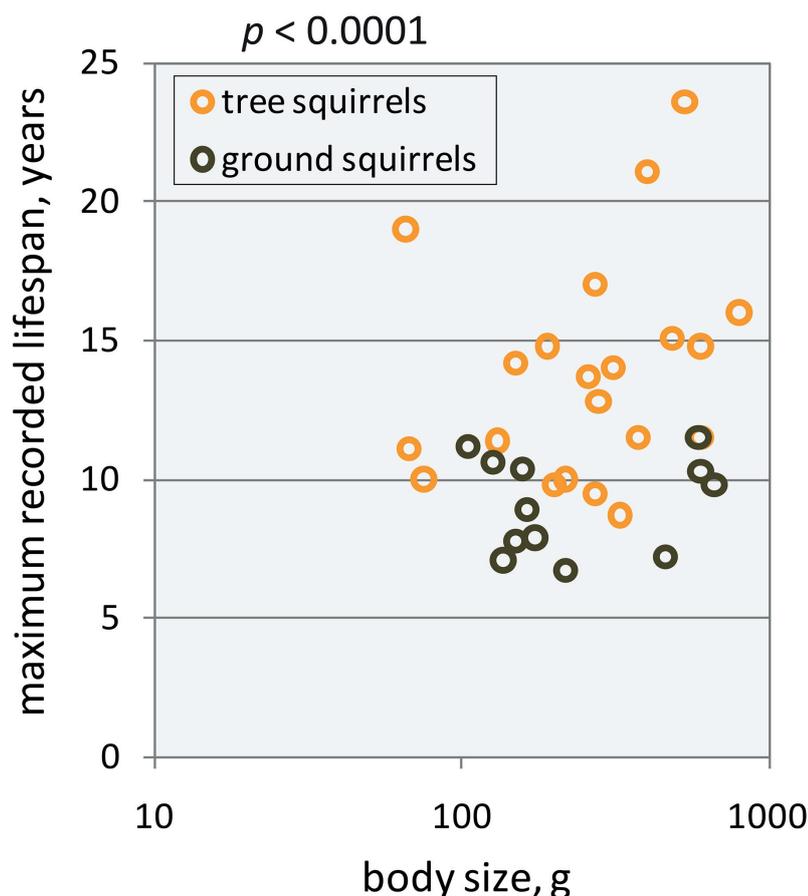
Однако неясно, как у долгоживущих видов решается проблема новообразований, почему ткани с низким уровнем пролиферации, и

организмы, состоящие из неделящихся (постмитотических) клеток, также подвержены старению [45–47]. Из этих соображений возникают два фундаментальных вопроса. Во-первых, какова максимальная продолжительность жизни, которая возможна в контексте проблемы новообразований и, во-вторых, как эта гипотеза может объяснить изменчивость старения у разных видов? Долголетие положительно коррелирует с размерами тела и устойчивостью к раку (парадокс Peto [48]). Мышь с массой тела ~20 г живет около двух лет, а синий кит с массой тела примерно 100 тонн живет до 100 лет. Соответственно, у китов должны были выработаться эффективные механизмы защиты от рака [49–51]. Небольшое животное способно развить эффективный механизм для противодействия возникновению рака, сравнимый по эффективности с существующим у китообразных, что могло бы обеспечить ему гораздо большую продолжительность жизни. Не ясно, почему эта комбинация не была создана эволюцией. Следовательно, хотя гипотеза Nelson и Masel [22] может постулировать теоретические пределы долголетия, их работа не идентифицирует очевидную эволюционную детерминанту, которая могла бы объяснить различную продолжительность жизни у разных видов.

Тем не менее подобные гипотезы широко распространены, возможно, потому что они резонируют с нашими культурными (или даже докультурными) стереотипами о бренности всего сущего как неизбежной части бытия, широко представленными в додарвиновской литературе. Энтропия или эгоистичная эволюция заменяют трансцендентные силы, сохраняя общие контуры концепции нетронутыми. Чтобы преодолеть эту культурную контаминацию, мы введем мысленный эксперимент, который называем «беличьим тестом».

«БЕЛИЧИЙ ТЕСТ»

«Беличий тест» призван селективировать гипотезы, пытающиеся объяснить основные эволюционные причины старения. Эксперимент основан на максимальной зарегистрированной продолжительности жизни разных видов белок. Древесные белки живут в 1,5–2 раза дольше, чем земляные белки (рис. 1) [52, 53]. Таким образом, генетически родственные, морфологически сходные животные, имеющие близкий пищевой рацион и образ жизни, имеют статистически различимые фенотипы долголетия. Каждая обоснованная эволюционная



Sciurus vulgaris



Callospermophilus saturatus

Рис. 1. Древесные белки живут дольше наземных белок. Данные о максимальной зарегистрированной продолжительности жизни были собраны из базы данных AnAge. Значение p получено с использованием двустороннего t -критерия, рассчитанного для максимальной продолжительности жизни без поправки на размер тела

гипотеза старения должна допускать разницу в продолжительности жизни представителей этих близкородственных видов. В качестве первого примера мы используем «беличий тест» для проверки гипотезы старения, которая предполагает, что долголетие определяется балансом между неизбежностью возникновения рака и механизмами, противодействующими развитию этой патологии. Если у древесных белок на протяжении многих лет есть эффективный контроль неоплазии, то почему наземные белки не могут выработать аналогичные механизмы?

Та же проблема, очевидно, существует и с другими энтропийными гипотезами, такими как эгоистичная эволюция митохондрий [20] или мобильных генетических элементов [21], гиперфункция развития [54], накопление гликированных продуктов [55], соматические мутации [14], окисление [11], укорочение теломер [56], повреждение молекулы ДНК [57], идеями, основанными на сложности биологических механизмов [18, 25] и др. Важно отметить, что многие из этих процессов могут иметь

отношение к старению, и поэтому их необходимо изучить. Однако они могут не быть первичными эволюционными факторами, определяющими эволюцию заданных параметров старения и продолжительности жизни. Далее мы сосредоточимся только на гипотезах, проходящих «беличий тест», поскольку этот подход помогает создать основу для рассмотрения эволюционных принципов, определяющих заданные значения продолжительности жизни.

НЕЙТРАЛЬНОЕ СТАРЕНИЕ: SELECTION SHADOW

Selection shadow определяет старение как совокупность вредных для организма признаков, проявляющихся только в позднем возрасте и не влияющих на отбор. В своей книге «Новые Пути в Генетике» Haldane обсуждает болезнь Хантингтона, аутомно-доминантное наследственное заболевание, которое обычно поражает людей в возрасте от 30 до 50 лет. К тому времени у большинства носителей мутации уже

были дети, и, таким образом, патологическая мутация могла быть им передана [4]. Selection shadow проходит «беличий тест», если мы предполагаем, что наземные белки в большей степени, чем древесные белки, склонны к гибели из-за внешних причин и не доживают до возраста старения.

Можно сразу найти подтверждение концепции тени отбора, если обратить пристальное внимание на виды, которые подвержены гибели по определенным временам причинам, таким как испарение небольших водоемов, в которых обитают сезонные нотобранхиусы. Различные виды этих однолетних пресноводных рыбок могут обитать как в постоянных водоемах, так и в водоемах, которые пересыхают в летний период. Для видов, населяющих пересыхающие воды, характерна одна из самых коротких продолжительностей жизни среди позвоночных (около 3–9 месяцев для *Nothobranchius furzeri*). В то же время представители видов, обитающих в постоянных водоемах, живут значительно дольше (2–3 года) [52, 58]. Такая же тенденция была обнаружена у сезонных насекомых [59] и у *Neurospora crassa*, подверженных регулярным антропогенным пожарам [60]. Таким образом, полное отсутствие отбора среди особей старшего возраста действительно приводит к ухудшению остаточной продолжительности жизни. Однако большинство животных не подвержены детерминистическому сезонному прерыванию жизни. Стохастическая смертность, которой подвержено большинство видов животных, не может обеспечить полное уничтожение всего возрастного класса, поэтому число выживших особей не может стать равным нулю. Selection shadow может объяснить отсутствие отбора долгоживущих вариантов только в том случае, если животные в дикой природе никогда не достигают возраста старения. Эта ключевая предпосылка гипотезы selection shadow не находит себе подтверждения. Так, Williams [6] утверждал, что, согласно записям спортивных достижений и таблицам продолжительности жизни, физическое угасание человека начинается после 30 лет, и «скорее всего, эта часть жизненного цикла человека связана с естественным отбором».

Увеличение смертности с возрастом наблюдается в природных популяциях видов из разных таксонов, включая Mammalia, Aves, Reptilia, Amphibia и даже Arthropoda, что свидетельствует о том, что особи многих видов доживают до возраста старения [61, 62]. Это предполагает существование какой-то другой причины старения, которая способна объяс-

нить его эволюционную стабильность, несмотря на его вредность для приспособленности индивида.

ПОБОЧНЫЕ ЭФФЕКТЫ ПОЛЕЗНЫХ СВОЙСТВ: АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ ПЛЕЙОТРОПИЯ

Антагонистическая плейотропия предполагает, что старение, даже в условиях отрицательного отбора, развивается за счет повреждающих побочных эффектов генов с плейотропными функциями [6]. Если какой-то гипотетический ген полезен в более молодом возрасте и вреден в более позднем возрасте, то он будет отобран эволюцией. Из-за внешней смертности доля пожилых особей ниже, чем молодых, поэтому снижается отбор по полезным признакам, проявляющимся в позднем возрасте. Более того, градиенты отбора снижаются с возрастом даже без учета внешней смертности: более молодые особи обычно составляют большинство в популяциях животных только в силу основных законов роста популяции [63]. Следовательно, плейотропные аллели, постулированные Williams как «... гены, оказывающие противоположное влияние на приспособленность в разном возрасте...», могут быть отобраны [6]. Эта гипотеза также проходит беличий тест, если мы предположим, что наземные белки (но не древесные белки) имеют некоторые преимущества в физической форме в раннем возрасте, которые им мешают в более позднем возрасте.

Одним из четырех фундаментальных положений теории антагонистической плейотропии, заимствованных из гипотезы тени отбора, является идея убывающего градиента отбора. Она также является основанием для одного из девяти предсказаний, сформулированных в основополагающей статье: «...низкие показатели смертности взрослых особей должны быть связаны с низкими показателями старения, а высокие показатели их смертности — с высокими показателями старения» [6]. В подтверждение этого Williams привел пример птиц и летучих мышей, продолжительность жизни которых намного больше, чем у наземных млекопитающих сопоставимых размеров, предположительно, из-за того что способность к полету позволяет избегать нападения хищников. Корреляция между старением и внешней смертностью привлекла значительное внимание в последующие годы. Несмотря на непрекращающиеся споры об ее математической согласованности [64–66]

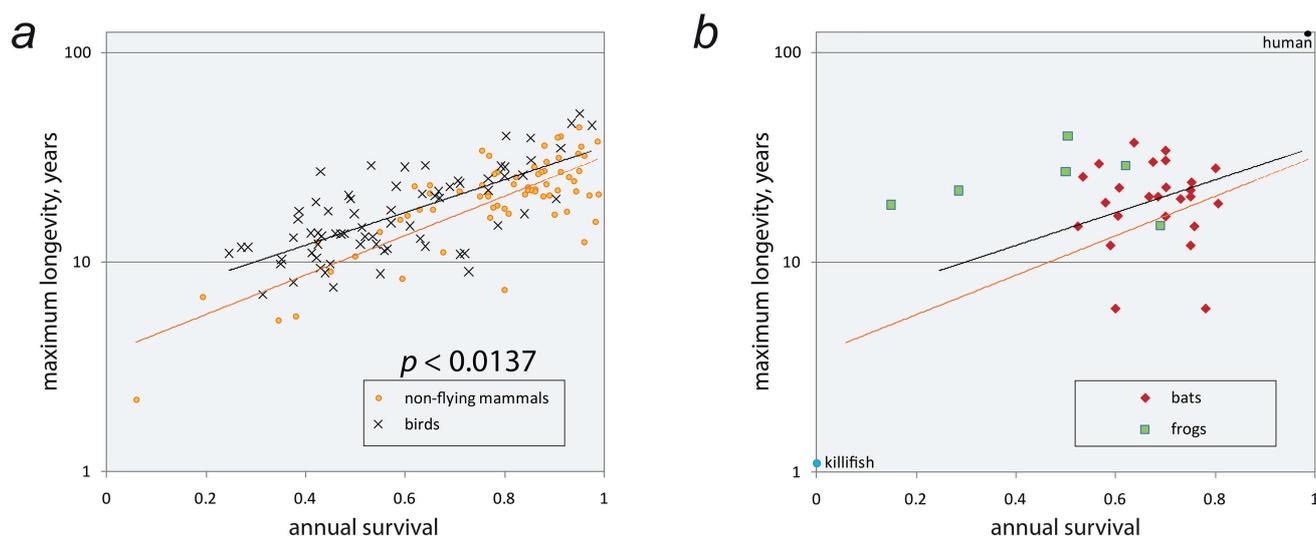


Рис. 2. Внешняя смертность не определяет скорость старения. Данные о максимальной зарегистрированной продолжительности жизни были взяты из базы данных AnAge без учета поправок на размер тела. Данные о годовой выживаемости взяты из источников, перечисленных в табл. S1 Приложения. Были собраны данные годовой выживаемости взрослых особей. При наличии данных для самок и самцов рассчитывали среднее значение. Если было доступно несколько вариантов, приоритет отдавался данным по возрастным группам и полу в указанном порядке. Если присутствовало несколько вариантов с одинаковым уровнем детализации, выбирались более высокие значения выживаемости. Представленные здесь данные следует интерпретировать с осторожностью, поскольку максимальная продолжительность жизни может зависеть от размера анализируемого массива, а годовая выживаемость может варьироваться в широком диапазоне между сезонами и разными популяциями. Тем не менее имеющиеся данные свидетельствуют о том, что старение в определенной степени не связано со смертностью от внешних причин. *a* – По-видимому, продолжительность жизни видов птиц выше, чем у нелетающих млекопитающих с сопоставимой годовой выживаемостью. Значение p получали с помощью двустороннего t -критерия углов наклона. Кривые регрессии были получены с помощью экспоненциальной модели. *b* – Некоторые виды летучих мышей и лягушек демонстрируют неожиданно высокую продолжительность жизни по сравнению с нелетающими млекопитающими и птицами с сопоставимой годовой выживаемостью. Кривые регрессии взяты из панели (*a*). Следует отметить, что не все летучие мыши живут долго [272]. Данные по лягушкам не являются полными, поскольку для сбора данных были отобраны только виды с большой зарегистрированной продолжительностью жизни

и доказательства того, что ее влияние на эволюцию продолжительности жизни зависит от других экологических факторов [67, 68], она до сих пор рассматривается как ключевое фальсифицируемое предсказание гипотезы антагонистической плейотропии [69]. Экологические данные об этой корреляции (за исключением приведенных выше примеров, когда гибель животных строго детерминирована сезонностью) неоднозначны. Классический результат, который, казалось бы, поддерживает предсказание, был получен для виргинского опоссума (*Didelphis virginiana*) путем сравнения защищенной островной популяции и континентальной популяции, подверженной нападению хищников [70]. Островные опоссумы демонстрировали более медленное старение, большую продолжительность жизни и более поздние сроки начала размножения. Однако этот вывод не был подтвержден при изучении других популяций. В некоторых случаях корреляция имела обратную тенденцию. Например, гуппи (*Poecilia reticulata*) и дафнии (*Daphnia magna*) из популяций, существующих в присут-

ствии хищников, стареют медленнее, чем особи, обитающие в защищенной среде [71–73]. Анализ годовой смертности и продолжительности жизни у разных видов млекопитающих не показал сильной корреляции после учета поправок на размеры тела [74]. Более того, годовая выживаемость долгоживущих животных, таких как птицы [75–77], летучие мыши [78] или лягушки [79], по-видимому, ниже, чем у нелетающих млекопитающих с сопоставимыми рассчитанными значениями продолжительности жизни (рис. 2). Таким образом, имеющиеся данные обеспечивают ограниченную поддержку одного из основных предсказаний антагонистической плейотропии в ее классической формулировке.

Хотя несостоятельность ключевого предсказания Williams не полностью опровергает его теорию, настоящей Ахиллесовой пятой теории антагонистической плейотропии является её несоответствие положениям современной молекулярной генетики. Концепция плейотропных генов формировалась в то же время, что и механистические взгляды на мутации

и рекомбинацию, одновременно с провозглашением центральной догмы молекулярной биологии, и почти за десятилетие до того, как был расшифрован генетический код. Изменчивость и пластичность геномов в то время сильно недооценивались. Например, Muller в 1950 году писал, что «средняя [человеческая] особь, вероятно, является гетерозиготной минимум по 8 генам» [80] вместо ~3 млн полиморфных сайтов. Следовательно, гипотеза антагонистической плейотропии явно не могла соответствовать консенсусу, сформировавшемуся десятилетия спустя. Основная идея гипотезы о существовании генов с противоположным действием в разном возрасте косвенно подразумевает неизменяемость генетических признаков. Действительно, связь между двумя признаками, кодируемыми одним геном, сама должна быть генетическим признаком. В случае отрицательного отбора эта связь должна быть устранена или, альтернативно, негативное действие гена должно быть нейтрализовано мутациями в других областях генома. Хотя были идентифицированы гены со свойствами, предсказываемыми теорией антагонистической плейотропии [81], объяснения их генетической стабильности отсутствуют. Не очень убедительны гипотетические механистические примеры плейотропных генов, способствующих старению, приведенные Williams и другими в более поздней литературе. Здесь мы обсудим приведенный Williams пример, который до сих пор широко цитируется в данной области [69]: «...возникающая мутация, оказывающая благоприятное влияние на кальцификацию кости в период раннего развития, но проявляющаяся в последующем соматическом окружении [возрасте] при кальцификации соединительной ткани артерий. Если ген приживется в популяции, и если этот более поздний эффект в конечном итоге окажется вредным, премия за отбор будет отдана любому гену, который может подавить кальцификацию артерий. Однако по мере того, как подавление приближается к завершению, давление отбора для дальнейшего подавления уменьшается. Полное подавление, вероятно, никогда не будет реализовано.» [6]. Это приводит нас к ситуации, когда 1) согласно ключевой предпосылке работы Williams, признак более поздней кальцификации артерий находится под воздействием отрицательного отбора, 2) независимая компенсаторная эволюция этого признака механически возможна, но 3) как ни парадоксально, не происходит закрепления полезного признака. Этот сценарий противоречит основным идеям естественного отбора. Механистическая связь между форми-

рованием кости в молодости и более поздней кальцификацией также сомнительна. Эти два процесса хорошо разделены во времени и пространстве и могут регулироваться независимо друг от друга. Кроме того, многочисленны случаи, когда более быстрый рост и кальцификация сочетаются с более длительной продолжительностью жизни. Например, относительно долго живущие птицы растут быстрее млекопитающих [82] и используют кальцификацию во взрослом возрасте для образования яичной скорлупы. Таким образом, эффект жестких плейотропных генов может противоречить пластичности и приспособляемости регуляторных сетей, обнаруженных современной генетикой.

Эlegantная вариация источника плейотропных генов связана с взаимодействием хозяина и патогенов [83]. Плейотропные свойства генов, обеспечивающих устойчивость к патогенам, могут оказывать неблагоприятное влияние на продолжительность жизни. Инфекционные заболевания являются одной из самых мощных сил отбора в природе. Установлено, что гены, ответственные за противодействие патогенам, эволюционируют намного быстрее, чем остальная часть генома [84]. Эволюция генов иммунитета, в свою очередь, вызывает адаптивную эволюцию патогенов, которая приводит к новым адаптациям генов иммунитета в бесконечной гонке вооружений [85, 86]. Для адаптации к постоянно изменяющейся эпидемиологической ситуации в некоторых случаях требуются значительные затраты. Классическим примером такого компромисса является серповидноклеточная анемия. Деадаптивный фенотип проявляется только у гомозиготных индивидов, несущих две копии патологического аллеля гемоглобина [87]. Гетерозиготные индивиды здоровы и обладают частичной устойчивостью к малярии. Несмотря на пагубные последствия, патологический аллель широко распространен в популяциях людей, исторически подвергавшихся воздействию малярии [88].

Может ли старение быть вредным побочным эффектом устойчивости к инфекционным болезням? В то время как методы моделирования предполагают, что это возможно [83], эмпирические данные говорят об обратном. Во-первых, долгоживущие мутанты круглых червей [89, 90] и плодовых мушек [91] проявляют более высокую устойчивость к патогенам. Долгоживущие виды, как считается, должны иметь лучшую иммунную защиту [92] наряду с улучшением других систем поддержания организма [50, 93–95]. Таким образом,

по-видимому, данные, свидетельствующие об отрицательной корреляции между продолжительностью жизни и общей иммунной защитой, отсутствуют. Можно утверждать, что гипотетические плейотропные гены могут стабилизироваться лишь несколькими исключительными патогенами, такими как возбудитель малярии, который оказывает очень сильное селективное давление, а основные иммунные механизмы не способны предотвратить его воздействие. Этот аргумент также неубедителен, поскольку возбудитель малярии является относительно новым патогеном, а серповидноклеточная анемия может быть новой адаптацией [96] с потенциальным дезадаптивным признаком, который может быть устранен в ходе эволюции, например, путем дубликации гена, кодирующего гемоглобин, что позволит сохранить в каждом индивиде как ген дикого типа, так и его патологические/резистентные формы. Таким образом, распространенность серповидной анемии – это преходящий эволюционный момент, а не долгосрочное устойчивое состояние. Кроме того, наследуемые сходным образом и устойчивые к патогенам генетические нарушения имеют совершенно разные симптомы. Например, муковисцидоз может быть связан с устойчивостью к туберкулезу и другим бактериальным инфекциям, проявляться совсем по другому симптоматическому типу [97–99]. Следовательно, если старение является результатом подобных взаимодействий, то можно ожидать, что фенотипические проявления старения будут различаться у разных видов и даже у разных популяций одного и того же вида, подвергшихся воздействию различных патогенов. В то же время механизмы старения удивительно консервативны среди различных таксонов [23], что делает этот вариант антагонистической плейотропии сомнительным.

Для сохранения концепции антагонистической плейотропии, как общей теории старения без пересмотра основ молекулярной генетики, следует допустить существование некоего фундаментального баланса (trade-off), определяемого универсальными законами природы. Например, физические размеры животных определяются компромиссом между преимуществами большого размера и нелинейно возрастающими энергетическими потребностями для поддержания и перемещения крупного тела [100]. Считается, что максимальные размеры насекомых ограничиваются скоростью диффузии кислорода в их трахейной системе и гемолимфе [101]. Если бы можно было идентифицировать подобные факторы, определяющие ограничение продолжительности жизни,

они привели бы антагонистическую плейотропию в соответствие с генетикой и теорией эволюции. Наиболее разработанной концепцией, работающей в этом направлении, является теория одноразовой сомы, которая предполагает, что ограничение энергии является основой компромисса между долголетием и приспособленностью.

СТАРЕНИЕ КАК СТРАТЕГИЯ ЭНЕРГОСБЕРЕЖЕНИЯ: ОДНОРАЗОВАЯ СОМА

В гипотезе одноразовой сомы [7] основное внимание уделяется тому, как организмы используют ограниченные ресурсы. Она предполагает, что поскольку животные ограничены в питательных веществах, то энергия должна направляться либо на размножение, либо на поддержание организма. Так, с учетом некоторых параметрических предположений короткоживущий, но быстро размножающийся вариант может превзойти долгоживущий вариант с более низкой скоростью размножения. Если особь производит сотни потомков, а ее потомки также размножаются экспоненциально, то продолжительность жизни самой первой предковой особи может показаться несущественной для отбора. Напротив, критическое значение имеет коэффициент воспроизводства, определяющий основание показателя степени в уравнении, описывающем рост популяции. Следовательно, эволюция всегда отдает предпочтение размножению, а не поддержанию. Одноразовая сома проходит беличий тест, если мы предположим, что наземные белки вкладывают больше ресурсов в свое воспроизводство и заботу о потомстве. Следует отметить, что плодовитость и продолжительность жизни имеют обратную корреляцию между разными видами животных [8, 9, 102], и это подтверждает центральный постулат этой гипотезы.

Однако гипотеза одноразовой сомы не может полностью объяснить старение [103]. Во-первых, рост популяции не всегда ограничивается наличием ресурсов. Во многих случаях уничтожение людьми хищников приводило к резкому увеличению популяции их потенциальных жертв [104, 105]. Таким образом, легко представить себе ситуацию, в которой ресурсов достаточно как для размножения, так и для поддержания организма в нестареющем состоянии.

Во-вторых, в природе не наблюдается экспоненциальный рост популяций, а, скорее, их численность колеблется вокруг некоторых стационарных значений. Более быстрое

воспроизводство за счет увеличения продолжительности жизни действительно может быть полезным при увеличении популяции, но более продолжительная жизнь и более низкая плодовитость будут выгодны, когда численность популяции сокращается или остается стабильной. Рассмотрим пример животных с половым размножением и старением в популяции со стабильной численностью и низким уровнем внешней смертности (например, слонов или китов). Чтобы сохранить представительство своих генов в генофонде на прежнем уровне, отдельной особи необходимо произвести не менее двух потомков, которые доживут до репродуктивного возраста. Это может сэкономить энергию только в том случае, если количество питательных веществ, затрачиваемых на доведение потомства от зиготы до взрослой особи, меньше, чем ресурсы, необходимые для дальнейшего поддержания организма родителя. Если питательные вещества для родителей и детенышей поступают из одного и того же пула, тогда сценарий вступает в противоречие с основными законами сохранения энергии. В случае экспоненциально растущей популяции модель одноразовой сомы сталкивается с внутренним противоречием в отношении наличия пищи: окружающая среда должна быть достаточно богатой, чтобы поддерживать растущее потомство, и в то же время быть ограниченной, когда речь идет о необходимых затратах на поддержание организма родителя.

В-третьих, ресурсы распределены в пространстве и времени неравномерно. Если доступность источников энергии является ограничивающим фактором долголетия, то в богатый сезон, когда пищи достаточно как для поддержания жизни, так и для размножения, у некоторых животных, согласно предсказаниям теории одноразовой сомы, могла бы происходить активация программы омоложения или по крайней мере замедления старения. Механизмы замедления процесса старения существуют в природе, и их активация происходит в прямо обратной ситуации – в условиях дефицита ресурсов (ограничение калорий) [106–108]. Это противоречит ожиданиям гипотезы одноразовой сомы. Kirkwood и Holliday попытались скорректировать свою теорию, определив строгое ограничение калорий как «голод» (*famine*), который отличается от обычной нехватки ресурсов [109, 110], и утверждая, что многие виды не размножаются при воздействии голода и вкладывают средства только в поддержание. Однако эти аргументы не объясняют, почему мы не можем наблюдать активацию программы

замедления старения в условиях «лучших, чем оптимальные», когда пища имеется в избытке.

Кроме того, теория одноразовой сомы подверглась критике по нескольким более конкретным вопросам. 1) Хотя самки млекопитающих тратят больше энергии на размножение, чем самцы, у большинства видов самки стареют значительно медленнее [111]. 2) Одноразовая сома предполагает значительные затраты на поддержание, однако организму по-прежнему необходимо тратить большое количество энергии на постоянную регенерацию пролиферирующих тканей (например, кожи, крови, эпителия кишечника). Таким образом, эта гипотеза фокусируется только на остаточных затратах на поддержание, помимо повседневной репарации. Размер энергетического бюджета в таком случае никогда не рассчитывался, и остается неясным, являются ли затраты на остаточное поддержание настолько существенными, чтобы жертвовать для них жизнью. Более того, у некоторых долгоживущих видов развились энергетически более эффективные системы контроля повреждений, чем у короткоживущих видов, что удешевило поддержание долгоживущего организма [95]. 3) Продолжительность жизни родителя может быть не связана с количеством потомков [112–114]. В ряде случаев возможен одновременный отбор на большую продолжительность жизни и более высокую плодовитость [115–117]. 4) Потребление энергии уменьшается в пожилом возрасте [118], хотя, согласно гипотезе, более высокие затраты на поддержание, если источник пищи в изобилии, должны быть достаточными для увеличения продолжительности жизни.

Антагонистическую плейотропию и одноразовую сому часто группируют вместе как гипотезы «плати позже» (*pay later*): молодые организмы «заимствуют» приспособленность у самих себя в будущем. Будучи внутренне непротиворечивыми, эти гипотезы не содержат измеримых факторов, контролирующих старение. Неясно, что это означает с физиологической точки зрения, поскольку валюта для операции займа или причины ее эволюционной устойчивости неизвестны. Таким образом, природа «оплаты» не имеет четкого определения.

Еще одним аргументом против гипотез группы «плати позже» является требование заранее установленной жесткой инвестиционной стратегии. Концепции Hamilton [5] и Williams [6], а также теория одноразовой сомы в неявном виде предполагают, что индивид распределяет свои гипотетические ограниченные ресурсы между ранней и поздней приспособленностью, и что эта распределительная

стратегия остается неизменной. Например, в случае гипотезы одноразовой сомы [7] пожилой индивид не может перестать тратить свои ресурсы на воспроизводство и направить их на омоложение.

Принимая все это во внимание, мы полагаем, что аргументы против классических гипотез, в том числе перечисленных выше и ниже, на данный момент сильнее, чем аргументы в их пользу, и что эволюционная теория старения требует дополнительного уточнения [103, 119, 120].

КРИТИКА ТЕОРИЙ АДАПТИВНОГО СТАРЕНИЯ

Исторически сложилось так, что самая первая эволюционная гипотеза утверждала, что старение представляет собой адаптацию, развившуюся для высвобождения ресурсов, потребляемых потенциально искалеченными старыми организмами [1]. Впоследствии эта идея как концепция группового отбора была опровергнута. Часто приводимые аргументы против адаптивного старения были в 1957 году обобщены Williams [6]. К ним относятся:

«1) *ошибочность отождествления старения с механическим износом* (аргумент, относящийся только к теории Weismann);

2) *крайне редкое присутствие в природных популяциях особей, которые были бы достаточно стары, чтобы умереть от предполагаемого механизма смерти* (опровергнуто Williams на следующих страницах);

3) *неудача нескольких десятилетий геронтологических исследований, чтобы раскрыть какой-либо механизм смерти* (в настоящее время можно назвать клеточное старение, рак и многие другие возрастные расстройства механистической основой запрограммированной смерти);

4) *трудности, связанные с визуализацией того, как такой признак мог быть создан естественным отбором...*».

Таким образом, из четырех аргументов, выдвинутых Williams, только один (четвертый) выдержал испытание временем. Действительно, мы до сих пор не нашли эволюционных преимуществ и универсальных механизмов отбора, ограничивающих продолжительность жизни животных. Общая проблема, с которой сталкиваются теории адаптивного старения, заключается в дисбалансе между сильными индивидуальными потерями за старение и диффузной слабой пользой, которую оно дает. Если старение — это адаптация, то это должен быть сильный альтруистический признак,

который удовлетворял бы правилу Hamilton [121–123]: $r \cdot b > c$, где r — родство между альтруистом и реципиентом, b — выгода для реципиента, а c — стоимость для альтруиста. Поскольку $r \leq 1$, гипотетическая выгода b должна превышать стоимость c , которая в данном случае равна стоимости жизни альтруиста. Таким образом, сокращение продолжительности жизни особи должно приносить очень серьезную и очевидную пользу ее сородичам, которая должна превышать стоимость ее остаточной продолжительности жизни. Природа этого преимущества неясна.

Дополнительным аргументом, часто используемым для опровержения возможности процесса старения как адаптации, является отсутствие мутантов, избегающих старения [124]: адаптивное старение должно быть запрограммировано где-то в нашем геноме, и эти механизмы могут быть нарушены генетическими мутациями. Однако биологически бессмертные мутанты не обнаружены ни в дикой природе, ни в лабораторных экспериментах. Мутации, увеличивающие продолжительность жизни, обычно ассоциировались со значительными неблагоприятными эффектами приспособленности в соответствии с предсказаниями теории антагонистической плейотропии [81]. Таким образом, критерии реалистичной гипотезы адаптивного старения, помимо стабильности в беличьем тесте, должны включать возможность объяснения почти универсального преимущества более короткой продолжительности жизни, механизмов ее отбора и отсутствия биологически бессмертных мутантов. Это сочетание условий многие ученые считают невозможным [112, 124, 125].

Тем не менее в литературе легко найти доказательства того, что гибель организма может быть адаптивной. Бактерии [126] и одноклеточные эукариоты [127–129] при заражении патогенами или в других неблагоприятных условиях совершают адаптивное самоубийство (феноптоз) [130]. В случае одноклеточных организмов феноптоз функционально эквивалентен бактериальной запрограммированной гибели клеток или апоптозу. Среди многоклеточных животных ряд семелпарных видов, вероятно, подвергается феноптозу вскоре после размножения [131]. Несмотря на то что семелпарность описана у моллюсков [132], млекопитающих [133], насекомых [134] и других таксонов [131], некоторые ученые считают ее вторичным признаком, возникающим в результате истощения при размножении. Исключение делается для лососевых рыб (например, тихоокеанского лосося, *Oncorhynchus*

tshawytscha). Эти проходные рыбы мигрируют из океана в пресные воды и вскоре после размножения погибают [135]. Их смерть сопровождается полиорганной недостаточностью, в том числе ухудшением иммунитета и нейродегенерацией в течение двух недель, и вряд ли может считаться результатом истощения [136–138]. Предложенные эволюционные гипотезы предполагают, что мальки лосося могут питаться разлагающимися телами павших родителей [139, 140] (см. ниже). Таким образом, при определенных экологических условиях отбор может благоприятствовать прекращению продолжительной жизни.

Еще один недооцененный аргумент в пользу адаптивного старения исходит из клеточной и молекулярной биологии. В энтропийных гипотезах и гипотезах «плати позже» предполагается, что механизмы поддержания организма несовершенны, и, таким образом, они позволяют накапливать повреждения (рис. 3, *a*). Напротив, гипотезы запрограммированного старения предполагают, что системы репарации устойчивы в раннем возрасте и со временем происходит их деградация (рис. 3, *b*). Эти два противоположных сценария могут сочетаться, если само накопленное повреждение вредно для систем репарации (рис. 3, *c*) [10]. Наблюдения, сделанные до сих пор, как кажется, подтверждают модель адаптивного старения (рис. 3, *b*): активность нескольких систем молекулярной репарации, таких как репарация ДНК [141], аутофагия [142], протеостаз [143] и контроль качества РНК [144] с возрастом понижается. В то же время эти системы могут быть повторно активированы в более позднем возрасте с помощью

генетических, фармакологических или экологических вмешательств, что приводит к увеличению продолжительности жизни. Гены, участвующие в репарации, при старении подавляются на уровне транскрипции [145, 146]. Например, экспрессия *Sirt1* (гена, участвующего в репарации ДНК) у старых мышей снижена [147]. Эти факты не укладываются ни в модель простого накопления повреждений (рис. 3, *a*), ни в зависимое от повреждения ухудшение работы систем репарации (рис. 3, *c*), и они предполагают, что старение является эволюционной адаптацией (рис. 3, *b*).

Несмотря на долгую историю пренебрежения, гипотезы адаптивного старения все еще жизнеспособны и по-прежнему развиваются. Существует три типа гипотез адаптивного старения, классифицируемых в соответствии с пользой, которую может принести укороченная жизнь: 1) предотвращение мальтузианских катастроф и высвобождение ресурсов [1, 26–30], 2) ускорение эволюции [31–33] и 3) контроль над патогенами [34–36].

ВЫСВОБОЖДЕНИЕ РЕСУРСОВ

Модели высвобождения ресурсов предполагают, что старение является механизмом, который был выработан для предотвращения перенаселенности и истощения ресурсов. Однако опубликованные модели предусматривают очень сильные допущения. Так, для них необходимы частые вымирания групп особей на участках с долгоживущими вариантами из-за локальных демографических коллапсов [29].

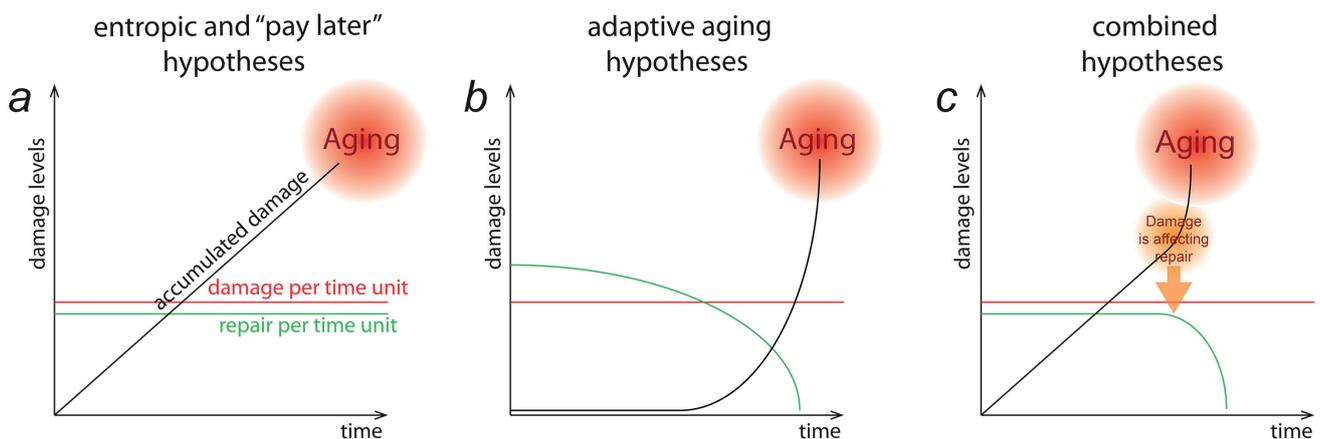


Рис. 3. Три модели контроля повреждений. *a* – Согласно энтропийным гипотезам и гипотезам «плати позже», механизмы контроля повреждений несовершенны, и повреждения накапливаются на протяжении всей жизни, что в конечном итоге приводит к старению. *b* – Гипотезы адаптивного старения утверждают, что закодированное в процессе развития снижение работоспособности механизма поддержания организма приводит к накоплению повреждений. *c* – Модель, объясняющая снижение работоспособности систем положительной петлей, включающей неблагоприятное влияние накопленных повреждений на системы репарации. Обратите внимание, что эта модель не предполагает существование программы старения, связанной с развитием

Это структура группового отбора, близкая к модели «стога сена» (haystack model) Smith [148]. В других моделях накладываются нереально строгие ограничения на расселение особей [27, 28, 30].

Кроме того, контроль численности популяции может быть опосредован зависимым от плотности популяции подавлением плодовитости [149, 150], что делает старение излишним и дорогостоящим в качестве стратегии ограничения численности. Следовательно, старение как универсальное явление пока трудно объяснить исключительно на основе концепций высвобождения ресурсов.

УСКОРЕНИЕ ПРОЦЕССА ЭВОЛЮЦИИ

Концепция ускорения эволюции предполагает, что более короткое время жизни поколения может способствовать более быстрому обороту генетических вариантов и закреплению адаптивных признаков [31–33]. Однако преимущества ускоренной эволюции не кажутся однозначными. В действительности, ускоренное старение может усилить эффект генетического дрейфа в ответ на нерелевантные эволюционные вызовы и, таким образом, снизить генетическую изменчивость, необходимую для дальнейшей адаптации. Модели ускоренной эволюции неубедительны, поскольку обычно учитывают только один фактор отбора [33, 124, 151]. В естественных популяциях индивиды подвергаются селективному давлению со стороны множества факторов. Мы полагаем, что сильные факторы отбора должны быть способны удалять неприспособленных особей без участия механизмов старения. Усиление слабых факторов отбора может привести к увеличению генетического дрейфа, уменьшению генетической изменчивости и неспособности адаптироваться к изменениям окружающей среды в будущем. Более того, хотя модели построены для бесполой популяции, рекомбинация может усложнить эти модели, поскольку недавно развившиеся адаптивные признаки будут легко комбинироваться с нестарееющим аллелем. Модели, пытающиеся объяснить старение в популяциях, размножающихся половым путем, нуждаются в существовании генетических связей между старением и полезными признаками, что относит эти гипотезы к подклассу вариантов антагонистической плейотропии [151]. Концепция ускорения эволюции также предсказывает низкие темпы старения у медленно эволюционирующих видов.

Но это предсказание не срабатывает в природе: медленно эволюционирующие акулы или щитни не являются самыми долгоживущими животными по сравнению с другими рыбами и членистоногими, в то время как быстро эволюционирующие таксоны, такие как приматы или китообразные, являются одними из самых долгоживущих млекопитающих [52, 152]. Также эта концепция не исключает бессмертия и не объясняет его почти полное отсутствие в природе. Таким образом, на современном этапе своего развития гипотезы ускорения эволюции также не могут объяснить старение.

ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ И ЭПИДЕМИИ

Группа адаптивных гипотез утверждает, что старение эволюционировало для борьбы с эпидемиями инфекционных заболеваний [34–36]. Действительно, патогены являются универсальным и мощным фактором отбора [84, 86], а внутренняя, независимая от болезней смертность (продолжительность жизни) организма-хозяина является важным параметром в эпидемиологических моделях [153].

В основополагающей работе было предложено ограничить продолжительность жизни для уменьшения бремени хронических инфекций [34]. Если вероятность заражения особи на протяжении всей жизни остается одинаковой и предполагается отсутствие её выздоровления, то следует ожидать, что старые особи будут заражены чаще, чем молодые. Таким образом, удаление старых особей в результате старения, очевидно, приводит к снижению хронической патогенной нагрузки. Если предположить, что инфекция отрицательно влияет на размножение [154], тогда сокращение продолжительности жизни может парадоксальным образом привести к увеличению скорости роста популяции. Kirchner и Roy [34] предложили модель разбитой на кластеры метапопуляции со спорадической, независимой от болезней элиминацией кластеров с последующим их заселением выжившими особями (аналогично модели стога сена [148]). При некотором сочетании параметров существует сценарий, в котором в популяции берет верх вариант с более короткой продолжительностью жизни.

Отбор более короткой продолжительности жизни под влиянием болезней также предлагался в гибридной модели, включающей элементы контроля плотности популяции, ускорения эволюции и предотвращения болезней с акцентом на перенаселенность как причину

эпидемии [35]. В пространственно распределенной популяции с нулевой миграцией смерть от старения делала часть участков экспериментального пространства незанятыми. В модели предполагались эпидемии высокоинфекционных заболеваний с абсолютной смертностью. Районы с высокой долей свободных участков были не полностью ликвидированы вспышками инфекции из-за перколяционных эффектов (по аналогии с просеками, ограничивающими лесные пожары). Короткоживущие варианты также более эффективно фиксировали аллели устойчивости к патогенам [35].

Однако две эти модели не являются универсальным объяснением старения. Обе модели включают групповой отбор, который принято считать редким явлением [148]. Для обеих моделей требуются постоянно происходящие серьезные эпидемии, чтобы поддерживать давление отбора против увеличения продолжительности жизни. Эта предпосылка противоречит наблюдениям. Кроме того, такие эпидемии должны способствовать быстрому отбору устойчивости организма-хозяина. Kirchner и Roy [34] даже не претендовали на то, что они представили общую гипотезу старения, поскольку эффект был ограничен кластеризованными метапопуляциями. Дальнейшее развитие их модели привело к её конвергенции с антагонистической плейотропией, обсуждавшейся выше [83]. Модель Mitteldorf и Repper [35], помимо включения группового отбора и нереалистично вирулентных патогенов (см. также Débarge et al. [155]), очень чувствительна к миграции хозяина [124]. Обе гипотезы, проходя беличий тест и объясняя эволюционные преимущества старения, не могли объяснить отсутствие нестареющих мутантов. Таким образом, при тщательном анализе обеих моделей следует сделать вывод о том, что патогены не могут быть основной эволюционной движущей силой старения, поскольку требования моделей нереалистично высоки.

НОВАЯ КОНЦЕПЦИЯ, РАССМАТРИВАЮЩАЯ КОНТРОЛЬ НАД ПАТОГЕНАМИ КАК ДВИЖУЩУЮ СИЛУ СТАРЕНИЯ

Используя реалистичные эпидемиологические модели и модели популяционной динамики, нами была создана теоретическая основа, подтверждающая идею о том, что патогены все же могут быть основной движущей силой эволюции продолжительности жизни. Новая модель предполагает, что старение может быть

адаптацией для ограничения возникновения и распространения эпидемий инфекционных заболеваний [36].

Во-первых, мы обнаружили, что популяции короткоживущих особей, помимо снижения распространенности патогенов [34], дают дополнительные преимущества при столкновении с эпидемиями. Новым патогенам, заражающим новый вид, может потребоваться значительное время для адаптации к новому хозяину. Например, некоторые субштаммы ВИЧ-2 были описаны только у отдельных пациентов, и поэтому считаются зоонозными вирусами, не приспособленными для эффективной передачи от человека к человеку [156, 157]. Наша модель показывает, что более короткая продолжительность жизни может ограничить временное окно, доступное для таких хронических патогенов, чтобы развить лучшую трансмиссивность. Тем самым короткая продолжительность жизни предотвращает зоонозную передачу.

Также мы обнаружили, что резкое снижение плотности зараженной популяции (бутылочное горлышко [158]) во время естественных колебаний численности или при миграции в новую среду может быть связано с элиминацией патогенов. Если последние инфицированные основатели популяции умрут до того, как её плотность восстановится до допустимого для поддержания эпидемии уровня, то патоген в этой популяции вымрет. Этот эффект напрямую зависит от продолжительности жизни особей. Таким образом, короткая продолжительность жизни имеет преимущества на уровне популяции. Далее моделирование, разработанное на основе этой гипотезы, продемонстрировало сценарий отбора короткой продолжительности жизни на уровне индивидуального отбора. Выбор в нашей модели был основан на нескольких реалистичных и общих предположениях, касающихся структуры популяции хозяина и свойств патогенов. Мы рассматривали «вязкие» популяции животных [140, 159, 160], где ограниченное расселение делает инфекционный контакт между родственными особями более вероятным [155]. Преимущественная передача патогенов между родственниками может быть обусловлена социальной и семейной структурой популяции, которые в будущем следует учитывать при моделировании. Мы также предположили, что расселение в определенной степени зависит от плотности [161, 162], так как конкуренция за ресурсы в густонаселенных районах ареала заставляет животных мигрировать в менее заселенные районы. Оба эти предположения

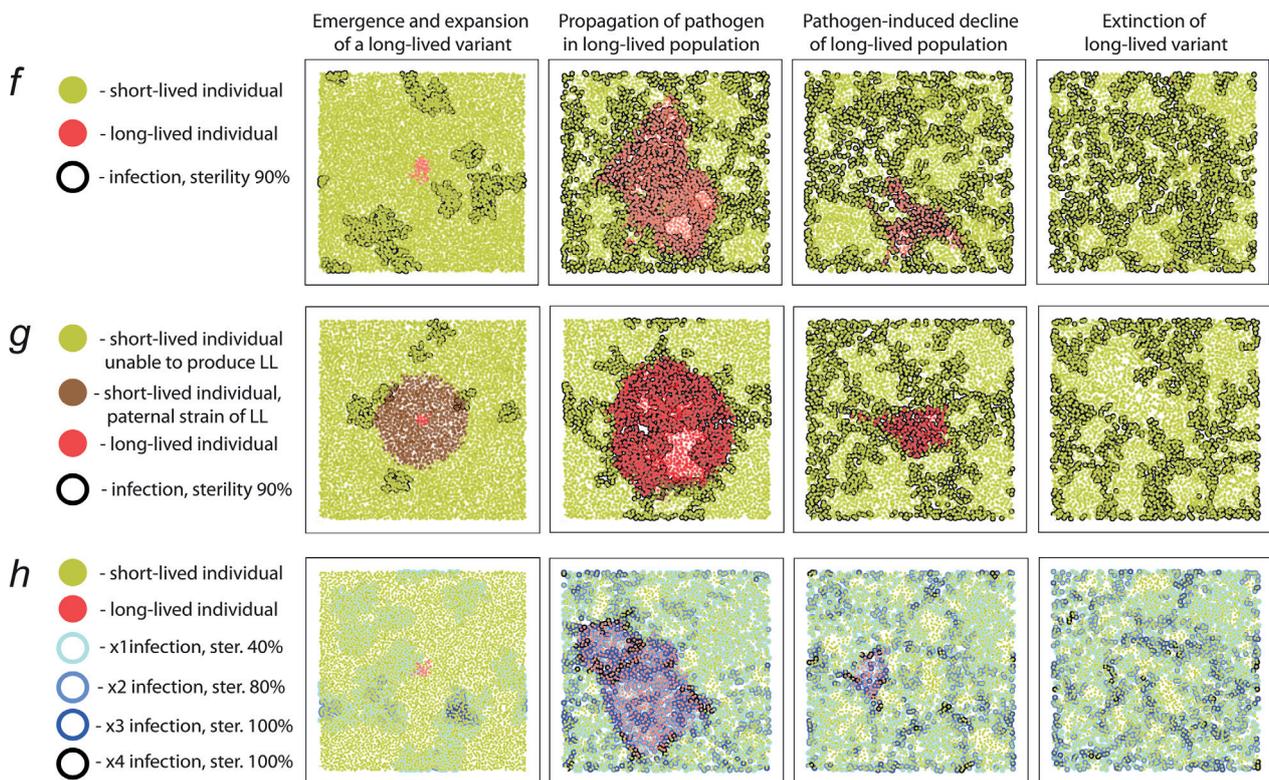
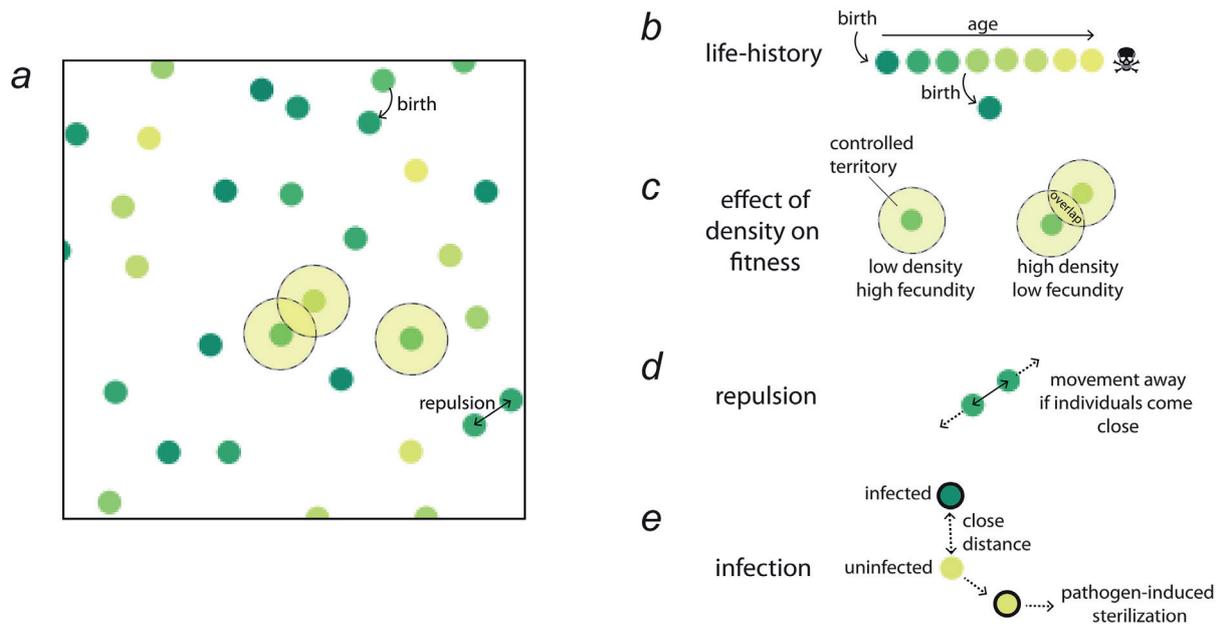


Рис. 4. Гипотеза контроля инфекций: модель отбора. *a* – Модель предполагает свободное передвижение особей (обозначенных кружками). *b* – Особи погибают при достижении критического возраста, определяемого внутренним специфическим для штамма параметром: заданным значением продолжительности жизни. *a–e* – Возраст изображен в цвете. *c* – Более высокая плотность приводит к перекрыванию территорий особей, что ограничивает доступность ресурсов и снижает их плодовитость. *d* – Чтобы максимизировать доступную территорию, особи удаляются друг от друга (см. видео 1 в Приложении). *e* – Особи могут заражать друг друга; вероятность заражения зависит от расстояния между особями. *f* – Основные этапы стабилизирующего отбора предотвращают появление в популяции долгоживущих вариантов. Цвета соответствуют штаммам на панелях (*f*) и (*g*). Стерилизация хозяина патогеном – 90%. *g* – Причины отсутствия в природе долгоживущих мутантов и преимущества супрессоров эволюционируемости. На начальном этапе размножения долгоживущего варианта (красный) происходит вытеснение его отцовского короткоживущего штамма (коричневый). Таким образом, вредна не только долгая жизнь сама по себе, но даже способность производить долгоживущих мутантов. *h* – Сценарий отбора с несколькими более мягкими патогенами. Четыре патогена, 40%-ная стерилизация хозяина каждым индивидуальным патогеном

вполне реалистичны, обсуждаются в литературе и, скорее всего, широко распространены в природе. Мы построили простую и интуитивно понятную стохастическую модель для исследования этого сценария (рис. 4, видео 1 в Приложении).

Модель предполагает наличие хронических патогенов с сильным негативным воздействием на репродуктивную способность. Такие патогены присутствуют в природе. Эволюционная паразитология предсказывает, что патогены, скорее, стерилизуют своих хозяев, чем сокращают продолжительность их жизни для усиления передачи [163]. Некоторые патогены используют стерилизацию хозяина как часть своей репродуктивной стратегии [164, 165]. Некоторые венерические заболевания человека, такие как гонорея, хламидиоз и сифилис, вызывают бесплодие [166, 167]. Снижение плодовитости происходит и при других хронических заболеваниях человека, таких как ВИЧ [168], проказа [169], HCV [170], туберкулез [171], герпес [172] и др. Кроме того, можно также предусмотреть стерилизацию, вызванную коинфекцией несколькими легкими хроническими патогенами. Таким образом, условия, связанные со свойствами патогенов, которые удовлетворяют критериям модели, также являются реалистичными.

Мы смоделировали популяцию короткоживущих особей, в которой образовались долгоживущие мутанты. С помощью этой модели мы наблюдали стабилизирующий отбор более короткоживущих особей, который происходил по следующему механизму: 1) на ранних стадиях патогены и долгоживущие мутанты пространственно отделены друг от друга, что позволяет мутантам размножаться за счет их низкой смертности, 2) патогены распространяются на территории, занятой долгоживущими хозяевами, и по причинам, описанным выше, становятся более распространенными, чем у короткоживущих хозяев, 3) более широкое распространение патогена приводит к более высокой стерилизации и сокращению численности долгоживущих особей, что в сочетании с популяционным давлением со стороны незараженных участков, заселенных короткоживущими особями, приводит к полному вытеснению долгоживущего варианта (рис. 4, *f*; видео 2 в Приложении). Таким образом, в присутствии вызывающих бесплодие хозяина хронических патогенов ограниченная продолжительность жизни может являться эволюционно стабильной альтруистической стратегией, защищенной от инвазии долгоживущих дефекторов.

Мы выявили критические факторы, влияющие в этой модели на выбор заданных значений продолжительности жизни. В дополнение к «вязкости» популяции важными факторами, влияющими на исход конкуренции, являются скорость передачи патогенов, степень стерилизации и рождаемость хозяев.

Вязкость популяции является ключевым концептуальным параметром модели. Предположим, что популяция хорошо перемешана, а взаимодействия между ее членами беспорядочны. В этом случае заражение не связано с родственниками индивида, и выгода от более короткой продолжительности жизни не может распространяться конкретно на родственников. В таких условиях, следуя основному сценарию «Трагедии общин» (Tragedy of the Commons) [173], эволюцией фиксируется большая продолжительность жизни.

Мы обнаружили, что патогены со слишком высокой или слишком низкой инфекционностью не могут участвовать в отборе на более короткую продолжительность жизни. Если имеет место эффективная передача патогена, то он неселективно заражает как короткоживущие, так и долгоживущие популяции. Если уровень передачи патогена слишком низкий, то его распространенность и, следовательно, его неблагоприятное воздействие на рост популяции долгоживущих вариантов недостаточно. Отбор в пользу короткой продолжительности жизни требует наличие высоко (90%) стерилизующего патогена или комбинации умеренно (10–40%) стерилизующих патогенов, которые могут обеспечить сильное кумулятивное воздействие на коинфицированных хозяев (рис. 4, *h*). Все патогены в модели считались хроническими.

Таким образом, мы делаем вывод, что только часть патогенов может влиять на эволюцию продолжительности жизни. Однако, учитывая огромное разнообразие паразитов в природе и их негативное влияние на приспособленность хозяина [154, 174], разумно предположить, что у большинства видов есть достаточное количество возбудителей, удовлетворяющих этим критериям. Кроме того, поскольку мы обнаружили, что популяции долгоживущих особей являются более подходящим субстратом для адаптации новых «зоонозных» патогенов, передающихся от других видов, спектр предполагаемых патогенов еще больше расширяется.

В отличие от предыдущих моделей типа контроля над патогенами, наш сценарий не требует для объяснения заданного значения ограниченной продолжительности жизни, действия группового отбора или постоянно идущих эпидемий тяжелых заболеваний.

Наша гипотеза смягчает проблемы, связанные с эволюцией устойчивости хозяина к патогенам. Так, давление отбора в сторону более короткой продолжительности жизни может быть обеспечено зоонозными патогенами; воздействие этих патогенов ограничено и вероятность развития устойчивости снижается. В другом сценарии, включающем несколько более мягких патогенов, каждый из этих патогенов обладает лишь небольшой избирательной способностью стимулировать эволюцию резистентности.

Отрицательная связь между рождаемостью хозяина и эволюцией продолжительности жизни в эпидемиологических моделях была отмечена в предыдущих моделях группового отбора [34, 35] и была стабильной в нашей модели родственного отбора (см. ниже).

Важно отметить, что мы идентифицировали механизм отбора, который предотвращает появление нестареющих мутантов. Описанный выше сценарий отбора предполагает, что один и тот же признак (т.е. большая продолжительность жизни) может быть полезным сразу после его появления до закрепления патогена в долгоживущем штамме и вредным — после внедрения патогена (рис. 4, *f*). Мы показали, что этот механизм отбора делает саму эволюционную способность производить долгоживущих мутантов вредным признаком. Короткоживущий отцовский штамм уязвим для частичного вытеснения долгоживущими мутантами, которые, в свою очередь, нестабильны из-за эффектов инфекций. Штамм, не способный продуцировать долгоживущие мутанты, может получить долгосрочное преимущество при отборе (рис. 4, *g*). Эти взаимодействия могут способствовать закреплению защитных контролируемых механизмов, ограничивающих эволюцию продолжительности жизни. Концепция супрессоров эволюционирования, отбирающихся для стабилизации признаков вредных на короткой эволюционной дистанции и полезных в долгосрочной перспективе, была предложена Altenberg [175] в 2005 году и впоследствии обсуждалась в контексте гипотезы старения о высвобождении ресурсов [29]. Однако, насколько нам известно, наша модель является первой, показывающей потенциальное влияние отбора Altenberg на эволюцию продолжительности жизни без участия группового отбора. Кроме того, существование супрессоров эволюционирования, предсказанное нашей моделью, является потенциальным объяснением мутаций, которые продлевают продолжительность жизни, но снижают репродуктивную способность, обыч-

но рассматриваемую как проявление «плейотропных генов». В отличие от классических гипотез, наша модель рассматривает эти связи между старением и другими функциями организма как адаптивные супрессоры эволюционирования, а не результат фиксации случайных признаков [6, 81].

Таким образом, наша гипотеза удовлетворяет всем четырем критериям, критическим для адаптивной гипотезы старения. Наша гипотеза проходит «беличий тест», если мы предполагаем, что наземные белки подвергаются более высокому избирательному давлению со стороны патогенов (см. ниже). Мы можем объяснить преимущества более короткой продолжительности жизни и определить механизм отбора. Неравенство Hamilton в случае гипотезы контроля над патогенами принимает вид

$$\sum r^*b > c,$$

где левая часть представляет собой сумму всех выгод родственникам альтруиста от предотвращения или ограничения эпидемий. Мы также можем объяснить отсутствие нестареющих или чрезвычайно долгоживущих мутантов. Мы рассматриваем эти факторы как критические, что позволяет рассматривать структуру контроля над патогенами как объединяющую гипотезу эволюции старения.

На следующих страницах мы рассмотрим ряд наблюдений, связанных со старением, и обсудим их соответствие существующим эволюционным гипотезам старения.

НАБЛЮДЕНИЯ, СВЯЗАННЫЕ СО СТАРЕНИЕМ, И ИХ СООТВЕТСТВИЕ ГИПОТЕЗАМ СТАРЕНИЯ

Универсальность и изменчивость старения.

Старение встречается в природе почти повсеместно [61], и это приводит энтропийные гипотезы к постулату о том, что старение является фундаментальным свойством живой материи. Тем не менее различия в скорости старения у разных видов значительны [62]. Например, продолжительность жизни млекопитающих колеблется от примерно 2 лет у землеройки до более чем 200 лет у гренландского кита [52]. Эта пластичность не соответствует представлению о старении как об основном биохимическом свойстве жизни. Кроме того, у некоторых организмов старения не наблюдается (см. выше). Таким образом, старение, по-видимому, не является необходимым свойством жизни и,

вероятно, определяется некими экологическими факторами. Распространенность старения предполагает, что эти экологические факторы, за немногими исключениями, присутствуют повсеместно.

Классические гипотезы «плати позже» (антагонистическая плейотропия и одноразовая сома) определяют высокую внешнюю смертность, участие неких эволюционных компромиссов, связанных с продолжительностью жизни [6], и энергетические ограничения [7] в качестве критических параметров, определяющих эволюцию старения. Однако ни один из них не является достаточно распространенным, чтобы объяснить универсальность старения.

Гипотезы «плати позже» формально не исключают возможности биологического бессмертия (например, в богатой и хорошо защищенной среде, что является не такой уж редкой комбинацией условий). Однако эти предположения плохо объясняют исключительную продолжительность жизни, которая не соответствует предсказанным условиям. Например, голый землекоп является примером чрезвычайно долгоживущего вида [44]. Тем не менее на голых землекопах активно охотятся змеи, и они не живут в особенно богатой пищей среде по сравнению с другими грызунами [176].

Напротив, патогены являются универсальными спутниками каждого свободноживущего вида и представляют исключительно мощную силу отбора [84, 86]. Гипотеза контроля над эпидемиями опирается на этот ключевой фактор, чтобы объяснить универсальность старения и продемонстрировать достаточную способность объяснять различия в продолжительности жизни у разных видов с использованием параметров, модулирующих эпидемические процессы (см. ниже).

Бессмертие примитивных многоклеточных организмов. Известный факт отсутствия старения у гидры (*Hydra vulgaris*) [38], плоских червей планарий (*Schmidtea mediterranea*) [39] и медуз (*Turritopsis dohrnii*) [39] является парадоксом, который классические гипотезы старения не могут полностью разрешить. Во-первых, доказательство существования биологического бессмертия является критической проблемой для энтропийных гипотез. Гипотезы «плати позже» и гипотезы адаптивного старения утверждают, что бессмертие у этих видов вызвано их неспособностью механически разъединить размножение и регенерацию или, как это было представлено в более ранней рукописи, они являются «...организмами, в которых различие между сомой и зародышевой плазмой могут не существовать» [6]. Как только разъ-

единение становится возможным, старение развивается за счет выгод от компромиссов (гипотеза «плати позже») или адаптивных преимуществ, характерных для каждой адаптивной гипотезы. В случае модели контроля над патогенами — это более низкая патогенная нагрузка. Недавнее исследование показало, что при стрессе гидры, размножающиеся бесполом путем, переключаются на половой жизненный цикл, включающий старение [177]. Заманчиво предположить, что это может быть связано в том числе с реакцией на инфекционные заболевания.

Отдельные мутации могут способствовать увеличению продолжительности жизни, но бессмертные мутанты отсутствуют. Пластичность старения не ожидается, если исходить из того, что старение является общим свойством жизни каким-то образом заложенным в биохимии. Гипотезы группы «плати позже» предполагают, что мутации, увеличивающие продолжительность жизни, сопровождаются вредными побочными эффектами. Отсутствие бессмертных мутантов, с точки зрения этих гипотез, происходит из-за множественности повреждающих процессов, которые нельзя компенсировать несколькими дополнительными мутациями.

Гипотеза контроля над патогенами хорошо согласуется с данными о пластичности старения, поскольку в ней старение предполагается как регулируемая адаптация. Это первая гипотеза адаптивного старения, которая предлагает модель, объясняющую отсутствие бессмертных мутантов подавлением эволюционируемости (рис. 4, g) [36, 175]. «Плейотропные» пагубные эффекты мутаций, увеличивающих продолжительность жизни, можно рассматривать как проявление этих механизмов контроля эволюционируемости.

Взаимосвязь между долголетием и размерами тела. Корреляция между размером тела животного и продолжительностью жизни представляет собой хорошо охарактеризованную корреляцию [8, 178–181]. Действительно, очевидное экологическое ограничение требует, чтобы у животного было достаточно времени для роста, чтобы использовать преимущества своего размера, и это наблюдение стабильно в контексте любой эволюционной гипотезы старения [182].

Однако у мутантных вариантов и искусственно отобранных пород животных эта корреляция носит обратный характер. Так, мутанты мышей и мух с дефектами роста имеют более длительную продолжительность жизни [183, 184], что противоположно корреляции, наблюдаемой при сравнении продолжительности

жизни разных видов. Наиболее известным примером является долголетие у собак: мелкие породы живут значительно дольше, чем крупные [185]. У людей карликовость при синдроме Ларона ассоциирована с более низкой заболеваемостью диабетом типа II и некоторыми видами рака и может увеличивать продолжительность жизни [186, 187]. Таким образом, рост, по-видимому, вреден для продолжительности жизни на индивидуальном уровне. Считается, что гормоны роста (GH/IGF-1) участвуют в регуляции размера и старения модельных организмов [188], пород собак [189] и людей с синдромом Ларона [190], подчеркивая механистическое сохранение физиологической связи между старением и ростом.

Эти наблюдения показывают, что, хотя экологическая связь приводит к увеличению продолжительности жизни у более крупных животных, физиологическая связь между ростом и старением носит противоположный характер. Основываясь на этих взглядах, ожидается, что более мелкие долгоживущие мутанты, если их выпустить в дикую природу, будут эволюционировать либо до большего размера, либо до более короткой продолжительности жизни.

Это сложное взаимодействие факторов можно объяснить в большей или меньшей степени всеми неэнтропийными эволюционными гипотезами. Однако, на наш взгляд, наиболее экономное объяснение исходит из концепции адаптивного старения. В ней утверждается, что, хотя долголетие является необходимой предпосылкой для увеличения размера тела, процесс роста механически связан с таймером старения, чтобы синхронизировать скорость старения с индивидуальным прогрессом развития. С помощью этого аргумента можно объяснить существование потенциала продления жизни и причины, по которым этот потенциал не активируется повсеместно. Таким образом, отклонения скорости старения у пород собак и других искусственных мутантов объясняются недостаточной экспозицией к естественному отбору для оптимизации продолжительности их жизни.

Корреляция со скоростью метаболизма. Считается, что животные с более высокой скоростью метаболизма стареют быстрее [191–193]. Эту корреляцию часто упоминают в поддержку энтропийной гипотезы: повышенный уровень повреждений возникает при более высокой скорости метаболизма [194]. Однако эта корреляция не является абсолютной. Птицы и летучие мыши, две группы долгоживущих животных, имеют очень высокий уровень метаболизма [195]. Более того, наблюдается об-

ратная корреляция между размерами тела млекопитающих и скоростью метаболизма [196, 197], а исключение фактора размера делает корреляцию между уровнем метаболизма и продолжительностью жизни статистически незначимой [182]. Таким образом, гипотезы накопления повреждений не могут объяснить эти наблюдения.

Тем не менее, хотя экологическая связь между уровнем метаболизма и долголетием обсуждается, физиологический компромисс был ясно показан во многих моделях. Мутанты с более низкой скоростью метаболизма имеют большую продолжительность жизни [198–200]. Как и в случае с размерами тела, адаптивные гипотезы старения интерпретируют это как свидетельство взаимодействия между скоростью метаболизма и таймером старения.

Компромисс между плодовитостью и долголетием. Хорошо описанным экологическим наблюдением является негативная корреляция между продолжительностью жизни и количеством потомства при сравнении разных видов животных [8, 9, 102]. Компромисс между долголетием и плодовитостью лежит в основе гипотезы одноразовой сомы [7] и современной теории истории жизни (life history theory) [201, 202]. Однако в индивидуальной истории жизни этот компромисс не очень ясен. Продолжительность жизни девственной самки дрозофилы больше, чем у спаривавшихся самок [203]. Однако тщательный анализ показал, что этот эффект обусловлен не истощением, связанным с откладыванием яиц, а, скорее, специфическим явлением, связанным со спариванием и ассоциированным с половым пептидом из спермы самца (sex-peptide). Самки, скрещенные с нулевыми мутантами по этому пептиду, имеют более длительную продолжительность жизни, тогда как у самок, скрещенных со стерильными самцами, содержащими половой пептид, продолжительность жизни сокращается [204–206]. Связь между плодовитостью и продолжительностью жизни у *Drosophila* может быть нарушена при помощи искусственной селекции [207]. Корреляция между пострепродуктивным долголетием и количеством детей у женщин незначительна или отсутствует в зависимости от исследования [208]. Таким образом, предсказания гипотезы одноразовой сомы, похоже, работают на уровне видов и терпят неудачу на уровне индивидуальной истории жизни.

Гипотеза контроля над патогенами идентифицирует экологическую связь между долголетием и плодовитостью в эпидемиологических моделях через влияние на баланс популяционных

давлений между высоко инфицированными долгоживущими особями и менее инфицированными короткоживущими особями [36]. И рождаемость, и смертность влияют на темпы прироста популяции. Рассмотрим популяцию с очень низкой плодовитостью. Небольшое увеличение продолжительности жизни повлияет на рост популяции в большей мере, чем в очень плодovитой популяции. С ростом рождаемости относительная роль продолжительности жизни в поддержании демографического давления снижается, так что большая продолжительность жизни сильно инфицированных долгоживущих особей может оказаться недостаточной, чтобы обеспечить необходимое демографическое давление и уравновесить более высокий уровень воспроизводства менее инфицированного короткоживущего штамма (рис. 5). Таким образом, гипотеза о контроле над патогенами раскрывает механизм этой корреляции, предлагая экологическую парадигму, в которой более высокая рождаемость должна приводить к более короткой продолжительности жизни и наоборот.

Примечательно, что этот механизм не противоречит теории истории жизни, но обеспечивает модельную альтернативу одноразовой сомe. Тем не менее предсказания двух гипотез немного отличаются. Одноразовая сома предполагает, что старение находится в физиологическом компромиссе с плодовитостью и лучше коррелирует с затратами калорий на размножение. Гипотеза контроля над патогенами рассматривает эти два параметра как экологический компромисс и, следовательно, предсказывает, что скорость роста популяции лучше коррелирует с продолжительностью жизни. Изучение этих двух корреляций может помочь сделать выбор между этими гипотезами.

Ограничение калорий и гормезис. Гипотеза одноразовой сомы предполагает, что старение является результатом затрат энергии на размножение за счет энергии, необходимой для поддержания [7]. Этот взгляд повлиял и на современную теорию истории жизни [201, 202]. Однако это противоречит наблюдению, что ограничение калорий увеличивает продолжительность жизни [106–108], тогда как диета *ad libitum* не сопровождается экстенсивным самовосстановлением и увеличением продолжительности жизни (см. выше). Интересно, что ограничение калорий не является единственным стрессором, вызывающим гормезисную реакцию. Некоторые легкие стрессоры, такие как субоптимальная температура или окисление, также увеличивают продолжительность жизни [209–211]. Это указыва-

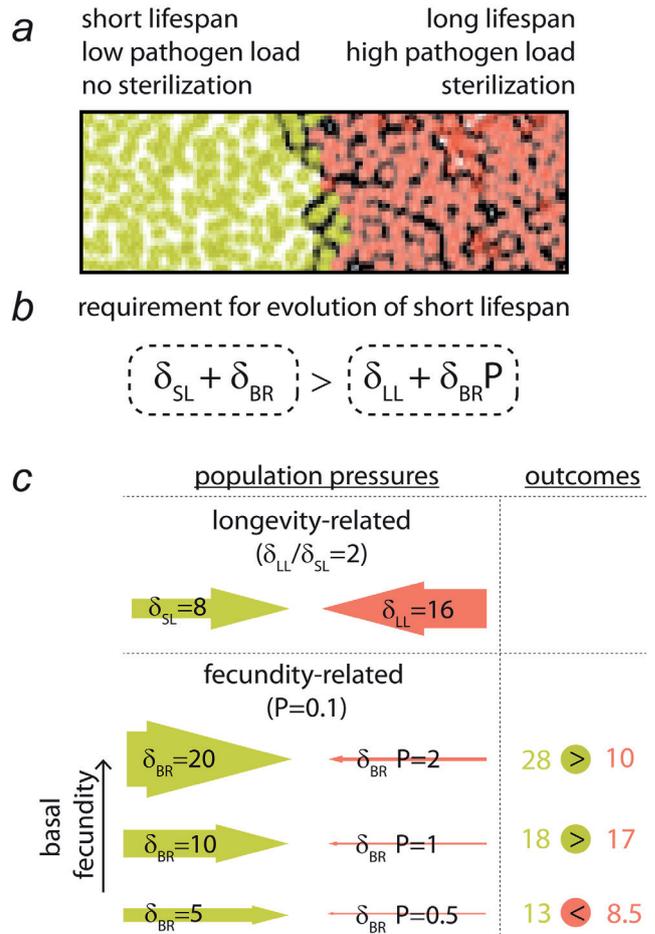


Рис. 5. Связь между продолжительностью жизни и плодовитостью, объясняемая гипотезой контроля над патогенами. *a* – Граница между короткоживущими и долгоживущими популяциями показана на рис. 4, *f*. *b* – Необходимое (но не достаточное) условие отбора в сторону меньшей продолжительности жизни. Градиент популяционного давления, зависящий от продолжительности жизни, очевидно, всегда благоприятствует долгоживущему штамму (поскольку $\delta_{SL} < \delta_{LL}$), а градиент, зависящий от размножения, – короткоживущему штамму ($\delta_{BR} > \delta_{BR} P$). Следовательно, увеличение δ_{BR} приводит к увеличению силы отбора в сторону более короткой продолжительности жизни. *c* – Давление популяции, влияющее на результат отбора: смертность и плодовитость влияют на давление популяции. δ_{SL} и δ_{LL} – Давление, возникающее из-за короткой и долгой продолжительности жизни соответственно. δ_{BR} – Давление, создаваемое за счет воспроизводства здоровой популяции. P – Патоген-зависимая стерилизация хозяина, < 1 . $\delta_{BR} P$ – Популяционное давление, создаваемое размножением зараженной популяции

ет на существование путей условного продления жизни. Классические гипотезы «плати позже» не могут объяснить, почему эти механизмы продления жизни не действуют в оптимальных или «лучших чем оптимальные» условиях. Недавние исследования показали, что увеличение продолжительности жизни за счет ограничения калорий в значительной степени зависит от обонятельных сигналов, а

не от потребления пищи [212, 213]. Поскольку запахи не должны влиять на метаболический баланс, эти наблюдения указывают на то, что горметические реакции являются экологическими адаптациями, а не результатом физиологических компромиссов.

Гипотеза контроля над патогенами может объяснить это явление. Поскольку эволюция продолжительности жизни обусловлена балансами популяционных давлений, пауза в размножении, вызванная ограничением калорий или другими мягкими стрессорами, также приостанавливает отбор, если применяется ко всем членам популяции. Следовательно, горметическое увеличение продолжительности жизни в этом случае может быть адаптивным, поскольку оно позволяет отложить размножение до лучших времен с лишь незначительными потерями, связанными с патогенами.

Также в соответствии с предсказаниями этой гипотезы хронические инфекции и воспалительные процессы, в отличие от других стрессоров окружающей среды, должны сокращают продолжительность жизни [214, 215], что указывает на уникальное место инфекций в эволюции старения.

Связь с внешней смертностью. Более высокие темпы старения у видов, подверженных высокой внешней смертности (например, из-за хищничества или голода), часто считаются ключевым предсказанием гипотезы антагонистической плейотропии [6, 65, 69].

Эмпирически детерминированная гибель особей в силу сезонности или других периодических причин приводит к развитию нейтрального в этих условиях старения [58–60]. Таким образом, если нельзя избежать смерти, старение может развиваться посредством генетического дрейфа или даже как стратегия энергосбережения, например, если накопление поврежденных молекул является более дешевой стратегией, чем их переработка [216]. Однако данные о недетерминистической смертности противоречивы. В одних популяциях усиление хищничества приводит к уменьшению продолжительности жизни [70, 217], а в других – к её увеличению [68, 72, 73]. Корреляция между годовой смертностью и продолжительностью жизни у разных видов млекопитающих находится на грани статистической значимости [74]. Таким образом, единого мнения о взаимосвязи внешней смертности и старения до сих пор нет [71].

Гипотеза контроля над патогенами предполагает сложные и косвенные экологические взаимодействия между внешней смертностью и старением. С одной стороны, высокая внеш-

няя смертность может привести к удалению старых инфицированных особей, чтобы ослабить давление отбора в сторону более короткой продолжительности жизни. Этот эффект может быть сильнее, если инфицированные особи особенно уязвимы к внешним причинам смертности. С другой стороны, внешняя смертность может способствовать развитию более раннего созревания и более высокой рождаемости [217], т.е. признаков, способствующих эволюции более короткой продолжительности жизни в нашей модели [36]. Следовательно, более быстрое старение, действительно, может развиваться из-за высокого уровня внешней смертности как вторичного эффекта увеличения плодовитости. Будущее моделирование и эмпирическая работа необходимы для выяснения точного способа взаимодействия между внешней смертностью и долголетием в рамках гипотезы о контроле над патогенами.

Полет и повышение продолжительности жизни.

Существует корреляция между полетом и долголетием [53, 218]. Летающие птицы и летучие мыши имеют большую продолжительность жизни, чем наземные млекопитающие с сопоставимыми размерами [8]. В то же время считается, что нелетающие птицы имеют более короткую продолжительность жизни с поправкой на размер [218]. Согласно классическим гипотезам, это связано с защитным эффектом полета как стратегии избегания хищников [6, 219]. Однако смертность птиц и летучих мышей часто превышает смертность наземных млекопитающих с аналогичной максимальной зарегистрированной продолжительностью жизни (рис. 2) [77, 220, 221]. Любопытно, что у планирующих и древесных животных отмечается большая продолжительность жизни, чем у соразмерных им наземных видов [53, 218]. В частности, это относится к различиям между наземными и древесными белками (рис. 1).

Гипотеза контроля над патогенами предполагает, что полет приводит к снижению вязкости популяции. В этом случае повышается вероятность передачи инфекции между неродственными особями. В случае беспорядочных взаимодействий индивид не может направить выигрыш от своей адаптивной смерти своим родственникам, делая альтруизм невыгодным, и приводя к увеличению продолжительности жизни. Необходимы исследования характеристик популяций, чтобы проверить предсказания гипотезы контроля над патогенами. Привлекательными объектами для таких исследований являются летучие мыши, среди которых есть долго- и короткоживущие виды.

Изменчивость старения в изоформах развития.

Другим примером пластичности старения является различие в продолжительности жизни между изоформами развития полифенических видов. Наиболее изученным примером является дауэровская личинка *Caenorhabditis elegans*, которая развивается в ответ на голодание и может выживать в течение ~4 месяцев вместо 2–3 недель для обычной взрослой особи [222]. Другой пример – королевы эусоциальных насекомых [223] и грызунов [224, 225], которые живут дольше не размножающихся особей (см. ниже). Ярким примером изменчивости продолжительности жизни является перелетная бабочка-монарх (*Danaus plexippus*), резидентная особь которой живет менее двух месяцев, в то время как мигрирующая может прожить более шести месяцев [226]. Следовательно, один и тот же генетический материал может реализоваться в совершенно разных продолжительностях жизни. Энтропийные гипотезы не могут объяснить, почему программа долгожительства, закодированная в геноме, не активируется у короткоживущих изоформ. Гипотезы «плати позже» предполагают, что компромиссы различны в различных вариантах развития. В частности, в контексте одноразовой сомы можно утверждать, что дауэровская личинка *C. elegans* является энергосберегающей формой, которая не инвестирует в размножение и направляет все ресурсы на долголетие. В случае маток у эусоциальных видов эта гипотеза все еще может утверждать, что колония вкладывает в матку больше ресурсов, чем в содержание рабочих особей [227]. Эти аргументы кажутся слабыми, так как неясно, почему короткоживущие изоформы не имеют достаточного количества ресурсов в некоторых исключительно благоприятных экологических нишах или во время богатых сезонов. Таким образом, неясно, почему программа выживания не включается в этих «лучше, чем оптимальные» случаях. Пример бабочек-монархов особенно противоречив в контексте одноразовой сомы. В то время как мигрирующие монархи не размножаются (состояние, называемое диапаузой), в отличие от других насекомых в этом состоянии, они остаются физически активными, совершая необычайно долгое путешествие из Канады в Мексику. Количество энергии, потраченной во время этого путешествия, очевидно, существенно. Этими примерами мы подчеркиваем общую слабость теории одноразовой сомы, которая требует, чтобы стоимость поддержания была достаточно высокой с одной стороны и в то же время доступной – в случае долгоживущих изоформ развития.

Гипотеза контроля над патогенами предполагает, что продолжительность жизни определяется как компромисс между эпидемически-обусловленными потерями, связанными с долгой продолжительностью жизни и экологическими преимуществами долголетия. Следовательно, если для выживания при определенных обстоятельствах (суровая среда, миграция) необходима более длительная продолжительность жизни, то она может эволюционировать и проявиться именно в этих условиях. Патогены по-прежнему присутствуют в «лучшей, чем оптимальная» среде, поэтому давление отбора в сторону более короткой продолжительности жизни не снижается.

Эусоциальность насекомых и млекопитающих.

Эусоциальность связана с крайней разницей в продолжительности жизни между особями одного и того же вида [223, 224] и конкретными социальными структурами. Их стоит обсудить отдельно от вариаций продолжительности жизни других фенических изоформ. Например, пчелиные матки (*Apis mellifera*) живут от 2 до 5 лет, а рабочие особи – лишь 15–38 дней (в летнее время). Молодых рабочих сначала определяют на работу по уходу за яйцами и личинками, и они не покидают улей. Через несколько недель они переключаются на поиск пищи и занимаются сбором нектара вплоть до своей гибели, которая обычно происходит вне улья. Любопытно, что если воспрепятствовать рабочим покидать улей, продолжительность их жизни увеличивается до 75–135 дней, что указывает на то, что социально-обусловленный переход от профессии няньки к сборщице является ключевым событием, определяющим продолжительность жизни рабочей пчелы. Кроме того, если пчелы-сборщицы вынуждены вернуться к работе по уходу за личинками, то эти особи омолаживаются и продлевают свою жизнь. Зимостойкий стрессоустойчивый вариант рабочей пчелы может выживать в течение 140–320 дней [228–233]. Различные классические гипотезы пытались объяснить эти паттерны дифференцированной защитой от опасностей, относящейся к разным работам, и стратегиями энергосбережения [231]. Однако около 20% рабочих особей доживают до возраста старения, что противоречит идее об эволюционной нейтральности старения пчел [234, 235]. Этот пример предельной пластичности демонстрирует кажущееся отсутствие жестких механистических ограничений, препятствующих эволюции долгой продолжительности жизни согласно гипотезе антагонистической плейотропии [6]. Модель одноразовой сомы [236] также не может объяснить эти

наблюдения. Ключевым элементом этой гипотезы – уровень питания – по-видимому, не играет большой роли в управлении заданным значением продолжительности жизни медоносных пчел. Так, трудно представить себе случай, когда воспроизводство нового рабочего может быть дешевле для улья, чем затраты на содержание старой особи.

Гипотеза контроля над патогенами предполагает, что старение в разных кастах определяется воздействием на них патогенов, их рисками передачи патогена другим членам колонии и их относительной ценностью для общей приспособленности улья. Матка проживает в улье, и стоимость ее приспособленности очень высока, а относительный пагубный эффект передачи патогена от матки к рабочим пчелам, вероятно, минимален. Пчелы, осуществляющие уход, также находятся внутри улья и не подвергаются воздействию патогенов. У пчел-собиралиц более высокий риск заражения, и они могут занести инфекцию внутрь колонии, что объясняет, почему распределение на работу по добыче пищи ограничивает продолжительность жизни.

Интересно, что ленточные черви способны увеличивать продолжительность жизни инфицированных рабочих особей муравьев, делая их такими же долгожителями, как и королевы [237], указывая на связь между продолжительностью жизни и защитой от патогенов.

Другим примером, связывающим долголетие и эусоциальность, являются виды землекопов, принадлежащие к роду *Fukomys*, группе подземных эусоциальных грызунов. Продолжительность жизни размножающихся особей у большинства видов землекопов существенно больше, чем у неразмножающихся животных, что напоминает ситуацию с эусоциальными насекомыми [224, 225].

Загадочным исключением является голый землекоп (*Heterocephalus glaber*), грызун размером с обыкновенную мышь, у которого после более чем 30 лет лабораторных исследований практически не наблюдалось увеличения смертности [44]. Считается, что все касты голых землекопов живут одинаково долго. Эта модель бросает вызов всем классическим эволюционным гипотезам старения, которые не могут объяснить столь экстремальное долголетие какими-либо экологическими факторами.

Гипотеза контроля над патогенами дает основу для объяснения этого явления, связывая уникальную продолжительность жизни голого землекопа со структурой эусоциальной популяции, которая не часто встречается у млекопитающих. Мы предполагаем, что

эусоциальность может позволить адаптивное самоубийство (феноптоз) как стратегию уничтожения патогенов в популяции [155, 238, 239]. Если зараженный рабочий немедленно после инфицирования погибает с помощью поведенческих или иммунных механизмов, это может принести пользу его генам, поскольку в этом случае воспроизводство отделено от инфекции. Такая адаптивная стратегия самоубийства может помочь сохранить колонию особей свободной от патогенов, делая старение излишним. Мало что известно об иммунной системе голых землекопов. Однако известно, что эти животные гиперчувствительны к вирусу простого герпеса [240] и некоторым бактериальным инфекциям [241, 242]. Кроме того, матки голых землекопов, по-видимому, менее восприимчивы к коронавирусу, чем не приносящие потомство особи [243], что согласуется с предсказаниями гипотезы контроля над патогенами. Секвенирование образцов иммунных клеток землекопа выявило потерю НК-клеток у этих животных [244]. Интересно, что иммунная депрессия (уменьшение количества иммунных клеток) также наблюдается у пчел при переходе к кормлению и восстанавливается, если пчелы-собиратели возвращаются к кормлению [245]. Будущие экспериментальные исследования должны изучить потенциальную связь между эусоциальностью, старением и феноптозом в ответ на инфекцию.

Омоложение и проблема симметрии. Старение традиционно считается необратимым однонаправленным процессом [246, 247]. Однако некоторые возрастные параметры можно обратить вспять с помощью фармакологических вмешательств [248], переливания крови [249, 250] или физических тренировок [251]. Замечательное проявление физиологического омоложения наблюдалось у пчел, перешедших от поиска пищи к уходу за личинками [245].

Отражают ли эти наблюдения системное омоложение? Случай, когда «омоложенное» старое животное становится функционально не отличимым от более молодой особи, несовместим с классическими господствующими гипотезами. Рассмотрим родительский организм, который производит генетически эквивалентную дочернюю особь (для простоты предположим клональное размножение), а затем подвергается омоложению. Теперь обе особи генетически и физиологически эквивалентны, имеют одни и те же внешние риски, обладают сходной фертильностью и одинаково ценны для процесса отбора. Ясно, что старение было бы в равной степени неадаптивным для обоих индивидов без каких-либо предпочтений

в отношении родителя (рис. 6). Потеря четкого определения времени в такой модели приводит к серьезному столкновению с классическими эволюционными гипотезами старения, поскольку и идея накопления повреждений, и формула «плати позже» требуют однонаправленной стрелки времени в качестве критического предположения.

В то же время само омоложение не противоречит ни современным знаниям из области биохимии (за исключением соматических мутаций, которыми мы можем пренебречь, если будем рассматривать короткоживущие виды), ни гипотезе контроля над патогенами. Действительно, вероятность заражения зависит от хронологического, а не биологического возраста, и оно может выступать в качестве параметра, отличающего омоложенного родителя от его потомства. Необходимы будущие эксперименты, чтобы определить, возможно ли всеобъемлющее омоложение или фенотипы, о которых сообщается, ограничены только некоторыми отдельными тканями. Если же истинное системное омоложение будет обнаруже-

но в какой-либо животной модели, то одного этого факта будет достаточно, чтобы заставить пересмотреть всю структуру господствующих эволюционных концепций старения.

Семелпарность и ускоренное старение. Семелпарность можно интерпретировать как крайнюю форму старения, быстро развивающуюся после размножения. Семелпарные виды встречаются во многих таксонах (например, рыбы [135], моллюски [132], насекомые [252], млекопитающие [253]). Экологические детерминанты семелпарности не совсем ясны. Некоторые авторы утверждают, что остаточная жизнь родителя может быть менее важна, чем увеличение числа потомков, и что чрезмерные затраты на воспроизводство потомства являются выгодными, даже если они приводят к смертельному истощению [131, 254]. Однако эта точка зрения не совсем убедительна, поскольку потомство обычно подвержено более высокой смертности в период роста и может не дожить до зрелого возраста, в то время как взрослые особи обычно лучше защищены. Более того, в некоторых случаях смерть родительских организмов, по-видимому, вызвана программой адаптивного развития, а не чрезмерными затратами на размножение. Например, хирургическое удаление зрительных желез у самок осьминогов предотвращает их суицидальное поведение и существенно увеличивает продолжительность жизни [132]. Стерилизация продлевает жизнь семелпарным тихоокеанским лососям [255]. У семелпарных видов лососевых рыб и сумчатых млекопитающих пострепродуктивная гибель связана с повышенным уровнем кортикоидов, что свидетельствует, скорее, о запрограммированном характере ускоренной смерти, а не смерти, вызванной истощением [256–258].

Эти наблюдения ясно указывают на то, что гибель индивида может быть адаптивной, по крайней мере при определенных условиях. Классические гипотезы обычно игнорируют эти факты (например, объявляя их не связанными со старением у итеропарных видов). Гипотеза контроля над патогенами объясняет разнообразие адаптивного сокращения продолжительности жизни. Мы предполагаем, что семелпарность – это адаптация, развившаяся для предотвращения передачи патогенов от поколения к поколению. Например, патогены могут стать серьезной проблемой в перенаселенных реках, где происходит нерест тихоокеанского лосося. В поддержку этой концепции сообщалось также о влиянии патогенов на жизненный цикл семелпарных сумчатых [259].

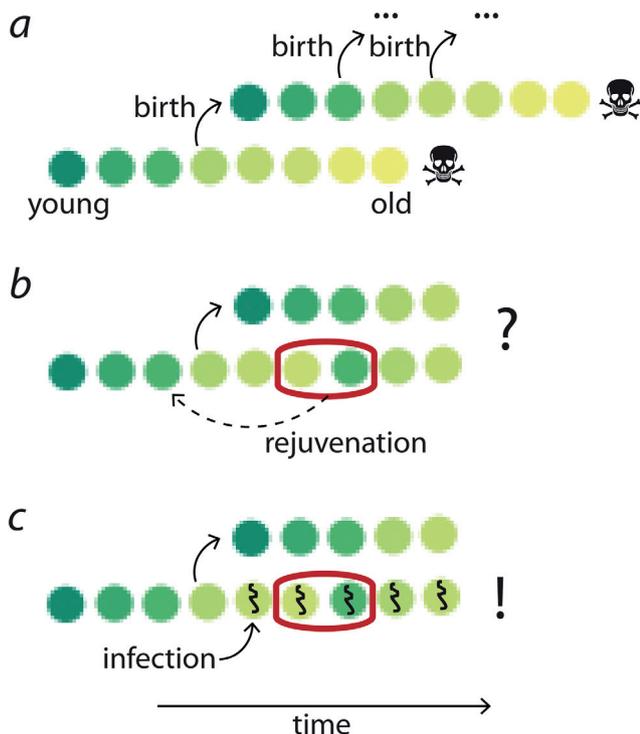


Рис. 6. Омоложение предоставляет возможность для критической полемики с классическими гипотезами. *a* – Старение при отсутствии омоложения. *b* – Возможность омоложения приводит к симметрии между родительским и дочерним организмом, что делает старение невозможным. *c* – Инфекционные болезни (черные черви) возвращают асимметрию даже в системах с омоложением, так как вероятность заражения зависит от хронологического, а не физиологического возраста

ПРОВЕРЯЕМЫЕ ПРЕДСКАЗАНИЯ

Будущее моделирование и эмпирическая работа должны проверить предсказания гипотезы контроля над патогенами. В связи с этим мы очерчиваем три основных направления предлагаемого исследования.

Взаимодействие между старением и иммунитетом. Во-первых, представленные к настоящему времени модели не включают иммунную систему и ее взаимодействие со старением. Однако, если мы предположим, что старение является частью иммунного ответа, то можем ожидать обнаружение значительных перекрестных связей между этими системами. Старение связано с вялотекущими, хроническими воспалительными процессами [260, 261], а хроническая активация иммунной системы приводит к сокращению продолжительности жизни в экспериментальных условиях [215, 262] и к ускорению старения у пациентов [263, 264]. Это отличает хроническую инфекцию от других легких стрессоров, которые обычно, напротив, снижают скорость старения и увеличивают продолжительность жизни [209–211]. Отдельные случаи, когда патогены продлевают жизнь, описаны у эусоциальных [237] и семелпарных видов [265].

Эволюционная интерпретация ускоренного старения из-за хронической инфекции может быть двойкой. Классическая гипотеза предполагает, что это происходит из-за распределения ресурсов на развертывание иммунного ответа за счет систем поддержания организма [266]. Гипотеза контроля над патогенами предсказывает, что условное сокращение продолжительности жизни за счет активации иммунной системы является адаптивным механизмом управления продолжительностью жизни, защищающим родственников индивида (рукопись в процессе подготовки). Для проверки этих двух предсказаний нужно определить, может ли развертывание системы иммунной защиты в ответ на патогенный стимул быть механически не связанным со снижением продолжительности жизни (например, за счет генетических мутаций или других вмешательств). Если это так, то это был бы сильный аргумент в пользу гипотезы контроля над патогенами. Такие эксперименты могут также дать представление о механизмах старения и его связи с иммунитетом.

Структура инфекционных сетей. Гипотеза контроля патогенов предсказывает, что эволюция продолжительности жизни зависит от структуры контактных сетей, которые определяют пути передачи патогенов. Если сети

ориентированы на взаимодействие между родственными особями, это будет способствовать эволюции более короткой продолжительности жизни. В случае более беспорядочных хаотических взаимодействий предпочтение отдается более длительной продолжительности жизни. Проверка этого предсказания на долгоживущих и короткоживущих видах должна стать хорошей проверкой гипотезы. Виды с необычной структурой популяции и аномальной продолжительностью жизни, такие как эусоциальные насекомые и грызуны, летучие мыши и проходные виды рыб, необходимо изучить с помощью моделирования и экологических исследований.

Обилие патогенов и ассоциированные с инфекцией затраты. Изменчивость патогенов является важным допущением гипотезы контроля над патогенами. Было предложено два общих сценария отбора. Один сценарий предполагает зоонозную передачу нового патогена. Следовательно, животные из богатых биотопов, подвергшиеся воздействию патогенов, представляющих различные родственные виды, должны испытывать более сильное давление отбора в сторону более короткой продолжительности жизни. Низкая численность патогенов должна ослабить процесс отбора в сторону более короткой продолжительности жизни. В хорошем соответствии с этими ожиданиями некоторые хорошо известные долгоживущие виды (например, гренландский кит *Balaena mysticetus* [267], гренландская акула *Somniosus microcephalus* [268], моллюск *Arctica islandica* [269] и протей *Proteus anguinus* [40]) встречаются в абиотической арктической или пещерной среде. Однако эту корреляцию можно также объяснить экологической адаптацией к низкой плодовитости, возникающей в результате ограниченности питания.

Второй сценарий предполагает совместное инфицирование несколькими легкими патогенами, что приводит к стерилизации за счет кумулятивного эффекта (рис. 4, *h*) [36].

Осуществимость этих двух сценариев можно исследовать в естественных или лабораторных популяциях путем изучения распространенности патогенов, зоонозных передач, коинфекции и стерилизации, вызванной инфекцией.

Проблемы гипотезы старения, основанной на контроле над патогенами. До сих пор мы сравнивали гипотезу контроля над патогенами с классическими теориями. На текущем этапе развития борьба с патогенами объясняет большую часть наблюдений, связанных со старением, и является более экономной с точки зрения необходимых предположений.

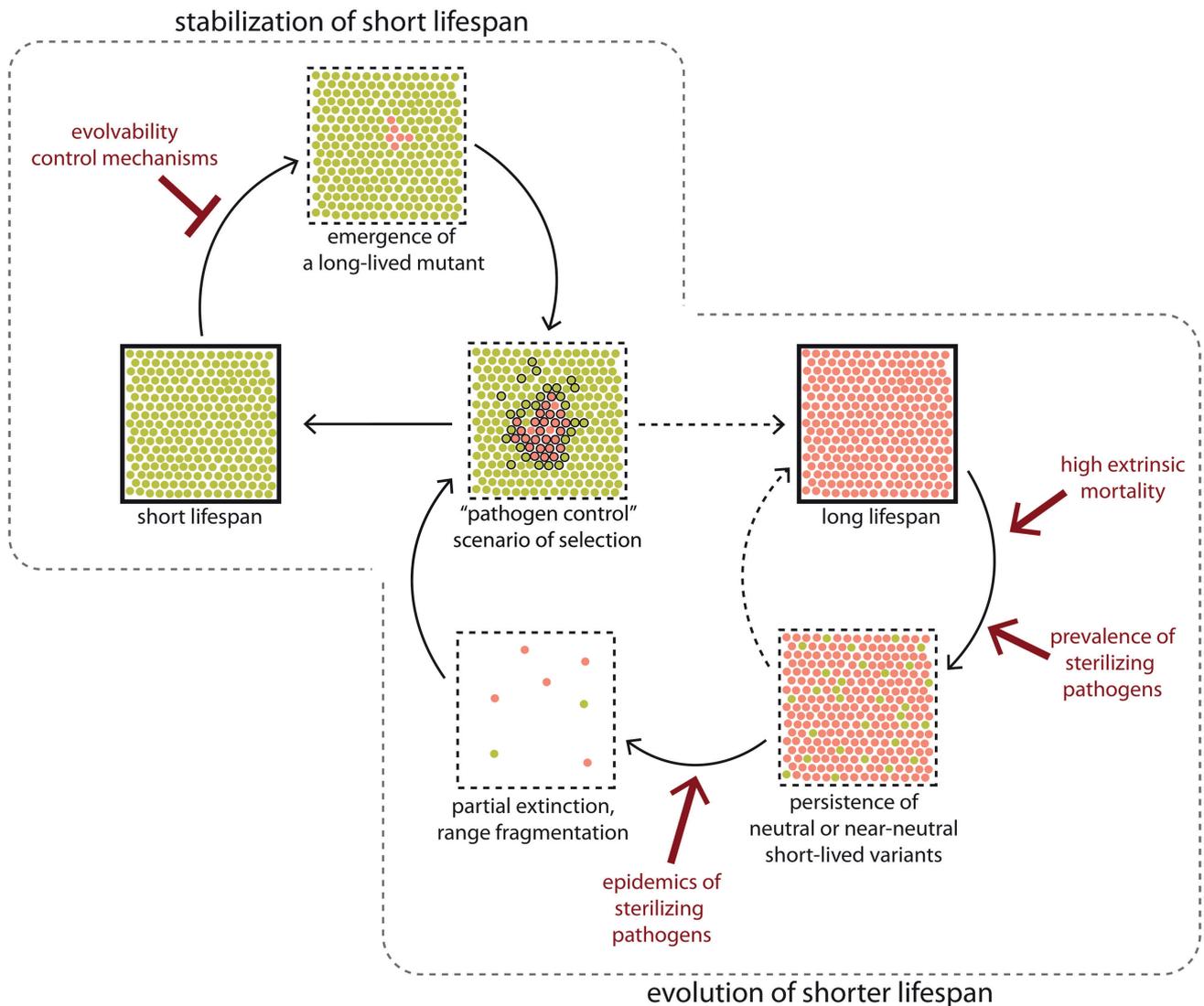


Рис. 7. Отбор, стабилизирующий меньшую продолжительность жизни, и возможный эволюционный сценарий сокращения продолжительности жизни. Механизм стабилизирующего отбора, описанный на рис. 4, *f*, схематично изображен в левом верхнем углу. В правом нижнем углу показан потенциальный сценарий развития более короткой продолжительности жизни в популяции, где изначально преобладает более длительная продолжительность жизни. Короткоживущие варианты сохраняются в такой популяции в условиях высокой внешней смертности и/или преобладания стерилизующих возбудителей. Если впоследствии такая смешанная популяция подвергается резкому сокращению численности (например, из-за эпидемий венерических заболеваний, приводящих к стерилизации особей), фрагментация ареала приводит к возникновению субпопуляций с высоким эффектом основателя. Таким образом, могут возникать чистые популяции короткоживущих особей, приближая модель к сценарию конкуренции, описанному на рис. 4, *f*

Тем не менее некоторые вопросы остаются неразрешенными. Во-первых, это числовые оценки параметров эпидемиологической и популяционной динамики, которые могут повлиять на эволюцию продолжительности жизни. Обилие патогенов в природе и их способность снижать плодовитость инфицированных животных хорошо известны [154]. Однако необходимы дополнительные исследования для эмпирической оценки этих параметров в популяциях диких животных. То же самое от-

носится и к «вязкости» популяции: хотя ясно, что расселение животных ограничено законами физики, а территориальное поведение является почти универсальным признаком [270], точные числовые оценки и влияние семейной и социальной структуры на формирование обусловленной родственными связями специфичности инфекционных сетей еще предстоит определить.

Во-вторых, описанный сценарий отбора объясняет предотвращение появления долго-

живущих вариантов в существовавшей ранее популяции короткоживущих особей [36]. Однако эволюция более короткой продолжительности жизни от долгоживущих предков требует дополнительных условий. Ключевым требованием является необходимость образования изначальной субпопуляции «чистых» короткоживущих особей, которые могут извлечь выгоду из низкой распространенности патогена и обеспечить достаточное популяционное давление для их дальнейшего расширения (рис. 7).

Можно предположить несколько сценариев эволюции более короткой продолжительности жизни, но самый простой из них предполагает накопление короткоживущих вариантов в популяции с очень высокой внешней смертностью (нейтральное старение) с последующим катастрофическим сокращением плотности популяции, фрагментацией ареалов и появлением пятен с высокими эффектами основателя (рис. 7). Таким образом, сценарии установления ограниченной продолжительности жизни предполагаются более требовательными (рис. 7), чем сценарий стабилизации. Однако продолжительность жизни коррелирует с размерами тела [8], а размеры тела животных в основном эволюционируют в сторону их увеличения, согласно правилу Коупа (Cope's rule) [271]. Следовательно, эволюция более короткой продолжительности жизни ожидается нечастой, и дисбаланс между требованиями двух сценариев отбора не является критическим для объяснительной силы гипотезы (таблица).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как обсуждалось выше, основные эволюционные гипотезы старения, несмотря на долгую историю исследований, остаются спорными. Эти классические гипотезы основаны на концепциях плейотропных генов или недостаточного инвестирования в поддержание организма в качестве энергосберегающей стратегии и не вполне согласуются с современной молекулярной генетикой и биохимией. Старение не является универсальным процессом, и оно протекает по-разному у различных видов, и эта изменчивость лишь слабо объясняется классическими гипотезами. Основные предсказания классических гипотез не оправдались: внешняя смертность не формирует эво-

люцию старения; соотношение плодовитости и долголетия может быть разобщено. Старение демонстрирует неожиданную пластичность в зависимости от окружающей среды. При наличии такой пластичности реакции, предсказанные классическими гипотезами, не наблюдаются.

Недавно предложенная гипотеза о контроле над патогенами является более экономной с точки зрения допущений и более убедительной, чем основные гипотезы старения. Она основывается на положениях (вязкость популяции и хронические стерилизующие инфекции), хорошо принятых в области популяционной динамики и паразитологии. Она обеспечивает целенаправленные и четкие прогнозы. В частности, эта гипотеза дает потенциальное объяснение очевидной механистической связи между старением и иммунитетом [261]. Более того, основополагающие элементы господствующих гипотез, плейотропные гены и компромисс между плодовитостью и долголетием, можно объяснить с помощью эпидемиологических моделей. Мы утверждаем, что гипотеза контроля над патогенами должна рассматриваться экспериментаторами и эволюционными биологами как одна из основных концепций эволюции старения.

Наша модель предполагает, что старение может быть эволюционной адаптацией, что игнорируется большинством исследователей в этой области. Если эта гипотеза подтвердится, то она должна существенно изменить подход к биологии старения.

Вклад авторов. ПВЛ – исходная концепция работы; ПВЛ, ЦЮ, ЖР, РА – обсуждение и доработка; ЦЮ – сбор данных для таблицы S1 Приложения; ПВЛ, ЖР, РА – написание манускрипта; РА – финансирование работы.

Финансирование. Работа была поддержана грантами NIH R01AI137471 и грантом программы стимулирования долголетия, предоставленного РА.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Данная статья не содержит описания исследований с участием человека или лабораторных животных.

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте издательства Springer (www.springer.com/journal/10541), том 87, вып. 12, 2022.

Сравнение различных гипотез старения

		Накопление повреждений	Антагонистическая плейотропия	Одноразовая сома	Контроль над патогенами
Ключевые предпосылки		старение основано на базовых биохимических процессах	плейтропные гены	поддержание требует больших затрат	вязкость популяции
			сила отбора с возрастом снижается	размножение предпочтительнее долголетия	распространенность хронических патогенов, вызывающих бесплодие
Наблюдения, связанные со старением	Универсальность старения	фундаментальная биохимия универсальна	универсальные факторы не предусмотрены	истощающее размножение не является универсальным	патогены являются универсальным фактором отбора
	В диких популяциях старение оказывает влияние на приспособленность	должен быть выработан более лучший контроль повреждений, если старение подвергается отбору	благоприятное влияние плейтропных генов компенсирует потери	более высокая плодовитость компенсирует потери	старение – это эволюционная адаптация, ослабляющая действие эпидемий
	Межвидовая изменчивость	невозможно объяснить различия скоростей старения	различный баланс преимуществ, обеспечиваемый плейтропными генами	различный вклад в размножение	виды различаются по структуре популяции и составу патогенов
	Задетствованные консервативные генетические пути	не ожидается, что старение находится под строгим контролем	предполагает множественные и хаотичные эффекты плейтропных генов	консервативные пути контролируют способы, которыми организмы распределяют ресурсы	старение является адаптацией, задействующей консервативные пути
	Бессмертие у примитивных многоклеточных организмов ^a	согласно теориям накопления повреждений, бессмертие невозможно	бессмертие существует в тех случаях, когда размножение нельзя разобщить с регенерацией; бессмертие сопровождается некоторыми вредными побочными эффектами, специфичными для каждой их гипотез		
	Индивидуальные генетические мутации влияют на темпы старения	не ожидается сильного влияния одиночной мутации на основные биохимические процессы	мутация в отдельном плейтропном гене вряд ли вызовет значительный эффект	изменение баланса энергетических вкладов	скорость адаптивного старения находится под контролем развития
	Биологически бессмертные мутанты у высших животных отсутствуют	базовая биохимия генетически стабильна	не исключены бессмертные мутанты		супрессоры эволюционирования
	Виды с большими размерами тела живут дольше ^b	для роста и развития крупного организма необходимо время			
	Медленный рост коррелирует с долголетием в индивидуальной истории жизни ^b	нет хороших объяснений			«таймер» старения зависит от скорости роста

Таблица (продолжение)

	Накопление повреждений	Антагонистическая плейотропия	Одноразовая сома	Контроль над патогенами	
Наблюдения, связанные со старением	Ограничение калорий и мягкие стрессоры продлевают жизнь	почему существующая программа продления жизни не активируется в условиях, которые «лучше, чем оптимальные»?			баланс между эпидемиологическими рисками и выживанием
	Корреляция между плодовитостью и долголетием, выявляемый при сравнении различных видов ^d	нет хорошего объяснения	противоположные эффекты плейотропных генов	равновесие между вкладом в размножение и поддержанием	продолжительность жизни и размножение уравнивают друг друга, когда влияют на демографические нагрузки
	Отсутствие корреляции между плодовитостью и продолжительностью жизни на индивидуальном уровне ^d	объяснения не требуются		противоречие	индивидуальная история жизни менее критична для отбора на продолжительность жизни
	Корреляция между скоростью метаболизма и продолжительностью жизни у животных-мутантов ^e	более быстрое накопление повреждений	нет хорошего объяснения	более крупные вклады в размножение, более дорогое поддержание	скорость метаболизма взаимодействует с «таймером» адаптивного старения
	Слабая экологическая корреляция между скоростью метаболизма и долголетием ^e	более быстрый метаболизм должен привести к большему накоплению повреждений	объяснения не требуются		скорость метаболизма не является необходимым фактором в эпидемиологических моделях
	Летающие животные живут дольше	объяснения неудовлетворительны, поскольку птицы и летучие мыши часто гибнут от внешних факторов; независимая от возраста смертность не влияет на эволюцию старения			предсказание: низкая вязкость популяции ^f
	Различия темпов старения у изоформ развития ^g	нет объяснения пластичности	нет хорошего объяснения	во многих случаях энергия вряд ли будет задействована	баланс между эпидемиологическими рисками и выживанием
	Долголетие королев в эусоциальных видах	нет объяснения пластичности	нет хорошего объяснения		предсказание: низкий эпидемиологический риск ^h
	Голый землекоп (<i>Heterocephalus glaber</i>)	не было предложено экологических детерминант для бессмертия голого землекопа			предсказание: адаптивное самоубийство ⁱ
	Семелпарность ^j	обычно семелпарность рассматривают за рамками старения			предсказание: сниженная вертикальная трансмиссия

Таблица (окончание)

	Накопление повреждений	Антагонистическая плейотропия	Одноразовая сома	Контроль над патогенами
Ключевые предсказания	низкая пластичность старения, специфичные механистические детали в зависимости от гипотезы	множественные компромиссы между долголетием и жизненно важными функциями	уровень питания как ключевой регулятор долголетия	корреляция с воздействием патогенов и бесплодием в результате болезни
		множественность и изменчивость механизмов старения	компромисс между плодовитостью и долголетием не может быть нарушен	корреляция между долголетием и структурой популяции
				механистические связи между старением и иммунитетом
Не рассмотренные выше проблемы, связанные с гипотезами	повреждение, ответственное за старение, должно быть идентифицировано	нет реалистичных примеров плейотропных генов	не работает в стагнантных популяциях; в растущих популяциях вступает в противоречие с избытком ресурсов	должен быть установлен точный сценарий укорочения продолжительности жизни ^k
			должны быть определены затраты на поддержание организма	распространенность болезней, вызывающих бесплодие, должна быть эмпирически подтверждена
			самцы стареют быстрее, при этом внося меньший вклад в воспроизводство потомства	числовые оценки вязкости популяции должны быть найдены эмпирически

Примечание. Воспроизведено с разрешения из [37]. Зеленые ячейки содержат аргументы в поддержку, красные – противоречия, желтые – предсказания.

^a Некоторые виды беспозвоночных (например, плоские черви *Schmidtea mediterranea* [273] и кишечнополостные *Hydra vulgaris* [38]) биологически бессмертны.

^b Размер тела данного вида коррелирует с долголетием: более крупные животные живут дольше [182, 218]. Как это ни парадоксально, мутантные варианты с меньшими размерами тела часто имеют большую продолжительность жизни у домашних собак (*Canis lupus familiaris*) [185], людей [187] и модельных животных [183].

^c Гипотеза контроля патогенов предполагает, что популяционное давление является ключевым элементом отбора продолжительности жизни. Голод одновременно подавляет размножение всех членов популяции и может приостановить или задержать процесс отбора. Таким образом, замедление старения во время голода может быть разумной стратегией выживания.

^d Продолжительность жизни обратно пропорциональна плодовитости у разных видов: виды с высокой плодовитостью обычно живут недолго [182]. Однако продолжительность жизни конкретной особи во многих случаях не зависит от истории ее воспроизводства [274]. Долгоживущие мутанты могут обладать высокой фертильностью [207], а королевы эусоциальных животных – быть долгоживущими и плодовитыми [275]. Следовательно, этот компромисс можно нарушить, предполагая, что его формируют экологические, а не физиологические факторы.

^e При изучении модельных животных выяснено, что скорость метаболизма влияет на продолжительность жизни. Так, мутантные варианты с более низкой скоростью метаболизма стареют медленнее [200]. Это также может коррелировать с продолжительностью жизни различных видов. Однако эта корреляция исчезает, если исключить из анализа влияние фактора размера тела [182]. У летающих птиц очень высокая скорость метаболизма и большая продолжительность жизни. Нелетающие птицы имеют короткую продолжительность жизни и более низкую скорость метаболизма [182, 218]. Таким образом, продолжительность жизни и обмен веществ, по-видимому, эволюционируют независимо.

^f Расселение летающих животных на более протяженных расстояниях может способствовать их более интенсивному перемешиванию в сравнении с популяциями наземных видов [276]. Если происходит беспорядочное взаимодействие индивидов, тогда гипотеза контроля над патогенами предсказывает эволюцию увеличения продолжительности жизни.

^s В качестве примера можно привести репродуктивную диапаузу у бабочек-монархов (*Danaus plexippus*): продолжительность жизни зимующих мигрирующих форм может быть в 5–6 раз больше, чем у дачных взрослых особей [277].

^b Эпидемический контроль, обусловленный короткой продолжительностью жизни рабочих особей, сочетается с преимуществом в приспособленности за счет продолжительного периода воспроизводства маток. Рассмотрим инфекционный агент со скоростью передачи $\beta = 1$ в месяц. Он не может размножаться в колонии эусоциальных животных с продолжительностью жизни $A < 2$ месяцев, поскольку каждый зараженный хозяин заражает менее одного восприимчивого животного: $R_0 < A\beta/2$. Долгая продолжительность жизни маток обеспечивает селективные преимущества из-за продолжительного периода воспроизводства, тогда как защита от болезней, обеспечиваемая более короткой продолжительностью жизни неразмножающихся особей, остается активной. Матки обычно живут внутри колонии и изолированы от загрязнений окружающей среды, что снижает вероятность того, что первоначальная инфекция поразит самого производителя.

ⁱ Как у размножающихся, так и у неразмножающихся голых землекопов старение, по-видимому, незначительно, что ставит под сомнение общие взгляды на старение [176]. Гипотеза контроля над патогенами дает потенциальное объяснение. Если особи будут немедленно умирать в ответ на каждый патоген, что предотвратит его распространение, популяция может поддерживать нулевую патогенную нагрузку, делая старение излишним. Эусоциальность может способствовать развитию этой фенотипической стратегии: инфицированные неразмножающиеся индивиды могут подвергнуться запрограммированной смерти, чтобы защитить репродуктивную способность королевы. Действительно, были высказаны предположения, что эти животные гиперчувствительны к инфекциям [66] и лишены натуральных киллеров [244]. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы точно проверить это предсказание.

^j Некоторые животные погибают сразу после размножения. Семелпарность можно рассматривать как крайний случай компромисса между плодовитостью и долголетием [131]. В некоторых случаях смерть родителя, по-видимому, имеет запрограммированный компонент и не происходит исключительно из-за истощения [278]. Экологическая роль такой запрограммированной смерти плохо изучена. Гипотеза контроля над патогенами предполагает, что семелпарность эволюционировала для предотвращения передачи болезней от родителей к потомству.

^k Проведенные исследования могут объяснить эволюционную стабильность ограниченной продолжительности жизни и препятствование вторжению долгоживущих мутантов [36]. Однако эволюция более короткой продолжительности жизни из долгоживущего варианта требует дополнительных условий. Короткоживущие особи должны сначала накапливаться локально, чтобы воспользоваться их основным на альтруизме механизмом инфекционного контроля. Такие сценарии могут быть осуществимы в эпидемиологических моделях, но пока еще не изучены. Однако эта проблема несущественная: в процессе эволюции размеры тела млекопитающих преимущественно увеличиваются (правило Коупа) [271]. Поскольку размер тела коррелирует с долголетием, продолжительность жизни должна уменьшаться только в редких случаях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Weismann, A. (1891) *Essays Upon Heredity and Kindred Biological Problems*, Clarendon Press, Oxford.
- Fisher, R. A. (1930) The genetical theory of natural selection, doi: 10.5962/bhl.title.27468.
- Medawar, P. B. (1952) *An Unsolved Problem of Biology: An Inaugural Lecture Delivered at University College, London, 6 December, 1951*.
- Haldane, J. B. S. (1942) *New Paths in Genetics*, Harper & Brothers, NY & London.
- Hamilton, W. D. (1966) The moulding of senescence by natural selection, *J. Theor. Biol.*, **12**, 12–45, doi: 10.1016/0022-5193(66)90184-6.
- Williams, G. C. (1957) Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence, *Evolution*, **11**, 398, doi: 10.2307/2406060.
- Kirkwood, T. B., and Holliday, R. (1979) The evolution of ageing and longevity, *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **205**, 531–546, doi: 10.1098/rspb.1979.0083.
- Lindstedt, S. L., and Calder, W. A. (1981) Body size, physiological time, and longevity of homeothermic animals, *Quart. Rev. Biol.*, **56**, 1–16, doi: 10.1086/412080.
- Ricklefs, R. E. (2010) Life-history connections to rates of aging in terrestrial vertebrates, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 10314–10319, doi: 10.1073/pnas.1005862107.
- Orgel, L. E. (1963) The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **49**, 517–521, doi: 10.1073/pnas.49.4.517.
- Harman, D. (1962) Role of free radicals in mutation, cancer, aging, and the maintenance of life, *Radiat. Res.*, **16**, 753–763.
- Bjorksten, J. (1968) The crosslinkage theory of aging, *J. Am. Geriatr. Soc.*, **16**, 408–427, doi: 10.1111/j.1532-5415.1968.tb02821.x.
- Gavrilov, L. A., and Gavrilova, N. S. (2001) The reliability theory of aging and longevity, *J. Theor. Biol.*, **213**, 527–545, doi: 10.1006/jtbi.2001.2430.
- Curtis, H. J. (1965) The somatic mutation theory of aging, *Contribut. Psychobiol. Aging*, 69–80, doi: 10.1007/978-3-662-39847-0_6.
- Gershon, D. (1999) The mitochondrial theory of aging: is the culprit a faulty disposal system rather than indigenous mitochondrial alterations? *Exp. Gerontol.*, **34**, 613–619, doi: 10.1016/s0531-5565(99)00010-8.
- Kowald, A. (1999) The mitochondrial theory of aging: do damaged mitochondria accumulate by delayed degradation? *Exp. Gerontol.*, **34**, 605–612, doi: 10.1016/s0531-5565(99)00011-x.
- Terman, A. (2001) Garbage catastrophe theory of aging: imperfect removal of oxidative damage? *Redox Rep.*, **6**, 15–26, doi: 10.1179/135100001101535996.

18. Gladyshev, V. N. (2016) Aging: progressive decline in fitness due to the rising deleteriome adjusted by genetic, environmental, and stochastic processes, *Aging Cell*, **15**, 594-602, doi: 10.1111/ace1.12480.
19. Vijg, J. (2020) Loss of gene coordination as a stochastic cause of ageing, *Nat. Metab.*, **2**, 1188-1189, doi: 10.1038/s42255-020-00295-2.
20. Larsson, N.-G. (2010) Somatic mitochondrial DNA mutations in mammalian aging, *Annu. Rev. Biochem.*, **79**, 683-706, doi: 10.1146/annurev-biochem-060408-093701.
21. Murray, V. (1990) Are transposons a cause of ageing? *Mutat. Res.*, **237**, 59-63, doi: 10.1016/0921-8734(90)90011-f.
22. Nelson, P., and Masel, J. (2017) Intercellular competition and the inevitability of multicellular aging, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 12982-12987, doi: 10.1073/pnas.1618854114.
23. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G. (2013) The hallmarks of aging, *Cell*, **153**, 1194-1217, doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039.
24. Gems, D., and de Magalhães, J. P. (2021) The hoverfly and the wasp: A critique of the hallmarks of aging as a paradigm, *Ageing Res. Rev.*, **70**, 101407, doi: 10.1016/j.arr.2021.101407.
25. Cohen, A. A., Ferrucci, L., Fülöp, T., Gravel, D., Hao, N., Kriete, A., Levine, M. E., Lipsitz, L. A., Olde Rikkert, M. G. M., Rutenberg, A., Stroustrup, N., and Varadhan, R. (2022) A complex systems approach to aging biology, *Nat. Aging*, **2**, 580-591, doi: 10.1038/s43587-022-00252-6.
26. Hirsch, H. R. (1987) Why should senescence evolve? An answer based on a simple demographic model, *Evol. Longev. Anim.*, 75-90, doi: 10.1007/978-1-4613-1939-9_5.
27. Travis, J. M. J. (2004) The evolution of programmed death in a spatially structured population, *J. Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **59**, B301-B305, doi: 10.1093/gerona/59.4.b301.
28. Mitteldorf, J. J. (2012) Demographic evidence for adaptive theories of aging, *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 726-728, doi: 10.1134/s0006297912070048.
29. Mitteldorf, J. (2017) *Aging is a Group-Selected Adaptation: Theory, Evidence, and Medical Implications*, CRC Press, doi: 10.1201/9781315371214.
30. Werfel, J., Ingber, D. E., and Bar-Yam, Y. (2015) Programed death is favored by natural selection in spatial systems, *Phys. Rev. Lett.*, **114**, 238103, doi: 10.1103/PhysRevLett.114.238103.
31. Goldsmith, T. C. (2008) Aging, evolvability, and the individual benefit requirement; medical implications of aging theory controversies, *J. Theor. Biol.*, **252**, 764-768, doi: 10.1016/j.jtbi.2008.02.035.
32. Skulachev, V. P. (1997) Aging is a specific biological function rather than the result of a disorder in complex living systems: biochemical evidence in support of Weismann's hypothesis, *Biochemistry*, **62**, 1191-1195.
33. Martins, A. C. R. (2011) Change and aging senescence as an adaptation, *PLoS One*, **6**, e24328, doi: 10.1371/journal.pone.0024328.
34. Kirchner, J. W., and Roy, B. A. (1999) The evolutionary advantages of dying young: epidemiological implications of longevity in metapopulations, *Am. Nat.*, **154**, 140, doi: 10.2307/2463908.
35. Mitteldorf, J., and Pepper, J. (2009) Senescence as an adaptation to limit the spread of disease, *J. Theor. Biol.*, **260**, 186-195, doi: 10.1016/j.jtbi.2009.05.013.
36. Lidsky, P. V., and Andino, R. (2020) Epidemics as an adaptive driving force determining lifespan setpoints, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 17937-17948, doi: 10.1073/pnas.1920988117.
37. Lidsky, P. V., and Andino, R. (2022) Could aging evolve as a pathogen control strategy? *Trends Ecol. Evol.*, doi: 10.1016/j.tree.2022.08.003.
38. Martínez, D. E. (1998) Mortality patterns suggest lack of senescence in hydra, *Exp. Gerontol.*, **33**, 217-225, doi: 10.1016/s0531-5565(97)00113-7.
39. Piraino, S., Boero, F., Aeschbach, B., and Schmid, V. (1996) Reversing the life cycle: medusae transforming into polyps and cell transdifferentiation in *Turritopsis nutricula* (Cnidaria, Hydrozoa), *Biol. Bull.*, **190**, 302-312, doi: 10.2307/1543022.
40. Voituron, Y., de Fraipont, M., Issartel, J., Guillaume, O., and Clobert, J. (2011) Extreme lifespan of the human fish (*Proteus anguinus*): a challenge for ageing mechanisms, *Biol. Lett.*, **7**, 105-107, doi: 10.1098/rsbl.2010.0539.
41. Congdon, J. D., Nagle, R. D., Kinney, O. M., and van Loben Sels, R. C. (2001) Hypotheses of aging in a long-lived vertebrate, Blanding's turtle (*Emydoidea blandingii*), *Exp. Gerontol.*, **36**, 813-827, doi: 10.1016/s0531-5565(00)00242-4.
42. Miller, J. K. (2001) Escaping senescence: demographic data from the three-toed box turtle (*Terrapene carolina triunguis*), *Exp. Gerontol.*, **36**, 829-832, doi: 10.1016/s0531-5565(00)00243-6.
43. Cailliet, G. M., Andrews, A. H., Burton, E. J., Watters, D. L., Kline, D. E., and Ferry-Graham, L. A. (2001) Age determination and validation studies of marine fishes: do deep-dwellers live longer? *Exp. Gerontol.*, **36**, 739-764, doi: 10.1016/s0531-5565(00)00239-4.
44. Buffenstein, R. (2008) Negligible senescence in the longest living rodent, the naked mole-rat: insights from a successfully aging species, *J. Comp. Physiol. B*, **178**, 439-445, doi: 10.1007/s00360-007-0237-5.
45. Idda, M. L., McClusky, W. G., Lodde, V., Munk, R., Abdelmohsen, K., Rossi, M., and Gorospe, M. (2020) Survey of senescent cell markers with age in human tissues, *Aging*, **12**, 4052-4066, doi: 10.18632/aging.102903.
46. Olivetti, G., Melissari, M., Capasso, J. M., and Anversa, P. (1991) Cardiomyopathy of the aging human heart. Myocyte loss and reactive cellular hypertrophy, *Circ. Res.*, **68**, 1560-1568, doi: 10.1161/01.res.68.6.1560.

47. Chien, K. R., and Karsenty, G. (2005) Longevity and lineages: toward the integrative biology of degenerative diseases in heart, muscle, and bone, *Cell*, **120**, 533-544, doi: 10.1016/j.cell.2005.02.006.
48. Peto, R. (2016) Epidemiology, multistage models, and short-term mutagenicity tests, *Int. J. Epidemiol.*, **45**, 621-637, doi: 10.1093/ije/dyv199.
49. Tian, X., Azpurua, J., Ke, Z., Augereau, A., Zhang, Z. D., Vijg, J., Gladyshev, V. N., Gorbunova, V., and Seluanov, A. (2015) INK4 locus of the tumor-resistant rodent, the naked mole rat, expresses a functional p15/p16 hybrid isoform, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 1053-1058, doi: 10.1073/pnas.1418203112.
50. Seluanov, A., Gladyshev, V. N., Vijg, J., and Gorbunova, V. (2018) Mechanisms of cancer resistance in long-lived mammals, *Nat. Rev. Cancer*, **18**, 433-441, doi: 10.1038/s41568-018-0004-9.
51. Hiatt, H. H., Watson, J. D., and Winsten, J. A. (1977) *Origins of Human Cancer*, Cold Spring Harbor Laboratory, UK.
52. Tacutu, R., Thornton, D., Johnson, E., Budovsky, A., Barardo, D., Craig, T., Diana, E., Lehmann, G., Toren, D., Wang, J., Fraifeld, V. E., and de Magalhães, J. P. (2018) Human Ageing Genomic Resources: new and updated databases, *Nucleic Acids Res.*, **46**, D1083-D1090, doi: 10.1093/nar/gkx1042.
53. Holmes, D. J., and Austad, S. N. (1994) Fly now, die later: life-history correlates of gliding and flying in mammals, *J. Mammal.*, **75**, 224-226, doi: 10.2307/1382255.
54. Blagosklonny, M. V. (2013) Aging is not programmed, *Cell Cycle*, **12**, 3736-3742, doi: 10.4161/cc.27188.
55. Lee, A. T., and Cerami, A. (1992) Role of glycation in aging, *Ann. NY Acad. Sci.*, **663**, 63-70, doi: 10.1111/j.1749-6632.1992.tb38649.x.
56. Blackburn, E. H., Greider, C. W., and Szostak, J. W. (2006) Telomeres and telomerase: the path from maize, *Tetrahymena* and yeast to human cancer and aging, *Nat. Med.*, **12**, 1133-1138, doi: 10.1038/nm1006-1133.
57. Gensler, H. L., and Bernstein, H. (1981) DNA Damage as the primary cause of aging, *Quart. Rev. Biol.*, **56**, 279-303, doi: 10.1086/412317.
58. Valdesalici, S., and Cellerino, A. (2003) Extremely short lifespan in the annual fish *Nothobranchius furzeri*, *Proc. Biol. Sci.*, **270 Suppl 2**, S189-S191, doi: 10.1098/rsbl.2003.0048.
59. Tatar, M., Gray, D. W., and Carey, J. R. (1997) Altitudinal variation for senescence in *Melanoplus grasshoppers*, *Oecologia*, **111**, 357-364, doi: 10.1007/s004420050246.
60. Bertrand, H., S. Chan, B. S., and Griffiths, A. J. F. (1985) Insertion of a foreign nucleotide sequence into mitochondrial DNA causes senescence in neurospora intermedia, *Cell*, **41**, 877-884, doi: 10.1016/s0092-8674(85)80068-4.
61. Nussey, D. H., Froy, H., Lemaître, J.-F., Gaillard, J.-M., and Austad, S. N. (2013) Senescence in natural populations of animals: widespread evidence and its implications for bio-gerontology, *Ageing Res. Rev.*, **12**, 214-225, doi: 10.1016/j.arr.2012.07.004.
62. Jones, O. R., Scheuerlein, A., Salguero-Gómez, R., Camarda, C. G., Schaible, R., Casper, B. B., Dahlgren, J. P., Ehrlén, J., García, M. B., Menges, E. S., Quintana-Ascencio, P. F., Caswell, H., Baudisch, A., and Vaupel, J. W. (2014) Diversity of ageing across the tree of life, *Nature*, **505**, 169-173, doi: 10.1038/nature12789.
63. Caswell, H., and Shyu, E. (2017) Senescence, Selection Gradients and Mortality, in *The Evolution of Senescence in the Tree of Life*, Cambridge University Press, pp. 56-82, doi: 10.1017/9781139939867.004.
64. Caswell, H. (2007) Extrinsic mortality and the evolution of senescence, *Trends Ecol. Evol.*, **22**, 173-174, doi: 10.1016/j.tree.2007.01.006.
65. Day, T., and Abrams, P. A. (2020) Density dependence, senescence, and Williams' hypothesis, *Trends Ecol. Evol.*, **35**, 300-302, doi: 10.1016/j.tree.2019.11.005.
66. Moorad, J., Promislow, D., and Silvertown, J. (2020) Williams' intuition about extrinsic mortality is irrelevant, *Trends Ecol. Evol.*, **35**, 379, doi: 10.1016/j.tree.2020.02.010.
67. Abrams, P. A. (1993) Does increased mortality favor the evolution of more rapid senescence? *Evolution*, **47**, 877-887, doi: 10.1111/j.1558-5646.1993.tb01241.x.
68. Chen, H.-Y., and Maklakov, A. A. (2012) Longer life span evolves under high rates of condition-dependent mortality, *Curr. Biol.*, **22**, 2140-2143, doi: 10.1016/j.cub.2012.09.021.
69. Gaillard, J.-M., and Lemaître, J.-F. (2017) The Williams' legacy: a critical reappraisal of his nine predictions about the evolution of senescence, *Evolution*, **71**, 2768-2785, doi: 10.1111/evo.13379.
70. Austad, S. N. (1993) Retarded senescence in an insular population of Virginia opossums (*Didelphis virginiana*), *J. Zool.*, **229**, 695-708, doi: 10.1111/j.1469-7998.1993.tb02665.x.
71. Furness, A. I., and Reznick, D. N. (2017) The Evolution of Senescence in Nature, in *The Evolution of Senescence in the Tree of Life*, Cambridge University Press, pp. 175-197, doi: 10.1017/9781139939867.009.
72. Reznick, D. N., Bryant, M. J., Roff, D., Ghalambor, C. K., and Ghalambor, D. E. (2004) Effect of extrinsic mortality on the evolution of senescence in guppies, *Nature*, **431**, 1095-1099, doi: 10.1038/nature02936.
73. Walsh, M. R., Whittington, D., and Walsh, M. J. (2014) Does variation in the intensity and duration of predation drive evolutionary changes in senescence? *J. Anim. Ecol.*, **83**, 1279-1288, doi: 10.1111/1365-2656.12247.
74. Promislow, D. E. L., and Harvey, P. H. (1990) Living fast and dying young: a comparative analysis of life-history variation among mammals, *J. Zool.*, **220**, 417-437, doi: 10.1111/j.1469-7998.1990.tb04316.x.

75. Deevey, E. S. (1977) Life tables for natural populations of animals, *Math. Demography*, pp. 61-74, doi: 10.1007/978-3-642-81046-6_9.
76. Botkin, D. B., and Miller, R. S. (1974) Mortality rates and survival of birds, *Am. Nat.*, **108**, 181-192, doi: 10.1086/282898.
77. Siriwardena, G. M., Baillie, S. R., and Wilson, J. D. (1998) Variation in the survival rates of some British passerines with respect to their population trends on farmland, *Bird Study*, **45**, 276-292, doi: 10.1080/00063659809461099.
78. Van Heerdt, P. F., Sluiter, J. W., and Bezem, J. J. (1960) Population statistics of five species of the bat genus *Myotis* and one of the genus *Rhinolophus*, hibernating in the caves of S. Limburg, *Arch. Néerlandaises Zool.*, **13**, 511-539, doi: 10.1163/036551660x00170.
79. Gibbons, M. M., and McCarthy, T. K. (1984) Growth, maturation and survival of frogs *Rana temporaria* L., *Ecography*, **7**, 419-427, doi: 10.1111/j.1600-0587.1984.tb01143.x.
80. Muller, H. J. (1950) Our load of mutations, *Am. J. Hum. Genet.*, **2**, 111-176.
81. Austad, S. N., and Hoffman, J. M. (2018) Is antagonistic pleiotropy ubiquitous in aging biology? *Evol. Med. Public Health*, **2018**, 287-294, doi: 10.1093/emph/eoy033.
82. Case, T. J. (1978) On the evolution and adaptive significance of postnatal growth rates in the terrestrial vertebrates, *Q. Rev. Biol.*, **53**, 243-282, doi: 10.1086/410622.
83. Kirchner, J. W., and Roy, B. A. (2000) Evolutionary implications of host-pathogen specificity: the fitness consequences of host life history traits, *Evol. Ecol.*, **14**, 665-692, doi: 10.1023/a:1011647526731.
84. Enard, D., Cai, L., Gwennap, C., and Petrov, D. A. (2016) Viruses are a dominant driver of protein adaptation in mammals, *Elife*, **5**, doi: 10.7554/eLife.12469.
85. Duggal, N. K., and Emerman, M. (2012) Evolutionary conflicts between viruses and restriction factors shape immunity, *Nat. Rev. Immunol.*, **12**, 687-695, doi: 10.1038/nri3295.
86. Daugherty, M. D., and Malik, H. S. (2012) Rules of engagement: molecular insights from host-virus arms races, *Annu. Rev. Genet.*, **46**, 677-700, doi: 10.1146/annurev-genet-110711-155522.
87. Bunn, H. F., and Franklin Bunn, H. (1997) Pathogenesis and treatment of sickle cell disease, *New Engl. J. Med.*, **337**, 762-769, doi: 10.1056/nejm199709113371107.
88. Williams, T. N., and Thein, S. L. (2018) Sickle cell anemia and its phenotypes, *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.*, **19**, 113-147, doi: 10.1146/annurev-genom-083117-021320.
89. Evans, E. A., Chen, W. C., and Tan, M.-W. (2008) The DAF-2 insulin-like signaling pathway independently regulates aging and immunity in *C. elegans*, *Aging Cell*, **7**, 879-893, doi: 10.1111/j.1474-9726.2008.00435.x.
90. Garsin, D. A., Villanueva, J. M., Begun, J., Kim, D. H., Sifri, C. D., Calderwood, S. B., Ruvkun, G., and Ausubel, F. M. (2003) Long-lived *C. elegans* daf-2 mutants are resistant to bacterial pathogens, *Science*, **300**, 1921, doi: 10.1126/science.1080147.
91. Fabian, D. K., Garschall, K., Klepsatel, P., Santos-Matos, G., Sucena, É., Kapun, M., Lemaitre, B., Schlötterer, C., Arking, R., and Flatt, T. (2018) Evolution of longevity improves immunity in *Drosophila*, *Evol. Lett.*, **2**, 567-579, doi: 10.1002/evl3.89.
92. Donnelly, R., White, A., and Boots, M. (2017) Host lifespan and the evolution of resistance to multiple parasites, *J. Evol. Biol.*, **30**, 561-570, doi: 10.1111/jeb.13025.
93. Huang, Z., Whelan, C. V., Dechmann, D., and Teeling, E. C. (2020) Genetic variation between long-lived versus short-lived bats illuminates the molecular signatures of longevity, *Aging*, **12**, 15962-15977, doi: 10.18632/aging.103725.
94. Gorbunova, V., Seluanov, A., Zhang, Z., Gladyshev, V. N., and Vijg, J. (2014) Comparative genetics of longevity and cancer: insights from long-lived rodents, *Nat. Rev. Genet.*, **15**, 531-540, doi: 10.1038/nrg3728.
95. Swovick, K., Firсанov, D., Welle, K. A., Hryhorenko, J. R., Wise, J. P., George, C., Sformo, T. L., Seluanov, A., Gorbunova, V., and Ghaemmghami, S. (2021) Interspecies differences in proteome turnover kinetics are correlated with lifespans and energetic demands, *Mol. Cell. Proteomics*, **20**, 100041, doi: 10.1101/2020.04.25.061150.
96. Carlton, J. M. (2018) Evolution of human malaria, *Nat. Microbiol.*, **3**, 642-643, doi: 10.1038/s41564-018-0170-2.
97. Pier, G. B., Grout, M., Zaidi, T., Meluleni, G., Mueschenborn, S. S., Banting, G., Ratcliff, R., Evans, M. J., and Colledge, W. H. (1998) Salmonella typhi uses CFTR to enter intestinal epithelial cells, *Nature*, **393**, 79-82, doi: 10.1038/30006.
98. Cuthbert, A. W., Halstead, J., Ratcliff, R., Colledge, W. H., and Evans, M. J. (1995) The genetic advantage hypothesis in cystic fibrosis heterozygotes: a murine study, *J. Physiol.*, **482**, 449-454, doi: 10.1113/jphysiol.1995.sp020531.
99. Poolman, E. M., and Galvani, A. P. (2007) Evaluating candidate agents of selective pressure for cystic fibrosis, *J. R. Soc. Interface*, **4**, 91-98, doi: 10.1098/rsif.2006.0154.
100. Hill, A. V. (1949) The dimensions of animals and their muscular dynamics, *Nature*, **164**, 820.
101. Harrison, J. F., Kaiser, A., and VandenBrooks, J. M. (2010) Atmospheric oxygen level and the evolution of insect body size, *Proc. Biol. Sci.*, **277**, 1937-1946, doi: 10.1098/rspb.2010.0001.
102. Holliday, R. (1995) *Understanding Ageing*, Cambridge University Press, doi: 10.1017/cbo9780511623233.
103. Trindade, L. S., Aigaki, T., Peixoto, A. A., Balduino, A., Mânica da Cruz, I. B., and Heddle, J. G. (2013) A novel

- classification system for evolutionary aging theories, *Front. Genet.*, **4**, 25, doi: 10.3389/fgene.2013.00025.
104. Gordon, I. J., Hester, A. J., and Festa-Bianchet, M. (2004) Review: The management of wild large herbivores to meet economic, conservation and environmental objectives, *J. Appl. Ecol.*, **41**, 1021-1031, doi: 10.1111/j.0021-8901.2004.00985.x.
105. Nilsen, E. B., Milner-Gulland, E. J., Schofield, L., Myrsetrud, A., Stenseth, N. C., and Coulson, T. (2007) Wolf reintroduction to Scotland: public attitudes and consequences for red deer management, *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, **274**, 995-1003, doi: 10.1098/rspb.2006.0369.
106. McCay, C. M., Crowell, M. F., and Maynard, L. A. (1935) The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size, *J. Nutr.*, **10**, 63-79, doi: 10.1093/jn/10.1.63.
107. Sohal, R. S., and Weindruch, R. (1996) Oxidative stress, caloric restriction, and aging, *Science*, **273**, 59-63, doi: 10.1126/science.273.5271.59.
108. Masoro, E. J. (2000) Caloric restriction and aging: an update, *Exp. Gerontol.*, **35**, 299-305, doi: 10.1016/s0531-5565(00)00084-x.
109. Shanley, D. P., and Kirkwood, T. B. (2000) Calorie restriction and aging: a life-history analysis, *Evolution*, **54**, 740-750, doi: 10.1111/j.0014-3820.2000.tb00076.x.
110. Holliday, R. (1989) Food, reproduction and longevity: is the extended lifespan of calorie-restricted animals an evolutionary adaptation? *Bioessays*, **10**, 125-127, doi: 10.1002/bies.950100408.
111. Lemaître, J.-F., Ronget, V., Tidière, M., Allainé, D., Berger, V., Cohas, A., Colchero, F., Conde, D. A., Garratt, M., Liker, A., Marais, G. A. B., Scheuerlein, A., Székely, T., and Gaillard, J.-M. (2020) Sex differences in adult lifespan and aging rates of mortality across wild mammals, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 8546-8553, doi: 10.1073/pnas.1911999117.
112. Gavrillov, L. A., and Gavrillova, N. S. (2002) Evolutionary theories of aging and longevity, *Sci. World J.*, **2**, 339-356, doi: 10.1100/tsw.2002.96.
113. Flatt, T. (2011) Survival costs of reproduction in *Drosophila*, *Exp. Gerontol.*, **46**, 369-375, doi: 10.1016/j.exger.2010.10.008.
114. Grandison, R. C., Piper, M. D. W., and Partridge, L. (2009) Amino-acid imbalance explains extension of lifespan by dietary restriction in *Drosophila*, *Nature*, **462**, 1061-1064, doi: 10.1038/nature08619.
115. Leroi, A. M., Chippindale, A. K., and Rose, M. R. (1994) Long-term laboratory evolution of a genetic life-history trade-off in *Drosophila melanogaster*. 1. The role of genotype-by-environment interaction, *Evolution*, **48**, 1244-1257, doi: 10.1111/j.1558-5646.1994.tb05309.x.
116. Rose, M. R. (1984) Laboratory evolution of postponed senescence in *Drosophila melanogaster*, *Evolution*, **38**, 1004-1010, doi: 10.1111/j.1558-5646.1984.tb00370.x.
117. Zajitschek, F., Georgolopoulos, G., Vourlou, A., Ericsson, M., Zajitschek, S. R. K., Friberg, U., and Maklakov, A. A. (2019) Evolution under dietary restriction decouples survival from fecundity in *Drosophila melanogaster* females, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **74**, 1542-1548, doi: 10.1093/gerona/gly070.
118. Morley, J. E. (2001) Decreased food intake with aging, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **56**, 81-88, doi: 10.1093/gerona/56.suppl_2.81.
119. Flatt, T., and Partridge, L. (2018) Horizons in the evolution of aging, *BMC Biol.*, **16**, 93, doi: 10.1186/s12915-018-0562-z.
120. Cohen, A. A., Coste, C. F. D., Li, X. y., Bourg, S., and Pavard, S. (2020) Are trade-offs really the key drivers of ageing and life span? *Funct. Ecol.*, **34**, 153-166, doi: 10.1111/1365-2435.13444.
121. Hamilton, W. D. (1963) The evolution of altruistic behavior, *Am. Nat.*, **97**, 354-356, doi: 10.1086/497114.
122. Hamilton, W. D. (1964) The genetical evolution of social behaviour. I, *J. Theor. Biol.*, **7**, 1-16, doi: 10.1016/0022-5193(64)90038-4.
123. Hamilton, W. D. (1964) The genetical evolution of social behaviour. II, *J. Theor. Biol.*, **7**, 17-52, doi: 10.1016/0022-5193(64)90039-6.
124. Kowald, A., and Kirkwood, T. B. L. (2016) Can aging be programmed? A critical literature review, *Aging Cell*, **15**, 986-998, doi: 10.1111/accel.12510.
125. Cohen, A. A., Kennedy, B. K., Anglas, U., Bronikowski, A. M., Deelen, J., Dufour, F., Ferbeyre, G., Ferrucci, L., Franceschi, C., Frasca, D., Friguier, B., Gaudreau, P., Gladyshev, V. N., Gonos, E. S., Gorbunova, V., Gut, P., Ivanchenko, M., Legault, V., Lemaître, J.-F., Liontis, T., et al. (2020) Lack of consensus on an aging biology paradigm? A global survey reveals an agreement to disagree, and the need for an interdisciplinary framework, *Mech. Ageing Dev.*, **191**, 111316, doi: 10.1016/j.mad.2020.111316.
126. Hampton, H. G., Watson, B. N. J., and Fineran, P. C. (2020) The arms race between bacteria and their phage foes, *Nature*, **577**, 327-336, doi: 10.1038/s41586-019-1894-8.
127. Bramucci, A. R., and Case, R. J. (2019) *Phaeobacter inhibens* induces apoptosis-like programmed cell death in calcifying *Emiliania huxleyi*, *Sci. Rep.*, **9**, 5215, doi: 10.1038/s41598-018-36847-6.
128. Deponte, M. (2008) Programmed cell death in protists, *Biochim. Biophys. Acta*, **1783**, 1396-1405, doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.01.018.
129. Feng, Y., Hsiao, Y.-H., Chen, H.-L., Chu, C., Tang, P., and Chiu, C.-H. (2009) Apoptosis-like cell death induced by *Salmonella* in *Acanthamoeba rhysodes*, *Genomics*, **94**, 132-137, doi: 10.1016/j.ygeno.2009.05.004.
130. Skulachev, V. P. (1999) Phenoptosis: programmed death of an organism, *Biochemistry (Moscow)*, **64**, 1418-1426.
131. Hughes, P. W. (2017) Between semelparity and iteroparity: empirical evidence for a continuum of modes of parity, *Ecol. Evol.*, **7**, 8232-8261, doi: 10.1002/ece3.3341.

132. Wodinsky, J. (1977) Hormonal inhibition of feeding and death in octopus: control by optic gland secretion, *Science*, **198**, 948-951, doi: 10.1126/science.198.4320.948.
133. Lopes, G. P., and Leiner, N. O. (2015) Semelparity in a population of *Gracilinanus agilis* (Didelphimorphia: Didelphidae) inhabiting the Brazilian cerrado, *Mammal. Biol.*, **80**, 1-6, doi: 10.1016/j.mambio.2014.08.004.
134. Fritz, R. S., Stamp, N. E., and Halverson, T. G. (1982) Iteroparity and semelparity in insects, *Am. Nat.*, **120**, 264-268, doi: 10.1086/283987.
135. Quinn, T. P. (2011) *The Behavior and Ecology of Pacific Salmon and Trout*, UBC Press.
136. Dickhoff, W. W. (1989) Salmonids and annual fishes: death after sex, in *Development, Maturation, and Senescence of Neuroendocrine Systems*, pp. 253-266, doi: 10.1016/b978-0-12-629060-8.50017-5.
137. Robertson, O. H., and Wexler, B. C. (1960) Histological changes in the organs and tissues of migrating and spawning Pacific salmon (genus *Oncorhynchus*), *Endocrinology*, **66**, 222-239, doi: 10.1210/endo-66-2-222.
138. McBride, J. R., and van Overbeeke, A. P. (1971) Effects of androgens, Estrogens, and cortisol on the skin, stomach, liver, pancreas, and kidney in gonadectomized adult Sockeye Salmon (*Oncorhynchus nerka*), *J. Fish. Res. Board Can.*, **28**, 485-490, doi: 10.1139/f71-068.
139. Cederholm, C. J., Jeff Cederholm, C., Kunze, M. D., Murota, T., and Sibatani, A. (1999) Pacific salmon carcasses: essential contributions of nutrients and energy for aquatic and terrestrial ecosystems, *Fisheries*, **24**, 6-15, doi: 10.1577/1548-8446(1999)024<0006:psc>2.0.co;2.
140. Galimov, E. R., Lohr, J. N., and Gems, D. (2019) When and how can death be an adaptation? *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1433-1437, doi: 10.1134/s0006297919120010.
141. Gorbunova, V., Seluanov, A., Mao, Z., and Hine, C. (2007) Changes in DNA repair during aging, *Nucleic Acids Res.*, **35**, 7466-7474, doi: 10.1093/nar/gkm756.
142. Rubinsztein, D. C., Mariño, G., and Kroemer, G. (2011) Autophagy and aging, *Cell*, **146**, 682-695, doi: 10.1016/j.cell.2011.07.030.
143. Ben-Zvi, A., Miller, E. A., and Morimoto, R. I. (2009) Collapse of proteostasis represents an early molecular event in *Caenorhabditis elegans* aging, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 14914-14919, doi: 10.1073/pnas.0902882106.
144. Son, H. G., Seo, M., Ham, S., Hwang, W., Lee, D., An, S. W. A., Artan, M., Seo, K., Kaletsky, R., Arey, R. N., Ryu, Y., Ha, C. M., Kim, Y. K., Murphy, C. T., Roh, T.-Y., Nam, H. G., and Lee, S.-J. V. (2017) RNA surveillance via nonsense-mediated mRNA decay is crucial for longevity in *daf-2/insulin/IGF-1* mutant *C. elegans*, *Nat. Commun.*, **8**, 14749, doi: 10.1038/ncomms14749.
145. Lipinski, M. M., Zheng, B., Lu, T., Yan, Z., Py, B. F., Ng, A., Xavier, R. J., Li, C., Yankner, B. A., Scherzer, C. R., and Yuan, J. (2010) Genome-wide analysis reveals mechanisms modulating autophagy in normal brain aging and in Alzheimer's disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 14164-14169, doi: 10.1073/pnas.1009485107.
146. Collin, G., Huna, A., Warnier, M., Flaman, J.-M., and Bernard, D. (2018) Transcriptional repression of DNA repair genes is a hallmark and a cause of cellular senescence, *Cell Death Dis.*, **9**, doi: 10.1038/s41419-018-0300-z.
147. Gong, H., Pang, J., Han, Y., Dai, Y., Dai, D., Cai, J., and Zhang, T.-M. (2014) Age-dependent tissue expression patterns of Sirt1 in senescence-accelerated mice, *Mol. Med. Rep.*, **10**, 3296-3302, doi: 10.3892/mmr.2014.2648.
148. Smith, J. M. (1964) Group selection and kin selection, *Nature*, **201**, 1145-1147, doi: 10.1038/2011145a0.
149. Lack, D. (1966) *Population Studies of Birds*, Oxford University Press, UK.
150. Andrewartha, H. G. (1954) *The Distribution and Abundance of Animals*, Univ Of Chicago Press, USA.
151. Markov, A. V., Barg, M. A., and Yakovleva, E. Y. (2018) Can aging develop as an adaptation to optimize natural selection? (application of computer modeling for searching conditions when the "Fable of hares" can explain the evolution of aging), *Biochemistry*, **83**, 1504-1516, doi: 10.1134/S0006297918120088.
152. Finch, C. E. (2010) *The Biology of Human Longevity: Inflammation, Nutrition, and Aging in the Evolution of Lifespans*, Elsevier.
153. Anderson, R. M., and May, R. M. (1979) Population biology of infectious diseases: Part I, *Nature*, **280**, 361-367, doi: 10.1038/280361a0.
154. Schmid-Hempel, P. (2011) *Evolutionary Parasitology: The Integrated Study of Infections, Immunology, Ecology, and Genetics*, OUP Oxford
155. Débarre, F., Lion, S., van Baalen, M., and Gandon, S. (2012) Evolution of host life-history traits in a spatially structured host-parasite system, *Am. Nat.*, **179**, 52-63, doi: 10.1086/663199.
156. Santiago, M. L., Range, F., Keele, B. F., Li, Y., Bailes, E., Bibollet-Ruche, F., Fruteau, C., Noë, R., Peeters, M., Brookfield, J. F. Y., Shaw, G. M., Sharp, P. M., and Hahn, B. H. (2005) Simian immunodeficiency virus infection in free-ranging Sooty Mangabeys (*Cercocebus atys atys*) from the Taï Forest, Côte d'Ivoire: implications for the origin of epidemic human immunodeficiency virus type 2, *J. Virol.*, **79**, 12515-12527, doi: 10.1128/JVI.79.19.12515-12527.2005.
157. Marx, P. A., Alcabes, P. G., and Drucker, E. (2001) Serial human passage of simian immunodeficiency virus by unsterile injections and the emergence of epidemic human immunodeficiency virus in Africa, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **356**, 911-920, doi: 10.1098/rstb.2001.0867.

158. Mayr, E. (1999) *Systematics and the Origin of Species, from the Viewpoint of a Zoologist*, Harvard University Press.
159. Pollock, G. B. (1983) Population viscosity and kin selection, *Am. Nat.*, **122**, 817-829, doi: 10.1086/284174.
160. Mitteldorf, J., and Wilson, D. S. (2000) Population viscosity and the evolution of altruism, *J. Theor. Biol.*, **204**, 481-496, doi: 10.1006/jtbi.2000.2007.
161. Pulliam, H. R., and Ronald Pulliam, H. (1988) Sources, sinks, and population regulation, *Am. Nat.*, **132**, 652-661, doi: 10.1086/284880.
162. Pulliam, H. R., Ronald Pulliam, H., and Danielson, B. J. (1991) Sources, sinks, and habitat selection: a landscape perspective on population dynamics, *Am. Nat.*, **137**, S50-S66, doi: 10.1086/285139.
163. Schmid-Hempel, P. (2021) *Evolutionary parasitology*, 2 Edn., Oxford University Press, London, England.
164. Lafferty, K. D., and Kuris, A. M. (2009) Parasitic castration: the evolution and ecology of body snatchers, *Trends Parasitol.*, **25**, 564-572, doi: 10.1016/j.pt.2009.09.003.
165. Lima, N. R. W., Azevedo, J. d. S., Silva, L. G. d., and Dansa-Petretski, M. (2007) Parasitic castration, growth, and sex steroids in the freshwater bonefish *Cyphocharax gilbert* (Curimatidae) infested by *Riggia paranensis* (Cymothoidea), *Neotrop. Ichthyol.*, **5**, 471-478, doi: 10.1590/s1679-62252007000400006.
166. Sherman, K. J., Daling, J. R., and Weiss, N. S. (1987) Sexually transmitted diseases and tubal infertility, *Sex. Transmitted Dis.*, **14**, 12-16, doi: 10.1097/00007435-198701000-00003.
167. Schulz, K. F., Cates, W., Jr., and O'Mara, P. R. (1987) Pregnancy loss, infant death, and suffering: legacy of syphilis and gonorrhoea in Africa, *Genitourin. Med.*, **63**, 320-325, doi: 10.1136/sti.63.5.320.
168. Zaba, B., and Gregson, S. (1998) Measuring the impact of HIV on fertility in Africa, *AIDS*, **12 Suppl 1**, S41-S50.
169. Smith, D. G., and Guinto, R. S. (1978) Leprosy and fertility, *Hum. Biol.*, **50**, 451-460.
170. Villa, E., Vukotic, R., Cammà, C., Petta, S., Di Leo, A., Gitto, S., Turola, E., Karampatou, A., Losi, L., Bernabucci, V., Cenci, A., Tagliavini, S., Baraldi, E., De Maria, N., Gelmini, R., Bertolini, E., Rendina, M., and Francavilla, A. (2012) Reproductive status is associated with the severity of fibrosis in women with hepatitis C, *PLoS One*, **7**, e44624, doi: 10.1371/journal.pone.0044624.
171. Parikh, F. R., Nadkarni, S. G., Kamat, S. A., Naik, N., Soonawala, S. B., and Parikh, R. M. (1997) Genital tuberculosis – a major pelvic factor causing infertility in Indian women, *Fertil. Steril.*, **67**, 497-500, doi: 10.1016/s0015-0282(97)80076-3.
172. Kapranos, N., Petrakou, E., Anastasiadou, C., and Kotronias, D. (2003) Detection of herpes simplex virus, cytomegalovirus, and Epstein-Barr virus in the semen of men attending an infertility clinic, *Fertil. Steril.*, **79 Suppl 3**, 1566-1570, doi: 10.1016/s0015-0282(03)00370-4.
173. Rankin, D. J., Bargum, K., and Kokko, H. (2007) The tragedy of the commons in evolutionary biology, *Trends Ecol. Evol.*, **22**, 643-651, doi: 10.1016/j.tree.2007.07.009.
174. Anderson, R. M., and May, R. M. (1982) Coevolution of hosts and parasites, *Parasitology*, **85**, 411-426, doi: 10.1017/s0031182000055360.
175. Altenberg, L. (2005) Evolvability suppression to stabilize far-sighted adaptations, *Artif. Life*, **11**, 427-443, doi: 10.1162/106454605774270633.
176. Sherman, P. W., Jarvis, J. U. M., and Alexander, R. D. (2017) *The Biology of the Naked Mole-Rat*, Princeton University Press.
177. Sun, S., White, R. R., Fischer, K. E., Zhang, Z., Austad, S. N., and Vijg, J. (2020) Inducible aging in *Hydra oligactis* implicates sexual reproduction, loss of stem cells, and genome maintenance as major pathways, *Geroscience*, **42**, 1119-1132, doi: 10.1007/s11357-020-00214-z.
178. Lindstedt, S. L., and Calder, W. A. (1976) Body size and longevity in birds, *Condor*, **78**, 91-94, doi: 10.2307/1366920.
179. Sacher, G. A. (2008) Relation of Lifespan to Brain Weight and Body Weight in Mammals, *Ciba Foundation Symposium – The Lifespan of Animals (Colloquia on Ageing, Vol. 5)*, 115-141, doi: 10.1002/9780470715253.ch9.
180. Peters, R. H. (1983) *The Ecological Implications of Body Size*, Cambridge University Press, doi: 10.1017/cbo9780511608551.
181. Read, A. F., and Harvey, P. H. (1989) Life history differences among the eutherian radiations, *J. Zool.*, **219**, 329-353, doi: 10.1111/j.1469-7998.1989.tb02584.x.
182. de Magalhães, J. P., Costa, J., and Church, G. M. (2007) An analysis of the relationship between metabolism, developmental schedules, and longevity using phylogenetic independent contrasts, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **62**, 149-160, doi: 10.1093/gerona/62.2.149.
183. Kapahi, P., Zid, B. M., Harper, T., Koslover, D., Sapin, V., and Benzer, S. (2004) Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway, *Curr. Biol.*, **14**, 885-890, doi: 10.1016/j.cub.2004.03.059.
184. Flurkey, K., Papaconstantinou, J., Miller, R. A., and Harrison, D. E. (2001) Lifespan extension and delayed immune and collagen aging in mutant mice with defects in growth hormone production, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 6736-6741, doi: 10.1073/pnas.111158898.
185. Kraus, C., Pavard, S., and Promislow, D. E. L. (2013) The size-life span trade-off decomposed: why large dogs die young, *Am. Nat.*, **181**, 492-505, doi: 10.1086/669665.
186. Guevara-Aguirre, J., Balasubramanian, P., Guevara-Aguirre, M., Wei, M., Madia, F., Cheng, C. W.,

- Hwang, D., Martin-Montalvo, A., Saavedra, J., Ingles, S., de Cabo, R., Cohen, P., and Longo, V. D. (2011) Growth hormone receptor deficiency is associated with a major reduction in pro-aging signaling, cancer, and diabetes in humans, *Sci. Transl. Med.*, **3**, 70ra13, doi: 10.1126/scitranslmed.3001845.
187. Laron, Z., Kauli, R., Lapkina, L., and Werner, H. (2017) IGF-I deficiency, longevity and cancer protection of patients with Laron syndrome, *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.*, **772**, 123-133, doi: 10.1016/j.mrrrev.2016.08.002.
188. Fontana, L., Partridge, L., and Longo, V. D. (2010) Extending healthy life span – from yeast to humans, *Science*, **328**, 321-326, doi: 10.1126/science.1172539.
189. Greer, K. A., Hughes, L. M., and Masternak, M. M. (2011) Connecting serum IGF-1, body size, and age in the domestic dog, *Age*, **33**, 475-483, doi: 10.1007/s11357-010-9182-4.
190. Laron, Z. (2015) Lessons from 50 years of study of laron syndrome, *Endocr. Pract.*, **21**, 1395-1402, doi: 10.4158/EP15939.RA.
191. Rubner, M. (1908) *Das Problem der Lebensdauer und seine Beziehungen zu Wachstum und Ernährung*, Oldenbourg Wissenschaftsverlag, doi: 10.1515/9783486736380.
192. Pearl, R. (1928) *The Rate of Living: Being an Account of Some Experimental Studies on the Biology of Life Duration*, University of London press Ltd., London.
193. McCarter, R., Masoro, E. J., and Yu, B. P. (1985) Does food restriction retard aging by reducing the metabolic rate? *Am. J. Physiol.*, **248**, E488-E490, doi: 10.1152/ajpendo.1985.248.4.E488.
194. Beckman, K. B., and Ames, B. N. (1998) The free radical theory of aging matures, *Physiol. Rev.*, **78**, 547-581, doi: 10.1152/physrev.1998.78.2.547.
195. Munshi-South, J., and Wilkinson, G. S. (2010) Bats and birds: exceptional longevity despite high metabolic rates, *Ageing Res. Rev.*, **9**, 12-19, doi: 10.1016/j.arr.2009.07.006.
196. White, C. R., and Seymour, R. S. (2003) Mammalian basal metabolic rate is proportional to body mass^{2/3}, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 4046-4049, doi: 10.1073/pnas.0436428100.
197. Bennett, A. F. (1988) Structural and functional determinates of metabolic rate, *Am. Zool.*, **28**, 699-708, doi: 10.1093/icb/28.2.699.
198. Van Voorhies, W. A., and Ward, S. (1999) Genetic and environmental conditions that increase longevity in *Caenorhabditis elegans* decrease metabolic rate, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 11399-11403, doi: 10.1073/pnas.96.20.11399.
199. Trout, W. E., and Kaplan, W. D. (1970) A relation between longevity, metabolic rate, and activity in shaker mutants of *Drosophila melanogaster*, *Exp. Gerontol.*, **5**, 83-92, doi: 10.1016/0531-5565(70)90033-1.
200. Conti, B., Sanchez-Alavez, M., Winsky-Sommerer, R., Morale, M. C., Lucero, J., Brownell, S., Fabre, V., Huitron-Resendiz, S., Henriksen, S., Zorrilla, E. P., de Lecea, L., and Bartfai, T. (2006) Transgenic mice with a reduced core body temperature have an increased life span, *Science*, **314**, 825-828, doi: 10.1126/science.1132191.
201. Flatt, T., and Heyland, A. (2011) *Mechanisms of Life History Evolution: The Genetics and Physiology of Life History Traits and Trade-Offs*, Oxford University Press.
202. Shefferson, R. P. J., Owen, R., and Salguero-Gómez, R. (2017) *The Evolution of Senescence in the Tree of Life*, Cambridge University Press.
203. Fowler, K., and Partridge, L. (1989) A cost of mating in female fruitflies, *Nature*, **338**, 760-761, doi: 10.1038/338760a0.
204. Chapman, T., Liddle, L. F., Kalb, J. M., Wolfner, M. F., and Partridge, L. (1995) Cost of mating in *Drosophila melanogaster* females is mediated by male accessory gland products, *Nature*, **373**, 241-244, doi: 10.1038/373241a0.
205. Liu, H., and Kubli, E. (2003) Sex-peptide is the molecular basis of the sperm effect in *Drosophila melanogaster*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 9929-9933, doi: 10.1073/pnas.1631700100.
206. Chapman, T., Bangham, J., Vinti, G., Seifried, B., Lung, O., Wolfner, M. F., Smith, H. K., and Partridge, L. (2003) The sex peptide of *Drosophila melanogaster*: female post-mating responses analyzed by using RNA interference, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 9923-9928, doi: 10.1073/pnas.1631635100.
207. Khazaeli, A. A., and Curtsinger, J. W. (2013) Pleiotropy and life history evolution in *Drosophila melanogaster*: uncoupling life span and early fecundity, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **68**, 546-553, doi: 10.1093/geron/gls226.
208. Gagnon, A. (2015) Natural fertility and longevity, *Fertil. Ster.*, **103**, 1109-1116, doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.03.030.
209. Kenyon, C. (2005) The plasticity of aging: insights from long-lived mutants, *Cell*, **120**, 449-460, doi: 10.1016/j.cell.2005.02.002.
210. Hercus, M. J., Loeschcke, V., and Rattan, S. I. S. (2003) Lifespan extension of *Drosophila melanogaster* through hormesis by repeated mild heat stress, *Biogerontology*, **4**, 149-156, doi: 10.1023/a:1024197806855.
211. Cypser, J. R., and Johnson, T. E. (2002) Multiple stressors in *Caenorhabditis elegans* induce stress hormesis and extended longevity, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **57**, B109-114, doi: 10.1093/geron/57.3.b109.
212. Zhang, B., Jun, H., Wu, J., Liu, J., and Xu, X. Z. S. (2021) Olfactory perception of food abundance regulates dietary restriction-mediated longevity via a brain-to-gut signal, *Nat. Aging*, **1**, 255-268, doi: 10.1038/s43587-021-00039-1.
213. Alcedo, J., and Kenyon, C. (2004) Regulation of *C. elegans* longevity by specific gustatory and olfactory neurons, *Neuron*, **41**, 45-55, doi: 10.1016/s0896-6273(03)00816-x.

214. Furman, D., Campisi, J., Verdin, E., Carrera-Bastos, P., Targ, S., Franceschi, C., Ferrucci, L., Gilroy, D. W., Fasano, A., Miller, G. W., Miller, A. H., Mantovani, A., Weyand, C. M., Barzilai, N., Goronzy, J. J., Rando, T. A., Effros, R. B., Lucia, A., Kleinstreuer, N., and Slavich, G. M. (2019) Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span, *Nat. Med.*, **25**, 1822-1832, doi: 10.1038/s41591-019-0675-0.
215. Libert, S., Chao, Y., Chu, X., and Pletcher, S. D. (2006) Trade-offs between longevity and pathogen resistance in *Drosophila melanogaster* are mediated by NFκB signaling, *Aging Cell*, **5**, 533-543, doi: 10.1111/j.1474-9726.2006.00251.x.
216. Vonk, W. I. M., Rainbolt, T. K., Dolan, P. T., Webb, A. E., Brunet, A., and Frydman, J. (2020) Differentiation drives widespread rewiring of the neural stem cell chaperone network, *Mol. Cell*, **78**, 329-345.e329, doi: 10.1016/j.molcel.2020.03.009.
217. Stearns, S. C., Ackermann, M., Doebeli, M., and Kaiser, M. (2000) Experimental evolution of aging, growth, and reproduction in fruitflies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 3309-3313, doi: 10.1073/pnas.060289597.
218. Healy, K., Guillerme, T., Finlay, S., Kane, A., Kelly, S. B. A., McClean, D., Kelly, D. J., Donohue, I., Jackson, A. L., and Cooper, N. (2014) Ecology and mode-of-life explain lifespan variation in birds and mammals, *Proc. Biol. Sci.*, **281**, 20140298, doi: 10.1098/rspb.2014.0298.
219. Ricklefs, R. E. (1998) Evolutionary theories of aging: confirmation of a fundamental prediction, with implications for the genetic basis and evolution of life span, *Am. Nat.*, **152**, 24-44, doi: 10.1086/286147.
220. Tidière, M., Gaillard, J.-M., Berger, V., Müller, D. W. H., Bingaman Lackey, L., Gimenez, O., Clauss, M., and Lemaître, J.-F. (2016) Comparative analyses of longevity and senescence reveal variable survival benefits of living in zoos across mammals, *Sci. Rep.*, **6**, 36361, doi: 10.1038/srep36361.
221. Thompson, W. (2013) *Sampling Rare or Elusive Species: Concepts, Designs, and Techniques for Estimating Population Parameters*, Island Press.
222. Klass, M., and Hirsh, D. (1976) Non-ageing developmental variant of *Caenorhabditis elegans*, *Nature*, **260**, 523-525, doi: 10.1038/260523a0.
223. Keller, L., and Genoud, M. (1997) Extraordinary lifespans in ants: a test of evolutionary theories of ageing, *Nature*, **389**, 958-960, doi: 10.1038/40130.
224. Dammann, P., Šumbera, R., Maßmann, C., Scherag, A., and Burda, H. (2011) Extended longevity of reproductives appears to be common in *Fukomys* mole-rats (Rodentia, Bathyergidae), *PLoS One*, **6**, e18757, doi: 10.1371/journal.pone.0018757.
225. Schmidt, C. M., Jarvis, J. U. M., and Bennett, N. C. (2013) The long-lived queen: reproduction and longevity in female eusocial Damaraland mole-rats (*Fukomys damarensis*), *Afr. Zool.*, **48**, 193-196, doi: 10.3377/004.048.0116.
226. Zhan, S., Merlin, C., Boore, J. L., and Reppert, S. M. (2011) The monarch butterfly genome yields insights into long-distance migration, *Cell*, **147**, 1171-1185, doi: 10.1016/j.cell.2011.09.052.
227. Da Silva, J. (2019) Plastic senescence in the honey bee and the disposable soma theory, *Am. Nat.*, **194**, 367-380, doi: 10.1086/704220.
228. Omholt, S. W. (2004) Epigenetic regulation of aging in honeybee workers, *Sci. Aging Knowl. Environ.*, **2004**, e28-pe28, doi: 10.1126/sageke.2004.26.pe28.
229. Winston, M. L. (1991) *The Biology of the Honey Bee*, Harvard University Press.
230. Lundie, A. E. (1925) *The Flight Activities of the Honey-bee*, Washington, D.C. : U.S. Dept. of Agriculture, doi: 10.5962/bhl.title.108871.
231. Münch, D., and Amdam, G. V. (2010) The curious case of aging plasticity in honey bees, *FEBS Lett.*, **584**, 2496-2503, doi: 10.1016/j.febslet.2010.04.007.
232. Page, R. E., Jr., and Peng, C. Y. (2001) Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L., *Exp. Gerontol.*, **36**, 695-711, doi: 10.1016/s0531-5565(00)00236-9.
233. Rueppell, O., Bachelier, C., Fondrk, M. K., and Page, R. E., Jr. (2007) Regulation of life history determines lifespan of worker honey bees (*Apis mellifera* L.), *Exp. Gerontol.*, **42**, 1020-1032, doi: 10.1016/j.exger.2007.06.002.
234. Visscher, P. K., and Dukas, R. (1997) Survivorship of foraging honey bees, *Insectes Sociaux*, **44**, 1-5, doi: 10.1007/s000400050017.
235. Dukas, R. (2008) Mortality rates of honey bees in the wild, *Insectes Sociaux*, **55**, 252-255, doi: 10.1007/s00040-008-0995-4.
236. Kramer, B. H., and Schaible, R. (2013) Life span evolution in eusocial workers – a theoretical approach to understanding the effects of extrinsic mortality in a hierarchical system, *PLoS One*, **8**, e61813, doi: 10.1371/journal.pone.0061813.
237. Beros, S., Lenhart, A., Scharf, I., Negroni, M. A., Menzel, F., and Foitzik, S. (2021) Extreme lifespan extension in tapeworm-infected ant workers, *R Soc. Open Sci.*, **8**, 202118, doi: 10.1098/rsos.202118.
238. Iranzo, J., Lobkovsky, A. E., Wolf, Y. I., and Koonin, E. V. (2015) Immunity, suicide or both? Ecological determinants for the combined evolution of anti-pathogen defense systems, *BMC Evol. Biol.*, **15**, doi: 10.1186/s12862-015-0324-2.
239. Refardt, D., Bergmiller, T., and Kümmerli, R. (2013) Altruism can evolve when relatedness is low: evidence from bacteria committing suicide upon phage infection, *Proc. Biol. Sci.*, **280**, 20123035, doi: 10.1098/rspb.2012.3035.
240. Artwohl, J., Ball-Kell, S., Valyi-Nagy, T., Wilson, S. P., Lu, Y., and Park, T. J. (2009) Extreme susceptibility of African naked mole rats (*Heterocephalus glaber*) to experimental infection with herpes simplex virus type 1, *Comp. Med.*, **59**, 83-90.

241. Githure, J. I., Gardener, P. J., and Kinoti, G. K. (1988) Experimental infection of the naked mole-rat, *Heterocephalus glaber*, with *Leishmania donovani*, *Transact. R. Soc. Trop. Med. Hygiene*, **82**, 563, doi: 10.1016/0035-9203(88)90507-x.
242. Hill, W. C. O., Osman Hill, W. C., Porter, A., Bloom, R. T., Seago, J., and Southwick, M. D. (2009) Field and laboratory studies on the naked mole rat, *Heterocephalus glaber*, *Proc. Zool. Soc. Lond.*, **128**, 455-514, doi: 10.1111/j.1096-3642.1957.tb00272.x.
243. Ross-Gillespie, A., Justin O'Riain, M., and Keller, L. F. (2007) Viral epizootic reveals inbreeding depression in a habitually inbreeding mammal, *Evolution*, **61**, 2268-2273, doi: 10.1111/j.1558-5646.2007.00177.x.
244. Hilton, H. G., Rubinstein, N. D., Janki, P., Ireland, A. T., Bernstein, N., Fong, N. L., Wright, K. M., Smith, M., Finkle, D., Martin-McNulty, B., Roy, M., Imai, D. M., Jojic, V., and Buffenstein, R. (2019) Single-cell transcriptomics of the naked mole-rat reveals unexpected features of mammalian immunity, *PLoS Biol.*, **17**, e3000528, doi: 10.1371/journal.pbio.3000528.
245. Amdam, G. V., Aase, A. L. T. O., Seehuus, S.-C., Kim Fondrk, M., Norberg, K., and Hartfelder, K. (2005) Social reversal of immunosenescence in honey bee workers, *Exp. Gerontol.*, **40**, 939-947, doi: 10.1016/j.exger.2005.08.004.
246. Galkin, F., Zhang, B., Dmitriev, S. E., and Gladyshev, V. N. (2019) Reversibility of irreversible aging, *Ageing Res. Rev.*, **49**, 104-114, doi: 10.1016/j.arr.2018.11.008.
247. Lemaitre, J.-M. (2013) Reversibility of cellular aging by reprogramming through an embryonic-like state: a new paradigm for human cell rejuvenation, *Cent. As. J. Glob. Health*, **2**, 88, doi: 10.5195/cajgh.2013.88.
248. Chang, J., Wang, Y., Shao, L., Laberge, R.-M., Demaria, M., Campisi, J., Janakiraman, K., Sharpless, N. E., Ding, S., Feng, W., Luo, Y., Wang, X., Aykin-Burns, N., Krager, K., Ponnappan, U., Hauer-Jensen, M., Meng, A., and Zhou, D. (2016) Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice, *Nat. Med.*, **22**, 78-83, doi: 10.1038/nm.4010.
249. Katsimpardi, L., Litterman, N. K., Schein, P. A., Miller, C. M., Loffredo, F. S., Wojtkiewicz, G. R., Chen, J. W., Lee, R. T., Wagers, A. J., and Rubin, L. L. (2014) Vascular and neurogenic rejuvenation of the aging mouse brain by young systemic factors, *Science*, **344**, 630-634, doi: 10.1126/science.1251141.
250. Conboy, I. M., Conboy, M. J., Wagers, A. J., Girma, E. R., Weissman, I. L., and Rando, T. A. (2005) Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment, *Nature*, **433**, 760-764, doi: 10.1038/nature03260.
251. Safdar, A., Bourgeois, J. M., Ogborn, D. I., Little, J. P., Hettinga, B. P., Akhtar, M., Thompson, J. E., Melov, S., Mocellin, N. J., Kujoth, G. C., Prolla, T. A., and Tarnopolsky, M. A. (2011) Endurance exercise rescues progeroid aging and induces systemic mitochondrial rejuvenation in mtDNA mutator mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 4135-4140, doi: 10.1073/pnas.1019581108.
252. Gary, N. E., and Marston, J. (1971) Mating behaviour of drone honey bees with queen models (*Apis mellifera* L.), *Animal Behav.*, **19**, 299-304, doi: 10.1016/s0003-3472(71)80010-6.
253. Oakwood, M., Bradley, A. J., and Cockburn, A. (2001) Semelparity in a large marsupial, *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, **268**, 407-411, doi: 10.1098/rspb.2000.1369.
254. Andrade, M. C. B. (1996) Sexual selection for male sacrifice in the Australian redback spider, *Science*, **271**, 70-72, doi: 10.1126/science.271.5245.70.
255. Robertson, O. H. (1961) Prolongation of the life span of kokanee salmon (*Oncorhynchus Nerka Kennerlyi*) by castration before beginning of gonad development, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **47**, 609-621, doi: 10.1073/pnas.47.4.609.
256. Stein-Behrens, B. A., and Sapolsky, R. M. (1992) Stress, glucocorticoids, and aging, *Ageing*, **4**, 197-210, doi: 10.1007/BF03324092.
257. McDonald, I. R., Lee, A. K., Bradley, A. J., and Than, K. A. (1981) Endocrine changes in dasyurid marsupials with differing mortality patterns, *Gen. Comp. Endocrinol.*, **44**, 292-301, doi: 10.1016/0016-6480(81)90004-6.
258. Barry, T. P., Unwin, M. J., Malison, J. A., and Quinn, T. P. (2001) Free and total cortisol levels in semelparous and iteroparous chinook salmon, *J. Fish Biol.*, **59**, 1673-1676, doi: 10.1111/j.1095-8649.2001.tb00230.x.
259. Strona, A. L. S., Levenhagem, M., and Leiner, N. O. (2015) Reproductive effort and seasonality associated with male-biased parasitism in *Gracilinanus agilis* (Didelphimorphia: Didelphidae) infected by *Eimeria* spp. (Apicomplexa: Eimeriidae) in the Brazilian cerrado, *Parasitology*, **142**, 1086-1094, doi: 10.1017/S0031182015000402.
260. Chung, H. Y., Cesari, M., Anton, S., Marzetti, E., Giovannini, S., Seo, A. Y., Carter, C., Yu, B. P., and Leeuwenburgh, C. (2009) Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases, *Ageing Res. Rev.*, **8**, 18-30, doi: 10.1016/j.arr.2008.07.002.
261. Franceschi, C., and Campisi, J. (2014) Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **69 Suppl 1**, S4-S9, doi: 10.1093/gerona/glu057.
262. Kounatidis, I., Chtarbanova, S., Cao, Y., Hayne, M., Jayanth, D., Ganetzky, B., and Ligoxygakis, P. (2017) NF- κ B immunity in the brain determines fly lifespan in healthy aging and age-related neurodegeneration, *Cell Rep.*, **19**, 836-848, doi: 10.1016/j.celrep.2017.04.007.
263. Boulias, K., Lieberman, J., and Greer, E. L. (2016) An epigenetic clock measures accelerated aging in treated HIV infection, *Mol. Cell*, **62**, 153-155, doi: 10.1016/j.molcel.2016.04.008.

264. Gindin, Y., Gaggar, A., Lok, A. S., Janssen, H. L. A., Ferrari, C., Subramanian, G. M., Jiang, Z., Masur, H., Emmanuel, B., Poonia, B., and Kottlil, S. (2021) DNA methylation and immune cell markers demonstrate evidence of accelerated aging in patients with chronic hepatitis B virus or hepatitis C virus, with or without human immunodeficient virus co-infection, *Clin. Infect. Dis.*, **73**, e184-e190, doi: 10.1093/cid/ciaa1371.
265. Ziuganov, V. V. (2005) A long-lived parasite extending the host life span: the pearl mussel *Margaritifera margaritifera* elongates host life by turns out the program of accelerated senescence in salmon *Salmo salar*, *Dokl. Biol. Sci.*, **403**, 291-294, doi: 10.1007/s10630-005-0115-9.
266. Finch, C. E., Morgan, T. E., Longo, V. D., and de Magalhaes, J. P. (2010) Cell resilience in species life spans: a link to inflammation? *Aging Cell*, **9**, 519-526, doi: 10.1111/j.1474-9726.2010.00578.x.
267. George, J. C. c., “Craig” George, J. C., and Bockstoce, J. R. (2008) Two historical weapon fragments as an aid to estimating the longevity and movements of bowhead whales, *Polar Biol.*, **31**, 751-754, doi: 10.1007/s00300-008-0407-2.
268. Nielsen, J., Hedeholm, R. B., Heinemeier, J., Bushnell, P. G., Christiansen, J. S., Olsen, J., Ramsey, C. B., Brill, R. W., Simon, M., Steffensen, K. F., and Steffensen, J. F. (2016) Eye lens radiocarbon reveals centuries of longevity in the Greenland shark (*Somniosus microcephalus*), *Science*, **353**, 702-704, doi: 10.1126/science.aaf1703.
269. Wanamaker, A. D., Heinemeier, J., Scourse, J. D., Richardson, C. A., Butler, P. G., Eiriksson, J., and Knudsen, K. L. (2008) Very long-lived mollusks confirm 17th century AD tephra-based radiocarbon reservoir ages for north Icelandic shelf waters, *Radio-carbon*, **50**, 399-412, doi: 10.1017/s0033822200053510.
270. Maher, C. R., and Lott, D. F. (2000) A review of ecological determinants of territoriality within vertebrate species, *Am. Midl. Nat.*, **143**, 1-29, doi: 10.1674/0003-0031(2000)143[0001:aroedo]2.0.co;2.
271. Brown, J. H., and Maurer, B. A. (1986) Body size, ecological dominance and Cope’s rule, *Nature*, **324**, 248-250, doi: 10.1038/324248a0.
272. Wilkinson, G. S., and Adams, D. M. (2019) Recurrent evolution of extreme longevity in bats, *Biol. Lett.*, **15**, 20180860, doi: 10.1098/rsbl.2018.0860.
273. Tan, T. C. J., Rahman, R., Jaber-Hijazi, F., Felix, D. A., Chen, C., Louis, E. J., and Aboobaker, A. (2012) Telomere maintenance and telomerase activity are differentially regulated in asexual and sexual worms, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 4209-4214, doi: 10.1073/pnas.1118885109.
274. Ricklefs, R. E., and Cadena, C. D. (2007) Lifespan is unrelated to investment in reproduction in populations of mammals and birds in captivity, *Ecol. Lett.*, **10**, 867-872, doi: 10.1111/j.1461-0248.2007.01085.x.
275. Rodrigues, M. A., and Flatt, T. (2016) Endocrine uncoupling of the trade-off between reproduction and somatic maintenance in eusocial insects, *Curr. Opin. Insect Sci.*, **16**, 1-8, doi: 10.1016/j.cois.2016.04.013.
276. Sutherland, G. D., Harestad, A. S., Price, K., and Lertzman, K. (2000) Scaling of natal dispersal distances in terrestrial birds and mammals, *Conserv. Ecol.*, **4**, doi: 10.5751/es-00184-040116.
277. Herman, W. S., and Tatar, M. (2001) Juvenile hormone regulation of longevity in the migratory monarch butterfly, *Proc. Biol. Sci.*, **268**, 2509-2514, doi: 10.1098/rspb.2001.1765.
278. Quinn, T. P. (2018) *The Behavior and Ecology of Pacific Salmon and Trout*, **2 ed.**, University of Washington Press.

IS AGING AN INEVITABLE CHARACTERISTIC OF ORGANIC LIFE OR AN EVOLUTIONARY ADAPTATION?

Review

P. V. Lidsky^{1*}, J. Yuan¹, Jacob M. Rulison^{1,2}, and R. Andino-Pavlovsky^{1*}

¹ Department of Microbiology and Immunology, University of California San Francisco, CA, USA;
E-mail: peter.lidsky@ucsf.edu; raul.andino@ucsf.edu

² University of California Berkeley, CA, USA

Aging is an evolutionary paradox. Several hypotheses have been proposed to explain it, but none fully explains all the biochemical and ecologic data accumulated over decades of research. We suggest that senescence is a primitive immune strategy which acts to protect an individual’s kin from chronic infections. Older organisms are exposed to pathogens for a longer period of time and have a higher likelihood of acquiring infectious diseases. Accordingly, the parasitic load in aged individuals is higher than in younger ones.

Given that the probability of pathogen transmission is higher within the kin, the inclusive fitness cost of infection might exceed the benefit of living longer. In this case, programmed lifespan termination might be an evolutionarily stable strategy. Here, we discuss the classical evolutionary hypotheses of aging and compare them with the pathogen control hypothesis, discuss the consistency of these hypotheses with existing empirical data, and present a revised conceptual framework to understand the evolution of aging.

Keywords: aging, evolution, infection, immunity, phenoptosis

ЯВЛЯЕТСЯ ЛИ СТАРЕНИЕ ЧЕЛОВЕКА ФОРМОЙ ФЕНОПТОЗА?

Обзор

© 2022 G. Libertini^{1,2*}, G. Corbi^{3,4}, O. Shubernetskaya⁵, and N. Ferrara^{2,6}

¹ Italian Society for Evolutionary Biology (SIBE), 14100 Asti, Italy; Email: giacinto.libertini@yahoo.com

² Department of Translational Medical Sciences, Federico II University of Naples, 80131 Naples, Italy

³ Department of Medicine u Health Sciences, University of Molise, 86100 Campobasso, Italy

⁴ Italian Society of Gerontology u Geriatrics (SIGG), 50129 Firenze, Italy

⁵ Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, 117997 Moscow, Russia

⁶ Istituti Clinici Scientifici Maugeri SPA – Società Benefit, IRCCS, 82037 Telesse Terme (BN), Italy

Поступила в редакцию 02.08.2022

После доработки 28.08.2022

Принята к публикации 29.08.2022

Суть этой активно обсуждаемой научной проблемы заключается в том, является ли старение следствием накопления дегенеративных факторов, недостаточно противостоящих естественному отбору, или же, напротив, оно является упорядоченным процессом, генетически предопределённым и регулируемым, моделируемым естественным отбором, для которого было вполне уместно использовать определение фенототического явления. В настоящем обзоре приведены теоретические аргументы и эмпирические данные в пользу обеих гипотез с дополнительными доказательствами в поддержку тезиса о старении как форме фенотоза. Поскольку тезис о старении как адаптивном запрограммированном явлении должен быть подкреплён существованием специфических механизмов, определяющих старение, таких как предложенная для этой цели субтеломерно-теломерная теория, приводятся доказательства, подтверждающие механизмы, описываемые этой теорией. В частности, в статье подчёркивается, что недавно появившаяся интерпретация роли последовательностей TERRA в рамках субтеломерно-теломерной теории является ключевым моментом в поддержку гипотетических механизмов. Кроме того, отдельные характеристики механизмов, предложенных в рамках данной теории, такие как наблюдаемые при старении эпигенетические модификации, постепенное старение клеток, клеточное старение, ограничения дупликации клеток и фиксированный размер теломерного гетерохроматинового капюшона, подробно рассмотрены на предмет их совместимости как с положением о старении как фенототическом явлении, так и с противоположными точками зрения. Короче говоря, старение как форма фенотоза представляется научно обоснованной гипотезой, в то время как противоположный тезис должен прояснить значение различных явлений, которые, по-видимому, опровергают его.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фенотоз, старение, субтеломеры, теломеры, субтеломерно-теломерная теория, постепенное клеточное старение, клеточное старение, эпигенетические изменения.

DOI: 10.31857/S0320972522120041, EDN: NFXQXK

ВВЕДЕНИЕ

Прошло 25 лет с тех пор, как был определён и предложен неологизм и концепция фенотоза как «запрограммированной смерти организма» [1, 2]. Впоследствии: (1) старение, проявляющееся у особей нашего и многих дру-

гих видов, точно описанное как «увеличение смертности с увеличением хронологического возраста в популяциях в дикой природе» [3], было указано как форма «медленного фенотоза» [4]; (2) было расширено определение фенотоза: «Фенотоз – это смерть особи, вызванная её собственными действиями или

Принятые сокращения: Т-последовательности – РНК, содержащие теломерные повторы (TERRA); ERC – внехромосомные рибосомные кольца ДНК; ES – эмбриональные стволовые клетки; iPSC – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; CGI – CpG-островки; MSC – мезенхимные стволовые клетки; SASP – секреторный фенотип, ассоциированный со старением; SC – стволовые клетки.

* Адресат для корреспонденции.

действиями близких родственников (сублицид; в частности, гибель потомства в результате действий родителей или сыновнее детоубийство) и не вызванная несчастными случаями, болезнями или внешними факторами, т.е. определяется, регулируется или находится под влиянием генов, одобренных естественным отбором» [5]; и (3) было подчеркнуто, насколько этот тип явления широко распространён в природе [5, 6].

Концепция феноптоза позволяет охватить одним понятием ряд очень разнородных явлений, при которых у огромного числа видов особь умирает или подвергает себя риску умереть в чётко определённых фазах жизненного цикла или в определённых случаях [5, 7].

Для феноптотических явлений характерны два общих признака.

- Естественный отбор строго на уровне одного индивида не может объяснить тот факт, почему гены благоприятствуют характеристикам, из-за которых особь погибает или же снижаются её шансы на выживание. Следовательно, любой тип феноптоза должен определяться естественным отбором, действующим на надындивидуальном уровне.

- Феноптотические явления должны быть вызваны особыми механизмами, определяемыми и регулируемые специфическими генами, существование которых допускается вышеупомянутыми надындивидуальными селективными механизмами отбора.

Понятие феноптоза возникает в противовес идеям Дарвина, если ограничиться выражением «выживание наиболее приспособленных», которое содержится в названии пятого издания его книги [8]. Без дальнейших пояснений исключается возможность того, что естественный отбор может благоприятствовать чему-либо, что убивает или наносит вред индивиду. Однако важно помнить, что Дарвин не исключал возможность того, что естественный отбор мог благоприятствовать признакам, которые вредны для индивида: «Племя, состоящее из множества членов, ... всегда готовых помогать друг другу и жертвовать собой ради общего блага, одержало бы победу над большинством других племён; и это был бы естественный отбор» ([9], стр. 500). Следовательно, было бы несправедливо верить тому, что концепция феноптоза несовместима с идеями Дарвина или является их преодолением. Правильнее понимать категорию феноптотических явлений как нечто недооценённое в прошлом, не описываемое как совокупность явлений, которые можно было охватить одним термином, а, может быть, необоснованно воспринимать как ряд редких и любопытных ис-

ключений из правила королевы о «выживании сильнейших».

Однако, как показано при обсуждении настоящей работы, концепция феноптоза должна преодолеть глубоко укоренившиеся предвзятые представления, беспочвенность которых доказана как теоретическими аргументами, так и эмпирическими данными.

Представление о старении как о запрограммированном явлении иногда описывается как несостоятельное, не подкреплённое доказательствами, с сильными аргументами против. Например, «с точки зрения эволюции, предполагается, что старение вызвано не активным генным программированием, а развившимися ограничениями в соматическом поддержании, что приводит к накоплению повреждений ... доказательств существования такой программы мало, и есть веские аргументы в пользу того, почему её не должно быть» [10].

Напротив, тема настоящей обзорной статьи заключается в том, можно ли корректно определить старение как форму феноптоза, т.е. обоснованно ли рассматривать старение как адаптивный феномен, которому благоприятствует естественный отбор, определяемый и регулируемый специальными механизмами.

В частности, в начале «Дискуссии» анализируется: (1) правильно ли принимать некоторые обычно выдвигаемые аргументы против идеи старения как адаптивного и запрограммированного явления; и (2) правдоподобие некоторых аргументов и фактов в поддержку противоположного представления о старении как о неадаптивном и незапрограммированном явлении.

Затем обсуждается существование или отсутствие специфических механизмов, определяющих старение, которые необходимы в случае старения как феноптотического явления и неоправданны – в противоположном случае.

ДИСКУССИЯ

Аргументы и свидетельства в пользу двух взаимно противоположных интерпретаций процесса старения. Популярные аргументы против гипотезы старения как адаптивного феномена. В качестве предварительных возражений против возможности восприятия старения как адаптивного явления, которое является необходимым условием для того, чтобы считать старение разновидностью феноптоза, часто выдвигаются три аргумента. Однако эти аргументы противоречат фактам и не кажутся убедительными.

1. *Старение как универсальное и неизбежное явление.* Популярна идея, что старение является универсальным и поэтому неизбежным явлением для любого вида (например: «В отличие от любой болезни, возрастные изменения ... происходят у каждого многоклеточного животного, достигающего фиксированного размера в период репродуктивной зрелости ... происходят практически во всей живой и неживой материи» [11]). Согласно этой концепции, безусловно, возможно старение более или менее быстрыми темпами, но нестареющих видов не существует. Следовательно, поскольку старение является универсальным и вполне естественным явлением, оно не требует особых обоснований.

Эта концепция полностью опровергается доказательствами. Достаточно прочесть материал, изложенный в хорошо известном трактате Finch [7], и аргументы, сформулированные в статье, посвящённой феноптозу [5], и в главе 2 недавно вышедшей книги Libertini et al. [6]. Короче говоря, ограничиваясь только многоклеточными видами и несколькими категориями примеров, большое количество видов демонстрируют в качестве своего нормального срока жизни явные феноптотические явления, отличные от старения, как определено выше [3]. Многие виды как среди животных, так и среди растений размножаются только один раз, а затем умирают (семеларность, semelparity). Для многих растений и насекомых характерны годовые циклы, которые генетически предопределены и заканчиваются их гибелью. Как крайний пример, многие виды насекомых во взрослом состоянии не питаются или даже имеют дефектные системы питания, не позволяющие питаться (афагия). Эти случаи описаны в трактате Finch [7] в главе «Быстрое старение и внезапная смерть».

Однако термин «старение», используемый для вышеупомянутых видов, может привести к некоторой путанице из-за существования других видов, у которых увеличение смертности происходит постепенно. Этот процесс описывается как «постепенное старение с определённой продолжительностью жизни» [7] и подпадает под вышеупомянутое определение старения.

Другое возможное непонимание заключается в том, что «быстрое старение и внезапная гибель» обязательно предполагает короткую продолжительность жизни, что совсем не соответствует действительности: «Различные виды толстоствольного бамбука (*Phyllostachys*) отличаются продолжительными фазами вегетативного роста, которые длятся многие года

или десятилетия (7, 30, 60 или 120 лет) в зависимости от вида, прежде чем внезапно расцвести и умереть...» ([7], стр. 101).

Однако все эти случаи «быстрого старения» явно генетически предопределены и, следовательно, запрограммированы и подпадают под определение феноптоза.

Особь некоторых видов не гибнут вследствие феноптоза а, напротив, у них с возрастом не наблюдаются какие-либо заметные признаки функционального спада («Negligible Senescence» или «незначительное старение») [7]. Точнее, можно сказать, что у многих видов нет возрастного повышения смертности в условиях их существования в дикой природе. Для некоторых видов, особенно тех, у которых увеличение размера приводит к большей устойчивости к хищникам, наблюдается возрастное снижение смертности (так называемое «негативное старение» [12], что может ввести в заблуждение).

Таким образом, за исключением всех случаев, упомянутых до сих пор, данные показывают, что только ограниченное число видов демонстрирует старение, как определено выше [3]. Иными словами, если рассматривать все виды, то старение – явление не универсальное, а довольно редкое. Сам факт, что человек и животные, которые нам известны, подвержены старению, является вероятным источником неправильного представления об универсальности старения.

Другая концепция заключается в неизбежности гибели особей любых видов. Например, в случае вида с «незначительным старением» постоянная смертность в любом возрасте не исключает риска смерти в любом возрасте и того, что умрут все особи этого вида. Кроме того, для такого вида нельзя исключить, что в искусственных условиях в возрастах, не существующих в природе, наблюдается возрастное повышение смертности, потому что явления сколько-нибудь вредные только в возрастах, не существующих в дикой природе, не могут подвергаться воздействию естественного отбора [3].

2. *Старение как явление, не имеющее селективного значения.* В некоторых исследованиях были выявлены явные доказательства того, что старение имеет небольшое значение или же оно не сказывается на показателе смертности в дикой природе, и, следовательно, не может иметь значение для естественного отбора.

Например: «Старение редко имеет место у диких животных, если оно вообще когда-либо происходит, потому что для них необычно прожить достаточно долго, чтобы испытать

это явление. То же самое можно сказать и про доисторических людей. Естественный отбор не мог влиять на такой процесс как старение, когда лишь немногие особи когда-либо жили достаточно долго, чтобы участвовать в процессе отбора» [11]; «имеется мало свидетельств того, что старение вносит существенный вклад в смертность в дикой природе, ... как правило дикие животные просто не живут так долго, чтобы состариться; следовательно, естественный отбор имеет ограниченные возможности, чтобы оказывать прямое влияние на процесс старения» [13].

В явном противоречии с этим мнением существует достаточное количество документов о возрастном увеличении смертности в популяциях в дикой природе и о том, что это увеличение смертности в значительной степени способствует сокращению средней продолжительности жизни [14, 15].

В частности, Nussey et al. [15] утверждают: «Появившиеся недавно результаты долгосрочных полевых исследований предоставили неопровержимые доказательства того, что старение обычно происходит в природе. Мы нашли такие доказательства у 175 различных видов животных из 340 отдельных исследований».

Кроме того, при анализе таблиц смертности некоторых видов уже в 1988 г. было отмечено, что средняя продолжительность жизни сократилась вдвое из-за этого увеличения смертности (т.е. старения), и, кроме того, за исключением особей, умерших до достижения зрелости, средняя продолжительность последующей жизни сократилась на две трети [3].

Следовательно, для видов, особи которых стареют, поскольку возрастное увеличение смертности существует в дикой природе и значительно изменяет среднюю продолжительность жизни, старение вообще не может не иметь селективного значения.

Другая концепция заключается в том, что особи, находящиеся на поздней стадии старения (например, долгожитель – в случае людей), отсутствуют в естественных условиях. Это не противоречит хорошо задокументированному факту, что возрастное увеличение уровня смертности (которое означает возрастное снижение функциональных свойств организма) хорошо прослеживается в естественных условиях, и, следовательно, в тех возрастах, в которых прирост смертности превышает критический уровень, выживание становится невозможным, и особи этих возрастов не обнаруживаются.

Необходимо избегать «смещения процесса старения с состоянием старости» [16], т.е. необходимо различать возрастное сниже-

ние способности к выживанию (т.е. старение) и возраст, в котором нарушение биологического угасания серьезно снижает способность к выживанию. Более того, период, в котором смертность возрастает и до состояния старости, непременно подлечит естественному отбору. Это хорошо выразил Williams [16]: «Никто не счёл бы 30-летнего мужчину стариком, однако при сопоставлении спортивных достижений и соответствующего возраста, в это десятилетие происходит сильное старение. Несомненно, эта часть жизненного цикла человека связана с естественным отбором».

3. *Старение как неадаптивный феномен, потому что оно не оправдано с точки зрения индивидуального отбора.* Главный аргумент, который используется против возможности старения как адаптивного феномена заключается в том, что ген, вызывающий старение, безусловно, вреден для индивида, и поэтому естественный отбор не может благоприятствовать такому гену: «... любой гипотетический “ген ускоренного старения” был бы невыгоден индивиду. Следовательно, трудно понять, как гены ускоренного старения могут поддерживаться в стабильном равновесии, поскольку индивиды, у которых гены были инактивированы мутацией, получили бы преимущество отбора» [13]. «Аномальная природа старения как предполагаемой адаптации заключается в том, что оно вредно для индивида, у которого проявляется этот процесс. Животное, которое вырастает до зрелости, а затем размножается бесконечно, обладает при прочих равных условиях большей дарвиновской приспособленностью, чем животное, которое вырастает до зрелости, а затем выживает и размножается только в течение фиксированного периода времени» [17].

Изменение частоты между одним поколением и последующим гена S , действующего на индивид I (Δ_c), может быть выражено следующей формулой:

$$\Delta_c \propto S \cdot P, \quad (1)$$

где S – преимущество или недостаток (т.е. большая или меньшая приспособленностью) для I , вызванное геном S ; P – остаточная репродуктивная способность I в возрасте, когда S действует.

Если значение S отрицательно, Δ_c тоже будет отрицательным, т.е. частота гена S уменьшится. Следовательно, согласно этой формуле, любой вредный для особи, в которой он действует, ген будет элиминирован естественным отбором, а значит, гены, вызывающие старение

и любые фенотипические явления, не могут быть адаптивными.

Рассмотрим теперь механизм надындивидуального отбора, известный как родственный отбор и основанный на инклюзивной приспособленности (inclusive fitness) [18, 19]. Этот селективный механизм рассматривает как особь I_1 , в которой присутствует и действует ген C , так и другие n особей, генетически связанных с I (I_2, I_3, \dots), для которых действие гена C имеет какое-либо значение для их способности к выживанию. В этом случае Δ_c описывается формулой:

$$\Delta_c \propto \sum_{x=1}^n (S_x \cdot P_x \cdot r_x), \quad (2)$$

где S_x — преимущество или недостаток для индивидуального I_x в результате действия C ; P_x — репродуктивная ценность I_x в том возрасте, когда действует C ; r_x — коэффициент связи между I_x и I_1 .

Если значение суммы положительно, то естественный отбор благоприятствует гену C . Это может также происходить в случае, при котором значение S_1 отрицательно (т.е. в том случае, когда C невыгоден индивиду I_1 , в котором он действует).

Следует отметить, что если C воздействует только на I_1 , то формула (2) превращается в формулу (1). Следовательно, отбор на индивидуальном уровне является лишь частным случаем более общего способа описания естественного отбора, и две приведённые формулы не представляют альтернативные теории.

Более того, как обсуждалось в исследовании Libertini et al. ([6], §2.2), надындивидуальный отбор, частный случай группового отбора, можно описать в терминах инклюзивной приспособленности с помощью соответствующих преобразований формулы (2), а конкретные популяционные модели также позволяют объяснить существование генов, которые вредны для организма, в котором они действуют. Важный вывод состоит в том, что неправильно априори исключать возможность того, что гены, вредные для индивида, в котором они действуют (например, гены, определяющие старение или вообще явления фенотипа), благоприятствуют естественному отбору.

Слабые стороны теорий, поддерживающих гипотезу старения как неадаптивного феномена. Несмотря на обоснованность трёх вышеупомянутых аргументов против возможности того, что старение представляет собой адаптивное явление, существуют три традиционные теории, которые так или иначе пы-

таются рассмотреть механизмы отбора, чтобы оправдать старение, а также разнообразный набор теорий, объясняющих старение, как постепенное накопление действия вредных агентов разного типа.

1. *Теория накопления мутаций* [20, 21]. Эта теория берёт своё начало от того факта, что со временем число выживших особей уменьшается, и, следовательно, вредный ген, который оказывает действие на особи в более старшем возрасте (назовём его для краткости «t-ген»), удаляется в ходе естественного отбора слабее, чем эквивалентный ген, действующий в более молодом возрасте. Следовательно, вредные гены, действующие в более старшем возрасте, путём накопления своих вредных эффектов постепенно вызывают общие возрастные нарушения, определяемые как старение.

Ещё в 1988 г. [3] была предложена простая математическая модель, чтобы проверить, может ли большая нагрузка t-генов вызвать прогрессирующее возрастное увеличение смертности, т.е. можно ли определить таблицу долголетия (life table), сходную с той, что наблюдается у стареющего вида. Модель, вновь предложенная в других работах (например, [6, 22]) и никогда не опровергнутая остальными авторами, продемонстрировала, что t-гены не приводят к таблицам долголетия вышеупомянутого типа и что, следовательно, t-гены не являются вероятной причиной старения.

Однако, принимая во внимание, что теория накопления мутаций является допустимой гипотезой, она должна объяснять отличия в темпах старения у разных видов. Конечно, малоубедительно постулировать, что у видов с низкими скоростями старения число и эффекты t-генов меньше и что у видов с «незначительным старением» t-генов недостаточно, чтобы вызвать заметное старение.

Более того, в теории накопления мутаций есть ещё один скрытый постулат, а именно: частота мутаций, не устранённых особыми механизмами, не может быть дополнительно ограничена естественным отбором. Но и у этого тезиса есть противоречия.

- Существует обратная зависимость между продолжительностью жизни и частотой соматических мутаций в год [23] (конечно, учитывая только те мутации, которые не устраняются специфическими механизмами). Без этой обратной зависимости у животных с большей продолжительностью жизни должно быть больше клеток с критическим уровнем мутаций, вызывающих рак [24]. Фактически, это свидетельствует о том, что естественный отбор вполне способен разработать эффективные механизмы

для сдерживания мутаций, и, следовательно, кажется необоснованным утверждать, что старение каким-то образом вызвано накоплением мутаций, против которых естественный отбор не может противостоять.

• Некоторые исследования показывают, что у людей с генетическими изменениями, вызывающими более высокую частоту мутаций, не наблюдается признаков ускоренного старения [25], «что противоречит прямой связи между накоплением мутаций и старением» [24].

2. *Теория антагонистической плейотропии* [16, 26]. Эта теория постулирует существование генов с полезными эффектами в молодом и зрелом возрасте, но вредными в старшем возрасте. Поскольку преимущество в раннем возрасте перевешивает недостаток в более позднем возрасте (также потому, что в этом более позднем возрасте меньше выживших), эти плейотропные гены будут одобрены естественным отбором, и поэтому их кумулятивные эффекты будут определять старение.

Косвенно, эта теория также постулирует отсутствие или невозможность существования аналогичных генов, выгодных для всех возрастов.

Кроме того, если мы хотим объяснить различия между различными видами в ритмах старения (т.е. темпы увеличения смертности), представляется необходимым постулировать, что количество и эффекты гипотетических генов с плейотропными эффектами пропорциональны ритмам старения.

Наконец, желая объяснить существование видов с «незначительным старением», представляется также необходимым постулировать, что у таких видов вышеупомянутые гипотетические гены настолько немногочисленны и обладают столь ограниченными эффектами, что оправдывают невозможность обнаружения старения.

К сожалению, помимо множества постулатов, которые затрудняют принятие теории в качестве научной, нет никаких доказательств существования генов с вышеупомянутыми плейотропными эффектами (первый постулат), а также каких-либо элементов, подтверждающих другие выделенные постулаты.

3. *Теория одноразовой сомы* [27, 28]. Эта теория постулирует, что для организма существуют ограниченные ресурсы, которые лучше не конкретизированы.

Допуская этот предел, так как организм должен обязательно делить недостающие ресурсы для наилучшего удовлетворения всех потребностей, естественный отбор выбирает компромисс между необходимостью повышения репродуктивной способности и потребностью

в постоянном восстановлении физиологических систем, т.е. противодействии старению. Частичное удовлетворение потребностей второго типа прогрессивно ухудшает функциональные возможности организма, т.е. определяет старение.

Существуют и другие более или менее явные постулаты этой теории: (1) наличие неопределённого ресурса с ограниченной доступностью; (2) ограничение упомянутого ресурса вынуждает выбирать между репродуктивным потенциалом и способностью противодействовать снижению функций; (3) при сравнении видов есть различия в ограничении ресурсов в зависимости от скорости старения особей; (4) такого ограничения ресурсов не существует у видов с «незначительным старением».

Для этой теории, кроме множества постулатов, которые затрудняют её принятие в качестве научной, также нет работ, доказывающих существование неопределённого ресурса с ограниченной доступностью или обратной зависимости между репродуктивной способностью и темпами старения.

Кроме того, ограничение калорий, которое, предположительно, ещё больше сократило бы гипотетический ограниченный ресурс, должно лимитировать продолжительность жизни, но данные, по-видимому, противоречат этому прогнозу (для обсуждения см. Libertini et al. [6], §4.4.5, «Влияние ограничения калорий на продолжительность жизни»).

4. *Теории накопления повреждений* [6, 29]. Есть много факторов, которые, как предполагается, вызывают прогрессирующее повреждение организмов и, следовательно, старение. Например: клеточный «износ»; механохимическое разрушение клеточных коллоидов; изменения в определённых тканях (нервной, эндокринной, сосудистой, соединительной); токсические продукты кишечных бактерий; накопление «металлазмы» или метаболитов; действие силы тяжести; накопление тяжёлой воды; возрастающая энтропия; накопление химических изменений из-за ошибок транскрипции ДНК; вредные эффекты окислительных процессов; окислительные эффекты свободных радикалов на ДНК, митохондрии и весь организм; возрастные воспалительные явления; возрастные изменения иммунной системы [6, 29].

Для некоторых из этих теорий отправной точкой является хорошо известная связь между старшим возрастом и явлениями, предложенными в качестве причин старения. Например, воспалительные явления и иммунологические изменения коррелируют с возрастом и предполагаются в качестве причины старения [30, 31].

Однако указанная ассоциация не позволяет исключить обратное, т.е. что старение является причиной возрастного нарастания воспалительных явлений и иммунологических изменений.

Аналогичное возражение можно сформулировать и для теорий, согласно которым старение обусловлено явлениями окисления, на основании известной связи между старением и накоплением продуктов окисления. Что касается противоположного тезиса о том, что старение приводит к накоплению окисленных веществ, то уместно сообщить, среди прочего, о различных экспериментальных работах, в которых с помощью различных манипуляций дифференцированные клетки доводятся до состояния эмбриональных или стволовых клеток (SC), в которых не происходит накопления окисленных веществ. Например: (1) введение четырёх факторов (Oct3/4, Sox2, c-Myc и Klf4) трансформирует (т.е. перепрограммирует) взрослые фибробласты в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC, induced pluripotent stem cells), которые имеют гены клеточных маркеров и ростовые свойства эмбриональных стволовых клеток (ES) [32]; у человека тетраплоидные клетки, обладающие функциональными характеристиками ES, были получены путём слияния соматических клеток с ES («Анализ полногеномной транскрипционной активности, активации репортерного гена, экспрессии аллель-специфического гена и метилирования ДНК показал, что соматический геном был перепрограммирован в эмбриональное состояние» [33]).

В отдельных случаях предполагаемая связь между старением и конкретной причиной, по-видимому, противоречит доказательствам. Например, в случае гипотезы о том, что на старение влияет более быстрый метаболизм, учитывая, что потребности полета требуют ускоренного метаболизма, этому тезису противоречит наблюдаемая у птиц поразительная продолжительность жизни по сравнению с млекопитающими («Максимальная продолжительность жизни у птиц ... существенно длиннее, чем у млекопитающих сопоставимого размера и активности» [29]).

В целом, говоря о причинном приоритете старения или, наоборот, клеточных повреждений разного типа, важно помнить, что утверждает Fossel [34] на основе результатов многих работ: «Клетки стареют не из-за износа, а потому, что они допускают изнашивание из-за изменённого паттерна экспрессии генов» (стр. 53); «клетки не стареют, потому что они повреждены, но допускают повреждение, потому что они стареют» (стр. 55).

Однако в целом теории накопления повреждений не объясняют различий в скорости старения, обусловленных предполагаемым вредным фактором, и не объясняют существование видов с «незначительным старением».

Общий аргумент против теорий неадаптивного старения и в поддержку противоположного тезиса. Фактор, общий для всех упомянутых ранее теорий, заключается в том, что старение всегда интерпретируется как нечто, противопоставляемое отбору, поскольку оно неизбежно вредно. В соответствии с этими теориями, если внешняя смертность (т.е. базовый уровень смертности, отличный от повышения уровня смертности из-за старения) высока, сила естественного отбора, направленная против естественного старения, действует менее эффективно, и поэтому теоретический прогноз состоит в том, что старение происходит раньше и сильнее: «Предполагается, что основным определяющим фактором в эволюции долголетия будет уровень внешней смертности. Если этот уровень высок, ожидаемая продолжительность жизни в дикой природе коротка, сила отбора быстро ослабевает, эффекты вредных генов накапливаются в более раннем возрасте, а отбор на высокий уровень соматического поддержания слаб. Следовательно, прогнозируется, что организм будет жить недолго ... И, наоборот, если уровень внешней смертности низок, отбор, как предсказано, отсрочит вредные генные эффекты и направит большие инвестиции в создание и поддержание прочной сомы» [13].

Первая теория, которая, используя точную теоретическую модель, предлагала старение как адаптивный феномен, с точки зрения надывидуального отбора, предсказывала прямо противоположное, а именно: при прочих равных условиях при более высоких уровнях внешней смертности старение будет откладываться, что приведёт к увеличению продолжительности жизни, и что противоположное произошло бы при более низких уровнях внешней смертности («эффект Мафусаила» [3]). Аналогичный прогноз был предложен в других теоретических моделях, в которых старение было предложено как адаптивное явление, которому способствует естественный отбор на надывидуальном уровне [35–37]. Это, казалось бы, парадоксальное теоретическое предсказание можно объяснить в нематематических терминах простыми рассуждениями. Если старение, с точки зрения естественного отбора, положительно при определённых экологических условиях, но сдерживается недостатками, вызванными меньшей продолжительностью жизни,

то для вида будет оптимальным значение средней продолжительности жизни, при которой сбалансированы преимущества и недостатки старения. Средняя продолжительность жизни вида является следствием комбинированного действия старения (внутренней смертности) и внешней смертности. Если внешняя смертность выше, внутренняя смертность должна быть ниже, чтобы иметь вышеупомянутое оптимальное значение продолжительности жизни. Напротив, если внешняя смертность ниже, то внутренняя смертность должна быть выше, т.е. требуется более быстрое старение, если нужно достичь указанного выше оптимального значения.

Следовательно, мы имеем два противоположных теоретических предсказания в адаптивной и неадаптивной теориях старения. Однако в работе, основанной на наблюдениях в дикой природе [14], была описана обратная корреляция между внешней смертностью и ритмами старения, в соответствии с предсказанием адаптивных теорий старения и в противоположность тому, что предсказывали неадаптивные гипотезы старения. Это подчёркивалось и в других работах [6, 38, 39], но до настоящего времени нет работ, предлагающих альтернативную интерпретацию вышеупомянутых данных, которая могла бы быть совместима с неадаптивными теориями старения.

Существование механизмов старения в соответствии с тезисом о старении как о запрограммированном явлении. Современная наука фундаментально и прочно основана на экспериментальных данных. Судя по всему, даже лучшие теоретические аргументы и теории, которые кажутся совместимыми с фактами, не могут рассматриваться как самостоятельные научные теории при отсутствии чётких и бесспорных экспериментальных доказательств и подтверждений. Следовательно, хотя то, что было сказано до сих пор, может показаться подкрепляющим тезис о старении как о запрограммированном явлении (т.е. адаптивном и в рамках концепции феноптоза), вопреки противоположному тезису, первую гипотезу следует считать неопределённо обоснованной без поддержки однозначно интерпретируемых экспериментальных данных, подтверждающих её и в то же время фальсифицирующих противоположный тезис о старении как о незапрограммированном явлении. Следует подчеркнуть, что эта концепция также применима к противоположной общей идее старения как неадаптивного феномена и к всевозможным разнообразным теориям, которые подпадают под этот тезис, иногда представляемый как

надёжное научное объяснение старения (например, теории 1–3, обсуждаемые выше, дают дополнительные объяснения того, почему происходит старение) [13].

В связи с этим возможен принципиальный отличительный элемент между теориями, интерпретирующими старение как вредное явление, недостаточно противостоящее отбору, и противоположными теориями, интерпретирующими старение как адаптивный феномен. Для второго тезиса абсолютно необходимы специфические механизмы, генетически детерминированные и регулируемые, которые определяют и модулируют старение.

Гипотетическое существование таких механизмов, если бы они были описаны, продемонстрированы и подтверждены достоверными и разнообразными экспериментами, явилось бы необходимым и фундаментальным доказательством тезиса о старении как приспособительном феномене, т.е. как особой форме феноптоза. Действительно, возможное существование механизмов, которые каким-то образом постепенно ухудшают способность к выживанию, было бы доказательством старения как адаптивного и запрограммированного явления. Напротив, эти механизмы потребовали бы рациональных и веских обоснований, если бы противоположный тезис о старении как о неадаптивном явлении все же можно было бы считать правдоподобным.

В то же время можно привести сложный и изоциренный механизм, который, по-видимому, объясняет, как определяется старение. Этот механизм, описанный в двух недавно опубликованных работах [40, 41], определяется как «субтеломерно-теломерная теория старения». Он вытекает из предыдущей теории, определяемой как «теломерная теория старения», и является результатом десятилетий работы многих исследователей, большинство из которых не стремились так или иначе описать молекулярные и клеточные механизмы, лежащие в основе старения как запрограммированного явления. Действительно, исследователи, которые внесли и продолжают вносить большой вклад в описание этих предполагаемых механизмов старения, часто являются сторонниками противоположного тезиса, утверждающего, что таких механизмов не существует. Например, Hayflick [11], долгое время являвшийся убеждённым сторонником тезиса о старении как неадаптивном явлении, впервые продемонстрировал пределы дубликации клеток [42], ранее считавшиеся несуществующими, но являющиеся фундаментальными для механизмов старения.

В настоящей работе вместо излишнего повторения всего того, что было изложено в двух цитированных выше работах [40, 41], будут намечены три основных фазы развития субтеломерно-теломерной теории, а также некоторые основные особенности предлагаемого механизма, в частности те, которые кажутся несовместимыми с тезисом о старении как неадаптивном и незапрограммированном явлении.

Фаза 1) Теория теломеры. В 1961 г. была опубликована ключевая работа, в которой было показано, что нормальные неопухолевые клетки ограничены в своей способности к дублированию [42]. Что касается этого предела, спустя десять лет Olovnikov [43] заметил, что фермент, катализирующий дублирование молекулы ДНК, не осуществляет репликацию небольшого концевых участка молекулы. Поэтому молекула ДНК при каждой её дубликации укорачивается, и это может быть рациональным объяснением ограничения способности к дубликации.

Вскоре тот же автор указал, что для оправдания большей способности к дубликации или отсутствия пределов дубликации стволовых и зародышевых клеток необходим фермент, чтобы частично или полностью восстановить после дубликации клетки нереплицируемый участок молекулы ДНК [44]. Этот фермент (впоследствии названный теломеразой) был выделен 12 лет спустя [45].

Серия открытий привела к появлению гипотезы, которая, как казалось, объясняет старение. Последовательное укорочение концевых участков молекул ДНК (теломер) может служить оправданием прогрессирующих клеточных изменений, в том числе запуска механизма клеточного старения (см. ниже) и последующего нарушения деятельности всего организма в целом, а именно, старения. Однако этой теории, которую можно определить как «теломерную теорию старения», противоречили некоторые экспериментальные данные.

• При сравнении между разными видами не было выявлено корреляции между длиной теломеры и продолжительностью жизни [46]. Например, у людей теломеры короче, чем у мышей и хомячков, но люди живут дольше [47]. Кроме того, между клетками клонированного животного, полученными из соматической клетки донора, и донорскими клетками длины теломеры были разными в первой половой клетке каждого организма, но продолжительность жизни оказалась одинаковой [48, 49]. Эти свидетельства и другие экспериментальные доказательства того же типа (см. также книгу Fossel [34], стр. 59–61) противоречили правдоподобию теломерной теории.

• В синхронно делящихся клеточных культурах при достижении определённого критического количества дубликаций (т.е. при достижении критического укорочения теломеры) не происходил запуск процесса клеточного старения, но появлялась, как явление, прогрессивно возрастающая вероятность прекращения дубликации, коррелирующая с укорочением теломер, но не определяемая критическими уровнями их укорочения [50].

• Клетки, не демонстрирующие дубликации и обновления в организме (многолетние клетки, например, большинство нейронов), и, следовательно, без какого-либо укорочения теломер стареют, как и обновляющиеся клетки.

Следовательно, теломерная теория оказалась неподходящей для объяснения старения и могла бы в лучшем случае объяснить некоторые особенности этого феномена.

Фаза 2) Субтеломерно-теломерная теория её первой формулировке. Затем была предпринята попытка преодоления недостатков теломерной теории путём допущения фундаментальной роли части молекулы ДНК, примыкающей к теломере, а именно субтеломеры [34, 51], и это предложение было определено как «субтеломерно-теломерная теория» [6, 40, 52].

Эта теория основана главным образом на двух явлениях: (1) в дрожжевых клетках гены, вставленные в субтеломерное положение, в определённых условиях репрессируются [53]; (2) у дрожжей, которые являются одноклеточными организмами, теломераза в диких штаммах всегда находится в активном состоянии, и, следовательно, теломера не укорачивается при каждой дубликации. Каждая клетка делится на две клетки, одна из которых называется материнской клеткой, а другая – дочерней клеткой. В клетках материнской линии при каждой дубликации происходит накопление на субтеломере определённых молекул, внехромосомных рибосомных колец ДНК (ERC), с прогрессирующим ингибированием субтеломеры, определяющим торможение бесчисленных клеточных функций и возрастающим риском клеточного старения, что у дрожжей приводит к апоптозу, т.е. гибели клетки [54]. Кроме того, в мутантных дрожжевых клетках *tlc 1Δ*, теломераза которых неактивна, в клетках дочерней линии, в которых не происходит накопления ERC, в связи с укорочением теломеры при каждой дубликации, наблюдаются клеточные изменения, не отличимые от таковых клеток материнской линии [55].

Эти экспериментальные результаты и другие, которые для краткости здесь не описаны, привели к предположению, что существует

«...гетерохроматиновый “капюшон”, который покрывает теломеру и переменную длину субтеломерной хромосомы ... По мере укорочения теломеры капюшон соскальзывает далее вниз по хромосоме ... (размер гетерохроматинового капюшона не изменяется, и он просто перемещается вместе с укорачивающимся концевым участком) ... в результате происходит изменение картины транскрипции в участках хромосомы, которые прилегают к теломерному комплексу, обычно вызывая сайленсинг (заглушение) транскрипции, хотя контроль теломер из-за близости ... Эти заглушенные гены могут, в свою очередь, модулировать другие, более отдаленные гены (или набор генов). Имеются некоторые прямые доказательства такой модуляции в субтеломере» ([34], стр. 50).

Короче говоря, субтеломерно-теломерная теория предлагала:

(1) существование теломерного капюшона с размером, установленным в первой клетке организма и смоделированным на основе длины теломеры, а не на основе заранее определённой длины;

(2) неизменность размера капюшона при каждой дупликации;

(3) этот капюшон у многих многоклеточных организмов и у человека в связи с укорочением теломеры при каждой дупликации (что происходит, если теломераза неактивна) скользил по субтеломерам и постепенно ингибировал всё больше конкретных гипотетических последовательностей, определяемых как «R»-последовательности (этот механизм также действовал в дочерней линии мутантных клеток дрожжей *tlc1Δ*, тогда как в клетках материнской линии диких штаммов ингибирование субтеломеры было обусловлено прогрессирующим накоплением ERC);

(4) репрессия гипотетических субтеломерных последовательностей «R» вызывала разные модуляции других последовательностей, регулируемых ими; это вызывало следующие модуляции многих других клеточных последовательностей с прогрессивным общим изменением клеточных функций;

(5) среди этих изменений также была прогрессивно возрастающая уязвимость к активации клеточного старения, «фундаментальной клеточной программы» [56], характеризующейся многими изменениями клеточных функций, включая клеточную секрецию (секреторный фенотип, ассоциированный со старением, SASP), которые наносят вред другим клеткам, а также органам и тканям, состоящим из этих клеток [57], и «связаны с воспалением и злокачественностью» [58].

Следует отметить, что у дрожжей клеточное старение вызывает апоптоз клетки и немедленную смерть. Напротив, у видов с многоклеточными организмами старение клеток вызывает устойчивость к апоптозу, но накопление стареющих клеток снижает общую работоспособность организма, вызывая или усугубляя болезненные состояния и риск смерти настолько, что элиминация стареющих клеток — активно изучаемый метод борьбы с различными видами заболеваний и даже со старением [52].

Субтеломерно-теломерная теория позволила преодолеть первые два из вышеупомянутых возражений теломерной теории (о третьем возражении см. ниже).

Во-первых, гипотеза о том, что размер капюшона был определён в первой клетке организма и не менялся при укорочении теломеры означала, что длина теломеры в первой клетке не имеет значения, а последующее укорочение теломеры при каждой дупликации имело решающее значение для работоспособности клеток и, следовательно, организма. Следовательно, связи между исходной длиной теломер и продолжительностью жизни больше не ожидалось, и это согласовывалось с доказательствами отсутствия корреляции между этими двумя значениями.

Во-вторых, поскольку субтеломерная репрессия была прогрессивной, из этого вытекала прогрессивно возрастающая уязвимость к клеточному старению, что объясняет, почему активация клеточного старения не была обусловлена критической длиной теломер, а была связана с прогрессивным укорочением теломер.

Субтеломерно-теломерная теория дала ответ и на другое возможное возражение. В каждой клетке много теломер (например, поскольку на каждую молекулу ДНК приходится 2 теломеры, на каждую хромосому — 2 копии молекулы ДНК, а хромосом — 23, следовательно, число теломер = $2 \times 2 \times 23 = 92$), и они не имеют одинаковой исходной длины (т.е. в первой клетке организма). Среди хромосом одной и той же клетки «длины теломер в пределах одной и той же клетки неоднородны, и определённые участки хромосом (chromosome arms) обычно имеют либо короткие, либо длинные теломеры» [59]. Более того, длина теломеры отличается у отдельных представителей одного вида, и эти различия наследуются от родителей [60].

Любой механизм, основанный на исходной абсолютной длине теломеры, привёл бы к появлению различных способов регуляции в зависимости от разной длины теломеры, и это было бы вероятным источником дисгармонии. Напротив, предполагая существование

капюшона, который был смоделирован в первой клетке организма по определённой длине каждой теломеры, для теломер разной длины одно и то же укорочение (в терминах потерянных пар нуклеотидов) определяло бы одинаковую степень субтеломерной репрессии.

Однако у субтеломерно-теломерной теории, хотя она выглядит рационально последовательной и с предсказаниями, согласующимися с фактами, имеется уязвимое место. Действительно, она предполагает существование определённых теломерных последовательностей (последовательностей «R»), о которой были косвенные теоретические подсказки, но не было прямых доказательств. Следовательно, теория может быть оценена как возможная, но не подтверждена прямыми доказательствами.

Фаза 3). Субтеломерно-теломерная теория и последовательности TERRA. Однако в то время, как последовательности «R» были предсказаны без получения прямых доказательств их существования, последовательности с предполагаемыми для них характеристиками уже были активным объектом изучения блестящих исследователей, которые, по-видимому, никоим образом не преследовали цели заполнить вышеупомянутый пробел в субтеломерно-теломерной теории.

Еще в 1990 г. в работе Brown et al. [61] были подробно описаны две субтеломерные последовательности, названные TelBam3.4 и TelSau2.0, с консервативными участками (длиной 1,6 т.п.н. и 1,3 т.п.н.), точно описанными Nergadze et al. [62].

Эти последовательности, определяемые как РНК, содержащие теломерные повторы (Telomeric Repeat-containing RNA, TERRA), здесь для краткости будут обозначаться «Т-последовательности»: (1) не кодируют белки; (2) однако они подвержены транскрипции с образованием последовательностей РНК (здесь для краткости называемые «Т-транскрипты»); (3) были описаны в клетках человека, а также в клетках мышей, рыбок данио (Zebrafish), растений и дрожжей (ссылки см. в обзоре Libertini et al. [40]).

Т-последовательности. У млекопитающих в результате действия фермента РНК-полимеразы II происходит запуск процесса транскрипции на промоторе в субтеломерном участке молекулы ДНК, и он продолжается в направлении мотивов теломерных повторов, включая транскрипцию некоторых из них [63–65]. Транскрипция Т-последовательностей начинается с субтеломерных промоторов, локализованных как минимум на двух третях концов хромосом [62, 66, 67].

«Первые идентифицированные субтеломерные промоторы человека содержат богатые динуклеотидами CpG островки ДНК общие для нескольких концов хромосом ... Эти островки CpG характеризуются наличием так называемых повторов 61-29-37, локализованных непосредственно перед сайтом начала транскрипции TERRA (Transcription Start Site, TSS) и на расстоянии ~1 т.п.н. от теломерного тракта» [68].

Т-последовательности являются общим признаком эукариотических клеток и «появляются в качестве новых ключевых игроков в нескольких важных биологических процессах» [68]. Было подчеркнуто, что «TERRA эволюционно консервативны у позвоночных» [69], и это подразумевает, что они, безусловно, выполняют очень важную функцию с древних времён.

«Охват чтения TERRA был высоким в субтеломерных областях почти всех хромосом, особенно на хромосомах 2, 9, 13, 18 и половых хромосомах, с мишенями, находящимися на расстоянии до десятков т.п.н. от теломерного повтора, ... TERRA также связывается во внутренних хромосомных областях и в генах, где предпочтение отдаётся интронам ... TERRA связывается с мишенями на хроматине по всему геному ... TERRA связывается с теломерами как в *цис*-, так и в *транс*-положениях в последовательностях генов или вблизи от них» [70].

Имеются «значительные изменения в экспрессии мишеней TERRA по сравнению с не-мишенями после деплеции TERRA ...», что указывает на то, что гены-мишени TERRA, с большей вероятностью, будут затронуты деплецией TERRA. Интересно, что субтеломерные гены-мишени постоянно подавлялись ... Внутренние гены-мишени могли либо активироваться, либо подавляться ... В геноме эмбриональных стволовых клеток (ES) мыши мы идентифицировали тысячи сайтов связывания *цис*- и *транс*-хроматина» [70].

Т-транскрипты связываются со многими локусами, расположенными вне теломер, где некодирующие последовательности ДНК, вероятно, выполняют важные регуляторные функции, касающиеся экспрессии генов [70, 71].

«Подавляющее большинство сайтов связывания TERRA было обнаружено вне теломер, преимущественно в дистальных межгенных и интронных областях генома, где TERRA регулирует экспрессию генов» [68].

Было показано, что физическая нагрузка повышает уровень TERRA в биоптатах скелетных мышц здоровых молодых людей, и это соответствует идее о том, что физическая активность защищает от старения [67].

T-последовательности и защита теломер. В ES мышей деплеция T-транскриптов связана со снижением уровня защиты теломер [70, 71]. Блокирование транскрипции T-последовательности связано с изменениями кэпирующей функции, и после деплеции TERRA была показана потеря целостности теломер [70].

T-транскрипты противодействуют ATRX, особому белку, связанному с X-ассоциированным синдромом умственной отсталости при альфа-талассемии (alpha thalassemia mental retardation X-related syndrome), и важны для защиты теломер: «TERRA и ATRX имеют сотни общих генов-мишеней и функционально антагонистичны в этих локусах: если TERRA активирует, то ATRX подавляет экспрессию генов. На теломерах TERRA конкурирует с теломерной ДНК за связывание ATRX, подавляет локализацию ATRX и обеспечивает стабильность теломер» [70]. Ингибирование транскрипции T-последовательностей активирует механизмы ответа на повреждение ДНК на теломерах [72]. Делеция локуса 20q определяет сильное снижение уровня TERRA и последующую массивную реакцию на повреждение ДНК, что, по-видимому, является «демонстрацией в любом организме существенной роли TERRA в поддержании теломер» [73].

Характеристики T-последовательности, по-видимому, точно соответствуют субтеломерно-теломерной теории, которая предполагает существование «R»-последовательностей. Действительно, они расположены в субтеломерах, ингибируются в связи с укорочением теломер по отношению к исходной длине, имеют транскрипты, выполняющие регуляторные функции в отношении других регуляторных последовательностей, находящихся как вблизи, так и на удалении в молекуле ДНК, в которой они присутствуют, но также и в других молекулах ДНК в той же клетке. T-последовательности влияют различными способами на бесчисленные функции клеток, необходимы для стабилизации теломер и, следовательно, также для снижения вероятности активации клеточного старения; они широко распространены и эволюционно стабильны и поэтому, безусловно, выполняют очень важную функцию.

Короче говоря, T-последовательности — это последовательности «R», преобразованные из гипотезы в реальность. Что касается функционального значения T-последовательностей, то для любого возможного объяснения, отличного от того, что выражено субтеломерно-теломерной теорией, необходимо было бы предоставить обоснование того, почему последовательности, имеющие такое большое

значение для функционирования целой клетки, находятся в наиболее уязвимом для ингибирования положении в случае укорочения теломеры. Напротив, для субтеломерно-теломерной теории T-последовательности и последствия их уязвимого положения являются фундаментальной частью механизма постепенного саморазрушения организма, и они, в соответствии с определением, предложенным Скулачевым [1], полностью совместимы с гипотезой старения как формы феноптоза.

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МОДИФИКАЦИИ В ПРОЦЕССЕ СТАРЕНИЯ

Что касается эпигенетических модификаций при старении, следует учитывать ряд фактов.

- Существует строгая корреляция между возрастом и эпигенетическими модификациями ДНК, которые также зависят от типа клеток и тканей [74, 75]. В частности, среди возрастных эпигенетических модификаций наиболее хорошо изучено метилирование цитозина-5 в составе динуклеотидов CpG, определяемое как метилирование ДНК [76, 77].

- Эпигенетические модификации в результате метилирования ДНК практически равны нулю для эмбриональных клеток и для индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, при этом они растут пропорционально числу клеточных дупликаций [76, 77]. Следует подчеркнуть, что эти эпигенетические изменения являются обратимыми, о чём свидетельствует тот факт, что трансформация взрослых соматических клеток в iPSC возвращает эти изменения к значениям, практически равным нулю, как для эмбриональных клеток [76].

- Последовательности CpG, которые показывают метилирование ДНК в зависимости от возраста [78–81], ограничены определёнными частями ДНК, в частности участками ДНК, где нуклеотиды CpG составляют примерно 1 на 10 п.н., определяемыми как CpG-островки (CGI). Они составляют только 2% от всей ДНК [74] и часто совпадают с сайтами начала транскрипции генов [82]. Метилирование этих CGI коррелирует с сайленсингом присутствующих в них промоторов [83], и, наоборот, деметилирование восстанавливает экспрессию промотора [84].

- Возрастное метилирование ДНК CGI в отдельных случаях представляет собой гипометилирование, а в других — гиперметилирование [80, 81, 85, 86].

- Для человека эти типы возрастного метилирования ДНК были предложены в качестве

индикаторов для оценки возраста. Наиболее достоверный индикатор [76] показывает корреляцию с возрастом, равную 0,96, и ошибку в 3,6 года.

• Подобные эпигенетические модификации задокументированы для млекопитающих в целом. При исследовании 128 видов млекопитающих (с максимальной продолжительностью жизни от 3,8 до 211 лет и аналогичным большим разнообразием веса взрослой особи) был предложен аналогичный показатель с корреляцией более 0,96 и медианной относительной ошибкой менее 3,5% [77].

• CGI кажутся эволюционно консервативными до такой степени, что это позволяет определить вышеупомянутый надёжный индекс, который действителен для млекопитающих в целом [77].

• Кроме метилирования ДНК, существуют и другие, связанные с возрастом, эпигенетические изменения (например, «снижение общих уровней коровых гистонов, изменения паттернов посттранскрипционных модификаций гистонов, ... замена канонических гистонов на их модифицированные варианты и изменение экспрессии некодирующих РНК» [87], метилирование гистоновых белков, ремоделирование нуклеосом, редукция гетерохроматина, изменение гистоновых меток [88, 89]). Однако в отношении этих эпигенетических изменений не было предложено ни одного надёжного индикатора, такого как два упомянутых выше.

Что касается корреляции между эпигенетическими модификациями и Т-последовательностями, мы имеем следующие данные:

• субтеломерные CGI «способствуют транскрипции молекул TERRA» [62];

• «уровень метилирования субтеломерной ДНК ... понижается пропорционально укорочению теломеры у мышей *Terс^{-/-}*» [90];

• у мышей метилирование субтеломеры связано с укорочением теломеры [91]; «кроме того, отмена основных эпигенетических регуляторов, таких как гистоновые метилтрансферазы и ДНК-метилтрансферазы, коррелирует с потерей контроля над длиной теломеры, а укорочение теломеры до критической длины влияет на эпигенетический статус теломеры и субтеломеры» [91];

• «у здоровых людей из контрольной группы, а также у больных саркоидозом было показано снижение доли длинных теломер (> 9,4 т.п.н.) и увеличение доли коротких теломер (< 4,4 т.п.н.) при старении, что сопровождалось относительным увеличением доли длинных теломер с гиперметилированием субтеломеры и коротких теломер с гипометилированием субтеломеры;

это даёт основание полагать, что возрастное укорочение теломеры связано с гипометилированием её субтеломеры» [92];

• в лейкоцитах человека «более короткие теломеры, связанные со сниженным уровнем метилирования множественных сайтов цитозина, расположены в пределах 4 млн п.н. от теломер ... значительное увеличение количества положительно ассоциированных метилированных сайтов CpG в субтеломерных локусах (до 4 млн п.н. вблизи теломеры) ($p < 0,01$)» [93]; укорочение теломеры изменяет экспрессию генов и увеличивает тяжесть и риск возникновения возрастных заболеваний [93].

Это означает, что с более длинными теломерами происходит большее деметилирование Т-последовательностей, а с более короткими теломерами – больше метилирование Т-последовательностей, что должно определять меньшую и большую репрессию Т-последовательностей соответственно.

Что касается эффектов, которые Т-последовательности (предположительно, являющиеся регуляторами первого уровня) оказывают на другие регуляторные последовательности (предположительно, регуляторы второго уровня), важным ключом является то, что сообщается (1) для клеток в отношении количества дупликаций; и (2) для клеток в состоянии клеточного старения, где должна быть максимальная репрессия Т-последовательностей:

• в случае мезенхимных стволовых клеток (MSC – mesenchymal stem cells) «экспансия этих клеток оказывает очень последовательное влияние на профили метилирования ДНК»; «517 CpG-сайтов постоянно отличались метилированием в ранних и поздних пассажах» [94];

• клеточное старение в случае MSC ассоциировано с гистоновыми метками старения, такими как триметилирование специфических мишеней и метилирование ДНК в определённых CGI [94];

• в старых MSC в одних CpG-сайтах наблюдается гипометилирование, а в других – гиперметилирование: «почти треть CpG-сайтов выявляют возрастные изменения по метилированию ДНК, из которых 60% становятся гипометилированными, а 40% – гиперметилируются при старении» [95].

Эти данные указывают на то, что существует связь между репрессией Т-последовательностей и рядом эпигенетических модификаций ДНК и что, таким образом, эти эпигенетические модификации, безусловно, связанные с возрастом, не первичны и не коррелируют с гипотетическими случайными факторами, а вторичны по отношению к более или

менее подавленной активности Т-последовательностей.

Следовательно, когда старение правильно описывается как эпигенетический феномен, это должно быть интегрировано, выделив зависимость этого явления от регуляции (т.е. степени репрессии) Т-последовательностей.

Тот факт, что старение является эпигенетическим явлением, не должен удивлять или заставлять нас думать, что это исключение в общей организации организма или, что ещё хуже, оно определяется случайными факторами.

Когда было обнаружено, что синтез белков связан с определёнными участками молекулы ДНК (генами), способными кодировать белок, первоначально считалось, что ДНК в основном состоит из генов. Последующее открытие, что очень большая часть ДНК не кодирует белок, даже привело к утверждениям о существовании «мусорной» ДНК [96]. Впоследствии было отмечено, что виды с огромной разницей в степени сложности их организации тем не менее имели одинаковое количество генов (например, «Научное сообщество было поражено тем, что количество генов человека равно количеству генов довольно простой нематоды» [97]). Проекты «Геном человека» и «ENCODE» показали, что «потенциал кодирования белков генома млекопитающих крайне ограничен ..., хотя кодируется только 2% генома, более 90% транскрибируется; эта транскрипционная активность в значительной степени продуцирует длинные некодирующие РНК (lncRNA), функции которых в основном остаются неизвестными» [70].

Всё это означает, что большая часть «программы», определяющей функции и развитие организма, находится не в той малой части ДНК, кодирующей белковые последовательности, а в оставшейся части ДНК, которая подвергается транскрипции, но не кодирует белки, и которая посредством механизмов репрессии/активации, повышающей/понижающей регуляции участков ДНК, не кодирующих или кодирующих белок, регулирует каждую характеристику организма как на клеточном уровне, так и в процессах развития и функционирования всего организма.

Следовательно, вполне вероятно, что каждая функция клетки и всего организма обычно достигается за счёт эпигенетических модификаций (т.е. регуляции), и неудивительно, что старение также является следствием эпигенетических модификаций. Следует также отметить, что определение старения как эпигенетического явления вряд ли совместимо с интерпретацией старения как результата случайного накопления разного рода повреждений.

КЛЕТОЧНОЕ СТАРЕНИЕ

Клетка в состоянии, определяемом как клеточное старение, представляет собой клетку, в которой активирована специфическая «фундаментальная клеточная программа» [56], а не общее название «старая клетка». Старение клеток запускается в нормальных клетках различными факторами [56], такими как укорочение теломеры [98], и характеризуется: (1) репликативным старением, т.е. снижением способности клеток к репликации [99, 100]; (2) специфическими изменениями клеточных функций [100–102] с большими модификациями транскрипции («связанное со старением ремоделирование хроматина приводит к глубоким транскрипционным изменениям» [103]); (3) специфическими изменениями процесса внеклеточной секреции (секреторный фенотип, связанный со старением, SASP) [58, 104]; (4) устойчивостью к апоптозу [102, 105].

При идентификации стареющих клеток, используя экспрессию белка p16^{Ink4a}, было показано, что с возрастом увеличивается абсолютное количество этих клеток и их доля в общем количестве клеток [106, 107], причём их количество чётко связано с проявлениями старения и возрастными болезнями [108, 109].

Избирательное удаление стареющих клеток улучшает состояние и снижает проявления старения и возрастных заболеваний [109, 110]. Таким образом, их селективная элиминация соответствующими препаратами или комбинациями препаратов, сенолитиками, является важной и актуальной терапевтической целью [110, 111]. Эта тема подробно рассмотрена в обзоре Libertini et al. [52].

Очевидно, что стареющие клетки вредны для индивида, в котором происходит их накопление, и они сильно способствуют проявлениям старения и возрастных болезней. По субтеломерно-теломерной теории, эти клетки составляют основную часть повреждений, возникающих в результате укорочения теломер и последующей репрессии субтеломер, которые, среди прочего, повышают вероятность активации программы клеточного старения. Для теорий, интерпретирующих старение как неадаптивное и незапрограммированное явление, важно обосновать клеточное старение иначе, чем считать этот процесс частью механизма саморазрушения (т.е. старения).

Единственное альтернативное объяснение клеточного старения состоит в том, что это явление, поскольку оно каким-то образом препятствует пролиферации клеток, представляет собой общую защиту от рака [112, 113].

Более того, учитывая повреждения, вызываемые клеточным старением, это считалось эволюционным компромиссом между его вредом и необходимостью противодействия раковой пролиферации, т.е. хороший пример антагонистической плейотропии [114].

Есть много фактов и аргументов, которые противоречат этому предположению (подробно см. в обзорах Libertini et al. [52] и [6], §5.4 «Ограничения способности к дублированию клеток и другие эффекты системы теломера—субтеломера—теломеразы, объясняемые как общая защита от рака»). Приведём примеры.

- Старение клеток, как часть изменений, определяемых как SASP, обуславливает секрецию «множества факторов, связанных с воспалением и злокачественностью» [58].

- У мышей избирательная элиминация стареющих клеток определяла, помимо увеличения продолжительности жизни и меньшего количества возрастных изменений, также задержку прогрессирования рака [107].

- Различные исследования у людей показали связь между короткими теломерами и риском развития рака [115, 116].

- У нормальных мышей индуцированная экспрессия теломеразы замедляла старение и увеличивала продолжительность жизни, но не увеличивала риск развития рака [117].

- У дрожжей клеточное старение вызывает немедленный апоптоз, т.е. гибель клеток [118], и это не может иметь никакого противоракового значения у одноклеточных видов.

- Детальный анализ показал, что у 175 видов животных, исследованных в дикой природе, наблюдается прогрессирующее возрастное увеличение смертности, что значительно сокращает среднюю продолжительность жизни [15]. Однако документально подтверждено, что ни для одного из видов смертность от рака существенно не влияет на увеличение смертности в дикой природе. Представляется нелогичным предполагать, что клеточное старение является эффективной защитой от рака, поскольку оно снижает способность клеток к дубликации в возрасте, когда увеличение смертности резко снижает количество выживших, а рак всё ещё не оказывает существенного влияния на это количество выживших. Этот аргумент уже предлагался на основе данных, полученных при изучении человеческой популяции в дикой природе: «Это полностью опровергает гипотезу о том, что снижение способности клеток к размножению является защитой от рака: это всё равно, что утверждать, что защита против смертельной болезни имеет эффект массового убийства до того, как болезнь начнет убивать» [119].

- Однако «если клеточное старение предназначено для отсекаания раковых клеточных линий, то почему стареющие клетки остаются живыми и токсичными? Вместо этого их можно было бы запрограммировать таким образом, чтобы они были «хорошими гражданами» и демонтировали себя посредством апоптоза, чтобы облегчить переработку белков и питательных веществ; тот факт, что стареющие клетки выделяют яды, полностью согласуется с теорией о том, что клеточное старение является формой запрограммированной смерти организма» [120].

Короче говоря, клеточное старение, важная часть механизмов старения в контексте субтеломерно-теломерной теории и общей гипотезы запрограммированного адаптивного старения, не находит оправдания для принятия идеи о том, что старение является неадаптивным явлением.

ПОСТЕПЕННОЕ КЛЕТОЧНОЕ СТАРЕНИЕ

Субтеломерно-теломерная теория утверждает, что по мере укорочения теломеры происходит прогрессирующее ингибирование субтеломер, т.е. T-последовательностей. Это вызывает: (1) прогрессирующее увеличение возможности активации клеточного старения; и (2) прогрессирующее изменение клеточных функций, явление, определяемое как «постепенное клеточное старение», которое следует отличать от клеточного старения [121].

Имеются доказательства, подтверждающие существование постепенного клеточного старения как феномена, отличного от клеточного старения.

- *In vitro* мезенхимные стволовые клетки демонстрируют постепенные изменения экспрессии мРНК наряду с «последовательным изменением глобальной экспрессии генов ... Эти изменения не ограничиваются более поздними пассажами, а постоянно приобретаются с увеличением числа пассажей» [122]. Кроме того, пропорционально числу дубликаций, в MSC наблюдается постепенное изменение уровня метилирования ДНК (гипометилирование в одних участках и гиперметилирование — в других), чья величина может быть использована для расчёта количества дубликаторов [123–125].

- В работе о последствиях укорочения теломер Robin et al. [126] заявляют: «Наши результаты показали, что экспрессия подмножества субтеломерных генов зависит от длины теломер и что широко распространённые изменения

экспрессии генов индуцируются укорочением теломеры задолго до того, как теломеры укорачиваются, становятся скоростью-лимитирующим фактором деления клеток, или до того, как короткие теломеры инициируют передачу сигналов о повреждении ДНК. Эти изменения включают повышение и понижение уровня экспрессии генов».

При изучении постепенного клеточного старения необходимо избегать возможной путаницы из-за перекрывания в культуре эффектов постепенного клеточного старения в одних клетках и эффектов клеточного старения – в других. Эти трудности полностью удаётся избежать в культурах дрожжей – одноклеточных организмов, у которых старение клетки приводит к апоптозу, т.е. к гибели [127, 128]. У дрожжей в клетках материнской линии штаммов дикого типа (в которых теломераза всегда активна и, следовательно, не происходит укорочение теломеры при каждой дупликации [129]) репрессия субтеломеры вызвана накоплением ERC и, в зависимости от количества дупликаций, наблюдаются нарастающие функциональные изменения и предрасположенность к клеточному старению [127, 128]. Кроме того, в дрожжевых клетках мутантного штамма *tlc1Δ*, для которых характерна неактивная теломераза, при каждой дупликации происходит укорочение теломеры. Подавление субтеломеры, вероятно, вызвано соскальзыванием субтеломерного капюшона на теломеру: в клетках дочерней линии, в которой нет накопления ERC, имеется транскриптом, сходный с транскриптомом клеток материнской линии с таким же числом предшествующих дупликаций и, следовательно, со сходными функциональными изменениями [55].

Феномен постепенного старения клеток можно интерпретировать как действие случайных дегенеративных факторов, полностью выходящих за рамки гипотетической программы старения. Однако функциональные изменения MSC, связанные с предшествующим числом дупликаций, могут быть устранены путём их перепрограммирования в iPSC [130]. Эти iPSC независимо от возраста донора и источника клеток показывали омоложенный профиль [130]. Кроме того, для индуцированных MSC (iMSC) «метилирование ДНК, связанное с возрастом, было полностью стёрто, и iMSC вновь демонстрировали связанный со старением профиль метилирования ДНК во время культивирования *in vitro*» [95]. Из iPSC можно получить MSC с меньшим количеством эпигенетических изменений и улучшенными клеточными функциями [131].

Следует принять во внимание, что постепенное клеточное старение, по-видимому, является следствием репрессии определённых последовательностей (Т-последовательностей) в субтеломерном положении, которое критически подвержено этой репрессии. Поскольку постепенное клеточное старение снижает функциональную эффективность клетки (и организма, если клетка является частью многоклеточного организма), этот феномен не может быть оправдан с точки зрения индивидуального отбора, и необходимо выдвинуть предположение о его преимуществе, с точки зрения надиндивидуального отбора, в контексте более общей фенотипической программы.

ПРЕДЕЛЫ ДУПЛИКАЦИИ КЛЕТОК И АТРОПИЧЕСКИЙ СИНДРОМ

Соматические клетки в значительной степени подвержены клеточному обновлению. Фактически, клетки, которые постоянно умирают от некроза (вызванного травматическими событиями, инфекцией или воспалением), а также от апоптоза или других типов запрограммированной гибели ([6], §6.1.2 «Изменения клеточного оборота»), постоянно заменяются. Для некоторых типов клеток обновление происходит очень медленно («кость ... у человека обновляется в течение примерно десяти лет» [132]; если бы «умирающие миоциты не замещались постоянно, весь орган исчез бы примерно через 4,5 года» [133]), в то время как для других типов клеток характерно очень быстрое обновление (например, в «кишечном эпителии ... клетки заменяются каждые три–шесть дней» [132]).

У некоторых типов клеток (большинство типов нейронов, включая фоторецепторы сетчатки глаза) совсем нет обновления, и они считаются многолетними клетками, но их жизнеспособность зависит от других клеток, которые подвержены обновлению [134].

Можно полагать, что, в частности, для типов клеток с быстрым обновлением прогрессирующее укорочение теломеры является критическим элементом, который может быть основой старения. Однако некоторые исследования выявили более сложную ситуацию, которая вполне объяснима.

В обзоре Takubo et al. [135] исследовано уменьшение длины теломер у людей от новорожденных до долгожителей. Для некоторых тканей с типами клеток, демонстрирующими отсутствие или очень низкие темпы обновления

(например, мозговая ткань и сердечная мышца), практически не обнаруживается уменьшение длины теломер, измеренное в парах нуклеотидов, потерянных за один год.

В том же обзоре подчёркивается, что: (1) для некоторых типов клеток уменьшение длины теломер было критичным (например, для гепатоцитов скорость укорочения составляла 120 п.н./год, а средняя длина теломеры уменьшалась с $13,7 \pm 2,5$ т.п.н. у новорожденных до $8,7 \pm 1,4$ т.п.н. у долгожителей); и (2) для многих тканей темпы редукции в год имели промежуточные значения, в основном в пределах 20–60 п.н. в год.

Другое исследование показало, что в четырёх типах клеток или тканей с совершенно разной скоростью обновления клеток (скелетные мышцы, лейкоциты, кожа и подкожный жир) скорости укорочения теломер были одинаковыми [136]. Длина теломер оказалась одинаковой в разных тканях и органах человеческого плода [137]. Длина теломеры в SC кроветворных типов клеток с высокой скоростью обновления короче, чем у SC других типов клеток с низкой скоростью обновления [136].

Эти результаты позволили предположить, что в период роста стволовые клетки-предшественники каждого типа клеток подвергаются экспансии (т.е. пролиферации), которая пропорциональна последующим ритмам клеточного обновления (например, умеренная пролиферация SC скелетной мышцы с медленным обновлением и массивная экспансия SC гемопоэтических клеток с высоким уровнем обновления). Длина теломеры у каждого типа SC уменьшалась пропорционально степени их экспансии, в то время как на более поздних этапах жизни длина теломеры в разных типах клеток уменьшалась со сходной скоростью [136].

Более того, MSC пропорционально их экспансии, т.е. количеству дубликаций, демонстрировали последовательные эпигенетические изменения [94].

Эти факты, которые, безусловно, связаны с набором сложных механизмов регуляции, наряду с тем, что было описано для клеточного старения и постепенного клеточного старения, позволяют нам представить общую интерпретацию старения.

• Поскольку теломераза в SC неактивна, как и в эмбриональных клетках, всегда существует определённая вероятность того, что SC переходит в состояние клеточного старения, при котором происходит блокировка возможности дублирования [50]. Следовательно, с прогрессивным уменьшением числа стволовых клеток, способных к самовоспроизведению,

способности клеток к обновлению постепенно замедляются и снижаются.

• Помимо снижения способности клеток к обновлению из-за уменьшения количества SC, для различных типов клеток наблюдается прогрессивное увеличение числа клеток, (1) у некоторых из которых частичное укорочение теломер вызывает изменения процесса постепенного старения клеток; (2) для других активация клеточного старения вызывает изменения клеточных функций и аномальную секрецию (SASP), которые влияют на функционирование следующих клеток. По этим причинам для противодействия некоторым проявлениям старения и возрастным заболеваниями была предложена стратегия избирательного устранения клеток, изменённых клеточным старением, которая является предметом многочисленных исследований [52].

• Что касается многолетних клеток (большинство нейронов, включая фоторецепторы сетчатки и волокна хрусталика глаза), то они зависят от специализированных клеток, подверженных обновлению (определённые типы глиоцитов, включая пигментные клетки сетчатки и клетки эпителия хрусталика). Эти трофические клетки подвержены явлениям старения, характерным для других обновляющихся клеток, и их снижение определяет старение многолетних клеток [134, 138, 139].

Эти явления вызывают прогрессирующее изменение всех тканей и органов, которое было описано как «атрофический синдром» и характеризуется: а) снижением средней способности клеток к дублированию и замедлением обновления клеток; б) уменьшением количества клеток (атрофия); в) замещением отсутствующих специфических клеток неспецифическими клетками; г) гипертрофией остальных специфических клеток; д) изменёнными функциями клеток с укороченными теломерами или находящимися определённо в нециклическом состоянии; е) изменениями окружающей среды и клеток в зависимости от функциональности стареющих или отсутствующих клеток; ж) уязвимостью к раку из-за нестабильности, вызванной теломерой с нарушенной функцией» [140].

ФИКСИРОВАННЫЙ РАЗМЕР ТЕЛОМЕРНОГО ГЕТЕРОХРОМАТИНОВОГО КАПЮШОНА

Теломерный гетерохроматиновый капюшон подробно обсуждается в статье Libertini et al. [41], в частности, подчёркивая

характеристики, требуемые субтеломерно-теломерной теорией для теломерного капюшона, его функции и его возможную структуру (белки RAP1, TIN2, TRF1, TRF2, TPP1 и POT1, которые образуют цепочку шелтериновых комплексов). Кроме того, рассматриваются вопросы, которые ещё нуждаются в пояснении.

Важно подчеркнуть существенный момент. Субтеломерно-теломерная теория требует, чтобы капюшон для каждой теломеры имел размер, определяемый в первой клетке организма в соответствии с длиной теломеры, и чтобы этот размер не менялся в последующих клеточных дупликациях даже при укорочении теломеры. Если эта теория верна, возможное предсказание состоит в том, что количество шелтериновых белков в клетке не должно быть связано с общей длиной теломер, а должно быть постоянным. Наоборот, если размеры капюшона уменьшаются, должно происходить уменьшение количества шелтериновых белков, связанное с укорочением теломер.

Однако было показано, что количество и стехиометрия белков, составляющих шелтериновые комплексы, «сходны в первичных и трансформированных клетках и ... не коррелируют с длиной теломеры» [141].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Срок жизни живых существ обычно определяется или находится под влиянием одной из различных известных форм запрограммированной смерти [7], впоследствии включённых в объединяющий необходимый неологизм и понятие феноптоза [1].

Исключением из этого правила являются организмы, которые делятся на две совершенно равные особи-потомки (например, бактерии), и виды, у которых возрастная смертность не увеличивается (виды с «незначительным старением») [7].

В этом общем контексте не следует удивляться тому, что старение, проявляющееся у человека и у многих других знакомых нам видов, является ещё одной формой феноптоза. Более того, существование видов с незначительным старением свидетельствует о том, что старение не является обязательной и общей судьбой для всех видов, даже если существуют родственные виды, для которых старение является обычным [7].

Принятие идеи о том, что старение может быть формой феноптоза, сразу наталкивается

на возражения о необходимости доказывать существование специфических, генетически детерминированных и модулируемых механизмов, вызывающих старение. Вышеизложенное показывает, что существование таких механизмов представляется достаточно задокументированным, чтобы сделать эту гипотезу весьма правдоподобной и заслуживающей дальнейшего изучения. Также для противоположного тезиса о том, что старение представляет собой результат кумулятивного прогрессирующего эффекта разнородных повреждений, должны быть обоснованы различные противоречия этого тезиса и некоторые особенности явлений, предлагаемых в рамках механизмов старения.

Однако в целом сопротивление представлению о старении как о адаптивном и запрограммированном явлении и упорная защита противоположной гипотезы, даже при недооценке аргументов и эмпирических данных, выявляющих различные противоречия, имеют более глубокие корни.

Современная биология прочно базируется на позициях дарвинизма, т.е. на эволюции путём естественного отбора и всего, что из него следует. Дарвинизм в своей первоначальной (но не исключительной!) форме, предложенной Чарльзом Дарвином, основан на индивидуальном отборе. Теоретические аргументы и эмпирические данные убедительно подводят нас к мысли, что дарвинизм должен быть расширен для рассмотрения также механизмов надиндивидуального отбора, который не исключал и сам Дарвин.

Если мы примем эту идею, преодолев чрезмерно узкую концепцию дарвинизма, многие вещи станут более понятными. В этом контексте концепция феноптоза, одной из форм которого является старение, кажется совершенно естественной и представляет собой ключевой сигнал инноваций в контексте дарвинизма.

Вклад авторов. Первый автор взял на себя инициативу в написании рукописи. Все авторы обсудили результаты, предоставили критические отзывы и внесли свой вклад в окончательный вариант рукописи.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или любой другой сфере.

Соблюдение этических норм. Эта статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных, проведённых кем-либо из авторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Skulachev, V. P. (1997) Aging is a specific biological function rather than the result of a disorder in complex living systems: biochemical evidence in support of Weismann's hypothesis, *Biochemistry (Moscow)*, **62**, 1191-1195.
2. Skulachev, V. P. (1999) Phenoptosis: programmed death of an organism, *Biochemistry (Moscow)*, **64**, 1418-1426.
3. Libertini, G. (1988) An adaptive theory of the increasing mortality with increasing chronological age in populations in the wild, *J. Theor. Biol.*, **132**, 145-162, doi: 10.1016/s0022-5193(88)80153-x.
4. Skulachev, V. P. (2002) Programmed death phenomena: from organelle to organism, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **959**, 214-237, doi: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb02095.x.
5. Libertini, G. (2012) Classification of phenoptotic phenomena, *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 707-715, doi: 10.1134/S0006297912070024.
6. Libertini, G., Corbi, G., Conti, V., Shubernetskaya, O., and Ferrara, N. (2021) Evolutionary Gerontology and Geriatrics – Why and How We Age, in *Advances in Studies of Aging and Health*, 2, Switzerland, Springer, doi: 10.1007/978-3-030-73774-0.
7. Finch, C. E. (1990) *Longevity, Senescence, and the Genome*, University of Chicago Press, Chicago.
8. Darwin, C. R. (1869) *Origin of Species*, 5th Edn., John Murray, London.
9. Darwin, C. R. (1871) *The Descent of Man, and Selection in Relation to Sex*, John Murray, London.
10. Kirkwood, T. B. (2005) Understanding the odd science of aging, *Cell*, **120**, P437-P447, doi: 10.1016/j.cell.2005.01.027.
11. Hayflick, L. (2000) The future of ageing, *Nature*, **408**, 267-269, doi: 10.1038/35041709.
12. Vaupel, J. W., Baudisch, A., Dölling, M., Roach, D. A., and Gampe, J. (2004) The case for negative senescence, *Theor. Popul. Biol.*, **65**, 339-351, doi: 10.1016/j.tpb.2003.12.003.
13. Kirkwood, T. B., and Austad, S. N. (2000) Why do we age? *Nature*, **408**, 233-238, doi: 10.1038/35041682.
14. Ricklefs, R. E. (1998) Evolutionary theories of aging: confirmation of a fundamental prediction, with implications for the genetic basis and evolution of life span, *Am. Nat.*, **152**, 24-44, doi: 10.1086/286147.
15. Nussey, D. H., Froy, H., Lemaître, J. F., Gaillard, J. M., and Austad, S. N. (2013) Senescence in natural populations of animals: widespread evidence and its implications for bio-gerontology, *Ageing Res. Rev.*, **12**, 214-225, doi: 10.1016/j.arr.2012.07.004.
16. Williams, G. C. (1957) Pleiotropy, natural selection and the evolution of senescence, *Evolution*, **11**, 398-411, doi: 10.2307/2406060.
17. Kirkwood, T. B., and Melov, S. (2011) On the programmed/non-programmed nature of ageing with in the life history, *Curr. Biol.*, **21**, R701-R707, doi: 10.1016/j.cub.2011.07.020.
18. Hamilton, W. D. (1964) The genetical evolution of social behaviour. II, *J. Theor. Biol.*, **7**, 1-52, doi: 10.1016/0022-5193(64)90039-6.
19. Trivers, R. L. (1971) The evolution of reciprocal altruism, *Quart. Rev. Biol.*, **46**, 35-57, doi: 10.1086/406755.
20. Medawar, P. B. (1952) *An Unsolved Problem in Biology*, H. K. Lewis, London. Reprinted in *The Uniqueness of the Individual* (Medawar, P. B., 1957) Methuen, London.
21. Mueller, L. D. (1987) Evolution of accelerated senescence in laboratory populations of *Drosophila*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 1974-1977, doi: 10.1073/pnas.84.7.1974.
22. Libertini, G., Rengo, G., and Ferrara, N. (2017) Aging and aging theories, *J. Geront. Geriatr.*, **65**, 59-77.
23. Cagan, A., Baez-Ortega, A., Brzozowska, N., Abascal, F., Coorens, T. H. H., et al. (2022) Somatic mutation rates scale with lifespan across mammals, *Nature*, **604**, 517-524, doi: 10.1038/s41586-022-04618-z.
24. Gorelick, A. N., and Naxerova, K. (2022) Mutational clocks tick differently across species, *Nature*, **604**, 435-436, doi: 10.1038/d41586-022-00976-w.
25. Robinson, P. S., Coorens, T. H. H., Palles, C., Mitchell, E., Abascal, F., et al. (2021) Increased somatic mutation burdens in normal human cells due to defective DNA polymerases, *Nat. Genet.*, **53**, 1434-1442, doi: 10.1038/s41588-021-00930-y.
26. Rose, M. R. (1991) *Evolutionary Biology of Aging*, Oxford University Press, Oxford (UK).
27. Kirkwood, T. B. (1977) Evolution of ageing, *Nature*, **270**, 301-304, doi: 10.1038/270301a0.
28. Kirkwood, T. B., and Holliday, R. (1979) The evolution of ageing and longevity, *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **205**, 531-546, doi: 10.1098/rspb.1979.0083.
29. Comfort, A. (1979) *The Biology of Senescence*, Livingstone, London.
30. Fülöp, T., Witkowski, J. M., Pawelec, G., Alan, C., and Larbi, A. (2014) On the immunological theory of aging, *Interdiscip. Top. Gerontol.*, **39**, 163-176, doi: 10.1159/000358904.
31. Franceschi, C., Garagnani, P., Morsiani, C., Conte, M., Santoro, A., et al. (2018) The continuum of aging and age-related diseases: common mechanisms but different rates, *Front. Med. (Lausanne)*, **5**, 61, doi: 10.3389/fmed.2018.00061.
32. Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell*, **126**, 663-676, doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
33. Cowan, C. A., Atienza, J., Melton, D. A., and Eggan, K. (2005) Nuclear reprogramming of somatic cells after

- fusion with human embryonic stem cells, *Science*, **309**, 1369-1373, doi: 10.1126/science.1116447.
34. Fossel, M. B. (2004) *Cells, Aging and Human Disease*, Oxford University Press, New York.
 35. Travis, J. M. (2004) The evolution of programmed death in a spatially structured population, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **59**, 301-305, doi: 10.1093/gerona/59.4.b301.
 36. Martins, A. C. (2011) Change and aging senescence as an adaptation, *PLoS One*, **6**, e24328, doi: 10.1371/journal.pone.0024328.
 37. Mitteldorf, J., and Martins, A. C. (2014) Programmed life span in the context of evolvability, *Am. Nat.*, **184**, 289-302, doi: 10.1086/677387.
 38. Libertini, G. (2006) Evolutionary explanations of the “actuarial senescence in the wild” and of the “state of senility”, *ScientificWorldJournal*, **6**, 1086-1108, doi: 10.1100/tsw.2006.209.
 39. Libertini, G. (2008) Empirical evidence for various evolutionary hypotheses on species demonstrating increasing mortality with increasing chronological age in the wild, *ScientificWorldJournal*, **8**, 182-193, doi: 10.1100/tsw.2008.36.
 40. Libertini, G., Corbi, G., and Ferrara, N. (2020) Importance and meaning of TERRA sequences for aging mechanisms, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 1505-1517, doi: 10.1134/S0006297920120044.
 41. Libertini, G., Shubernetskaya, O., Corbi, G., and Ferrara, N. (2021) Is evidence supporting the subtelomere-telomere theory of aging? *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 1766-1781, doi: 10.1134/S0006297921120026.
 42. Hayflick, L., and Moorhead, P. S. (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains, *Exp. Cell Res.*, **25**, 585-621, doi: 10.1016/0014-4827(61)90192-6.
 43. Olovnikov, A. M. (1971) Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides, *Doklady Biochem.*, **201**, 394-397.
 44. Olovnikov, A. M. (1973) A theory of marginotomy: the incomplete copying of template margin in enzyme synthesis of polynucleotides and biological significance of the problem, *J. Theor. Biol.*, **41**, 181-190, doi: 10.1016/0022-5193(73)90198-7.
 45. Greider, C. W., and Blackburn, E. H. (1985) Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts, *Cell*, **43** (2 Pt 1), 405-413, doi: 10.1016/0092-8674(85)90170-9.
 46. Gorbunova, V., Bozzella, M. J., and Seluanov, A. (2008) Rodents for comparative aging studies: from mice to beavers, *Age (Dordr.)*, **30**, 111-119, doi: 10.1007/s11357-008-9053-4.
 47. Slijepcevic, P., and Hande, M. P. (1999) Chinese hamster telomeres are comparable in size to mouse telomeres, *Cytogenet. Cell Genet.*, **85**, 196-199, doi: 10.1159/000015292.
 48. Kubota, C., Yamakuchi, H., Todoroki, J., Mizoshita, K., Tabara, N., et al. (2000) Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 990-995, doi: 10.1073/pnas.97.3.990.
 49. Lanza, R. P., Cibelli, J. B., Faber, D., Sweeney, R. W., Henderson, B., et al. (2001) Cloned cattle can be healthy and normal, *Science*, **294**, 1893-1894, doi: 10.1126/science.1063440.
 50. Blackburn, E. H. (2000) Telomere states and cell fates, *Nature*, **408**, 53-56, doi: 10.1038/35040500.
 51. Libertini, G., and Ferrara, N. (2016) Possible interventions to modify aging, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 1413-1428, doi: 10.1134/S0006297916120038.
 52. Libertini, G., Ferrara, N., Rengo, G., and Corbi, G. (2018) Elimination of senescent cells: prospects according to the subtelomere-telomere theory, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 1477-1488, doi: 10.1134/S0006297918120064.
 53. Gottschling, D. E., Aparicio, O. M., Billington, B. L., and Zakian, V. A. (1990) Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription, *Cell*, **63**, 751-762, doi: 10.1016/0092-8674(90)90141-z.
 54. Sinclair, D. A., and Guarente, L. (1997) Extrachromosomal rDNA circles – a cause of aging in yeast, *Cell*, **91**, 1033-1042, doi: 10.1016/s0092-8674(00)80493-6.
 55. Lesur, I., and Campbell, J. L. (2004) The transcriptome of prematurely aging yeast cells is similar to that of telomerase-deficient cells, *Mol. Biol. Cell*, **15**, 1297-1312, doi: 10.1091/mbc.e03-10-0742.
 56. Ben-Porath, I., and Weinberg, R. (2005) The signals and pathways activating cellular senescence, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **37**, 961-976, doi: 10.1016/j.biocel.2004.10.013.
 57. Campisi, J., and d'Adda di Fagagna, F. (2007) Cellular senescence: when bad things happen to good cells, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **8**, 729-740, doi: 10.1038/nrm2233.
 58. Coppé, J. -P., Patil, C. K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D. P., et al. (2008) Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor, *PLoS Biol.*, **6**, 2853-2868, doi: 10.1371/journal.pbio.0060301.
 59. Londoño-Vallejo, J. A., DerSarkissian, H., Cazes, L., and Thomas, G. (2001) Differences in telomere length between homologous chromosomes in humans, *Nucleic Acids Res.*, **29**, 3164-3171, doi: 10.1093/nar/29.15.3164.
 60. Hjelmborg, J. B., Dalgård, C., Möller, S., Steenstrup, T., Kimura, M., et al. (2015) The heritability of leucocyte telomere length dynamics, *J. Med. Genet.*, **52**, 297-302, doi: 10.1136/jmedgenet-2014-102736.
 61. Brown, W. R., MacKinnon, P. J., Villasanté, A., Spurr, N., Buckle, V. J., et al. (1990) Structure and polymorphism of human telomere-associated DNA, *Cell*, **63**, 119-132, doi: 10.1016/0092-8674(90)90293-n.
 62. Nergadze, S. G., Farnung, B. O., Wischnewski, H., Khoraiuli, L., Vitelli, V., et al. (2009) CpG-island promoters drive transcription of human telomeres, *RNA*, **15**, 2186-2194, doi: 10.1261/rna.1748309.

63. Azzalin, C. M., Reichenbach, P., Khoraiuli, L., Giulotto, E., and Lingner, J. (2007) Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends, *Science*, **318**, 798-801, doi: 10.1126/science.1147182.
64. Schoeftner, S., and Blasco, M. A. (2008) Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II, *Nat. Cell Biol.*, **10**, 228-236, doi: 10.1038/ncb1685.
65. Feuerhahn, S., Iglesias, N., Panza, A., Porro, A., and Lingner, J. (2010) TERRA biogenesis, turnover and implications for function, *FEBS Lett.*, **584**, 3812-3818, doi: 10.1016/j.febslet.2010.07.032.
66. Porro, A., Feuerhahn, S., Delafontaine, J., Riethman, H., Rougemont, J., et al. (2014) Functional characterization of the TERRA transcriptome at damaged telomeres, *Nat. Commun.*, **5**, 5379, doi: 10.1038/ncomms6379.
67. Diman, A., Boros, J., Poulain, F., Rodriguez, J., Purnelle, M., et al. (2016) Nuclear respiratory factor 1 and endurance exercise promote human telomere transcription, *Sci. Adv.*, **2**, e1600031, doi: 10.1126/sciadv.1600031.
68. Diman, A., and Decottignies, A. (2018) Genomic origin and nuclear localization of TERRA telomeric repeat-containing RNA: from Darkness to Dawn, *FEBS J.*, **285**, 1389-1398, doi: 10.1111/febs.14363.
69. Azzalin, C. M., and Lingner, J. (2008) Telomeres: the silence is broken, *Cell Cycle*, **7**, 1161-1165, doi: 10.4161/cc.7.9.5836.
70. Chu, H. -P., Cifuentes-Rojas, C., Kesner, B., Aeby, E., Lee, H.-G., et al. (2017) TERRA RNA antagonizes ATRX and protects telomeres, *Cell*, **170**, 86-101, doi: 10.1016/j.cell.2017.06.017.
71. Chu, H. -P., Froberg, J. E., Kesner, B., Oh, H. J., Ji, F., et al. (2017) PAR-TERRA directs homologous sex chromosome pairing, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **24**, 620-631, doi: 10.1038/nsmb.3432.
72. Bettin, N., Oss Pegorar, C., and Cusanelli, E. (2019) The emerging roles of TERRA in telomere maintenance and genome stability, *Cells*, **8**, 246, doi: 10.3390/cells8030246.
73. Montero, J. J., Lopez de Silanes, I., Grana, O., and Blasco, M. A. (2016) Telomeric RNAs are essential to maintain telomeres, *Nat. Commun.*, **7**, 12534, doi: 10.1038/ncomms12534.
74. Illingworth, R., Kerr, A., Desousa, D., Jørgensen, H., Ellis, P., et al. (2008) A novel CpG island set identifies tissue-specific methylation at developmental gene loci, *PLoS Biol.*, **6**, e22, doi: 10.1371/journal.pbio.0060022.
75. Bernstein, B. E., Stamatoyannopoulos, J. A., Costello, J. F., Ren, B., Milosavljevic, A., et al. (2010) The NIH roadmap epigenomics mapping consortium. *Nat. Biotechnol.*, **28**, 1045-1048, doi: 10.1038/nbt1010-1045.
76. Horvath, S. (2013) DNA methylation age of human tissues and cell types, *Genome Biol.*, **14**, R115, doi: 10.1186/gb-2013-14-10-r115. Erratum in: Horvath, S. (2015) Erratum to: DNA methylation age of human tissues and cell types, *Genome Biol.*, **16**, 96, doi: 10.1186/s13059-015-0649-6.
77. Mammalian Methylation Consortium (2021) Universal DNA methylation age across mammalian tissues, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2021.01.18.426733.
78. Rakyan, V. K., Down, T. A., Maslau, S., Andrew, T., Yang, T. P., et al. (2010) Human aging-associated DNA hypermethylation occurs preferentially at bivalent chromatin domains, *Genome Res.*, **20**, 434-439, doi: 10.1101/gr.103101.109.
79. Teschendorff, A. E., Menon, U., Gentry-Maharaj, A., Ramus, S. J., Weisenberger, D. J., et al. (2010) Age-dependent DNA methylation of genes that are suppressed in stem cells is a hallmark of cancer, *Genome Res.*, **20**, 440-446, doi: 10.1101/gr.103606.109.
80. Horvath, S., Zhang, Y., Langfelder, P., Kahn, R., Boks, M., et al. (2012) Aging effects on DNA methylation modules in human brain and blood tissue, *Genome Biol.*, **13**, R97, doi: 10.1186/gb-2012-13-10-r97.
81. Bell, J. T., Tsai, P. C., Yang, T. P., Pidsley, R., Nisbet, J., et al. (2012) Epigenome-wide scans identify differentially methylated regions for age and age-related phenotypes in a healthy ageing population, *PLoS Genet.*, **8**, e1002629, doi: 10.1371/journal.gen.1002629.
82. Bird, A. (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory, *Genes Dev.*, **16**, 6-21, doi: 10.1101/gad.947102.
83. Stein, R., Razin, A., and Cedar, H. (1982) *In vitro* methylation of the hamster adenine phosphoribosyltransferase gene inhibits its expression in mouse L cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3418-3422, doi: 10.1073/pnas.79.11.3418.
84. Hansen, R. S., and Gartler, S. M. (1990) 5-Azacytidine-induced reactivation of the human X chromosome-linked PGK1 gene is associated with a large region of cytosine demethylation in the 5' CpG island, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4174-4178, doi: 10.1073/pnas.87.11.4174.
85. Bollati, V., Schwartz, J., Wright, R., Litonjua, A., Tarantini, L., et al. (2009) Decline in genomic DNA methylation through aging in a cohort of elderly subjects, *Mech. Ageing Dev.*, **130**, 234-239, doi: 10.1016/j.mad.2008.12.003.
86. Christensen, B. C., Houseman, E. A., Marsit, C. J., Zheng, S., Wrensch, M. R., et al. (2009) Aging and environmental exposures alter tissue specific DNA methylation dependent upon CpG island context, *PLoS Genet.*, **5**, e1000602, doi: 10.1371/journal.pgen.1000602.
87. Pal, S., and Tyler, J. K. (2016) Epigenetics and aging, *Sci. Adv.*, **2**, e1600584, doi: 10.1126/sciadv.1600584.
88. Greer, E. L., and Shi, Y. (2012) Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance, *Nat. Rev. Genet.*, **13**, 343-357, doi: 10.1038/nrg31730.

89. Booth, L. N., and Brunet, A. (2016) The aging epigenome, *Mol. Cell*, **62**, 728-744, doi: 10.1016/j.molcel.2016.05.013.
90. Benetti, R., García-Cao, M., and Blasco, M. A. (2007) Telomere length regulates the epigenetic status of mammalian telomeres and subtelomeres, *Nat. Genet.*, **39**, 243-250, doi: 10.1038/ng1952.
91. Blasco, M. A. (2007) The epigenetic regulation of mammalian telomeres, *Nat. Rev. Genet.*, **8**, 299-309, doi: 10.1038/nrg2047.
92. Maeda, T., Guan, J. Z., Higuchi, Y., Oyama, J., and Makino, N. (2009) Aging-related alterations of subtelomeric methylation in sarcoidosis patients, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **64**, 752-760, doi: 10.1093/gerona/glp049.
93. Buxton, J. L., Suderman, M., Pappas, J. J., Borghol, N., McArdle, W., et al. (2014) Human leukocyte telomere length is associated with DNA methylation levels in multiple subtelomeric and imprinted loci, *Sci. Rep.*, **4**, 4954, doi: 10.1038/srep04954.
94. Schellenberg, A., Lin, Q., Schüler, H., Koch, C. M., Jousen, S., et al. (2011) Replicative senescence of mesenchymal stem cells causes DNA-methylation changes which correlate with repressive histone marks, *Aging (Albany NY)*, **3**, 873-888, doi: 10.18632/aging.100391.
95. Zhou, X., Hong, Y., Zhang, H., and Li, X. (2020) Mesenchymal stem cell senescence and rejuvenation: current status and challenges, *Front. Cell Dev. Biol.*, **8**, 364, doi: 10.3389/fcell.2020.00364.
96. Ohno, S. (1972) So much "junk" DNA in our genome, in *Evolution of Genetic Systems* (Smith, H. H., ed.) Gordon and Breach, New York, pp. 366-370.
97. Moraes, F., and Góes, A. (2016) A decade of human genome project conclusion: Scientific diffusion about our genome knowledge, *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, **44**, 215-223, doi: 10.1002/bmb.20952.
98. D'Adda di Fagagna, F., Reaper, P. M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., et al. (2003) A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence, *Nature*, **426**, 194-198, doi: 10.1038/nature02118.
99. Cristofalo, V. J., and Pignolo, R. J. (1993) Replicative senescence of human fibroblast-like cells in culture, *Physiol. Rev.*, **73**, 617-638, doi: 10.1152/physrev.1993.73.3.617.
100. Kwon, S. M., Hong, S. M., Lee, Y. K., Min, S., and Yoon, G. (2019) Metabolic features and regulation in cell senescence, *BMB Rep.*, **52**, 5-12, doi: 10.5483/BMBRep.2019.52.1.291.
101. Shelton, D. N., Chang, E., Whittier, P. S., Choi, D., and Funk, W. D. (1999) Microarray analysis of replicative senescence, *Curr. Biol.*, **9**, 939-945, doi: 10.1016/s0960-9822(99)80420-5.
102. Kirkland, J. L., and Tchkonja, T. (2017) Cellular senescence: a translational perspective, *EBioMedicine*, **21**, 21-28, doi: 10.1016/j.ebiom.2017.04.013.
103. Van Deursen, J. M. (2014) The role of senescent cells in ageing, *Nature*, **509**, 439-446, doi: 10.1038/nature13193.
104. Rodier, F., Coppé, J. P., Patil, C. K., Hoeijmakers, W. A., Muñoz, D. P., et al. (2009) Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion, *Nat. Cell. Biol.*, **11**, 973-979, doi: 10.1038/ncb1909.
105. Wang, E. (1995) Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved, *Cancer Res.*, **55**, 2284-2292.
106. Krishnamurthy, J., Torrice, C., Ramsey, M. R., Kovalev, G. I., Al-Regaiey, K., et al. (2004) Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging, *J. Clin. Invest.*, **114**, 1299-1307, doi: 10.1172/JCI22475.
107. Baker, D. J., Childs, B. G., Durik, M., Wijers, M. E., Sieben, C. J., et al. (2016) Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan, *Nature*, **530**, 184-189, doi: 10.1038/nature16932.
108. Baker, D. J., Jeganathan, K. B., Cameron, J. D., Thompson, M., Juneja, S., et al. (2004) BubR1 insufficiency causes early onset of aging-associated phenotypes and infertility in mice, *Nat. Genet.*, **36**, 744-749, doi: 10.1038/ng1382.
109. Baker, D. J., Perez-Terzic, C., Jin, F., Pitel, K. S., Niederländer, N. J., et al. (2008) Opposing roles for p16Ink4a and p19Arf in senescence and ageing caused by BubR1 insufficiency, *Nat. Cell. Biol.*, **10**, 825-836, doi: 10.1038/ncb1744.
110. Chang, J., Wang, Y., Shao, L., Laberge, R.-M., Demaria, M., et al. (2016) Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice, *Nat. Med.*, **22**, 78-83, doi: 10.1038/nm.4010.
111. Fuhrmann-Stroissnigg, H., Ling, Y. Y., Zhao, J., McGowan, S. J., Zhu, Y., et al. (2017) Identification of HSP90 inhibitors as a novel class of senolytics, *Nat. Commun.*, **8**, 422, doi: 10.1038/s41467-017-00314-z.
112. Campisi, J. (2003) Cancer and ageing: rival demons? *Nat. Rev. Cancer*, **3**, 339-349, doi: 10.1038/nrc1073.
113. Wright, W. E., and Shay, J. W. (2005) Telomere biology in aging and cancer, *J. Am. Geriatr. Soc.*, **53**, S292-S294, doi: 10.1111/j.1532-5415.2005.53492.x.
114. Campisi, J. (2000) Cancer, aging and cellular senescence, *In vivo*, **14**, 183-188.
115. Wu, X., Amos, C. I., Zhu, Y., Zhao, H., Grossman, B. H., et al. (2003) Telomere dysfunction: a potential cancer predisposition factor, *J. Natl. Cancer Inst.*, **95**, 1211-1218, doi: 10.1093/jnci/djg011.
116. Ma, H., Zhou, Z., Wei, S., Liu, Z., Pooley, K. A., et al. (2011) Shortened telomere length is associated with increased risk of cancer: a meta-analysis, *PLoS One*, **6**, e20466, doi: 10.1371/journal.pone.0020466.
117. Bernardes de Jesus, B., Vera, E., Schneeberger, K., Tejera, A. M., Ayuso, E., et al. (2012) Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer, *EMBO Mol. Med.*, **4**, 691-704, doi: 10.1002/emmm.201200245.

118. Laun, P., Bruschi, C. V., Dickinson, J. R., Rinnerthaler, M., Heeren, G., et al. (2007) Yeast mother cell-specific ageing, genetic (in)stability, and the somatic mutation theory of ageing, *Nucleic Acids Res.*, **35**, 7514-7526, doi: 10.1093/nar/gkm919.
119. Libertini, G. (2013) Evidence for aging theories from the study of a hunter-gatherer people (Ache of Paraguay), *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 1023-1032, doi: 10.1134/S0006297913090083.
120. Mitteldorf, J. (2013) Telomere biology: cancer firewall or aging clock? *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 1054-1060, doi: 10.1134/S0006297913090125.
121. Libertini, G. (2015) Non-programmed versus programmed aging paradigm. *Curr Aging Sci*, **8**, 56-68, doi: 10.2174/1874609808666150422111623.
122. Wagner, W., Horn, P., Castoldi, M., Diehlmann, A., Bork, S., et al. (2008) Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process, *PLoS One*, **3**, e2213, doi: 10.1371/journal.pone.0002213.
123. Koch, C. M. (2012) Monitoring of cellular senescence by DNA-methylation at specific CpG sites, *Aging Cell*, **11**, 366-369, doi: 10.1111/j.1474-9726.2011.00784.x.
124. Schellenberg, A. (2014) Proof of principle: quality control of therapeutic cell preparations using senescence-associated DNA-methylation changes, *BMC Res. Notes*, **7**, 254, doi: 10.1186/1756-0500-7-254.
125. Fernandez-Rebollo, E. (2020) Senescence-associated metabolomic phenotype in primary and iPSC-derived mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Rep.*, **14**, 201-209, doi: 10.1016/j.stemcr.2019.12.012.
126. Robin, J. D., Ludlow, A. T., Batten, K., Magdinier, F., Stadler, G., et al. (2014) Telomere position effect: regulation of gene expression with progressive telomere shortening over long distances, *Genes Dev.*, **28**, 2464-2476, doi: 10.1101/gad.251041.114.
127. Laun, P., Pichova, A., Madeo, F., Fuchs, J., Ellinger, A., et al. (2001) Aged mother cells of *Saccharomyces cerevisiae* show markers of oxidative stress and apoptosis, *Mol. Microbiol.*, **39**, 1166-1173, doi: 10.1111/j.1365-2958.2001.02317.x.
128. Herker, E., Jungwirth, H., Lehmann, K. A., Maldener, C., Fröhlich, K. U., et al. (2004) Chronological aging leads to apoptosis in yeast, *J. Cell Biol.*, **164**, 501-507, doi: 10.1083/jcb.200310014.
129. D'Mello, N. P., and Jazwinski, S. M. (1991) Telomere length constancy during aging of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.*, **173**, 6709-6713, doi: 10.1128/jb.173.21.6709-6713.1991.
130. Spitzhorn, L. S. (2019) Human iPSC-derived MSCs (iMSCs) from aged individuals acquire a rejuvenation signature, *Stem Cell Res. Ther.*, **10**, 100, doi: 10.1186/s13287-019-1209-x.
131. Hynes, K. (2013) Mesenchymal stem cells from iPSC cells facilitate periodontal regeneration, *J. Dent. Res.*, **92**, 833-839, doi: 10.1177/0022034513498258.
132. Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., et al. (2014) *Essential Cell Biology*, 4th Edn., Garland Science, New York.
133. Anversa, P., Kajstura, J., Leri, A., and Bolli, R. (2006) Life and death of cardiac stem cells: a paradigm shift in cardiac biology, *Circulation*, **113**, 1451-1463, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.595181.
134. Libertini, G., and Ferrara, N. (2016) Aging of perennial cells and organ parts according to the programmed aging paradigm, *Age (Dordr.)*, **38**, 35, doi: 10.1007/s11357-016-9895-0.
135. Takubo, K., Aida, J., Izumiyama-Shimomura, N., Ishikawa, N., Sawabe, M., et al. (2010) Changes of telomere length with aging, *Geriatr. Gerontol. Int.*, **10**, S197-S206, doi: 10.1111/j.1447-0594.2010.00605.x.
136. Daniali, L., Benetos, A., Susser, E., Kark, J. D., Labat, C., et al. (2013) Telomeres shorten at equivalent rates in somatic tissues of adults, *Nat. Commun.*, **4**, 1597, doi: 10.1038/ncomms2602.
137. Okuda, K., Bardeguet, A., Gardner, J. P., Rodriguez, P., Ganesh, V., et al. (2002) Telomere length in the newborn, *Pediatr. Res.*, **52**, 377-381, doi: 10.1203/00006450-200209000-00012.
138. Libertini, G. (2009) The role of telomere-telomerase system in age-related fitness decline, a tameable process, in *Telomeres: Function, Shortening and Lengthening* (Mancini, L., ed.) Nova Science Publ., New York, pp. 77-132.
139. Flanary, B. (2009) Telomeres: Function, Shortening, and Lengthening, in *Telomeres: Function, Shortening and Lengthening* (Mancini, L., ed.) Nova Science Publ. Inc., New York, pp. 379-386.
140. Libertini, G. (2014) Programmed aging paradigm: how we get old, *Biochemistry (Moscow)*, **79**, 1004-1016, doi: 10.1134/S0006297914100034.
141. Takai, K. K., Hooper, S., Blackwood, S., Gandhi, R., and de Lange, T. (2010) *In vivo* stoichiometry of shelterin components, *J. Biol. Chem.*, **285**, 1457-1467, doi: 10.1074/jbc.M109.038026.

IS HUMAN AGING A FORM OF PHENOPTOSIS?

Review

G. Libertini^{1,2*}, G. Corbi^{3,4}, O. Shubernetskaya⁵, and N. Ferrara^{2,6}

¹ *Italian Society for Evolutionary Biology (SIBE), 14100 Asti, Italy; Email: giacinto.libertini@yahoo.com*

² *Department of Translational Medical Sciences, Federico II University of Naples, 80131 Naples, Italy*

³ *Department of Medicine and Health Sciences, University of Molise, 86100 Campobasso, Italy*

⁴ *Italian Society of Gerontology and Geriatrics (SIGG), 50129 Firenze, Italy*

⁵ *Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, 117997 Moscow, Russia*

⁶ *Istituti Clinici Scientifici Maugeri SPA – Società Benefit, IRCCS, 82037 Telese Terme (BN), Italy*

A much debated question is whether aging is the cumulative consequence of degenerative factors insufficiently opposed by natural selection, or, on the contrary, an ordered process, genetically determined and regulated, modeled by natural selection, and for which the definition of phenoptotic phenomenon would be entirely appropriate. In this review, theoretical arguments and empirical data about the two hypotheses are exposed, with more evidence in support of the thesis of aging as a form of phenoptosis. However, as the thesis of aging as an adaptive and programmed phenomenon necessarily requires the existence of specific mechanisms that determine to age, such as the subtelomere-telomere theory proposed for this purpose, the evidence supporting the mechanisms described by this theory is reported. In particular, it is highlighted that the recent interpretation of the role of TERRA sequences in the context of subtelomere-telomere theory is a fundamental point in supporting the hypothesized mechanisms. Furthermore, some characteristics of the mechanisms proposed by the theory, such as epigenetic modifications in aging, gradual cell senescence, cell senescence, limits in cell duplications, and fixed size of the telomeric heterochromatin hood, are exposed in their compatibility with both the thesis of aging as phenoptotic phenomenon and the opposite thesis. In short, aging as a form of phenoptosis appears a scientifically sound hypothesis while the opposite thesis should clarify the meaning of various phenomena that appear to invalidate it.

Keywords: phenoptosis, aging, subtelomere, telomere, subtelomere-telomere theory, gradual cell senescence, cell senescence, epigenetic changes

ЯВЛЯЕТСЯ ЛИ Nrf2 ОСНОВНЫМ РЕГУЛЯТОРОМ СТАРЕНИЯ МЛЕКОПИТАЮЩИХ?

Обзор

© 2022 Р.А. Зиновкин^{1,2*}, Н.Д. Кондратенко^{1,2,3}, Л.А. Зиновкина³

¹ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119991 Москва, Россия; электронная почта: roman.zinovkin@gmail.com

² ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России,
Российский геронтологический научно-клинический центр, 129226 Москва, Россия

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 13.09.2022

После доработки 05.11.2022

Принята к публикации 07.11.2022

Транскрипционный фактор Nrf2 давно находится в центре внимания исследователей феномена старения. В многочисленных работах были обнаружены его эффекты как на старение целых организмов, так и на процессы клеточного старения. Транскрипционному фактору Nrf2 зачастую приписывают центральную роль в процессах старения, хотя этот тезис нуждается в доказательствах. Следует отметить, что большинство работ проводили не на млекопитающих, а на беспозвоночных модельных животных, таких как нематоды и дрозофилы. В данном обзоре кратко рассматриваются основные механизмы старения млекопитающих, роль воспалительных реакций и окислительного стресса в процессах старения. Также рассматриваются основные механизмы регуляции активности транскрипционного фактора Nrf2, участие Nrf2 в клеточном старении и появлении секреторного фенотипа, ассоциированного со старением. Основная часть обзора посвящена критическому анализу экспериментальных данных по изучению роли Nrf2 в старении млекопитающих.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: транскрипционный фактор Nrf2, старение, воспаление, окислительный стресс, теории старения, возрастные изменения.

DOI: 10.31857/S0320972522120053, **EDN:** NGCFVI

ВВЕДЕНИЕ

К настоящему моменту опубликовано более полутора тысяч экспериментальных и обзорных работ, посвящённых транскрипционному фактору Nrf2 и старению. Действительно, участие Nrf2 в процессах старения клеток и организма не вызывает сомнений. Зачастую Nrf2 называют «главным регулятором процесса старения» (master regulator of the aging process) [1]. Однако, если какой-либо белок является главным регулятором старения, то его активность должна регулировать работу тех генов, чья экспрессия

меняется с возрастом и напрямую влияет на процессы старения на клеточном и организменном уровнях. Но справедливо ли применять такой термин к Nrf2? Данный обзор не ставит своей целью подробный анализ влияния активации или ингибирования активности Nrf2 на процессы старения, что было сделано ранее [2]. Также настоящий обзор не рассматривает данные, полученные на беспозвоночных животных, поскольку у них механизмы старения могут отличаться от таковых у млекопитающих. Цель настоящего обзора – провести критический анализ роли Nrf2 в старении млекопитающих.

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; КС – клеточное старение; ARE – элемент антиоксидантного ответа; GSK3 β – гликогенсинтаза 3 бета; KEAP1 – Kelch-подобный ECH(Nrf2)-ассоциированный белок-1; Nrf2 – родственник эритроидному фактору 2 ядерный фактор 2; p62/SQSTM1 – полиубиквитин-связывающий белок p62/секвестосома 1; SASP – секреторный фенотип, ассоциированный со старением; β -TgCP – белок, содержащий повторы бета-трансламина.

* Адресат для корреспонденции.

ТЕОРИИ И МЕХАНИЗМЫ СТАРЕНИЯ

Старение является сложным процессом, затрагивающим практически все клетки организма. В процессе старения развивается митохондриальная дисфункция, нарушается гомеостаз, развивается окислительный стресс, а также изменяется эпигеном, транскриптом и протеомом клеток [3]. Эти изменения происходят на всех уровнях организации живого: молекулярном, клеточном и тканевом. В результате с возрастом экспоненциально возрастает вероятность развития болезней и состояний, угрожающих жизни.

Известно много признаков старения, затрагивающих биохимические и физиологические параметры организма [4]. Одним из важнейших признаков старения является окислительный стресс, под которым подразумевается нарушение баланса между антиоксидантной системой и прооксидантной в пользу последней. Возникающие в результате этого стресса активные формы кислорода (АФК) и азота повреждают нуклеиновые кислоты, ли-

пиды и белки, что приводит к дисфункции клеток и тканей. Широко известная свободнорадикальная теория старения постулирует, что свободные радикалы – основная движущая сила старения [5], хотя эта теория и оспаривается рядом исследователей [6]. Поскольку митохондрии являются основными источниками АФК, воздействие на митохондрии является перспективным подходом в антивозрастной терапии [7]. Ещё один важный признак старения – состояние, называемое «inflammaging» – хроническое воспаление, сопутствующее процессу старения организма [8]. Важно отметить, что между окислительным стрессом и хроническим воспалением существует петля положительной обратной связи: АФК и свободные радикалы являются важными сигнальными молекулами, вызывающими воспалительные реакции, которые, в свою очередь, приводят к образованию АФК и иных радикалов (рис. 1).

Исследование причин и механизмов старения является чрезвычайно актуальной задачей. Существует множество теорий старения,

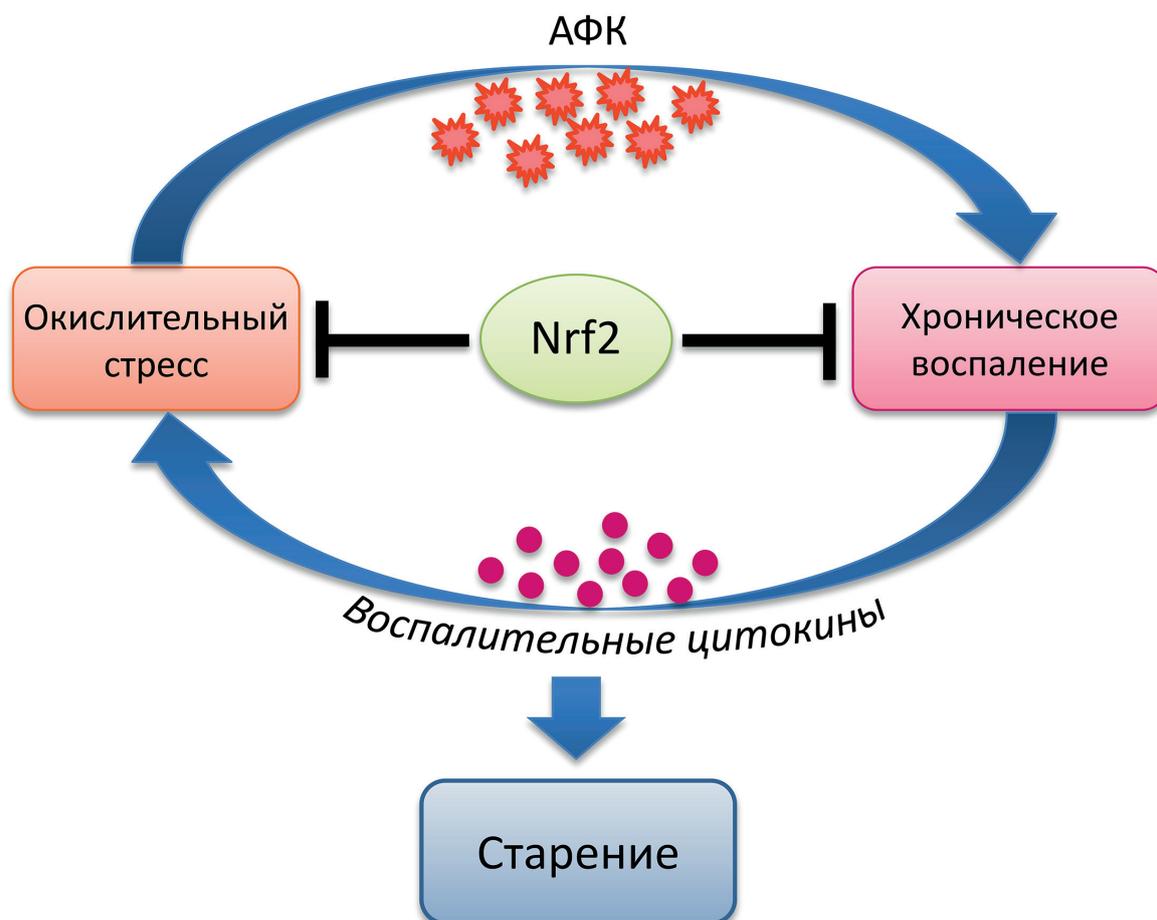


Рис. 1. Схема «порочного круга», состоящего из петли положительной связи между окислительным стрессом и хроническим воспалением. Активация Nrf2 как подход к противозрастной терапии. Подробности в тексте

которые в первом приближении можно классифицировать на теории программируемого старения, теории накопления повреждений, а также объединяющие их комбинированные теории [9].

Теории программируемого старения постулируют, что старение является онтогенетической программой, обеспечивающей организму эволюционное преимущество [10]. Согласно концепции фенотоза, гибель организма запрограммирована в его геноме [11]. Такой подход предполагает, что старение является излечимым состоянием, что открывает новые возможности к предотвращению развития возрастных заболеваний и продлению жизни [12].

Теории накопления повреждений оспаривают постулаты теории программируемого старения, приводя доводы, что старение может объясняться отсутствием естественного отбора на пострепродуктивном этапе жизни и возникать за счёт накопления мутаций и побочных продуктов обмена веществ, которые вызывают повреждение клеток, органов и тканей [13]. Хотя накопление повреждений и является спонтанным энтропийным процессом, его кинетика может регулироваться как генетически, так и под влиянием окружающей среды, что и приводит к различной продолжительности жизни у разных генотипов [14].

Несмотря на различие в определении движущих сил и причин старения, все теории сходятся в том, что продолжительность жизни организма определяется динамическим взаимодействием двух факторов: (1) процесса накопления вредных изменений (за счёт действия программы старения либо накопления повреждений); и (2) противодействующих механизмов восстановления и поддержания гомеостаза (за счёт программы антистарения либо ответа на возникающие стрессы) [13, 15].

Таким образом, независимо от точки зрения на причины старения, в качестве противовосрастной терапии весьма перспективно воздействовать на сигнальные пути, снижающие воспаление и уровень АФК. Одним из таких подходов является активация транскрипционного фактора Nrf2 (рис. 1).

ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ФАКТОР Nrf2 И ЕГО РЕГУЛЯЦИЯ

Транскрипционный фактор Nrf2 (nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (*NFE2L2*) или NF-E2 related factor 2) является центральным звеном в обеспечении защиты организма от различных воздействий, в том числе от окис-

лительного и электрофильного стрессов. Этот транскрипционный фактор относится к семейству основных белков с лейциновой молнией. Nrf2 был открыт более четверти века назад [16] и с тех пор неизменно остаётся в центре внимания исследователей [17].

Nrf2 управляет экспрессией ~250 генов, продукты которых участвуют в антиоксидантном ответе, редокс-гомеостазе, детоксикации токсичных соединений, биогенезе митохондрий и многих других процессах (рис. 2). Активация этих генов защищает клетки от окислительного стресса и развития воспаления [18, 19]. При активации Nrf2 повышается экспрессия гена *HMOX1*, кодирующего гемоксигеназу-1 (HO-1), ответственную за деградацию провоспалительных свободных генов и образование противовоспалительных соединений, таких как угарный газ (CO) и билирубин; NAD(P)H:хинон оксидоредуктазы-1 (*NQO1*), обладающей антиоксидантными активностями; цитоплазматической формы антиоксидантного фермента супероксиддисмутазы-1 (*SOD1*), а также ключевых ферментов биосинтеза глутатиона (тяжёлой каталитической субъединицы глутамат-цистеинлигазы, *GCLC*, и лёгкой регуляторной субъединицы глутамат-цистеинлигазы, *GCLM*), который является основным клеточным тиолом, необходимым для поддержания редокс-гомеостаза.

Индукция экспрессии Nrf2 также приводит к понижению уровня цитокинов воспаления за счёт эпигенетического сайленсинга соответствующих промоторов в иммунных клетках [20]. Через активацию Nrf2 осуществляет свои противовоспалительные функции и эндогенный метаболит итаконат [21]. Отсутствие Nrf2 у мышей вызывает неконтролируемый воспалительный ответ: активацию клеток врождённого иммунитета, высокую продукцию цитокинов, хемокинов и АФК – все эти факторы способствуют повреждению клеток и тканей [22]. Активация Nrf2 рассматривается как терапевтическая возможность снижения избыточного воспалительного ответа при стерильном воспалении и некоторых вирусных инфекциях [23].

Известно несколько способов регуляции активности Nrf2, который в обычных условиях является короткоживущим белком [24].

Первый (классический) вариант заключается в следующем: в нормальных условиях Nrf2 локализован в цитоплазме и связан со своим ингибитором – белком KEAP1 (Kelch-подобный ECH(Nrf2)-ассоциированный белок-1, Kelch-like ECH (Nrf2) associated protein-1), который стимулирует убиквитинилирование Nrf2

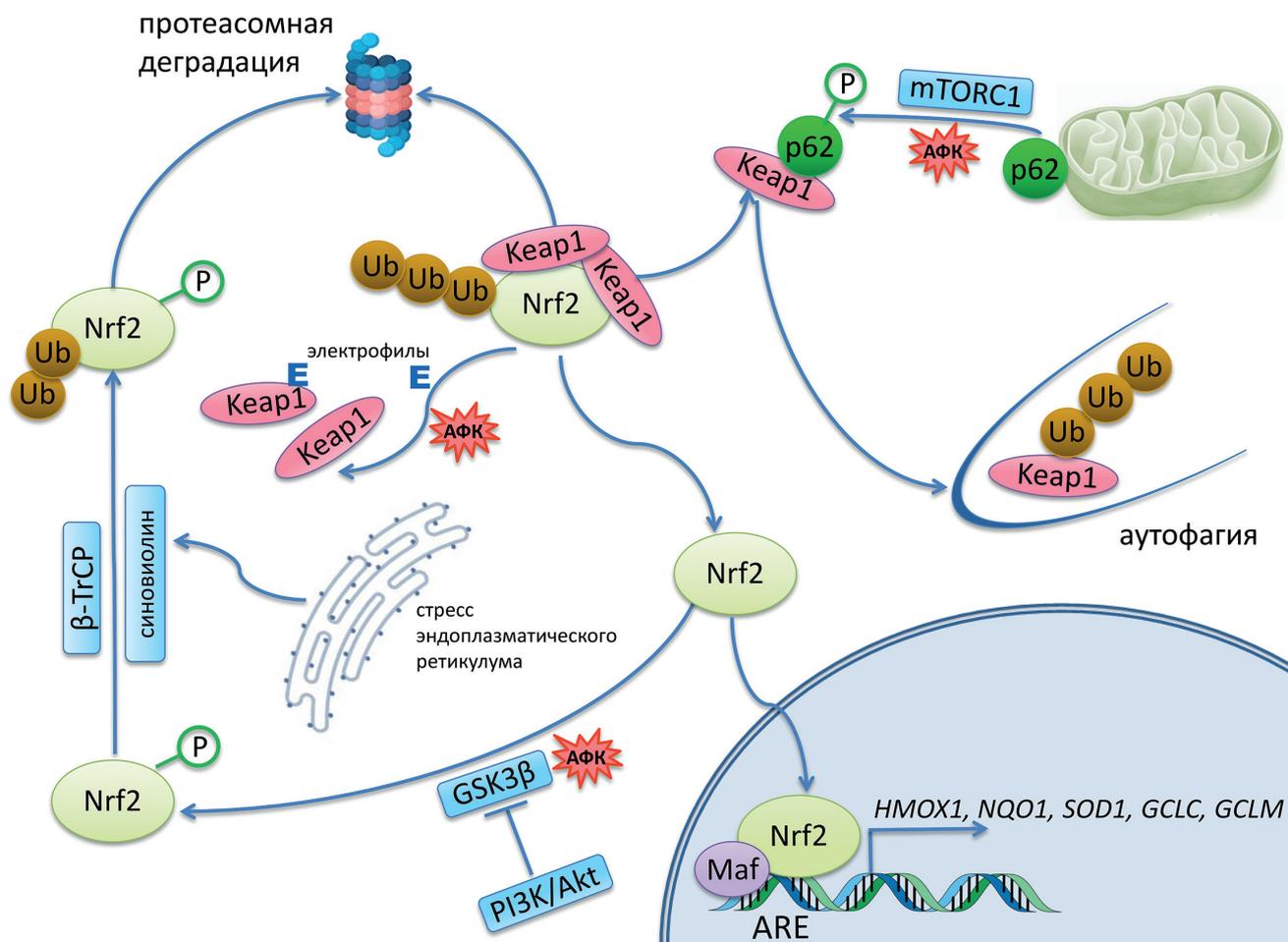


Рис. 2. Способы регуляции активности Nrf2. В нормальных условиях Nrf2 в цитоплазме связан со своим ингибитором KEAP1 (Kelch-подобный ECH(Nrf2)-ассоциированный белок-1), который стимулирует его убиквитинилирование и протеасомную деградацию. Окислители или электрофилы (E) связываются с тиоловыми группами цистеиновых остатков белка KEAP1. В результате Nrf2 накапливается в ядре и связывается с элементами антиоксидантного ответа ARE (antioxidant response elements) – последовательностями в промоторах своих генов-мишеней (*HMOX1*, *NQO1*, *SOD1*, *GCLC*, *GCLM*), стимулируя таким образом их транскрипцию. При окислительном стрессе также происходит фосфорилирование полиубиквитин-связывающего белка p62/секвестосома 1 (p62/SQSTM1), что облегчает его связывание с KEAP1 и приводит к убиквитинилированию и протеасомной деградации последнего. К протеасомной деградации самого Nrf2 приводит связывание с E3 убиквитинлигазами синовиолином и β-TrCP (белок, содержащий повторы бета-транслуцина). Киназа GSK3β (гликогенсинтаза 3 бета) напрямую фосфорилирует Nrf2 и облегчает его взаимодействие с β-TrCP. При окислительном стрессе происходит активация киназ Akt и PI3K (фосфатидилинозитол-3-киназы), которые ингибируют GSK3β и соответственно протеасомную деградацию Nrf2. Обозначения: E – электрофил, АФК – активные формы кислорода

и его последующую протеасомную деградацию. Окислители или электрофилы связываются с KEAP1 через SH-группу, в результате чего Nrf2 освобождается от его влияния, избегая деградации, и накапливается в ядре. Там Nrf2 вместе с набором транскрипционных кофакторов, таких как белки Maf, взаимодействует со специфическими последовательностями (ARE) в промоторах генов, стимулируя таким образом их транскрипцию [25]. Важно отметить, что последовательность ARE находится и в промоторе самого *Nrf2*, что обеспечивает петлю положительной обратной связи [26]. Помимо окислителей и электрофилов, индукцию Nrf2 способны вызывать сероводород и некоторые

меркаптаны, восстанавливающие дисульфидные связи белка KEAP1 [27].

Второй вариант активации Nrf2 – деградация KEAP1 с помощью аппарата аутофагии. При этом происходит взаимодействие KEAP1 с убиквитин-связывающим белком p62/SQSTM1, что способствует его деградации в аутофагосоме и активации Nrf2 [28]. В промоторе гена, кодирующего белок p62/SQSTM1, присутствует последовательность ARE, его транскрипция повышается при активации Nrf2, что дополнительно способствует его активации. Окислительный стресс вызывает фосфорилирование Ser349 в мотиве STGE белка p62/SQSTM1 с помощью белка-сенсора mTORC1 (комплекс 1

мишени рапамицина млекопитающих, mammalian target of rapamycin C1). Такое фосфорилирование приводит к увеличению аффинности p62/SQSTM1 к KEAP1 и его эффективному элиминированию [29–32]. Важно отметить, что белок p62/SQSTM1 также обнаруживается на внешней мембране митохондрий и участвует в селективной аутофагии (митофагии) [33]. Взаимодействие KEAP1 с p62 зависит от белка сестрин-2 (SESN2) [34], который также локализован в митохондриях [35].

Третий путь регуляции Nrf2 осуществляется с помощью двух E3 убиквитинлигаз: β -TrCP и синовиолина (также известного как Hrd1). Синовиолин активируется при стрессе эндоплазматического ретикулула (ER-stress), что снижает количество белка Nrf2 [36]. Помимо этого, киназа GSK3 β может напрямую фосфорилировать белок Nrf2, что приводит к его узнаванию убиквитинлигазой β -TrCP и последующей деградации [37]. Киназа GSK3 β проявляет конститутивную активность и ингибируется киназами PI3K/Akt, которые активируются при окислительном стрессе [38]. Таким образом, при окислительном стрессе происходит ингибирование β -TrCP-зависимой деградации Nrf2.

Помимо этого, киназа GSK3 β может фосфорилировать тирозинкиназу Fyn из семейства Src-киназ, что приводит к транслокации Fyn в ядро, где она фосфорилирует Nrf2, вызывая экспорт Nrf2 из ядра [39, 40].

На 5'-конце нетранслируемой области мРНК *Nrf2* находится внутренний сайт посадки рибосомы (IRES), который позволяет быстро производить трансляцию в условиях стресса. Окислительный стресс, вирусная инфекция, тепловой шок, депривация питательных веществ, алкилирующие агенты – все эти воздействия приводят к активации кэп-независимой трансляции через IRES и увеличению количества Nrf2 [41, 42].

Nrf2 В КЛЕТОЧНОМ СТАРЕНИИ

На клеточном уровне процессы старения выражаются в изменении внеклеточного матрикса, клеточного состава, накоплении повреждения макромолекул, а также в появлении «состаренных клеток». Клеточное старение (КС, cell senescence) – это остановка деления клеток, которая происходит в нормально функционирующих тканях при достижении предела Хейфлика. КС может быть также инициировано целым рядом факторов: повреждением ДНК, окислительным стрес-

сом, дисфункцией митохондрий, активацией онкогенов [43]. С одной стороны, феномен КС является фундаментальным биологическим процессом, который полезен для организма, так как он обеспечивает защиту от онкогенной трансформации. С другой стороны, состаренные клетки синтезируют провоспалительные цитокины и матриксные металлопротеиназы, что вызывает воспаление и локальную дисфункцию тканей [44, 45]. Такое состояние называется секреторным фенотипом, ассоциированным со старением (SASP). Хотя SASP и вносит заметный вклад в хроническое воспаление, его действие этим не ограничивается, а носит сложный плеiotропный характер, который подробно изложен в недавнем обзоре Birch и Gil [46]. Уничтожение клеток с SASP приводит к восстановлению функций органов и тканей и является перспективным подходом в борьбе против старения [47].

Nrf2 широко известен как фактор, ингибирующий процессы КС. Nrf2 влияет на многочисленные сигнальные пути, включающие антиоксидантную систему, аутофагию, систему мониторинга целостности генома с помощью p53, AMP-активируемой протеинкиназы (AMPK), транскрипционного фактора «каппа-би» (NF- κ B), и др. (см. обзор Yuan et al. [48]). Активность Nrf2 уменьшается при старении фибробластов человека, его сайленсинг индуцирует преждевременное старение, а фармакологическая активация Nrf2 увеличивает продолжительность жизни клеток [49]. В соответствии с этими данными, негативный регулятор Nrf2 кавеолин-1 (caveolin-1) также вызывал преждевременное старение фибробластов [50]. В состоянии покоя Nrf2 частично локализуется в кавеолах – инвагинациях плазматической мембраны, где он находится в комплексе со своим эндогенным ингибитором кавеолином-1. При окислительном стрессе кавеолин-1 ограничивает миграцию Nrf2 в ядро, тем самым предотвращая активацию генов-мишеней Nrf2. При сверхэкспрессии кавеолина на фоне окислительного стресса происходит ингибирование Nrf2-сигналинга и развитие преждевременного старения клеток [50]. Парадоксальным образом у мышей с делецией участка *Nrf2*, ответственного за связывание с KEAP1, перманентная активация Nrf2 приводит к преждевременному старению фибробластов и повышает вероятность развития раковых заболеваний [51]. При этом большинство исследователей полагают, что активация Nrf2 изначально мешает онкогенной трансформации клеток, но помогает выжить уже возникшим

раковым клеткам, предотвращая их гибель за счёт снижения окислительного стресса и элиминации химиопрепаратов. Более подробно неоднозначная роль Nrf2 в онкогенезе рассматривается в обзоре Wu et al. [52].

С одной стороны, имеется множество экспериментальных свидетельств, что активация Nrf2 снижает окислительный стресс, замедляет КС и уменьшает фенотип SASP [53–57]. Тем не менее имеются данные, что избыточная активация Nrf2 может вызывать окислительный стресс за счёт увеличения активности NADPH-оксидазы NOX4 [58], что может способствовать КС. Таким образом, продолжительность и амплитуда активации Nrf2 чрезвычайно важны для регуляции уровня АФК и КС.

СТАРЕНИЕ МЛЕКОПИТАЮЩИХ И АКТИВНОСТЬ Nrf2

В пионерской работе Suh et al. [59] было показано, что при старении у крыс снижается как количество Nrf2, так и его транскрипционная активность, что приводит к уменьшению экспрессии ферментов биосинтеза глутатиона, и, как следствие, понижению его количества, что способствует развитию окислительного стресса. Впоследствии ряд работ прямо или косвенно связали снижение активности Nrf2 со старением организма [60]. В скелетных мышцах пожилых людей, ведущих сидячий образ жизни, активность Nrf2 снижена [61]. В миокарде старых мышей транскрипционная активность Nrf2 снижалась, но её можно было восстановить умеренными физическими нагрузками [62].

Количество Nrf2 или его активность также снижались с возрастом в спинном мозге мышей [63], эндотелии сосудов [64], ткани языка крыс [65], печени крыс [66], а также в эпителиальных клетках бронхов человека [67]. Тем не менее до сих пор имеется лишь небольшое количество экспериментальных работ, в которых измеряли возрастное изменение активности Nrf2 в органах и тканях млекопитающих [2]. При этом в некоторых работах не было обнаружено возрастного снижения Nrf2 в артериях макаков [68]. А в других работах, напротив, детектировали увеличение активности Nrf2 в гладкомышечных клетках сосудов старых крыс [69]. Требуются дальнейшие усилия исследователей для заполнения этого пробела.

Несмотря на имеющиеся экспериментальные несоответствия, можно сделать предположение, что возрастное уменьшение активности Nrf2 носит универсальный межвидовой

характер: грызуны с высокой активностью Nrf2 обладают большей продолжительностью жизни, чем грызуны с низкой активностью [70]. Подобная ситуация наблюдается и у птиц – животных с высокой метаболической активностью и продукцией АФК, но парадоксально большой продолжительностью жизни. У клады Neoaaves, представляющей до 95% всех видов птиц, система Nrf2 постоянно активирована, что, как предполагается, обеспечивает адаптацию птиц к высоким уровням АФК и, как следствие, высокую продолжительность жизни [71]. Активация этой системы произошла за счёт мутации гена *KEAP1* у предка Neavian, что нарушило репрессию Nrf2 с помощью KEAP1 в тканях и клетках диких Neoaaves [71]. Однако среди представителей клады Neoaaves доля видов с высокой продолжительностью жизни является не очень большой [72]. При этом другие виды птиц, которые не относятся к этой кладе, например лебеди, характеризуются высокой продолжительностью жизни [73]. Таким образом, повышенная активация Nrf2 у птиц не может служить единственным объяснением феномена высокой продолжительности жизни.

Генетический нокаут *Nrf2* обычно приводит к усилению старческого фенотипа в самых разных органах и тканях животных: гиппокампе [74], скелетных мышцах [75, 76], сетчатке [77], слуховой системе [78], а также уменьшает продолжительность жизни самок мышей [79]. Как правило, эти изменения сопровождаются воспалительными реакциями и повышением уровня АФК, в том числе митохондриальных. Тем не менее существуют и противоположные примеры влияния нокаута *Nrf2* на окислительный стресс и признаки старения. Так, например, нокаут *Nrf2* у стареющих мышей уменьшил отложение ионов железа в головном мозге, понизил уровень окислительного повреждения в полосатом теле, а также смягчил возрастную двигательную дисфункцию [80]. Авторы связывают этот эффект со снижением экспрессии в эндотелии головного мозга гена ферропонтинина 1, находящегося под контролем Nrf2: у нокаутных животных уменьшение ферропонтинина в мозге приводит к уменьшению отложения железа и, соответственно, снижается окислительный стресс. Следовательно, действие транскрипционного фактора Nrf2 на уровне организма было бы неверно рассматривать как исключительно антиоксидантное, противовоспалительное и в конечном счёте антивозрастное. Под контролем Nrf2 находится множество генов, продукты которых оказывают на организм сложное, плейотропное действие. Так, избыточная ак-

тивация Nrf2 в печени мышей приводит к развитию гепатомегалии за счёт активации сигнального пути Akt [81].

Активация Nrf2 химическим или генетическим путём может приводить к уменьшению признаков старения. К сожалению, до сих пор не было проведено экспериментов по использованию химических индукторов Nrf2 как противовозрастных препаратов. При этом активация Nrf2 с помощью электрофилов из экстрактов растений (протандимом (Protandim)) увеличила медианную продолжительность жизни мышей, правда, только самцов [82].

Рапамицин является одним из немногих соединений, чья способность продлевать жизнь модельным животным подтверждается многими независимыми исследованиями [83]. Хотя основной мишенью рапамицина является mTOR, рапамицин также способен активировать Nrf2 [84], но это свойство оказалось не обязательным для предотвращения процесса КС *in vitro*.

Ещё один известный кандидат на «лекарство против старения» – антидиабетический препарат метформин, чьё действие на продолжительность жизни было проверено во множестве экспериментов [85]. Интересно, что метформин также способен активировать Nrf2 у *Caenorhabditis elegans* [86], но, по-видимому, у мышей метформин обладает противоположным эффектом, ингибируя Nrf2 в мозге [87].

Перманентная активация Nrf2 путём генетического нокаута его негативного регулятора *KEAP1* крайне неблагоприятна для организма: новорождённые нокаутные мыши быстро умирают от голода, скорее всего, из-за повышения экспрессии α -кератинов и последующего кератоза желудочно-кишечного тракта [88]. У мышей со сниженной экспрессией *KEAP1* уровень активации Nrf2 повышается не так сильно, как у нокаутных животных, что даёт возможность исследовать вклад Nrf2 в возрастные изменения. У таких мышей действительно замедлено развитие некоторых признаков старения: замедлено прогрессирование возрастной потери слуха [89], менее выражены старческие изменения в слюнных железах [90]. Можно было бы ожидать, что такие животные будут обладать большей продолжительностью жизни, но экспериментальных доказательств этого до сих пор нет. Напротив, по предварительным данным, снижение экспрессии *KEAP1* приводит к уменьшению выживаемости в когорте двухлетних мышей [91]. Дополнительной проблемой в трактовке действия Nrf2 на продолжительность жизни является факт, что *KEAP1* взаимодействует не

только с Nrf2, но и с другими клеточными субстратами [92, 93].

При этом есть косвенные указания, что повышение активности Nrf2 действительно может продлевать жизнь: так происходит у мышей, нокаутных по гену, кодирующему глутатион-трансферазу mGSTA4-4 (изоформа A4-4 глутатион-S-трансферазы млекопитающих) [94]. Поскольку этот фермент обеспечивает детоксикацию конечного продукта окисления липидов, 4-гидроксиноненаля (4-HNE), ожидалось, что делеция кодирующего его гена будет способствовать накоплению окислительных повреждений и сокращению жизни. Вероятно, компенсаторная активация Nrf2 у этих мышей не только способствовала детоксикации 4-HNE, но и замедлила процессы старения.

Важным модельным организмом для изучения старения и роли митохондрий в этом процессе являются так называемые быстро стареющие «мутаторные» мыши. Эти трансгенные животные экспрессируют митохондриальную ДНК-полимеразу гамма без корректирующей 3'-5'-экзонуклеазной активности, что приводит к накоплению мутаций в мтДНК, дисфункции дыхательной цепи, окислительному стрессу и преждевременному старению [95, 96]. Снижение митохондриального окислительного стресса с помощью митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 (пластохинолил-10(6'-децилтрифенил)фосфоний) продлевает жизнь животным [97]. Довольно неожиданное участие Nrf2 в старении мутаторных мышей было обнаружено в недавней работе Lei et al. [98]: оказалось, что мтДНК выходит из митохондрий в цитоплазму, активирует интерфероновый ответ, который ингибирует Nrf2, что ведёт к усилению окислительного стресса и ускоренному старению.

Голый землекоп широко известен как долгоживущее животное, устойчивое к раку и возрастным заболеваниям, а также обладающее признаками неотении, что может объяснять его феноменальную продолжительность жизни [99]. Относительно других грызунов у голых землекопов повышен базовый уровень Nrf2, в том числе имеется больше Nrf2 в ядре, повышена способность Nrf2 связываться с ARE и, соответственно, выше уровень экспрессии подконтрольных ему генов [70, 100]. Исследователи предполагают, что Nrf2 вносит значительный вклад в обеспечении высокой продолжительности жизни голого землекопа [101].

Одним из немногих надёжных способов продления жизни животных является ограничение питания. В работе Pearson et al. [102] было установлено, что ограничение калорий-

ности продлевает жизнь и нокаутным по *Nrf2* мышам, следовательно, Nrf2 не принимает участия в обеспечении продления жизни, вызываемого ограничением питания.

Про роль Nrf2 в старении человека известно немного. Предполагается, что у долгожителей может быть повышена активность Nrf2 за счёт специфической диеты, содержащей его индукторы, и что именно Nrf2 может играть ключевую роль в такой большой продолжительности жизни [103]. Тем не менее до сих пор нет экспериментальных свидетельств, что у долгожителей действительно повышена активность Nrf2.

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПРОФИЛЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ И Nrf2

Логично предположить, что если Nrf2 действительно является одним из центральных регуляторов старения, то профиль экспрессии регулируемых им генов в стареющих тканях должен изменяться соответствующим образом. К настоящему времени накоплены многочисленные омиксные данные по возрастным изменениям в различных тканях и органах. Некоторые из этих изменений действительно имеют признаки ослабления транскрипционной активности Nrf2. Так, например, транскриптомные данные указывают, что в мозгах нокаутных по *Nrf2* мышей наблюдаются такие изменения сигнальных путей, которые типичны для мозга пожилых людей [104].

Однако подавляющее большинство исследований, использующих непредвзятый подход к анализу паттернов старческих изменений, не обнаруживают признаков заметного изменения активности транскрипционного фактора Nrf2. Транскриптомный анализ образцов кожи человека (30–45 лет) демонстрирует центральную роль TNF (фактора некроза опухоли), p53 и NF-κB в возрастных изменениях [105]. Независимый метаанализ баз данных по 18 тканям людей различного возраста не обнаружил Nrf2 среди транскрипционных факторов, контролирующих транскрипцию генов, экспрессия которых изменяется с возрастом [106], что соответствует более ранним работам (см. обзор Stegeman и Weake [107]). Полномасштабный эпигеномный и транскриптомный ландшафт четырёх тканей при старении мыши выявил индукцию воспалительного ответа, но не активацию Nrf2 [108]. Системный анализ возрастных изменений в протеоме человека также не выявил изменения количества белков, являющихся продук-

тами мишеней Nrf2 [109]. Обнаружение так называемых «эпигенетических часов», отражающих биологический возраст человека и животных [110], также, к сожалению, не позволило выявить транскрипционные факторы, чья активность меняется со старением [111].

Следует отметить, что омиксные технологии, описывающие старение людей и животных, сталкиваются с рядом объективных трудностей. Во-первых, разный генетический бэкграунд и разный образ жизни вносит значительный вклад в детектируемые изменения. Во-вторых, неизбежные старческие болезни и патологии также изменяют профили экспрессии генов. В-третьих, клеточный состав тканей значительно меняется с возрастом, что безусловно, искажает картину происходящего. К сожалению, в большинстве исследований не проводилось предварительной сортировки клеток, что не позволяет сделать однозначные выводы. Наконец, активация Nrf2 может носить транзистентный характер, т.е. быстро возрастать и так же быстро снижаться. На этот процесс могут влиять различные факторы, такие как диета и употребление лекарственных средств. Например, употребление побегов брокколи, содержащих сульфорафан (индуктор Nrf2), повышает его экспрессию в крови людей [112], а многие лекарственные средства являются известными активаторами Nrf2 [113].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Старение организмов сопровождается: (1) накоплением окислительных повреждений и (2) повышением уровня воспаления. Активация транскрипционного фактора Nrf2 может повлиять на оба эти фактора, замедлив развитие старческих изменений. Косвенным подтверждением этого предположения является тот факт, что долгоживущие животные, такие как голый землекоп, имеют повышенный уровень активации Nrf2. Важным направлением исследований должно стать получение независимых экспериментальных данных о возрастной динамике изменения активности Nrf2 у животных и человека, так как имеется недостаток данных подобного рода.

Заманчиво предположить, что людям для успешной борьбы со старением, подобно голым землекопам, необходимо научиться должным образом активировать Nrf2. Однако следует учесть, что долгоживущие организмы эволюционно адаптировались к высокой активности Nrf2 и произвели тонкую настройку сложной системы взаимодействий сигналь-

ных и метаболических путей. Поэтому простая фармакологическая активация Nrf2 с целью продления жизни представляется не самым перспективным подходом, несущим риски серьёзных побочных эффектов. Более того, в литературе отсутствуют надёжные данные, однозначно доказывающие, что активация Nrf2 действительно приводит к увеличению продолжительности жизни млекопитающих.

Старение сопровождается изменением профиля экспрессии генов, который является ткане- и видоспецифичным. Эти изменения лишь в небольшой степени соответствуют паттерну генов, контролируемых Nrf2. Таким образом, в настоящий момент нельзя сделать вывод, что Nrf2 является «главным регулятором процесса старения».

Вклад авторов. Р.А. Зиновкин – концепция обзора; Л.А. Зиновкина – подготовка рисунков; Р.А. Зиновкин, Л.А. Зиновкина и Н.Д. Кондратенко – написание и редактирование текста.

Благодарности. Авторы благодарны господину Е.С. Егорову за помощь в редактировании статьи. Работа осуществлена при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных автором исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lewis, K. N., Mele, J., Hayes, J. D., and Buffenstein, R. (2010) Nrf2, a guardian of healthspan and gatekeeper of species longevity, *Integr. Comp. Biol.*, **50**, 829-843, doi: 10.1093/icb/icq034.
- Shilovsky, G. A. (2022) Lability of the Nrf2/Keap/ARE cell defense system in different models of cell aging and age-related pathologies, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 70-85, doi: 10.1134/S0006297922010060.
- Van der Rijt, S., Molenaars, M., McIntyre, R. L., Janssens, G. E., and Houtkooper, R. H. (2020) Integrating the hallmarks of aging throughout the tree of life: a focus on mitochondrial dysfunction, *Front. Cell Dev. Biol.*, **8**, 594416, doi: 10.3389/fcell.2020.594416.
- Moskalev, A. (2019) *Biomarkers of Human Aging*, Springer International Publishing, doi: 10.1007/978-3-030-24970-0.
- Harman, D. (1955) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry, *J. Gerontol.*, **3**, 298-300, doi: 10.1093/geronj/11.3.298.
- Gladyshev, V. N. (2014) The free radical theory of aging is dead. Long live the damage theory! *Antioxid. Redox Signal.*, **20**, 727-731, doi: 10.1089/ars.2013.5228.
- Skulachev, V. P., Anisimov, V. N., Antonenko, Y. N., Bakeeva, L. E., Chernyak, B. V., Elichev, V. P., et al. (2009) An attempt to prevent senescence: a mitochondrial approach, *Biochim. Biophys. Acta*, **1787**, 437-461, doi: 10.1016/j.bbabi.2008.12.008.
- Franceschi, C., Capri, M., Monti, D., Giunta, S., Olivieri, F., Sevini, F., et al. (2007) Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans, *Mech. Ageing Dev.*, **128**, 92-105, doi: 10.1016/j.mad.2006.11.016.
- Da Costa, J. P., Vitorino, R., Silva, G. M., Vogel, C., Duarte, A. C., and Rocha-Santos, T. (2016) A synopsis on aging-theories, mechanisms and future prospects, *Ageing Res. Rev.*, **29**, 90-112, doi: 10.1016/j.arr.2016.06.005.
- Longo, V. D., Mitteldorf, J., and Skulachev, V. P. (2005) Programmed and altruistic ageing, *Nat. Rev. Genet.*, **6**, 866-872, doi: 10.1038/nrg1706.
- Skulachev, V. P. (1999) Phenoptosis: programmed death of an organism, *Biochemistry (Moscow)*, **64**, 1418-1426.
- Goldsmith, T. C. (2016) Evolution of aging theories: why modern programmed aging concepts are transforming medical research, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 1406-1412, doi: 10.1134/S0006297916120026.
- Johnson, F. B., Sinclair, D. A., and Guarente, L. (1999) Molecular biology of aging, *Cell*, **96**, 291-302, doi: 10.1016/s0092-8674(00)80567-x.
- Carlos Aledo, J., and Maria Blanco, J. (2015) Aging is neither a failure nor an achievement of natural selection, *Curr. Aging Sci.*, **8**, 4-10, doi: 10.2174/1874609808666150421130033.
- Skulachev, M. V., and Skulachev, V. P. (2017) Programmed aging of mammals: proof of concept and prospects of biochemical approaches for anti-aging therapy, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 1403-1422, doi: 10.1134/S000629791712001X.
- Moi, P., Chan, K., Asunis, I., Cao, A., and Kan, Y. W. (1994) Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 9926-9930, doi: 10.1073/pnas.91.21.9926.
- Liu, T., Lv, Y.-F., Zhao, J.-L., You, Q.-D., and Jiang, Z.-Y. (2021) Regulation of Nrf2 by phosphorylation: Consequences for biological function and therapeutic

- implications, *Free Radic. Biol. Med.*, **168**, 129-141, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.03.034.
18. Ahmed, S. M. U., Luo, L., Namani, A., Wang, X. J., and Tang, X. (2017) Nrf2 signaling pathway: pivotal roles in inflammation, *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Bas. Dis.*, **1863**, 585-597, doi: 10.1016/j.bbadis.2016.11.005.
19. Chen, Q. M. (2021) Nrf2 for cardiac protection: pharmacological options against oxidative stress, *Trends Pharmacol. Sci.*, **42**, 729-744, doi: 10.1016/j.tips.2021.06.005.
20. Kobayashi, E. H., Suzuki, T., Funayama, R., Nagashima, T., Hayashi, M., Sekine, H., et al. (2016) Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription, *Nat. Commun.*, **7**, 11624, doi: 10.1038/ncomms11624.
21. Mills, E. L., Ryan, D. G., Prag, H. A., Dikovskaya, D., Menon, D., Zaslona, Z., et al. (2018) Itaconate is an anti-inflammatory metabolite that activates Nrf2 via alkylation of KEAP1, *Nature*, **556**, 113-117, doi: 10.1038/nature25986.
22. Kensler, T. W., Wakabayashi, N., and Biswal, S. (2007) Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **47**, 89-116, doi: 10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141046.
23. Zinovkin, R. A., and Grebenchikov, O. A. (2020) Transcription factor Nrf2 as a potential therapeutic target for prevention of cytokine storm in COVID-19 patients, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 833-837, doi: 10.1134/S0006297920070111.
24. Katoh, Y., Iida, K., Kang, M.-I., Kobayashi, A., Mizukami, M., Tong, K. I., et al. (2005) Evolutionary conserved N-terminal domain of Nrf2 is essential for the Keap1-mediated degradation of the protein by proteasome, *Arch. Biochem. Biophys.*, **433**, 342-350, doi: 10.1016/j.abb.2004.10.012.
25. Motohashi, H., and Yamamoto, M. (2004) Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism, *Trends Mol. Med.*, **10**, 549-557, doi: 10.1016/j.molmed.2004.09.003.
26. Kwak, M.-K., Itoh, K., Yamamoto, M., and Kensler, T. W. (2002) Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter, *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 2883-2892, doi: 10.1128/mcb.22.9.2883-2892.2002.
27. Xie, L., Gu, Y., Wen, M., Zhao, S., Wang, W., Ma, Y., et al. (2016) Hydrogen sulfide induces Keap1 S-sulfhydration and suppresses diabetes-accelerated atherosclerosis via Nrf2 activation, *Diabetes*, **65**, 3171-3184, doi: 10.2337/db16-0020.
28. Jiang, T., Harder, B., Rojo de la Vega, M., Wong, P. K., Chapman, E., and Zhang, D. D. (2015) p62 links autophagy and Nrf2 signaling, *Free Radic. Biol. Med.*, **88**, 199-204, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.014.
29. Hay, N., and Sonenberg, N. (2004) Upstream and downstream of mTOR, *Genes Dev.*, **18**, 1926-1945, doi: 10.1101/gad.1212704.
30. Kim, D.-H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., King, J. E., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., et al. (2002) mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery, *Cell*, **110**, 163-175, doi: 10.1016/s0092-8674(02)00808-5.
31. Ichimura, Y., Waguri, S., Sou, Y.-S., Kageyama, S., Hasegawa, J., Ishimura, R., et al. (2013) Phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during selective autophagy, *Mol. Cell*, **51**, 618-631, doi: 10.1016/j.molcel.2013.08.003.
32. Saito, T., Ichimura, Y., Taguchi, K., Suzuki, T., Mizushima, T., Takagi, K., et al. (2016) p62/Sqstm1 promotes malignancy of HCV-positive hepatocellular carcinoma through Nrf2-dependent metabolic reprogramming, *Nat. Commun.*, **7**, 12030, doi: 10.1038/ncomms12030.
33. Ma, K., Chen, G., Li, W., Kepp, O., Zhu, Y., and Chen, Q. (2020) Mitophagy, mitochondrial homeostasis, and cell fate, *Front. Cell Dev. Biol.*, **8**, 467, doi: 10.3389/fcell.2020.00467.
34. Fan, Y., Xing, Y., Xiong, L., and Wang, J. (2020) Sestrin2 overexpression alleviates hydrogen peroxide-induced apoptosis and oxidative stress in retinal ganglion cells by enhancing Nrf2 activation via Keap1 downregulation, *Chem. Biol. Interact.*, **324**, 109086, doi: 10.1016/j.cbi.2020.109086.
35. Kovaleva, I. E., Tokarchuk, A. V., Zheltukhin, A. O., Dalina, A. A., Safronov, G. G., Evstafieva, A. G., et al. (2020) Mitochondrial localization of SESN2, *PLoS One*, **15**, e0226862, doi: 10.1371/journal.pone.0226862.
36. Wu, T., Zhao, F., Gao, B., Tan, C., Yagishita, N., Nakajima, T., et al. (2014) Hrd1 suppresses Nrf2-mediated cellular protection during liver cirrhosis, *Genes Dev.*, **28**, 708-722, doi: 10.1101/gad.238246.114.
37. Chowdhry, S., Zhang, Y., McMahon, M., Sutherland, C., Cuadrado, A., and Hayes, J. D. (2013) Nrf2 is controlled by two distinct β -TrCP recognition motifs in its Neh6 domain, one of which can be modulated by GSK-3 activity, *Oncogene*, **32**, 3765-3781, doi: 10.1038/onc.2012.388.
38. Purdom-Dickinson, S. E., Sheveleva, E. V., Sun, H., and Chen, Q. M. (2007) Translational control of nrf2 protein in activation of antioxidant response by oxidants, *Mol. Pharmacol.*, **72**, 1074-1081, doi: 10.1124/mol.107.035360.
39. Shang, G., Tang, X., Gao, P., Guo, F., Liu, H., Zhao, Z., et al. (2015) Sulforaphane attenuation of experimental diabetic nephropathy involves GSK-3 beta/Fyn/Nrf2 signaling pathway, *J. Nutr. Biochem.*, **26**, 596-606, doi: 10.1016/j.jnutbio.2014.12.008.
40. Culbreth, M., Zhang, Z., and Aschner, M. (2017) Methylmercury augments Nrf2 activity by downregulation of the Src family kinase Fyn, *Neurotoxicology*, **62**, 200-206, doi: 10.1016/j.neuro.2017.07.028.

41. Li, W., Thakor, N., Xu, E. Y., Huang, Y., Chen, C., Yu, R., et al. (2010) An internal ribosomal entry site mediates redox-sensitive translation of Nrf2, *Nucleic Acids Res.*, **38**, 778-788, doi: 10.1093/nar/gkp1048.
42. Lee, S. C., Zhang, J., Strom, J., Yang, D., Dinh, T. N., Kappeler, K., et al. (2017) G-quadruplex in the NRF2 mRNA 5' untranslated region regulates *de novo* NRF2 protein translation under oxidative stress, *Mol. Cell. Biol.*, **37**, e00122-16, doi: 10.1128/MCB.00122-16.
43. Kumari, R., and Jat, P. (2021) Mechanisms of cellular senescence: cell cycle arrest and senescence associated secretory phenotype, *Front. Cell Dev. Biol.*, **9**, 645593, doi: 10.3389/fcell.2021.645593.
44. Rodier, F., Coppé, J.-P., Patil, C. K., Hoeijmakers, W. A. M., Muñoz, D. P., Raza, S. R., et al. (2009) Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion, *Nat. Cell Biol.*, **11**, 973-979, doi: 10.1038/ncb1909.
45. Coppé, J.-P., Patil, C. K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D. P., Goldstein, J., et al. (2008) Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor, *PLoS Biol.*, **6**, 2853-2868, doi: 10.1371/journal.pbio.0060301.
46. Birch, J., and Gil, J. (2020) Senescence and the SASP: many therapeutic avenues, *Genes Dev.*, **34**, 1565-1576, doi: 10.1101/gad.343129.120.
47. Cai, Y., Zhou, H., Zhu, Y., Sun, Q., Ji, Y., Xue, A., et al. (2020) Elimination of senescent cells by β -galactosidase-targeted prodrug attenuates inflammation and restores physical function in aged mice, *Cell Res.*, **30**, 574-589, doi: 10.1038/s41422-020-0314-9.
48. Yuan, H., Xu, Y., Luo, Y., Wang, N.-X., and Xiao, J.-H. (2021) Role of Nrf2 in cell senescence regulation, *Mol. Cell. Biochem.*, **476**, 247-259, doi: 10.1007/s11010-020-03901-9.
49. Kapeta, S., Chondrogianni, N., and Gonos, E. S. (2010) Nuclear erythroid factor 2-mediated proteasome activation delays senescence in human fibroblasts, *J. Biol. Chem.*, **285**, 8171-8184, doi: 10.1074/jbc.M109.031575.
50. Volonte, D., Liu, Z., Musille, P. M., Stoppani, E., Wakabayashi, N., Di, Y.-P., et al. (2013) Inhibition of nuclear factor-erythroid 2-related factor (Nrf2) by caveolin-1 promotes stress-induced premature senescence, *Mol. Biol. Cell*, **24**, 1852-1862, doi: 10.1091/mbc.E12-09-0666.
51. Hiebert, P., Wietecha, M. S., Cangkrama, M., Haertel, E., Mavrogonatou, E., Stumpe, M., et al. (2018) Nrf2-mediated fibroblast reprogramming drives cellular senescence by targeting the matrisome, *Dev. Cell*, **46**, 145-161.e10, doi: 10.1016/j.devcel.2018.06.012
52. Wu, S., Lu, H., and Bai, Y. (2019) Nrf2 in cancers: a double-edged sword, *Cancer Med.*, **8**, 2252-2267, doi: 10.1002/cam4.2101.
53. Zhou, T., Zhang, M., Zhao, L., Li, A., and Qin, X. (2016) Activation of Nrf2 contributes to the protective effect of Exendin-4 against angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell senescence, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **311**, C572-C582, doi: 10.1152/ajpcell.00093.2016.
54. Romero, A., San Hipólito-Luengo, Á., Villalobos, L. A., Vallejo, S., Valencia, I., Michalska, P., et al. (2019) The angiotensin-(1-7)/Mas receptor axis protects from endothelial cell senescence via klotho and Nrf2 activation, *Aging Cell*, **18**, e12913, doi: 10.1111/ace1.12913.
55. Wang, Z., Chen, Z., Jiang, Z., Luo, P., Liu, L., Huang, Y., et al. (2019) Cordycepin prevents radiation ulcer by inhibiting cell senescence via NRF2 and AMPK in rodents, *Nat. Commun.*, **10**, 2538, doi: 10.1038/s41467-019-10386-8.
56. Chen, L., Yang, R., Qiao, W., Zhang, W., Chen, J., Mao, L., et al. (2019) 1,25-Dihydroxyvitamin D exerts an antiaging role by activation of Nrf2-antioxidant signaling and inactivation of p16/p53-senescence signaling, *Aging Cell*, **18**, e12951, doi: 10.1111/ace1.12951.
57. Lu, D., Le, Y., Ding, J., Dou, X., Mao, W., and Zhu, J. (2021) CLIC1 Inhibition protects against cellular senescence and endothelial dysfunction via the Nrf2/HO-1 pathway, *Cell Biochem. Biophys.*, **79**, 239-252, doi: 10.1007/s12013-020-00959-6.
58. Kovac, S., Angelova, P. R., Holmström, K. M., Zhang, Y., Dinkova-Kostova, A. T., and Abramov, A. Y. (2015) Nrf2 regulates ROS production by mitochondria and NADPH oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1850**, 794-801, doi: 10.1016/j.bbagen.2014.11.021.
59. Suh, J. H., Shenvi, S. V., Dixon, B. M., Liu, H., Jaiswal, A. K., Liu, R.-M., et al. (2004) Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 3381-3386, doi: 10.1073/pnas.0400282101.
60. Matsumaru, D., and Motohashi, H. (2021) The KEAP1-NRF2 system in healthy aging and longevity, *Antioxidants (Basel)*, **10**, 1929, doi: 10.3390/antiox10121929.
61. Safdar, A., deBeer, J., and Tarnopolsky, M. A. (2010) Dysfunctional Nrf2-Keap1 redox signaling in skeletal muscle of the sedentary old, *Free Radic. Biol. Med.*, **49**, 1487-1493, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.08.010.
62. Gounder, S. S., Kannan, S., Devadoss, D., Miller, C. J., Whitehead, K. J., Odelberg, S. J., et al. (2012) Impaired transcriptional activity of Nrf2 in age-related myocardial oxidative stress is reversible by moderate exercise training, *PLoS One*, **7**, e45697, doi: 10.1371/journal.pone.0045697.
63. Duan, W., Zhang, R., Guo, Y., Jiang, Y., Huang, Y., Jiang, H., et al. (2009) Nrf2 activity is lost in the spinal cord and its astrocytes of aged mice, *In vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, **45**, 388-397, doi: 10.1007/s11626-009-9194-5.
64. Ungvari, Z., Bailey-Downs, L., Sosnowska, D., Gautam, T., Koncz, P., Losonczy, G., et al. (2011) Vascular oxidative stress in aging: a homeostatic failure

- due to dysregulation of NRF2-mediated antioxidant response, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **301**, H363-H372, doi: 10.1152/ajpheart.01134.2010.
65. Baek, M.-K., Lee, H., Kim, K.-O., Kwon, H.-J., Chung, M.-H., Park, H.-M., et al. (2017) Age-related changes in nuclear factor erythroid 2-related factor 2 and reactive oxygen species and mitochondrial structure in the tongues of Fischer 344 rats, *Clin. Exp. Otorhinolaryngol.*, **10**, 357-362, doi: 10.21053/ceo.2016.01095.
66. Shih, P.-H., and Yen, G.-C. (2007) Differential expressions of antioxidant status in aging rats: the role of transcriptional factor Nrf2 and MAPK signaling pathway, *Biogerontology*, **8**, 71-80, doi: 10.1007/s10522-006-9033-y.
67. Zhou, L., Zhang, H., Davies, K. J. A., and Forman, H. J. (2018) Aging-related decline in the induction of Nrf2-regulated antioxidant genes in human bronchial epithelial cells, *Redox Biol.*, **14**, 35-40, doi: 10.1016/j.redox.2017.08.014.
68. Ungvari, Z., Bailey-Downs, L., Gautam, T., Sosnowska, D., Wang, M., Monticone, R. E., et al. (2011) Age-associated vascular oxidative stress, Nrf2 dysfunction, and NF- κ B activation in the nonhuman primate *Macaca mulatta*, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **66**, 866-875, doi: 10.1093/gerona/glr092.
69. Li, M., Liu, R.-M., Timblin, C. R., Meyer, S. G., Mossman, B. T., and Fukagawa, N. K. (2006) Age affects ERK1/2 and NRF2 signaling in the regulation of GCLC expression, *J. Cell Physiol.*, **206**, 518-525, doi: 10.1002/jcp.20496.
70. Lewis, K. N., Wason, E., Edrey, Y. H., Kristan, D. M., Nevo, E., and Buffenstein, R. (2015) Regulation of Nrf2 signaling and longevity in naturally long-lived rodents, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 3722-3727, doi: 10.1073/pnas.1417566112.
71. Castiglione, G. M., Xu, Z., Zhou, L., and Duh, E. J. (2020) Adaptation of the master antioxidant response connects metabolism, lifespan and feather development pathways in birds, *Nat. Commun.*, **11**, 2476, doi: 10.1038/s41467-020-16129-4.
72. Jones, O. R., Scheuerlein, A., Salguero-Gómez, R., Camarda, C. G., Schaible, R., Casper, B. B., et al. (2014) Diversity of ageing across the tree of life, *Nature*, **505**, 169-173, doi: 10.1038/nature12789.
73. Charmantier, A., Perrins, C., McCleery, R. H., and Sheldon, B. C. (2006) Quantitative genetics of age at reproduction in wild swans: support for antagonistic pleiotropy models of senescence, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 6587-6592, doi: 10.1073/pnas.0511123103.
74. Fulop, G. A., Kiss, T., Tarantini, S., Balasubramanian, P., Yabluchanskiy, A., Farkas, E., et al. (2018) Nrf2 deficiency in aged mice exacerbates cellular senescence promoting cerebrovascular inflammation, *Geroscience*, **40**, 513-521, doi: 10.1007/s11357-018-0047-6.
75. Ahn, B., Pharaoh, G., Premkumar, P., Huseman, K., Ranjit, R., Kinter, M., et al. (2018) Nrf2 deficiency exacerbates age-related contractile dysfunction and loss of skeletal muscle mass, *Redox Biol.*, **17**, 47-58, doi: 10.1016/j.redox.2018.04.004.
76. Kitaoka, Y., Tamura, Y., Takahashi, K., Takeda, K., Takemasa, T., and Hatta, H. (2019) Effects of Nrf2 deficiency on mitochondrial oxidative stress in aged skeletal muscle, *Physiol. Rep.*, **7**, e13998, doi: 10.14814/phy2.13998.
77. Zhao, Z., Chen, Y., Wang, J., Sternberg, P., Freeman, M. L., Grossniklaus, H. E., et al. (2011) Age-related retinopathy in NRF2-deficient mice, *PLoS One*, **6**, e19456, doi: 10.1371/journal.pone.0019456.
78. Hoshino, T., Tabuchi, K., Nishimura, B., Tanaka, S., Nakayama, M., Ishii, T., et al. (2011) Protective role of Nrf2 in age-related hearing loss and gentamicin ototoxicity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **415**, 94-98, doi: 10.1016/j.bbrc.2011.10.019.
79. Yoh, K., Itoh, K., Enomoto, A., Hirayama, A., Yamaguchi, N., Kobayashi, M., et al. (2001) Nrf2-deficient female mice develop lupus-like autoimmune nephritis, *Kidney Int.*, **60**, 1343-1353, doi: 10.1046/j.1523-1755.2001.00939.x.
80. Han, K., Jin, X., Guo, X., Cao, G., Tian, S., Song, Y., et al. (2021) Nrf2 knockout altered brain iron deposition and mitigated age-related motor dysfunction in aging mice, *Free Radic. Biol. Med.*, **162**, 592-602, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.11.019.
81. He, F., Antonucci, L., Yamachika, S., Zhang, Z., Taniguchi, K., Umemura, A., et al. (2020) NRF2 activates growth factor genes and downstream AKT signaling to induce mouse and human hepatomegaly, *J. Hepatol.*, **72**, 1182-1195, doi: 10.1016/j.jhep.2020.01.023.
82. Strong, R., Miller, R. A., Antebi, A., Astle, C. M., Bogue, M., Denzel, M. S., et al. (2016) Longer lifespan in male mice treated with a weakly estrogenic agonist, an antioxidant, an α -glucosidase inhibitor or a Nrf2-inducer, *Aging Cell*, **15**, 872-884, doi: 10.1111/accel.12496.
83. Selvarani, R., Mohammed, S., and Richardson, A. (2021) Effect of rapamycin on aging and age-related diseases – past and future, *GeroScience*, **43**, 1135-1158, doi: 10.1007/s11357-020-00274-1.
84. Wang, R., Yu, Z., Sunchu, B., Shoaf, J., Dang, I., Zhao, S., et al. (2017) Rapamycin inhibits the secretory phenotype of senescent cells by a Nrf2-independent mechanism, *Aging Cell*, **16**, 564-574, doi: 10.1111/accel.12587.
85. Mohammed, I., Hollenberg, M. D., Ding, H., and Triggle, C. R. (2021) A critical review of the evidence that metformin is a putative anti-aging drug that enhances healthspan and extends lifespan, *Front. Endocrinol.*, **12**, 718942, doi: 10.3389/fendo.2021.718942.
86. Onken, B., and Driscoll, M. (2010) Metformin induces a dietary restriction-like state and the oxidative stress response to extend *C. elegans* healthspan via AMPK, LKB1, and SKN-1, *PLoS One*, **5**, e8758, doi: 10.1371/journal.pone.0008758.

87. Allard, J. S., Perez, E. J., Fukui, K., Carpenter, P., Ingram, D. K., and de Cabo, R. (2016) Prolonged metformin treatment leads to reduced transcription of Nrf2 and neurotrophic factors without cognitive impairment in older C57BL/6J mice, *Behav. Brain Res.*, **301**, 1-9, doi: 10.1016/j.bbr.2015.12.012.
88. Wakabayashi, N., Itoh, K., Wakabayashi, J., Motohashi, H., Noda, S., Takahashi, S., et al. (2003) Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation, *Nat. Genet.*, **35**, 238-245, doi: 10.1038/ng1248.
89. Oishi, T., Matsumaru, D., Ota, N., Kitamura, H., Zhang, T., Honkura, Y., et al. (2020) Activation of the NRF2 pathway in Keap1-knockdown mice attenuates progression of age-related hearing loss, *NPJ Aging Mech. Dis.*, **6**, 14, doi: 10.1038/s41514-020-00053-4.
90. Wati, S. M., Matsumaru, D., and Motohashi, H. (2020) NRF2 pathway activation by KEAP1 inhibition attenuates the manifestation of aging phenotypes in salivary glands, *Redox Biol.*, **36**, 101603, doi: 10.1016/j.redox.2020.101603.
91. Taguchi, K., Maher, J. M., Suzuki, T., Kawatani, Y., Motohashi, H., and Yamamoto, M. (2010) Genetic analysis of cytoprotective functions supported by graded expression of Keap1, *Mol. Cell. Biol.*, **30**, 3016-3026, doi: 10.1128/MCB.01591-09.
92. Lee, D.-F., Kuo, H.-P., Liu, M., Chou, C.-K., Xia, W., Du, Y., et al. (2009) KEAP1 E3 ligase-mediated downregulation of NF- κ B signaling by targeting IKK β , *Mol. Cell*, **36**, 131-140, doi: 10.1016/j.molcel.2009.07.025.
93. Mulvaney, K. M., Matson, J. P., Siesser, P. F., Tamir, T. Y., Goldfarb, D., Jacobs, T. M., et al. (2016) Identification and characterization of MCM3 as a Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1) substrate, *J. Biol. Chem.*, **291**, 23719-23733, doi: 10.1074/jbc.M116.729418.
94. Singh, S. P., Niemczyk, M., Saini, D., Sadvov, V., Zimniak, L., and Zimniak, P. (2010) Disruption of the mGsta4 gene increases life span of C57BL mice, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **65**, 14-23, doi: 10.1093/gerona/glp165.
95. Trifunovic, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J. N., Rovio, A. T., Bruder, C. E., et al. (2004) Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase, *Nature*, **429**, 417-423, doi: 10.1038/nature02517.
96. Kujoth, G. C., Hiona, A., Pugh, T. D., Someya, S., Panzer, K., Wohlgemuth, S. E., et al. (2005) Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging, *Science*, **309**, 481-484, doi: 10.1126/science.1112125.
97. Shabalina, I. G., Vysokikh, M. Y., Gibanova, N., Csikasz, R. I., Edgar, D., Hallden-Waldemarson, A., et al. (2017) Improved health-span and lifespan in mtDNA mutator mice treated with the mitochondrially targeted antioxidant SkQ1, *Aging*, **9**, 315-339, doi: 10.18632/aging.101174.
98. Lei, Y., Guerra Martinez, C., Torres-Odio, S., Bell, S. L., Birdwell, C. E., Bryant, J. D., et al. (2021) Elevated type I interferon responses potentiate metabolic dysfunction, inflammation, and accelerated aging in mtDNA mutator mice, *Sci. Adv.*, **7**, doi: 10.1126/sciadv.abe7548.
99. Skulachev, V. P., Holtze, S., Vysokikh, M. Y., Bakeeva, L. E., Skulachev, M. V., Markov, A. V., et al. (2017) Neoteny, prolongation of youth: from naked mole rats to "naked apes" (humans), *Physiol. Rev.*, **97**, 699-720, doi: 10.1152/physrev.00040.2015.
100. Lewis, K. N., Mele, J., Hornsby, P. J., and Buffenstein, R. (2012) Stress resistance in the naked mole-rat: the bare essentials – a mini-review, *Gerontology*, **58**, 453-462, doi: 10.1159/000335966.
101. Bruns, D. R., Drake, J. C., Biela, L. M., Peelor, F. F., Miller, B. F., and Hamilton, K. L. (2015) Nrf2 signaling and the slowed aging phenotype: evidence from long-lived models, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2015**, 732596, doi: 10.1155/2015/732596.
102. Pearson, K. J., Lewis, K. N., Price, N. L., Chang, J. W., Perez, E., Cascajo, M. V., et al. (2008) Nrf2 mediates cancer protection but not longevity induced by caloric restriction, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 2325-2330, doi: 10.1073/pnas.0712162105.
103. Davinelli, S., Willcox, D. C., and Scapagnini, G. (2012) Extending healthy ageing: nutrient sensitive pathway and centenarian population, *Immun. Ageing*, **9**, 9, doi: 10.1186/1742-4933-9-9.
104. Rojo, A. I., Pajares, M., Rada, P., Nuñez, A., Nevado-Holgado, A. J., Killik, R., et al. (2017) NRF2 deficiency replicates transcriptomic changes in Alzheimer's patients and worsens APP and TAU pathology, *Redox Biol.*, **13**, 444-451, doi: 10.1016/j.redox.2017.07.006.
105. Haustead, D. J., Stevenson, A., Saxena, V., Marriage, F., Firth, M., Silla, R., et al. (2016) Transcriptome analysis of human ageing in male skin shows mid-life period of variability and central role of NF- κ B, *Sci. Rep.*, **6**, 26846, doi: 10.1038/srep26846.
106. Alfego, D., Rodeck, U., and Kriete, A. (2018) Global mapping of transcription factor motifs in human aging, *PLoS One*, **13**, e0190457, doi: 10.1371/journal.pone.0190457.
107. Stegeman, R., and Weake, V. M. (2017) Transcriptional signatures of aging, *J. Mol. Biol.*, **429**, 2427-2437, doi: 10.1016/j.jmb.2017.06.019.
108. Benayoun, B. A., Pollina, E. A., Singh, P. P., Mahmoudi, S., Harel, I., Casey, K. M., et al. (2019) Remodeling of epigenome and transcriptome landscapes with aging in mice reveals widespread induction of inflammatory responses, *Genome Res.*, **29**, 697-709, doi: 10.1101/gr.240093.118.
109. Johnson, A. A., Shokhirev, M. N., Wyss-Coray, T., and Lehallier, B. (2020) Systematic review and analysis

- of human proteomics aging studies unveils a novel proteomic aging clock and identifies key processes that change with age, *Ageing Res. Rev.*, **60**, 101070, doi: 10.1016/j.arr.2020.101070.
110. Horvath, S. (2013) DNA methylation age of human tissues and cell types, *Genome Biol.*, **14**, 3156, doi: 10.1186/gb-2013-14-10-r115.
111. Bell, C. G., Lowe, R., Adams, P. D., Baccarelli, A. A., Beck, S., Bell, J. T., et al. (2019) DNA methylation aging clocks: challenges and recommendations, *Genome Biol.*, **20**, 249, doi: 10.1186/s13059-019-1824-y.
112. Dinkova-Kostova, A. T., Fahey, J. W., Kostov, R. V., and Kensler, T. W. (2017) KEAP1 and done? Targeting the NRF2 pathway with sulforaphane, *Trends Food Sci. Technol.*, **69**, 257-269, doi: 10.1016/j.tifs.2017.02.002.
113. Taguchi, K., and Kensler, T. W. (2020) Nrf2 in liver toxicology, *Arch. Pharm. Res.*, **43**, 337-349, doi: 10.1007/s12272-019-01192-3.

DOES Nrf2 APPEAR TO BE A MASTER REGULATOR OF MAMMALIAN AGING?

Review

R. A. Zinovkin^{1,2*}, N. D. Kondratenko^{1,2,3}, and L. A. Zinovkina³

¹ *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; E-mail: roman.zinovkin@gmail.com*

² *Russian Clinical Research Center for Gerontology of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Pirogov Russian National Research Medical University, 129226, Moscow, Russia*

³ *Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991, Russia*

For a long time Nrf2 transcription factor has been keeping close attention of aging phenomenon researchers. Numerous studies have investigated Nrf2 effects on the aging and cell senescence. Nrf2 is often ascribed to have a central role in aging processes, however this thesis needs to be proven. It should be noted, that most studies were carried out on invertebrate model organisms, such as nematodes and fruit flies, but not on mammals. This paper briefly overviews main mechanisms of mammalian aging and role of inflammation and oxidative stress in this process. The mechanisms of Nrf2 activity regulation, its involvement in aging and development of senescence-associated secretory phenotype (SASP) are also discussed. The main part of this review is devoted to critical analysis of experimental data on the role of Nrf2 in mammalian aging.

Keywords: transcription factor Nrf2, aging, inflammation, oxidative stress, aging theories, age-related changes

ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ФАКТОР Nrf2 И МИТОХОНДРИИ – ДРУЗЬЯ ИЛИ ПРОТИВНИКИ В РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИИ ТЕМПОВ СТАРЕНИЯ

Обзор

© 2022 Г.А. Шиловский^{1,2,3*}, В.В. Ашапкин¹

¹ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия; электронная почта: gregory_sh@list.ru, grgerontol@gmail.com

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991 Москва, Россия

³ Институт проблем передачи информации РАН, 127051 Москва, Россия

Поступила в редакцию 17.10.2022

После доработки 24.11.2022

Принята к публикации 25.11.2022

На первый взгляд, главный регулятор активности антиоксидантных систем клетки, транскрипционный фактор Nrf2, и главный источник активных форм кислорода, митохондрии, должны играть противоположные роли в определении темпов старения. Однако, так же как причины старения далеко не исчерпываются окислительным стрессом, роль Nrf2 не исчерпывается регуляцией активности антиоксидантных систем, и тем более роль митохондрий не исчерпывается генерацией АФК. В данном обзоре мы постарались рассмотреть лишь один из частных аспектов этой проблемы – молекулярные механизмы взаимодействия Nrf2 и митохондрий, так или иначе влияющие на темпы старения и продолжительность жизни. Накопившиеся к сегодняшнему дню экспериментальные данные показывают, что активность Nrf2 положительно связана с митохондриальной динамикой и контролем качества митохондрий. Nrf2 может влиять на работу митохондрий разными способами: регулируя продукцию закодированных в ядерном геноме митохондриальных белков или изменяя баланс АФК и других существенных для функционирования митохондрий метаболитов. В свою очередь, многие регуляторные белки, функционально связанные с митохондриями, влияют также и на активность системы Nrf2 и даже образуют с ней взаимные регуляторные петли. Есть все основания полагать, что существование таких регуляторных петель связано с тонкой настройкой редокс-систем клетки, а возможно, и метаболизма в целом. Долгое время считалось, что все регуляторные сигналы митохондрий связаны с белками, закодированными в ядре, в то время как роль митохондриального генома сводится к кодированию небольшого числа структурных белков респираторной цепи и двух рибосомных РНК. Относительно недавно обнаружены и исследованы закодированные в митохондриальном геноме пептиды, играющие роль митохондриально генерируемых сигналов. Мы рассмотрим данные о молекулярных механизмах их взаимодействия с ядерными регуляторными системами, в первую очередь Nrf2, и возможной роли в определении темпов старения. Механизмы взаимодействия регуляторных каскадов, связывающих программы поддержания гомеостаза и ответа клетки на окислительный стресс, являются существенной частью программ старения и антистарения, а их понимание способствует поиску перспективных молекулярных мишеней для борьбы с болезнями преклонного возраста и старением в целом.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: Nrf2, митохондрия, старение, продолжительность жизни, окислительный стресс, возрастные нарушения, антиоксиданты.

DOI: 10.31857/S0320972522120065, **EDN:** NGGKHI

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; ТФ – транскрипционный фактор; ARE – антиоксидант-респонс(ив)ный элемент (antioxidant response element); GSK3 β – киназа гликогенсинтазы 3 β ; Hmox1 – гемоксигеназа1; Keap1 – Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1); MOTS-c – mitochondrial open reading frame of the twelve S rRNA type-c; Nrf2 – ТФ 2 семейства NFE (nuclear factor erythroid 2-related factor 2); SOD – супероксиддисмутаза.

* Адресат для корреспонденции.

ВВЕДЕНИЕ

К внутренним факторам, определяющим темпы старения и форму кривых выживания (*pace and shape of aging*), относятся программы старения и антистарения, представляющие собой, по современным представлениям, совокупность сигнальных генных каскадов [1]. Поддержание гомеостаза зависит от множества взаимозависимых реакций, и его эффективность ухудшается с возрастом [1–7]. Предполагается, что ядерный и митохондриальный геномы эволюционировали совместно и кодируют факторы взаимной регуляции, образуя генетически детерминированную систему двунаправленной коммуникации. Со времён D. Harman митохондрии считаются машиной, вызывающей клеточную гибель и в значительной степени определяющей продолжительность жизни (ПЖ) и скорость старения организма [8–10].

Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) является ключевым транскрипционным фактором (ТФ) поддержания редокс-баланса клеток и играет центральную роль в снижении внутриклеточного окислительного стресса, замедлении старения и предотвращении возрастных заболеваний [1, 2, 11]. Nrf2 является одним из главных регуляторов клеточного гомеостаза. Он контролирует экспрессию более 200 генов человека, связанных с реакциями биотрансформации, редокс-гомеостазом, энергетическим метаболизмом, репарацией ДНК и протеостазом, которые в совокупности представляют собой мощную защитную систему клетки [1, 2].

Для борьбы с генерируемыми активными формами кислорода (АФК) клетки имеют эффективную антиоксидантную систему, состоящую из ферментативных и неферментативных антиоксидантов. Ферментативные антиоксиданты включают каталазу (CAT, находится в основном в пероксисомах и в меньшей степени в митохондриях), глутатионпероксидазу (GPX, находится как в цитоплазме, так и в митохондриях), глутатионредуктазу (GR, находится как в цитоплазме, так и в митохондриях), глутатион-S-трансферазу (GST, находится в цитозоле), NAD(P)H-оксидазу (в мембране и цитозоле), пероксиредоксины (в различных внутриклеточных компартментах) и супероксиддисмутазы (SOD). Последние включают три изоформы: SOD1 [Cu-Zn-супероксиддисмутазы], расположенную в митохондриях/межмембранном пространстве и цитозоле, SOD2 (Mn-SOD), расположенную в митохондриальном матриксе, и SOD3 (Cu-ZnSOD), расположенную во внекле-

точном пространстве [12]. Гены-мишени Nrf2 с *цис*-элементами антиоксидантного ответа (ARE), которые кодируют белки, относящиеся к митохондриям, включают, среди прочих, тиоредоксин, глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназу, глутатион-S-трансферазу, NAD(P)H:хинон-оксидоредуктазу 1 (Nqo1) и гемоксигеназу 1 (Hmox1) [13]. Эти белки относятся к системам антиоксидантной защиты, регенерации NADH и метаболизма железа. Таким образом, существует тесная связь между Nrf2 и гомеостазом митохондриальных АФК [14].

Старение имеет сложную природу, и его темпы зависят от многих факторов. Однако митохондрии и система антиоксидантной защиты Nrf2 являются важными «игроками» в регуляции этого процесса. В обзоре рассмотрены пути их взаимного влияния в редокс-опосредованной регуляции темпов старения.

РЕГУЛЯТОРНЫЕ ПЕРЕКРЁСТНЫЕ ВЛИЯНИЯ МЕЖДУ ТФ Nrf2 И МИТОХОНДРИЯМИ

Регуляторные перекрёстные влияния между ТФ Nrf2 и митохондриями играют важную роль в клеточной биоэнергетике, биосинтезе и апоптозе. Для поддержания гомеостаза и контроля качества митохондрий митохондриальная морфология быстро изменяется в ответ на внешние воздействия и изменения метаболического статуса посредством слияния и деления (так называемая митохондриальная динамика), а повреждённые митохондрии удаляются посредством митофагии. Хотя митохондрии являются одним из источников АФК, сами они также уязвимы для окислительного стресса. Системы эндогенной антиоксидантной защиты играют важную роль в выживании клеток в физиологических и патологических условиях. Так, в противоположность известному пути ингибирования Nrf2 синовииолином (Hrd1) при стрессе эндоплазматического ретикулума (ЭР) [15], опосредуемая PERK активация Nrf2 при стрессе ЭР защищает митохондрии, стабилизируя динамику, метаболизм и контроль качества митохондрий [16].

Баланс митохондриального деления/слияния, оборота (биогенез/митофагия), гомеостаз кальция и АФК важны для поддержания нормального функционирования митохондрий [17]. При их нарушении митохондрии могут стать дисфункциональными, производя повышенное количество АФК и, соответственно, усиливая окислительный стресс, что может приводить к развитию патологий [17, 18].

АФК продуцируются в нескольких клеточных компартментах, таких как клеточная мембрана, цитоплазма, ЭР, пероксисомы и аппарат Гольджи, но основным их источником являются митохондрии [19, 20]. В зависимости от уровня продукции АФК митохондрии естественным образом влияют на активность Nrf2. В свою очередь, Nrf2, а также ТФ NRF1 (ядерный респираторный фактор 1) и коактиваторы транскрипции PGC-1 α и PGC-1 β являются ключевыми регуляторами митохондриального биогенеза (рисунок). Они участвуют в транскрипции ядерных генов, кодирующих митохондриальные белки и фактор транскрипции TFAM, контролирующей транскрипцию генов респираторной цепи, закодированных в мтДНК [21].

Так как Nrf2 является ядерным фактором, чувствительным к АФК, его активность изменяется в зависимости от уровня АФК. Адаптация клетки к таким изменениям затрагивает различные клеточные функции, в том числе гомеостаз глюкозы и липидов [18]. Нокаут гена, кодирующего белок Nrf2 (*Nfe2l2*), уменьшает потенциал митохондриальной мембраны и уровень продукции АТФ [22]. Ген разобщающего белка UCP3 содержит ARE и является мишенью Nrf2, который связывается с промотором *UCP3* после воздействия H₂O₂. Это позволяет предположить, что UCP3-опосредованная утечка протонов в ответ на H₂O₂ влияет на выживаемость клеток [23]. Ген ядерного респираторного фактора NRF1 также содержит ARE и регулируется ТФ Nrf2. Показано, что при гиперактивации Hmx1 в кардиомиоцитах происходит Nrf2-зависимая стимуляция экспрессии гена *NRF1* и митохондриального биогенеза [24].

От активности Nrf2 зависят многие аспекты митохондриальной физиологии и гомеостаза [25-27], такие как митохондриальная энергетика [28], биогенез митохондрий [29], окисление жирных кислот [30], дыхание [22], продукция АТФ [31], мембранный потенциал [32], окислительно-восстановительный гомеостаз [33], структурная целостность и защита от окислительного стресса [34], подвижность и динамика митохондрий [35]. Показано, что в условиях стресса Nrf2 поддерживает качество и целостность митохондрий, стимулируя p62-зависимую митофагию: ген, кодирующий белок p62 (*SQSTM1*), является прямой мишенью Nrf2, а сам белок p62 конкурирует с Nrf2 за связывание с белком-ингибитором Keap1 (Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок 1, Kelch-like ECH-associated protein 1) [26]. Nrf2 может влиять на активность митохондрий и косвенным образом, изменяя уровень метаболитов и антиоксидантов, существенных для функции

митохондрий [36-38]. Гены ключевых факторов биогенеза митохондрий, NRF1 и TFAM, являются прямыми мишенями Nrf2 [38]. Активность ключевого кофактора митохондриогенеза PGC-1 α также стимулируется Nrf2; в свою очередь, PGC-1 α инактивирует GSK3 β (киназу гликогенсинтазы 3 β), индуцирующую протеосомную деградацию Nrf2. Следовательно, существуют положительная регуляторная петля между ТФ Nrf2 и фактором митохондриогенеза PGC-1 α , играющая важную роль в поддержании количества митохондрий и редокс-гомеостаза. Взаимные регуляторные связи с Nrf2 описаны и для других митохондриальных белков, таких как DJ-1, PGAM5, фратаксин [38].

Помимо митохондриального биогенеза и гомеостаза, Nrf2 также играет хорошо известную роль в поддержании клеточного редокс-гомеостаза, контролируя выработку АФК посредством регулирования биосинтеза, использования и регенерации глутатиона (GSH), тиоредоксина и NADPH [39]. Активация Nrf2 индуцирует экспрессию митохондриальных антиоксидантных белков GR, GPX, тиоредоксинредуктазы 2, пероксиредоксина 3, пероксиредоксина 5 и SOD2, противодействуя увеличению продукции АФК в ответ на окислительный стресс [25].

Nrf2 также участвует в регуляции редокс-активности ионов металлов, в том числе в гомеостазе железа [40, 41]. Окисление железа тесно взаимосвязано с транспортом кислорода, потреблением и продукцией АФК [42]. Ген феррохелатазы, фермента, который осуществляет последнюю стадию биосинтеза гема путём встраивания двухвалентного железа в протопорфирин, является прямой мишенью Nrf2 [43]. Экспрессия генов, кодирующих обе цепи ферритина и ферропортин, также регулируется Nrf2 [42].

Особую роль в координации ответов на окислительный и другие стрессы между ядром и митохондриями могут играть митохондриальные пептиды. В мтДНК человека содержится только 13 генов, кодирующих белки дыхательной цепи, для которых не описано каких-либо сигнальных функций. Долгое время считалось, что активные пути митонуклеарной коммуникации опосредуются исключительно факторами, закодированными в ядерном геноме. Подавляющее большинство митохондриальных белков кодируется ядерными генами, позволяя ядру практически полностью контролировать биогенез, динамику и функцию митохондрий [44, 45]. Однако в последние несколько лет активно исследуется регуляторная роль биоактивных пептидов митохондриального происхождения (mitochondrial-derived peptides, MDPs), закодированных в коротких открытых

рамках считывания (short open reading frames, sORFs) в митохондриальном геноме [44]. В настоящее время описано восемь MDP: гуманин, MOTS-c (mitochondrial open reading frame of the twelve S rRNA type-c) и шесть небольших гуманиноподобных пептидов SHLP1-SHLP6 (small humanin-like peptides). Как ясно из названия, MOTS-c закодирован в 12S рРНК. Гуманин и SHLP1-6 закодированы в митохондриальной 16S рРНК. Гуманин имеет специфическое сродство к белку 3, связывающему инсулиноподобный фактор роста (insulin-like growth factor binding protein 3, IGFBP-3) [46], и к антиапоптотическому фактору Bcl-2 [47]. Он был идентифицирован во фракции мозга при болезни Альцгеймера как защитный фактор против токсинов, таких как β -амилоид, характерных для этой патологии [48], и как важный фактор для нормальной сердечной функции [49]. Систематическое применение митохондриальных пептидов в различных моделях метаболического стресса у грызунов обнаружило их благоприятное действие [50].

Существуют достаточно убедительные доказательства положительного влияния митохондриальных пептидов на состояния, связанные с заболеваниями преклонного возраста и возрастными нарушениями метаболизма. Уровни гуманина, SHLP2 и MOTS-c снижаются с возрастом, а их активность положительно коррелирует с долголетием [51-57]. Уровень гуманина у мыши и человека отрицательно регулируется связанной со старением сигнальной осью GH/IGF [58]. У долгоживущих GH-дефицитных мышей Ames уровень гуманина в крови повышен, а у короткоживущих GH-трансгенных мышей, наоборот, снижен [58].

MOTS-c действует как регулятор метаболического гомеостаза, который может предотвратить обусловленные диетой ожирение и инсулинорезистентность, а также возрастную инсулинорезистентность у мышей [53, 59, 60]. Клетки HEK293, сверхэкспрессирующие MOTS-c, устойчивы к метаболическому стрессу, вызванному депривацией глюкозы и сыворотки [44]. Показано, что в базовом состоянии клеток лишь небольшая часть MOTS-c локализована в ядре, а при различных видах клеточного стресса происходит быстрая индукция его транслокации в ядро, сопровождающаяся изменениями в экспрессии генов [44, 61]. Интересно, что уровень MOTS-c в митохондриях и цитоплазме при этом снижается. Складывается впечатление, что этот митохондриальный пептид играет роль стресс-индуцированного сигнала между клеточными компартментами. MOTS-c присутствует в плазме крови и явля-

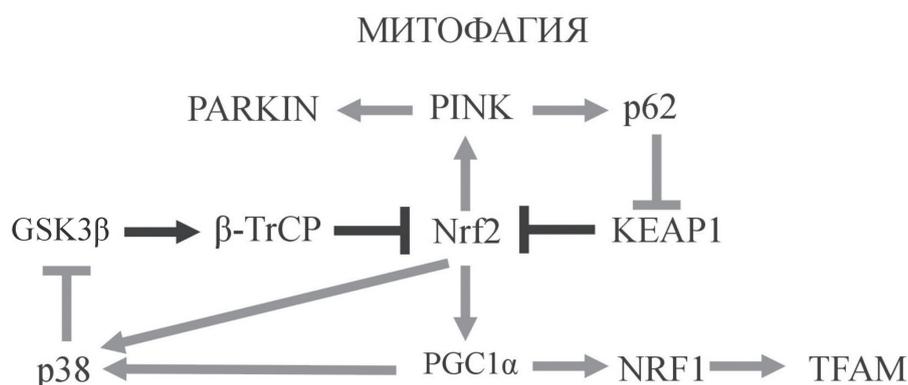
ется важным «митокином», то есть носителем митохондриальных сигналов, которые воздействуют на клетки разных органов подобным гормону способом [61]. Он предотвращает ожирение и инсулинорезистентность, вызванные неправильным питанием, возвращает чувствительность мышц к инсулину у пожилых мышцей, активирует АМПК в скелетных мышцах, улучшает физическую выносливость к бегу независимо от веса тела, влияя на энергетический метаболизм и повышая адаптивный ответ на холодовой шок и вызванный упражнениями стресс в скелетных мышцах [61]. Показано, что MOTS-c обладает противовоспалительными и сосудопротекторными свойствами, снижая экспрессию факторов воспаления (TNF- α , IL-6, IL-1 β) [62, 63]. Все эти эффекты MOTS-c частично зависят от SIRT1 и АМПК [44, 53] – двух важных взаимосвязанных факторов, которые регулируют ПЖ у различных модельных организмов [64, 65]. Примечательно, что, перемещаясь в ядро при клеточных стрессах, MOTS-c регулирует экспрессию адаптивных генов путём взаимодействия с другими стресс-зависимыми ТФ, в том числе Nrf2 [44, 45, 61, 66]. Механизмы выбора генов-мишеней MOTS-c мало изучены. Судя по имеющимся данным, и транслокация в ядро, и взаимодействие с промоторами генов-мишеней зависят от его взаимодействия с ядерными белками [44]. Например, в экспериментах по совместной иммунупреципитации обнаружено физическое связывание MOTS-c с ТФ Nrf2. Тем не менее при действии индукторов стресса Nrf2 и MOTS-c транслоцируются в ядро независимо друг от друга [44]. Более того, в тестах ретардации в электрофоретическом геле обнаружено прямое связывание MOTS-c с последовательностями ДНК ARE-содержащих промоторных областей генов-мишеней Nrf2, таких как *Hmox1*, *Nqo1*, *Ugt1A1*, *Ugt1A6*, *Txn*, *Ftl* и *Gpx2*, а связывание Nrf2 с ARE-содержащими промоторными участками значительно стимулируется в присутствии MOTS-c. Однако сульфорафан (10 мкМ, 16 ч) вызывал Nrf2-зависимую экспрессию *Hmox1* даже в условиях истощения MOTS-c актиноном. Очевидно, MOTS-c – не единственный кофактор Nrf2 [67]. Можно предположить, что, нарушая функционирование дыхательной цепи, актинонин приводит к повышенной генерации АФК и, как следствие, перемещению Nrf2 в ядро и увеличению экспрессии *Hmox1* [68]. При ограничении глюкозы в клетках HEK293, трансфицированных суперэкспрессирующим MOTS-c вектором, изменялась экспрессия 802 генов (у 412 подавлялась

и у 390 повышалась) [44]. При этом часть генов, активируемых MOTS-с, совпадает с генами-мишенями Nrf2. В промоторах генов, регулируемых MOTS-с, также обнаружены мотивы активирующих факторов транскрипции 1 и 7 (ATF1, ATF7) и JUND, родственных Nrf2 и, как известно, *перекрёстно регулирующих гены с ARE* [69, 70]. И в этом случае гены-мишени TF ATF1 и JUND частично совпадают с генами, регулируемые MOTS-с. Интересно, что перекрывание между наборами генов-мишеней Nrf2, ATF1 и JUND также неполное, хотя все они регулируют экспрессию генов через ARE. Это указывает на сложный механизм отбора генов-мишеней такой регуляции.

МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ БИОГЕНЕЗ

Митохондриогенез – сложный строго регулируемый процесс, требующий тесной координации между митохондриальными и ядерными TF [71]. Маркеры митохондриального биогенеза включают соотношение мтДНК/ядДНК (ядерной ДНК) и уровни экспрессии генов, кодирующих регуляторные белки митохондрий, такие как PGC-1 α , TFAM, NRF1 и митохондриальный фактор транскрипции B1 (TFB1M). Помимо экспрессии митохондриальных генов, митохондриальный биогенез также требует синтеза нуклеотидов и фосфолипидов. Nrf2 способствует экспрессии генов, участвующих в пентозофосфатном пути, синтезе нуклеотидов *de novo* и продукции NADPH, биосинтезе пуринов и метаболизме глутамин путём активации передачи сигналов PI3K-Akt [72].

Белок PGC-1 α представляет собой коактиватор ядерного рецептора PPAR- γ , контролирующего развитие и метаболизм жировой ткани и мышц [73]. Вместе с Nrf2 PGC-1 α коактивирует NRF1 и затем при фосфорилировании Akt и инактивации GSK3 β активирует митохондриальный фактор транскрипции A (TFAM), необходимый для поддержания нормальных уровней мтДНК [74] (рисунок). Ещё один белок, кодируемый геном-мишенью Nrf2, Hmox1, стимулирует митохондриальный биогенез, активируя сигнальный каскад Akt-Nrf2-NRF1 в сердце мыши [24]. Позже в той же лаборатории показали, что митохондриальный биогенез связан с увеличением экспрессии двух противовоспалительных генов, *IL10* и *IL1Ra*, посредством редокс-регуляции Hmox1/CO и Nrf2 в митохондриях клеток гепатомы человека HepG2 и клетках печени *in vivo* [75]. PGC1- α не только является основным регулятором митохондриального биогенеза, но также участвует в антиоксидантной защите, в том числе путём модуляции транскрипции гена *SOD2* и уровня самой *SOD2* [74]. Сверхэкспрессия *PGC1- α* в клеточной линии НК-2 защищала клетки от окислительного стресса, индуцированного перекисью водорода [76]. С помощью нокаута гена, кодирующего белок Nrf2 (*Nfe2l2*), было показано, что это цитопротекторное действие опосредовано Nrf2. Оно подавлялось ингибитором p38; это позволило предположить, что в его основе лежит активация Nrf2 путём инактивации его негативного регулятора GSK3 β , которая, в свою очередь, вызывается активацией p38 (рисунок). С другой стороны, уменьшение продукции Nrf2 с помощью siRNA снижает уровни



МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ БИОГЕНЕЗ

Nrf2 играет важную роль в митохондриальном и клеточном гомеостазе. Представлена упрощённая схема путей митофагии и митохондриального биогенеза, опосредованных p62 и PGC1- α соответственно, при активации Nrf2, свидетельствующая о существовании регуляторной петли, включающей p62, Keap1 и Nrf2 и коррелирующей с митофагией, и другой регуляторной петли, включающей PGC1- α , p38, GSK3 β и Nrf2 и связанной с митохондриальным биогенезом. Стрелкой обозначено прямое стимулирующее воздействие, включая катализ; линией с тупым концом обозначено ингибирующее активностью Nrf2 действие

PGC1- α [77]. Повышенные уровни АФК, например, при раке, могут приводить к ретроградной передаче сигналов через путь JNK-PGC1- α с повышением фосфорилирования комплекса II электрон-транспортной цепи и усилением митохондриального биогенеза [78, 79]. Кроме того, при нокдауне Nrf2 в клеточной линии рака толстой кишки человека блокируется индуцированная гипоксией активация HIF-1 α [80].

АМР-активируемая протеинкиназа (АМРК).

АМРК является основным сенсором энергии в эукариотических клетках, также известным как хранитель метаболизма и митохондриального гомеостаза [81], участвующим в нескольких важных митохондриальных процессах, таких как митофагия, митохондриальная динамика и транскрипция, а также митохондриальный биогенез. Она также влияет на циркадные ритмы путём фосфорилирования и дестабилизации белков CRY и PER. Известно, например, что АМРК фосфорилирует и тем самым способствует деградации белка циркадных биоритмов CRY1 [82]. С другой стороны, состав субъединиц АМРК, её субклеточная локализация и фосфорилирование субстратов зависят от времени суток [83]. Показано, что АМРК активирует Nrf2 путём ингибирования GSK3 β [84]. Конвергенция между путями АМРК и Nrf2 важна, например, для противовоспалительного действия берберина на макрофаги, стимулированные липополисахаридом, и мышей, подвергшихся эндотоксическому шоку [85].

Активация АМРК приводит к перепрограммированию метаболизма на усиление катаболизма и снижение анаболизма путём фосфорилирования ключевых факторов во многих биосинтетических путях, в том числе мишени рапамицина млекопитающих (mTOR) [81]. Nrf2 также может напрямую регулировать экспрессию гена *mTOR*, связываясь с его промотором [86]. Одним из активаторов АМРК является серин/треонин киназа LKB1 – известный опухолевый супрессор [87]. Эксперименты на тканеспецифических нокаутах гена *LKB1* у мышей показали, что в большинстве тканей именно LKB1 является главным посредником в адаптивной активации АМРК при энергетических стрессах. Это демонстрирует наличие связи между регуляцией энергетического метаболизма и подавлением опухолей.

Один из механизмов регуляции экспрессии антиоксидантных генов со стороны митохондрий связан с белком PGAM5. Имея сходство одновременно к белкам Nrf2 и Keap1, он образует с ними третичные комплексы, увлекая их к внешней мембране митохондрий за

счёт присутствующего в его молекуле сигнала митохондриальной локализации [88]. Нокдаун *Keap1* и/или *PGAM5* повышает активность Nrf2. Ингибитор PGAM5 – LFHP-1с усиливает активацию Nrf2 при ишемическом инсульте головного мозга, вызванном нарушением гематоэнцефалического барьера [89].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Старение связано с увеличением производства АФК и повышенным окислительным стрессом с одновременным снижением активности основных антиоксидантных систем, что способствует развитию широкого спектра заболеваний [90]. Возрастные изменения могут приводить к нарушению уровня экспрессии генов-мишеней Nrf2 (*Nqo1*, *Ho-1*, *GCL*) вследствие снижения общего уровня мРНК и белка Nrf2, уменьшения его содержания в ядре, ухудшения его связывания с ARE, негативной регуляции экспрессии, опосредованной Nrf2 (см. обзоры [91-93]). Так, возрастное снижение синтеза основного антиоксиданта клетки, глутатиона, может быть вызвано нарушением регуляции ARE-опосредованной экспрессии генов, но нацеленные на Keap1 хемопротекторные агенты, такие как липоевая кислота, сульфорафан и другие известные активаторы Nrf2, могут лишь частично (а с возрастом – всё хуже и хуже) компенсировать эту потерю [94-99], подавляя опосредованный Keap1 путь деградации Nrf2, но не предотвратить её. Функциональная связь между Nrf2 и митохондриальной сетью может реализоваться через прямое взаимодействие этого ТФ с некоторыми митохондриальными белками или через тонкую настройку баланса АФК. Хорошо известны механизмы ретроградного сигналинга митохондрий в ядро при реакциях на клеточный стресс, включая ответы на нарушения структуры митохондриальных белков (UPRmt) [100-102] и молекулярные паттерны, связанные с повреждением (DAMP) [103]). Закодированный в митохондриальном геноме 16-аминокислотный пептид MOTS-c в ответ на метаболический стресс активно транслируется в ядро в координации с ядерной АМРК и SIRT1 и непосредственно регулирует экспрессию ARE-содержащих генов-мишеней в ядерном геноме, частично взаимодействуя с Nrf2. Взаимодействие с MOTS-c усиливает связывание Nrf2 с генами-мишенями. Сверхэкспрессия MOTS-c защищает клетки от стрессов депривации глюкозы и сыворотки. Эти результаты демонстрируют важную роль

транслоцируемого в ядро митохондриального пептида в ответах ядерных генов на метаболический стресс [44]. Эта и подобные ей функциональные связи потенциально могут стать краеугольным камнем для новых терапевтических подходов к борьбе с широким спектром возрастных патологий человека, включая онкологию [104]. Такие пептиды млекопитающих функционально сходны с пептидами эндосимбиотических протомитохондриальных бактерий, используемых ими для связи с клетками предков эукариот [105]. Вполне вероятно, что два генома эволюционировали совместно, чтобы перекрёстно регулировать друг друга для координации клеточных функций. Будущие исследования передачи сигналов Nrf2 и способности различных веществ, активирующих путь Nrf2, предотвращать хронические заболевания, связанные со старением, позво-

лят глубже понять роль активации Nrf2 как возможного вмешательства, способствующего долголетию.

Вклад авторов. Г.А. Шиловский — концепция работы и написание текста статьи; В.В. Ашапкин — написание текста статьи; Г.А. Шиловский и В.В. Ашапкин — написание и редактирование текста статьи, подготовка таблиц и графиков

Благодарности. Авторы сердечно благодарят акад. В.П. Скулачёва за оригинальную идею и ценные советы в процессе написания статьи.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. В данной работе не было никаких исследований, в которых были использованы в качестве объектов люди или животные.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Skulachev, V. P., Shilovsky, G. A., Putyatina, T. S., Popov, N. A., Markov, A. V., Skulachev, M. V., and Sadovnichii, V. A. (2020) Perspectives of *Homo sapiens* lifespan extension: focus on external or internal resources? *Aging (Albany NY)*, **12**, 5566-5584, doi: 10.18632/aging.102981.
- Lewis, K. N., Wason, E., Edrey, Y. H., Kristan, D. M., Nevo, E., and Buffenstein, R. (2015) Regulation of Nrf2 signaling and longevity in naturally long-lived rodents, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 3722-3727, doi: 10.1073/pnas.1417566112.
- Skulachev, M. V., Severin, F. F., and Skulachev, V. P. (2015) Aging as an evolvability-increasing program which can be switched off by organism to mobilize additional resources for survival, *Curr. Aging Sci.*, **8**, 95-109, doi: 10.2174/1874609808666150422122401.
- Skulachev, V. P., Holtze, S., Vyssokikh, M. Y., Bakeeva, L. E., Skulachev, M. V., Markov, A. V., Hildebrandt, T. B., and Sadovnichii, V. A. (2017) Neoteny, prolongation of youth: from naked mole rats to "naked apes" (humans), *Physiol. Rev.*, **97**, 699-720, doi: 10.1152/physrev.00040.2015.
- Vyssokikh, M. Y., Holtze, S., Averina, O. A., Lyamzaev, K. G., Panteleeva, A. A., Marey, M. V., Zinovkin, R. A., Severin, F. F., Skulachev, M. V., Fasel, N., Hildebrandt, T. B., and Skulachev, V. P. (2020) Mild depolarization of the inner mitochondrial membrane is a crucial component of an anti-aging program, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 6491-6501, doi: 10.1073/pnas.1916414117.
- Barth, E., Srivastava, A., Wengerodt, D., Stojiljkovic, M., Axer, H., Witte, O. W., Kretz, A., and Marz, M. (2021) Age-dependent expression changes of circadian system-related genes reveal a potentially conserved link to aging, *Aging (Albany NY)*, **13**, 25694-25716, doi: 10.18632/aging.203788.
- Holtze, S., Gorshkova, E., Braude, S., Cellerino, A., Dammann, P., Hildebrandt, T. B., Hoeflich, A., Hoffmann, S., Koch, P., Terzibasi Tozzini, E., Skulachev, M. V., Skulachev, V. P., and Sahm, A. (2021) Alternative animal models of aging research, *Front. Mol. Biosci.*, **8**, 660959, doi: 10.3389/fmolb.2021.660959.
- Harman, D. (1972) The biologic clock: the mitochondria? *J. Am. Ger. Soc.*, **20**, 145-147, doi: 10.1111/j.1532-5415.1972.tb00787.x.
- Austad, S. N. (2018) The comparative biology of mitochondrial function and the rate of aging, *Integr. Comp. Biol.*, **58**, 559-566, doi: 10.1093/icb/icy068.
- Son, J. M., and Lee, C. (2021) Aging: all roads lead to mitochondria, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **116**, 160-168, doi: 10.1016/j.semcdb.2021.02.006.
- Tebay, L. E., Robertson, H., Durant, S. T., Vitale, S. R., Penning, T. M., Dinkova-Kostova, A. T., and Hayes, J. D. (2015) Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease, *Free Radic. Biol. Med.*, **88**, 108-146, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.021.
- Irato, P., and Santovito, G. (2021) Enzymatic and non-enzymatic molecules with antioxidant function, *Antioxidants*, **10**, 579, doi: 10.3390/antiox10040579.
- Tonelli, C., Chio, I. I. C., and Tuveson, D. A. (2018) Transcriptional regulation by Nrf2, *Antioxid. Redox Signal.*, **29**, 1727-1745, doi: 10.1089/ars.2017.7342.
- Shin, D., Kim, E. H., Lee, J., and Roh, J. L. (2018) Nrf2 inhibition reverses resistance to GPX4 inhibitor-induced ferroptosis in head and neck cancer, *Free*

- Radic. Biol. Med.*, **129**, 454-462, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.426.
15. Wu, T., Zhao, F. Gao, B., Tan, C., Yagishita, N., Nakajima, T., Wong, P. K., Chapman, E., Fang, D., and Zhang, D. D. (2014) Hrd1 suppresses Nrf2-mediated cellular protection during liver cirrhosis, *Genes Dev.*, **28**, 708-722, doi: 10.1101/gad.238246.114.
 16. Almeida, L. M., Pinho, B. R., Duchen, M. R., and Oliveira, J. M. A. (2022) The PERKs of mitochondria protection during stress: insights for PERK modulation in neurodegenerative and metabolic diseases, *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, **97**, 1737-1748, doi: 10.1111/brv.12860.
 17. Bennett, C. F., Latorre-Muro, P., and Puigserver, P. (2022) Mechanisms of mitochondrial respiratory adaptation, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **23**, 817-835, doi: 10.1038/s41580-022-00506-6.
 18. Zarkovic, N. (2020) Roles and functions of ROS and RNS in cellular physiology and pathology, *Cells*, **9**, 767, doi: 10.3390/cells9030767.
 19. Sies, H., and Jones, D. P. (2020) Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **21**, 363-383, doi: 10.1038/s41580-020-0230-3.
 20. Sies, H., Belousov, V. V., Chandel, N. S., Davies, M. J., Jones, D. P., Mann, G. E., Murphy, M. P., Yamamoto, M., and Winterbourn, C. (2022) Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **23**, 499-515, doi: 10.1038/s41580-022-00456-z.
 21. Bouchez, C., and Devin, A. (2019) Mitochondrial biogenesis and mitochondrial reactive oxygen species (ROS): a complex relationship regulated by the cAMP/PKA signaling pathway, *Cells*, **8**, 287, doi: 10.3390/cells8040287.
 22. Holmström, K. M., Baird, L., Zhang, Y., Hargreaves, I., Chalasani, A., Land, J. M., Stanyer, L., Yamamoto, M., Dinkova-Kostova, A. T., and Abramov, A. Y. (2013) Nrf2 impacts cellular bioenergetics by controlling substrate availability for mitochondrial respiration, *Biol. Open*, **2**, 761-770, doi: 10.1242/bio.20134853.
 23. Hirschenson, J., Melgar-Bermudez, E., and Mailloux, R. J. (2022) The uncoupling proteins: a systematic review on the mechanism used in the prevention of oxidative stress, *Antioxidants (Basel)*, **11**, 322, doi: 10.3390/antiox11020322.
 24. Piantadosi, C. A., Carraway, M. S., Babiker, A., and Suliman, H. B. (2008) Heme oxygenase-1 regulates cardiac mitochondrial biogenesis via Nrf2-mediated transcriptional control of nuclear respiratory factor-1, *Circ. Res.*, **103**, 1232-1240, doi: 10.1161/01.RES.0000338597.71702.ad.
 25. Itoh, K., Ye, P., Matsumiya, T., Tanji, K., and Ozaki, T. (2015) Emerging functional cross-talk between the Keap1-Nrf2 system and mitochondria, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **56**, 91-97, doi: 10.3164/jcbn.14-134.
 26. Holmström, K. M., Kostov, R. V., and Dinkova-Kostova, A. T. (2016) The multifaceted role of Nrf2 in mitochondrial function, *Curr. Opin. Toxicol.*, **1**, 80-91, doi: 10.1016/j.cotox.2016.10.002.
 27. Panieri, E., Pinho, S. A., Afonso, G. J. M., Oliveira, P. J., Cunha-Oliveira, T., and Saso, L. (2022) Nrf2 and mitochondrial function in cancer and cancer stem cells, *Cells*, **11**, 2401, doi: 10.3390/cells11152401.
 28. Dinkova-Kostova, A. T., Baird, L., Holmstrom, K. M., Meyer, C. J., and Abramov, A. Y. (2015) The spatio-temporal regulation of the Keap1-Nrf2 pathway and its importance in cellular bioenergetics, *Biochem. Soc. Trans.*, **43**, 602-610, doi: 10.1042/BST20150003.
 29. MacGarvey, N. C., Suliman, H. B., Bartz, R. R., Fu, P., Withers, C. M., Welty-Wolf, K. E., and Piantadosi, C. A. (2012) Activation of mitochondrial biogenesis by heme oxygenase-1-mediated NF-E2-related factor-2 induction rescues mice from lethal *Staphylococcus aureus* sepsis, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **185**, 851-861, doi: 10.1164/rccm.201106-1152OC.
 30. Ludtmann, M. H., Angelova, P. R., Zhang, Y., Abramov, A. Y., and Dinkova-Kostova, A. T. (2014) Nrf2 affects the efficiency of mitochondrial fatty acid oxidation, *Biochem. J.*, **457**, 415-424, doi: 10.1042/BJ20130863.
 31. Abdullah, A., Kitteringham, N. R., Jenkins, R. E., Goldring, C., Higgins, L., Yamamoto, M., Hayes, J., and Park, B. K. (2012) Analysis of the role of Nrf2 in the expression of liver proteins in mice using two-dimensional gel-based proteomics, *Pharmacol. Rep.*, **64**, 680-697, doi: 10.1016/S1734-1140(12)70863-0.
 32. De Oliveira, M. R., de Souza, I. C. C., and Brasil, F. B. (2021) Promotion of mitochondrial protection by emodin in methylglyoxal-treated human neuroblastoma SH-SY5Y cells: Involvement of the AMPK/Nrf2/HO-1 axis, *Neurotox. Res.*, **39**, 292-304, doi: 10.1007/s12640-020-00287-w.
 33. Hayes, J. D., and Dinkova-Kostova, A. T. (2014) The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism, *Trends Biochem. Sci.*, **39**, 199-218, doi: 10.1016/j.tibs.2014.02.002.
 34. Goodfellow, M. J., Borcar, A., Proctor, J. L., Greco, T., Rosenthal, R. E., and Fiskum, G. (2020) Transcriptional activation of antioxidant gene expression by Nrf2 protects against mitochondrial dysfunction and neuronal death associated with acute and chronic neurodegeneration, *Exp. Neurol.*, **328**, 113247, doi: 10.1016/j.expneurol.2020.113247.
 35. O'Mealey, G. B., Plafker, K. S., Berry, W. L., Janknecht, R., Chan, J. Y., and Plafker, S. M. (2017) A PGAM5-Keap1-Nrf2 complex is required for stress-induced mitochondrial retrograde trafficking, *J. Cell Sci.*, **130**, 3467-3480, doi: 10.1242/jcs.203216.
 36. Jobbagy, S., Vitturi, D. A., Salvatore, S. R., Turell, L., Pires, M. F., Kansanen, E., Batthyany, C., Lancaster, J. R., Jr., Freeman, B. A., and Schopfer, F. J. (2019) Electrophiles modulate glutathione reductase acti-

- vity via alkylation and upregulation of glutathione biosynthesis, *Redox Biol.*, **21**, 101050, doi: 10.1016/j.redox.2018.11.008.
37. Piloni, N. E., Vargas, R., Fernández, V., Videla, L. A., and Puntarulo, S. (2021) Effects of acute iron overload on Nrf2-related glutathione metabolism in rat brain, *Biometals*, **34**, 1017-1027, doi: 10.1007/s10534-021-00324-x.
 38. Ryoo, I. G., and Kwak, M. K. (2018) Regulatory crosstalk between the oxidative stress-related transcription factor *Nfe2l2/Nrf2* and mitochondria, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **359**, 24-33, doi: 10.1016/j.taap.2018.09.014.
 39. Dinkova-Kostova, A. T., and Abramov, A. Y. (2015) The emerging role of Nrf2 in mitochondrial function, *Free Radic. Biol. Med.*, **88**, 179-188, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.036.
 40. Lim, P. J., Duarte, T. L., Arezes, J., Garcia-Santos, D., Hamdi, A., et al. (2019) Nrf2 controls iron homeostasis in haemochromatosis and thalassaemia via *Bmp6* and hepcidin, *Nat. Metab.*, **1**, 519-531, doi: 10.1038/s42255-019-0063-6.
 41. Duarte, T. L., Talbot, N. P., and Drakesmith, H. (2021) NRF2 and hypoxia-inducible factors: key players in the redox control of systemic iron homeostasis, *Antioxid. Redox Signal.*, **35**, 433-452, doi: 10.1089/ars.2020.8148.
 42. He, F., Ru, X., and Wen, T. (2020) NRF2, a transcription factor for stress response and beyond, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 4777, doi: 10.3390/ijms21134777.
 43. Chorley, B. N., Campbell, M. R., Wang, X., Karaca, M., Sambandan, D., Bangura, F., Xue, P., Pi, J., Kleeberger, S. R., and Bell, D. A. (2012) Identification of novel NRF2-regulated genes by ChIP-Seq: influence on retinoid X receptor alpha, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 7416-7429, doi: 10.1093/nar/gks409.
 44. Kim, K. H., Son, J. M., Benayoun, B. A., and Lee, C. (2018) The mitochondrial-encoded peptide MOTS-c translocates to the nucleus to regulate nuclear gene expression in response to metabolic stress, *Cell Metab.*, **28**, 516-524, doi: 10.1016/j.cmet.2018.06.008.
 45. Mangalhará, K. C., and Shadel, G. S. (2018) A mitochondrial-derived peptide exercises the nuclear option, *Cell Metab.*, **28**, 330-331, doi: 10.1016/j.cmet.2018.08.017.
 46. Ikonen, M., Liu, B., Hashimoto, Y., Ma, L., Lee, K. W., Niikura, T., Nishimoto, I., and Cohen, P. (2003) Interaction between the Alzheimer's survival peptide humanin and insulin-like growth factor-binding protein 3 regulates cell survival and apoptosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 13042-13047, doi: 10.1073/pnas.2135111100.
 47. Guo, B., Zhai, D., Cabezas, E., Welsh, K., Nouraini, S., Satterthwait, A. C., and Reed, J. C. (2003) Humanin peptide suppresses apoptosis by interfering with Bax activation, *Nature*, **423**, 456-461, doi: 10.1038/nature01627.
 48. Hashimoto, Y., Niikura, T., and Tajima, H., Yasukawa, T., Sudo, H., et al. (2001) A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimer's disease genes and Abeta, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 6336-6341, doi: 10.1073/pnas.101133498.
 49. Widmer, R. J., Flammer, A. J., Herrmann, J., Rodriguez-Porcel, M., Wan, J., Cohen, P., Lerman, L. O., and Lerman, A. (2013) Circulating humanin levels are associated with preserved coronary endothelial function, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **304**, 393-397, doi: 10.1152/ajpheart.00765.2012.
 50. Merry, T. L., Chan, A., Woodhead, J. S. T., Reynolds, J. C., Kumagai, H., Kim, S. J., and Lee, C. (2020) Mitochondrial-derived peptides in energy metabolism, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **319**, 659-666, doi: 10.1152/ajpendo.00249.2020.
 51. Muzumdar, R. H., Huffman, D. M., Atzmon, G., Buettner, C., et al. (2009) Humanin: a novel central regulator of peripheral insulin action, *PLoS One*, **4**, e6334, doi: 10.1371/journal.pone.0006334.
 52. Bachar, A. R., Scheffer, L., Schroeder, A. S., Nakamura, H. K., Cobb, L. J., et al. (2010) Humanin is expressed in human vascular walls and has a cytoprotective effect against oxidized LDL-induced oxidative stress, *Cardiovasc. Res.*, **88**, 360-366, doi: 10.1093/cvr/cvq191.
 53. Lee, C., Zeng, J., Drew, B. G., Sallam, T., Martin-Montalvo, A., et al. (2015) The mitochondrial-derived peptide MOTS-c promotes metabolic homeostasis and reduces obesity and insulin resistance, *Cell Metab.*, **21**, 443-454, doi: 10.1016/j.cmet.2015.02.009.
 54. Cobb, L. J., Lee, C., Xiao, J., Yen, K., Wong, R. G., et al. (2016) Naturally occurring mitochondrial-derived peptides are age-dependent regulators of apoptosis, insulin sensitivity, and inflammatory markers, *Aging*, **8**, 796-809, doi: 10.18632/aging.100943.
 55. Kim, S. J., Xiao, J., Wan, J., Cohen, P., and Yen, K. (2017) Mitochondrially derived peptides as novel regulators of metabolism, *J. Physiol.*, **595**, 6613-6621, doi: 10.1113/JP274472.
 56. Conte, M., Ostan, R., Fabbri, C., Santoro, A., Guidarelli, G., et al. (2019) Human aging and longevity are characterized by high levels of mitokines, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **74**, 600-607, doi: 10.1093/gerona/gly153.
 57. D'Souza, R. F., Woodhead, J. S. T., Hedges, C. P., Zeng, N., Wan, J., et al. (2020) Increased expression of the mitochondrial derived peptide, MOTS-c, in skeletal muscle of healthy aging men is associated with myofiber composition, *Aging (Albany NY)*, **12**, 5244-5258, doi: 10.18632/aging.102944.
 58. Lee, C., Wan, J., Miyazaki, B., Fang, Y., Guevara-Aguirre, J., Yen, K., Longo, V., Bartke, A., and Cohen, P. (2014) IGF-I regulates the age-dependent signaling peptide humanin, *Aging Cell*, **13**, 958-961, doi: 10.1111/acel.12243.

59. Zarse, K., and Ristow, M. (2015) A mitochondrially encoded hormone ameliorates obesity and insulin resistance, *Cell Metab.*, **21**, 355-356, doi: 10.1016/j.cmet.2015.02.013.
60. Lee, C., Kim, K. H., and Cohen, P. (2016) MOTs-c: a novel mitochondrial-derived peptide regulating muscle and fat metabolism, *Free Radic. Biol. Med.*, **100**, 182-187, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.05.015.
61. Mohtashami, Z., Singh, M. K., Salimiaghdam, N., Ozgul, M., Kenney, M. C. (2022) MOTs-c, the most recent mitochondrial derived peptide in human aging and age-related diseases, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 11991, doi: 10.3390/ijms231911991.
62. Fuku, N., Pareja-Galeano, H., and Zempo, H., et al. (2015) The mitochondrial-derived peptide MOTs-c: a player in exceptional longevity? *Aging Cell*, **14**, 921-923, doi: 10.1111/acel.12389.
63. Zempo, H., Fuku, N., Nishida, Y., Higaki, Y., Naito, H., Hara, M., and Tanaka, K. (2016) Relation between type 2 diabetes and m.1382 A>C polymorphism which occurs amino acid replacement (K14Q) of mitochondria-derived MOTs-c, *FASEB J.*, **30**, 956.1, doi: 10.1096/fasebj.30.1_supplement.956.1.
64. Cantó, C., Gerhart-Hines, Z., Feige, J. N., Lagouge, M., Noriega, L., Milne, J. C., Elliott, P. J., Puigserver, P., and Auwerx, J. (2009) AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity, *Nature*, **458**, 1056-1060, doi: 10.1038/nature07813.
65. Price, N. L., Gomes, A. P., Ling, A. J., Duarte, F. V., Martin-Montalvo, A., et al. (2012) SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function, *Cell Metab.*, **15**, 675-690, doi: 10.1016/j.cmet.2012.04.003.
66. Wong, W. (2018) Going nuclear with stress, *Sci. Signal.*, **11**, eaav4285, doi: 10.1126/scisignal.aav4285.
67. Hirotsu, Y., Katsuoka, F., Funayama, R., Nagashima, T., Nishida, Y., Nakayama, K., Engel, J. D., and Yamamoto, M. (2012) Nrf2-MafG heterodimers contribute globally to antioxidant and metabolic networks, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 10228-10239, doi: 10.1093/nar/gks827.
68. Richter, U., Lahtinen, T., Marttinen, P., Myöhänen, M., Greco, D., Cannino, G., Jacobs, H. T., Lietzén, N., Nyman, T. A., and Battersby, B. J. (2013) A mitochondrial ribosomal and RNA decay pathway blocks cell proliferation, *Curr. Biol.*, **23**, 535-541, doi: 10.1016/j.cub.2013.02.019.
69. Chepelev, N. L., Zhang, H., Liu, H., McBride, S., Seal, A. J., et al. (2013) Competition of nuclear factor-erythroid 2 factors related transcription factor isoforms, Nrf1 and Nrf2, in antioxidant enzyme induction, *Redox Biol.*, **1**, 183-189, doi: 10.1016/j.redox.2013.01.005.
70. Willyard, C. (2017) The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats, *Nature*, **543**, 15, doi: 10.1038/nature.2017.21550.
71. Jornayvaz, F. R., and Shulman, G. I. (2010) Regulation of mitochondrial biogenesis, *Essays Biochem.*, **47**, 69-84, doi: 10.1042/bse0470069.
72. Mitsuishi, Y., Taguchi, K., Kawatani, Y., Shibata, T., Nukiwa, T., Aburatani, H., Yamamoto, M., and Motohashi, H. (2012) Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming, *Cancer Cell*, **22**, 66-79, doi: 10.1016/j.ccr.2012.05.016.
73. Chen, L., Qin, Y., Liu, B., Gao, M., Li, A., Li, X., and Gong, G. (2022) PGC-1 α -mediated mitochondrial quality control: molecular mechanisms and implications for heart failure, *Front. Cell. Dev. Biol.*, **10**, 871357, doi: 10.3389/fcell.2022.871357.
74. Gureev, A. P., Shaforostova, E. A., and Popov, V. N. (2019) Regulation of mitochondrial biogenesis as a way for active longevity: interaction between the Nrf2 and PGC-1 α signaling pathways, *Front. Genet.*, **10**, 435, doi: 10.3389/fgene.2019.00435.
75. Piantadosi, C. A., Withers, C. M., Bartz, R. R., MacGarvey, N. C., Fu, P., Sweeney, T. E., Welty-Wolf, K. E., and Suliman, H. B. (2011) Heme oxygenase-1 couples activation of mitochondrial biogenesis to anti-inflammatory cytokine expression, *J. Biol. Chem.*, **286**, 16374-16385, doi: 10.1074/jbc.M110.207738.
76. Choi, H. I., Kim, H. J., Park, J. S., Kim, I. J., Bae, E. H., Ma, S. K., and Kim, S. W. (2017) PGC-1 α attenuates hydrogen peroxide-induced apoptotic cell death by upregulating Nrf-2 via GSK3 β inactivation mediated by activated p38 in HK-2 cells, *Sci. Rep.*, **7**, 4319, doi: 10.1038/s41598-017-04593-w.
77. Whitman, S. A., Long, M., Wondrak, G. T., Zheng, H., and Zhang, D. D. (2013) Nrf2 modulates contractile and metabolic properties of skeletal muscle in streptozotocin-induced diabetic atrophy, *Exp. Cell Res.*, **319**, 2673-2683, doi: 10.1016/j.yexcr.2013.07.015.
78. Acín-Pérez, R., Carrasco, I., Baixauli, F., Roche-Molina, M., Latorre-Pellicer, A., et al. (2014) ROS-triggered phosphorylation of complex II by Fgr kinase regulates cellular adaptation to fuel use, *Cell Metab.*, **19**, 1020-1033, doi: 10.1016/j.cmet.2014.04.015.
79. Keerthiga, R., Pei, D. S., and Fu, A. (2021) Mitochondrial dysfunction, UPR(mt) signaling, and targeted therapy in metastasis tumor, *Cell Biosci.*, **11**, 186, doi: 10.1186/s13578-021-00696-0.
80. Kim, T. H., Hur, E. G., Kang, S. J., Kim, J. A., Thapa, D., Lee, Y. M., Ku, S. K., Jung, Y., and Kwak, M. K. (2011) Nrf2 blockade suppresses colon tumor angiogenesis by inhibiting hypoxia-induced activation of HIF-1 α , *Cancer Res.*, **71**, 2260-2275, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3007.
81. Herzig, S., and Shaw, R. J. (2018) AMPK: Guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **19**, 121-135, doi: 10.1038/nrm.2017.95.
82. Morgunova, G. V., and Klebanov, A. A. (2019) Age-related AMP-activated protein kinase alterations: from

- cellular energetics to longevity, *Cell Biochem. Funct.*, **37**, 169-176, doi: 10.1002/cbf.3384.
83. Jordan, S. D., and Lamia, K. A. (2013) AMPK at the crossroads of circadian clocks and metabolism, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **366**, 163-169, doi: 10.1016/j.mce.2012.06.017.
 84. Joo, M. S., Kim, W. D., Lee, K. Y., Kim, J. H., Koo, J. H., and Kim, S. G. (2016) AMPK facilitates nuclear accumulation of Nrf2 by phosphorylating at serine 550, *Mol. Cell. Biol.*, **36**, 1931-1942, doi: 10.1128/MCB.00118-16.
 85. Mo, C., Wang, L., Zhang, J., Numazawa, S., Tang, H., et al. (2014) The crosstalk between Nrf2 and AMPK signal pathways is important for the anti-inflammatory effect of berberine in LPS-stimulated macrophages and endotoxin-shocked mice, *Antioxid. Redox Signal.*, **20**, 574-588, doi: 10.1089/ars.2012.5116.
 86. Bendavit, G., Aboukassim, T., Hilmi, K., Shah, S., and Batist, G. (2016) Nrf2 transcription factor can directly regulate mTOR: linking cytoprotective gene expression to a major metabolic regulator that generates redox activity, *J. Biol. Chem.*, **291**, 25476-25488, doi: 10.1074/jbc.M116.760249.
 87. Shackelford, D. B., and Shaw, R. J. (2009) The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression, *Nat. Rev. Cancer*, **9**, 563-575, doi: 10.1038/nrc2676.
 88. Lo, S. C., and Hannink, M. (2008) PGAM5 tethers a ternary complex containing Keap1 and Nrf2 to mitochondria, *Exp. Cell Res.*, **314**, 1789-1803, doi: 10.1016/j.yexcr.2008.02.014.
 89. Gao, C., Xu, Y., Liang, Z., Wang, Y., Shang, Q., et al. (2021) A novel PGAM5 inhibitor LFHP-1c protects blood-brain barrier integrity in ischemic stroke, *Acta Pharm. Sin. B*, **11**, 1867-1884, doi: 10.1016/j.apsb.2021.01.008.
 90. Ungvari, Z., Tarantini, S., Kiss, T., Wren, J. D., Giles, C. B., et al. (2018) Endothelial dysfunction and angiogenesis impairment in the ageing vasculature, *Nat. Rev. Cardiol.*, **15**, 555-565, doi: 10.1038/s41569-018-0030-z.
 91. Shilovsky, G. A., Putyatina, T. S., Morgunova, G. V., Seliverstov, A. V., Ashapkin, V. V., and Skulachev, V. P. (2021) A crosstalk between the biorhythms and gatekeepers of longevity: dual role of glycogen synthase kinase-3, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 433-448, doi: 10.1134/S0006297921040052.
 92. Shilovsky, G. A. (2022) Lability of the Nrf2/Keap/ARE cell defense system in different models of cell aging and age-related pathologies, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 70-85, doi: 10.1134/S0006297922010060.
 93. Zinovkin R. A., Kondratenko, N. D., and Zinovkina, L. A. (2022) Does NRF2 appear to be a master regulator of mammalian aging? *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 1465-1476, doi: 10.1134/S0006297922120045.
 94. Robledinos-Antón, N., Fernández-Ginés, R., Manda, G., and Cuadrado, A. (2019) Activators and inhibitors of NRF2: a review of their potential for clinical development, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2019**, 9372182, doi: 10.1155/2019/9372182.
 95. Cuadrado, A., Manda, G., Hassan, A., Alcaraz, M. J., Barbas, C., et al. (2018) Transcription factor NRF2 as a therapeutic target for chronic diseases: a systems medicine approach, *Pharmacol. Rev.*, **70**, 348-383, doi: 10.1124/pr.117.014753.
 96. Hushpulian, D. M., Ammal Kaidery, N., Ahuja, M., Poloznikov, A. A., Sharma, S. M., et al. (2021) Challenges and limitations of targeting the Keap1Nrf2 pathway for neurotherapeutics: Bach1 derepression to the rescue, *Front. Aging Neurosci.*, **13**, 673205, doi: 10.3389/fnagi.2021.673205.
 97. Ulasov, A. V., Rosenkranz, A. A., Georgiev, G. P., and Sobolev, A. S. (2021) Keap1/ARE signaling: towards specific regulation, *Life Sci.*, **291**, 120111, doi: 10.1016/j.lfs.2021.120111.
 98. Ushakova, N. A., Brodsky, E. S., Tikhonova, O. V., Dontsov, A. E., Marsova, M. V., et al. (2021) Novel extract from beetle *Ulomoides dermestoides*: a study of composition and antioxidant activity, *Antioxidants (Basel)*, **10**, 1055, doi: 10.3390/antiox10071055.
 99. Qin, X., Xu, X., Hou, X., Liang, R., Chen, L., Hao, Y., Gao, A., Du, X., Zhao, L., Shi, Y., and Li, Q. (2022) The pharmacological properties and corresponding mechanisms of farrerol: a comprehensive review, *Pharm. Biol.*, **60**, 9-16, doi: 10.1080/13880209.2021.2006723.
 100. Jovaisaite, V., and Auwerx, J. (2015) The mitochondrial unfolded protein response – synchronizing genomes, *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **33**, 74-81, doi: 10.1016/j.ceb.2014.12.003.
 101. Zinovkin, R. A., Skulachev, M. V., and Skulachev, V. P. (2016) Mitochondrial genome and longevity, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 1401-1405, doi: 10.1134/S0006297916120014.
 102. Miskevich, D., Chaban, A., Dronina, M., Abramovich, I., Gottlieb, E., et al. (2021) Glutamine homeostasis and its role in the adaptive strategies of the blind mole rat, *Spalax, Metabolites*, **11**, 755, doi: 10.3390/metabo11110755.
 103. Galluzzi, L., Kepp, O., and Kroemer, G. (2012) Mitochondria: master regulators of danger signalling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 780-788, doi: 10.1038/nrm3479.
 104. Miller, B., Kim, S. J., Kumagai, H., Yen, K., and Cohen, P. (2022) Mitochondria-derived peptides in aging and healthspan, *J. Clin. Invest.*, **132**, e158449, doi: 10.1172/JCI158449.
 105. Waters, C. M., and Bassler, B. L. (2005) Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **21**, 319-346, doi: 10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001.

**TRANSCRIPTION FACTOR Nrf2 AND MITOCHONDRIA –
FRIENDS OR FOES IN THE AGING PACE REGULATION****Review****G. A. Shilovsky^{1,2,3*} and V. V. Ashapkin¹**¹ *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia; e-mail: gregory_sh@list.ru, grgerontol@gmail.com*² *Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia*³ *Institute for Information Transmission Problems, Russian Academy of Sciences, 127051 Moscow, Russia*

At the first sight, the transcription factor Nrf2, being the master regulator of cellular antioxidant systems, and mitochondria, being the main source of reactive oxygen species (ROS), should play opposite roles in determination of the aging pace. However, as much as the aging causes could not be confined to oxidative stress, Nrf2 role could not be confined to the antioxidant system regulation, and even more so, the role of mitochondria is not confined to ROS production. Indeed, significance of both Nrf2 and mitochondria in aging has been studied for a long time rather successfully. In the current review, we will discuss a small aspect of this problem only, specifically, molecular mechanisms of Nrf2-mitochondria interaction that, one way or another, influence the pace of aging and the lifespan. Experimental data accumulated so far show that Nrf2 activity positively affects both the mitochondrial dynamics and quality control. Nrf2 could affect the mitochondrial function via different modes, either directly via regulation of nuclear encoded mitochondrial proteins or indirectly via changing balance of ROS or other metabolites affecting mitochondrial functioning. In turn, multiple regulatory proteins functionally associated with mitochondria affect Nrf2 activity and even form mutual regulatory loops with Nrf2. It will be suggested that these loops enable fine-tuning of the cellular redox balance and possibly the cellular metabolism as a whole. It has been believed for quite a long time that all mitochondrial regulatory signals are mediated by the nuclear genome encoded proteins whereas the mitochondrial genome has been considered to encode a few respiratory chain proteins and two ribosomal RNAs. Relatively recently, mtDNA encoded signal peptides were discovered and investigated. In this paper, we will discuss data concerning molecular features of their interaction with nuclear regulatory systems, Nrf2 in the first place, and their possible involvement in determining the pace of aging. Mechanisms of interaction of regulatory cascades that link programs of the cellular homeostasis and cellular responses to oxidative stress are a significant part of the aging and anti-aging programs. Therefore, the respective knowledge should be of great help in searching the promising molecular targets to counteract the aging diseases and the aging *per se*.

Keywords: Nrf2, mitochondria, aging, lifespan, oxidative stress, aging diseases, antioxidants

НЕ НАСТАЛО ЛИ ВРЕМЯ СЛОМА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ПАРАДИГМЫ И УСТАНОВЛЕНИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ НОМЕНКЛАТУРЫ?

Обзор

© 2022 Д.Б. Зоров^{1,2*}, Л.Д. Зорова^{1,2}, Н.В. Андрианова¹, В.А. Бабенко^{1,2},
С.Д. Зоров^{1,3}, И.Б. Певзнер^{1,2}, Г.Т. Сухих², Д.Н. Силачев^{1,2}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
119991 Москва, Россия; электронная почта: zorov@belozersky.msu.ru

² Национальный медицинский исследовательский центр
акушерства, гинекологии и перинатологии имени В.И. Кулакова, 117997 Москва, Россия;

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 21.10.2022

После доработки 03.11.2022

Принята к публикации 03.11.2022

В этой работе мы решили инициировать дискуссию, касающуюся гетерогенности митохондрий, предположив, что настало время создать классификацию митохондрий наподобие той, которая существует для их прародителей – α -протеобактерий – с предложением возможного выделения митохондриальных «штаммов», а может быть и видов. Мы продолжаем придерживаться линии, что митохондрии являются друзьями и врагами: с одной стороны, обеспечивая клетку и организм необходимыми энергетическими и сигнальными молекулами, а с другой – участвуя в уничтожении клетки и организма. Текущее понимание, что деятельность митохондрий не только не ограничивается энергетической функцией, но и что эти альтернативные функции являются уникальными и незаменимыми в клетке, позволило говорить о сильной подчиненности всего клеточного метаболизма характерным функциональным проявлениям митохондрий. Митохондрии способны производить не только АТФ, но и железосерные кластеры, стероидные гормоны, гем, активные формы кислорода и азота, принимать участие в термогенезе, регулировать клеточную гибель, пролиферацию и дифференцировку, участвовать в детоксикации и пр. Они являются обязательным атрибутом эукариотических клеток, и до сих пор не было обнаружено таких эукариотических клеток, ведущих непаразитическое или не симбиотическое существование, в которых бы отсутствовали митохондрии. Мы считаем, что структурно-функциональное внутриклеточное, межклеточное, межорганное и межвидовое разнообразие митохондрий достаточно велико, чтобы иметь основания для создания митохондриальной номенклатуры. Аргументы для этого приводятся в данном аналитическом обзоре.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: митохондрии, бактерии, структура, гетерогенность, митохондриальная ДНК, гетероплазмия, болезни, фенотип, таксономия.

DOI: 10.31857/S0320972522120077, EDN: NGMTGC

ВВЕДЕНИЕ. МИТОХОНДРИИ КАК ОБЯЗАТЕЛЬНЫЙ АТТРИБУТ НОРМАЛЬНОЙ ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ КЛЕТКИ

В предыдущих выпусках «Феноптоза» мы акцентировали внимание читателей на необходимости понимания, что митохондрии яв-

ляются ключевым элементом в управлении жизни и гибели не только клетки-хозяина, но и всего организма [1–5]. Причем мы в очередной раз подчеркиваем, что энергетическая функция митохондрий является важной, но не основной из целого ряда известных митохондриальных функций [6]. Действительно, митохондрии присутствуют практически во всех эукариотических клетках. Поиск амитохондриальных эукариотов, а их набралась некоторая коллекция, привел к одному неопровержимому

Принятые сокращения: мтДНК – митохондриальная ДНК.

* Адресат для корреспонденции.

выводу о крайней важности этой органеллы для функционирования нормальной клетки. В исключительных случаях, например, в эритроцитах млекопитающих как более продвинутых по сравнению с другими представителями животного царства [7], отсутствует как ядро, так и митохондрии, что приписывают исключительно утилитарной O_2 -переносящей функции этих клеток и необходимости сильно деформироваться, проходя через узкие капилляры, чему мешает присутствие жесткого ядра. Кстати, у рыб и птиц в эритроцитах находят функционирующие ядро и митохондрии [8]. Еще отметим, что предшественники красных кровяных клеток млекопитающих все же имеют митохондрии [9], и эти клетки вместе со стадией энуклеации при созревании осуществляют программируемое устранение своих митохондрий [10]. При этом описано четыре типа программируемого уничтожения митохондриальной популяции в клетке: асимметричное деление предшественника с передачей всех митохондрий в одну из делящихся клеток, аутофагия (митофагия) внутри предшественника, выброс митохондрий из клетки в составе экзосом и опосредованный перенос митохондрий в контактирующий с предшественником макрофаг через нанотрубочки [11–14]. Все остальные случаи существования эукариотов без митохондрий описаны либо у клеток, ведущих очевидный паразитический образ жизни, либо у облигатных симбионтов (грань между которыми очень трудно определить) с авторским консенсусом, что утрата митохондрий была вторичной, ибо эволюционные предшественники этих клеток все же имели митохондрии [15, 16]. В этом плане постоянно шел спор, какие внутриклеточные структуры считать митохондриями, и какие биохимические функции надлежит приписать исключительно митохондриям. Поначалу почти у всех присутствовало согласие считать комплекс, отвечающий за образование железосерных кластеров, как единственно верный признак наличия митохондрий, но после открытия паразитических особей среди флагеллат *Monocercomonoides* sp. [16], у которых не было обнаружено признаков наличия митохондрий вместе с обнаружением цитоплазматической системы, отвечающей за синтез железосерных кластеров, очевидно приобретенной в ходе эволюции за счет латерального переноса соответствующих генов от бактерий, этот признак не был отнесен к чисто митохондриальным. Споры по этой тематике все продолжаются, так как есть вопросы и к методической стороне исследований, на основании которой было сделано утверждение об отсут-

ствии в той или иной клетке митохондриальных признаков, например, обнаружение якобы отсутствия митохондриальной ДНК в клетке динофлагеллат [17] потом было оспорено [18]. Появилась теория митохондриальной редуцированной эволюции, в которой присутствуют несколько очевидных стадий — от классической аэробной схемы через анаэробную, затем гидрогенисомальную, затем митосомальную стадии с, возможно, окончательной утратой тех митохондриальных функций, которые мы называем классическими [19]. В этом обзоре не ставится цель полностью разобрать этот вопрос, ибо широкий спектр приспособленческих к внешним условиям реакций, и, в частности, митохондриальных функций, особенно проявляющийся при паразитических условиях, с нашей точки зрения, в очередной раз подчеркивает неоспоримую важность любой из митохондриальных функций, которые в клетке не исчезают, а либо реализуются в самой митохондрии, либо делегируются другим отделам клетки.

МНОЖЕСТВЕННОСТЬ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ФУНКЦИЙ

Рассматривая многоликое функционирование митохондрий, оценка того, насколько важна та или иная функция из альтернативных энергетическим функциям митохондрий, невозможна, ибо все они уникальны. Например, синтез железосерных кластеров, без которых невозможно существование любой живой системы [20], происходит именно в митохондриях, равно как и синтез гема, являющегося необходимым и насущным элементом целого ряда редокс-зависимых и независимых белков, или синтез стероидов, без которых невозможна регуляция широкого спектра физиологических функций [6, 21]. Несомненна исключительная роль митохондрий в регуляции пролиферации, дифференцировки и гибели клетки, что ставит митохондрию в центр регуляции жизнедеятельности клетки. Тогда и становится ясным обязательное присутствие митохондрий даже в такой эукариотической клетке, в которой энергопродуцирующая функция митохондрий (через окислительное фосфорилирование или за счет редуцированной цепи переноса электронов, что наблюдается у анаэробных высших организмов [22]) вносит малый вклад в общую энергопродукцию клетки с существенным преобладанием гликолитического пути синтеза АТФ, что имеет место, например, в раковой клетке [23].

Анализируя относительную самостоятельность функционирования митохондрий, которую даже издревле дают как пример эндосимбиотического сосуществования с клеткой [24, 25] с последующим развитием этой концепции [26–29], мы в то же время отмечали ее «эгоистичное» поведение [2, 3, 30], из которого напрашивалось проведение параллели с ее эволюционными предшественниками, бактериями. Надо отметить, что наша точка зрения на внутриклеточный эгоизм митохондрии, граничащий с паразитизмом, не является уникальной, и, в частности, можно привести цитату из обзора Roger et al. [31], касающуюся взаимоотношения митохондрии и клетки: «...симбионт мог начать использовать ресурсы метаболитов хозяина как умеренный паразит, или хозяин и симбионт могли быть синтрофными партнерами, но затем, как только хозяин получил доступ к запасам АТФ симбионта, ассоциация, возможно, перешла к порабощению».

БАКТЕРИИ КАК ПРЕДШЕСТВЕННИКИ МИТОХОНДРИЙ

Прокариотическое происхождение митохондрий находит множество подтверждений. До сих пор митохондрии сохраняют многие структурные свойства прокариотической клетки, в частности, за счет наличия сопрягающей мембраны со встроенными генераторами протон-движущей силы, общей структуры АТФ-синтазной машины, кардиолипинов, циклической структуры ДНК и пр. В то же время бактериальная клетка сама производит все, что ей надо для жизнедеятельности, что отличает ее от митохондрии, зависимой от ядерной экспрессии большого ряда необходимых белков, гены которых были делегированы в ядерный геном. Однако существует и иная точка зрения, что как такового переноса генов не было, а было совместное редактирование двух бактериальных геномов с большим пулом общих генов. Кроме того, сотни вновь появившихся в «пришельце» генов явно возникли уже в ходе эволюции [31]. Именно это, как мы уже указывали, позволило рассматривать взаимоотношения митохондрий с оставшейся частью клетки как симбиотические. Мы еще раз подчеркиваем, что иногда взаимоотношения митохондрий и клетки рассматриваются как крайне «эгоистические», если не паразитические [2, 3, 32], учитывая несоответствие «интересов» митохондрий и клетки в условиях кризиса, наподобие того, который наблюдается в условиях гипоксии, когда ми-

тохондрия, неспособная к окислительному синтезу АТФ, начинает использовать клеточный АТФ для поддержания своего мембранного потенциала [30, 32], и это поведение внешне кажется противоречащим «интересам» клетки, находящейся в относительном энергетическом кризисе.

Существует точка зрения, что митохондрии возникли при повышении атмосферного содержания кислорода на Земле и были призваны бороться с кислородной опасностью в силу того, что кислород и его производные обладают достаточно сильной и зачастую нежелательной окислительной способностью, от которой живой системе необходима была защита [33]. Хотя надо признать, что существует и альтернативная точка зрения, основанная не на геологических данных, утверждающих, что во время внедрения в клетку кислородная опасность была не так велика из-за низкого содержания атмосферного кислорода, и внедрявшаяся органелла могла быть факультативным анаэробом, способным жить как с кислородом, так и без него. В этом плане по мере постепенного повышения содержания окружающего кислорода органелла адаптировала свой метаболизм с перестройкой на аэробную энергопродукцию [34].

Как мы уже отметили, напрямую делать сравнение митохондриального функционирования с таковым у большого ряда бактерий неправомерно, так как в основном бактерии являются самодостаточными организмами, в то время как митохондрии, как мы уже говорили, делегировали клеточному ядру организацию и саму экспрессию генов, кодирующих большинство своих белков. Но, основываясь на данных по строению геномов, мы можем провести некую параллель между митохондриями и паразитическими бактериями [35, 36]. В целом, человек и животные населены широким спектром малоразмерных бактерий с сильно редуцированным геномом, например из филы *Saccharibacteria*, приспособившихся к паразитированию на разных типах млекопитающих [37]. Надо отметить, что и паразитические бактерии, и митохондрии трудно или почти невозможно культивировать [38, 39], что также дает право их сравнивать. Тут надо сделать отступление и заметить, что вообще есть мнение, что поддается культивации всего лишь 1% всех известных бактерий [38], а для паразитических особей (некоторых из которых все же удалось культивировать [39]) эта проблема особенно остра, ибо она требует тонкого подбора сред, идентичных содержанию клетки-хозяина, от которой бактерии зависят.

Казалось бы, культивация митохондрий достаточно бессмысленная вещь, однако в далеком прошлом попытка культивации их была осуществлена, и, по утверждению авторов, она была достаточно успешной [40, 41]. В настоящее время, когда есть предпосылки для трансплантации митохондрий для лечения ряда патологий [42], идея культивации митохондрий уже не будет такой наивной, хотя и потребует очень непростых подходов, основанных на знаниях взаимоотношения клеточного ядра и митохондрий. Но, возвращаясь к аналогии митохондрий и паразитических бактерий, надо отметить, что в большинстве своем бактерии, если они и паразитируют, являются эпибионтами, т.е. существуют на поверхности клетки, в отличие от митохондрий, которые, находясь внутри клетки, пользуются этим и, в частности, синтезируют в ограниченный клеточный объем АТФ, забуферивая значения своего мембранного потенциала [43, 44].

Однако есть большие группы внутриклеточных бактерий. Например, существует большой кластер работ по сравнению митохондрий и риккетсий, входящих в подразделение протеобактерий. Риккетсии – это в большинстве своем облигатные эндосимбионты порядка Rickettsiales, часть которых населяют членистоногих, хотя *Rickettsia prowazekii* является паразитом, возбудителем эпидемического сыпного тифа, крайне патогенного для человека. Природа облигатного внутриклеточного симбиоза риккетсий остается непонятной. Молекулярно-биологические данные указывают на то, что Rickettsiales, скорее всего, являются прародителем митохондрий либо и митохондрии и Rickettsiales произошли от общего прародителя [45–51], при этом наблюдается поразительное сходство между этими риккетсиями и митохондриями, выражающееся прежде всего в высоком сходстве в функциональных профилях генов риккетсии и митохондрий [45]. У *Rickettsia prowazekii* даже был обнаружен характерный для всех митохондрий ADP/АТФ-антипортер [52], который отсутствует у бактерий, ведущих непаразитический образ жизни, ибо его присутствие немедленно привело бы к истощению адениновых нуклеотидов. У риккетсий антипортер обеспечивает однонаправленный транспорт АТФ из организма-хозяина в клетку паразита в обмен на ADP, хотя структурная гомология этого антипортера с таковым у митохондрий отсутствует. Но при этом, хотя для риккетсий таксономия сохранилась, для родственных им митохондрий классификации и систематики не существует.

АНАЛИЗ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ. ВОЗМОЖНОСТЬ СУЩЕСТВОВАНИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ

Трехмерная организация митохондрий в одиночной клетке может быть представлена смесью продолговатых, часто разветвленных митохондриальных тяжей и округлых структур с разным соотношением этих состояний, и все это в целом именуется хондриомом. Указанное соотношение продолговатых и округлых митохондриальных структур не постоянное и зависит от окружения, в которое попадает клетка. В частности, в результате налагаемого извне или возникшего внутри клетки окислительного стресса (т.е. когда суммарный редокс-потенциал основных компонентов, определяющий редокс-статус клетки, таких как глутатион, NAD(P)H и SH-группы белков, снижен, т.е. эти компоненты в своем большинстве окислены) происходит расщепление продолговатых митохондриальных структур на мелкие фрагменты. И, наоборот, в комфортных условиях (когда редокс-статус клетки восстанавливается) происходит объединение митохондрий в протяженные структуры. Все эти превращения свидетельствуют о высокой лабильности хондриома, направленной на адаптацию митохондрий к условиям внешней среды, ставящей конечной целью сохранить популяцию митохондрий и обеспечить ее эффективное функционирование в разных условиях. Действительно, фрагментация митохондрий при окислительном стрессе [53–56] выглядит логически обоснованной, увеличивая шанс сохранения хотя бы малой части популяции митохондрий в условиях окислительной опасности и возможного уничтожения части популяции [57, 58]. Ранее было обозначено доказанное преимущество протяженных митохондриальных структур, заключающееся в возможности равного обеспечения энергией всего клеточного объема [59–63]. В соответствии с этой концепцией энергия в разные отделы клетки доставляется в виде мембранного потенциала, который по мере необходимости трансформируется в энергию АТФ, генерируемую равномерно распределенным по всем митохондриям АТФ-синтазным комплексом. Мы с полным правом можем рассуждать о сложной и многообразной трехмерной организации митохондриального хондриома в клетке, пронизывающего все клеточные компартменты, иногда включающие и ядро [59–64], со своими законами по коммуникации, функциям и жизненному циклу [32].

Хотя митохондрии были открыты существенно позднее, чем были обнаружены и охарактеризованы бактерии, митохондриальная наука развивается очень активно, с полным пониманием многофункциональности этой клеточной органеллы и вызывает необходимость сравнения деятельности митохондрий в клетке и бактерий, находящихся в своей среде обитания. Проведя такое сравнения компонентов клетки с целыми многоклеточными организмами, обладающими своей микробиотой, мы позволили себе отнести митохондриальную популяцию клетки к своеобразной организации, именуемой *митобиотой*, которая, как и *микробиота*, в значительной мере определяет функционирование клетки или организма-хозяина [3].

Микробиология является более древней наукой, чем митохондриология, и на ее заре она в основе рассматривала функционирование единого начала — одного микроба, который может быть вреден для организма человека и животных. Только позже пришло понимание, что микробов существует великое множество, и это целый мир со своими законами борьбы и единства.

Сегодня, пока не произошло основанное на структурно-функциональных особенностях разделение митохондрий на разные типы, их разделение на основе полиморфизма митохондриальной ДНК (митотипы) было сделано, и нами будет кратко обсуждено далее в соответствующем разделе. Однако на основании одного лишь параметра, а именно разницы в структуре митохондриальной ДНК (мтДНК), классификация будет ущербной, учитывая громадную гетерогенность других характеристик митохондрий. Гетерогенность морфологии митохондриальных структур поразительна [65–70], даже исключая изменение их конформации при изменении энергетического статуса [71–75]. То же самое можно сказать и про разнообразие митохондриального функционирования, даже в пределах одного органа [76], а разнообразие структур и функций митохондрий в разных органах просто огромное. Митохондрии кардиомиоцитов отличаются от митохондрий фибробластов или эпителиоцитов, да и в разных структурах мозга митохондриальная морфология существенно различна. Более того, в пределах одной клетки можно наблюдать существенную гетерогенность популяции, которая пока на данный момент описывается на основе гетерогенности функциональных свойств, оцениваемых по значениям трансмембранного потенциала [43, 44, 66].

Морфологические различия присутству-

ющих у данного биологического вида митохондрий также очень масштабны, что, по-видимому, отражает адаптацию данного типа клетки к окружающему миру [67]. Понятно, что эти адаптивные приспособления митохондрий не определяются адаптацией их энергопродуцирующих свойств, а отражают в значительной мере обеспечение митохондриями альтернативных функций. В качестве примера приведем функционирование митохондрий взрослой особи кольчатого червя, аскариды, или клеток солидной опухоли, находящихся в условиях гипоксии, не позволяющей осуществить полноценную активность митохондрий в энергетическом плане [23, 77]. При этом особи сохраняют митохондриальные структуры, очевидно, из-за обязательности выполнения ими таких функций, как участие в программируемой гибели клетки, синтез железосерных кластеров и других синтетических процессов.

Одним из побуждающих мотивов к рассуждению о том, что митохондрии все различны даже в пределах одной клетки, являются данные о трансклеточном переносе митохондрий [78–83]. В последнее время эта тематика стала очень модной после открытия переноса митохондрий из стволовых и прогенитарных клеток в дифференцированные клетки, сопровождающегося перестройками в клетках реципиентов, причем в разных направлениях — от смертельных до репаративных и выживающих [84]. Однако данные свидетельствовали не о массовом переносе митохондрий от клеток-доноров в клетки-реципиенты, а о переносе достаточно небольшого числа митохондрий [85]. Вывод о том, что перенос очень небольшого числа митохондрий вызывает серьезные клеточные перестройки, вынуждает признать, что перенесенные в другие клетки одиночные митохондрии в некотором аспекте являются особенными или «специальными», и чисто логически неспособными изменить энергетический статус клетки за счет своего непосредственного участия, на чем настаивало большое число исследователей [86, 87]. Этот факт, кроме явного предположения о неэнергетической роли перенесенных митохондрий, опять же предполагал, что перенесенная популяция митохондрий по своим функциям явно отлична от хозяйских митохондрий. Кроме того, что стало понятным, что такой межклеточный перенос может происходить по разным механизмам, была искусственно осуществлена приводящая к положительным эффектам массовая трансплантация митохондрий в пораженный орган, приводящая к положительным эффектам, и на основе этих данных родилась

концепция нового типа терапии, а именно терапия при помощи трансплантации субклеточных структур, в частности митохондрий [88].

Вариабельность митохондриальных функций определяет их специфическую роль в ткани, например, производство тепла в буром жире, производство стероидных гормонов в стероидогенных тканях, исключительное производство АТФ для обеспечения подвижности сперматозоида и т.п. Видимо, и в пределах одиночной клетки функции митохондрий различны, определяя необходимость деления митохондриальной популяции, в частности, в скелетной мускулатуре, на субсарколеммальные, интерфибриллярные и окооядерные митохондрии, которые отличаются по структуре и функциональности [89]. Кроме внутренне предопределенной вариабельности митохондрий, в последнее время все больше появляется подтверждений об усилении гетерогенности митохондрий в клетке при патологических состояниях [90], причем оценка вариабельности в основном происходит по измеренным функциональным параметрам [66], хотя и производятся попытки оценить структурные изменения в мтДНК, вызванные, в частности, не клиническими проблемами, а экспериментально созданным окислительным вызовом [91].

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК

Попытки рассмотрения вариабельности митохондриальной биохимии в основном сводятся к изучению вариабельности митохондриальной ДНК, взяв в качестве эталона мтДНК дикого типа, хотя ее однотипность еще предстоит доказать, учитывая возможные модификации в известных митохондриальных генах. Была доказана не только высокая вариабельность мтДНК у разных биологических видов (наличие разных митотипов, которые будут обсуждаться ниже), в частности, у млекопитающих, но и отмечена внутривидовая вариабельность, разобранная на примерах митохондриальных геномов *Homo sapiens*, *Bos taurus*, *Sus scrofa* и *Canis familiaris* [92]. При этом пока исключается рассмотрение структуры некодирующего участка мтДНК, идентичность или вариабельность которого еще надлежит разобрать.

Достаточно широко признано, что увеличение вариабельности мтДНК является причиной внутриклеточной гетерогенности митохондрий, т.е. сопряженной с разделением их на субпопуляции [93] с конечным результатом или лучше сказать ассоциацией возникнове-

ния патологического фенотипа [94], который наступает при превышении определенных значений соотношения «патологических» форм мтДНК к дикому типу [95].

Вариабельность мтДНК включает в себя как точечные изменения структуры, так и серьезные изменения генома, выражающиеся в отсутствии достаточно длинного участка генома (делеции) или приобретении дополнительных участков, которые чаще всего реализуются в копировании отдельных участков генома (дупликация).

Хотя общепринятым и превалирующим является утверждение, что делеции, дупликации и точечные мутации в молекуле мтДНК являются причинами митохондриальных болезней [96–102], нам кажется, что это утверждение несколько сильное, ибо если и можно в какой-то мере согласиться с этим в случаях мутаций, то когда речь заходит о связи делеций мтДНК и митохондриальных патологий, – тут налицо лишь ассоциативная связь, т.е. присутствие разных делетированных форм мтДНК сопровождает то или иное заболевание. Давайте проведем аналогичную параллель с таким бактериальным заражением, которое определяет развитие и сопровождает течение той или иной болезни. Например, присутствие непатогенных форм *E. coli* в кишечнике человека является нормальным, а вот появление патогенных форм той же бактерии (или, например, бактериальных персистеров), именуемых штаммами и отличающихся от непатогенной формы не больше, чем существуют различия между разными структурами мтДНК, приводит к фенотипическим проявлениям патологического состояния.

Наше предложение сводится к тому, что, в принципе, мы должны принять наличие «штаммов», а может быть, и видов митохондрий, в частности, учитывая зависимость степени отклонения мтДНК, находящейся в той или иной митохондрии, от так называемой «стандартной» структуры. Мешает такому рассмотрению обыденное представление, что в нормальной клетке присутствует однотипная копия мтДНК, и, если происходят изменения в структуре этой молекулы, они, в принципе, патогенны, хотя и выражение этой патогенности происходит на стадии, когда соотношение «патогенной» формы к «дикотипной» (высокая степень гетероплазмии) превышает определенный порог, вызывая фенотипические проявления патологии. Эти воззрения, в принципе, не совсем верны, ибо гетероплазмия имеет место и в норме [103], и принятие постоянного сосуществования наряду

с признанной «стандартной» копией мтДНК другой, измененной копии является основой для рассмотрения *независимого* существования таких копий. В этом плане наши воззрения не являются новыми, ибо признано существование типов мтДНК (митотипов или гаплотипов), отражающих высокую степень полиморфизма мтДНК, которая в некоторой мере систематизирована с выделением у человека до 5000 митотипов по всему земному шару [104]. Было построено филогенетическое дерево митохондрий человека, в котором существуют гаплотипы и гаплогруппы, которые, условно говоря, можно было представить как листья и точки ветвления дерева на основе сходства митогеномов. Это типирование мтДНК ставило целью раскрыть происхождение той или иной популяции и ее генетическую структуру, в конечном итоге позволяющую классифицировать около 40 гаплогрупп мтДНК, распределенных у людей разных наций и населяющих разные географические области [105, 106].

Для предположения независимого существования митотипов несущественным является соотношение разных копий мтДНК в клетке, ибо оно существенно лишь для фенотипа, возникающего при доминировании «нестандартной» копии. Мы не будем углубляться в механизмы изменения этого соотношения, выражающиеся в непонятном по механизму принципе сегрегации митохондрий или узкого бутылочного горлышка, но можем предположить участие также непонятного по механизму асимметрического распределения биологических структур. Такая асимметрия была описана как при делении бактериальной клетки [107], так и для распределения митохондрий между материнской дрожжевой клеткой и дочерней почкой [108], и для распределения митохондрий при делении стволовой клетки, и анализ асимметрического деления был проведен нами ранее [109]. Это позволяет предположить асимметрическое распределения копий мтДНК при репликации митохондрий и клеток, хотя это не выходит из разряда спекуляций.

Основной вопрос: а нужна ли такая систематика митохондрий? Мы снова апеллируем к бактериальной систематике, которая была создана и в какой-то мере подвергается критике, что характерно для всех систематиков и эволюционных биологов. Что дала такая систематика для бактерий, да и не только для них? Прежде всего, это позволило сделать некоторые выводы о ходе эволюции того или иного биологического объекта. Такая систематика (хотя пока непонятно, на чем она должна быть основана для митохондрий, и мы не даем предложений,

кроме пожелания инициации дискуссии на эту тему) поможет решить вопрос о прародителе или прародителях (при подтверждении слишком сильной дивергенции митохондрий их может быть много). Вопрос второй — насколько симбиотичным нужно считать наличие в наших клетках митохондрий? Кто они: активные и очень нужные элементы (это вроде бы доказано, хотя элементы проявления митохондриального «эгоизма» очевидны) и/или находящиеся в общей даже нормальной популяции «спящие» враги, которые могут «проснуться» и запустить уничтожение системы? Именно поэтому эту работу мы публикуем в выпуске «Феноптоза», а аргументация, что митохондрии являются активными участниками феноптической гибели организма, нами давалась ранее [1].

Нет сомнений, что достаточно легко можно согласиться с организацией митохондриальной номенклатуры у разных биологических видов. Гораздо сложнее будет применить ее на организменном, органном и внутриклеточном уровнях. Пока мы не используем для митохондрий устоявшиеся для бактерий термины: типы, виды, штаммы, таксономия, но если согласие с традиционными биологическими систематиками в каком-то виде будет найдено, то мы сможем прийти к более сильным утверждениям и избирательным действиям по работе с каждым членом митохондриальной популяции, которые проявляют нежелательные для организма действия. Пока же без определения митохондриальной номенклатуры мы прячем свое нежелание и неумение ее провести за терминами «митохондриальное разнообразие», «гетерогенность популяции» и т.д., что не сильно будет способствовать развитию митохондриальной медицины.

Очевидно, что при общем согласии, на которое не очень приходится рассчитывать, потребуется значительное время, которое должно быть прежде всего потрачено на изучение сравнительной биологии митохондрий и близких к ним по деятельности биологических видов, например риккетсий. Но из-за отсутствия предлагаемых решений и ограничения объема публикации все эти аспекты мы рассмотрели достаточно тезисно без углубления в специфические элементы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как мы уже отмечали, наша работа носит характер мнения по открытию возможной дискуссии о необходимости рассмотрения

митохондриального разнообразия как отражения существования разных митохондриальных «штаммов», а может быть и видов. К этому побуждают многочисленные данные о бактериальном происхождении митохондрий, их межвидовом, внутривидовом и даже внутриклеточном разнообразии и разнообразии их генома, что позволяет сделать предположение достаточно независимого существования разных типов мтДНК, как одного из источников этого разнообразия. Вкупе анализ этих данных и сравнение структуры и функции митохондрий с таковыми у бактерий, таксономия которых крайне обширна, позволяет инициировать рассмотрение номенклатуры митохондрий.

Вклад авторов. Д.Б. Зоров, Г.Т. Сухих, Д.Н. Силачев – концепция; Д.Б. Зоров, Н.В. Андрианова, В.А. Бабенко, Л.Д. Зорова, С.Д. Зоров, И.Б. Певзнер, Д.Н. Силачев – обсуждение; редактирование концепции; написание текста; Д.Б. Зоров, Д.Н. Силачев – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-14-00173-П).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zorov, D. B., Plotnikov, E. Y., Jankauskas, S. S., Isaev, N. K., Silachev, D. N., Zorova, L. D., Pevzner, I. B., Pulkova, N. V., Zorov, S. D., and Morosanov, M. A. (2012) The phenoptosis problem: what is causing the death of an organism? Lessons from acute kidney injury, *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 742-753, doi: 10.1134/S0006297912070073.
- Zorov, D. B., Isaev, N. K., Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Zorova, L. D., Pevzner, I. B., Morosanov, M. A., Jankauskas, S. S., Zorov, S. D., and Babenko, V. A. (2013) Perspectives of mitochondrial medicine, *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 979-990, doi: 10.1134/S0006297913090034.
- Zorov, D. B., Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Zorova, L. D., Pevzner, I. B., Zorov, S. D., Babenko, V. A., Jankauskas, S. S., Popkov, V. A., and Savina, P. S. (2014) Microbiota and mitobiota. Putting an equal sign between mitochondria and bacteria, *Biochemistry (Moscow)*, **79**, 1017-1031, doi: 10.1134/S0006297914100046.
- Popkov, V. A., Silachev, D. N., Jankauskas, S. S., Zorova, L. D., Pevzner, I. B., Babenko, V. A., Plotnikov, E. Y., and Zorov, D. B. (2016) Molecular and cellular interactions between mother and fetus. Pregnancy as a rejuvenating factor, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 1480-1487, doi: 10.1134/S0006297916120099.
- Popkov, V. A., Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Zorova, L. D., Pevzner, I. B., Jankauskas, S. S., Zorov, S. D., Andrianova, N. V., Babenko, V. A., and Zorov, D. B. (2017) Bacterial therapy and mitochondrial therapy, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 1549-1556, doi: 10.1134/S0006297917120148.
- Zorov, D. B., Krasnikov, B. F., Kuzminova, A. E., Vysokikh MYu and Zorova, L. D. (1997) Mitochondria revisited. Alternative functions of mitochondria, *Biosci. Rep.*, **17**, 507-520, doi: 10.1023/A:1027304122259.
- Snyder, G. K., and Sheafor, B. A. (1999) Red blood cells: centerpiece in the evolution of the vertebrate circulatory system, *Am. Zool.*, **39**, 189-198, doi: 10.1093/icb/39.2.189.
- Gaetgens, P., Schmidt, F., and Will, G. (1981) Comparative rheology of nucleated and non-nucleated red blood cells. I. Microrheology of avian erythrocytes during capillary flow, *Pflugers Arch.*, **390**, 278-282, doi: 10.1007/BF00658276.
- Dzierzak, E., and Philipsen, S. (2013) Erythropoiesis: development and differentiation, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **3**, a011601, doi: 10.1101/cshperspect.a011601.
- Dubiel, W., and Rapoport, S. M. (1989) ATP-dependent proteolysis of mitochondria of reticulocytes, *Rev. Biol. Cell.*, **21**, 505-521.
- Klionsky, D. J., and Emr, S. D. (2000) Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation, *Science*, **290**, 1717-1721, doi: 10.1126/science.290.5497.1717.
- Johnstone, R. M., Mathew, A., Mason, A. B., and Teng, K. (1991) Exosome formation during maturation of mammalian and avian reticulocytes: evidence that exosome release is a major route for externalization of obsolete membrane proteins, *J. Cell Physiol.*, **147**, 27-36, doi: 10.1002/jcp.1041470105.
- Yang, C., Endoh, M., Tan, D. Q., Nakamura-Ishizu, A., Takihara, Y., Matsumura, T., and Suda, T. (2021) Mitochondria transfer from early stages of erythroblasts to their macrophage niche via tunnelling nanotube, *Br. J. Haematol.*, **193**, 1260-1274, doi: 10.1111/bjh.17531.
- Géminard, C., de Gassart, A., and Vidal, M. (2002) Reticulocyte maturation: mitoptosis and exosome release, *Biocell*, **26**, 205-215.
- Tovar, J., León-Avila, G., Sánchez, L. B., Sutak, R., Tachezy, J., van der Giezen, M., Hernández, M., Müller, M., and Lucocq, J. M. (2003) Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation, *Nature*, **426**, 172-176, doi: 10.1038/nature01945.

16. Karnkowska, A., Vacek, V., Zubáčová, Z., Treitli, S. C., Petrželková, R., Eme, L., Novák, L., Žárský, V., Barlow, L. D., Herman, E. K., Soukal, P., Hroudová, M., Doležal, P., Stairs, C. W., Roger, A. J., Eliáš, M., Dacks, J. B., Vlček, Č., and Hampl, V. (2016) A eukaryote without a mitochondrial organelle, *Curr Biol*, **26**, 1274-1284, doi: 10.1016/j.cub.2016.03.053.
17. John, U., Lu, Y., Wohlrab, S., Growth, M., Janouškovec, J., Kohli, G. S., Mark, F. C., Bickmeyer, U., Farhat, S., Felder, M., Frickenhaus, S., Guillou, L., Keeling, P. J., Moustafa, A., Porcel, B. M., Valentin, K., and Glöckner, G. (2019) An aerobic eukaryotic parasite with functional mitochondria that likely lacks a mitochondrial genome, *Sci. Adv.*, **5**, eaav1110, doi: 10.1126/sciadv.aav1110.
18. Kayal, E., and Smith, D. R. (2021) Is the dinoflagellate *Amoebophrya* really missing an mtDNA? *Mol. Biol. Evol.*, **38**, 2493-2496, doi: 10.1093/molbev/msab041.
19. Burki, F. (2016) Mitochondrial evolution: going, going, gone, *Curr. Biol.*, **26**, R410-R412, doi: 10.1016/j.cub.2016.04.032.
20. Rouault, T. A. (2012) Biogenesis of iron-sulfur clusters in mammalian cells: new insights and relevance to human disease, *Dis. Model Mech.*, **5**, 155-164, doi: 10.1242/dmm.009019.
21. Dempsey, M. E. (1974) Regulation of steroid biosynthesis, *Annu. Rev. Biochem.*, **43**, 967-990, doi: 10.1146/annurev.bi.43.070174.004535.
22. Salinas, G., Langelaan, D. N., and Shepherd, J. N. (2020) Rhoquinone in bacteria and animals: Two distinct pathways for biosynthesis of this key electron transporter used in anaerobic bioenergetics, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1861**, 148278, doi: 10.1016/j.bbabi.2020.148278.
23. Koppenol, W. H., Bounds, P. L., and Dang, C. V. (2011) Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism, *Nat. Rev. Cancer*, **11**, 325-337, doi: 10.1038/nrc3038.
24. Mereschkowsky, C. (1905) Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche [in Deutsch], *Biologisches Zentralblatt*, **XXV (18)**, 593-604.
25. Фаминцын А. С. (1907) О роли симбиоза в эволюции организмов, *Труды Ботанической лаборатории Императорской Академии наук*, **20**, 1-14.
26. Margulis, L. (1981) *Symbiosis in Cell Evolution: Life and Its Environment on the Early Earth*, Publisher: W. H. Freeman and Company, San Francisco.
27. Sagan, L. (1967) On the origin of mitosing cells, *J. Theor. Biol.*, **14**, 225-274, doi: 10.1016/0022-5193(67)90079-3.
28. Margulis, L., and Bermudes, D. (1985) Symbiosis as a mechanism of evolution: status of cell symbiosis theory, *Symbiosis*, **1**, 101-124.
29. Gray, M. W. (1983) The bacterial ancestry of plastids and mitochondria, *BioScience*, **33**, 693-699, doi: 10.2307/1309349.
30. di Lisa, F., Blank, P. S., Colonna, R., Gambassi, G., Silverman, H. S., Stern, M. D., and Hansford, R. G. (1995) Mitochondrial membrane potential in single living adult rat cardiac myocytes exposed to anoxia or metabolic inhibition, *J. Physiol.*, **486**, 1-13, doi: 10.1113/jphysiol.1995.sp020786.
31. Roger, A. J., Muñoz-Gómez, S. A., and Kamikawa, R. (2017) The origin and diversification of mitochondria, *Curr. Biol.*, **27**, R1177-R1192, doi: 10.1016/j.cub.2017.09.015.
32. Zorov, D. B., Isaev, N. K., Plotnikov, E. Y., Zorova, L. D., Stelmashook, E. V., Vasileva, A. K., Arkhangel'skaya, A. A., and Khrjapenkova, T. G. (2007) The mitochondrion as Janus bifrons, *Biochemistry (Moscow)*, **72**, 1115-1126, doi: 10.1134/S0006297907100094.
33. Abele, D. (2002) Toxic oxygen: The radical life-giver, *Nature*, **420**, 27-27, doi: 10.1038/420027a.
34. Martin, W., and Mentel, M. (2010) The origin of mitochondria, *Nat. Education*, **3**, 58.
35. Viale, A. M., and Arakaki, A. K. (1994) The chaperone connection to the origins of the eukaryotic organelles, *FEBS Lett.*, **341**, 146-151, doi: 10.1016/0014-5793(94)80446-X.
36. McLean, J. S., Bor, B., Kerns, K. A., Liu, Q., To, T. T., Solden, L., Hendrickson, E. L., Wrighton, K., Shi, W., and He, X. (2020) Acquisition and adaptation of ultra-small parasitic reduced genome bacteria to mammalian hosts, *Cell Rep.*, **32**, 107939, doi: 10.1016/j.celrep.2020.107939.
37. He, X., McLean, J. S., Edlund, A., Yooseph, S., Hall, A. P., Liu, S.-Y., Dorrestein, P. C., Esquenazi, E., Hunter, R. C., Cheng, G., et al. (2015) Cultivation of a human-associated TM7 phylotype reveals a reduced genome and epibiotic parasitic lifestyle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 244-249, doi: 10.1073/pnas.1419038112.
38. Amann, R., Ludwig, W., and Schleifer, K.-H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation, *Microbiol. Rev.*, **59**, 143-169, doi: 10.1128/mr.59.1.143-169.1995.
39. Vartoukian, S. R., Palmer, R. M., and Wade, W. G. (2010) Strategies for culture of "unculturable" bacteria, *FEMS Microbiol. Lett.*, **309**, 1-7, doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.02000.x.
40. Portier, P. J. (1918) *Les Symbiotes*. French Edition, *Masson (Paris)*, **1**.
41. Wallin, I. E. (1925) On the nature of mitochondria. IX. Demonstration of the bacterial nature of mitochondria, *Am. J. Anat.*, **36**, 131.
42. Masuzawa, A., Black, K. M., Pacak, C. A., Ericsson, M., Barnett, R. J., Drumm, C., Seth, P., Bloch, D. B., Levitsky, S., Cowan, D. B., et al. (2013) Transplantation of autologously derived mitochondria protects the heart from ischemia-reperfusion injury, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **304**, H966-H982, doi: 10.1152/ajpheart.00883.2012.
43. Zorova, L. D., Popkov, V. A., Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Pevzner, I. B., Jankauskas, S. S.,

- Babenko, V. A., Zorov, S. D., Balakireva, A. V., Juhaszova, M., et al. (2018) Mitochondrial membrane potential, *Anal. Biochem.*, **552**, 50-59, doi: 10.1016/j.ab.2017.07.009.
44. Zorova, L. D., Demchenko, E. A., Korshunova, G. A., Tashlitsky, V. N., Zorov, S. D., Andrianova, N. V., Popkov, V. A., Babenko, V. A., Pevzner, I. B., Silachev, D. N., et al. (2022) Is the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$) correctly assessed? Intracellular and intramitochondrial modifications of the $\Delta\Psi$ probe, rhodamine 123, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 482, doi: 10.3390/ijms23010482.
45. Andersson, S. G. E., Zomorodipour, A., Andersson, J. O., Sicheritz-Pontén, T., Alsmark, U. C. M., Podowski, R. M., Näslund, A. K., Eriksson, A.-S., Winkler, H. H., and Kurland, C. G. (1998) The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria, *Nature*, **396**, 133-140, doi: 10.1038/24094.
46. Kurland, C. G., and Andersson, S. G. (2000) Origin and evolution of the mitochondrial proteome, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **64**, 786-820, doi: 10.1128/MMBR.64.4.786-820.2000.
47. Emelyanov, V. V. (2001) Evolutionary relationship of *Rickettsia* and mitochondria, *FEBS Lett.*, **501**, 11-18, doi: 10.1016/S0014-5793(01)02618-7.
48. Emelyanov, V. V. (2003) Mitochondrial connection to the origin of the eukaryotic cell, *Eur. J. Biochem.*, **270**, 1599-1618, doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03499.x.
49. Fitzpatrick, D. A., Creevey, C. J., and McInerney, J. O. (2006) Genome phylogenies indicate a meaningful alpha-proteobacterial phylogeny and support a grouping of the mitochondria with the *Rickettsiales*, *Mol. Biol. Evol.*, **23**, 74-85, doi: 10.1093/molbev/msj009.
50. Driscoll, T. P., Verhoeve, V. I., Guillotte, M. L., Lehman, S. S., Rennoll, S. A., Beier-Sexton, M., Rahman, M. S., Azad, A. F., and Gillespie, J. J. (2017) Wholly *Rickettsia*! Reconstructed metabolic profile of the quintessential bacterial parasite of eukaryotic cells, *mBio*, **8**, e00859-17, doi: 10.1128/mBio.00859-17.
51. Pallen, M. J. (2011) Time to recognize that mitochondria are bacteria? *Trends Microbiol.*, **19**, 58-64, doi: 10.1016/j.tim.2010.11.001.
52. Winkler, H. H., Neuhaus, H. E. (1999) Non-mitochondrial ATP transport, *Trends Biochem. Sci.*, **24**, 64-68, doi: 10.1016/S0968-0004(98)01334-6.
53. Vorobjev, I. A., and Zorov, D. B. (1983) Diazepam inhibits cell respiration and induces fragmentation of mitochondrial reticulum, *FEBS Lett.*, **163**, 311-314, doi: 10.1016/0014-5793(83)80842-4.
54. Plotnikov, E. Y., Vasileva, A. K., Arkhangelskaya, A. A., Pevzner, I. B., Skulachev, V. P., and Zorov, D. B. (2008) Interrelations of mitochondrial fragmentation and cell death under ischemia/reoxygenation and UV-irradiation: protective effects of SkQ1, lithium ions and insulin, *FEBS Lett.*, **582**, 3117-3124, doi: 10.1016/j.febslet.2008.08.002.
55. Skulachev, V. P., Bakeeva, L. E., Chernyak, B. V., Domnina, L. V., Minin, A. A., Pletjushkina, O. Y., Saprunova, V. B., Skulachev, I. V., Tsyplenkova, V. G., Vasiliev, J. M., et al. (2004) Thread-grain transition of mitochondrial reticulum as a step of mitoptosis and apoptosis, *Mol. Cell Biochem.*, **256-257**, 341-358, doi: 10.1023/B:MCBI.0000009880.94044.49.
56. Zorov, D. B., Vorobjev, I. A., Popkov, V. A., Babenko, V. A., Zorova, L. D., Pevzner, I. B., Silachev, D. N., Zorov, S. D., Andrianova, N. V and Plotnikov, E. Y. (2019) Lessons from the discovery of mitochondrial fragmentation (fission): A review and update, *Cells*, **8**, 175, doi: 10.3390/cells8020175.
57. Youle, R. J., and van der Bliek, A. M. (2012) Mitochondrial fission, fusion, and stress, *Science*, **337**, 1062-1065, doi: 10.1126/science.1219855.
58. Chen, H., Vermulst, M., Wang, Y. E., Chomyn, A., Prolla, T. A., McCaffery, J. M., and Chan, D. C. (2010) Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations, *Cell*, **141**, 280-289, doi: 10.1016/j.cell.2010.02.026.
59. Drachev, V. A., and Zorov, D. B. (1986) Mitochondria as an electric cable. Experimental testing of a hypothesis, *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **287**, 1237-1238.
60. Amchenkova, A. A., Bakeeva, L. E., Chentsov, Y. S., Skulachev, V. P., and Zorov, D. B. (1988) Coupling membranes as energy-transmitting cables. I. Filamentous mitochondria in fibroblasts and mitochondrial clusters in cardiomyocytes, *J. Cell Biol.*, **107**, 481-495, doi: 10.1083/jcb.107.2.481.
61. Skulachev, V. P. (2001) Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables, *Trends Biochem. Sci.*, **26**, 23-29, doi: 10.1016/S0968-0004(00)01735-7.
62. Bakeeva, L. E., Chentsov, Yu. S and Skulachev, V. P. (1978) Mitochondrial framework (reticulum mitochondriale) in rat diaphragm muscle, *Biochim. Biophys. Acta*, **501**, 349-369, doi: 10.1016/0005-2728(78)90104-4.
63. Bakeeva, L. E., Chentsov, Y. S., and Skulachev, V. P. (1981) Ontogenesis of mitochondrial reticulum in rat diaphragm muscle, *Eur. J. Cell Biol.*, **25**, 175-181.
64. Eldarov, C. M., Vangely, I. M., Vays, V. B., Sheval, E. V, Holtze, S., Hildebrandt, T. B., Kolosova, N. G., Popkov, V. A., Plotnikov, E. Y., Zorov, D. B., et al. (2020) Mitochondria in the nuclei of rat myocardial cells, *Cells*, **9**, 712, doi: 10.3390/cells9030712.
65. Khryapenkova, T. G., Plotnikov, E. Y., Korotetskaya, M. V, Sukhikh, G. T., and Zorov, D. B. (2008) Heterogeneity of mitochondrial potential as a marker for isolation of pure cardiomyoblast population, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **146**, 506-511, doi: 10.1007/s10517-009-0327-3.
66. Popkov, V. A., Plotnikov, E. Y., Lyamzaev, K. G., Silachev, D. N., Zorova, L. D., Pevzner, I. B., Jankauskas, S. S., Zorov, S. D., Babenko, V. A., and Zorov, D. B.

- (2015) Mitodiversity, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 532-541, doi: 10.1134/S000629791505003X.
67. Smith, R. A., and Ord, M. J. (1983) Mitochondrial form and function relationships in vivo: their potential in toxicology and pathology, *Int. Rev. Cytol.*, **83**, 63-134, doi: 10.1016/S0074-7696(08)61686-1.
 68. Wikstrom, J. D., Twig, G., and Shirihai, O. S. (2009) What can mitochondrial heterogeneity tell us about mitochondrial dynamics and autophagy? *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **41**, 1914-1927, doi: 10.1016/j.biocel.2009.06.006.
 69. Kuznetsov, A. V., and Margreiter, R. (2009) Heterogeneity of mitochondria and mitochondrial function within cells as another level of mitochondrial complexity, *Int. J. Mol. Sci.*, **10**, 1911-1929, doi: 10.3390/ijms10041911.
 70. Wikstrom, J. D., Katzman, S. M., Mohamed, H., Twig, G., Graf, S. A., Heart, E., Molina, A. J. A., Corkey, B. E., de Vargas, L. M., Danial, N. N., et al. (2007) beta-Cell mitochondria exhibit membrane potential heterogeneity that can be altered by stimulatory or toxic fuel levels, *Diabetes*, **56**, 2569-2578, doi: 10.2337/db06-0757.
 71. Hackenbrock, C. R. (1968) Chemical and physical fixation of isolated mitochondria in low-energy and high-energy states, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **61**, 598-605, doi: 10.1073/pnas.61.2.598.
 72. Hackenbrock, C. R. (1966) Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria, *J. Cell Biol.*, **30**, 269-297, doi: 10.1083/jcb.30.2.269.
 73. Hackenbrock, C. R. (1968) Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. II. Electron transport-linked ultrastructural transformations in mitochondria, *J. Cell Biol.*, **37**, 345-369, doi: 10.1083/jcb.37.2.345.
 74. Hackenbrock, C. R. (1972) States of activity and structure in mitochondrial membranes, *Ann. NY Acad. Sci.*, **195**, 492-504, doi: 10.1111/j.1749-6632.1972.tb54831.x.
 75. Bakeeva, L. E., Grinius, L. L., Jasaitis, A. A., Kuliene, V. V., Levitsky, D. O., Liberman, E. A., Severina, I. I., and Skulachev, V. P. (1970) Conversion of biomembrane-produced energy into electric form. II. Intact mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta*, **216**, 13-21, doi: 10.1016/0005-2728(70)90154-4.
 76. Anusha-Kiran, Y., Mol, P., Dey, G., Bhat, F. A., Chatterjee, O., Deolankar, S. C., Philip, M., Prasad, T. S. K., Srinivas Bharath, M. M., and Mahadevan, A. (2022) Regional heterogeneity in mitochondrial function underlies region specific vulnerability in human brain ageing: Implications for neurodegeneration, *Free Radic. Biol. Med.*, **193**, 34-57, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2022.09.027.
 77. Sakai, C., Tomitsuka, E., Esumi, H., Harada, S., and Kita, K. (2012) Mitochondrial fumarate reductase as a target of chemotherapy: from parasites to cancer cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **1820**, 643-651, doi: 10.1016/j.bbagen.2011.12.013.
 78. Plotnikov, E. Y., Babenko, V. A., Silachev, D. N., Zorova, L. D., Khryapenkova, T. G., Savchenko, E. S., Pevzner, I. B., and Zorov, D. B. (2015) Intercellular transfer of mitochondria, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 542-548, doi: 10.1134/S0006297915050041.
 79. Babenko, V. A., Silachev, D. N., Popkov, V. A., Zorova, L. D., Pevzner, I. B., Plotnikov, E. Y., Sukhikh, G. T., and Zorov, D. B. (2018) Miro1 enhances mitochondria transfer from multipotent mesenchymal stem cells (MMSC) to neural cells and improves the efficacy of cell recovery, *Molecules*, **23**, 687, doi: 10.3390/molecules23030687.
 80. Plotnikov, E. Y., Khryapenkova, T. G., Galkina, S. I., Sukhikh, G. T., and Zorov, D. B. (2010) Cytoplasm and organelle transfer between mesenchymal multipotent stromal cells and renal tubular cells in co-culture, *Exp. Cell Res.*, **316**, 2447-2455, doi: 10.1016/j.yexcr.2010.06.009.
 81. Plotnikov, E. Y., Khryapenkova, T. G., Vasileva, A. K., Marey, M. V., Galkina, S. I., Isaev, N. K., Sheval, E. V., Polyakov, V. Y., Sukhikh, G. T., and Zorov, D. B. (2008) Cell-to-cell cross-talk between mesenchymal stem cells and cardiomyocytes in co-culture, *J. Cell Mol. Med.*, **12**, 1622-1631, doi: 10.1111/j.1582-4934.2007.00205.x.
 82. Koyanagi, M., Brandes, R. P., Haendeler, J., Zeiher, A. M., and Dimmeler, S. (2005) Cell-to-cell connection of endothelial progenitor cells with cardiac myocytes by nanotubes: a novel mechanism for cell fate changes? *Circ. Res.*, **96**, 1039-1041, doi: 10.1161/01.RES.0000168650.23479.0c.
 83. Rustom, A., Saffrich, R., Markovic, I., Walther, P., and Gerdes, H.-H. (2004) Nanotubular highways for intercellular organelle transport, *Science*, **303**, 1007-1010, doi: 10.1126/science.1093133.
 84. Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Popkov, V. A., Zorova, L. D., Pevzner, I. B., Zorov, S. D., Jankauskas, S. S., Babenko, V. A., Sukhikh, G. T., and Zorov, D. B. (2017) Intercellular signalling cross-talk: To kill, to heal and to rejuvenate, *Heart Lung Circ.*, **26**, 648-659, doi: 10.1016/j.hlc.2016.12.002.
 85. Babenko, V. A., Silachev, D. N., Zorova, L. D., Pevzner, I. B., Khutornenko, A. A., Plotnikov, E. Y., Sukhikh, G. T., and Zorov, D. B. (2015) Improving the post-stroke therapeutic potency of mesenchymal multipotent stromal cells by cocultivation with cortical neurons: The role of crosstalk between cells, *Stem Cells Transl. Med.*, **4**, 1011-1020, doi: 10.5966/sctm.2015-0010.
 86. Frankenberg, G., Rogers, A. V., Mak, J. C. W., Halayko, A. J., Hui, C. K. M., Xu, B., Chung, K. F., Rodriguez, T., Michaeloudes, C., and Bhavsar, P. K. (2022) Mitochondrial transfer regulates bioenergetics in healthy and chronic obstructive pulmonary disease

- airway smooth muscle, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **67**, 471-481, doi: 10.1165/rcmb.2022-0041OC.
87. Sinha, P., Islam, M.N., Bhattacharya, S., and Bhattacharya, J. (2016) Intercellular mitochondrial transfer: bioenergetic crosstalk between cells, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **38**, 97-101, doi: 10.1016/j.gde.2016.05.002.
 88. Masuzawa, A., Black, K. M., Pacak, C. A., Ericsson, M., Barnett, R. J., Drumm, C., Seth, P., Bloch, D. B., Levitsky, S., Cowan, D. B., et al. (2013) Transplantation of autologously derived mitochondria protects the heart from ischemia-reperfusion injury, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **304**, H966-H982, doi: 10.1152/ajpheart.00883.2012.
 89. Willingham, T.B., Ajayi, P.T., and Glancy B. (2021) Subcellular specialization of mitochondrial form and function in skeletal muscle cells, *Front. Cell Dev. Biol.*, **9**, 757305, doi: 10.3389/fcell.2021.757305.
 90. Ngo, J., Osto, C., Villalobos, F., and Shirihai, O. S. (2021) Mitochondrial heterogeneity in metabolic diseases, *Biology (Basel)*, **10**, 927, doi: 10.3390/biology10090927.
 91. Gureev, A. P., Andrianova, N. V, Pevzner, I. B., Zorova, L. D., Chernyshova, E. V, Sadovnikova, I. S., Chistyakov, D. V, Popkov, V. A., Semenov, D. S., Babenko, V. A., et al. (2022) Dietary restriction modulates mitochondrial DNA damage and oxylipin profile in aged rats, *FEBS J.*, **289**, 5697-5713, doi: 10.1111/febs.16451.
 92. Santamaria, M., Lanave, C., Vicario, S., and Saccone, C. (2007) Variability of the mitochondrial genome in mammals at the inter-species/intra-species boundary, *Biol. Chem.*, **388**, 943-946, doi: 10.1515/BC.2007.121.
 93. Aryaman, J., Johnston, I. G., and Jones, N. S. (2019) Mitochondrial heterogeneity, *Front. Genet.*, **9**, 718, doi: 10.3389/fgene.2018.00718.
 94. Kopinski, P. K., Singh, L. N., Zhang, S., Lott, M. T., and Wallace, D. C. (2021) Mitochondrial DNA variation and cancer, *Nat. Rev. Cancer*, **21**, 431-445, doi: 10.1038/s41568-021-00358-w.
 95. Wallace, D. C. (2018) Mitochondrial genetic medicine, *Nat. Genet.*, **50**, 1642-1649, doi: 10.1038/s41588-018-0264-z.
 96. Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., et al. (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome, *Nature*, **290**, 457-465, doi: 10.1038/290457a0.
 97. Van Goethem, G., Dermaut, B., Löfgren, A., Martin, J. J., and van Broeckhoven, C. (2001) Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions, *Nat. Genet.*, **28**, 211-212, doi: 10.1038/90034.
 98. Spelbrink, J. N., Li, F. Y., Tiranti, V., Nikali, K., Yuan, Q. P., Tariq, M., Wanrooij, S., Garrido, N., Comi, G., Morandi, L., et al. (2001) Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a page T7 gene 4-like protein localized in mitochondria, *Nat. Genet.*, **28**, 223-231, doi: 10.1038/90058.
 99. Goffart, S., Cooper, H. M., Tynismaa, H., Wanrooij, S., Suomalainen, A., and Spelbrink, J. N. (2009) Twinkle mutations associated with autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia lead to impaired helicase function and in vivo mtDNA replication stalling, *Hum. Mol. Genet.*, **18**, 328-340, doi: 10.1093/hmg/ddn359.
 100. Holt, I. J., Harding, A. E., and Morgan-Hughes, J. A. (1988) Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies, *Nature*, **331**, 717-719, doi: 10.1038/331717a0.
 101. Moraes, C. T., DiMauro, S., Zeviani, M., Lombes, A., Shanske, S., Miranda, A. F., Nakase, H., Bonilla, E., Werneck, L. C., and Servidei, S. (1989) Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome, *N. Engl. J. Med.*, **320**, 1293-1299, doi: 10.1056/NEJM198905183202001.
 102. Poulton, J., Deadman, M. E., and Gardiner, R. M. (1989) Duplications of mitochondrial DNA in mitochondrial myopathy, *Lancet*, **1**, 236-240, doi: 10.1016/S0140-6736(89)91256-7.
 103. Zaidi, A. A., Wilton, P. R., Su, M. S.-W., Paul, I. M., Arbeithuber, B., Anthony, K., Nekrutenko, A., Nielsen, R., and Makova, K. D. (2019) Bottleneck and selection in the germline and maternal age influence transmission of mitochondrial DNA in human pedigrees, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 25172-25178, doi: 10.1073/pnas.1906331116.
 104. Beck, E. A., Bassham, S., Cresko, W. A. (2022) Extreme intraspecific divergence in mitochondrial haplotypes makes the threespine stickleback fish an emerging evolutionary mutant model for mito-nuclear interactions, *Front. Genet.*, **13**, 925786, doi: 10.3389/fgene.2022.925786.
 105. Torroni, A., Huoponen, K., Francalacci, P., Petrozzi, M., Morelli, L., Scozzari, R., Obinu, D., Savontaus, M. L., Wallace, D. C. (1996) Classification of European mtDNAs from an analysis of tree European populations, *Genetics*, **144**, 1835-1850, doi: 10.1093/genetics/144.4.1835.
 106. Van Oven, M., Kayser, M. (2009) Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation, *Hum. Mutat.*, **30**, 386-394, doi: 10.1002/humu.20921.
 107. Shapiro, L., McAdams, H. H., and Losick, R. (2002) Generating and exploiting polarity in bacteria, *Science*, **298**, 1942-1946, doi: 10.1126/science.1072163.
 108. Jazwinski, S. M. (2002) Growing old: metabolic control and yeast aging, *Annu. Rev. Microbiol.*, **56**, 769-792, doi: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160830.
 109. Zorov, D. B., Popkov, V. A., Zorova, L. D., Vorobjev, I. A., Pevzner, I. B., Silachev, D. N., Zorov, S. D., Jankauskas, S. S., Babenko, V. A., and Plotnikov, E. Y. (2017) Mitochondrial aging: Is there a mitochondrial clock? *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **72**, 1171-1179, doi: 10.1093/gerona/glw184.

ISN'T IT TIME FOR ESTABLISHING MITOCHONDRIAL NOMENCLATURE TO BREAK MITOCHONDRIAL PARADIGM?

Review

**D. B. Zorov^{1,2*}, L. D. Zorova^{1,2}, N. V. Andrianova¹, V. A. Babenko^{1,2}, S. D. Zorov^{1,3},
I. B. Pevsner^{1,2}, G. T. Sukhikh², and D. N. Silachev^{1,2}**

¹ *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia;
E-mail: zorov@belozersky.msu.ru*

² *V. I. Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology,
117997 Moscow, Russia*

³ *Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

In this work, we decided to initiate a discussion concerning the heterogeneity of mitochondria, suggesting that it is time to build a classification of mitochondria, like the one that exists for their progenitors, α -proteobacteria, with a proposal for the possible isolation of mitochondrial strains, and maybe species. We continue to adhere to the line that mitochondria are friends and foes, on the one hand, providing the cell and the organism with the necessary energetics and signaling molecules, and on the other hand participating in the destruction of the cell and the organism. The current understanding that the activity of mitochondria is not only not limited to the energy production, but also that these alternative functions are unique and irreplaceable in the cell, allowed us to speak about the strong subordination of the entire cellular metabolism to the characteristic functional manifestations of mitochondria. Mitochondria are capable of producing not only ATP, but also iron-sulfur clusters, steroid hormones, heme, reactive oxygen and nitrogen species, participate in thermogenesis, regulate cell death, proliferation and differentiation, participate in detoxification, etc. They are a mandatory attribute of eukaryotic cells, and so far, no eukaryotic cells performing a non-parasitic or non-symbiotic life style have been found that lack mitochondria. We believe that the structural-functional intracellular, intercellular, inter-organ and interspecific diversity of mitochondria is large enough to have grounds for creating a mitochondrial nomenclature. The arguments for this are given in this analytical work.

Keywords: mitochondria, bacteria, structure, heterogeneity, mitochondrial DNA, heteroplasm, diseases, phenotype, taxonomy

СТАРЕНИЕ ЯВЛЯЕТСЯ ПОБОЧНЫМ ЭФФЕКТОМ РЕАЛИЗАЦИИ ПРОГРАММЫ ОНТОГЕНЕЗА МНОГОКЛЕТОЧНЫХ

Обзор

© 2022 Л.В. Сальников

АнтиКА Биомед, Сан-Диего, Калифорния, США 92111; электронная почта: lsalnikov@anticabiomed.com

Поступила в редакцию 16.08.2022

После доработки 14.09.2022

Принята к публикации 14.09.2022

В обзоре представлено краткое изложение современного состояния основных теоретических подходов к проблеме старения. Приведён разбор работ авторов, придерживающихся теории «накопления ошибок» и теорий, утверждающих присутствие у всех многоклеточных гипотетической «программы старения». Анализируется роль апоптоза и его связь с феноптозом, а также теория «гиперфункции». Представлен собственный подход к этой проблеме, в котором старение объясняется перераспределением ограниченного объёма ресурсов между двумя основными задачами организма: его самообеспечением, основанном на функции группы генов «домашнего хозяйства» (HG), и функциональной специализацией, обеспечиваемой группой интегративных генов (IntG). Неразрывная связь старения с программой онтогенеза означает, что главная роль в механизмах старения отводится перераспределению ресурсов с генов самообеспечения HG на группу генов IntG, необходимую для работы всех специализированных функций организма в целом. Нарастающий с возрастом дисбаланс между HG и IntG даёт основания предполагать, что переключение клеточных ресурсов в пользу генов IntG является побочным эффектом реализации программы онтогенеза и главной причиной старения, заложенной в самой природе функционирования генома в условиях высокоинтегрированной многоклеточности. Гипотеза функционального подразделения генома также указывает на ведущую роль медленно делящихся и постмитотических клеток, как наиболее чувствительных к снижению уровня репарации, для запуска и реализации процесса старения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: старение, теории, программа онтогенеза, функциональные группы генома, гены «домашнего хозяйства», специализированные гены, метилирование.

DOI: 10.31857/S0320972522120089, **EDN:** NGNSFN

ВВЕДЕНИЕ. ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ТЕОРИЙ СТАРЕНИЯ

В настоящее время нет единой, общепринятой теории старения так же, как и общепринятого определения этого явления. Существуют две основные группы научных гипотез, объясняющих суть и причины старения многоклеточных организмов. Гипотезы первой группы объединены теорией «накопления ошибок», основанной на стохастическом подходе к этому явлению. Вторая группа объединяет гипотезы исследователей, считающих, что у всех многоклеточных существует заложенная в них

«программа старения», определённым образом связанная с индивидуальным развитием. Многие сторонники теории «накопления ошибок» склонны полагать, что основную роль в клеточных повреждениях ДНК играют разные процессы, связанные с избыточным производством свободных радикалов [1]. Тем самым признаётся изначальная неспособность клеток полностью защититься от вредных воздействий. Этот вывод следует из ряда экспериментальных данных [2]. Так, увеличение количества невосстанавливаемых повреждений клеточной ДНК в стареющих клетках по сравнению с молодыми позволяет авторам сделать вывод, что именно это является причиной старения [3].

Принятые сокращения: HG – гены «домашнего хозяйства»; IntG – гены, обеспечивающие специализированные функции и целостность организма; MI – митотический индекс.

Сторонники теории «накопления ошибок» оправданно указывают на то, что основные повреждения накапливаются в тех клетках, замена которых затруднена или невозможна. Однако просто указать на этот факт явно недостаточно для понимания происходящих в них процессов, свидетельствующих о возникающем с возрастом дефиците репаративной активности. Тот факт, что подобные изменения фиксируются в организмах после их созревания, просто указывает на связь этого явления с онтогенезом.

Вторая группа гипотез предполагает присутствие у всех многоклеточных генетической «программы старения». Такой подход обосновывается эволюционной необходимостью старения как механизма смены поколений [4, 5]. Развивая идеи Августа Вейсмана [6], В.П. Скулачёв сформулировал теорию о быстром феноптозе (сепсис, канцерогенез, инфаркт и т.д.) и медленном феноптозе (старение организма), отводя в ней важную роль механизму апоптоза [7]. Работы в области изучения роли апоптоза в стареющих клетках организма остаются актуальными и сегодня, хотя, как можно предполагать, это явление является не причиной, а следствием процессов старения в постмитотических клетках.

По нашему мнению, управление только апоптозом не может привести к значительному прорыву в области увеличения продолжительности жизни. Однако сама попытка привлечь внимание к генетическим механизмам, связанным со старением, заслуживает пристального внимания.

Поиски программы, ответственной за онтогенез, продолжаются и в настоящее время. Здесь следует отметить работы А.М. Оловникова [8], где представлена интересная гипотеза устройства программы развития многоклеточных, хотя и не имеющая пока экспериментального подтверждения. Поиски программы развития продолжаются и в области эпигенетики, где, начиная с С. Хорвата [9], продолжаются исследования процессов метилирования генома [10, 11, 12]. Признанным является и то, что эпигенетические процессы прямо отражают работу онтогенетической программы [13]. Данные по метилированию генома могут достаточно точно показывать биологический возраст, однако, являясь статистическим показателем, не имеют прямой связи с известными механизмами старения, отражая только сам факт регулирования генома в ходе онтогенеза. С эволюционной точки зрения в многоклеточных организмах постоянно совершенствуются те внутренние механизмы, которые способствуют выживанию вида, игнорируя отдель-

ного его представителя. Так, наличие мутаций может принести вред отдельной особи, но присутствие отдельного механизма их приобретения многократно повышает адаптивную пластичность вида, как было предложено в работе А.М. Оловникова [14].

Как мы увидим далее, онтогенез является программой успешного достижения зрелости, а старение – удобным с точки зрения вида побочным эффектом. Похожую точку зрения высказывает автор теории «гиперфункции» М.В. Благодосклонный [15, 16]. Развивая идею В.М. Дильмана [17] о возрастном повышении порога чувствительности гипоталамуса к регуляторному влиянию периферических гормонов, автор теории «гиперфункции» согласен с утверждением, что есть только программы развития, а не старения. Непрерывная работа такой программы неизбежно приводит к истощению ресурсов и возрастным заболеваниям [18, 19]. Таким образом, гиперфункционирование является следствием того, что у программы развития нет естественного выключателя. Следуя логике автора, необходимо предположить существование некоего постоянно действующего стимула, усиливающего работу всех генов организма, что не находит экспериментального подтверждения. Более того, согласно последним данным, уровень метаболизма, измеренный на большой группе людей разного возраста, сохраняется неизменным, что не может обеспечивать непрерывное усиление функций. Напротив, он остаётся относительно постоянным и не возрастает между 20- и 60-летним возрастом [20].

ПРОГРАММА ОНТОГЕНЕЗА И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ЧАСТИ ГЕНОМА

Имеет смысл различать сам феномен старения и его механизмы и причины, чему посвящено много статей [21, 22]. В своей работе мы придерживаемся определения самого явления «старение» как процесса, возникающего в любом биологическом объекте вследствие недостаточного восстановления повреждённых или расходуемых ресурсов, данного Гавриловыми [23]. В случае многоклеточного организма его старение обусловлено снижением ресурсов, требующимся его клеткам на репарацию и тканевую регенерацию [24, 25]. Другими словами, старение многоклеточного организма начинается в тот момент, когда его восстановление начинает быть *неполным*. Причины подобного явления хорошо объясняются с точки зрения функционального подразделения клеточного генома Metazoa, представленной в наших пу-

бликациях [26, 27]. Напомним основные принципы нашей гипотезы.

С нашей точки зрения, многоклеточный организм – это способ существования отдельной клеточной колонии, основанный на системообразующем принципе высокоспециализированной многоклеточности. В ходе индивидуального развития (онтогенез) формируется самостоятельная система нового уровня сложности. Такой коллективный клеточный симбионт, обеспечивая все специализированные функции, необходим для существования самой колонии. Мы утверждаем, что в ходе онтогенеза (отражающего филогенез, или эволюционное происхождение) любой многоклеточный организм строится на основе не всего, а только части своего генома, который и изменялся в ходе эволюции. Другая часть генома остаётся практически неизменной, постоянно обеспечивая жизнеспособность клеток. Это гены, аналогичные большинству генов у одноклеточных. Таким образом, как необходимое условие развития организма, ДНК всех его клеток содержит две *функционально независимые части*. Одной из них является наиболее консервативная часть генома, обеспечивающая внутренние нужды любой клетки, или *гены «домашнего хозяйства»* (housekeeping genes, HG).

Группа генов с таким названием была определена довольно давно, и одним из основных критериев этой группы был относительно постоянный уровень активности включаемых в неё генов [28, 29]. Другой функциональной частью клеточного генома являются гены, обеспечивающие *интегративную функцию*, или гены, ответственные за все специализированные структуры, производимые клетками в ходе дифференцировки и создающие организм как *интегрированное целое* (IntG). Развитие и созревание организма у Metazoa находится под контролем *программы онтогенеза*. Мы понимаем программу онтогенеза как строго определённую последовательность экспрессии генов IntG с присвоением им преимущества в потреблении клеточных ресурсов с целью формирования организма и достижения им своего максимума развития к моменту полового созревания. Изменение роли генов в ходе онтогенеза было выдвинуто Г. Вильямсом [30], предложившим принцип *антагонистической плейотропии*, остающийся актуальным и сегодня [31, 32].

С нашей позиции, плейотропными свойствами обладают не отдельные, приобретённые в ходе эволюции гены, а *вся их группа*, создающая организм как отдельную биологическую систему и объединённая в интегративной части

(IntG) клеточного генома. Мы рассматриваем явление плейотропности IntG-группы генов как наличие их одностороннего преимущества в экспрессии и ресурсах. Для организма свойство плейотропности создаёт ситуацию, когда роль группы IntG в геноме переходит от «необходимого симбионта» до «паразита» за счёт увеличения «системного налога» на группу генов HG со стороны IntG после достижения организмом этапа фертильности. В своих взглядах мы исходим из двух базовых утверждений: ресурсные возможности любых клеток всегда конечны; главной целью реализации программы онтогенеза является достижение максимального конкурентного преимущества к моменту достижения организмом состояния фертильности, поскольку естественный отбор направлен именно на этот этап развития Metazoa [13, 34, 35]. Преимущество, полученное в критический для продолжения рода момент и оплаченное подавлением автономного и регенеративного потенциала в будущем – это и есть плейотропия IntG.

Именно постоянный рост интеграционных функциональных издержек определяет главный механизм старения, заложенный в самой природе функционирования генома в условиях высокоинтегрированной многоклеточности. Как для отдельных клеток, так и для организма в целом существует зона функционального оптимума. Это состояние, при котором запрограммированный уровень развития сопровождается наименьшими метаболическими затратами на его поддержание. Как для отдельных клеток, так и для всего организма в целом это происходит в разное время. Организм как целостная система специализированных функций достигает своего функционального оптимума всегда позже, чем его отдельные клетки. Такое несоответствие закономерно ведёт к «выталкиванию» клеток организма из зоны оптимума, что приводит к аналогичной ситуации для организма в целом. Повторим, что здесь мы говорим о системообразующем принципе высокоспециализированной многоклеточности, на котором она построена и который определяет ход развития многоклеточного организма.

Ещё раз подчеркнём: разница в подходах между теорией «гиперфункции» и нашей теоретической моделью заключается в том, что для нас ведущую роль в процессах старения играет не прямое и непрерывное усиление функций в организме, а перераспределение ресурсов в сторону IntG-части генома, возрастающее после достижения организмом фертильности и сопровождающееся снижением репарации ниже необходимого уровня.

ПОСТМИТОТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ И ИХ РОЛЬ В ПРОЦЕССЕ СТАРЕНИЯ

В работах, посвящённых старению, очень много внимания уделяется клеткам и тканям с высоким митотическим индексом (МИ). Это свойство позволяет таким клеткам сохранять высокий *регенеративный* потенциал и делает их мишенью для экспериментов, направленных на реювенацию [12, 34–37]. С нашей точки зрения, только воздействия на эпигенетические механизмы клеток с высоким МИ явно недостаточно для достижения истинного омоложения организма. С другой стороны, основную массу организма составляют органы и ткани, составленные из постмитотических клеток и клеток с низким МИ. Существует много работ, посвящённых процессам старения в таких клетках, влиянию старых клеток на окружающие ткани и реакцию на них иммунной системы [38–42].

Самосохранение этой группы клеток основано на процессах внутриклеточной *репарации*. Именно для этих процессов баланс активности между NG и IntG играет решающую роль, позволяя организму достигать пика своего развития за счёт высокодифференцированных тканей к периоду фертильности. Сохраняемое преимущество генов IntG в потреблении ресурсов сдвигает баланс потребления в их сторону, что особенно значимо для постмитотических клеток и клеток с низким МИ. По нашему мнению, именно эта группа клеток, составляющая основу массы организма, играет ведущую роль и запускает весь каскад изменений, сопутствующих старению. Происходящее с возрастом нарастание количества старящихся клеток, имеющих дефицит репаративных возможностей, приводит к накоплению в них и в окружающей их среде цитотоксических продуктов и связанных с этим метаболических нарушений. В результате этого ткани с высоким МИ подвергаются возрастающему метаболическому давлению со стороны массы медленно делящихся и постмитотических клеток. Для активно делящихся клеток постоянно обновляющихся тканей, таких как костный мозг, эпителий кишечника и слизистых оболочек, ростковый слой кожи, такое токсическое воздействие приводит к постепенному уменьшению количества их стволовых клеток и снижению темпов регенерации. Вклад в процессы старения и негативное влияние старых клеток на организм были показаны в ряде статей [39–44].

Всё это заставляет по-новому взглянуть на те клетки, длительность существования которых сопоставима со сроком жизни организма

в целом. Становится понятным, что попытки добиться успеха в омоложении организма, основанные только на процессах регенерации, не представляются осуществимыми. Сам факт большого промежутка времени, сравнимого с продолжительностью жизни между делениями, или его отсутствие у постмитотических клеток, делает их особенно чувствительными к внутриклеточному балансу между группами генов NG и IntG, приводящему к перераспределению ресурсов клетки в пользу генов IntG. Ещё раз подчеркнём, что снижение продукции генов группы NG закономерно приводит также к снижению способности клеток к репарации, запуская в них ситуацию «неполного восстановления». Именно в этот момент запускается весь каскад процессов старения и проявляется ситуация, при которой старение становится побочным эффектом программы развития организма [45]. Такая ситуация позволяет рассматривать соотношение активности двух групп генома в таких клетках, как их «функциональные часы».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итоги обсуждения и анализа имеющихся в настоящее время теоретических подходов к явлению старения и его причин, мы можем утверждать, что истинные причины биологического старения пока остаются невыясненными. В настоящее время отмечается рост научного интереса к этой проблеме как в уже общепринятых, так и в новых направлениях. Представленная нами теоретическая модель старения может стать одним из новых направлений в изучении старения. Далее представим первые результаты, её подтверждающие, а также направление последующей работы.

Для нас основополагающим является подход, при котором мы рассматриваем не отдельные гены, а их онтогенетически обусловленные группы. Подтверждением существования таких групп служит не только различие между ними, но и динамика их метилирования с возрастом. Основанием для этого являются данные, полученные нами в недавно опубликованной нашей работе [46].

В этой статье представлен результат статистического сравнительного анализа уровня метилирования генома человека в различных возрастных группах. Результаты показали достоверные отличия между выделенными нами группами (NG и IntG) по уровню абсолютных значений метилирования, более выраженные в промоторах исследуемых групп генов в течение

всего периода наблюдения. Так, суммарный уровень метилирования в промоторах генов IntG оказался существенно выше его уровня в группе НГ с достоверностью $p < 0,0001$. Уровень метилирования тел генов показал такие же результаты, но с несколько меньшей разницей. Также показана динамика достоверного снижения уровня метилирования как промоторов, так и тел генов в функциональной группе генов IntG после достижения возраста полового созревания. В группе генов НГ этот уровень оставался постоянным. Нарастающий дисбаланс между НГ и IntG по уровням метилирования даёт основания предполагать, что этот сдвиг в группе генов IntG отражает побочный эффект реализации программы онтогенеза.

Учитывая, что уровень метилирования различных генов является статистическим показателем, не имеющим прямой связи с известными механизмами старения, он в достаточной мере отражает сам факт регулирования генома в ходе онтогенеза.

Возможность получения прямых данных по активности продукции генов предоставляет математический, в том числе кластерный анализ «больших данных» по секвенированию целостного генома. Именно в этом направлении проводится наша работа в настоящее время. По уже имеющимся результатам анализа можно утверждать, что выделенные нами функциональные группы генома статистически достоверно отличаются как по уровню продукции мРНК, так и по своей возрастной динамике.

Это позволяет подтвердить вывод, что *все гены, обеспечивающие специализированные функции организма, являются эволюционно позднейшими приобретениями для клеток и объединены общими свойствами*. Именно это позволяет направить дальнейшие исследования на поиск тех особенностей в выделенных нами функциональных группах генов, которые обеспечивают их различное поведение в ходе онтогенеза. Эти различия, или «печать эволюции», вероятнее всего, будут содержаться в эволюционно более молодой группе специализированных генов IntG. Определение таких особенностей позволит понять механизмы и варианты взаимоотношений между НГ- и IntG-группами генов.

В заключение ещё раз отметим, что снижение уровня как репаративных, так и регенеративных возможностей, обусловленное нарастающим дисбалансом между НГ и IntG и происходящее у всех многоклеточных с течением времени, является *не только побочным эффектом реализации программы онтогенеза, но и самой причиной старения*.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность А.М. Оловникову за приглашение к участию в сборнике и советы по написанию этого обзора.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Da Silva, P. F. L., and Schumacher, B. (2019) DNA damage responses in ageing, *Open Biol.*, **9**, 190168, doi: 10.1098/rsob.190168.
2. Bae, T., Fasching, L., Wang, Y., Shin, J. H., Suvakov, M., et al. (2022) Analysis of somatic mutations in 131 human brains reveals aging-associated hypermutability, *Science*, **7**, 511-517, doi: 10.1126/science.abm6222.
3. Anisimova, A. S., Alexandrov, A. I., Makarova, N. E., Gladyshev, V. N., and Dmitriev, S. E. (2018) Protein synthesis and quality control in aging, *Aging (Albany NY)*, **12**, 4269-4288, doi: 10.18632/aging.101721.
4. Kirkwood, T. B. L., and Holliday, R. (1979) The evolution of ageing and longevity, *Proc. R. Soc. London Ser. B Biol. Sci.*, **205**, 531-546, doi: 10.1098/rspb.1979.0083.
5. Kirkwood, T. B. L., and Austad, S. N. (2000) Why do we age? *Nature*, **408**, 233-238, doi: 10.1038/35041682.
6. Weissman, A. (1891) *Essays Upon Heredity and Kindred Biological Problems*, 2nd Edn., Clarendon Press, Oxford, UK.
7. Skulachev, V. P. (2019) Phenoptosis as a phenomenon widespread among many groups of living organisms including mammals (Commentary to the Paper by E. R. Galimov, J. N. Lohr, and D. Gems. (2019) *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1433-1437), *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1438-1441, doi: 10.1134/S0006297919120022.
8. Olovnikov, A. M. (2018) Chronographic theory of development, aging, and origin of cancer: role of chromeres and printomeres, *Curr. Aging Sci.*, **8**, 76-88, doi: 10.2174/1874609808666150422114916.
9. Horvath, S., and Raj, K. (2018) DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing, *Nat. Rev. Genet.*, **19**, 371-384, doi: 10.1038/s41576-018-0004-3.

10. Lu, A. T., Fei, Z., Haghani, A., Robeck, T. R., Zoller, J. A., et al. (2021) Universal DNA methylation age across mammalian issues, *bioRxiv*, 2021.01.18.426733, doi: 10.1101/2021.01.18.426733.
11. Porter, H. L., Brown, C. A., Roopnarinesingh, X., Giles, C. B., Georgescu, C., et al. (2021) Many chronological aging clocks can be found throughout the epigenome: Implications for quantifying biological aging, *Aging Cell*, **11**, e13492, doi: 10.1111/accel.13492.
12. Zhang, W., Qu, J., Liu, G. H., and Belmonte, J. C. I. (2020) The ageing epigenome and its rejuvenation, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **21**, 137-150, doi: 10.1038/s41580-019-0204-5.
13. Larocca, D., Lee, J., West, M. D., Labat, I., and Sternberg, H. (2021) No time to age: uncoupling aging from chronological time, *Genes (Basel)*, **12**, 611, doi: 10.3390/genes12050611.
14. Olovnikov, A. M. (2022) Eco-crossover, or environmentally regulated crossing-over, and natural selection are two irreplaceable drivers of adaptive evolution: Eco-crossover hypothesis, *BioSystems*, **5**, 104706, doi: 10.1016/j.biosystems.2022.104706.
15. Blagosklonny, M. V. (2007) Paradoxes of aging, *Cell Cycle*, **15**, 2997-3003, doi: 10.4161/cc.6.24.5124.
16. Blagosklonny, M. V. (2007) Program-like aging and mitochondria: instead of random damage by free radicals, *J. Cell Biochem.*, **15**, 1389-1399, doi: 10.1002/jcb.21602.
17. Dilman, V. M., and Ward, D. (1992) *The Neuroendocrine Theory of Aging and Degenerative Disease*, Center for Bio Gerontology.
18. Gems, D. (2022) The hyperfunction theory: an emerging paradigm for the biology of aging, *Ageing Res. Rev.*, **74**, 101557, doi: 10.1016/j.arr.2021.101557.
19. Blagosklonny, M. V. (2021) Response to the thought-provoking critique of hyperfunction theory by Aubrey de Grey, *Rejuvenation Res.*, **24**, 170-172, doi: 10.1089/rej.2021.0018.
20. Rhoads, T. W., and Anderson, R. M. (2021) Taking the long view on metabolism, *Science*, **373**, 738-739, doi: 10.1126/science.abl4537.
21. Bartke, A. (2021) New directions in research on aging, *Stem Cell Rev. Rep.*, **11**, 1-7, doi: 10.1007/s12015-021-10305-9.
22. Bilinski, T., Bylak, A., Kukuła, K., and Zadrag-Tecza, R. (2021) Senescence as a trade-off between successful land colonisation and longevity: critical review and analysis of a hypothesis, *PeerJ*, **9**, e12286, doi: 10.7717/peerj.12286.
23. Gavrilov, L. A., and Gavrilova, N. S. (2001) The reliability theory of aging and longevity, *J. Theor Biol.*, **213**, 527-545, doi: 10.1006/jtbi.2001.2430.
24. Ferreira, M., Francisco, S., Soares, A. R., Nobre, A., Pinheiro, M., et al. (2021) Integration of segmented regression analysis with weighted gene correlation network analysis identifies genes whose expression is remodeled throughout physiological aging in mouse tissues, *Aging (Albany NY)*, **29**, 18150-18190, doi: 10.18632/aging.203379.
25. Lagunas-Rangel, F. A., and Bermúdez-Cruz, R. M. (2019) The role of DNA repair in cellular aging process, in advances in DNA repair, *IntechOpen*, doi: 10.5772/intechopen.84628.
26. Salnikov, L., and Baramiya, M. G. (2020) The ratio of the genome two Functional parts activity as the prime cause of aging, *Front. Aging*, **1**, 608076, doi: 10.3389/fragi.2020.608076.
27. Salnikov, L., and Baramiya, M. G. (2021) From autonomy to integration, from integration to dynamically balanced integrated co-existence: non-aging as the third stage of development, *Front. Aging*, **2**, 655315, doi: 10.3389/fragi.2021.655315.
28. Eisenberg, E., and Levanon, E. Y. (2013) Human housekeeping genes, revisited, *Trends Genet.*, **10**, 569-574, doi: 10.1016/j.tig.2013.05.010.
29. Hounkpe, B. W., Chenou, F., De Lima, F., and De Paula, E. V. (2021) HRT Atlas v1.0 database: redefining human and mouse housekeeping genes and candidate reference transcripts by mining massive RNA-seq datasets, *Nucleic Acids Res.*, **8**, D947-D955, doi: 10.1093/nar/gkaa609.
30. Williams, G. C. (1957) Pleiotropy, natural selection and the evolution of senescence, *Evolution*, **11**, 398-411, doi: 10.2307/2406060.
31. Vijayakumar, K. A., and Cho, G. W. (2022) Pan-tissue methylation aging clock: Recalibrated and a method to analyze and interpret the selected features, *Mech. Ageing Dev.*, **204**, 111676, doi: 10.1016/j.mad.2022.111676.
32. Frankel, S., and Rogina, B. (2021) Evolution, chance, and aging, *Front. Genet.*, **9**, 733184, doi: 10.3389/fgene.2021.733184.
33. Curtsinger, J. W. (2016) Retired flies, hidden plateaus, and the evolution of senescence in *Drosophila melanogaster*, *Evolution*, **70**, 1297-1306, doi: 10.1111/evo.12946.
34. Gems, D., Kern, C. C., Nour, J., and Ezcurra, M. (2021) Reproductive suicide: similar mechanisms of aging in *C. elegans* and pacific salmon, *Front. Cell Dev. Biol.*, **9**, 688788, doi: 10.3389/fcell.2021.688788.
35. Lehmann, M., Canatelli-Mallat, M., Chiavellini, P., Cónsole, G. M., Gallardo, M. D., et al. (2019) Partial reprogramming as an emerging strategy for safe induced cell generation and rejuvenation, *Curr. Gene Ther.*, **9**, 248-254, doi: 10.2174/1566523219666190902154511.
36. Olova, N., Simpson, D. J., Marioni, R. E., and Chandra, T. (2019) Partial reprogramming induces a steady decline in epigenetic age before loss of somatic identity, *Aging Cell*, **18**, doi: 10.1111/accel.12877.
37. Lapasset, L., Milhavet, O., Prieur, A., Besnard, E., Babled, A., et al. (2011) Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state, *Genes Dev.*, **1**, 2248-2253, doi: 10.1101/gad.173922.111.

38. Voutetakis, K., Chatziioannou, A., Gonos, E. S., and Trougakos, I. P. (2015) Comparative meta-analysis of transcriptomics data during cellular senescence and *in vivo* tissue ageing, *Oxid. Med. Cell Longev.*, **2015**, 732914, doi: 10.1155/2015/732914.
39. Van Deursen, J. M. (2014) The role of senescent cells in ageing, *Nature*, **22**, 439-446, doi: 10.1038/nature13193.
40. Childs, B. G., Gluscevic, M., Baker, D. J., Laberge, R. M., Marquess, D., et al. (2017) Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **10**, 718-735, doi: 10.1038/nrd.2017.116.
41. Mylonas, A., and O’Loughlen, A. (2022) Cellular senescence and ageing: mechanisms and interventions, *Front. Aging*, **3**, 866718, doi: 10.3389/fragi.2022.866718.
42. Baramiya, M. G., Baranov, E., Saburina, I., and Salnikov, L. (2020) From cancer to rejuvenation: incomplete regeneration as the missing link (part II: rejuvenation circle), *Future Sci. OA*, **6**, FSO610, doi: 10.2144/foa-2020-0085.
43. Amorim, J.A., Coppotelli, G., Rolo, A. P., Palmeira, C. M., Ross, J. M., et al. (2022) Mitochondrial and metabolic dysfunction in ageing and age-related diseases, *Nat. Rev. Endocrinol.*, **18**, 243-258, doi: 10.1038/s41574-021-00626-7.
44. Reinhardt, H. C., and Schumacher, B. (2012) The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer, *Trends Genet.*, **3**, 128-136, doi: 10.1016/j.tig.2011.12.002.
45. De Magalhães, J. P., and Church, G. M. (2005) Genomes optimize reproduction: aging as a consequence of the developmental program, *Physiology (Bethesda)*, **20**, 252-259, doi: 10.1152/physiol.00010.2005.
46. Salnikov, L., Goldberg, S., Sukumaran, P., and Pinsky, E. (2022) DNA methylation meta-analysis confirms the division of the genome into two functional groups, *J. Cell Sci. Ther.*, **13**, 352.

AGING IS A SIDE EFFECT OF THE ONTOGENESIS PROGRAM OF MULTICELLULAR ORGANISMS

Review

L. Salnikov

AntiCA Biomed San Diego, CA 92111 USA; e-mail: lsalnikov@anticabiomed.com

The review presents a brief outline of the current state of the main theoretical approaches to the aging problem. The works of authors supporting the theory of “accumulation of errors” and theories stating the presence of a hypothetical “aging program” in all multicellular organisms are reviewed. The role of apoptosis and its connection with phenoptosis as well as the theory of “hyperfunction” are analyzed. Our own approach to this problem is presented, in which aging is explained by redistribution of limited resources between two main aims of the organism: its self-sufficiency, based on the function of housekeeping gene (HG) group, and functional specialization, provided by integrative gene group (IntG). Agreeing with the inseparable connection between aging and the ontogenesis program, the main role in the aging mechanisms is assigned to a redistribution of resources from HG self-sufficiency genes to the IntG group of genes necessary for operation of all specialized functions of the organism as a whole. The growing imbalance between HG and IntG with age suggests that switching of cellular resources in favor of IntG genes is a side effect of ontogenesis program implementation and the main reason for aging inherent in the nature of genome functioning under conditions of highly integrated multicellularity. The hypothesis of functional subdivision of the genome also points to the leading role of slow dividing and postmitotic cells, as the most sensitive to reduction of repair levels, for triggering and realization of the aging process.

Keywords: aging, theories, ontogenesis program, functional genome groups, housekeeping genes, specialized genes, methylation

РОЛЬ МЁРТВЫХ КЛЕТОК В КОЛЛЕКТИВНОЙ УСТОЙЧИВОСТИ К СТРЕССУ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ НА ПРИМЕРЕ ДРОЖЖЕЙ

Обзор

© 2022 Н.А. Киреева^{1,2#}, К.В. Галкина^{1#}, С.С. Соколов¹, Д.А. Кнорре^{1*}

¹ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119992 Москва, Россия; электронная почта: knorre@belozersky.msu.ru

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119234 Москва, Россия

Поступила в редакцию 03.10.2022

После доработки 08.11.2022

Принята к публикации 08.11.2022

Дрожжи большую часть своего жизненного цикла находятся в окружении генетически идентичных клеток – своих собственных клонов. При этом приспособленность дрожжевой клетки – например, к стрессовым условиям – зависит не только от неё самой, но и от других клеток микробного сообщества. Даже если клетка теряет способность к пролиферации, она всё ещё способна защищать оставшиеся в живых клетки. Мёртвые клетки могут абсорбировать липофильные антибиотики и представлять соседним родственным клеткам питательные вещества. Более того, некоторые ферменты мёртвых клеток могут высвобождаться в окружающую среду и способствовать обезвреживанию экзогенных токсинов. Например, каталаза, разлагающая пероксид водорода, может долго оставаться активной вне клетки. Кроме того, мёртвые клетки патогенных видов дрожжей могут подавлять иммунный ответ организма-хозяина и таким образом увеличивать шансы на выживание остальных клеток в этом организме. В этом обзоре мы предполагаем, что биохимические процессы в умирающих клетках могут увеличивать устойчивость к стрессу живых родственных клеток и, таким образом, находиться под действием естественного отбора. Мы рассматриваем возможные сценарии того, как мёртвые микробные клетки могут способствовать выживанию своих сородичей, на примере одноклеточных грибов – пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. В результате мы приходим к выводу, что эволюционно консервативные механизмы программируемой клеточной смерти у дрожжей, вероятно, включают раннюю пермеабиллизацию плазматической мембраны клетки, а не предполагают сохранение её целостности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: программируемая клеточная смерть, функциональная дифференциация, устойчивость к стрессу, межклеточная коммуникация, дрожжи.

DOI: 10.31857/S0320972522120090, **EDN:** NGREEQ

ВВЕДЕНИЕ

Живое многоклеточное животное обычно легко отличить от мёртвого. В случае же одноклеточных микроорганизмов (например, бактерий или дрожжей) это получается сделать далеко не всегда: в некоторых случаях оказывается сложно предсказать, сможет ли клетка

возобновить деление или уже потеряла свою жизнеспособность. В то же время жизнеспособность микроорганизмов является важным фактором в биотехнологических процессах и при тестировании противомикробных препаратов. Жизнеспособность микроорганизмов оценивают методом клоногенного анализа или с помощью красителей, которые накапливаются либо только в мёртвых, либо только в живых клетках [1]. Оба подхода имеют свои ограничения. В случае клоногенного анализа способность одноклеточных микроорганизмов к пролиферации может зависеть от специфических соединений, например, хелатирующей

Принятые сокращения: ПКС – программируемая клеточная смерть; ПМ – плазматическая мембрана; РКС – регулируемая клеточная смерть; PI – пропидий йодид.

* Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равный вклад в работу.

железо молекулы – сидерофора [2]. Таким образом, отрицательные результаты (колонии не образуются) могут быть ошибочно интерпретированы: живая клетка не будет образовывать колонии на чашках с богатой средой и агаром, в котором не оказалось необходимого ей соединения. Красители также имеют свои недостатки. Например, пропидий йодид (PI) считается специфическим красителем мёртвых клеток, но в определённых условиях он может накапливаться в живых клетках с нарушенным метаболизмом [3, 4]. Более того, подвергнутые стрессу клетки иногда начинают накапливать в цитоплазме PI лишь через несколько часов после воздействия стресса, а до этого оставаться PI-неокрашенными [5]. Это может объяснить несоответствие оценок жизнеспособности с использованием клоногенного анализа и окрашивания PI [6]. Эти примеры позволяют предположить, что микроорганизмы могут длительное время находиться в промежуточных состояниях между жизнью и смертью, когда метаболически активная клетка неспособна к дальнейшей пролиферации.

Последовательность событий в умирающей микробной клетке может регулироваться генетически. Процессы, протекающие в критически повреждённых клетках дрожжей, могут быть изменены, если в этих клетках заранее были нокаутированы «связанные со смертью» гены [5]. Этот феномен обычно называют регулируемой клеточной смертью (РКС). У дрожжей РКС может быть вызвана такими стрессами, как закисление цитоплазмы [7], тепловой шок [8], окислительный стресс и противогрибковые препараты [9]. Подробнее с информацией об индукторах РКС можно ознакомиться в недавно опубликованном обзоре Grosfeld et al. [10]. В сообществе бактерий РКС может быть адаптивным механизмом, при котором часть клеток жертвует собой ради увеличения шансов на выживание остальной части сообщества. К примеру, в условиях стресса некоторые клетки *Bacillus subtilis* формируют покоящиеся споры, в то время как остальные лизируются и становятся источником питательных веществ [11, 12]. Вопрос о том, может ли смерть микроорганизма быть запрограммированной (то есть быть вызвана слабым сигналом и усилена собственными системами клетки), до сих пор является предметом дискуссии [13]. Стратегии выживания, основанные на альтруистической программируемой смерти отдельных индивидуумов, уязвимы к «нахлебникам», которые часто появляются в сообществах клеток: например, описаны случаи «нахлебничества» в штаммах социальных

амёб [14] и у дрожжей [15]. Однако многоклеточные микробные сообщества обычно состоят из генетически идентичных клеток, находящихся пространственно в непосредственной близости друг от друга. Пространственная близость родственных клеток сокращает риск пожертвовать собой в пользу генетически чужеродных клеток и делает возможной эволюцию механизмов альтруистической кооперации [16].

Процессы, протекающие в умирающих клетках микроорганизмов, могут быть важны для выживания микробного сообщества. Роль этих процессов может быть велика, если сообщество оказалось в условиях стресса, способного убить большую часть клеток из этого сообщества. В своём обзоре мы обсуждаем биохимические процессы в микробных клетках, которые не способны к дальнейшей пролиферации. Мы рассматриваем ситуации, в которых мёртвые клетки дрожжей могут увеличивать или снижать выживание соседних клеток; для сравнения мы также приводим примеры, иллюстрирующие взаимодействие живых и мёртвых бактерий.

МИКРОБНЫЕ ПОПУЛЯЦИИ ФЕНОТИПИЧЕСКИ ГЕТЕРОГЕННЫ ПО УСТОЙЧИВОСТИ К СТРЕССУ

Популяция одноклеточных организмов, потомков одной клетки, может включать несколько групп клеток (субпопуляций), существенно различающихся по своему фенотипу. Так, например, в стационарной фазе культура *Saccharomyces cerevisiae* может дифференцироваться на две субпопуляции: покоящиеся и активно пролиферирующие клетки [17]. Межклеточная гетерогенность возникает из-за стохастических процессов при активации генов, цикличности процессов, протекающих в клетках, или из-за асимметричного деления клеток [18, 19]. В агрегатах дрожжевых клеток каждая клетка оказывается в уникальном микроокружении, это также может вызывать дифференцировку клеток [20, 21]. В колониях *S. cerevisiae*, например, споруляция осуществляется только в отдельных узких слоях колонии [22]. Более того, формирование колоний дрожжей сопровождается гибелью части клеток, расположенных в глубине колонии. Эта функциональная дифференцировка, приводящая к гибели клеток, регулируется аммонием и транскрипционным фактором Sok2p. Делеция гена *SOK2* меняет распределение мёртвых клеток по колонии: мёртвые клетки появляются не только в центре, но и на периферии колонии. Это снижает эффективность утилизации суб-

страта и приводит к снижению конечного размера колонии [23].

Дифференцировка микробных клеток может быть стратегией диверсификации рисков, обеспечивающей высокую скорость пролиферации одних клеток и повышенную устойчивость к стрессу других [24]. В случае стрессов умеренной силы микроорганизмы будут неизбежно окружены своими погибшими «родственниками», что может играть решающую роль в их дальнейшей судьбе. В рамках эксперимента можно изучать, как добавление мёртвых клеток влияет на физиологию и устойчивость микроорганизмов к стрессу. Такие эксперименты обсуждаются нами далее.

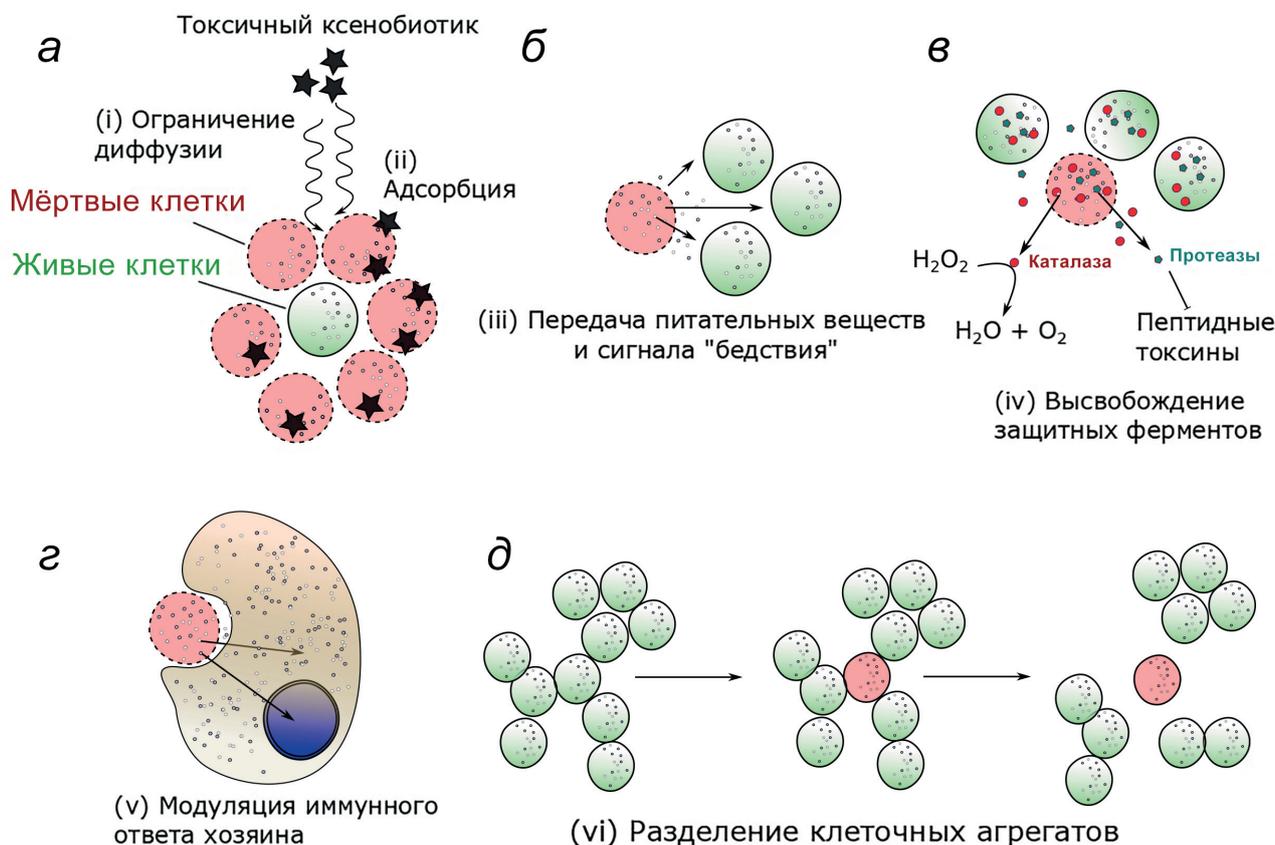
ОГРАНИЧЕННАЯ ДИФFUЗИЯ И АБСОРБЦИЯ КСЕНОБИОТИКОВ

Клетки верхних слоёв колонии дрожжей подвергаются воздействию внешней среды и, таким образом, взаимодействуют с токсичными веществами раньше, чем клетки, расположенные в толще колонии. К примеру, этанол и антимикотик амфотерицин В (АмВ) убивают клетки внешних слоёв колоний, не затрагивая клеток внутренних слоёв [25]. По всей види-

мости, это связано с тем, что мёртвые клетки верхнего слоя предотвращают проникновение этих вредных соединений во внутренние слои колонии (рисунок, а). Поэтому способность дрожжевых клеток собираться в агрегаты повышает их устойчивость к АмВ в разы [25].

Клетки дрожжей и фрагменты клеточных стенок часто используются в качестве адсорбентов микотоксинов в сельском хозяйстве [26]. К примеру, убитые тепловым шоком дрожжевые клетки способны удалять высококанцерогенный афлатоксин М1 из молочных продуктов [27] и адсорбировать охратоксин А из натуральных виноградных соков [28]. Клеточные стенки дрожжей также уменьшают абсорбцию микотоксинов у крыс [29]. Было показано, что мёртвые клетки дрожжей снижают интенсивность воздействия токсинов дрожжевых вирусов, хотя и в меньшей степени, чем это делают живые клетки [30]. Также была показана абсорбция вирусного токсина К28 интактными дрожжевыми клетками и препаратами клеточных стенок [31].

Мы недавно показали, что мёртвые клетки дрожжей *S. cerevisiae* абсорбируют намного больше АмВ и других полиеновых макролидов, чем способны живые клетки. В соответствии с этим добавление мёртвых клеток дрожжей к



Возможная роль мёртвых клеток в защите соседних клеток (см. объяснения в тексте)

живым клеткам защищало последние от воздействия макролидных антимикотиков [32]. Данный эффект был связан с тем, что гибель клеток сопряжена с пермеабиллизацией плазматической мембраны (ПМ). Это делает возможной адсорбцию полиеновых макролидов на поверхности мембран внутренних клеточных компартментов и, таким образом, увеличивает абсорбционную способность мёртвых клеток. Эти эксперименты показывают, что мёртвые клетки дрожжей могут служить адсорбентом токсичных соединений, в то время как пермеабиллизация ПМ повышает абсорбционную способность.

МЁРТВЫЕ КЛЕТКИ МОГУТ ПРЕДОСТАВЛЯТЬ ПИТАТЕЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА И ЗАЩИТНЫЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ФЕРМЕНТЫ СОСЕДНИМ КЛЕТКАМ

Мёртвые клетки могут не только абсорбировать вредные вещества, но и высвобождать собственное содержимое в среду, снабжая питательными веществами соседние клетки (рисунок, б). К примеру, после достижения стационарной фазы в жидкой синтетической среде большая часть клеток культуры дрожжей умирает в течение нескольких дней. За счёт этого выжившие клетки получают возможность пролиферировать, используя питательные вещества, высвобождаемые из мёртвых клеток [33]. Другим примером является споруляция: ограниченная доступность питательных веществ индуцирует мейоз и образование аскоспор. В нормальных условиях клетки *S. cerevisiae* формируют аски с четырьмя спорами. Однако если при споруляции в среде наблюдается недостаточное содержание источника углерода, в аске формируется только одна или две споры, в то время как остальные лизируются [34]. Мы предполагаем, что материал погибающих спор может использоваться выжившими спорами. Следует заметить, что питательные вещества из отмирающих клеток остаются внутри мёртвых диплоидных материнских клеток, таким образом, эти вещества оказываются доступны преимущественно для выживших спор, а не для чужеродных микроорганизмов.

Пермеабиллизация плазматической мембраны делает возможным высвобождение из клетки не только низкомолекулярных соединений, например, аминокислот и нуклеотидов, но и макромолекул, таких как ДНК и белки. Поскольку большинство ферментов имеют узкий оптимум активности (например, pH) или

являются АТР-зависимыми, то обычно они становятся неактивными за пределами клетки. Однако некоторые ферменты сохраняют свою активность вне клетки в течение длительного периода времени. Например, из лабораторной практики хорошо известно, что лизированные дрожжевые клетки высвобождают протеазы и нуклеазы, способные расщеплять внеклеточные белки и нуклеиновые кислоты. Это затрудняет очистку интактных белков и нуклеиновых кислот. Чтобы противодействовать этому, в среду выделения добавляют ингибиторы протеазы или сильные детергенты. Внеклеточная протеазная активность также является проблемой в биотехнологических процессах с использованием культур дрожжей высокой плотности, нацеленных на производство белков. Для её предотвращения используют штаммы с пониженной активностью протеаз или добавляют в среду избыток аминокислот, которые часто выступают как ингибитор протеолитической активности [35]. Протеазы из мёртвых клеток могут ингибировать пептидные токсины и, таким образом, играть защитную роль в естественных сообществах дрожжей (рисунок, в) [36]. Например, кондиционированная среда, оставшаяся от инкубации штамма *Saccharomyces boulardii*, проявляет протеолитическую активность, ингибирующую действие пептидных токсинов *Clostridium difficile* A и B [37]. Однако мёртвые клетки теоретически могут оказывать и неблагоприятное действие на соседние клетки, разрушая или ингибируя их антитоксины. Так, мёртвые клетки могут выделять пептиды, продукты частичного протеолиза белков, которые могут конкурентно ингибировать антиксининовые протеазы. Роль мёртвых дрожжевых клеток в защите от пептидных токсинов изучена пока недостаточно хорошо.

Ещё одним примером белка, который обычно локализован в клетке, но сохраняет активность в широком диапазоне условий, является антиоксидантный фермент каталаза. Перекись водорода – распространённое защитное соединение, у многоклеточных животных она вырабатывается иммунными клетками [38]. Чтобы защититься от перекиси водорода, патогенные микроорганизмы выработали надёжную антиоксидантную защиту. Например, распространённые условно-патогенные микроорганизмы *Candida glabrata* и *Candida albicans* могут выдерживать гораздо более высокие концентрации перекиси водорода, чем *S. cerevisiae*. Их высокая устойчивость обусловлена высокой экспрессией гена каталазы *CTA1* [39]. Важно отметить, что в отличие от многих других ферментов, каталаза не зависит от АТР и

активна в широком диапазоне рН [40]. Следовательно, каталаза может вносить вклад в коллективную защиту микробного сообщества от окислительного стресса, даже если клетка мертва и целостность её ПМ нарушена (рисунок, в).

МЕЖКЛЕТОЧНАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ С УЧАСТИЕМ МЁРТВЫХ КЛЕТОК

Ещё одним возможным вкладом мёртвых клеток в выживание оставшихся является быстрая передача сигнала «бедствия» от умирающих клеток живым. Подобная межклеточная коммуникация («некросигнализация», necro-signaling) обнаружена у бактерий. Мёртвые клетки *E. coli* выделяют белок AscA – фрагмент периплазматического компонента откачивающей помпы с широкой субстратной специфичностью. AscA взаимодействует с живыми клетками бактерий и вызывает экспрессию генов ответа на стресс, тем самым сильно повышая их устойчивость к антибиотикам [41]. В другом исследовании добавление клеток, убитых ультразвуком, подавляло рост культуры *E. coli* в богатой среде и ингибировало экспрессию более трёхсот генов [42]. Ингибирование роста, вызванное мёртвыми клетками, может быть адаптивной реакцией, поскольку медленный рост способствует накоплению белков стрессового ответа (рисунок, б).

Для дрожжей, насколько нам известно, сигнальный каскад, индуцируемый мёртвыми клетками, пока показан не был. Однако необходимо упомянуть, что лизат дрожжевых клеток присутствует в стандартной богатой среде – YPD (yeast extract peptone dextrose medium, глюкозо-пептонно-дрожжевая среда) [43], и это может скрывать сигналы, исходящие от мёртвых клеток. К примеру, клетки дрожжей, выращенные в богатой питательной среде, содержащей дрожжевой экстракт, более устойчивы к противогрибковым препаратам, чем клетки, выращенные на синтетической среде, в которую не добавляется дрожжевой экстракт [44]. В то же время лекарственная устойчивость клеток дрожжей, выращенных в богатой среде, может быть объяснена другими факторами: например, различными липидными профилями у дрожжей, выращенных на богатых средах, и у дрожжей, выращенных на полных синтетических средах (CSM, complete synthetic media) [45]. Более того, поскольку клетки, выращенные на CSM, растут медленнее, чем клетки, выращенные на YPD, они могут оказаться более устойчивыми к некоторым другим противогрибковым препаратам [46].

Патогенные виды дрожжей могут взаимодействовать не только друг с другом, но с иммунными клетками хозяина [47]. Например, клетки *S. albicans* могут вызывать у макрофагов одну из форм программируемой клеточной смерти (ПКС) – пироптоз и, таким образом, не быть уничтоженными ими [48]. Мёртвые дрожжевые клетки также способны модулировать иммунный ответ хозяина (рисунок, г). Так, было показано, что убитые тепловым шоком клетки *S. albicans* стимулируют секрецию фактора некроза опухоли альфа (TNF-альфа) мононуклеарными клетками крови в большей степени, чем живые клетки [49]. В другой работе, напротив, было обнаружено, что мёртвые споры гриба *Aspergillus fumigatus* слабее активировали клеточный иммунный ответ, чем живые споры [50].

ВЫСВОБОЖДЕНИЕ ВИРУЛЕНТНЫХ ФАКТОРОВ

ПКС многоклеточных животных и растений защищает хозяина, предотвращая распространение вирусов на соседние клетки. В ответ на это многие вирусы в ходе эволюции приобрели механизмы подавления ПКС клеток хозяина [51]. Несмотря на то что лизис хозяйской клетки является необходимой стадией жизненного цикла бактериофагов [52], преждевременная ПКС предотвращает распространение вируса в бактериальной популяции, поскольку в этом случае бактериальные клетки лизируются до того, как произойдёт сборка функционально активных фагов [53]. Дрожжевые клетки также могут быть носителями вирусов. Например, двуцепочечные РНК-вирусы семейства Totiviridae придают клеткам *S. cerevisiae* киллерный фенотип – способность вызывать гибель соседствующих клеток [54]. У пекарских дрожжей хорошо изучены три вирусных токсина – K1, K2 и K28. Токсины K1 и K2 нарушают целостность мембраны, в то время как K28 блокирует клеточный цикл [55]. Примечательно, что нет никакого доказательства внеклеточной передачи двуцепочечных РНК-вирусов дрожжей. Это говорит о том, что они сильно зависят от благополучия своих дрожжевых клеток-хозяев [56]. Было показано, что киллерные токсины могут индуцировать клеточную смерть [57]. Однако поскольку вирусы могут передаваться другим клеткам только во время спаривания, остаётся неясным, в каких условиях механизм индуцированной киллерным токсином клеточной смерти может быть полезен. Насколько нам известно, в настоящее время нет данных о

том, что регулируемый лизис дрожжевых клеток как-то препятствует или способствует распространению вирусов в популяции.

РАЗДЕЛЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ АГРЕГАТОВ

Существует ещё один необычный случай, при котором клеточная смерть дрожжей способствует пролиферации дрожжевых клеток в суспензионной культуре. В эволюционном эксперименте Ratcliff et al. [58] штамм *S. cerevisiae*, образующий флоккулы, со временем увеличивал частоту спонтанной гибели клеток. При этом смерть отдельных клеток помогала клеточным кластерам отделиться от более крупных клеточных агрегатов (рисунок, д). Это позволило эволюционировавшей линии со спонтанной гибелью отдельных клеток иметь большую скорость набора биомассы по сравнению с исходной линией [58]. Следует отметить, что отделение кластера клеток от больших клеточных агрегатов дрожжей возможно не только за счёт гибели клетки, удерживающей этот кластер в агрегате, но и за счёт активации ферментов ремоделирования клеточной стенки. Тем не менее многие виды дрожжей способны формировать сложные многоклеточные структуры и колонии со сложной морфологией [20], и мы полагаем, что мёртвые клетки могли бы предоставлять питательные вещества растущему краю колонии и способствовать лучшей аэрации внутренних слоёв колоний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выше мы обсудили, как мёртвые клетки дрожжей могут способствовать поддержанию живых клеток. Мёртвые клетки могут абсорбировать токсины (i-ii), высвободить питательные вещества (iii) и “общественно полезные” белки (iv) и влиять на иммунный ответ (v). Наконец, клеточная смерть способствует фрагментации многоклеточных агрегатов, что может быть полезно для распространения в определённых условиях (vi). Рисунок резюмирует все эти сценарии. При этом некоторые из представленных сценариев довольно спекулятивны (например, высвобождение каталазы), другие — имеют экспериментальные подтверждения (например, абсорбция макролидов).

Важным фактором в роли мёртвых клеток может быть способ их клеточной смерти и то, что произошло с клеткой до того, как она потеряла свою жизнеспособность. Например, супернатанты, полученные из клеток одно-

клеточной зелёной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*, убитых мягким тепловым шоком при 50 °С, усиливают рост суспензионной культуры этих водорослей. Важно отметить, что в этом случае для развития гибели клеток потребовалось 18 ч. Между тем супернатант клеток водорослей, убитых ультразвуком, ингибировал рост суспензионной культуры [59].

Влияние мёртвых клеток на живые может зависеть от проницаемости их ПМ. У многоклеточных животных запрограммированная гибель клеток играет важную роль в поддержании тканевого гомеостаза и предотвращении неоплазии. В этих случаях клетки обычно сохраняют целостность своей ПМ, чтобы предотвратить выброс провоспалительных факторов в межклеточную жидкость [60]. Однако при некоторых типах гибели клеток, например, при пироптозе, их плазматическая мембрана проницаема на ранних стадиях ПКС [61]. Рассматривая адаптивную роль гибели клеток у дрожжей, в большинстве обсуждавшихся выше сценариев мы не находим очевидной причины для сохранения целостности их плазматической мембраны. Возможно, единственным исключением может быть регуляция иммунного ответа организма хозяина патогенными дрожжами. Напротив, быстрое разрушение плазматической мембраны усиливает абсорбцию токсинов, а также высвобождение питательных веществ и защитных ферментов. Таким образом, мы предполагаем, что, в отличие от многоклеточных животных, эволюционно консервативные механизмы запрограммированной гибели клеток у дрожжей должны включать раннюю пермеабиллизацию плазматической мембраны дрожжей.

Вклад авторов. Все авторы участвовали в написании и обсуждении рукописи. Н.К. и Д.К. подготовили исходный текст. К.Г. написала абзацы о передаче сигналов мёртвыми клетками. Д.К. подготовил иллюстрацию. Все авторы отредактировали текст и утвердили окончательный вариант рукописи.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского государственного университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетической биологии».

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00406, для К.Г.).

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kwolek-Mirek, M., and Zadrag-Tecza, R. (2014) Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells, *FEMS Yeast Res.*, **14**, 1068-1079, doi: 10.1111/1567-1364.12202.
2. D'Onofrio, A., Crawford, J. M., Stewart, E. J., Witt, K., Gavrish, E., Epstein, S., et al. (2010) Siderophores from neighboring organisms promote the growth of uncultured bacteria, *Chem Biol.*, **17**, 254-264, doi: 10.1016/j.chembiol.2010.02.010.
3. Davey, H. M., and Hexley, P. (2011) Red but not dead? Membranes of stressed *Saccharomyces cerevisiae* are permeable to propidium iodide, *Environ. Microbiol.*, **13**, 163-171, doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02317.x.
4. Davey, H. M. (2011) Life, death, and in-between: meanings and methods in microbiology, *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 5571-5576, doi: 10.1128/AEM.00744-11.
5. Stolp, Z. D., Kulkarni, M., Liu, Y., Zhu, C., Jalisi, A., Lin, S., et al. (2022) Yeast cell death pathway requiring AP-3 vesicle trafficking leads to vacuole/lysosome membrane permeabilization, *Cell Rep.*, **39**, 110647, doi: 10.1016/j.celrep.2022.110647.
6. Rego, A., Ribeiro, A., Côte-Real, M., and Chaves, S. R. (2022) Monitoring yeast regulated cell death: trespassing the point of no return to loss of plasma membrane integrity, *Apoptosis*, **27**, 778-786, doi: 10.1007/s10495-022-01748-7.
7. Chaves, S. R., Rego, A., Martins, V. M., Santos-Pereira, C., Sousa, M. J., and Côte-Real, M. (2021) Regulation of cell death induced by acetic acid in yeasts, *Front. Cell Dev. Biol.*, **9**, 642375, doi: 10.3389/fcell.2021.642375.
8. Pyatrikas, D. V., Fedoseeva, I. V., Varakina, N. N., Rusaleva, T. M., Stepanov, A. V., Fedyeva, A. V., et al. (2015) Relation between cell death progression, reactive oxygen species production and mitochondrial membrane potential in fermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells under heat-shock conditions, *FEMS Microbiol. Lett.*, **362**, fnv082, doi: 10.1093/femsle/fnv082.
9. Phillips, A. J., Sudbery, I., and Ramsdale, M. (2003) Apoptosis induced by environmental stresses and amphotericin B in *Candida albicans*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 14327-14332, doi: 10.1073/pnas.2332326100.
10. Grosfeld, E. V., Bidiuk, V. A., Mitkevich, O. V., Ghazy, E. S. M. O., Kushnirov, V. V., and Alexandrov, A. I. (2021) A systematic survey of characteristic features of yeast cell death triggered by external factors, *J. Fungi (Basel)*, **7**, 886, doi: 10.3390/jof7110886.
11. Claverys, J.-P., and Håvarstein, L. S. (2007) Cannibalism and fratricide: mechanisms and raisons d'être, *Nat. Rev. Microbiol.*, **5**, 219-229, doi: 10.1038/nrmicro1613.
12. Allocati, N., Masulli, M., Di Ilio, C., and De Laurenzi, V. (2015) Die for the community: an overview of programmed cell death in bacteria, *Cell Death Dis.*, **6**, e1609, doi: 10.1038/cddis.2014.570.
13. Hardwick, J. M. (2018) Do fungi undergo apoptosis-like programmed cell death? *MBio*, **9**, e00948-18, doi: 10.1128/mBio.00948-18.
14. Strassmann, J. E., Zhu, Y., and Queller, D. C. (2000) Altruism and social cheating in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*, *Nature*, **408**, 965-967, doi: 10.1038/35050087.
15. Wloch-Salamon, D. M. (2014) Sociobiology of the budding yeast, *J. Biosci.*, **39**, 225-236, doi: 10.1007/s12038-013-9344-5.
16. West, S. A., Griffin, A. S., and Gardner, A. (2007) Evolutionary explanations for cooperation, *Curr. Biol.*, **17**, R661-R672, doi: 10.1016/j.cub.2007.06.004.
17. Benbadis, L., Cot, M., Rigoulet, M., and Francois, J. (2009) Isolation of two cell populations from yeast during high-level alcoholic fermentation that resemble quiescent and nonquiescent cells from the stationary phase on glucose, *FEMS Yeast Res.*, **9**, 1172-1186, doi: 10.1111/j.1567-1364.2009.00553.x.
18. Raj, A., and van Oudenaarden, A. (2008) Nature, nurture, or chance: stochastic gene expression and its consequences, *Cell*, **135**, 216-226, doi: 10.1016/j.cell.2008.09.050.
19. Knorre, D. A., Azbarova, A. V., Galkina, K. V., Feniouk, B. A., and Severin, F. F. (2018) Replicative aging as a source of cell heterogeneity in budding yeast, *Mech. Ageing Dev.*, **176**, 24-31, doi: 10.1016/j.mad.2018.09.001.
20. Granek, J. A., and Magwene, P. M. (2010) Environmental and genetic determinants of colony morphology in yeast, *PLoS Genet.*, **6**, e1000823, doi: 10.1371/journal.pgen.1000823.
21. Váchová, L., Stovicek, V., Hlaváček, O., Chernyavskiy, O., Stěpánek, L., Kubínová, L., Palková, Z. (2011) Flo11p, drug efflux pumps, and the extracellular matrix cooperate to form biofilm yeast colonies, *J. Cell Biol.*, **194**, 679-687, doi: 10.1083/jcb.201103129.
22. Piccirillo, S., and Honigberg, S. M. (2010) Sporulation patterning and invasive growth in wild and domesticated yeast colonies, *Res. Microbiol.*, **161**, 390-398, doi: 10.1016/j.resmic.2010.04.001.
23. Váchová, L., and Palková, Z. (2005) Physiological regulation of yeast cell death in multicellular colonies is triggered by ammonia, *J. Cell Biol.*, **169**, 711-717, doi: 10.1083/jcb.200410064.
24. Levy, S. F., Ziv, N., and Siegal, M. L. (2012) Bet hedging in yeast by heterogeneous, age-correlated expression of a stress protectant, *PLoS Biol.*, **10**, e1001325, doi: 10.1371/journal.pbio.1001325.
25. Smukalla, S., Caldara, M., Pochet, N., Beauvais, A., Guadagnini, S., Yan, C., et al. (2008) FLO1 is a variable green beard gene that drives biofilm-like cooperation in budding yeast, *Cell*, **135**, 726-737, doi: 10.1016/j.cell.2008.09.037.

26. Xu, R., Kiarie, E. G., Yiannikouris, A., Sun, L., and Karrow, N. A. (2022) Nutritional impact of mycotoxins in food animal production and strategies for mitigation, *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, **13**, 69, doi: 10.1186/s40104-022-00714-2.
27. Gonçalves, B. L., Muaz, K., Coppa, C. F. S. C., Rosim, R. E., Kamimura, E. S., Oliveira, C. A. F., et al. (2020) Aflatoxin M1 absorption by non-viable cells of lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* strains in Frescal cheese, *Food Res. Int.*, **136**, 109604, doi: 10.1016/j.foodres.2020.109604.
28. Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P., and Lebrihi, A. (2004) Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains, *J. Appl. Microbiol.*, **97**, 1038-1044, doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02385.x.
29. Yiannikouris, A., Apajalahti, J., Siikanen, O., Dillon, G. P., and Moran, C. A. (2021) *Saccharomyces cerevisiae* cell wall-based adsorbent reduces aflatoxin B1 absorption in rats, *Toxins*, **13**, 209, doi: 10.3390/toxins13030209.
30. Da Silva, G. A. (1996) The occurrence of killer, sensitive, and neutral yeasts in Brazilian Riesling Italico grape must and the effect of neutral strains on killing behaviour, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **46**, 112-121, doi: 10.1007/s002530050791.
31. Radler, F., and Schmitt, M. (1987) Killer toxins of yeasts: inhibitors of fermentation and their adsorption, *J. Food Prot.*, **50**, 234-238, doi: 10.4315/0362-028X-50.3.234.
32. Kireeva, N. A., Sokolov, S. S., Smirnova, E. A., Galkina, K. V., Severin, F. F., and Knorre, D. A. (2021) Adaptive role of cell death in yeast communities stressed with macrolide antifungals, *mSphere*, **6**, e0074521, doi: 10.1128/mSphere.00745-21.
33. Fabrizio, P., Battistella, L., Vardavas, R., Gattazzo, C., Liou, L.-L., Diaspro, A., et al. (2004) Superoxide is a mediator of an altruistic aging program in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Cell Biol.*, **166**, 1055-1067, doi: 10.1083/jcb.200404002.
34. Eastwood, M. D., Cheung, S. W. T., Lee, K. Y., Moffat, J., and Meneghini, M. D. (2012) Developmentally programmed nuclear destruction during yeast gametogenesis, *Dev. Cell*, **23**, 35-44, doi: 10.1016/j.devcel.2012.05.005.
35. Duman-Özdamar, Z. E., and Binay, B. (2021) Production of industrial enzymes via *Pichia pastoris* as a cell factory in bioreactor: current status and future aspects, *Protein J.*, **40**, 367-376, doi: 10.1007/s10930-021-09968-7.
36. Woods, D. R., Ross, I. W., and Hendry, D. A. (1974) A new killer factor produced by a killer-sensitive yeast strain, *J. Gen. Microbiol.*, **81**, 285-289, doi: 10.1099/00221287-81-2-285.
37. Castagliuolo, I., Riegler, M. F., Valenick, L., LaMont, J. T., and Pothoulakis, C. (1999) *Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in human colonic mucosa, *Infect. Immun.*, **67**, 302-307, doi: 10.1128/IAI.67.1.302-307.1999.
38. Winterbourn, C. C., Kettle, A. J., and Hampton, M. B. (2016) Reactive oxygen species and neutrophil function, *Annu. Rev. Biochem.*, **85**, 765-792, doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014442.
39. Cuéllar-Cruz, M., Briones-Martin-del-Campo, M., Cañas-Villamar, I., Montalvo-Arredondo, J., Riego-Ruiz, L., Castaño, I., et al. (2008) High resistance to oxidative stress in the fungal pathogen *Candida glabrata* is mediated by a single catalase, Cta1p, and is controlled by the transcription factors Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p, *Eukaryot. Cell*, **7**, 814-825, doi: 10.1128/EC.00011-08.
40. Chance, B. (1952) Effect of pH upon the reaction kinetics of the enzyme-substrate compounds of catalase, *J. Biol. Chem.*, **194**, 471-481, doi: 10.1016/S0021-9258(18)55799-9.
41. Bhattacharyya, S., Walker, D. M., and Harshey, R. M. (2020) Dead cells release a “necrosignal” that activates antibiotic survival pathways in bacterial swarms, *Nat. Commun.*, **11**, 4157, doi: 10.1038/s41467-020-17709-0.
42. Smakman, F., and Hall, A. R. (2022) Exposure to lysed bacteria can promote or inhibit growth of neighboring live bacteria depending on local abiotic conditions, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **98**, fiac011, doi: 10.1093/femsec/fiac011.
43. Sherman, F. (2002) Getting started with yeast, *Methods Enzymol.*, **350**, 3-41, doi: 10.1016/s0076-6879(02)50954-x.
44. Carlson, T., Lupinacci, E., Moseley, K., and Chandrasekaran, S. (2021) Effects of environmental factors on sensitivity of *Cryptococcus neoformans* to fluconazole and amphotericin B, *FEMS Microbiol. Lett.*, **368**, fnab040, doi: 10.1093/femsle/fnab040.
45. Mahto, K. K., Singh, A., Khandelwal, N. K., Bhardwaj, N., Jha, J., and Prasad, R. (2014) An assessment of growth media enrichment on lipid metabolome and the concurrent phenotypic properties of *Candida albicans*, *PLoS One*, **9**, e113664, doi: 10.1371/journal.pone.0113664.
46. Altamirano, S., Simmons, C., and Kozubowski, L. (2018) Colony and single cell level analysis of the heterogeneous response of *Cryptococcus neoformans* to fluconazole, *Front. Cell Infect. Microbiol.*, **8**, 203, doi: 10.3389/fcimb.2018.00203.
47. Marcos, C. M., de Oliveira, H. C., de Melo, W. de C. M. A., da Silva, J. de F., Assato, P. A., Scorzoni, L., et al. (2016) Anti-immune strategies of pathogenic fungi, *Front. Cell Infect. Microbiol.*, **6**, 142, doi: 10.3389/fcimb.2016.00142.
48. Uwamahoro, N., Verma-Gaur, J., Shen, H.-H., Qu, Y., Lewis, R., Lu, J., et al. (2014) The pathogen *Candida albicans* hijacks pyroptosis for escape from macrophages, *MBio*, **5**, e00003-14, doi: 10.1128/mBio.00003-14.

49. Mukaremera, L., Lee, K. K., Mora-Montes, H. M., and Gow, N. A. R. (2017) *Candida albicans* yeast, pseudohyphal, and hyphal morphogenesis differentially affects immune recognition, *Front. Immunol.*, **8**, 629, doi: 10.3389/fimmu.2017.00629.
50. Rivera, A., Van Epps, H. L., Hohl, T. M., Rizzuto, G., and Pamer, E. G. (2005) Distinct CD4⁺-T-cell responses to live and heat-inactivated *Aspergillus fumigatus* conidia, *Infect. Immun.*, **73**, 7170-7179, doi: 10.1128/IAI.73.11.7170-7179.2005.
51. Bertheloot, D., Latz, E., and Franklin, B. S. (2021) Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death, *Cell Mol. Immunol.*, **18**, 1106-1121, doi: 10.1038/s41423-020-00630-3.
52. Hampton, H. G., Watson, B. N. J., and Fineran, P. C. (2020) The arms race between bacteria and their phage foes, *Nature*, **577**, 327-336, doi: 10.1038/s41586-019-1894-8.
53. Smith, R. P., Barraza, I., Quinn, R. J., and Fortoul, M. C. (2020) The mechanisms and cell signaling pathways of programmed cell death in the bacterial world, *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.*, **352**, 1-53, doi: 10.1016/bs.ircmb.2019.12.002.
54. Schmitt, M. J., and Breinig, F. (2006) Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection, *Nat. Rev. Microbiol.*, **4**, 212-221, doi: 10.1038/nrmicro1347.
55. Tipper, D. J., and Schmitt, M. J. (1991) Yeast dsRNA viruses: replication and killer phenotypes, *Mol. Microbiol.*, **5**, 2331-2338, doi: 10.1111/j.1365-2958.1991.tb02078.x.
56. Buser, C. C., Jokela, J., and Martin, O. Y. (2021) Scent of a killer: how could killer yeast boost its dispersal? *Ecol Evol*, **11**, 5809-5814, doi: 10.1002/ece3.7534.
57. Ivanovska, I., and Hardwick, J. M. (2005) Viruses activate a genetically conserved cell death pathway in a unicellular organism, *J. Cell. Biol.*, **170**, 391-399, doi: 10.1083/jcb.200503069.
58. Ratcliff, W. C., Denison, R. F., Borrello, M., and Travisano, M. (2012) Experimental evolution of multicellularity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 1595-1600, doi: 10.1073/pnas.1115323109.
59. Durand, P. M., Rashidi, A., and Michod, R. E. (2011) How an organism dies affects the fitness of its neighbors, *Am. Nat.*, **177**, 224-232, doi: 10.1086/657686.
60. Zhang, Y., Chen, X., Gueydan, C., and Han, J. (2018) Plasma membrane changes during programmed cell deaths, *Cell Res.*, **28**, 9-21, doi: 10.1038/cr.2017.133.
61. Kayagaki, N., Kornfeld, O. S., Lee, B. L., Stowe, I. B., O'Rourke, K., Li, Q., et al. (2021) NINJ1 mediates plasma membrane rupture during lytic cell death, *Nature*, **591**, 131-136, doi: 10.1038/s41586-021-03218-7.

ROLE OF DEAD CELLS IN COLLECTIVE STRESS TOLERANCE IN MICROBIAL COMMUNITIES: EVIDENCE FROM YEAST

Review

N. A. Kireeva^{1,2*}, K. V. Galkina^{1#}, S. S. Sokolov¹, and D. A. Knorre^{1*}

¹ *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia; e-mail: knorre@belozersky.msu.ru*

² *Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia*

A substantial part of yeast life cycle takes place in the communities where the cells are surrounded by their own clones. Meanwhile, yeast cell fitness depends not only on its own adaptations but also on the processes in the neighboring cells. Moreover, even if a cell loses its clonogenic ability, it is still capable of protecting surrounding cells that are still alive. Dead cells can absorb lipophilic antibiotics and provide nutrients to their kin neighbors. Some enzymes can be released into the environment and detoxify exogenous toxins. For example, cytosolic catalase, which degrades hydrogen peroxide, can stay active outside of the cell. In viable cells of pathogenic yeast species can suppress host immune responses and, in this way, boost the spread of the pathogen. In this review, we speculate that the biochemical processes in dying cells can contribute to stress resistance to the alive kin cells and therefore be a subject of natural selection. We considered the possible scenarios of how dead microbial cells can increase the survival of their kin using unicellular fungi – baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* as an example. We conclude that evolutionary conserved mechanisms of programmed cell death in yeast are likely to include a module of early permeabilization of the cell plasma membrane rather than preserve its integrity.

Keywords: regulated cell death, functional differentiation, stress resistance, cell-to-cell communication, yeast

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА

Обзор

© 2022 З.Г. Гуватова^{1,2}, П.В. Борисов¹, А.А. Алексеев², А.А. Москалев^{1,2*}

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,
119991 Москва, Россия; электронная почта: amoskalev@list.ru

² ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет
имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, Российский геронтологический научно-клинический центр,
129226 Москва, Россия

Поступила в редакцию 29.08.2022

После доработки 14.11.2022

Принята к публикации 14.11.2022

Внеклеточный матрикс (ВКМ) представляет собой внеклеточную структуру ткани, которая, помимо механической поддержки клеток, участвует в регуляции многих клеточных процессов, включая транспорт химических веществ, рост, миграцию, дифференцировку и клеточное старение. Возрастные изменения в структуре и составе матрикса и растущая с возрастом жесткость ВКМ сказываются на функционировании многих тканей и способствуют развитию различных патологических состояний. В данном обзоре рассматриваются возрастные изменения ВКМ в различных тканях и органах, в частности, обсуждается влияние на старение.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: внеклеточный матрикс, старение.

DOI: 10.31857/S0320972522120107, **EDN:** NGRKYG

ВВЕДЕНИЕ

Старение – это комплексный, многофакторный биологический процесс, при котором происходит снижение адаптационных возможностей организма, способствующее развитию возрастных патологий. Процесс старения в различной степени затрагивает все ткани, органы и системы организма. Недавно было выдвинуто предположение, что накопление повреждений в долгоживущих макромолекулах (особенно в белках внеклеточного матрикса (ВКМ), белках комплекса ядерных пор и гистонах) является одним из ключевых молекулярно-клеточных признаков старения, наряду с ранее обнаруженными признаками, такими как нестабильность генома, укорочение теломер, эпигенетические альтерации, нарушение протеостаза, нарушение распозна-

вания питательных веществ, митохондриальная дисфункция, репликативное (клеточное) старение, истощение пула стволовых клеток и изменение межклеточного взаимодействия [1]. ВКМ представляет собой сложную химически и физически взаимосвязанную трехмерную сеть, в которую встроены клетки многоклеточного организма. Длительное время ВКМ рассматривался в качестве каркаса клеток, обеспечивающего механическую поддержку. Однако данные последних лет о влиянии ВКМ на транспорт химических веществ, рост, миграцию, клеточное старение, дифференцировку клеток и др. изменили представление о функциональной значимости его компонентов [2]. Показано, что мутации в генах, кодирующих компоненты ВКМ, могут приводить к развитию скелетно-мышечных, сердечно-сосудистых, почечных, печеночных, легочных

Принятые сокращения: БА – болезнь Альцгеймера; БМ – базальная мембрана; ВКМ – внеклеточный матрикс; ГАГ – гликозаминогликаны; ГК – гиалуроновая кислота; КПП – конечные продукты гликирования; ММП – матриксные металлопротеиназы; ПГ – протеогликаны; ПНС – перинеуральная сеть; ТИМП – тканевые ингибиторы металлопротеиназ; ХС – хондроитинсульфат-протеогликаны; CGA – хлорогеновая кислота; ECM1 – белок внеклеточного матрикса 1; HSC – звездчатые клетки печени; LOX – лизилоксидаза; NF-κB – ядерный фактор-κB; PDGF – тромбоцитарный фактор роста; RAGE – рецептор конечных продуктов гликирования; TGF-β – трансформирующий фактор роста-β.

* Адресат для корреспонденции.

и кожных заболеваний [3]. Коллаген и эластин, превалирующие белки ВКМ, имеют длительный период полураспада, из-за чего подвержены патологическим неферментативным модификациям, таким как гликирование, карбонилирование и карбамилирование [1]. Конечные продукты гликирования (КПГ) считаются одними из факторов, вносящих вклад в старение, и были обнаружены в различных тканях и органах, таких как почки, кости, глаза, скелетные мышцы, хрящи, стенки артерий и мозг [4–7]. КПГ способны сшивать и, таким образом, укреплять коллагеновые структуры. Клетки в ответ на увеличение жесткости ВКМ реагируют, экспрессируя ферменты, ремоделирующие ВКМ, чтобы приспособиться к предпочтительной для них жесткости матрикса [8]. Однако КПГ или поперечные связи препятствуют ферментативному расщеплению ВКМ, в результате чего остаются более жесткие части матрикса, в то время как окружающий неповрежденный матрикс подвергается ферментативному ремоделированию, что приводит к различным побочным повреждениям [8]. КПГ вовлечены в патогенез нейродегенеративных и сердечно-сосудистых заболеваний [9], а также играют важную роль в прогрессировании и метастазировании опухолей [10]. Кроме того, КПГ, связываясь со своим основным рецептором RAGE (Receptor for Advanced Glycation End products), расположенным на поверхности клеток, запускает ряд внутриклеточных сигнальных путей, приводящих к продукции цитокинов с последующим воспалительным процессом и к окислительному стрессу с формированием замкнутых петель обратной связи [8]. Другой тип неферментативной модификации, карбонилирование, также вносит вклад в старение организма. Накопление с возрастом основного продукта карбонилирования, гомоцитруллина, было обнаружено в коже у мышей, крупного рогатого скота и людей [11, 12]. Более того, показано, что с возрастом гомоцитруллин накапливается даже более интенсивно, чем карбоксиметиллизин, являющийся наиболее встречающимся КПГ [12]. При карбамилировании белков ВКМ конкурентно ингибируется образование ферментативных поперечных связей, что влияет на механические свойства коллагена. Например, карбамилированный коллаген стимулирует продукцию активной матриксной металлопротеиназы MMP-9 моноцитами. Карбамилирование может способствовать катарактогенезу за счет изменения третичной и вторичной структуры белка α -кристаллина [8].

Таким образом, исследования последних лет позволили выявить, что ВКМ – это высокодинамичная структура, которая постоянно подвергается ферментативному и неферментативному ремоделированию. В свою очередь, количественные и качественные изменения в матриксе обнаруживаются при развитии и прогрессировании широкого спектра патологий и заболеваний человека, включая возраст-зависимые заболевания. Тем не менее в современной литературе только малая часть работ посвящена возрастным изменениям ВКМ. И его роль в процессах как нормального, так и патологического старения остается недооцененной и является актуальной темой геронтологии. В представленном обзоре рассмотрено текущее состояние исследований, направленных на изучение ВКМ. Обсуждаются имеющиеся данные о возрастных изменениях ВКМ различных тканей и органов и влияние этих изменений на старение.

СТРУКТУРА И СОСТАВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА

ВКМ состоит из двух основных классов макромолекул: фибриллярные белки и протеогликаны (ПГ). К основным фибриллярным белкам относятся коллаген, фибронектин, ламинин и эластин, которые составляют 75% от общего количества белков ВКМ [8]. ПГ состоят из корового белка и ковалентно присоединенных к нему углеводных цепей гликозаминогликанов (ГАГ), причем последние во многих случаях определяют функции ПГ, такие как связывание различных факторов роста, цитокинов, других белков матрикса, а также адгезию клеток к ВКМ. ГАГ-цепи ПГ состоят из повторяющихся дисахаридов, которые можно разделить на сульфатированные и несulfатированные. К основным ПГ ВКМ относятся, преимущественно, хондроитинсульфат-протеогликаны (ХС) и дерматансульфат-протеогликаны (ДС) и в меньшей степени кератансульфат-протеогликаны [13]. При этом в свободном виде встречаются только несulfатированные ГАГ, главным представителем которых является гиалуроновая кислота (ГК). ВКМ в тканях можно разделить на два основных типа, различающихся по составу и структуре: интерстициальный матрикс и базальная мембрана (БМ). Основными компонентами интерстициального матрикса являются коллагены, эластин и фибронектин, образующие пористый 3D-гель, в который погружены клетки организма. В отличие от интерстициального

Возрастные изменения компонентов ВКМ

Орган/ткань	Компонент ВКМ	Возраст-зависимые изменения	Тип образца	Вид	Источники
Кожа	коллаген I коллаген III	↓	белок	человек	[19]
	декорин	↑	белок	человек	[20]
	версикан	↓	белок	человек	
	COL6A2/5/6 COL5A3 COL16A1 COL18A1 COL4A5 COL6A1 SLPI AMBP BGN DCN VCAN HAPLN1 PRG4 фубулин 7 ADIPOQ THBS4 MMRN1 MMRN2	↑	белок	человек	[21]
	COL12A1 COL21A1 FRAS1 ANXA5 CD109	↓	белок	человек	[21]
Легкие	CILP2 LOX AGRN FMOD SERPINB9B ECM2 SDC4 COL14A1 FREM2 COL6A4 FREM1 LTBP2 COL6A6 FRAS1 MFAP5 COL6A5	↓	мРНК	мышь	[22]
	CXCL12 MGP C1QC AMBP ITIH3 SEMA7A VTN F13B MFGE8 COL4A3 HPX LRG1 COL16A1 SERPINA1E WNT9A C1QTNF5	↑	мРНК	мышь	[22]
	нидоген-2 периостин	↑	белок	человек	[23]

Таблица (продолжение)

Орган/ткань	Компонент ВКМ	Возраст-зависимые изменения	Тип образца	Вид	Источники
Нервная ткань	рилин	↓	мРНК белок	человек	[24–26]
	хондроитинсульфат фибронектин	↓	мРНК	мышь	[27]
Мышечная ткань	коллаген IV	↑	белок	крыса	[28]
	ламинин	↓	белок	крыса	[28]
	COL3A1 TIMP1 TIMP2	↑	мРНК	мышь	[29]
Печень	MMP13	↓	мРНК	мышь	[30]
	TIMP	↔	мРНК	мышь	[31]
	CXCL9	↓	мРНК	мышь	[31]
	LOXL2	↑	мРНК	мышь	[32]
	коллаген I	↓	мРНК белок	человек	[33]
	COL3A1 COL4A1 COL4A2 COL5A1	↓	мРНК	человек	[34]
	фибронектин	↓	белок	мышь	[34]
Сердце	коллаген I коллаген III коллаген IV коллаген V ламинин фибронектин	↓	мРНК	мышь	[35, 36]
Почки	коллаген I	↑	белок	крыса	[37]
	коллаген III	↔	белок	человек	[38]
		↑	мРНК	человек крыса	[38, 39]
		↑	белок	мышь	[37, 40]
	коллаген IV	↓	мРНК	крыса	[41]
		↑	белок	мышь человек	[38, 42]
	коллаген VI	↓	мРНК	крыса	[41]
	фибронектин	↑	белок	мышь	[37]
	ламинин	↓	мРНК	крыса	[41]
↑		белок	крыса	[43]	

Примечание. ↑ – увеличение экспрессии, ↓ – уменьшение экспрессии, ↔ – без изменений.

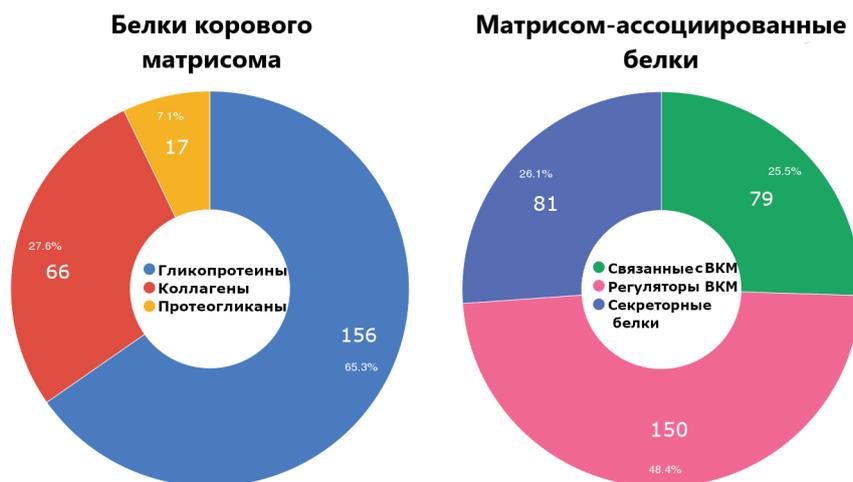


Рис. 1. Матрисом человека. Коровий матрисом состоит из гликопротеинов, коллагенов, протеогликанов. Матрисом-ассоциированные белки включают белки, связанные с ВКМ, регуляторные и секреторные белки. На круговой диаграмме отобрано количество белков в каждой категории и процентное соотношение

матрикса, БМ представляет собой более плотную и менее пористую слоистую структуру, состоящую из базальной ламины и связанной с ней сети коллагеновых волокон (ретикулярной ламины) [14]. Базальная ламина прилегает к базальной поверхности клеток эпителия, а также окружает гладкомышечные, жировые и нервные клетки. В разных тканях компоненты базальной ламины отличаются друг от друга, однако для большинства характерно наличие четырех основных компонентов ВКМ: коллагена IV, ламинина, гепарансульфат-ПГ и энтактина.

Ключевыми ферментами, участвующими в обмене ВКМ, являются матриксные ММП, тканевые ингибиторы металлопротеиназ (ТИМП) и лизилоксидазы (LOX). Семейство ММП состоит из более чем 25 отдельных протеаз, разделенных на классы на основе субстратной специфичности. Активность ММП ингибируется ТИМП, в семейство которых в настоящее время включены четыре фермента. Более подробный состав и структура ВКМ описаны в ряде обзоров других авторов [14–16].

Недавно Naba et al. [17] представили базу данных MatrisomeDB с *in silico* и *in vivo* данными о матрисоме человека и мыши. Изначально термин «матрисом» был введен для определения основных компонентов ВКМ, образующих надмолекулярные комплексы. Однако сегодня понятие «матрисом» шире и включает не только основные белки ВКМ, но и белки, связанные с ВКМ и ремодулирующие его (рис. 1).

Авторы также представили первый атлас ВКМ, включающий более 1000 белков. На сегодняшний день атлас содержит данные о ВКМ 15 различных типов нормальных тка-

ней, 6 типов опухолевых тканей (разные стадии рака молочной железы, колоректального рака, меланомы и инсулиномы), а также фиброзные ткани легких и печени [17]. Действительно, состав и структура компонентов ВКМ варьируют от ткани к ткани. Например, если в соединительных тканях компоненты ВКМ синтезируются фибробластами, в ряде других тканей компоненты ВКМ могут синтезироваться специализированными клетками, такими как хондроциты, нейроны, кератиноциты и др. Эти вариации влияют как на структуру и биомеханические свойства ВКМ, так и на сигналы, передаваемые клеткам, тем самым модулируя их ответы [18]. Поэтому неудивительно, что нарушения в структуре и составе ВКМ обнаруживаются во многих патологических состояниях различных систем органов (рис. 2).

Известно, что для отдельных органов и тканей в организме характерны различия в скорости развития возрастных изменений (гетерокинетичность) и расхождения во времени наступления старения (гетерохронность). Очевидно, что тканеспецифичные изменения ВКМ с возрастом вносят существенный вклад в паттерн старения данных тканей и органов. В таблице мы собрали имеющиеся литературные данные об изменениях экспрессии компонентов ВКМ с возрастом в ряде тканей и органов.

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ВКМ В КОЖЕ

Кожа – самый большой орган человеческого тела, выполняющий барьерную функцию и участвующий в терморегуляции, дыхании, обменных и многих других процессах [44].

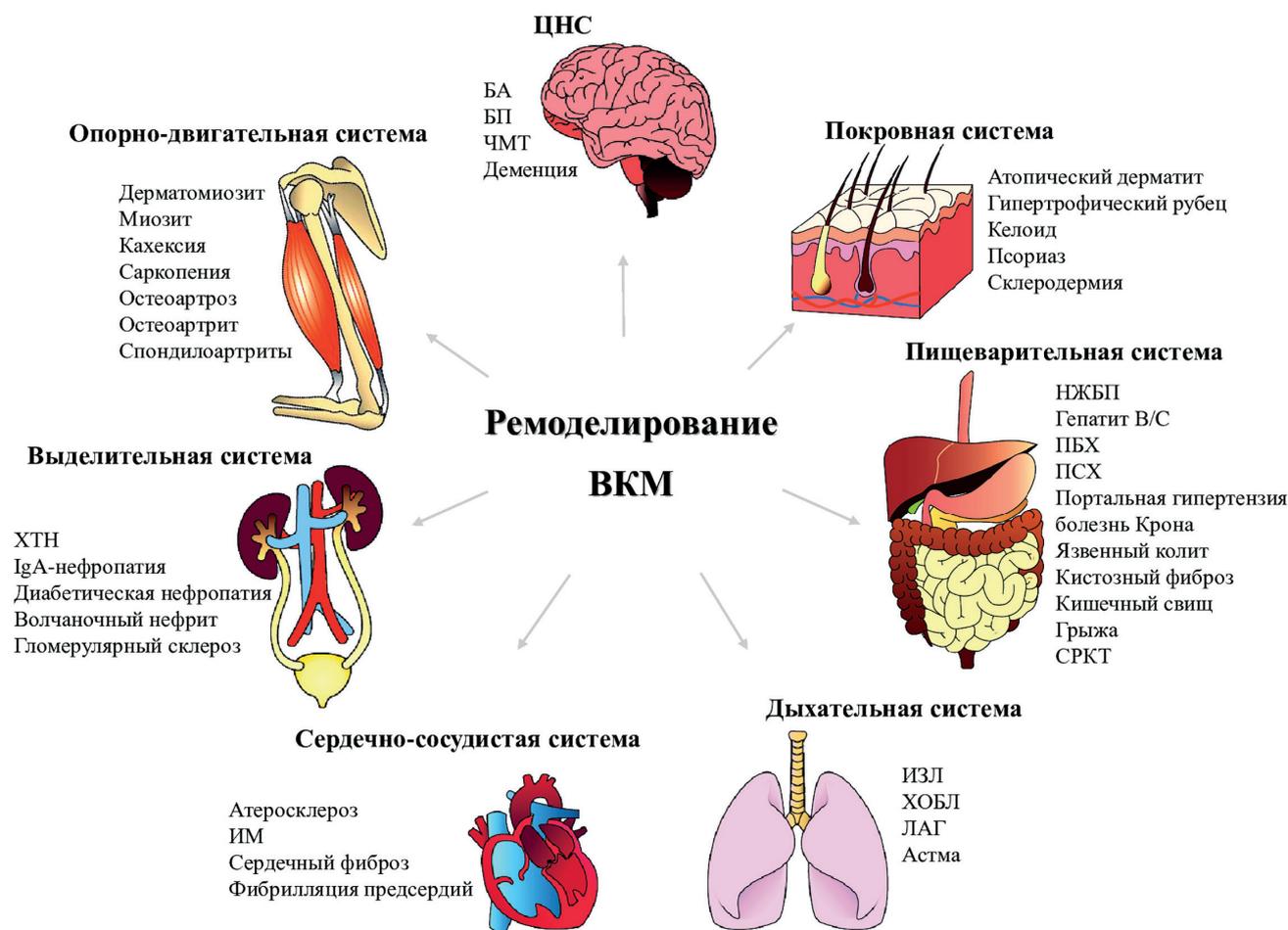


Рис. 2. Влияние нарушений ВКМ на различные системы органов. БА – болезнь Альцгеймера, БП – болезнь Паркинсона, ЧМТ – черепно-мозговая травма, НЖБП – неалкогольная жировая болезнь печени, ПБХ – первичный билиарный холангит, ПСХ – первичный склерозирующий холангит, СРКТ – синдром раздраженной толстой кишки, ИЗЛ – интерстициальные заболевания легких, ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких, ЛАГ – легочная артериальная гипертензия, ИМ – инфаркт миокарда, ХТН – хроническая трансплантационная нефропатия

Ключевую роль в целостности кожи играет дермальний ВКМ, компоненты которого продуцируются как фибробластами, так и кератиноцитами. В коже взрослого человека ВКМ включает коллагеновую сеть в качестве основного компонента, а также эластические волокна, ПГ, ГАГ и воду [21]. Коллагеновая сеть составляет 70–80% сухого веса кожи и в основном состоит из фибриллярных коллагенов, таких как коллаген I (80% всех коллагенов), коллаген III (15%) и коллаген V (5%). В меньшей степени в дерме представлены коллагены с прерываемыми тройными спиралями (FACIT-коллагены), которые включают коллагены XII, XIV и XVI. Они участвуют в регуляции сборки коллагеновой сети и во взаимодействии фибрилл с неколлагеновыми компонентами ВКМ [45].

Старение кожи характеризуется накоплением фрагментированных коллагеновых волокон, снижением общего уровня коллагена (в основном I и III) и нарушением регуляции

баланса ММП/ТИМП. Также модифицируется высокоорганизованная архитектура эластичных микрофибрилл, содержащих эластин и фибриллин. Считается, что фрагментация данных волокон вызывает мелкие поверхностные морщины, в то время как потеря фибриллина ответственна за постоянные морщины, а отложения плохо организованного эластина вызывают глубокие морщины. Недавний анализ возрастных изменений матрикса кожи, проведенный Li et al. [21], выявил повышенный синтез в стареющей дерме цепей коллагена VI (COL6A2/5/6), цепи альфа-3 коллагена V (COL5A3), цепи альфа-1 коллагена XVI, микрофибрилл (COL16A1), альфа-1 цепи коллагена XVIII (COL18A1) и коллагена IV (COL4A5), бигликана, декорина, версикана, ГК, ПГ-связывающего белка 1 (HAPLN1) и протеогликана 4 (PRG4), а также других компонентов ВКМ, включающих фубулин 7 и белки, связанные с ангиогенезом (ADIPOQ, THBS4, MMRN1,

MMRN2). Авторы также отмечают, что синтез цепи альфа-1 коллагена XII (COL12A1), цепей альфа-5 коллагена XXI (COL21A5), белка внеклеточного матрикса FRAS1, аннексина A5 (ANXA5) и антигена CD109 в течение жизни постепенно снижался, тогда как уровни антилейкопротеиназы (SLPI), цепей альфа-1 коллагена VI (COL6A1) и предшественника альфа-1-микроглобулина/бикунина (AMBIP) постепенно повышались.

Уровни ММП-1, ММП-2, ММП-3, ММП-9, ММП-10, ММП-11, ММП-13, ММП-17, ММП-26 и ММП-27 повышены в стареющей коже человека [46–49]. ММП и ТИМП часто регулируются координированно, чтобы контролировать избыточную активность ММП, но в то же время было показано, что повышение уровня ММП в стареющей коже не сопровождается соответствующим повышением уровня ТИМП [46, 47]. В результате ускоряется прогрессирующая фрагментация коллагена в дерме и соответственно старение кожи.

Исследования последних лет выявили, что окислительный стресс и повреждение ДНК являются наиболее важными механизмами старения кожи, приводящими к большинству типичных гистологических проявлений старения кожи, и взаимосвязаны с воспалением. Показано, что в дермальных фибробластах человека TGF- β (трансформирующий фактор роста- β) контролирует гомеостаз коллагена, регулируя как выработку, так и деградацию коллагена посредством Smad-пути [50]. Активные формы кислорода (АФК) через активацию MAPK-сигнального каскада влияют на активность транскрипционного фактора AP-1 (белок-активатор 1), который играет важную роль в регуляции транскрипции ММП-1, ММП-3, ММП-9 и ММП-12 [51–53].

Другой универсальный транскрипционный фактор NF- κ B (ядерный фактор- κ B), играющий важную роль в клеточном ответе на окислительный стресс, как показано, активирует экспрессию генов, кодирующих ММП-1 и ММП-3 в дермальных фибробластах [54, 55]. Важно отметить, что NF- κ B также опосредует реакцию на УФ-облучение, являясь основным фактором окружающей среды, вызывающим фотостарение [56]. Как правило, окислительные повреждения более очевидны в фотостареющей коже, и это может объяснить более заметные связанные со старением признаки, такие как глубокие морщины. В то время как основным источником ММП при естественном старении являются дермальные фибробласты, при фотостарении ММП также продуцируются эпидермальными кератиноцитами [47, 55].

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ВКМ В ЛЕГКИХ

Старение легких характеризуется структурным ремоделированием дыхательных путей, снижением дыхательной функции и повышенной восприимчивостью к острым и хроническим заболеваниям легких [57]. Показано, что в случае идиопатического легочного фиброза (ИЛФ) миофибробласты секретируют больше ВКМ, чем фибробласты [58], что может быть вызвано активацией сигнального пути TGF- β , способствующего дифференцировке фибробластов в миофибробласты [59]. При ИЛФ уровни коллагена, ПГ и гликопротеинов ВКМ увеличиваются, в то время как белки БМ, такие как ламинины и коллаген IV, снижаются. Также отмечается повышение уровня нидогена-2 и увеличение секреции периостина и ПГ [23]. В экспериментах на мышинной модели фиброза легких, вызванного блеомицином, авторы обнаружили увеличение экспрессии эмилина 1 и коллагена XXVI. Кроме этого, анализ растворимости белков выявил, что основные структурные компоненты БМ (цепи коллагена IV, ламинины, нидогены, перлекан) стали значительно более растворимыми в процессе восстановления легких [60]. С другой стороны, необходимо учитывать, что, в отличие от прогрессирующего и необратимого фиброза при многих хронических заболеваниях легких, фиброгенез, вызванный блеомицином, является физиологической реакцией организма, при которой происходит почти полное восстановление функциональной альвеолярной организации легких. В другой работе, также на мышинной модели, наблюдалось накопление ГК в жидкости бронхоальвеолярного лаважа после заражения гриппом А, тогда как введение гиалуронидазы ускорило восстановление после инфекции, вероятно, за счет воздействия на альвеолярные макрофаги [61]. Увеличение содержания ГК в жидкости бронхоальвеолярного лаважа отмечалось также при старении [62].

Недавно с помощью атомно-силовой микроскопии было продемонстрировано, что жесткость паренхимы легких с возрастом увеличивается [63]. Эти изменения, вероятно, обусловлены ремоделированием ВКМ и способствуют снижению эластической отдачи легких и снижению объема форсированного выдоха у пожилых людей [57]. На сегодняшний день выявлено более 150 различных компонентов ВКМ легких, включающих структурные белки, ГАГ и ферменты, которые собираются в сложные надмолекулярные структуры, характеризующиеся специфическими биофизическими и биохими-

мическими свойствами [64, 65]. На мышинной модели Angelidis et al. [22] идентифицировали 32 белка матрисома легких со значительными изменениями при старении. Анализ профилей растворимости белков позволил также выделить 8 белков ВКМ (EFEMP1, FREM1, SPARCL1, гемопексин, фибриллин-1, LAMA1, семафорин 3Е, плексин-А1), растворимость которых меняется с возрастом. Авторы предоставили атлас стареющего легкого (<https://theislab.github.io/LungAgingAtlas/>), который может служить полезным инструментом при изучении хронических заболеваний легких и старения [22].

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ВКМ В ЦНС

Компоненты ВКМ составляют до 20% объема мозга и синтезируются в основном нейронами и глиальными клетками [66]. Состав и структура ВКМ мозга особенны тем, что, в отличие от других тканей, где наиболее представлены компонентами ВКМ являются фибриллярные белки, основными компонентами ВКМ мозга являются ГК, ХСПГ из семейства лектиканов (агрекан, нейрокан, версикан и бревикан) и тенасцины R и C [67]. Причем отдельные компоненты ВКМ, а также определенные структуры ВКМ, такие как перинейрональная сеть (ПНС) и интерстициальный матрикс, по-разному распределены в мозге, что вносит вклад в уникальную структуру и функции матрикса в различных областях мозга [68]. По сравнению с молодым мозгом в старом мозге накопление ГК было выше в коре головного мозга и мозжечке, но не в других исследованных областях. Напротив, уровни ХСПГ не изменились с возрастом ни в одной из исследованных областей мозга [69]. Известно, что гиппокамп является одной из областей мозга, в которых происходит взрослый нейрогенез. Сообщалось, что снижение уровней ХСПГ в зубчатой извилине гиппокампа у взрослых мышей ведет к подавлению нейрогенеза и созревания дендритного дерева, а также вызывает когнитивные нарушения [70].

ПНС окружает перикарион с проксимальными дендритами и прилежащими синапсами определенных типов нейронов в ЦНС позвоночных животных. Если при развитии мозга ПНС влияет на поддержание предшественников нейронов, рост аксонов и формирование синапсов, то в зрелом мозге эта структура ВКМ является критическим регулятором синаптической пластичности [71]. Показано, что тенасцин-R, один из основных гликопротеинов ПНС, влияет на миграцию клеток-пред-

шественников во взрослом мозге [72], а его дефицит снижает количество пролиферирующих стволовых клеток, одновременно увеличивая количество клеток, коммитированных по нейрональному фенотипу [70]. У мышей с дефицитом тенасцина-R наблюдались аномальная структура ПНС, снижение долговременной потенциации (LTP), тревожность и двигательные нарушения [73]. Другой представитель этого семейства, тенасцин-C, вовлечен в нейровоспаление при болезни Альцгеймера (БА). Показано, что дефицит тенасцина-C снижает экспрессию про-, но усиливает экспрессию противовоспалительных цитокинов в мозге мышинной модели БА [74], что указывает на потенциал использования тенасцина-C в качестве новой терапевтической мишени при БА.

Действительно, будучи критическим компонентом внеклеточного пространства мозга ВКМ играет важную роль при развитии и прогрессировании нейродегенеративных заболеваний [75–77]. Недавнее исследование уровней мРНК и белка рилина в спинномозговой жидкости у пациентов с различными нейродегенеративными расстройствами указывает на снижение экспрессии рилина у пациентов с деменцией по сравнению с контрольной группой и с пациентами с умеренным когнитивным расстройством (УКР) [21]. Снижение рилина в спинномозговой жидкости пациентов с деменцией также было недавно отмечено в данных, опубликованных Dayon et al. [78], и оно также характерно для пациентов с шизофренией [79]. Считается, что уровни рилина во взрослом мозге должны поддерживаться на определенном уровне для поддержания нейронального гомеостаза и синаптической пластичности [80]. Рилин участвует в интеграции нейронов в гиппокамп, регулируя морфологию и тип дендритных шипов, количество синаптических связей на новых нейронах, а также степень покрытия перисинаптических астроцитов во взрослом мозге [81]. Известно, что рилин повышает синаптическую пластичность гиппокампа за счет изменения состава субъединиц NMDA-рецепторов и способствует группировке AMPA-рецепторов [71]. Недавно на модели обезьян *Macaca mulatta* было показано, что количество нейронов в слое II энторинальной коры, экспрессирующих рилин, снижается у старых особей с дефицитом памяти [82]. У старых грызунов дефицит рилина вызвал нарушения пространственной памяти [83], а инъекция рилина увеличивала плотность дендритных шипов, долговременную потенциацию гиппокампа и улучшала показатели ассоциативного и пространственного обучения и память [84].

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ВКМ В ПОПЕРЕЧНОПОЛОСАТОЙ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

Возрастное изменение скелетной мускулатуры и потеря функции – важная гериатрическая проблема, затрагивающая миллионы пожилых людей и людей старческого возраста [85]. Зрелые волокна скелетной мышцы не имеют способности к делению, поэтому рост и регенерация мышечной ткани происходят за счет клеток-сателлитов, которые после миогенной дифференцировки сливаются с поврежденными волокнами или образуют новые миосимпласты. В случае, когда повреждение не может быть полностью компенсировано активацией миосателлитов, воспалительные процессы приводят к изменению продукции белков ВКМ и последующему развитию фиброза. Все больше работ подтверждают, что ВКМ играет важную роль в развитии, росте и восстановлении мышц, а также в передаче сократительной силы [86–88]. Недавно Stearns-Reider et al. [29] продемонстрировали прямое влияние ВКМ на поведение мышечных сателлитных клеток, которое способствует возрастному снижению регенерации мышечной ткани и замещению их фиброзной тканью. Было показано, что старение ВКМ вызывает ядерную транслокацию YAP/TAZ и повышение экспрессии фибробластами Col3a1 и ТИМП (1 и 2), способствующих накоплению белков ВКМ за счет ингибирования активности ММП [29]. Предполагается, что жесткий ВКМ регулирует активацию коактиваторов транскрипции YAP/TAZ независимо от передачи сигналов Hippo. Интегрины, чувствительные к изменениям механического напряжения, активируют Rho-ROCK и нижестоящие MRTF и YAP/TAZ, что приводит к их транслокации в ядро и транскрипции генов-мишеней, участвующих в развитии фиброза [1]. Снижение активности ММП с возрастом выявлено в икроножной, глубокой и камбаловидной мышцах крыс. В другой работе на мышечной модели было обнаружено, что с возрастом количество клеток-миосателлитов снижается, а также меняется соотношение покоящихся и пролиферирующих сателлитных клеток, что в конечном итоге приводит к снижению регенеративного потенциала. Авторы предполагают, что данное возрастное ухудшение также напрямую зависит от жесткости микроокружения [89].

ВКМ в мышечной ткани организован иерархически: эндомизий окружает мышечное волокно, перимизий окружает группу мышеч-

ных волокон, а эпимизий покрывает всю мышцу [90]. ВКМ эндомизия, преимущественно, представлен коллагенами IV, VI и ламинином, тогда как ВКМ двух других слоев состоит в основном из коллагена I и III [91]. В недавней работе Liu et al. [90] показали, что коллаген I может усиливать миграцию и миогенную дифференцировку миосателлитов посредством регуляции ядерной транслокации NF-κB p65 с последующим повышением уровня IL-6. Другой представитель ВКМ, коллаген V, как показано, может поддерживать состояние покоя клеток-сателлитов через модуляцию Notch-сигналинга [92].

Старение коллагена в скелетных мышцах изучено у многих организмов, включая человека, грызунов, кроликов и тюленей [93–96]. Коллаген является долгоживущим белком и богат лизином и аргинином, что способствует образованию КПП [97]. Обнаружено, что RAGE, который обычно не экспрессируется во взрослой мышечной ткани, активируется в дистрофических мышцах и при раковой катехексии [98, 99]. Накопление КПП с возрастом снижает восприимчивость коллагена и других компонентов ВКМ к деградации ММП, вызывая повышение жесткости ВКМ скелетных мышц, что нарушает регуляцию покоящихся мышечных миосателлитов и передачу сократительной силы [100]. Интересно, что накопление КПП характерно как для медленных, так и для быстрых мышц [101].

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ВКМ В ПЕЧЕНИ

Влияние старения на фиброз печени, основной побочный эффект хронических заболеваний печени, представляет большой интерес [30]. При модулировании фиброза печени тетрахлорметаном (CCl₄) у старых мышцей развивался более выраженный фиброз по сравнению с молодыми, отмечалось снижение уровня ММП-13 и увеличение доли толстых коллагеновых волокон [30, 32].

Передача сигналов посредством TGF-β1 считается одним из ключевых путей активации звездчатых клеток печени (HSC), миофибробластоподобных клеток, являющихся основными продуцентами компонентов ВКМ печени [102, 103]. *In vitro* исследования с использованием HSC, культивируемых на субстратах различной жесткости, которые имитируют здоровую и фиброзную ткань печени, показали, что увеличение жесткости матрикса снижает экспрессию ММП-9 как на уровне

мРНК, так и на уровне белка [104]. Печеночный фиброгенез также сопровождается увеличением содержания таких компонентов ВКМ, как коллаген IV, ламинин и нидоген [104]. Показано, что экспрессия белка внеклеточного матрикса 1 (ECM1) снижается при фиброзе, и, как следствие, активируется TGF- β 1. Связь белков ВКМ и цитоскелета посредством интегринов способствует высвобождению TGF- β из латентного связанного TGF- β белкового комплекса [105, 106]. Интегрины состоят из двух субъединиц, α и β , и каждая комбинация имеет свою специфичность связывания и сигнальные свойства [107]. Хотя в целом интегрины $\alpha\beta$ 3, $\alpha\beta$ 5, $\alpha\beta$ 6 и $\alpha\beta$ 8 могут распознать специфическую последовательность RGD-пептида, ассоциированного с латентностью (LAP), входящего в латентный комплекс TGF- β , при фиброзе печени в основном играют роль $\alpha\beta$ 3 и $\alpha\beta$ 6 [108].

Также в фиброзе печени задействован сигнальный путь тромбоцитарного фактора роста (PDGF) [109]. На модели крыс с фиброзом печени было показано, что сорафениб, ингибитор рецепторных тирозинкиназ, включающих PDGFR- β , вызывал снижение экспрессии коллагена в печени [110, 111].

Избыточное отложение белков ВКМ регулируется протеазами, такими как ММП, ТИМП и LOXL. Следовательно, нацеливание на эти ферменты или на «отложение» белков матрикса может оказаться оптимальной стратегией для обращения вспять фиброза печени [112]. К примеру, LOXL2 практически отсутствовал в здоровой, но сильно индуцировался в фиброзной печени с преимущественной локализацией в фиброзных перегородках. Отсроченное лечение тиацетамид-индуцированного (ТАА) фиброза печени у мышей анти-LOXL2 значительно уменьшало перекрестное сшивание коллагена и гистологические признаки мостовидного фиброза с уменьшением морфометрического отложения коллагена на 53%. Ингибирование LOXL2 способствовало усилению расщепления и истончению фиброзных перегородок, что говорит об обратимости фиброза [32]. Хлорогеновая кислота (CGA) препятствует фиброзу печени путем блокирования Smad7, регулируемого miR-21, или TGF- β 1, или интерлейкином-13 (IL-13) [113, 114]. Как в *in vitro*, так и в *in vivo* экспериментах CGA защищала от вызванного CCL4 фиброза печени посредством подавления окислительного стресса [115], активации HSC и продукции фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и TGF- β 1 [116]. Кроме того, CGA уменьшает фиброз и воспаление посред-

ством подавления толл-подобного рецептора 4 (TLR-4) [117]. В совокупности CGA предотвращает окислительный стресс, воспаление и фиброз в печени посредством ингибирования сигнальных каскадов miR-21/Smad7/TGF- β 1/IL-13/TLR-4/HIF- α /miR-122 и Nrf2 в HSC и фибробластах [118].

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ВКМ В ПОЧКАХ

Старение почек характеризуется постепенным разрастанием соединительной ткани, развитием склероза почечных клубочков и атрофией клеток почечных канальцев [119, 120]. Исследование на мышах выявило, что возрастные изменения, происходящие на молекулярном уровне, проявляются уже в среднем возрасте и прогрессируют до старости [121]. Недавние протеомные и ультраструктурные исследования ВКМ почек указывают на возрастное снижение экспрессии белков БМ, таких как ламинины, коллаген IV и коллаген XVIII, наряду с увеличением экспрессии белков интерстициального матрикса (коллагены I, III, VI и XV; фибриногены и нефронектин). Интересно, что аналогичные признаки измененного матрикса также наблюдались в исследованиях, посвященных заболеваниям почек человека [122]. Известно, что при воспалении клетки почек высвобождают цитокины и факторы роста, в том числе PDGF- β , IL-1 β , TNF- α , IL-6 и TGF- β [123, 124]. TGF- β является движущей силой почечного фиброза, который может привести к хроническим заболеваниям почек. В поврежденной почке TGF- β индуцирует воспалительную и фиброзную реакции (сверхэкспрессию компонентов ВКМ и ремодулирующих белков) почечных клеток, включая эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки, фибробласты, перициты и макрофаги. TGF- β способствует активации и пролиферации фибробластов, а также их дифференцировке в миофибробласты. Кроме того, TGF- β оказывает профибротическое действие, взаимодействуя с другими сигнальными путями, такими как BMP-7, Wnt/ β -катенин и MAP-киназный каскад [125]. Стареющие почки также демонстрируют повышенное «сшивание» ВКМ и увеличение в 2–4 раза транслугутиназы 2, фермента, который катализирует Ca²⁺-зависимые перекрестные сшивки белков ВКМ [126]. Транслугутиназа 2 является «молекулярным партнером» эндостатина, сверхэкспрессия которого у молодых мышей приводит к интерстициальному фиброзу.

Подкапсульная инъекция трансглутаминазы 2 или эндостатина в молодую почку приводит к клеточному старению, а совместное лечение оказывает кумулятивный эффект, приводящий к увеличению доли стареющих клеток, апоптозу эпителиальных клеток канальцев, что свидетельствует о том, что эндостатин и трансглутаминаза 2 способствуют развитию фиброза [126, 127].

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ВКМ В СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЕ

Заболевания сердечно-сосудистой системы занимают первое место среди причин смертности во всем мире. Возрастные структурно-функциональные изменения стенки сосудов и сердца приводят к тканевым и органам дисфункциям у людей в возрасте, что делает старение основным фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний. Старение артерий характеризуется ригидностью, снижением эластичности, нарушением растяжимости и дисфункцией эндотелия [128]. Основными белками ВКМ артериальной стенки являются эластин, коллагены и растворимые ПГ [129]. Эластин является ключевым компонентом эластических волокон, которые формируют эластические пластины, расположенные в меди, и придают необходимую для функционирования артерий эластичность. В регуляции сборки эластических волокон важную роль играют фибулины (фибулин-4 и фибулин-5). Показано, что дефицит фибулина-4 у мышей вызывает нарушения в организации эластических волокон с последующим уплотнением стенок аорты [130]. Эластические волокна также стабилизированы поперечными связями. Показано, что с возрастом увеличивается экспрессия LOXL2 в стареющей аорте, а нокдаун *LOXL2* предотвращает связанное с возрастом повышение жесткости сосудов у мышей по сравнению с мышами дикого типа [131]. Содержание LOXL2 во внеклеточном пространстве гладкомышечных клеток сосудов (VSMC) может регулироваться биодоступностью оксида азота (NO), снижение которого считается одним из признаков старения сосудов. Показано, что возрастная потеря биодоступности NO также влияет на активацию ММП [132], что дополнительно обуславливает потерю эластичности и повышение ригидности за счет разрушения эластических волокон и увеличение содержания невосприимчивого к ММП коллагена. Основные типы ММП, обнаруживаемые в сердце и сосудистой ткани,

включают коллагеназы (ММП-1, -8 и -13), желатиназы (ММП-2 и -9), стромелизины (ММП-3, -10 и -11) и ММП-14 [133]. У стареющих мышцей повышенная активность ММП-9 была связана с усилением воспаления и ослаблением способности к ангиогенезу [134]. Усиленная активация ММП-2 и ММП-9 отмечается при aberrантном ремоделировании миокарда, а их уровни могут быть полезными маркерами для выявления пациентов с риском развития сердечной недостаточности [133]. Содержание в плазме у пожилых людей ряда других ММП, а также их ингибиторов, в частности ММП-7, ТИМП-1, ТИМП-2 и ТИМП-4, также возрастает, а уровни ММП-7, ТИМП-1 и ТИМП-4, как показано, положительно коррелируют с развитием диастолической дисфункции [135].

Старение сердца характеризуется в первую очередь нарушением диастолической функции. В свою очередь, эта дисфункция способствует развитию хронической сердечной недостаточности и связана с увеличением риска общей смертности у пожилых людей [136, 137]. Одним из объяснений возрастных нарушений диастолы может служить воспаление, постепенное развитие фиброза и повышение жесткости миокарда вследствие нарушения гомеостаза ВКМ сердца. Сердечный ВКМ в основном состоит из коллагена I и III, другие коллагены, а также фибронектин, ламинин и эластин представлены в сердце в меньшей степени [136, 137]. С возрастом наблюдается увеличение содержания коллагена I и уменьшение коллагена III [138]. Поскольку коллаген I обеспечивает прочность на растяжение, а коллаген III – эластичность миокарда, изменение соотношения этих коллагенов, наряду с увеличением общего содержания коллагенов и поперечных связей между ними, могут способствовать возрастной жесткости миокарда [135].

Показано, что поперечные шивки коллагеновых волокон могут также увеличивать жесткость миокарда без изменения общего содержания коллагена [139]. Повышение содержания белка SPARC (кислый секретрируемый белок, богатый цистеином), участвующего в формировании поперечных шивок, обнаружено в левом желудочке у стареющих мышцей и ассоциировано с возрастным увеличением диастолической ригидности [140]. Недавно участие в развитии фиброза миокарда другого компонента ВКМ, ЕСМ1, было продемонстрировано Hardy et al. [141]. Авторы обнаружили увеличение экспрессии ЕСМ1 в стареющем сердце и сердце после инфаркта миокарда. Как и в других тканях, накопление КПП отмечается в стареющем сердце [142], а также в плазме

пожилых людей, имеющих диастолическую дисфункцию левого желудочка [143]. Введение растворимого RAGE (sRAGE), ингибитора активности RAGE, взрослым мышам дикого типа уменьшало возрастной фиброз миокарда, раскрывая потенциал терапевтического использования sRAGE для предотвращения повреждающих эффектов КПП.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Компоненты ВКМ формируют механические и биохимические свойства тканей и органов, поддерживая внеклеточный гомеостаз и влияя на внутриклеточные процессы. Анализ литературы подчеркивает роль ремоделирования ВКМ в основных механизмах нормальной и патологической физиологии различных тканей при старении. Возрастные изменения ВКМ вызывают воспаление, фиброз, старение стволовых клеток, влияют на многие другие процессы и могут быть основным фактором старения тканей. На сегодняшний день многие компоненты ВКМ рассматриваются в качестве маркеров, отражающих состояние матрикса, а также в качестве потенциальных мишеней для диагностики и лечения заболеваний. В то же время, несмотря на существенный прогресс в понимании роли ВКМ в различных патологических процессах, из-за сложности ВКМ как с точки зрения состава, так и посттрансляционной модификации и сборки компонентов ВКМ в надмолекулярные структуры определение их биохимического состава и влияние структурных изменений на старение является сложной задачей. На сегодняшний день наши знания о ВКМ различных органов и тканей все еще остаются неполными и требуются дальнейшие фундаментальные

исследования для полноценного понимания процессов и механизмов, связанных с ВКМ, а также для выявления новых биомаркеров старения и разработки релевантных антивозрастных вмешательств. Например, наиболее изученный КПП стареющего ВКМ, глюкозепан, является многообещающей мишенью для предотвращения повреждающих эффектов возрастных нарушений ВКМ. Компания Revel Pharmaceuticals начала финансировать скрининг потенциальных терапевтических ферментов, способных разрушать поперечные связи глюкозепана (<https://www.revelpharmaceuticals.com>). Кроме разрушителей уже образованных продуктов неферментативных модификаций, перспективными также могут являться вмешательства, снижающие скорость образования шивок ВКМ, а также ингибиторы RAGE, стимуляторы эластогенеза и многие другие. Таким образом, изучение ВКМ и его взаимосвязи с процессами старения открывает огромное поле для поиска подходов, направленных на замедление старения и достижения активного долголетия.

Вклад авторов. Москалев А.А. — разработка концепции; Гуватова З.Г. — подготовка и редактирование текста, утверждение окончательного варианта; Борисов П.В. — подготовка и редактирование текста; Алексеев А.А. — визуализация.

Финансирование работы. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 17-74-30030).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fedintsev, A., and Moskalev, A. (2020) Stochastic non-enzymatic modification of long-lived macromolecules — a missing hallmark of aging, *Ageing Res. Rev.*, **62**, 101097, doi: 10.1016/j.arr.2020.101097.
2. Bonnans, C., Chou, J., and Werb, Z. (2014) Remodelling the extracellular matrix in development and disease, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **15**, 786-801, doi: 10.1038/nrm3904.
3. Bateman, J. F., Boot-Handford, R. P., and Lamande, S. R. (2009) Genetic diseases of connective tissues: cellular and extracellular effects of ECM mutations, *Nat. Rev. Genet.*, **10**, 173-183, doi: 10.1038/nrg2520.
4. Brownlee, M., Cerami, A., and Vlassara, H. (1988) Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications, *N. Engl. J. Med.*, **318**, 1315-1321, doi: 10.1056/NEJM198805193182007.
5. Li, Z., Wang, X., Hong, T. P., Wang, H. J., Gao, Z. Y., and Wan, M. (2021) Advanced glycosylation end products inhibit the proliferation of bone-marrow stromal cells through activating MAPK pathway, *Eur. J. Med. Res.*, **26**, 94, doi: 10.1186/s40001-021-00559-x.
6. Omolayo, T. S., and du Plessis, S. S. (2020) Male infertility: A proximate look at the advanced glycation end products, *Reprod. Toxicol.*, **93**, 169-177, doi: 10.1016/j.reprotox.2020.02.002.
7. Verzijl, N., DeGroot, J., Thorpe, S. R., Bank, R. A., Shaw, J. N., Lyons, T. J., Bijlsma, J. W., Lafeber, F. P.,

- Baynes, J. W., and TeKoppele, J. M. (2000) Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products, *J. Biol. Chem.*, **275**, 39027-39031, doi: 10.1074/jbc.M006700200.
8. Humphrey, J. D., Dufresne, E. R., and Schwartz, M. A. (2014) Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **15**, 802-812, doi: 10.1038/nrm3896.
 9. Zhang, Q., Ames, J. M., Smith, R. D., Baynes, J. W., and Metz, T. O. (2009) A perspective on the Maillard reaction and the analysis of protein glycation by mass spectrometry: probing the pathogenesis of chronic disease, *J. Proteome Res.*, **8**, 754-769, doi: 10.1021/pr800858h.
 10. Muthyalaiyah, Y. S., Jonnalagadda, B., John, C. M., and Arockiasamy, S. (2021) Impact of Advanced Glycation End products (AGEs) and its receptor (RAGE) on cancer metabolic signaling pathways and its progression, *Glycoconj. J.*, **38**, 717-734, doi: 10.1007/s10719-021-10031-x.
 11. Doue, M., Okwieka, A., Berquand, A., Gorisse, L., Maurice, P., Velard, F., Terryn, C., Molinari, M., Duca, L., Pietrement, C., Gillery, P., and Jaisson, S. (2021) Carbamylation of elastic fibers is a molecular substratum of aortic stiffness, *Sci. Rep.*, **11**, 17827, doi: 10.1038/s41598-021-97293-5.
 12. Gorisse, L., Pietrement, C., Vuiblet, V., Schmelzer, C. E., Kohler, M., Duca, L., Debelle, L., Fornes, P., Jaisson, S., and Gillery, P. (2016) Protein carbamylation is a hallmark of aging, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 1191-1196, doi: 10.1073/pnas.1517096113.
 13. Barkovskaya, A., Buffone, A., Jr., Zidek, M., and Weaver, V. M. (2020) Proteoglycans as mediators of cancer tissue mechanics, *Front. Cell. Dev. Biol.*, **8**, 569377, doi: 10.3389/fcell.2020.569377.
 14. Kular, J. K., Basu, S., and Sharma, R. I. (2014) The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering, *J. Tissue Eng.*, **5**, 2041731414557112, doi: 10.1177/2041731414557112.
 15. Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Gialeli, C., and Karamanos, N. K. (2016) Extracellular matrix structure, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **97**, 4-27, doi: 10.1016/j.addr.2015.11.001.
 16. Cui, N., Hu, M., and Khalil, R. A. (2017) Biochemical and biological attributes of matrix metalloproteinases, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, **147**, 1-73, doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.02.005.
 17. Naba, A., Clauser, K. R., Ding, H., Whittaker, C. A., Carr, S. A., and Hynes, R. O. (2016) The extracellular matrix: tools and insights for the “omics” era, *Matrix Biol.*, **49**, 10-24, doi: 10.1016/j.matbio.2015.06.003.
 18. Birch, H. L. (2018) Extracellular matrix and ageing, *Subcell. Biochem.*, **90**, 169-190, doi: 10.1007/978-981-13-2835-0_7.
 19. Zhang, C., Zhen, Y. Z., Lin, Y. J., Liu, J., Wei, J., Xu, R., and Hu, G. (2014) KNDC1 knockdown protects human umbilical vein endothelial cells from senescence, *Mol. Med. Rep.*, **10**, 82-88, doi: 10.3892/mmr.2014.2201.
 20. Carrino, D. A., Sorrell, J. M., and Caplan, A. I. (2000) Age-related changes in the proteoglycans of human skin, *Arch. Biochem. Biophys.*, **373**, 91-101, doi: 10.1006/abbi.1999.1545.
 21. Li, M., Li, X., Liu, B., Lv, L., Wang, W., Gao, D., Zhang, Q., Jiang, J., Chai, M., Yun, Z., Tan, Y., Gong, F., Wu, Z., Zhu, Y., Ma, J., and Leng, L. (2021) Time-resolved extracellular matrix atlas of the developing human skin dermis, *Front. Cell. Dev. Biol.*, **9**, 783456, doi: 10.3389/fcell.2021.783456.
 22. Angelidis, I., Simon, L. M., Fernandez, I. E., Strunz, M., Mayr, C. H., Greiffo, F. R., Tsitsiridis, G., Ansari, M., Graf, E., Strom, T. M., Nagendran, M., Desai, T., Eickelberg, O., Mann, M., Theis, F. J., and Schiller, H. B. (2019) An atlas of the aging lung mapped by single cell transcriptomics and deep tissue proteomics, *Nat. Commun.*, **10**, 963, doi: 10.1038/s41467-019-08831-9.
 23. Elowsson Rendin, L., Lofdahl, A., Ahrman, E., Muller, C., Notermans, T., Michalikova, B., Rosmark, O., Zhou, X. H., Dellgren, G., Silverborn, M., Bjermer, L., Malmstrom, A., Larsson-Callerfelt, A. K., Isaksson, H., Malmstrom, J., and Westergren-Thorsson, G. (2019) Matrisome properties of scaffolds direct fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 4013, doi: 10.3390/ijms20164013.
 24. DeSilva, U., D'Arcangelo, G., Braden, V. V., Chen, J., Miao, G. G., Curran, T., and Green, E. D. (1997) The human reelin gene: isolation, sequencing, and mapping on chromosome 7, *Genome Res.*, **7**, 157-164, doi: 10.1101/gr.7.2.157.
 25. Lidon, L., Urrea, L., Llorens, F., Gil, V., Alvarez, I., Diez-Fairen, M., Aguilar, M., Pastor, P., Zerr, I., Alcolea, D., Lleo, A., Vidal, E., Gavin, R., Ferrer, I., and Del Rio, J. A. (2020) Disease-specific changes in reelin protein and mRNA in neurodegenerative diseases, *Cells*, **9**, 1252, doi: 10.3390/cells9051252.
 26. Chin, J., Massaro, C. M., Palop, J. J., Thwin, M. T., Yu, G. Q., Bien-Ly, N., Bender, A., and Mucke, L. (2007) Reelin depletion in the entorhinal cortex of human amyloid precursor protein transgenic mice and humans with Alzheimer's disease, *J. Neurosci.*, **27**, 2727-2733, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3758-06.2007.
 27. Sykova, E., Mazel, T., Hasenohrl, R. U., Harvey, A. R., Simonova, Z., Mulders, W. H., and Huston, J. P. (2002) Learning deficits in aged rats related to decrease in extracellular volume and loss of diffusion anisotropy in hippocampus, *Hippocampus*, **12**, 269-279, doi: 10.1002/hipo.1101.
 28. Lofaro, F. D., Cisterna, B., Lacavalla, M. A., Boschi, F., Malatesta, M., Quagliano, D., Zancanaro, C., and Boraldi, F. (2021) Age-related changes in the matrisome of the mouse skeletal muscle, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 10564, doi: 10.3390/ijms221910564.
 29. Stearns-Reider, K. M., D'Amore, A., Beezhold, K., Rothrauff, B., Cavalli, L., Wagner, W. R., Vorp, D. A.,

- Tsamis, A., Shinde, S., Zhang, C., Barchowsky, A., Rando, T. A., Tuan, R. S., and Ambrosio, F. (2017) Aging of the skeletal muscle extracellular matrix drives a stem cell fibrogenic conversion, *Aging Cell*, **16**, 518-528, doi: 10.1111/acel.12578.
30. Delire, B., Lebrun, V., Selvais, C., Henriot, P., Bertrand, A., Horsmans, Y., and Leclercq, I. A. (2016) Aging enhances liver fibrotic response in mice through hampering extracellular matrix remodeling, *Aging (Albany NY)*, **9**, 98-113, doi: 10.18632/aging.101124.
31. Yang, L., Kwon, J., Popov, Y., Gajdos, G. B., Ordog, T., Brekken, R. A., Mukhopadhyay, D., Schuppan, D., Bi, Y., Simonetto, D., and Shah, V. H. (2014) Vascular endothelial growth factor promotes fibrosis resolution and repair in mice, *Gastroenterology*, **146**, 1339-1350. e1331, doi: 10.1053/j.gastro.2014.01.061.
32. Ikenaga, N., Peng, Z. W., Vaid, K. A., Liu, S. B., Yoshida, S., Sverdlov, D. Y., Mikels-Vigdal, A., Smith, V., Schuppan, D., and Popov, Y. V. (2017) Selective targeting of lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) suppresses hepatic fibrosis progression and accelerates its reversal, *Gut*, **66**, 1697-1708, doi: 10.1136/gutjnl-2016-312473.
33. Schnabl, B., Purbeck, C. A., Choi, Y. H., Hagedorn, C. H., and Brenner, D. (2003) Replicative senescence of activated human hepatic stellate cells is accompanied by a pronounced inflammatory but less fibrogenic phenotype, *Hepatology*, **37**, 653-664, doi: 10.1053/jhep.2003.50097.
34. Krizhanovsky, V., Yon, M., Dickins, R. A., Hearn, S., Simon, J., Miething, C., Yee, H., Zender, L., and Lowe, S. W. (2008) Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis, *Cell*, **134**, 657-667, doi: 10.1016/j.cell.2008.06.049.
35. Chiao, Y. A., Ramirez, T. A., Zamilpa, R., Okoronkwo, S. M., Dai, Q., Zhang, J., Jin, Y. F., and Lindsey, M. L. (2012) Matrix metalloproteinase-9 deletion attenuates myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in ageing mice, *Cardiovasc. Res.*, **96**, 444-455, doi: 10.1093/cvr/cvs275.
36. Toba, H., de Castro Bras, L. E., Baicu, C. F., Zile, M. R., Lindsey, M. L., and Bradshaw, A. D. (2016) Increased ADAMTS1 mediates SPARC-dependent collagen deposition in the aging myocardium, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **310**, E1027-1035, doi: 10.1152/ajpendo.00040.2016.
37. Hou, C. L., Wang, M. J., Sun, C., Huang, Y., Jin, S., Mu, X. P., Chen, Y., and Zhu, Y. C. (2016) Protective effects of hydrogen sulfide in the ageing kidney, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2016**, 7570489, doi: 10.1155/2016/7570489.
38. Eikmans, M., Baelde, H. J., de Heer, E., and Bruijn, J. A. (2001) Effect of age and biopsy site on extracellular matrix mRNA and protein levels in human kidney biopsies, *Kidney Int.*, **60**, 974-981, doi: 10.1046/j.1523-1755.2001.060003974.x.
39. Oelusz, A., Nichols, L. A., Grunz-Borgmann, E. A., Chen, G., Akintola, A. D., Catania, J. M., Burghardt, R. C., Trzeciakowski, J. P., and Parrish, A. R. (2013) Overexpression of MMP-7 increases collagen 1A2 in the aging kidney, *Physiol. Rep.*, **1**, e00090, doi: 10.1002/phy2.90.
40. Zhang, X., Chen, X., Hong, Q., Lin, H., Zhu, H., Liu, Q., Wang, J., Xie, Y., Shang, X., Shi, S., Lu, Y., and Yin, Z. (2006) TIMP-1 promotes age-related renal fibrosis through upregulating ICAM-1 in human TIMP-1 transgenic mice, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **61**, 1130-1143, doi: 10.1093/gerona/61.11.1130.
41. Hultstrom, M., Leh, S., Paliege, A., Bachmann, S., Skogstrand, T., and Iversen, B. M. (2012) Collagen-binding proteins in age-dependent changes in renal collagen turnover: microarray analysis of mRNA expression, *Physiol. Genomics*, **44**, 576-586, doi: 10.1152/physiolgenomics.00186.2011.
42. Schneider, R. R., Eng, D. G., Kutz, J. N., Sweetwyne, M. T., Pippin, J. W., and Shankland, S. J. (2017) Compound effects of aging and experimental FSGS on glomerular epithelial cells, *Aging (Albany NY)*, **9**, 524-546, doi: 10.18632/aging.101176.
43. Maric, C., Sandberg, K., and Hinojosa-Laborde, C. (2004) Glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis are attenuated with 17beta-estradiol in the aging Dahl salt sensitive rat, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **15**, 1546-1556, doi: 10.1097/01.asn.0000128219.65330.ea.
44. Dengjel, J., Bruckner-Tuderman, L., and Nystrom, A. (2020) Skin proteomics – analysis of the extracellular matrix in health and disease, *Expert Rev. Proteomics*, **17**, 377-391, doi: 10.1080/14789450.2020.1773261.
45. Haydont, V., Bernard, B. A., and Fortunel, N. O. (2019) Age-related evolutions of the dermis: clinical signs, fibroblast and extracellular matrix dynamics, *Mech. Ageing Dev.*, **177**, 150-156, doi: 10.1016/j.mad.2018.03.006.
46. Quan, T., Little, E., Quan, H., Qin, Z., Voorhees, J. J., and Fisher, G. J. (2013) Elevated matrix metalloproteinases and collagen fragmentation in photodamaged human skin: impact of altered extracellular matrix microenvironment on dermal fibroblast function, *J. Invest. Dermatol.*, **133**, 1362-1366, doi: 10.1038/jid.2012.509.
47. Qin, Z., Balimunkwe, R. M., and Quan, T. (2017) Age-related reduction of dermal fibroblast size upregulates multiple matrix metalloproteinases as observed in aged human skin *in vivo*, *Br. J. Dermatol.*, **177**, 1337-1348, doi: 10.1111/bjd.15379.
48. Tewari, A., Grys, K., Kollet, J., Sarkany, R., and Young, A. R. (2014) Upregulation of MMP12 and its activity by UVA1 in human skin: potential implications for photoaging, *J. Invest. Dermatol.*, **134**, 2598-2609, doi: 10.1038/jid.2014.173.
49. Parkinson, L. G., Toro, A., Zhao, H., Brown, K., Tebbutt, S. J., and Granville, D. J. (2015) Granzyme B mediates both direct and indirect cleavage of extracellular matrix in skin after chronic low-dose ultraviolet light irradiation, *Aging Cell*, **14**, 67-77, doi: 10.1111/acel.12298.

50. Quan, T., Shao, Y., He, T., Voorhees, J. J., and Fisher, G. J. (2010) Reduced expression of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) mediates collagen loss in chronologically aged human skin, *J. Invest. Dermatol.*, **130**, 415-424, doi: 10.1038/jid.2009.224.
51. Shaulian, E., and Karin, M. (2002) AP-1 as a regulator of cell life and death, *Nat. Cell. Biol.*, **4**, E131-136, doi: 10.1038/ncb0502-e131.
52. Chiang, H. M., Chen, H. C., Chiu, H. H., Chen, C. W., Wang, S. M., and Wen, K. C. (2013) *Neonauclea reticulata* (Havil.) Merr stimulates skin regeneration after UVB exposure via ROS scavenging and modulation of the MAPK/MMPs/collagen pathway, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, **2013**, 324864, doi: 10.1155/2013/324864.
53. Kim, J., Lee, C. W., Kim, E. K., Lee, S. J., Park, N. H., Kim, H. S., Kim, H. K., Char, K., Jang, Y. P., and Kim, J. W. (2011) Inhibition effect of *Gynura procumbens* extract on UV-B-induced matrix-metalloproteinase expression in human dermal fibroblasts, *J. Ethnopharmacol.*, **137**, 427-433, doi: 10.1016/j.jep.2011.04.072.
54. Lee, Y. R., Noh, E. M., Han, J. H., Kim, J. M., Hwang, J. K., Hwang, B. M., Chung, E. Y., Kim, B. S., Lee, S. H., Lee, S. J., and Kim, J. S. (2012) Brazilin inhibits UVB-induced MMP-1/3 expressions and secretions by suppressing the NF-kappaB pathway in human dermal fibroblasts, *Eur. J. Pharmacol.*, **674**, 80-86, doi: 10.1016/j.ejphar.2011.10.016.
55. Pittayapruek, P., Meehansan, J., Prapapan, O., Komine, M., and Ohtsuki, M. (2016) Role of matrix metalloproteinases in photoaging and photocarcinogenesis, *Int. J. Mol. Sci.*, **17**, 868, doi: 10.3390/ijms17060868.
56. Vicentini, F. T., He, T., Shao, Y., Fonseca, M. J., Verri, W. A., Jr., Fisher, G. J., and Xu, Y. (2011) Quercetin inhibits UV irradiation-induced inflammatory cytokine production in primary human keratinocytes by suppressing NF-kappaB pathway, *J. Dermatol. Sci.*, **61**, 162-168, doi: 10.1016/j.jdermsci.2011.01.002.
57. Brandenberger, C., and Muhlfeld, C. (2017) Mechanisms of lung aging, *Cell Tissue Res.*, **367**, 469-480, doi: 10.1007/s00441-016-2511-x.
58. Tsukui, T., Sun, K. H., Wetter, J. B., Wilson-Kanamori, J. R., Hazelwood, L. A., Henderson, N. C., Adams, T. S., Schupp, J. C., Poli, S. D., Rosas, I. O., Kaminski, N., Matthay, M. A., Wolters, P. J., and Sheppard, D. (2020) Collagen-producing lung cell atlas identifies multiple subsets with distinct localization and relevance to fibrosis, *Nat. Commun.*, **11**, 1920, doi: 10.1038/s41467-020-15647-5.
59. Huang, Y., Xie, Y., Abel, P. W., Wei, P., Plowman, J., Toews, M. L., Strah, H., Siddique, A., Bailey, K. L., and Tu, Y. (2020) TGF-beta1-induced miR-424 promotes pulmonary myofibroblast differentiation by targeting Slit2 protein expression, *Biochem. Pharmacol.*, **180**, 114172, doi: 10.1016/j.bcp.2020.114172.
60. Schiller, H. B., Fernandez, I. E., Burgstaller, G., Schaab, C., Scheltema, R. A., Schwarzmayr, T., Strom, T. M., Eickelberg, O., and Mann, M. (2015) Time- and compartment-resolved proteome profiling of the extracellular niche in lung injury and repair, *Mol. Syst. Biol.*, **11**, 819, doi: 10.15252/msb.20156123.
61. Bell, T. J., Brand, O. J., Morgan, D. J., Salek-Ardakani, S., Jagger, C., Fujimori, T., Cholewa, L., Tilakaratna, V., Ostling, J., Thomas, M., Day, A. J., Snelgrove, R. J., and Hussell, T. (2019) Defective lung function following influenza virus is due to prolonged, reversible hyaluronan synthesis, *Matrix Biol.*, **80**, 14-28, doi: 10.1016/j.matbio.2018.06.006.
62. McQuattie-Pimentel, A. C., Ren, Z., Joshi, N., Watanabe, S., Stoeger, T., Chi, M., Lu, Z., Sichizya, L., Aillon, R. P., Chen, C. I., Soberanes, S., Chen, Z., Reyfman, P. A., Walter, J. M., Anekalla, K. R., Davis, J. M., Helmin, K. A., Runyan, C. E., Abdala-Valencia, H., Nam, K., et al. (2021) The lung microenvironment shapes a dysfunctional response of alveolar macrophages in aging, *J. Clin. Invest.*, **131**, e140299, doi: 10.1172/JCI140299.
63. Sicard, D., Haak, A. J., Choi, K. M., Craig, A. R., Fredenburgh, L. E., and Tschumperlin, D. J. (2018) Aging and anatomical variations in lung tissue stiffness, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, **314**, L946-L955, doi: 10.1152/ajplung.00415.2017.
64. Decaris, M. L., Gatmaitan, M., FlorCruz, S., Luo, F., Li, K., Holmes, W. E., Hellerstein, M. K., Turner, S. M., and Emson, C. L. (2014) Proteomic analysis of altered extracellular matrix turnover in bleomycin-induced pulmonary fibrosis, *Mol. Cell Proteomics*, **13**, 1741-1752, doi: 10.1074/mcp.M113.037267.
65. Schiller, H. B., Mayr, C. H., Leuschner, G., Strunz, M., Staab-Weijnitz, C., Preisendorfer, S., Eckes, B., Moynzadeh, P., Krieg, T., Schwartz, D. A., Hatz, R. A., Behr, J., Mann, M., and Eickelberg, O. (2017) Deep proteome profiling reveals common prevalence of MZB1-positive plasma B cells in human lung and skin fibrosis, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **196**, 1298-1310, doi: 10.1164/rccm.201611-2263OC.
66. Song, I., and Dityatev, A. (2018) Crosstalk between glia, extracellular matrix and neurons, *Brain Res. Bull.*, **136**, 101-108, doi: 10.1016/j.brainresbull.2017.03.003.
67. Hayani, H., Song, I., and Dityatev, A. (2018) Increased excitability and reduced excitatory synaptic input into fast-spiking CA2 interneurons after enzymatic attenuation of extracellular matrix, *Front. Cell Neurosci.*, **12**, 149, doi: 10.3389/fncel.2018.00149.
68. Dauth, S., Grevesse, T., Pantazopoulos, H., Campbell, P. H., Maoz, B. M., Berretta, S., and Parker, K. K. (2016) Extracellular matrix protein expression is brain region dependent, *J. Comp. Neurol.*, **524**, 1309-1336, doi: 10.1002/cne.23965.
69. Reed, M. J., Damodarasamy, M., Pathan, J. L., Erickson, M. A., Banks, W. A., and Vernon, R. B. (2018) The effects of normal aging on regional accumulation

- of hyaluronan and chondroitin sulfate proteoglycans in the mouse brain, *J. Histochem. Cytochem.*, **66**, 697-707, doi: 10.1369/0022155418774779.
70. Yamada, J., Nadanaka, S., Kitagawa, H., Takeuchi, K., and Jinno, S. (2018) Increased synthesis of chondroitin sulfate proteoglycan promotes adult hippocampal neurogenesis in response to enriched environment, *J. Neurosci.*, **38**, 8496-8513, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0632-18.2018.
 71. Cope, E. C., and Gould, E. (2019) Adult neurogenesis, glia, and the extracellular matrix, *Cell Stem Cell*, **24**, 690-705, doi: 10.1016/j.stem.2019.03.023.
 72. David, L. S., Schachner, M., and Saghatelian, A. (2013) The extracellular matrix glycoprotein tenascin-R affects adult but not developmental neurogenesis in the olfactory bulb, *J. Neurosci.*, **33**, 10324-10339, doi: 10.1523/JNEUROSCI.5728-12.2013.
 73. Xu, J. C., Xiao, M. F., Jakovcevski, I., Sivukhina, E., Hargus, G., Cui, Y. F., Irintchev, A., Schachner, M., and Bernreuther, C. (2014) The extracellular matrix glycoprotein tenascin-R regulates neurogenesis during development and in the adult dentate gyrus of mice, *J. Cell Sci.*, **127**, 641-652, doi: 10.1242/jcs.137612.
 74. Xie, K., Liu, Y., Hao, W., Walter, S., Penke, B., Hartmann, T., Schachner, M., and Fassbender, K. (2013) Tenascin-C deficiency ameliorates Alzheimer's disease-related pathology in mice, *Neurobiol. Aging*, **34**, 2389-2398, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.04.013.
 75. Freitas, A., Aroso, M., Rocha, S., Ferreira, R., Vitorino, R., and Gomez-Lazaro, M. (2021) Bioinformatic analysis of the human brain extracellular matrix proteome in neurodegenerative disorders, *Eur. J. Neurosci.*, **53**, 4016-4033, doi: 10.1111/ejn.15316.
 76. Morawski, M., Filippov, M., Tzinia, A., Tsilibary, E., and Vargova, L. (2014) ECM in brain aging and dementia, *Prog. Brain Res.*, **214**, 207-227, doi: 10.1016/B978-0-444-63486-3.00010-4.
 77. Sun, Y., Xu, S., Jiang, M., Liu, X., Yang, L., Bai, Z., and Yang, Q. (2021) Role of the extracellular matrix in Alzheimer's disease, *Front. Aging Neurosci.*, **13**, 707466, doi: 10.3389/fnagi.2021.707466.
 78. Dayon, L., Nunez Galindo, A., Wojcik, J., Cominetti, O., Cortesy, J., Oikonomidi, A., Henry, H., Kussmann, M., Migliavacca, E., Severin, I., Bowman, G. L., and Popp, J. (2018) Alzheimer disease pathology and the cerebrospinal fluid proteome, *Alzheimers Res. Ther.*, **10**, 66, doi: 10.1186/s13195-018-0397-4.
 79. Mohammadi, A., Rashidi, E., and Amooeian, V. G. (2018) Brain, blood, cerebrospinal fluid, and serum biomarkers in schizophrenia, *Psychiatry Res.*, **265**, 25-38, doi: 10.1016/j.psychres.2018.04.036.
 80. Wang, S., Brunne, B., Zhao, S., Chai, X., Li, J., Lau, J., Failla, A. V., Zobiak, B., Sibbe, M., Westbrook, G. L., Lutz, D., and Frotscher, M. (2018) Trajectory analysis unveils Reelin's role in the directed migration of granule cells in the dentate gyrus, *J. Neurosci.*, **38**, 137-148, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0988-17.2017.
 81. Bosch, C., Masachs, N., Exposito-Alonso, D., Martinez, A., Teixeira, C. M., Feraud, I., Pujadas, L., Ulloa, F., Comella, J. X., DeFelipe, J., Merchán-Pérez, A., and Soriano, E. (2016) Reelin regulates the maturation of dendritic spines, synaptogenesis and glial ensheathment of newborn granule cells, *Cereb. Cortex*, **26**, 4282-4298, doi: 10.1093/cercor/bhw216.
 82. Long, J. M., Perez, E. J., Roberts, J. A., Roberts, M. T., and Rapp, P. R. (2020) Reelin in the Years: decline in the number of reelin immunoreactive neurons in layer II of the entorhinal cortex in aged monkeys with memory impairment, *Neurobiol. Aging*, **87**, 132-137, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2019.12.010.
 83. Marckx, A. T., Fritschle, K. E., Calvier, L., and Herz, J. (2021) Reelin changes hippocampal learning in aging and Alzheimer's disease, *Behav. Brain Res.*, **414**, 113482, doi: 10.1016/j.bbr.2021.113482.
 84. Rogers, J. T., Rusiana, I., Trotter, J., Zhao, L., Donaldson, E., Pak, D. T., Babus, L. W., Peters, M., Banko, J. L., Chavis, P., Rebeck, G. W., Hoe, H. S., and Weeber, E. J. (2011) Reelin supplementation enhances cognitive ability, synaptic plasticity, and dendritic spine density, *Learn Mem.*, **18**, 558-564, doi: 10.1101/lm.2153511.
 85. Larsson, L., Degens, H., Li, M., Salviati, L., Lee, Y. I., Thompson, W., Kirkland, J. L., and Sandri, M. (2019) Sarcopenia: aging-related loss of muscle mass and function, *Physiol. Rev.*, **99**, 427-511, doi: 10.1152/physrev.00061.2017.
 86. Csapo, R., Gumpfenberger, M., and Wessner, B. (2020) Skeletal muscle extracellular matrix – what do we know about its composition, regulation, and physiological roles? A narrative review, *Front. Physiol.*, **11**, 253, doi: 10.3389/fphys.2020.00253.
 87. Fry, C. S., Kirby, T. J., Kosmac, K., McCarthy, J. J., and Peterson, C. A. (2017) Myogenic progenitor cells control extracellular matrix production by fibroblasts during skeletal muscle hypertrophy, *Cell Stem Cell*, **20**, 56-69, doi: 10.1016/j.stem.2016.09.010.
 88. Zhang, W., Liu, Y., and Zhang, H. (2021) Extracellular matrix: an important regulator of cell functions and skeletal muscle development, *Cell Biosci.*, **11**, 65, doi: 10.1186/s13578-021-00579-4.
 89. Lacraz, G., Rouleau, A. J., Couture, V., Sollrard, T., Drouin, G., Veillette, N., Grandbois, M., and Grenier, G. (2015) Increased stiffness in aged skeletal muscle impairs muscle progenitor cell proliferative activity, *PLoS One*, **10**, e0136217, doi: 10.1371/journal.pone.0136217.
 90. Liu, X., Gao, Y., Long, X., Hayashi, T., Mizuno, K., Hattori, S., Fujisaki, H., Ogura, T., Wang, D. O., and Ikejima, T. (2020) Type I collagen promotes the migration and myogenic differentiation of C2C12 myoblasts via the release of interleukin-6 mediated by FAK/NF-kappaB p65 activation, *Food Funct.*, **11**, 328-338, doi: 10.1039/c9fo01346f.
 91. Mahdy, M. A. A. (2019) Skeletal muscle fibrosis: an overview, *Cell Tissue Res.*, **375**, 575-588, doi: 10.1007/s00441-018-2955-2.

92. Baghdadi, M. B., Castel, D., Machado, L., Fukada, S. I., Birk, D. E., Relaix, F., Tajbakhsh, S., and Mourikis, P. (2018) Reciprocal signalling by Notch-Collagen V-CALCR retains muscle stem cells in their niche, *Nature*, **557**, 714-718, doi: 10.1038/s41586-018-0144-9.
93. Haus, J. M., Carrithers, J. A., Trappe, S. W., and Trappe, T. A. (2007) Collagen, cross-linking, and advanced glycation end products in aging human skeletal muscle, *J. Appl. Physiol. (1985)*, **103**, 2068-2076, doi: 10.1152/jappphysiol.00670.2007.
94. Hindle, A. G., Horning, M., Mellish, J. A., and Lawler, J. M. (2009) Diving into old age: muscular senescence in a large-bodied, long-lived mammal, the Weddell seal (*Leptonychotes weddellii*), *J. Exp. Biol.*, **212**, 790-796, doi: 10.1242/jeb.025387.
95. Kanazawa, Y., Nagano, M., Koinuma, S., Sugiyo, S., and Shigeyoshi, Y. (2021) Effects of aging on basement membrane-related gene expression of the skeletal muscle in rats, *Biomed. Res.*, **42**, 115-119, doi: 10.2220/biomedres.42.115.
96. Ducomps, C., Mauriege, P., Darche, B., Combes, S., Lebas, F., and Doutreloux, J. P. (2003) Effects of jump training on passive mechanical stress and stiffness in rabbit skeletal muscle: role of collagen, *Acta Physiol. Scand.*, **178**, 215-224, doi: 10.1046/j.1365-201X.2003.01109.x.
97. Svensson, R. B., Smith, S. T., Moyer, P. J., and Magnusson, S. P. (2018) Effects of maturation and advanced glycation on tensile mechanics of collagen fibrils from rat tail and Achilles tendons, *Acta Biomater.*, **70**, 270-280, doi: 10.1016/j.actbio.2018.02.005.
98. Chiappalupi, S., Sorci, G., Vukasinovic, A., Salvadori, L., Sagheddu, R., Coletti, D., Renga, G., Romani, L., Donato, R., and Riuzzi, F. (2020) Targeting RAGE prevents muscle wasting and prolongs survival in cancer cachexia, *J. Cachexia Sarcopenia Muscle*, **11**, 929-946, doi: 10.1002/jcsm.12561.
99. Sagheddu, R., Chiappalupi, S., Salvadori, L., Riuzzi, F., Donato, R., and Sorci, G. (2018) Targeting RAGE as a potential therapeutic approach to Duchenne muscular dystrophy, *Hum. Mol. Genet.*, **27**, 3734-3746, doi: 10.1093/hmg/ddy288.
100. Olson, L. C., Redden, J. T., Schwartz, Z., Cohen, D. J., and McClure, M. J. (2021) Advanced glycation end-products in skeletal muscle aging, *Bioengineering (Basel)*, **8**, 168, doi: 10.3390/bioengineering8110168.
101. Ramamurthy, B., and Larsson, L. (2013) Detection of an aging-related increase in advanced glycation end products in fast- and slow-twitch skeletal muscles in the rat, *Biogerontology*, **14**, 293-301, doi: 10.1007/s10522-013-9430-y.
102. Inagaki, Y., and Okazaki, I. (2007) Emerging insights into transforming growth factor beta Smad signal in hepatic fibrogenesis, *Gut*, **56**, 284-292, doi: 10.1136/gut.2005.088690.
103. Dewidar, B., Meyer, C., Dooley, S., and Meindl-Beinker, A. N. (2019) TGF-beta in hepatic Stellate cell activation and liver fibrogenesis – updated 2019, *Cells*, **8**, 1419, doi: 10.3390/cells8111419.
104. Lachowski, D., Cortes, E., Rice, A., Pinato, D., Rombouts, K., and Del Rio Hernandez, A. (2019) Matrix stiffness modulates the activity of MMP-9 and TIMP-1 in hepatic stellate cells to perpetuate fibrosis, *Sci. Rep.*, **9**, 7299, doi: 10.1038/s41598-019-43759-6.
105. Conroy, K. P., Kitto, L. J., and Henderson, N. C. (2016) α v integrins: key regulators of tissue fibrosis, *Cell Tissue Res.*, **365**, 511-519, doi: 10.1007/s00441-016-2407-9.
106. Hinz, B. (2015) The extracellular matrix and transforming growth factor-beta1: tale of a strained relationship, *Matrix Biol.*, **47**, 54-65, doi: 10.1016/j.matbio.2015.05.006.
107. Giancotti, F. G., and Ruoslahti, E. (1999) Integrin signaling, *Science*, **285**, 1028-1032, doi: 10.1126/science.285.5430.1028.
108. Henderson, N. C., and Sheppard, D. (2013) Integrin-mediated regulation of TGFbeta in fibrosis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1832**, 891-896, doi: 10.1016/j.bbadis.2012.10.005.
109. Heldin, C. H., and Westermark, B. (1999) Mechanism of action and *in vivo* role of platelet-derived growth factor, *Physiol. Rev.*, **79**, 1283-1316, doi: 10.1152/physrev.1999.79.4.1283.
110. Ogawa, S., Ochi, T., Shimada, H., Inagaki, K., Fujita, I., Nii, A., Moffat, M. A., Katragadda, M., Violland, B. N., Arch, R. H., and Masferrer, J. L. (2010) Anti-PDGF-B monoclonal antibody reduces liver fibrosis development, *Hepatol. Res.*, **40**, 1128-1141, doi: 10.1111/j.1872-034X.2010.00718.x.
111. Wang, Y., Gao, J., Zhang, D., Zhang, J., Ma, J., and Jiang, H. (2010) New insights into the antifibrotic effects of sorafenib on hepatic stellate cells and liver fibrosis, *J. Hepatol.*, **53**, 132-144, doi: 10.1016/j.jhep.2010.02.027.
112. Khurana, A., Sayed, N., Allawadhi, P., and Weiskirchen, R. (2021) It's all about the spaces between cells: role of extracellular matrix in liver fibrosis, *Ann. Transl. Med.*, **9**, 728, doi: 10.21037/atm-20-2948.
113. Wang, Y., Yang, F., Xue, J., Zhou, X., Luo, L., Ma, Q., Chen, Y. F., Zhang, J., Zhang, S. L., and Zhao, L. (2017) Antischistosomiasis liver fibrosis effects of chlorogenic acid through IL-13/miR-21/Smad7 signaling interactions *in vivo* and *in vitro*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **61**, e01347-16, doi: 10.1128/AAC.01347-16.
114. Yang, F., Luo, L., Zhu, Z. D., Zhou, X., Wang, Y., Xue, J., Zhang, J., Cai, X., Chen, Z. L., Ma, Q., Chen, Y. F., Wang, Y. J., Luo, Y. Y., Liu, P., and Zhao, L. (2017) Chlorogenic acid inhibits liver fibrosis by blocking the miR-21-regulated TGF-beta1/Smad7 signaling pathway *in vitro* and *in vivo*, *Front. Pharmacol.*, **8**, 929, doi: 10.3389/fphar.2017.00929.
115. Shi, H., Shi, A., Dong, L., Lu, X., Wang, Y., Zhao, J., Dai, F., and Guo, X. (2016) Chlorogenic acid protects against liver fibrosis *in vivo* and *in vitro* through inhibition of oxidative stress, *Clin. Nutr.*, **35**, 1366-1373, doi: 10.1016/j.clnu.2016.03.002.

116. Shi, H., Dong, L., Bai, Y., Zhao, J., Zhang, Y., and Zhang, L. (2009) Chlorogenic acid against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats, *Eur. J. Pharmacol.*, **623**, 119-124, doi: 10.1016/j.ejphar.2009.09.026.
117. Shi, H., Dong, L., Jiang, J., Zhao, J., Zhao, G., Dang, X., Lu, X., and Jia, M. (2013) Chlorogenic acid reduces liver inflammation and fibrosis through inhibition of toll-like receptor 4 signaling pathway, *Toxicology*, **303**, 107-114, doi: 10.1016/j.tox.2012.10.025.
118. Nwafor, E. O., Lu, P., Zhang, Y., Liu, R., Peng, H., Xing, B., Liu, Y., Li, Z., Zhang, K., Zhang, Y., and Liu, Z. (2022) Chlorogenic acid: Potential source of natural drugs for the therapeutics of fibrosis and cancer, *Transl. Oncol.*, **15**, 101294, doi: 10.1016/j.tranon.2021.101294.
119. Denic, A., Glasscock, R. J., and Rule, A. D. (2016) Structural and functional changes with the aging kidney, *Adv. Chronic Kidney Dis.*, **23**, 19-28, doi: 10.1053/j.ackd.2015.08.004.
120. Lakatta, E. G. (2015) So! What's aging? Is cardiovascular aging a disease? *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **83**, 1-13, doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.04.005.
121. Sataranatarajan, K., Feliars, D., Mariappan, M. M., Lee, H. J., Lee, M. J., Day, R. T., Yalamanchili, H. B., Choudhury, G. G., Barnes, J. L., Van Remmen, H., Richardson, A., and Kasinath, B. S. (2012) Molecular events in matrix protein metabolism in the aging kidney, *Aging Cell*, **11**, 1065-1073, doi: 10.1111/accel.12008.
122. Randles, M., Lausecker, F., Kong, Q., Suleiman, H., Reid, G., Kolatsi-Joannou, M., Tian, P., Falcone, S., Davenport, B., Potter, P., Van Agtmael, T., Norman, J., Long, D., Humphries, M., Miner, J., and Lennon, R. (2021) Identification of an altered matrix signature in kidney aging and disease, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **32**, 1713-1732, doi: 10.1681/ASN.2020101442.
123. Hewitson, T. D. (2012) Fibrosis in the kidney: is a problem shared a problem halved? *Fibrogenesis Tissue Repair*, **5**, S14, doi: 10.1186/1755-1536-5-S1-S14.
124. Bolignano, D., Mattace-Raso, F., Sijbrands, E. J., and Zoccali, C. (2014) The aging kidney revisited: a systematic review, *Ageing Res. Rev.*, **14**, 65-80, doi: 10.1016/j.arr.2014.02.003.
125. Meng, X. M., and Lan, H. Y. (2018) Transforming growth factor-beta and renal fibrosis [in Chinese], *Sheng Li Xue Bao*, **70**, 612-622.
126. Lin, C. H., Chen, J., Zhang, Z., Johnson, G. V., Cooper, A. J., Feola, J., Bank, A., Shein, J., Ruotsalainen, H. J., Pihlajaniemi, T. A., and Goligorsky, M. S. (2016) Endostatin and transglutaminase 2 are involved in fibrosis of the aging kidney, *Kidney Int.*, **89**, 1281-1292, doi: 10.1016/j.kint.2016.01.030.
127. Prat-Duran, J., Pinilla, E., Norregaard, R., Simonsen, U., and Buus, N. H. (2021) Transglutaminase 2 as a novel target in chronic kidney disease – methods, mechanisms and pharmacological inhibition, *Pharmacol. Ther.*, **222**, 107787, doi: 10.1016/j.pharmthera.2020.107787.
128. Paneni, F., Costantino, S., and Cosentino, F. (2015) Molecular pathways of arterial aging, *Clin. Sci. (Lond)*, **128**, 69-79, doi: 10.1042/CS20140302.
129. Jana, S., Hu, M., Shen, M., and Kassiri, Z. (2019) Extracellular matrix, regional heterogeneity of the aorta, and aortic aneurysm, *Exp. Mol. Med.*, **51**, 1-15, doi: 10.1038/s12276-019-0286-3.
130. Hanada, K., Vermeij, M., Garinis, G. A., de Waard, M. C., Kunen, M. G., Myers, L., Maas, A., Duncker, D. J., Meijers, C., Dietz, H. C., Kanaar, R., and Essers, J. (2007) Perturbations of vascular homeostasis and aortic valve abnormalities in fibulin-4 deficient mice, *Circ. Res.*, **100**, 738-746, doi: 10.1161/01.RES.0000260181.19449.95.
131. Steppan, J., Wang, H., Bergman, Y., Rauer, M. J., Tan, S., Jandu, S., Nandakumar, K., Barreto-Ortiz, S., Cole, R. N., Boronina, T. N., Zhu, W., Halushka, M. K., An, S. S., Berkowitz, D. E., and Santhanam, L. (2019) Lysyl oxidase-like 2 depletion is protective in age-associated vascular stiffening, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **317**, H49-H59, doi: 10.1152/ajpheart.00670.2018.
132. Nascimento, R. A., Possomato-Vieira, J. S., Bonacio, G. F., Rizzi, E., and Dias-Junior, C. A. (2019) Reductions of circulating nitric oxide are followed by hypertension during pregnancy and increased activity of matrix metalloproteinases-2 and -9 in rats, *Cells*, **8**, 1402, doi: 10.3390/cells8111402.
133. Radosinska, J., Barancik, M., and Vrbjar, N. (2017) Heart failure and role of circulating MMP-2 and MMP-9, *Panminerva Med.*, **59**, 241-253, doi: 10.23736/S0031-0808.17.03321-3.
134. Yabluchanskiy, A., Ma, Y., Chiao, Y. A., Lopez, E. F., Voorhees, A. P., Toba, H., Hall, M. E., Han, H. C., Lindsey, M. L., and Jin, Y. F. (2014) Cardiac aging is initiated by matrix metalloproteinase-9-mediated endothelial dysfunction, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **306**, H1398-1407, doi: 10.1152/ajpheart.00090.2014.
135. Meschiari, C. A., Ero, O. K., Pan, H., Finkel, T., and Lindsey, M. L. (2017) The impact of aging on cardiac extracellular matrix, *Geroscience*, **39**, 7-18, doi: 10.1007/s11357-017-9959-9.
136. Spiecker, M. (2006) Heart failure in elderly patients, *Exp. Gerontol.*, **41**, 549-551, doi: 10.1016/j.exger.2006.03.002.
137. Diez-Villanueva, P., and Alfonso, F. (2016) Heart failure in the elderly, *J. Geriatr. Cardiol.*, **13**, 115-117, doi: 10.11909/j.issn.1671-5411.2016.02.009.
138. Mendes, A. B. L., Ferro, M., Rodrigues, B., Souza, M. R., Araujo, R. C., and Souza, R. R. (2012) Quantification of left ventricular myocardial collagen system in children, young adults, and the elderly, *Medicina (B Aires)*, **72**, 216-220.
139. Horn, M. A., and Trafford, A. W. (2016) Aging and the cardiac collagen matrix: Novel mediators of

- fibrotic remodelling, *J. Mol. Cell Cardiol.*, **93**, 175-185, doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.11.005.
140. De Castro Bras, L. E., Toba, H., Baicu, C. F., Zile, M. R., Weintraub, S. T., Lindsey, M. L., and Bradshaw, A. D. (2014) Age and SPARC change the extracellular matrix composition of the left ventricle, *Biomed. Res. Int.*, **2014**, 810562, doi: 10.1155/2014/810562.
141. Hardy, S. A., Mabotuwana, N. S., Murtha, L. A., Coulter, B., Sanchez-Bezanilla, S., Al-Omary, M. S., Senanayake, T., Loering, S., Starkey, M., Lee, R. J., Rainer, P. P., Hansbro, P. M., and Boyle, A. J. (2019) Novel role of extracellular matrix protein 1 (ECM1) in cardiac aging and myocardial infarction, *PLoS One*, **14**, e0212230, doi: 10.1371/journal.pone.0212230.
142. Li, S. Y., Du, M., Dolence, E. K., Fang, C. X., Mayer, G. E., Ceylan-Isik, A. F., LaCour, K. H., Yang, X., Wilbert, C. J., Sreejayan, N., and Ren, J. (2005) Aging induces cardiac diastolic dysfunction, oxidative stress, accumulation of advanced glycation endproducts and protein modification, *Aging Cell*, **4**, 57-64, doi: 10.1111/j.1474-9728.2005.00146.x.
143. Campbell, D. J., Somaratne, J. B., Jenkins, A. J., Prior, D. L., Yui, M., Kenny, J. F., Newcomb, A. E., Schalkwijk, C. G., Black, M. J., and Kelly, D. J. (2012) Diastolic dysfunction of aging is independent of myocardial structure but associated with plasma advanced glycation end-product levels, *PLoS One*, **7**, e49813, doi: 10.1371/journal.pone.0049813.

AGE RELATED CHANGES OF THE EXTRACELLULAR MATRIX

Review

Z. G. Guvatova^{1,2}, P. V. Borisov¹, A. A. Alekseev², and A. A. Moskalev^{1,2*}

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia; E-mail: amoskalev@list.ru

² Russian Clinical Research Center for Gerontology, Pirogov Russian National Research Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 129226 Moscow, Russia

The extracellular matrix (ECM) is an extracellular tissue structure that, in addition to mechanical support to the cell, is involved in the regulation of many cellular processes, including chemical transport, growth, migration, differentiation, and cellular senescence. Age-related changes in the structure and composition of the matrix and the increasing ECM stiffness with age affect the functioning of many tissues and contribute to the development of various pathological conditions. This review considers the age-related changes of the ECM in various tissues and organs, in particular, the effect on aging is discussed.

Keywords: extracellular matrix, aging

УДК 577.24

SkQ1 КАК ИНСТРУМЕНТ ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ПРОГРАММУ ПРЕЖДЕВРЕМЕННОГО СТАРЕНИЯ: ОПЫТ ИССЛЕДОВАНИЙ НА КРЫСАХ OXYS

Обзор

© 2022 Н.Г. Колосова^{1*}, О.С. Кожевникова¹, Н.А. Муралёва¹, Е.А. Рудницкая¹,
Ю.В. Румянцева¹, Н.А. Стефанова¹, Д.В. Телегина¹, М.А. Тюменцев¹, А.Ж. Фурсова^{1,2}

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН,
630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: kolosova@bionet.nsc.ru

² Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России,
630091 Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 28.09.2022

После доработки 06.10.2022

Принята к публикации 06.10.2022

Согласно концепции В.П. Скулачева и соавторов, старение живых организмов может рассматриваться как частный случай запрограммированной смерти организма – феноптоза, а тормозить как острый феноптоз, так и хронический – старение – способен митохондриальный антиоксидант SkQ1. Авторы концепции связывают эффекты SkQ1 с подавлением усиленной генерации активных форм кислорода, вырабатываемых митохондриями. Многочисленные исследования подтвердили способность SkQ1 тормозить проявления «здорового», или физиологического, старения. Согласно результатам наших исследований, особенно эффективно он подавляет программу генетически детерминированного преждевременного старения крыс OXYS – раннее развитие комплекса возраст-зависимых заболеваний: катаракты, ретинопатии, аналогичной возрастной макулярной дегенерации у людей, остеопороза и признаков болезни Альцгеймера. Преждевременное старение крыс OXYS связано с дисфункцией митохондрий, но при этом прямых ассоциаций с окислительным стрессом выявлено не было. Тем не менее SkQ1 способен предупреждать и/или подавлять развитие всех проявлений преждевременного старения крыс OXYS. Его эффекты обусловлены воздействием на активность многих сигнальных путей и процессов, но прежде всего – восстановлением структурно-функциональных параметров митохондрий. Можно полагать, что использование SkQ1 станет перспективной стратегией в профилактике ускоренного феноптоза – раннего развития комплекса возраст-зависимых заболеваний (мультиморбидности) у предрасположенных к нему людей.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: феноптоз, старение, митохондриальный антиоксидант SkQ1, преждевременно стареющие крысы OXYS.

DOI: 10.31857/S0320972522120119, **EDN:** NGVYTE

ВВЕДЕНИЕ

За последнее десятилетие получен ряд новых аргументов в пользу того, что старение живых организмов может рассматриваться как частный случай запрограммированной смерти организма – феноптоза [1–3]. Авторы этой концепции утверждают, что подавлять как

острый феноптоз, так и хронический – старение – способен митохондриальный антиоксидант SkQ (пластохинонил-децилтрифенилфосфоний). Многочисленные исследования подтвердили, что SkQ1 может тормозить проявления «здорового», или физиологического старения, но, согласно нашим результатам, полученным на крысах OXYS, особенно эффек-

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; БА – болезнь Альцгеймера; ВМД – возрастная макулярная дегенерация; РПЭ – ретинальный пигментный эпителий; Аβ – амилоид бета; GH – гормон роста; MAPK – митоген-активируемые протеинкиназы; PEDF – фактор пигментного эпителия; SkQ1 – пластохинонил-децилтрифенилфосфоний; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов.

* Адресат для корреспонденции.

тивно он подавляет программу генетически детерминированного синдрома преждевременного старения. Преждевременное старение проявляется развитием возраст-зависимых заболеваний в более раннем возрасте, в то время как их более позднее развитие становится основой успешного старения, долголетия. Как известно, неблагоприятные генетические варианты способствуют как более раннему старению, так и его множественным проявлениям – увеличению числа коморбидных состояний. Более 60% людей старше 65 лет страдают не одним, а несколькими заболеваниями [4], «набор» и возраст манифестации которых определяют генетические и экологические факторы, качество жизни, доступность медицины. Выяснение молекулярно-генетических предпосылок преждевременного старения и разработка надёжных способов его профилактики – основа увеличения здорового периода жизни людей. Результаты наших исследований на уникальной модели преждевременного старения – линии крыс OXYS – свидетельствуют о перспективности использования для профилактики преждевременного старения митохондриального антиоксиданта SkQ1.

Линия крыс OXYS (ИЦиГ СО РАН) была создана путём отбора чувствительных к катарактогенному эффекту галактозы крыс Вистар [5]. Только в пяти первых поколениях развитие катаракты вызывали обогащённой галактозой диетой, в дальнейшем отбор продолжался по ранней спонтанной катаракте, сцепленно с которой животные унаследовали синдром преждевременного старения, который проявляется ранним развитием фенотипа, сходного с гериатрическими заболеваниями человека [5–7]. Катаракта остаётся признаком, по которому контролируется состояние линии, при этом остальные признаки устойчиво проявляются спонтанно. У крыс OXYS на фоне умеренно повышенного кровяного давления [8] и ускоренной инволюции тимуса [9] уже в молодом возрасте, помимо катаракты, развиваются ретинопатия, по клиническим, морфологическим и молекулярным признакам аналогичная возрастной макулярной дегенерации (ВМД) у людей [10–11], остеопороз [12], саркопения [13], гипертрофическая кардиомиопатия [8] и ускоренное старение мозга с характерными для болезни Альцгеймера (БА) признаками [6]. Отсутствие мутаций в генах (*App*, *Psen1* и *Psen2*), специфичных для семейной формы этого заболевания, позволяет рассматривать крыс OXYS, как уникальную селекционную модель наиболее распространённой (>95% случаев) спорадической формы БА [7].

Все эти патологические состояния связывают с окислительным стрессом – нарушением баланса в системах генерации и детоксикации активных форм кислорода (АФК), но повышенный уровень окислительных повреждённых липидов, белков и ДНК регистрируется в тканях крыс OXYS позже, чем происходит манифестация признаков преждевременного старения [14]. Как наиболее вероятная причина преждевременного старения крыс OXYS рассматривается дисфункция митохондрий, выявленная сначала в печени [15], затем – в мышцах [13] и миокарде [16], а в последние годы – и в структурах мозга [17]. Установлено, что структурно-функциональные изменения митохондрий в структурах мозга крыс OXYS предшествуют и сопутствуют развитию характерных признаков БА, однако повышенная по сравнению с контролем генерация АФК митохондриями мозга была выявлена только у 20-дневных крыс OXYS – в период, когда эти признаки ещё не выражены [6, 17]. Отсутствие непосредственной связи между ранним развитием нейродегенеративных изменений и окислительным стрессом подтвердил и анализ транскриптомов сетчатки, коры мозга и гиппокампа крыс OXYS разного возраста [11, 18–20].

Представление о том, что митохондрии играют ключевую роль в старении и развитии связанных с ним заболеваний, было впервые сформулировано Harman [21] в рамках гипотезы митохондриальной свободнорадикальной теории старения, согласно которой старение обусловлено накоплением повреждений, вызванных образованием АФК. Однако в дальнейшем стало очевидным, что усиленная генерация АФК не является ни инициатором, ни основной причиной старения [22]. Более того, эпизодическое усиление митохондриями генерации АФК, играющих важную регуляторную роль, вызывает изменения, способные увеличить продолжительность жизни организма [23]. Также оказалось, что дисфункция митохондрий может способствовать старению независимо от образования АФК, что не только их метаболическая дисфункция, но и нарушения митохондриальной динамики и коммуникации с другими органеллами, в частности, с эндоплазматическим ретикуломом, также способствуют старению [24–27]. Примечательно, что у крыс OXYS в той или иной мере проявляются нарушения всех этих процессов, но наиболее ярким отличием от контрольных крыс Вистар становится уменьшение удельного количества митохондрий: в структурах мозга – в 1,5 раза в период активного развития признаков БА и вдвое – при выраженных нейродегенеративных

изменениях [17]. На связь преждевременного старения крыс OXYS с дисфункцией митохондрий указывает и то, что среди выявленных в их геноме однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), способных приводить к аномалиям в структуре и/или функциях белков и влиять на развитие их фенотипа, есть SNP в генах, ассоциированных с митохондриями [28, 29].

Таким образом, мы не выявили связи преждевременного старения крыс OXYS с окислительным стрессом. Но в то же время получили убедительные доказательства того, что SkQ1, эффекты которого его создатели связывают прежде всего с подавлением генерации АФК [2], существенно подавляет и/или замедляет развитие всех исследованных признаков преждевременного старения крыс OXYS. Важно, что антиоксидант в малых дозах проявляет не только профилактические, но и лечебные эффекты – способен в той или иной мере снижать выраженность уже развитых проявлений преждевременного старения крыс OXYS, тормозить их прогрессию.

СИСТЕМНЫЕ ЭФФЕКТЫ SkQ1

Очевидно, что при приёме SkQ1 с кормом он оказывает системное воздействие на организм. Одним из наиболее ярких изменений при старении не только иммунной системы, но и организма млекопитающих в целом является прогрессирующая инволюция тимуса, связанная с повышением восприимчивости к инфекциям, аутоиммунным заболеваниям и раку [30]. Как показали наши исследования, у крыс OXYS скорость возрастной инволюции тимуса существенно выше, чем у материнской линии – крыс Вистар [9]. Приём с пищей SkQ1 в низких дозах (250 нмоль/кг в день в возрасте от 1,5 до 14 мес.) подавлял возрастную инволюцию тимуса как у крыс Вистар, так и у крыс OXYS: сохранял общую массу и объём органа (объём коры и мозгового вещества тимуса, клеточность тимуса, количество и соотношение клеток CD3⁺, CD4⁺ и CD8⁺ в нём). При этом эффект SkQ1 был более выраженным у крыс OXYS. Таким образом, SkQ1 замедляет связанные со старением изменения иммунной системы [9].

Уровень циркулирующего гормона роста (GH) наиболее высок в неонатальный период, затем он снижается, снова возрастает в период полового созревания и резко снижается у пожилых людей [31]. Его снижение при старении людей и грызунов коррелирует со снижением уровня в сыворотке крови анабо-

лического медиатора IGF-1 [32]. Как показали наши исследования, с возрастом уровни GH и IGF-1 закономерно снижаются у крыс обеих линий, но при этом, начиная с молодого возраста, уровень GH в сыворотке крови крыс OXYS ниже, чем у крыс Вистар, в то время как сниженный уровень IGF-1 выявляется в возрасте полутора лет и старше. Приём SkQ1 в возрасте 19–23 мес. не только остановил снижение, но и повысил уровни GH и IGF-1 выше тех, что были зарегистрированы у 19-месячных животных. Примечательно, что приём препарата сравнения – антиоксиданта N-ацетил-L-цистеина – оказался менее эффективным, несмотря на то что он принимался в 16 000 раз большей дозе [33]. Также SkQ1 замедлил возрастное снижение уровня лейкоцитов и дегидроэпиандростерона (DHEA) в крови животных. Известно, что соотношение GH/IGF-1 играет важную роль в старении мозга, и снижение с возрастом активности соматотропной оси влияет на функции мозга у пожилых людей [34]. Можно полагать, что с восстановлением соотношения GH/IGF-1 могут быть связаны системные эффекты SkQ1, в том числе на функции мозга и иммунную систему, развитие остеопороза и саркопении.

SkQ1 ПОДАВЛЯЕТ РАЗВИТИЕ КАТАРАКТЫ

Ранняя катаракта – базовый признак селекции крыс OXYS, отбор по которому привёл к развитию синдрома преждевременного старения. Изменения хрусталиков у крыс OXYS на развитых стадиях катаракты аналогичны тем, что наблюдают у людей с сенильной формой этого заболевания. Клиническая картина поражения хрусталиков в 80% случаев соответствует ядерной форме катаракты, у 20% животных помутнения различной интенсивности выявляли в заднекапсулярной и корковой областях [35]. Первые признаки нарушения прозрачности хрусталика появляются у 20–25% крыс OXYS к 1,5 мес., а в возрасте 3 мес. заболеваемость достигает 100%, при этом преобладает лёгкая форма катаракты [36–37]. С возрастом катаракта прогрессирует и достигает выраженных стадий к 12 мес. на фоне существенного нарушения организации капсулы и кортикальных волокон хрусталиков, снижения экспрессии малых белков теплового шока α A- и α B-кристаллинов, играющих центральную роль в поддержании прозрачности хрусталика [35, 37–38], а также триптофана и кинуренинов [39]. Кинуренин и его производные синтезируются из трипто-

фана и в хрусталиках млекопитающих выполняют роль фильтров, защищающих сетчатку и сам хрусталик от УФ-облучения. С возрастом содержание и триптофана, и кинуренинов в хрусталике снижается, но наиболее существенно – при развитии катаракты [40].

Профилактический приём SkQ1 с кормом с 1,5 мес. дозозависимо влиял на развитие катаракты, при этом в дозе 250 нмоль/кг массы тела практически полностью предупреждал нарушения прозрачности хрусталиков вплоть до 2-летнего возраста [41–43]. Для профилактики и лечения катаракты и других заболеваний глаз принципиально важно, чтобы антиоксидант оказался эффективным в форме глазных капель. Исследование механизмов их терапевтического эффекта показали, что приём SkQ1 в форме капель полностью предотвращает прогрессию катаракты у крыс OXYS с уже выраженными изменениями хрусталиков, а у части животных – снижает выраженность патологических изменений. Согласно результатам световой и электронной микроскопии, SkQ1 ослаблял характерные для катаракты изменения в капсуле хрусталика и эпителиальных клетках, уменьшал нарушения гексагональной геометрии упаковки волокон хрусталика и улучшал ультраструктуру эпителиальных клеток. При этом SkQ1 усилил экспрессию генов кристаллинов *Cryaa* и *Cryab* и повысил уровень белка α B-кристаллина в хрусталиках крыс OXYS до уровня контрольных крыс Вистар, а также повысил в них содержание триптофана и кинуренина [38–39]. Результаты наших исследований на крысах OXYS легли в основу создания препарата «Визамитин», который успешно применяется для лечения синдрома сухого глаза [44] и рекомендуется для замедления прогрессирования возрастной катаракты [https://www.vidal.ru/drugs/visomitin__37882].

SkQ1 ТОРМОЗИТ РАЗВИТИЕ РЕТИНОПАТИИ, АНАЛОГИЧНОЙ ВМД У ЛЮДЕЙ

Параллельно с катарактой у крыс OXYS развивается ретинопатия, аналогичная ВМД – комплексному нейродегенеративному заболеванию, которое становится основной причиной необратимой потери зрения людьми старше 60 лет [45]. По клиническим проявлениям, выделяют «сухую» и «влажную» формы ВМД [46]. Эффективных способов лечения и профилактики «сухой» формы ВМД не существует, в то время как при отсутствии

методов профилактики «влажной» ВМД внедрение в практику ингибиторов фактора роста эндотелия сосудов VEGF коренным образом изменило результаты её лечения [47]. В основе патогенеза ВМД лежат характерные для старения структурно-функциональные изменения сетчатки, механизмы перехода которых в патологический процесс остаются неясными. Важную роль в патогенезе ВМД отводят окислительному стрессу и воспалению, однако эффективность антиоксидантов не только в лечении, но и в профилактике заболевания остаётся спорной [48, 49].

Уже к возрасту ~3–4 мес. у 100% крыс OXYS развиваются клинические проявления ретинопатии на фоне структурно-функциональных изменений клеток ретинального пигментного эпителия (РПЭ) и нарушения хориоидальной микроциркуляции [10, 50]. Патологические изменения в РПЭ проявляются как избыточное накопление в нём амилоида бета ($A\beta$) и липофусцина, а также нарушения морфологии клеток: увеличение доли многоядерных клеток, нарушение их гексагональной формы и гипертрофия, реактивный глиоз [51]. Развитие этих аномалий у крыс OXYS с возрастом сопровождается значительным уменьшением толщины слоя фоторецепторных клеток и уменьшением числа ядер фоторецепторных клеток в наружном ядерном слое, особенно в центре сетчатки [11, 51–52]. На молекулярном уровне развитие и прогрессия признаков ВМД у крыс OXYS сопровождалась нарушением нейротрофического обеспечения сетчатки [53], изменением метаболизма глутамата и ГАМК [54], дисфункцией аутофагии [55] и увеличением экспрессии маркеров программируемого некроза [56]. Согласно нашим данным, ретинопатия у крыс OXYS соответствует «сухой» или атрофической форме ВМД. При этом, как и у людей, у части (~10–20%) крыс OXYS с возрастом развивается неоваскуляризация.

Мы показали, что приём SkQ1 как с кормом, так и в каплях способен предотвращать развитие, а также подавлять прогрессию и, в определённой степени, вызывать регресс уже выраженных признаков ретинопатии у крыс OXYS [41–42, 55, 57]. Важно, что при этом SkQ1 оказывает модулирующее воздействие на экспрессию генов – ключевых регуляторов ангиогенеза: фактора роста пигментного эпителия *VEGF* и его антагониста – фактора пигментного эпителия *PEDF* (Pigment epithelium-derived factor) – в сетчатке крыс OXYS. При профилактическом приёме SkQ1 его эффект был связан с повышением мРНК гена *VEGF* и его белкового продукта в сетчатке молодых крыс OXYS

до уровня, выявляемого у крыс Вистар, при отсутствии изменений экспрессии *PEDF*. Напротив, лечение каплями SkQ1 вызывало снижение уровня мРНК и белка VEGF и повышение уровня мРНК гена *PEDF* у крыс OXYS среднего возраста с выраженными признаками ВМД, в то время как у одновозрастных крыс Вистар изменения экспрессии этих генов были обратными [11, 58]. В случае приёма SkQ1 с кормом (в возрасте 12–18 мес.) его эффекты были связаны с активацией процесса аутофагии в сетчатке, на что указывает снижение содержания в ней мультифункционального адапторного белка p62/Sqstm1 и повышение уровня мРНК гена *Beclin1* [52]. Примечательно, что мы не выявили влияния SkQ1 на систему глутамат/ГАМК, активность которой изменена у крыс OXYS. В то же время мы обнаружили, что приём SkQ1 в течение полугода вызывал значительные изменения системы глутамат/ГАМК в сетчатке крыс Вистар: снижение уровня глутаминсинтетазы, GLAST и GABAAR1 и повышение уровня глутаминазы, что указывает на увеличение содержания глутамата в синаптической щели, которое является одним из признаков усиления глиоза [54]. При этом, согласно результатам ультраструктурных и морфологических исследований, в сетчатке крыс OXYS SkQ1 предупреждает и/или подавляет накопление липофусциновых гранул, Аβ, атрофические изменения структуры клеток РПЭ и их формы, препятствует нарушениям микроциркуляции [57, 59, 60].

Принципиально важно, что эффект длительного профилактического приёма SkQ1 с кормом (с 1,5 до 22 мес.) был связан с подавлением в сетчатке активности сигнального пути mTOR [61], который функционирует как сенсор уровня питательных веществ и энергии в клетке и, интегрируя множество сигнальных путей, контролирует продолжительность жизни. Подавление активности mTOR, как известно, в настоящее время является единственной стратегией, которая продемонстрировала способность увеличивать продолжительность жизни во всех протестированных экспериментальных животных моделях [62].

ВЛИЯНИЕ SkQ1 НА РАЗВИТИЕ ПРИЗНАКОВ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА И ЕГО ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ

Параллельно с ранними нейродегенеративными изменениями в сетчатке у крыс OXYS спонтанно происходят нейродегенеративные процессы в мозге — развиваются все ключевые

патогенетические и «клинические» признаки БА. Их последовательность: дисфункция митохондрий, гиперфосфорилирование таубелка, нарушение длительной посттетанической потенциации, синаптическая недостаточность, деструктивные изменения нейронов, нарушения поведения и снижение когнитивных функций на ранних стадиях и их прогрессия на фоне повышения уровня APP, усиленного накопления Аβ и образования амилоидных бляшек в мозге, — соответствует современным представлениям о патогенезе спорадической формы этого заболевания у людей. Результаты исследований особенностей развития признаков БА у крыс OXYS свидетельствуют в пользу справедливости гипотезы «митохондриального каскада», согласно которой роль ведущего звена в запуске порочного круга нейродегенерации при БА принадлежит митохондриальной дисфункции [63]. Мы показали, что уже на доклинической стадии развития признаков БА, в возрасте 20 дней, у крыс OXYS наблюдаются структурно-функциональные изменения митохондрий в нейронах гиппокампа и коры мозга, которые в дальнейшем нарастают при манифестации признаков заболевания (3–5 мес.) и их прогрессии (12–18 мес. и старше). Уже в возрасте 20 дней в митохондриях гиппокампа и коры мозга крыс OXYS наблюдается снижение активности комплекса IV дыхательной цепи, характерное для митохондрий мозга пациентов с БА, изменения митохондриальной динамики и нарастающие в дальнейшем признаки нарушения аксонального транспорта, которым отводится критическая роль в патогенезе заболевания. Манифестация и прогрессия признаков БА у крыс OXYS происходят на фоне нарастающей дисфункции и значительного снижения удельного количества митохондрий в нейронах гиппокампа и коры мозга [17, 64–65]. Закономерно, что в основе выявленных структурно-функциональных изменений митохондрий у крыс OXYS лежат изменения экспрессии связанных с ними генов. Как показал анализ транскриптома коры мозга крыс OXYS (данных RNA-seq) [20], экспрессия ассоциированных с митохондриями генов изменена в коре мозга крыс OXYS уже в возрасте 20 дней (в «доклинический» период развития признаков БА), изменения нарастают при манифестации и по мере прогрессии признаков заболевания. На всех стадиях развития заболевания изменения экспрессии генов были также связаны с нейропластичностью, каталитической активностью, липидными и иммунными процессами. Сравнение изменений транскриптомов коры мозга крыс OXYS

с выраженными нейродегенеративными изменениями и пациентов с БА выявило значительное сходство: они были связаны, прежде всего, с функциями митохондрий, иммунной, эндокринной и кровеносной системами, передачей сигнала, нейрональными и синаптическими процессами, гипоксией и апоптозом [19].

Как показали наши исследования, приём SkQ1 с кормом, начатый в любом возрасте, влияет на развитие признаков БА у крыс OXYS. Его включение в рацион с «доклинической» стадии – с возраста 1,5 мес. – предупреждал и/или замедлял поведенческие проявления ускоренного старения мозга и дефицит пространственной памяти, патологическое накопление A β и гиперфосфорилирование тау-белка вплоть до возраста 23 мес. [6]. Приём SkQ1, начатый на стадии заболевания, которую мы можем определить, как аналог фазы преддеменции у людей с БА (в возрасте 12–18 мес.), существенно тормозил прогрессию признаков заболевания у крыс OXYS. SkQ1 предупреждал потерю нейронов и повреждение синапсов, усиливал нейротрофическое обеспечение и снижал уровни пептида A β (1–42) и гиперфосфорилирование тау-белка в гиппокампе и коре мозга крыс OXYS и, как следствие, улучшал способность к обучению и память [64]. Более того, мы показали, что SkQ1 может смягчать некоторые проявления БА-подобной патологии у крыс OXYS даже на стадии выраженных нейродегенеративных изменений: его приём в возрасте 19–24 мес. активизировал поведение как крыс OXYS, так и контрольных крыс Вистар и снижал у них уровень A β (1–42) и A β (1–40) в гиппокампе и коре мозга [65]. Принципиально важно, что, независимо от того, в каком возрасте был начат приём SkQ1, его нейропротекторные эффекты всегда были связаны с восстановлением и/или улучшением структурно-функциональных параметров митохондрий. При этом очевидно, что влияние SkQ1 на митохондриальный аппарат при его приёме с пищей не ограничивалось мозгом и было системным. Это подтвердили результаты исследования его воздействия на нарастающие с возрастом деструктивные изменения митохондрий в мышечной ткани и слёзной железе животных [13, 66].

Определить метаболические пути, изменения активности которых лежат в основе нейропротекторных эффектов SkQ1, выявить молекулярные мишени его действия позволяют исследования транскриптома. Мы исследовали влияние 6-месячного приёма антиоксиданта (в возрасте 12–18 мес.) на транскрипционный профиль гиппокампа жи-

вотных методами полногеномного секвенирования РНК (RNA-seq) [20]. Приём SkQ1 вдвое снизил количество генов, экспрессия которых различалась у крыс OXYS и контрольных крыс Вистар. Важно, что 10,5% из всех 1159 дифференциально экспрессирующихся у контрольных крыс OXYS генов было связано с митохондриальной функцией, а приём SkQ1 устранял различия в экспрессии 76% из них (93 из 122). Нейропротекторный эффект SkQ1 был связан с нормализацией активности многих сигнальных путей и внутриклеточных процессов, прежде всего – тех, с изменениями активности которых связана прогрессия признаков БА у крыс OXYS: активности MAPK-, кальций-, инсулин-, VEGF- и нейротрофин-зависимых путей, иммунных и цереброваскулярных процессов, катаболизма, деградациии и апоптоза.

В результате мы подтвердили, что развитие БА-подобной патологии у крыс OXYS связано с митохондриальной дисфункцией, но при этом не выявили очевидных признаков окислительного стресса – изменений в уровне экспрессии генов, продукты которых непосредственно вовлечены в процессы редокс-регуляции. В то же время не вызывает сомнений, что в основе эффектов SkQ1 лежит нормализация внутриклеточных процессов и функционирования многих сигнальных путей, в том числе – редокс-зависимых. Среди них – сигнальные пути митоген-активируемых протеинкиназ (MAPKs), которые передают от плазматической мембраны к ядру внеклеточные сигналы, в том числе – провоспалительных цитокинов и АФК [67]. Известно, что в мозге пациентов с БА активность p38 MAPK-пути повышена, и, как полагают, это повышение вносит существенный вклад в патогенез заболевания [68]. Закономерно, что подавление активности этого сигнального пути рассматривается как многообещающая стратегия в лечении БА [69]. В мозге крыс OXYS изменения активности p38 MAPK-пути регистрируются уже в раннем возрасте, до клинических проявлений БА-подобной патологии [70]. В гиппокампе полугодовалых крыс OXYS с выраженными признаками заболевания изменена экспрессия 12 из 14 генов, вовлечённых в сигнальный путь p38 MAPK, а приём SkQ1 нормализует её. О том, что нейропротекторные эффекты SkQ1 связаны с подавлением активности сигнального пути p38 MAPK, свидетельствует также снижение в гиппокампе крыс OXYS фосфорилирования промежуточных киназ (p38 MAPK и MK2) и нижестоящего белка α B-кристаллина [71].

На всех стадиях развития БА у людей выявляется увеличение активности других предста-

вителей семейства MAPK – ERK1 и ERK2 [72]. Сигнальный путь ERK1/2 участвует в регуляции дифференцировки, созревания и миграции клеток, тем самым способствуя формированию их фенотипа. Он вовлечён в регуляцию нейрогенеза как при формировании мозга, так и во взрослом организме [73], активно участвует в синаптогенезе и в изменениях, связанных с пластичностью нейронов, в том числе – с процессами обучения и памяти [73]. Патологические отложения в головном мозге тау-белка и Аβ при БА являются цитозольными мишенями ERK, взаимодействуя с которыми они принимают участие в формировании патологических признаков и нейродегенерации [72, 74]. Как показали наши исследования, прогрессия признаков БА у крыс OXYS происходит на фоне изменения экспрессии 9 генов, продукты которых являются компонентами сигнального пути ERK1/2, при этом приём SkQ1 нормализует экспрессию 8 из них. Кроме того, мы показали, что SkQ1 подавляет активность сигнального пути MEK1/2–ERK1/2, снижая фосфорилирование киназ ERK1/2, MEK1 и MEK2 [75].

В последние годы растёт количество аргументов в пользу того, что в патогенезе наиболее распространённой спорадической формы БА значительную роль играют нарастающие с возрастом изменения глиии – астроцитов и микроглии, которые выявляет анализ посмертных тканей пациентов с выраженной стадией заболевания [76, 77]. По данным одних авторов, активация глиии может предотвращать прогрессирование БА, опосредуя клиренс Аβ, в то время как другие исследования показали, что изменённая или аномальная активация глиии может усиливать образование Аβ и провоспалительных цитокинов в головном мозге [78]. У крыс OXYS развитие признаков БА происходит в условиях пониженной интенсивности нейрогенеза гиппокампа на фоне снижения в нейрогенной нише плотности астроцитов – при недостаточной астроцитарной поддержке нейронов, в то время как прогрессия заболевания – на фоне реактивного астроглиоза и активации микроглиии в гиппокампе [79, 80]. Приём SkQ1 в возрасте 12–18 мес. не повлиял на нейрогенез, но при этом снизил проявление



Схематическое изображение влияния SkQ1 на проявления преждевременного старения крыс OXYS. Приём SkQ1 предупреждает и/или подавляет развитие катаракты [41–44]; ретинопатии, аналогичной ВМД [11, 41–42, 55, 57–60]; остеопороза [41]; ускоренной инволюции тимуса [9]; саркопении [13]; ускоренного старения мозга с характерными для БА признаками [63, 64, 80–81]

ния астроглиоза и, как показал клеткоспецифичный анализ транскриптома гиппокампа, в значительной степени нормализовал профиль экспрессии генов, высокоспецифичных для астроцитов и микроглии [81]. Можно полагать, что снижение уровня A β (1–42), а также уровня и степени гиперфосфорилирования тау-белка в гиппокампе крыс OXYS могло быть связано с изменением экспрессии генов *Egr1*, *Egr2* и *Nab2* в клетках микроглии и активацией в них фагоцитоза [20]. Наблюдавшийся при этом сдвиг соотношения плотности покоящейся/активированной микроглии в направлении преобладания покоящихся клеток демонстрирует нам противовоспалительный эффект SkQ1, с которым может быть связана его способность предотвращать гибель нейронов и повреждение синапсов, усиливать нейротрофическое обеспечение и снижать уровни белка A β и гиперфосфорилирование тау-белка в гиппокампе крыс OXYS [64]. В то же время в гиппокампе, как и в сетчатке крыс Вистар, получавших SkQ1 в течение полугода, были выявлены признаки усиления глиоза [81].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассматривая митохондриальный антиоксидант SkQ1 как инструмент борьбы с программой старения, авторы концепции связывают его эффекты с подавлением «медленного отравления организма активными формами кислорода, вырабатываемыми митохондриями» [1–3]. Если рассматривать старение как медленный или хронический феноптоз, то преждевременное старение – раннее развитие комплекса возраст-зависимых заболеваний (мультиморбидности) – может быть определено как уско-

ренный феноптоз. Наши исследования показали, что преждевременное старение крыс OXYS связано с дисфункцией митохондрий, но при этом прямых ассоциаций с окислительным стрессом выявить не удалось. Тем не менее SkQ1 способен предупреждать и/или подавлять развитие всех проявлений генетически детерминированного преждевременного старения крыс OXYS (рисунок). Его эффекты обусловлены воздействием на активность многих сигнальных путей и процессов, но прежде всего – восстановлением структурно-функциональных параметров митохондрий. Таким образом, SkQ1 эффективно подавляет программу генетически детерминированного преждевременного старения крыс OXYS, а его использование для профилактики возраст-зависимых заболеваний у людей, склонных к их раннему развитию, может стать перспективной стратегией. В то же время нами получен ряд результатов, которые указывают на то, что мы ещё далеки от ответа на вопрос о том, в каких дозах и с какого возраста целесообразно назначать SkQ1 для профилактики «здорового», или физиологического, старения.

Вклад авторов. Н.Г. Колосова – концепция и руководство работой, подготовка обзора; все остальные авторы – равный вклад в исследования процессов преждевременного старения крыс OXYS и влияния на них SkQ1.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Бюджетного проекта № FWNR-2022-0016.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Skulachev, V. P. (2012) What is “phenoptosis” and how to fight it? *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 689-706, doi: 10.1134/S0006297912070012.
2. Skulachev, M. V., and Skulachev, V. P. (2017) Programmed aging of mammals: proof of concept and prospects of biochemical approaches for anti-aging therapy, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 1403-1422, doi: 10.1134/S000629791712001X.
3. Skulachev, V. P., Holtze, S., Vyssokikh, M. Y., Bakeeva, L. E., Skulachev, M. V., et al. (2017) Neoteny, prolongation of youth: from naked mole rats to “Naked Apes” (Humans), *Physiol. Rev.*, **97**, 699-720, doi: 10.1152/physrev.00040.2015.
4. Figueira, I., Fernandes, A., Mladenovic Djordjevic, A., Lopez-Contreras, A., Henriques, C. M., et al. (2016) Interventions for age-related diseases: shifting the paradigm, *Mech. Ageing Dev.*, **160**, 69-92, doi: 10.1016/j.mad.2016.09.009.
5. Kolosova, N. G., Stefanova, N. A., Korbolina, E. E., Fursova, A. Zh., and Kozhevnikova, O. S. (2014) Senescence-accelerated OXYS rats: A genetic model of premature aging and age-related diseases, *Adv. Gerontol.*, **4**, 294-298, doi: 10.1134/S2079057014040146.
6. Stefanova, N. A., Kozhevnikova, O. S., Vitovtov, A. O., Maksimova, K. Y., Logvinov, S. V., et al. (2014) Senescence-accelerated OXYS rats: a model of age-

- related cognitive decline with relevance to abnormalities in Alzheimer's disease, *Cell Cycle*, **13**, 898-909, doi: 10.4161/cc.28255.
7. Stefanova, N. A., Muraleva, N. A., Korbolina, E. E., Kiseleva, E., Maksimova, K. Y., et al. (2015) Amyloid accumulation is a late event in sporadic Alzheimer's disease-like pathology in nontransgenic rats, *Oncotarget*, **6**, 1396-1413, doi: 10.18632/oncotarget.2751.
 8. Muraleva, N. A., Devyatkin, V. A., and Kolosova, N. G. (2017) Phosphorylation of α B-crystallin in the myocardium: analysis of relations with aging and cardiomyopathy, *Exp. Gerontol.*, **95**, 26-33, doi: 10.1016/j.exger.2017.05.009.
 9. Obukhova, L. A., Skulachev, V. P., and Kolosova, N. G. (2009) Mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 inhibits age-dependent involution of the thymus in normal and senescence-prone rats, *Aging*, **1**, 389-401, doi: 10.18632/aging.100043.
 10. Zhdankina, A. A., Fursova, A., Logvinov, S. V., and Kolosova, N. G. (2008) Clinical and morphological characteristics of chorioretinal degeneration in early aging OXYS rats, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **146**, 455-458, doi: 10.1007/s10517-009-0298-4.
 11. Kozhevnikova, O. S., Korbolina, E. E., Ershov, N. I., and Kolosova, N. G. (2013) Rat retinal transcriptome: effects of aging and AMD-like retinopathy, *Cell Cycle*, **12**, 1745-1761, doi: 10.4161/cc.24825.
 12. Muraleva, N. A., Ofitserov, E. N., Tikhonov, V. P., and Kolosova, N. G. (2012) Efficacy of glucosamine alendronate alone and in combination with dihydroquercetin for treatment of osteoporosis in animal model, *Ind. J. Med. Res.*, **135**, 221-227.
 13. Vays, V. B., Eldarov, C. M., Vangely, I. M., Kolosova, N. G., Bakeeva, L. E., et al. (2014) Antioxidant SkQ1 delays sarcopenia-associated damage of mitochondrial ultrastructure, *Aging*, **6**, 140-148, doi: 10.18632/aging.100636.
 14. Kolosova, N. G., Shcheglova, T. V., Sergeeva, S. V., and Loskutova, L. V. (2006) Long-term antioxidant supplementation attenuates oxidative stress markers and cognitive deficits in senescent-accelerated OXYS rats, *Neurobiol. Aging*, **27**, 1289-1297, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2005.07.022.
 15. Kolosova, N. G., Aidagulova, S. V., Nepomnyashchikh, G. I., Shabalina, I. G., and Shalbueva, N. I. (2001) Dynamics of structural and functional changes in hepatocyte mitochondria of senescence-accelerated OXYS rats, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **132**, 814-819, doi: 10.1023/a:1013014919721.
 16. El'darov, C., Vays, V. B., Vangeli, I. M., Kolosova, N. G., and Bakeeva, L. E. (2015) Morphometric examination of mitochondrial ultrastructure in aging cardiomyocytes, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 604-609, doi: 10.1134/S0006297915050132.
 17. Tyumentsev, M. A., Stefanova, N. A., Muraleva, N. A., Rumyantseva, Y. V., Kiseleva, E., et al. (2018) Mitochondrial dysfunction as a predictor and driver of Alzheimer's disease-like pathology in OXYS rats, *J. Alzheimer's Dis.*, **63**, 1075-1088, doi: 10.3233/JAD-180065.
 18. Telegina, D. V., Korbolina, E. E., Ershov, N. I., Kolosova, N. G., and Kozhevnikova, O. S. (2015) Identification of functional networks associated with cell death in the retina of OXYS rats during the development of retinopathy, *Cell Cycle*, **14**, 3544-3556, doi: 10.1080/15384101.2015.1080399.
 19. Stefanova, N. A., Ershov, N. I., Maksimova, K. Y., Muraleva, N. A., Tyumentsev, M. A., et al. (2019) The rat prefrontal-cortex transcriptome: effects of aging and sporadic Alzheimer's disease-like pathology, *J. Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **74**, 33-43, doi: 10.1093/gerona/gly198.
 20. Stefanova, N. A., Ershov, N. I., and Kolosova, N. G. (2019) Suppression of Alzheimer's disease-like pathology progression by mitochondria-targeted antioxidant SkQ1: a transcriptome profiling study, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2019**, 3984906, doi: 10.1155/2019/3984906.
 21. Harman, D. (2009) Origin and evolution of the free radical theory of aging: a brief personal history, 1954-2009, *Biogerontology*, **10**, 773-781, doi: 10.1007/s10522-009-9234-2.
 22. Payne, B. A., and Chinnery, P. F. (2015) Mitochondrial dysfunction in aging: much progress but many unresolved questions, *Biochim. Biophys. Acta*, **1847**, 1347-1353, doi: 10.1016/j.bbabi.2015.05.022.
 23. Ristow, M., and Schmeisser, K. (2014) Mitohormesis: promoting health and lifespan by increased levels of reactive oxygen species (ROS), *Dose Response*, **12**, 288-341, doi: 10.2203/dose-response.13-035.Ristow.
 24. Correia-Melo, C., and Passos, J. F. (2015) Mitochondria: Are they causal players in cellular senescence? *Biochim. Biophys. Acta*, **1847**, 1373-1379, doi: 10.1016/j.bbabi.2015.05.017.
 25. Gonzalez-Freire, M., de Cabo, R., Bernier, M., Sollott, S. J., Fabbri, E., et al. (2015) Reconsidering the role of mitochondria in aging, *J. Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **70**, 1334-1342, doi: 10.1093/gerona/glv070.
 26. Ziegler, D. V., Wiley, C. D., and Velarde, M. C. (2015) Mitochondrial effectors of cellular senescence: beyond the free radical theory of aging, *Aging Cell*, **14**, 1-7, doi: 10.1111/accel.12287.
 27. Tong, Y., Zhang, Z., and Wang, S. (2022) Role of mitochondria in retinal pigment epithelial aging and degeneration, *Front. Aging*, **3**, 926627, doi: 10.3389/fragi.2022.926627.
 28. Devyatkin, V. A., Redina, O. E., Kolosova, N. G., and Muraleva, N. A. (2020) Single-nucleotide polymorphisms associated with the senescence-accelerated phenotype of OXYS rats: a focus on Alzheimer's disease-like and age-related-macular-degeneration-like pathologies, *J. Alzheimer's Dis.*, **73**, 1167-1183, doi: 10.3233/JAD-190956.
 29. Devyatkin, V. A., Muraleva, N. A., and Kolosova, N. G. (2020) Identification of single-nucleotide poly-

- morphisms in mitochondria-associated genes capable of affecting the development of hypertrophic cardiomyopathy in senescence-accelerated OXYS rats, *Adv. Gerontol.*, **10**, 121-127, doi: 10.1134/S2079057020020058.
30. Liang, Z., Dong, X., Zhang, Z., Zhang, Q., and Zhao, Y. (2022) Age-related thymic involution: Mechanisms and functional impact, *Aging Cell*, **21**, e13671, doi: 10.1111/acel.13671.
31. Caputo, M., Pigni, S., Agosti, E., Daffara, T., Ferrero, A., et al. (2021) Regulation of GH and GH signaling by nutrients, *Cells*, **10**, 1376, doi: 10.3390/cells10061376.
32. Bartke, A., Sun, L. Y., and Longo, V. (2013) Somatotrophic signaling: trade-offs between growth, reproductive development, and longevity, *Physiol. Rev.*, **93**, 571-598, doi: 10.1152/physrev.00006.2012.
33. Kolosova, N. G., Stefanova, N. A., Muraleva, N. A., and Skulachev, V. P. (2012) The mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 but not N-acetylcysteine reverses aging-related biomarkers in rats, *Aging*, **4**, 686-694, doi: 10.18632/aging.100493.
34. Sáez, J. M. (2012) Possible usefulness of growth hormone/insulin-like growth factor-I axis in Alzheimer's disease treatment, *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets*, **12**, 274-286, doi: 10.2174/187153012802002857.
35. Румянцева Ю. В., Фурсова А. Ж., Рябчикова Е. И., Колосова Н. Г. (2014) Развитие в онтогенезе преждевременно стареющих крыс OXYS катаракты – базового признака их селекции, *Успехи геронтологии*, **27**, 637-644.
36. Kolosova, N. G., Lebedev, P. A., Aidagulova, S. V., and Morozkova, T. S. (2003) OXYS rats as a model of senile cataract, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **136**, 415-419, doi: 10.1023/b:bebm.0000010967.24302.78.
37. Rumyantseva, Y. V., Fursova, A., Fedoseeva, L. A., and Kolosova, N. G. (2008) Changes in physicochemical parameters and alpha-crystallin expression in the lens during cataract development in OXYS rats, *Biochemistry (Moscow)*, **73**, 1176-1182, doi: 10.1134/s0006297908110023.
38. Rumyantseva, Y. V., Ryabchikova, E. I., Fursova, A. Z., and Kolosova, N. G. (2015) Ameliorative effects of SkQ1 eye drops on cataractogenesis in senescence-accelerated OXYS rats, *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, **253**, 237-248, doi: 10.1007/s00417-014-2806-0.
39. Snytnikova, O. A., Tsentalovich, Y. P., Stefanova, N. A., Fursova, A., Kaptein, R., et al. (2012) The therapeutic effect of mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 and *Cistanche deserticola* is associated with increased levels of tryptophan and kynurenine in the rat lens, *Doklady. Biochem. Biophys.*, **447**, 300-303, doi: 10.1134/S1607672912060087.
40. Demarais, N. J., Donaldson, P. J., and Grey, A. C. (2019) Age-related spatial differences of human lens UV filters revealed by negative ion mode MALDI imaging mass spectrometry, *Exp. Eye Res.*, **184**, 146-151, doi: 10.1016/j.exer.2019.04.016.
41. Neroev, V. V., Archipova, M. M., Bakeeva, L. E., Fursova, A., Grigorian, E. N., Grishanova, A. Y., et al. (2008) Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 4. Age-related eye disease. SkQ1 returns vision to blind animals, *Biochemistry (Moscow)*, **73**, 1317-1328, doi: 10.1134/s0006297908120043.
42. Skulachev, V. P., Anisimov, V. N., Antonenko, Y. N., Bakeeva, L. E., Chernyak, B. V., et al. (2009) An attempt to prevent senescence: a mitochondrial approach, *Biochim. Biophys. Acta*, **1787**, 437-461, doi: 10.1016/j.bbabi.2008.12.008.
43. Skulachev, M. V., Antonenko, Y. N., Anisimov, V. N., Chernyak, B. V., Cherepanov, D. A., et al. (2011) Mitochondrial-targeted plastoquinone derivatives. Effect on senescence and acute age-related pathologies, *Curr. Drug Targets*, **12**, 800-826, doi: 10.2174/138945011795528859.
44. Petrov, A., Perekhvatovala, N., Skulachev, M., Stein, L., and Ousler, G. (2016) SkQ1 ophthalmic solution for dry eye treatment: results of a phase 2 safety and efficacy clinical study in the environment and during challenge in the controlled adverse environment model, *Adv. Ther.*, **33**, 96-115, doi: 10.1007/s12325-015-0274-5.
45. Blasiak, J., Sobczuk, P., Pawlowska, E., and Kaarniranta, K. (2022) Interplay between aging and other factors of the pathogenesis of age-related macular degeneration, *Ageing Res. Rev.*, **81**, 101735, doi: 10.1016/j.arr.2022.101735.
46. Jager, R. D., Mieler, W. F., and Miller, J. W. (2008) Age-related macular degeneration, *New Engl. J. Med.*, **358**, 2606-2617, doi: 10.1056/NEJMra0801537.
47. Comparison of Age-related Macular Degeneration Treatments Trials (CATT) Research Group, Martin, D. F., Maguire, M. G., Fine, S. L., Ying, G. S., Jaffe, G. J., et al. (2012) Ranibizumab and bevacizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration: two-year results, *Ophthalmology*, **119**, 1388-1398, doi: 10.1016/j.optha.2012.03.053.
48. Camelo, S., Latil, M., Veillet, S., Dilda, P. J., and Lafont, R. (2020) Beyond AREDS formulations, what is next for intermediate age-related macular degeneration (iAMD) treatment? Potential benefits of antioxidant and anti-inflammatory apocarotenoids as neuroprotectors, *Oxid. Med. Cell. Longev*, **2020**, 4984927, doi: 10.1155/2020/4984927.
49. Wang, S., and Tang, Y. J. (2021) Sulforaphane ameliorates amyloid- β -induced inflammatory injury by suppressing the PARP1/SIRT1 pathway in retinal pigment epithelial cells, *Bioengineered*, **12**, 7079-7089, doi: 10.1080/21655979.2021.1976503.
50. Kolosova, N. G., Muraleva, N. A., Zhdankina, A. A., Stefanova, N. A., Fursova, A. Z., et al. (2012) Prevention of age-related macular degeneration-like

- retinopathy by rapamycin in rats, *Am. J. Pathol.*, **181**, 472-477, doi: 10.1016/j.ajpath.2012.04.018.
51. Telegina, D. V., Kozhevnikova, O. S., Bayborodin, S. I., and Kolosova, N. G. (2017) Contributions of age-related alterations of the retinal pigment epithelium and of glia to the AMD-like pathology in OXYS rats, *Sci. Rep.*, **7**, 41533, doi: 10.1038/srep41533.
 52. Telegina, D. V., Kozhevnikova, O. S., Fursova, A. Z., and Kolosova, N. G. (2020) Autophagy as a target for the retinoprotective effects of the mitochondria-targeted antioxidant SkQ1, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 1640-1649, doi: 10.1134/S0006297920120159.
 53. Telegina, D. V., Kolosova, N. G., and Kozhevnikova, O. S. (2019) Immunohistochemical localization of NGF, BDNF, and their receptors in a normal and AMD-like rat retina, *BMC Med. Genomics*, **12 (Suppl 2)**, 48, doi: 10.1186/s12920-019-0493-8.
 54. Kozhevnikova, O. S., Telegina, D. V., Tyumentsev, M. A., and Kolosova, N. G. (2019) Disruptions of autophagy in the rat retina with age during the development of age-related-macular-degeneration-like retinopathy, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 4804, doi: 10.3390/ijms20194804.
 55. Telegina, D. V., Antonenko, A. K., Fursova, A. Z., and Kolosova, N. G. (2022) The glutamate/GABA system in the retina of male rats: effects of aging, neurodegeneration, and supplementation with melatonin and antioxidant SkQ1, *Biogerontology*, **23**, 571-585, doi: 10.1007/s10522-022-09983-w.
 56. Kozhevnikova, O. S., Telegina, D. V., Devyatkin, V. A., and Kolosova, N. G. (2018) Involvement of the autophagic pathway in the progression of AMD-like retinopathy in senescence-accelerated OXYS rats, *Biogerontology*, **19**, 223-235, doi: 10.1007/s10522-018-9751-y.
 57. Muraleva, N. A., Kozhevnikova, O. S., Zhdankina, A. A., Stefanova, N. A., Karamysheva, T. V., et al. (2014) The mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 restores α B-crystallin expression and protects against AMD-like retinopathy in OXYS rats, *Cell Cycle*, **13**, 3499-3505, doi: 10.4161/15384101.2014.958393.
 58. Markovets, A. M., Fursova, A. Z., and Kolosova, N. G. (2011) Therapeutic action of the mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 on retinopathy in OXYS rats linked with improvement of VEGF and PEDF gene expression, *PLoS One*, **6**, e21682, doi: 10.1371/journal.pone.0021682.
 59. Saprunova, V. B., Pilipenko, D. I., Alexeevsky, A. V., Fursova, A., Kolosova, N. G., et al. (2010) Lipofuscin granule dynamics during development of age-related macular degeneration, *Biochemistry (Moscow)*, **75**, 130-138, doi: 10.1134/s0006297910020021.
 60. Saprunova, V. B., Lelekova, M. A., Kolosova, N. G., and Bakeeva, L. E. (2012) SkQ1 slows development of age-dependent destructive processes in retina and vascular layer of eyes of wistar and OXYS rats, *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 648-658, doi: 10.1134/S0006297912060120.
 61. Muraleva, N. A., Kozhevnikova, O. S., Fursova, A. Z., and Kolosova, N. G. (2019) Suppression of AMD-like pathology by mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 is associated with a decrease in the accumulation of amyloid β and in mTOR activity, *Antioxidants*, **8**, 177, doi: 10.3390/antiox8060177.
 62. Papadopoli, D., Boulay, K., Kazak, L., Pollak, M., Mallette, F., et al. (2019) mTOR as a central regulator of lifespan and aging, *F1000Research*, **8**, 998, doi: 10.12688/f1000research.17196.1.
 63. Swerdlow, R. H., and Khan, S. M. (2004) A "mitochondrial cascade hypothesis" for sporadic Alzheimer's disease, *Med. Hypotheses*, **63**, 8-20, doi: 10.1016/j.mehy.2003.12.045.
 64. Stefanova, N. A., Muraleva, N. A., Maksimova, K. Y., Rudnitskaya, E. A., Kiseleva, E., et al. (2016) An antioxidant specifically targeting mitochondria delays progression of Alzheimer's disease-like pathology, *Aging*, **8**, 2713-2733, doi: 10.18632/aging.101054.
 65. Kolosova, N. G., Tyumentsev, M. A., Muraleva, N. A., Kiseleva, E., Vitovtov, A. O., et al. (2017) Antioxidant SkQ1 alleviates signs of Alzheimer's disease-like pathology in old OXYS rats by reversing mitochondrial deterioration, *Curr. Alzheimer's Res.*, **14**, 1283-1292, doi: 10.2174/1567205014666170621111033.
 66. Bakeeva, L. E., Eldarov, C. M., Vangely, I. M., Kolosova, N. G., and Vays, V. B. (2016) Mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 reduces age-related alterations in the ultrastructure of the lacrimal gland, *Oncotarget*, **7**, 80208-80222, doi: 10.18632/oncotarget.13303.
 67. Guo, Y. J., Pan, W. W., Liu, S. B., Shen, Z. F., Xu, Y., et al. (2020) ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis, *Exp. Ther. Med.*, **19**, 1997-2007, doi: 10.3892/etm.2020.8454.
 68. Dhapola, R., Hota, S. S., Sarma, P., Bhattacharyya, A., Medhi, B., et al. (2021) Recent advances in molecular pathways and therapeutic implications targeting neuroinflammation for Alzheimer's disease, *Inflammopharmacology*, **29**, 1669-1681, doi: 10.1007/s10787-021-00889-6.
 69. Thakur, S., Dhapola, R., Sarma, P., Medhi, B., and Reddy, D. H. (2022) Neuroinflammation in Alzheimer's disease: current progress in molecular signaling and therapeutics, *Inflammation*, doi: 10.1007/s10753-022-01721-1.
 70. Muraleva, N. A., Kolosova, N. G., and Stefanova, N. A. (2019) p38 MAPK-dependent α B-crystallin phosphorylation in Alzheimer's disease-like pathology in OXYS rats, *Exp. Gerontol.*, **119**, 45-52, doi: 10.1016/j.exger.2019.01.017.
 71. Muraleva, N. A., Stefanova, N. A., and Kolosova, N. G. (2020) SkQ1 suppresses the p38 MAPK signaling pathway involved in Alzheimer's disease-like pathology in OXYS rats, *Antioxidants*, **9**, 676, doi: 10.3390/antiox9080676.
 72. Khezri, M. R., Yousefi, K., Esmaeili, A., and Ghasemnejad-Berenji, M. (2022) The role of ERK1/2

- pathway in the pathophysiology of Alzheimer's disease: an overview and update on new developments, *Cell. Mol. Neurobiol.*, doi: 10.1007/s10571-022-01191-x.
73. Iroegbu, J. D., Ijomone, O. K., Femi-Akinlosotu, O. M., and Ijomone, O. M. (2021) ERK/MAPK signalling in the developing brain: perturbations and consequences, *Neurosci. Biobehavioral Rev.*, **131**, 792-805, doi: 10.1016/j.neubiorev.2021.10.009.
 74. Kamat, P. K., Kalani, A., Rai, S., Swarnkar, S., Tota, S., et al. (2016) Mechanism of oxidative stress and synapse dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease: understanding the therapeutics strategies, *Mol. Neurobiol.*, **53**, 648-661, doi: 10.1007/s12035-014-9053-6.
 75. Muraleva, N. A., Kolosova, N. G., and Stefanova, N. A. (2021) MEK1/2-ERK pathway alterations as a therapeutic target in sporadic Alzheimer's disease: a study in senescence-accelerated OXYS rats, *Antioxidants*, **10**, 1058, doi: 10.3390/antiox10071058.
 76. Soreq, L., UK Brain Expression Consortium, North American Brain Expression Consortium, Rose, J., Soreq, E., Hardy, J., Trabzuni, D., Cookson, M. R., et al. (2017) Major shifts in glial regional identity are a transcriptional hallmark of human brain aging, *Cell Rep.*, **18**, 557-570, doi: 10.1016/j.celrep.2016.12.011.
 77. Salas, I. H., Burgado, J., and Allen, N. J. (2020) Glia: victims or villains of the aging brain? *Neurobiol. Disease*, **143**, 105008, doi: 10.1016/j.nbd.2020.105008.
 78. Uddin, M. S., and Lim, L. W. (2022) Glial cells in Alzheimer's disease: from neuropathological changes to therapeutic implications, *Ageing Res. Rev.*, **78**, 101622, doi: 10.1016/j.arr.2022.101622.
 79. Rudnitskaya, E. A., Kozlova, T. A., Burnyasheva, A. O., Kolosova, N. G., and Stefanova, N. A. (2019) Alterations of hippocampal neurogenesis during development of Alzheimer's disease-like pathology in OXYS rats, *Exp. Gerontol.*, **115**, 32-45, doi: 10.1016/j.exger.2018.11.008.
 80. Rudnitskaya, E. A., Kozlova, T. A., Burnyasheva, A. O., Tarasova, A. E., Pankova, T. M., et al. (2020) Features of postnatal hippocampal development in a rat model of sporadic Alzheimer's disease, *Front. Neurosci.*, **14**, 533, doi: 10.3389/fnins.2020.00533.
 81. Rudnitskaya, E. A., Burnyasheva, A. O., Kozlova, T. A., Peunov, D. A., Kolosova, N. G., et al. (2022) Changes in glial support of the hippocampus during the development of an Alzheimer's disease-like pathology and their correction by mitochondria-targeted Antioxidant SkQ1, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 1134, doi: 10.3390/ijms23031134.

SkQ1 AS A TOOL FOR INFLUENCE ON THE ACCELERATED SENESCENCE PROGRAM: EXPERIENCE IN OXYS RATS

Review

**N. G. Kolosova^{1*}, O. S. Kozhevnikova¹, N. A. Muraleva¹, E. A. Rudnitskaya¹,
Yu. V. Rumyantseva¹, N. A. Stefanova¹, D. V. Telegina¹, M. A. Tyumentsev¹, and A. Zh. Fursova^{1,2}**

¹ *Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia; E-mail: kolosova@bionet.nsc.ru*

² *Novosibirsk State Medical University, 630091 Novosibirsk, Russia*

According to the concept of V. P. Skulachev and co-authors, the aging of living organisms can be considered as a special case of programmed death of an organism – phenoptosis, and the mitochondrial antioxidant SkQ1 is capable of inhibiting both acute and chronic phenoptosis (aging). The authors of the concept associate the effects of SkQ1 with the suppression of enhanced generation of ROS produced by mitochondria. Numerous studies have confirmed the ability of SkQ1 to inhibit the manifestations of “healthy”, or physiological, aging. According to the results of our studies, it is especially effective in suppressing the program of genetically determined accelerated senescence in OXYS rats, which appears as the early development of a complex of age-related diseases: cataracts, retinopathy, similar to age-related macular degeneration in humans, osteoporosis, and signs of Alzheimer's disease. Accelerated senescence in OXYS rats is associated with mitochondrial dysfunction, but no direct associations with oxidative stress have been identified. Nevertheless, SkQ1 is able to prevent and/or suppress the development of all manifestations of accelerated senescence in OXYS rats. Its effects are due to the impact on the activity of many signaling pathways and processes, but first of all they are connected with the restoration of the structural and functional parameters of mitochondria. It could be assumed that the use of SkQ1 may become a promising strategy in the prevention of accelerated phenoptosis – the early development of a complex of age-related diseases (multimorbidity) in people predisposed to it.

Keywords: phenoptosis, aging, mitochondrial antioxidant SkQ1, accelerated senescence OXYS rats

МНОГОГРАННЫЙ НОТОБРАНХИУС

Обзор

© 2022 Е.В. Булавкина^{1,2}, А.А. Кудрявцев², М.А. Гончарова², М.С. Ланцова²,
А.И. Шувалова², М.А. Ковалев², А.В. Кудрявцева^{1,2*}

¹ Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН,
Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины,
119991 Москва, Россия; электронная почта: rhizantoeba@mail.ru

² Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН,
лаборатория постгеномных исследований, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 03.11.2022

После доработки 11.11.2022

Принята к публикации 11.11.2022

Научный интерес к короткоцикловым рыбам рода *Nothobranchius* с каждым годом стремительно возрастает. Всесторонне исследуются самые разные аспекты жизнедеятельности этих икромечущих карпозубых и особенно их старение. Обитание в пересыхающих водоёмах Африки редко позволяет нотобранхиусам пережить более одного сезона дождей, поэтому естественный отбор не был направлен на длительное выживание взрослых особей, что привело к снижению эффективности системы репарации ДНК. Старение нотобранхиусов изучается как в норме, так и при воздействии потенциальных геропротекторов, а также генетических модификаций. Большая часть биogerонтологических исследований проводится на *Nothobranchius furzeri* (изолят GRZ) с продолжительностью жизни 3–7 месяцев. Однако перечень модельных видов нотобранхиусов существенно шире, а спектр передовых научных направлений с их участием выходит далеко за пределы геронтологии. В обзоре рассматриваются наиболее интересные и перспективные направления, развивающиеся благодаря рыбам рода *Nothobranchius*. Затрагиваются как классические исследования, связанные с контролем продолжительности жизни, так и относительно новые, включающие специфику протекания диапаузы, сложности систематики и филогении, становление механизмов определения пола, изменение количества хромосом, появление в геноме множества повторяющихся последовательностей ДНК, когнитивно-поведенческие особенности и социальную стратификацию, а также методические сложности при работе с нотобранхиусами.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: старение, животные модели старения, *Nothobranchius*, возраст-зависимые заболевания, диапауза, нейродегенерация, продолжительность жизни, долголетие, видообразование, карิโอ-тип, стресс.

DOI: 10.31857/S0320972522120120, **EDN:** NHENPO

ВВЕДЕНИЕ

Современная геронтология, как фундаментальная, так и прикладная, немислима без исследований, проводимых на рыбах рода *Nothobranchius* [1–5]. Самый короткоживущий представитель рода, *Nothobranchius furzeri* Jubb, 1971 (изолят GRZ) успевает состариться и умереть естественным образом всего за 3–7 месяцев (не дольше 12 месяцев для вида в целом), что открывает огромные перспективы в исследовании генетических и биохимических основ процесса старения, а также в разработке

методической платформы для тестирования потенциальных геропротекторов и анализа механизма их действия на позвоночных животных [6–8]. Ранее исследования были сфокусированы на таких моделях, как *Caenorabditis elegans* и *Drosophila melanogaster* [9–13], однако при поиске геропротекторных интервенций для человека лучше использовать более эволюционно близкие модельные организмы. При использовании эволюционно далёких моделей намного выше риск с самого начала отказаться от интервенций, способных хорошо работать на человеке. Помимо этого, тестирование на

* Адресат для корреспонденции.

позвоночных животных является обязательным этапом исследований после проведения экспериментов на беспозвоночных. Поэтому использование нотобранхиусов позволяет сократить срок разработки лекарственных препаратов. Самые популярные модельные животные среди позвоночных живут долго: грызуны живут 2–3 года, а *Danio rerio* – до 4–5 лет. Таким образом, нотобранхиусы стали для геронтологов ценной находкой [5, 14], тем более что один из важнейших принципов биоэтики относительно выбора модельного животного гласит, что по возможности следует проводить эксперимент на организме, находящемся на как можно более низком уровне эволюционного развития.

Тестирование экспрессии генов в различных тканях, анализ микробиома кишечника, а также оценка когнитивно-поведенческих детерминант при исследовании геронпротекторов позволяют комплексно изучать влияние на организм различных интервенций [15, 16] и работать в области продления активной фазы жизни, т.е. обеспечивать активное долголетие [17, 18]. В условиях демографического перехода в Российской Федерации и многих европейских странах такие вопросы становятся архиважными.

Преимущества нотобранхиусов не ограничиваются исследованием механизмов старения. Существует множество удивительных особенностей, свойственных представителям этого рода, которые привлекают к себе внимание учёных. Например, тонкая регуляция процессов входа эмбриона в диапаузу и выхода из неё, что необходимо для коррекции периода нахождения в стадии икры до момента наступления погодных условий, подходящих для выклева малька (сезона дождей) [19–21]. Изучение способности к почти полному выключению метаболизма крайне важно для разработки подходов к освоению человеком космического пространства.

В обзоре рассмотрены наиболее перспективные направления изучения нотобранхиусов, интересующие исследовательские группы по всему миру – от полового поведения и социальной иерархической системы до особенностей структуры и функционирования генома.

ПРОБЛЕМЫ СИСТЕМАТИКИ И ЭВОЛЮЦИИ РОДА *Nothobranchius*

Представители рода *Nothobranchius* Peters, 1868 – стенотопные икромечущие костистые рыбы, обитающие в пересыхающих пресноводных водоёмах на территории Африки и

относящиеся к семейству Нотобранхиевых (*Nothobranchiidae*), отряду Карпозубообразных (*Cyprinodontiformes*). Род *Nothobranchius* довольно большой: описано несколько десятков валидных видов, каждый год к ним добавляются новые. Территория распространения рода *Nothobranchius* сравнительно небольшая, условия существования сильно ограничены факторами внешней среды, однако экологические ниши разных видов практически не различаются.

Исследователей интересуют прежде всего причины и механизмы формирования такого «высокого» видового разнообразия. Тематически связанным оказывается вопрос выбора оптимальных систематических признаков для разграничения видов в пределах рода *Nothobranchius*.

Каковы причины и механизм бурного видообразования в пределах рода *Nothobranchius*?

По этому вопросу уже сформировалась определённая гипотеза. Поскольку рыбы рода *Nothobranchius* населяют сезонно пересыхающие водоёмы в Центральной и Восточной Африке, их местообитание ограничено небольшими, малоподвижными водно-болотными угодьями, включающими поймы в верховьях рек, сезонно затопляемые долины, маршевые луга и русла медленно текущих мелких сезонных рек. Территория распространения нотобранхиусов также ограничивается областями с определённым составом грунта, так как для длительного сохранения икры необходимо, чтобы влага задерживалась в достаточном количестве. Нотобранхиусы были описаны в семи районах Африки: Нило-Судан, Виктория, Танганьика, Малави, Восточное побережье, Замбези и Конго [22]. Представители рода *Nothobranchius* являются эталонным примером аллопатрического видообразования. Оно происходит под влиянием изменений рельефа и обуславливает наличие весьма ограниченного ареала каждого вида при их общем большом количестве. Распространение рода в значительной степени совпадает с Восточно-Африканской рифтовой долиной, а геобиологический анализ подтверждает тектоническую гипотезу эволюции нотобранхиусов.

Видообразование прежде всего связано с накоплением изменений в геноме. Большое количество видов в пределах одного рода говорит о том, что для таксона в целом характерна высокая скорость накопления мутаций. Можно предположить, что у нотобранхиусов такая предрасположенность связана с ускоренным жизненным циклом, а точнее – с рано приходящей старостью, неизменно связанной с накоплением генетических ошибок в каждой

клетке организма [22]. Получается, что система репарации повреждений ДНК нотобранхиусов может не быть очень совершенной, так как организму не требуется, чтобы она в течение длительного периода его жизни исправляла ошибки. Естественный отбор не был направлен на решение такой задачи. Сочетание высокой частоты мутаций с генетическим дрейфом при коротком жизненном цикле, зависящем от сезонов дождей, в совокупности задали быстрые темпы видообразования [23]. Перечисленные признаки вместе с минимальным расхождением по экологическим нишам говорят о неадаптивном процессе видообразования в пределах рода *Nothobranchius* [24].

Какие таксономические признаки наиболее адекватны для разграничения видов нотобранхиусов? Систематика нотобранхиусов осложнена несколькими обстоятельствами. Прежде всего, не до конца очевидны видовые критерии, т.е. регулярно возникает вопрос, является ли новый изолят представителем уже известного вида, или он должен быть описан в качестве нового [25]. Эта проблема стоит довольно остро, так как почти каждая научная экспедиция возвращается с ранее не описанными видами нотобранхиусов. Важным диагностическим признаком является специфический паттерн окраски самцов [26]. Ситуация осложняется, с одной стороны, наличием различных цветовых морф одного и того же вида (например, у *N. furzeri*, *Nothobranchius korthause*, *Nothobranchius hassoni*), с другой стороны — существованием изолятов-двойников, фенотипически очень похожих, но имеющих различное количество хромосом.

Интересна существующая практика присвоения видовых эпитетов новым видам нотобранхиусов. Довольно часто новый вид называют в честь специалиста, который выделил изолят в природе и привёз его из экспедиции. При этом описанием вида занимаются совсем другие исследователи, как правило, даже не в соавторстве с первооткрывателем [27, 28]. Встречаются трогательные случаи, когда исследователи называют новые виды в честь близких, например, *Nothobranchius ditte* был описан известным исследователем короткоцикловых рыб Béla Nagy и получил свой видовой эпитет в честь его жены Эдит [29].

В систематике одним из главных видовых критериев считается способность к свободному скрещиванию организмов и появлению плодовитого потомства, сохраняющего признаки вида в ряду поколений. Но при работе с нотобранхиусами проведение таких тестов в лабораторных условиях сильно ограничено отсутствием представительной биоресурсной коллекции.

В природных популяциях изредка встречается ситуация, когда на одной территории одновременно обитают разные виды нотобранхиусов. В литературе их называют симпатрическими видами. Однако, во-первых, обычно времени проведения экспедиции недостаточно для детального анализа видового состава водоёма и популяционных особенностей, а, во-вторых, идентификация потенциальных гибридов далеко не всегда возможна по причине отсутствия разработанной системы маркеров.

Большие надежды возлагались на молекулярную систематику, но и в этой области исследователи столкнулись со сложностями. Оказалось, что очень ограниченные ареалы распространения не дают возможности сформировать представление о внутривидовой межпопуляционной вариабельности, т.е. молекулярные методы не позволяют дать точный ответ на вопрос, являются ли похожие изоляты одним видом или разными. Однако можно с уверенностью заключить, что род *Nothobranchius* — это уникальный объект для исследования микроэволюции, и учёным ещё предстоит сделать в этой области много открытий [22].

В заключение следует отметить, что изучение флоры и фауны Африки осложняется стремительной урбанизацией территорий, приводящей к изменению условий среды и, следовательно, к сокращению биоразнообразия. Поэтому уже в ближайшем будущем планета может лишиться многих известных науке нотобранхиусов и потерять ещё даже не открытые виды этих удивительных организмов.

РАЗНООБРАЗИЕ КАРИОТИПОВ, ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ ГЕНОМА И ЭВОЛЮЦИОННОЕ СТАНОВЛЕНИЕ СИСТЕМЫ ДЕТЕРМИНАЦИИ ПОЛА

В течение длительного времени, в догенетическую эру, кариология была важным инструментом систематики и позволяла найти дополнительные признаки там, где не хватало морфологических. Кариотипирование помогало также объяснить причины стерильности гибридов, обнаружить полиплоидизацию, определить половую принадлежность в раннем возрасте до появления фенотипических признаков. Однако специалисты по кариологии нотобранхиусов до сих пор не могут прийти к единому выводу даже по самым базовым вопросам. Дело в том, что кариотип различных представителей рода *Nothobranchius* характеризуется необыкновенно высокой вариабельностью [30]. Количество хромосом варьирует от 16 до 50.

Причины и механизмы возникновения такого разнообразия, а также направление эволюционного процесса вызывают огромный интерес исследователей. В настоящее время некоторая ясность в эти вопросы уже внесена, однако работ по исследованию кариотипа крайне немного, в связи с популярностью геномного секвенирования, вытесняющего кариотипирование.

Также представляют научный интерес механизмы определения пола у нотобранхиусов. Многие аквариумисты, которые содержали различные виды рода *Nothobranchius*, заметили, что при получении мальков и их последующем подращивании соотношение полов 1 : 1 не соблюдается почти никогда. Например, у *Nothobranchius guentheri* на 1 самку приходится около 5 самцов. Распространено также мнение, что в пределах рода *Nothobranchius* сосуществуют как механизмы определения пола факторами внешней среды, так и генетическая обусловленность полового статуса.

Самое передовое и популярное направление — это, несомненно, проведение омиксных исследований, прежде всего секвенирование генома и транскриптома [18]. Знание последовательности ДНК в геноме вида открывает широкие возможности молекулярно-генетических исследований, а также позволяет уточнить его положение на филогенетическом древе. Однако у нотобранхиусов сборка генома сильно осложняется наличием огромного количества повторов, происхождение и роль которых также вызывают жаркие дискуссии.

Как эволюционировал кариотип нотобранхиусов, и сколько хромосом было у предкового вида? Говоря о причинах и механизмах эволюции кариотипа нотобранхиусов, важно отметить, что хромосомные перестройки — естественное и частое явление при высокой скорости видообразования. Наиболее частые изменения связаны со смещением центромер на хромосомах и инверсиями, которые могут способствовать локальной адаптации за счёт подавления рекомбинации и, таким образом, накопления связанных адаптивных генов. Важно, что такие события часто приводят к генетической несовместимости, снижая фертильность гибридов, способствуя репродуктивной изоляции и видообразованию [31–34].

Описаны кариотипы более чем 65 видов [35]. Все известные нотобранхиусы диплоидны ($2n$), однако количество хромосом у разных видов варьирует от 16 до 50 (чаще всего 36, реже — 38) [36]. Эта особенность делает нотобранхиусов довольно привлекательной моделью для специалистов в области эволюции и экологии.

Учитывая колоссальный разброс в количестве хромосом у разных видов, сразу возникает предположение, что на каком-то этапе эволюции возникла полиплоидизация, после которой произошло расхождение дублированных хромосом по структуре и функциям. В этом случае виды с наименьшим количеством хромосом являлись бы наиболее эволюционно древними. Второй идеей было принятие «многохромосомных» видов (имеющих диплоидный набор более 38 хромосом, в том числе *N. ditte*, *Nothobranchius malaissei*, *Nothobranchius brieni*) в качестве предковых форм. Однако существующие филогенетические деревья, а также детальное изучение кариотипа различных видов свидетельствуют о том, что, скорее всего, предковой формой был вид с 38 хромосомами.

У подрода *Nothobranchius* [37] ($2n = 38$) изменения кариотипа происходили в основном путём перичентрических инверсий. Четыре вида — *N. furzeri*, *Nothobranchius kadleci*, *Nothobranchius orthonotus* и *Nothobranchius kuhntae* — отличались друг от друга соотношением одноплечих и двухплечих хромосом [35]. Для видов с числом хромосом меньше 38 характерна их редукция путём слияний. При этом в кариотипах видов с наименьшим числом хромосом (16 и 18 соответственно) преобладали двухплечие хромосомы (*Nothobranchius rachovii* — 16, *Nothobranchius krysanovi* — 18).

Для рода *Nothobranchius* характерно обилие не только внутривидовых, но и межвидовых перестроек. В хромосомной эволюции рода выявлены две основные тенденции: слияние хромосом (или, реже, расщепление на две хромосомы) и перичентрические инверсии [35].

Подводя итог, можно сказать, что, согласно современным взглядам, эволюционно первичным является набор хромосом $2n = 38$. Далее параллельно в нескольких группах рыб шли процессы уменьшения и увеличения количества хромосом. Все случаи с увеличенным количеством хромосом произошли независимо друг от друга. Механизмы увеличения числа хромосом связаны не с полиплоидизацией, а с расщеплением существующих хромосом на более мелкие. Процессы уменьшения количества хромосом эволюционно связаны с их слиянием.

Каким образом у разных видов нотобранхиусов определяется пол? Среди описанных кариотипов представителей рода *Nothobranchius* у пяти видов были описаны морфологически различимые половые хромосомы, а именно у *N. guentheri* [38], *N. brieni* [36], *Nothobranchius lourensi*, *Nothobranchius janpapi* и *N. ditte* [35]. Однако у всех изученных видов различается даже

хромосомный механизм определения пола. Рассмотрим, например, генотип *N. brienii* [36]. Количество хромосом *N. brienii* у самцов составило $2n = 49$, у самок – $2n = 50$. Женский кариотип состоял из 25 пар акроцентрических хромосом, постепенно уменьшающихся в размерах. Мужской кариотип состоял из 23 пар акроцентрических хромосом, одной двуплечей пары и двух непарных акроцентрических хромосом. В хромосомах первого мейоза при сперматогенезе наблюдалось 23 бивалента и тривалента при диакинезе. Таким образом, вид *N. brienii* – обладатель многополой хромосомной системы типа $X_1X_2Y/X_1X_1X_2X_2$. Одна двуплечая нео-Y-хромосома, скорее всего, возникла в результате Робертсоновского слияния между Y-хромосомой и аутосомой, как это было описано для других видов рыб [39]. У *N. brienii* и *Nothobranchius* sp. «Kasenga» Y-хромосома является крупной метацентрической, а X_1 - и X_2 -хромосомы – акроцентрическими разного размера [39]. У четырёх неблизкородственных видов в под родах *Zononothobranchius* (*N. brienii*) и *Adiniops* (*N. guentheri*, *N. lourensi* и *N. janpapi*) [40] множественные половые хромосомы, предположительно, возникли независимо друг от друга [35].

У некоторых видов не удаётся выделить морфологически различимые половые хромосомы, однако идентифицированы SDR-локусы – последовательности ДНК, конкретные различия в которых определяют пол особи. В качестве примера рассмотрим вид *N. furzeri*, который имеет XY-систему определения пола, причём его половые хромосомы практически неразличимы морфологически. Самцы являются гетерогаметным полом, несущим уникальную версию гена *gdf6*, являющегося представителем семейства факторов роста TGF- β и запускающего развитие по мужскому типу [41]. Y-вариант *gdf6* отличается от X-варианта наличием 15 аминокислотных замен и 3 делеций. Важно отметить, что замены произошли в высококонсервативной для позвоночных области, это свидетельствует о сильной положительной селекции в сторону накопления мутаций в этом гене.

Сразу после выклева оба аллеля *gdf6* экспрессируются в сопоставимой степени, однако спустя уже 3 дня экспрессия у самцов значительно превышает экспрессию у самок. У взрослых рыб проходит зависимость от пола экспрессия *gdf6*: тогда как в яичниках у самок его экспрессия очень низка, в семенниках у самцов он детектируется, что может быть связано с ещё одной делецией, произошедшей в 3'-UTR и вырезавшей сайт связывания

miR-430 – важного регулятора экспрессии генов в половой линии у рыб [41]. Конкретный механизм действия *gdf6* и распространённость системы определения пола с его участием у других видов нотобранхиусов требуют дальнейшего изучения. Наличие таких разнообразных систем половых хромосом делает род *Nothobranchius* перспективной моделью для исследования путей становления генетической детерминации пола.

Почему же все-таки у *N. guentheri* соотношение самцов и самок всегда настолько далеко от ожидаемого 1 : 1? Скорость роста и, как следствие, размеры тела самцов превышают аналогичные показатели у самок, поэтому при совместном выращивании мальков самки не выдерживают конкуренции и либо становятся «ползунами», либо поедаются более крупными особями. Как только в нашей лаборатории начали сортировать мальков согласно их размеру в пределах одного контейнера, соотношение полов сразу приблизилось к эталонному и составило 1 : 1.

Чем необычен геном нотобранхиусов? Развитие методов высокопроизводительного секвенирования позволило не только секвенировать геномы нескольких видов рода *Nothobranchius*, но и перейти к работам в области функциональной геномики. Всё шире применяется анализ транскриптома, исследуются и некодирующие РНК, метилом и состав сообществ микроорганизмов, населяющих главным образом желудочно-кишечный тракт [16]. Анализ бактериального состава кишечника может выполняться как культуральными методами, так и при помощи высокопроизводительного секвенирования [16, 42], позволяя анализировать метаболический потенциал микроорганизмов и их влияние на метаболизм хозяина.

Гаплоидный геном *N. furzeri* состоит из 19 хромосом ($2n = 38$). Размер генома составляет примерно ~1,5 млрд п.н. [41], при этом аннотировано более 22 000 белок-кодирующих генов [43]. Секвенирование генома значительно упростило применение молекулярно-биологических методов и подходов. Для наиболее короткоживущего и востребованного изолята *N. furzeri* GRZ на основе анализа генома был сделан вывод о высоком уровне инбредности. Было показано, что геном *N. furzeri* содержит высокую долю повторов, достигающую 45%, что очень велико для костистых рыб [41, 43]. Эта особенность усложняет сборку генома нотобранхиусов, однако эволюционное происхождение такой специфической черты и её роль в жизнедеятельности этих рыб крайне интересны. Наша гипотеза сводится к тому, что

происхождение большого количества повторов ассоциировано с повышенной активностью элементов генома, способных к транспозиции. Повышенную активность транспозонов мы наблюдали, в частности, при сопоставлении транскриптомов самцов *N. guentheri* разного иерархического статуса. Транспозоны содержат в своём составе регуляторные последовательности, оказывающие *цис*- и *транс*-воздействие на экспрессию специфических белок-кодирующих генов. Таким образом, они способны изменять механизмы морфогенеза, играя роль в адаптации организма к факторам окружающей среды.

В геноме *N. furzeri* представлены тандемные повторы, подвижные элементы (транспозоны и ретротранспозоны), псевдогены и сегментные дубликации. Среди них тандемные повторы составляют рекордные 20% генома, что сильно выделяет *N. furzeri* среди других рыб. Среди тандемных повторов особенно широко представлены два GC-богатых минисателлита, локализующиеся в перичентромерных регионах и имеющие длину 77 и 49 нуклеотидов. Возле центромера также локализуется имеющая широкое распространение сателлитная последовательность, состоящая из 348 нуклеотидов с низким содержанием GC.

Подвижные элементы занимают ~ 25% генома и представляют собой важную особенность генома *N. furzeri* [41].

Как ядерный, так и митохондриальный геном нотобранхиусов имеют большие размеры относительно родственных видов рыб, не являющихся короткоцикловыми. Увеличение размера ядерного генома в значительной степени обусловлено повышенным количеством элементов генома, способных к транспозиции, причиной которого может быть генетический дрейф. Митохондриальный геном у *N. furzeri*, также увеличенный (>19,5 кб) по сравнению с другими позвоночными (~16 кб), характеризуется большей суммарной длиной некодирующих областей [43].

Вариабельность кариотипа в пределах рода *Nothobranchius* очень велика по сравнению с другими родами костистых рыб [44, 45], что предполагает возникновение в процессе эволюции событий, связанных с частой крупномасштабной реструктуризацией геномов, что также соотносится с бурным видообразованием в пределах рода *Nothobranchius* [43].

АДАПТАЦИОННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ НОТОБРАНХИУСОВ

В естественных местообитаниях нотобранхиусы практически постоянно находятся в

окружении агрессивных факторов внешней среды. В процессе эволюции они смогли выработать ряд адаптационных механизмов, которые помогают им успешно выживать и активно эволюционировать. Детальная расшифровка этих механизмов интересует огромное количество исследователей, поскольку важна не только в фундаментальном аспекте, но имеет и важный прикладной потенциал.

Какие основные направления адаптаций отличают нотобранхиусов? Условия существования нотобранхиусов в сезонно засушливых местообитаниях африканских саванн отличаются чрезвычайной изменчивостью. Многие факторы изменяются очень быстро и в очень широком диапазоне значений (например, суточные колебания температуры от 14 до 37 °С) [1]. Для того чтобы выживать в таких условиях, животные должны сформировать особые механизмы адаптации. По-видимому, нотобранхиусы имели некую преадаптацию к условиям обитания в составе эфемерной фауны, поскольку их геном содержит довольно много мобильных элементов, способных к транспозиции и опосредующих, таким образом, инсерционный мутагенез. Этот процесс лежит в основе изменений геномов при естественном отборе [46]. В эволюции свойство транспозонов перемещаться в специфические сайты генома, регулировать экспрессию генов и взаимодействовать с транскрипционными факторами, наряду со способностью реагировать на экологические стрессоры, является основой для быстрой изменчивости и видообразования за счёт модулирования управления онтогенезом. Таким образом, нотобранхиусы приспособились к постоянно меняющимся условиям, в том числе за счёт увеличения количества транспозонов в геноме.

Помимо этого, представители рода *Nothobranchius* обладают уникальным набором репродуктивных адаптаций, одна из которых — наличие диапаузы, т.е. способности эмбрионов в определённые периоды существенно затормаживать обмен веществ. Одним из основных преимуществ является возможность регуляции общего времени нахождения эмбриона в защитной оболочке икры, что критически важно при наличии флуктуаций в погодных условиях из года в год [44, 45].

Помимо регуляции временного периода, важным адаптационным механизмом стало выживание эмбрионов в условиях засухи благодаря возникновению толстой оболочки икры, строение и состав которой эволюционно сформировались в условиях окружения смектитовыми глинами. Икринки способны

сохранять влагу и развиваться в таком грунте в течение длительного периода времени. Именно гидроморфные свойства растрескивающихся глинистых субстратов определяют ключевую роль в неравномерном распространении этих видов в тропических ландшафтах. Рыбы рода *Nothobranchius* мечут икру в мягкий ил, который имеет типичные характеристики вертисоля. Критически важно, что входящие в состав минералы группы смектитов (главным образом монтмориллонит) обладают способностью поглощать молекулы воды в кристаллических слоях. В период засухи вода испаряется, образуя в почве глубокие трещины. Таким образом, в течение сухого сезона глубоко внутри этих растрескивающихся глин, которые поддерживают оптимально влажный микроклимат, икринки способны войти в состояние диапаузы и остаться жизнеспособными до следующего сезона дождей [26, 44]. Со временем, в процессе эволюции, диапауза стала не просто жизненно необходимой адаптацией для переживания засухи, но и приобрела дополнительную роль: прохождение стадий диапаузы необходимо для формирования здоровой особи.

Феномен диапаузы у позвоночных, и механизмы её контроля. Диапауза встречается преимущественно у беспозвоночных животных, поэтому её изучение на модели рыб является особенно ценным в аспекте потенциального практического применения результатов. Основная часть научных исследований диапаузы выполнена на родственниках нотобранхиусов из Южной Америки, срок развития их икры существенно меньше, однако принято считать, что механизмы должны быть во многом схожими.

Выделяют три стадии диапаузы, которые в целом рассматриваются как этапы одного процесса, однако их продолжительность может существенно варьировать. Такая система подразумевает различные регуляторные механизмы для каждой стадии диапаузы. Важную роль в регуляции прохождения этих стадий играют условия окружающей среды [47]. Были изучены и молекулярные механизмы, определяющие возможность протекания диапаузы, например, её зависимость от сигнального пути витамина D [21]. Сделано предположение, что существует специальный путь для интеграции информации об окружающей среде и её преобразования в программы развития, связанные с эволюционными преобразованиями у животных. В роли сигнальных молекул рассматривают 7-дигидрохолестерин-производные гормоны и связанные с ними ядерные рецепторы.

В природе диапауза I происходит ещё в сезон дождей (во время дисперсионной фазы

перед гастрულიацией), на этом этапе пул эмбрионов развивается синхронно. Синхронно он входит и в диапаузу II, которая начинается в середине сомитогенеза, в период формирования большинства органов. Это случается уже во время засушливого периода. Диапауза II характеризуется снижением синтеза белка, остановкой клеточного цикла, ремоделированием энергетического обмена и контролируется сигнальной системой инсулиноподобного фактора роста. Митохондрии, выделенные из эмбрионов, остановленных в диапаузе II, не готовы производить АТФ, а, скорее, перемещают углерод и электроны через цикл Кребса, минимизируя генерацию протон-движущей силы [48]. Диапауза III происходит на заключительной стадии развития, непосредственно перед выклевом [47]. Асинхронность приходилась на начало и конец засушливого сезона.

Все три стадии диапаузы являются обязательными, но могут длиться разное время в зависимости от внешних раздражителей. У *Austrofundulus limnaeus* процесс входа в диапаузу и выхода из неё связан с температурой окружающей среды, а также с определёнными сигналами, передаваемыми от материнского организма [20, 49]. Например, вероятность того, что эмбрион войдёт в длительную диапаузу, зависит от возраста самки и количества яиц, которые она уже произвела [49]. При разведении *N. guentheri* и *N. rachovii* в лабораторных условиях мы выявили сходный паттерн.

Обнаружено, что процесс эмбрионального развития, в частности прохождение диапаузы, различается у рыб, живущих в дикой природе и рыб, содержащихся в условиях лаборатории. Основным отличительным признаком является сокращение срока диапаузы, например, у *N. furzeri* диапауза III в стандартных условиях инкубации практически не наблюдается. Скорее всего, она становится крайне непродолжительной. Это может отражаться на результатах научных экспериментов и вызывает необходимость детального изучения различий.

КОГНИТИВНО-ПОВЕДЕНЧЕСКАЯ СФЕРА И ОСОБЕННОСТИ СОЦИАЛЬНОГО ПОВЕДЕНИЯ

В отличие от *D. rerio*, традиционного модельного организма, представители рода *Nothobranchius* не ведут стайный образ жизни и являются хищниками. Всемирная организация здравоохранения даже рассматривала нотобранхиусов в качестве биологического средства борьбы с малярией в Африке, предполагая, что они способ-

ны массово истреблять личинки комаров [50]. По-видимому, именно хищничество позволило нотобранхиусам развить в процессе эволюции когнитивные способности и опосредовало появление иных поведенческих паттернов по сравнению с другими, нехищными, видами.

Можно ли говорить о том, что рыба обладает характером? Существует крайне интересная ниша исследований, направленная на изучение стабильных индивидуальных различий в поведении. Был введён термин «характер животного» (animal personality) [51], и вариации поведения были подтверждены для некоторых видов рыб [52, 53].

Экспериментально доказано, что особи вида *N. furzeri* обладают индивидуальными поведенческими вариациями. Для того чтобы доказать эту особенность, были проведены тесты на склонность к исследовательскому поведе-

нию рыб, на оценку смелости и склонности к риску. Результаты данного исследования подтвердили различия в последовательных индивидуальных поведенческих реакциях, а все поведенческие показатели, отражающие двигательную активность и склонность к риску, оказались повторяемыми [54].

Индивидуальные различия поведения между особями наблюдались и в наших исследованиях. Для тестирования экспериментального препарата рыбы вида *Nothobranchius foershi* помещались в пробирки объёмом 50 мл на 1 час 4 раза в день. После нахождения в пробирке рыбы демонстрировали два разных паттерна поведения. Одни после освобождения стремительно уплывали и прятались у дальней стенки аквариума, в то время как другие подплывали к передней стенке и демонстрировали поведенческие признаки агрессии.

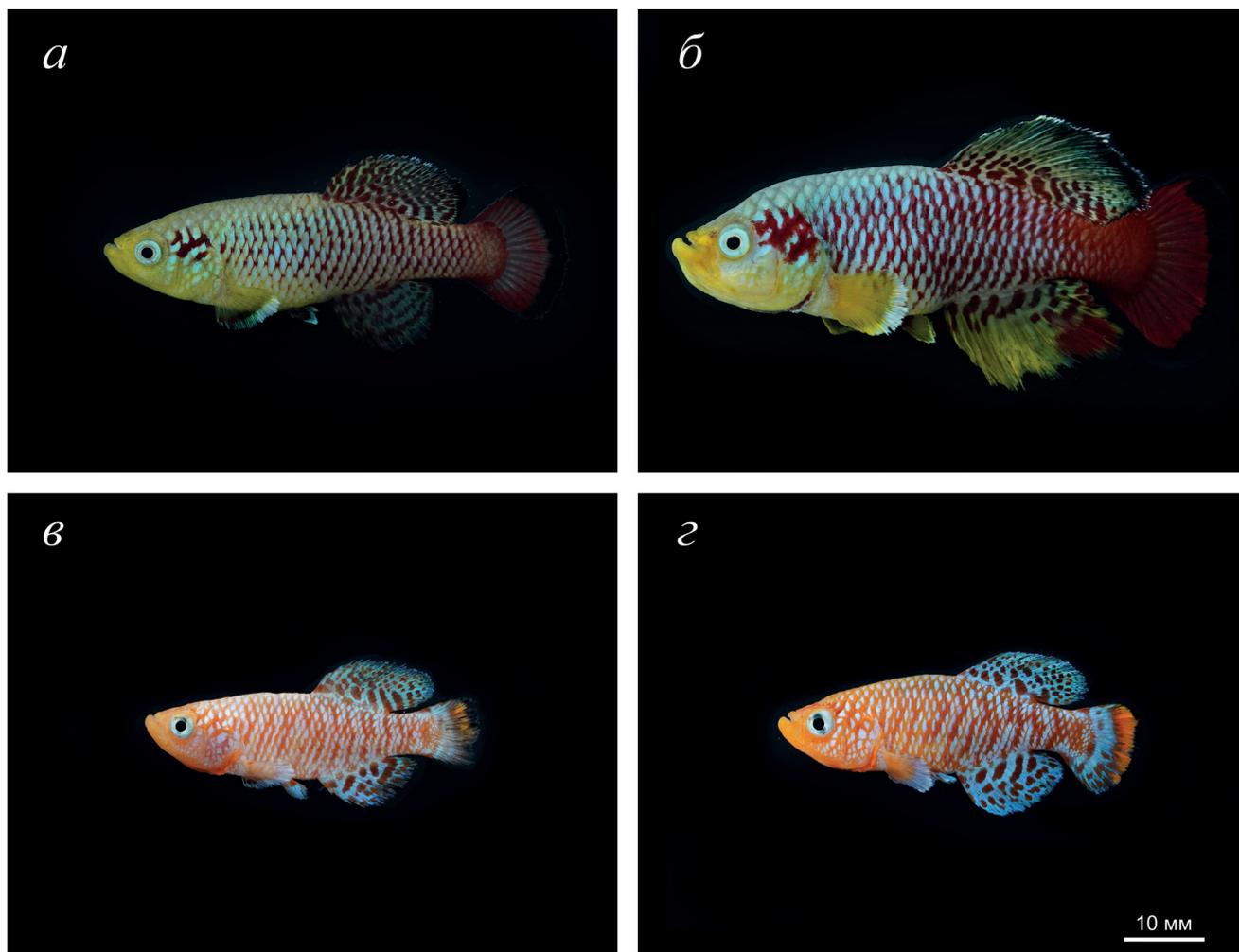


Рис. 1. Социальная стратификация в искусственно сформированных группах самцов *Nothobranchius guentheri* (а и б) и *Nothobranchius rachovii* (в и г) при избыточном кормлении личинками *Chironomus*. Уровень в иерархической лестнице находит отражение в размере особи, особенностях её окраски, а также поведенческом паттерне. Доминантные самцы крупнее и ярче (б и г), в то время как низкоранговые особи имеют меньшие размеры, бледную окраску и менее выраженный рисунок на поверхности тела (а и в)

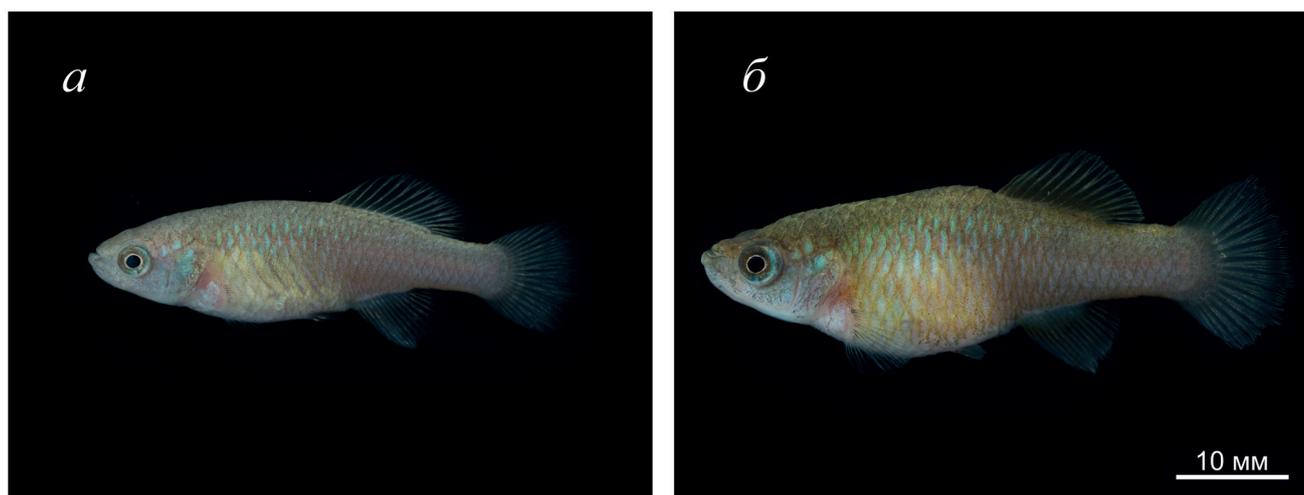


Рис. 2. В условиях аквакультуры среди нормальных самок *N. guentheri* средних размеров (а) отдельные особи маскулинизируются (б). Они могут значительно отличаться по размеру, иметь более тёмную окраску и проявлять высокий уровень агрессии по отношению к самкам и самцам своего вида

Как устроена иерархическая система у нотобранхиусов, и как это учитывать при планировании экспериментов? Широко известно, что животные одного вида в большинстве случаев формируют иерархическую социальную структуру при попадании в условия с ограниченными ресурсами [55]. Выявляются доминантные, иногда субдоминантные, и низкоранговые особи [56].

На начальных этапах работы с нотобранхиусами (*N. guentheri*, *N. rachovii* и *Nothobranchius flammicomantis*) нами было обнаружено, что при групповом содержании в лабораторных условиях рыбы активно взаимодействуют друг с другом. Характер взаимодействия однозначно говорил о невозможности проведения любых длительных экспериментов даже в том случае, если группа особей формировалась ещё в раннем возрасте и в аквариум не добавлялись новые особи.

При недостаточно обильном кормлении (3–4 раза в день до насыщения науплиусами *Artemia salina*) нотобранхиусы становятся более агрессивными, взаимодействие особей в популяции часто приводит к увечьям, а иногда даже к летальным исходам. Интересно, что такие особенности социального взаимодействия наблюдаются даже у одного из самых неагрессивных видов, *N. rachovii*. При избыточном кормлении (4–5 раз в день до насыщения личинками комаров семейства Chironomidae) рыбы реже проявляют агрессию, направленную на смерть противника, однако самцы демонстрируют по отношению к представителям своего пола поведенческий паттерн, характерный для процесса спаривания. Помимо этого, можно наблюдать диверсификацию как по

морфологическим признакам, так и по поведенческим паттернам (рис. 1).

При лабораторном разведении самок *N. guentheri* как в изоляции от самцов, так и при совместном содержании также наблюдается диверсификация особей по морфологическим признакам. Однако если у самцов формируется плавный переход между самыми яркими крупными и бледными мелкими особями, то для самок наблюдается немного другая ситуация. Самым ярким событием становится появление крупных агрессивных самок с более тёмной окраской, однако они никогда не приобретают фенотип и функционал самца (рис. 2).

Причины, которые определяют роль какой-то конкретной особи в социальной структуре, на данный момент неизвестны. Иерархическая структура распространена среди рыб [57], однако она ещё недостаточно изучена у нотобранхиусов и представляет не только фундаментальный научный интерес, но и важна для корректного составления выборки при проведении различных видов экспериментов. Например, это может быть важным при тестировании потенциальных геропротекторов и проведении сопутствующих поведенческих тестов. Также можно рассмотреть возможность использования представителей рода *Nothobranchius* в качестве моделей для изучения молекулярно-генетических основ различных поведенческих паттернов.

В наших экспериментах были обнаружены некоторые молекулярные механизмы, потенциально связанные с различиями в поведении нотобранхиусов и их иерархическим положением. Был проведён анализ транскриптома самцов *N. guentheri* разного социального

ранга — доминантных и наиболее низкоранговых. У доминантных самцов обнаружено значительное повышение уровня экспрессии транспозонов, ассоциированное преимущественно с экспрессией белок-кодирующих генов, вовлечённых в активность клеток нервной системы. Вероятно, высокая социальная позиция служит стрессовым стимулом, из-за которого и активируется экспрессия транспозонов.

Учитывая обнаруженные изменения на уровне транскриптома мозга в зависимости от иерархического статуса, можно предполагать наличие искажений при тестировании геропротекторов или при проведении любых других исследований. Полученные результаты необходимо учитывать при планировании экспериментов и составлении групп сравнения.

Как социальный стресс может влиять на жизнедеятельность организма и результаты трансляционных исследований? Нотобранхиусы отличаются высокой чувствительностью к социальному стрессу. В наших исследованиях наиболее яркой демонстрацией этой особен-

ности можно считать стремительную потерю способности регулировать положение своего тела в толще воды. Чаще всего у самцов это происходит при буллинге со стороны других самцов в аквариуме, у самок — при формировании нерестовой группы, когда одна из них не получает внимание самца. Такие особи преимущественно передвигаются по дну, из-за чего таких рыб называют «ползунами» (в англоязычной литературе «belly-sliders»), и социальный стресс — только одна из причин возникновения подобной патологии [58, 59]. Рис. 3 иллюстрирует значение социального стресса, его механизм и психогенный потенциал влияния на физиологическое состояние организма.

Полученные результаты могут частично объяснять широко известную проблему, связанную со сложностями в трансляции результатов экспериментов с животными на людей: модельные организмы при проведении эксперимента содержатся в практически идеальных условиях, в то время как люди постоянно

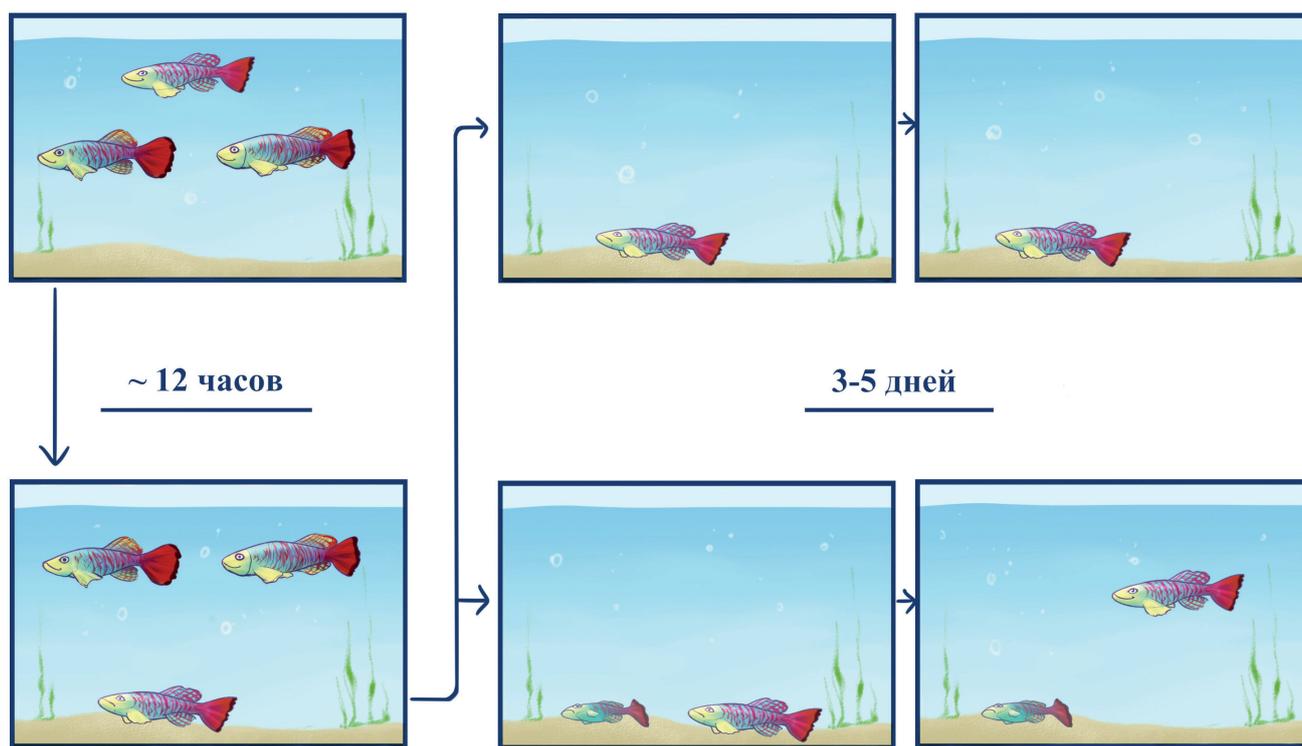


Рис. 3. Социальный стресс у самцов *N. guentheri*. Потенциал влияния буллинга на обоих участников взаимодействия. Если поместить в аквариум на ночь несколько самцов, например, троих, и предоставить им корм в избытке, то с большей долей вероятности один из них к утру окажется ползуном. Начало эксперимента в дневное время, скорее всего, приведёт к гибели одного из самцов вследствие агрессивного поведения и атак со стороны остальных. Став ползуном, особь старается найти безопасное место в аквариуме, где её не видно. Если наутро отсадить такую особь в отдельный аквариум, остановив стрессовое воздействие, идущее от соседей, то есть вероятность, что в течение 3–5 дней рыба вернётся к исходному состоянию и перестанет быть ползуном. Если к такому ползуну подсадить более мелкого ползуна (самца или самку в ещё более худшем состоянии), то формируется новая иерархия. Подопытный самец сам занимает главенствующее положение и нападает на маленького. В результате эксперимента оказалось, что если имеется более низкоранговый самец, которого можно подвергать буллингу, существенно возрастает вероятность возвращения к нормальному состоянию контроля положения тела в толще воды

подвергаются социальному стрессу во время приёма препаратов. Стресс связан как с осознанием своей болезни и сложностями в коммуникации, которые происходят на этом фоне, так и с обычными рутинными ситуациями, которые почти каждый день случаются с человеком. Наша гипотеза заключается в том, что для получения более релевантных результатов клинических испытаний необходимо дополнять их теми факторами, которые окружают человека в реальной жизни. Подверженность нотобранхиусов социальному стрессу предоставляет исследователям такую возможность.

СТАРЕНИЕ

Подавляющее большинство животных имеют сходные паттерны старения, хотя известны и исключения. Различия обычно затрагивают среднюю продолжительность жизни и динамику проявления возраст-ассоциированных признаков/заболеваний – скорость старения.

Изучать механизмы старения полностью на человеке невозможно, особенно если речь идёт о тестировании потенциальных лекарственных препаратов. Необходимы модельные животные. При их выборе приоритетными являются такие факторы, как эволюционная близость, схожесть процессов старения с человеком и наличие характерных признаков, которые могут быть использованы в качестве биомаркеров процесса старения. Также желательна небольшая масса тела животного и минимальная продолжительность жизни. Последние два пункта позволяют не только быстрее получить результаты работы, но и существенно сократить временные и финансовые затраты на тестируемый препарат. Прежде чем принять решение о корректности использования нотобранхиусов в качестве модельного организма, важно подтвердить, что выбранная модель является адекватной для экстраполяции результатов исследования.

При относительно коротком жизненном цикле представители рода *Nothobranchius* проходят типичные для млекопитающих, включая

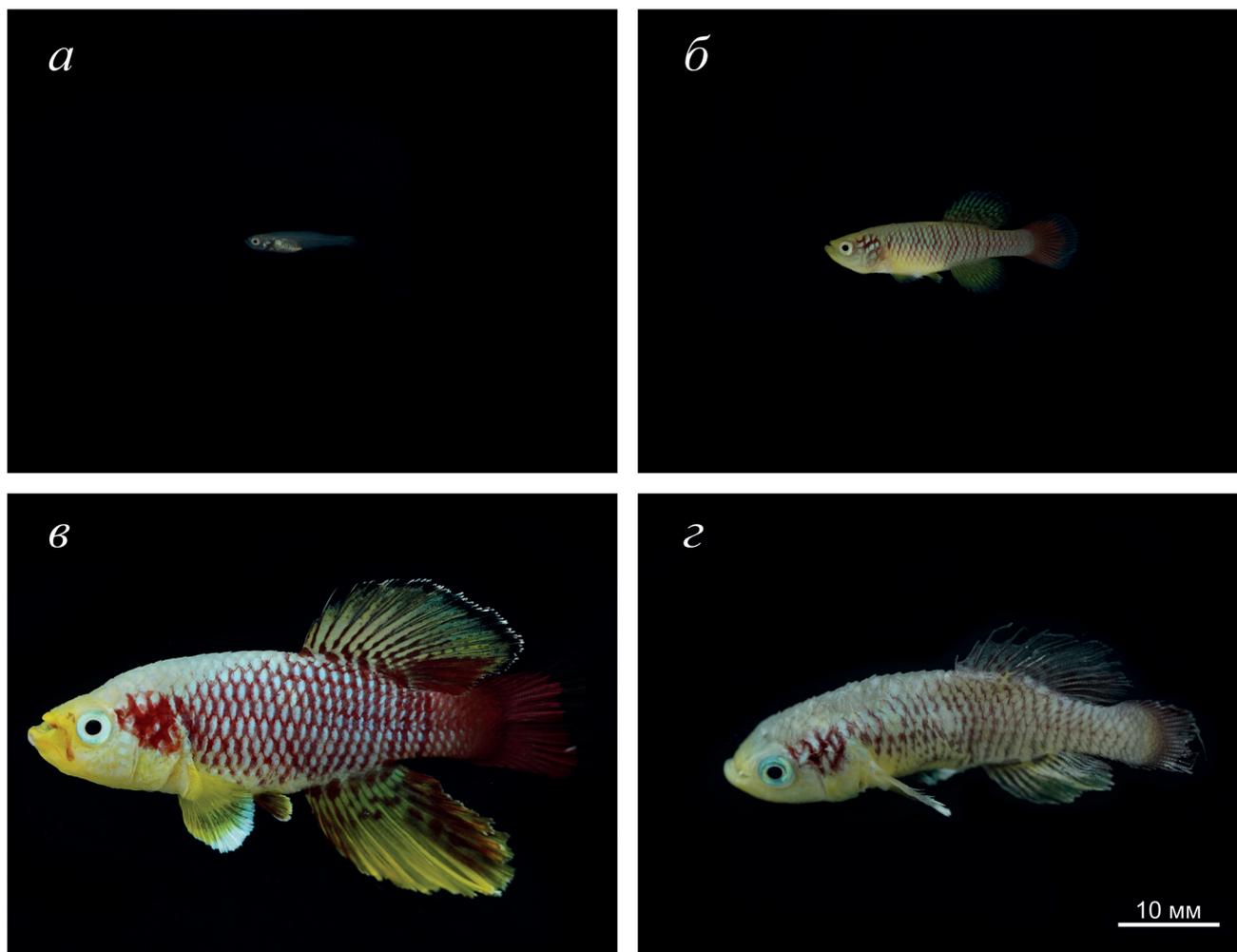


Рис. 4. Самцы *N. guentheri* разных возрастов: 7 дней (а); 2 недели (б); 3 месяца (в) и 18 месяцев (г)

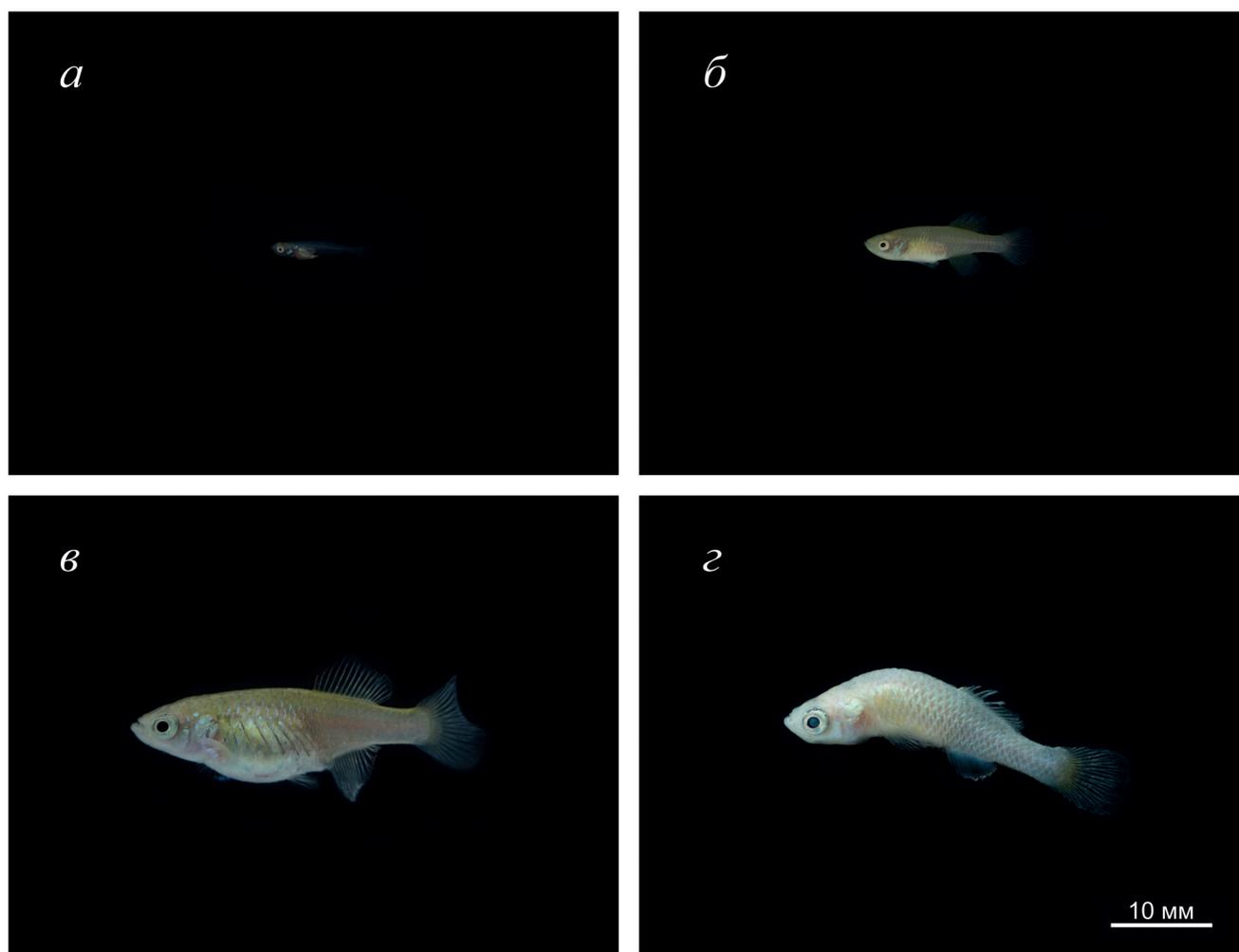


Рис. 5. Самки *N. guentheri* разных возрастов: 7 дней (а); 2 недели (б); 3 месяца (в) и 18 месяцев (г)

человека, этапы старения. Это выражается в нескольких проявлениях, в том числе постепенности развития признаков: нотобранхиусы теряют насыщенность и чёткость окраски, теряют мышечную массу и вес тела, накапливают мутации, демонстрируют снижение локомоторной активности. С возрастом у нотобранхиусов, как и у человека, синхронность календарного и биологического возраста всё больше нарушается. То есть в одном календарном возрасте особи могут существенно отличаться друг от друга по количеству и специфическому набору старческих признаков.

Какие признаки стоит рассматривать при разработке методов коррекции проявлений старения на нотобранхиусах? Являясь модельными организмами в геронтологии, нотобранхиусы имеют ряд морфологических признаков, которые удобно использовать в качестве маркеров старения. Статус этих маркеров и его изменения необходимо отслеживать в течение эксперимента. Оценка маркеров старения позволяет фиксировать динамику возраст-ассоциирован-

ных патологий и оценивать биологический возраст при тестировании различных интервенций. Также внешние признаки старения необходимо учитывать при методологических подходах, например, при составлении выборки для получения статистически значимых результатов, особенно если тест проводится на старых рыбах, так как к этому времени особи в группе могут значительно разойтись по биологическому возрасту.

Самцы теряют насыщенность окраски тела, узор на анальном и спинном плавнике бледнеет и теряет чёткость. Некоторые исследователи видят в этих процессах у нотобранхиусов параллель с млекопитающими, которые с возрастом постепенно теряют пигмент волос и кожи [60]. На рис. 4 представлен самец *N. guentheri* на четырёх стадиях развития — до начала окрашивания, в процессе приобретения окраски, в зрелости и в старости.

У старых нотобранхиусов заметно нарушается целостность плавников, причём даже в условиях индивидуального содержания, предотвращающего риск повреждения особями друг

друга. Значительные нарушения претерпевает опорно-двигательная система — искривлением позвоночника страдают как самцы, так и самки. У некоторых особей образуется «горб», также наблюдается истощение мышц, потеря веса. Старым особям свойственны нарушения зрительной системы. Довольно часто, особенно у самок, образуются мутно-белые пятна, которые могут расти и полностью «застилать» роговицу глаза подобно катаракте (рис. 5). У самцов чаще отмечается необратимое постепенное уменьшение зрачка до состояния едва заметной точки.

С возрастом нотобранхиусы теряют способность к регенерации тканей, например, 8-недельные *N. furzeri* (штамм MZM-0703) способны почти полностью регенерировать хвостовой плавник в течение 4 недель, а в возрасте 54 недель — уже только 46% от первоначального размера плавника [61]. Подобно большинству животных, рыбы рода *Nothobranchius* постепенно утрачивают репродуктивную способность, которая у *N. furzeri* начинает снижаться уже с 8–10 недель жизни [58].

Как и у человека, характерной чертой старения нотобранхиусов является развитие опухолевых новообразований. Опухоли, изученные в разных штаммах *N. furzeri*, имели нарушения в таких белках, как Bcl-2, цитокератин-8, карциноэмбриональный антиген и p53. Наиболее подверженным новообразованиям органом у нотобранхиусов является печень [62]. Вероятность возникновения неоплазий увеличивается по мере старения рыбы [63], что наблюдается и у людей [64]. Примечательно, что заболеваемость раком печени у самцов *N. furzeri* выше, чем у самок [62], это также повторяет статистику заболеваемости раком печени у людей [41, 65].

Перечисленные признаки старения нотобранхиусов соответствуют некоторым из возрастных изменений, происходящих у человека, мышей и других позвоночных [66]. Таким образом, в арсенале исследователей имеется набор биомаркеров старения представителей рода *Nothobranchius*, позволяющий изучать механизмы возраст-зависимых патологий различных систем органов, оценивать геронепротекторные эффекты тестируемых интервенций и отслеживать динамику возрастных изменений неинвазивным способом, получая релевантные результаты экспериментов на позвоночном животном за короткий срок.

Какие молекулярно-генетические нарушения нотобранхиусов наиболее перспективно изучать в аспекте старения? В 2015 году был отсекувенирован и собран *de novo* геном *N. furzeri*, проведена аннотация [67]. Оказалось, что некоторые гены были связаны с продолжительностью жизни

и старением (*mtor*, *4ebp*, *s6k*, *insr*, *foxo3a/b*, *ampk* и *polg*), аналогичная ассоциация была продемонстрирована и для нескольких генов, кодируемых митохондриальным геномом [43]. Генетические локусы, ассоциированные с продолжительностью жизни, расположены у *N. furzeri* на половой хромосоме и включают: 31 белок-кодирующий ген, 6 генов длинных некодирующих РНК и 2 гена малых ядерных РНК. Можно отметить ген *GRN*, кодирующий белок програнулин, который вовлечён в нейродегенеративные заболевания и регуляцию продолжительности жизни у мышей, *GSTT1A*, ген глутатион-S-трансфераз (окислительно-восстановительных ферментов гомеостаза, которые регулируют продолжительность жизни у червей и мышей), а также гены *STAT3* и *STAT5.1 (2of6)*, кодирующие два фактора транскрипции, участвующие в регуляции воспалительных процессов [43, 67].

Истощение теломер — типичный процесс старения клеток людей и многих других организмов, в том числе модельных [68–71], но он не является однозначным биомаркером старения нотобранхиусов. Было продемонстрировано, что у долгоживущего штамма *N. furzeri* теломеры истощаются с возрастом, а у штамма GRZ они почти не укорачиваются, возможно, из-за недолгой продолжительности жизни этого штамма [72]. Однако линия *N. furzeri* с мутацией теломеразы продемонстрировала преждевременное бесплодие, резкое снижение количества красных и белых кровяных клеток, аномалии в эпителиальных клетках кишечника, включая снижение полярности и увеличение соотношения размеров ядер и цитоплазмы [73]. По-видимому, теломераза играет ключевую роль в поддержании гомеостаза организма у *N. furzeri*, но не влияет на продолжительность жизни штамма GRZ.

У многих видов, включая человека, со старением коррелирует нестабильность митохондриальной ДНК (мтДНК) [70, 74–77]. Причина в том, что мтДНК не имеет гистонов, поэтому она в большей степени, чем ядерная ДНК, подвержена мутагенезу [78]. Также наблюдается снижение копийности мтДНК [74, 79], что приводит к раннему проявлению возраст-ассоциированных заболеваний [80]. Данный процесс коррелирует с возрастом во многих тканях *N. furzeri*, включая мозг, печень и мышцы [81].

Возрастное понижение активности протеасом, отвечающих за контроль качества белка, начинающееся после полового созревания, в итоге приводит к нарушению стехиометрии белков при старении. Прогрессирующая утрата нормального протеостаза считается одним

из основных факторов нейродегенерации как у *N. furzeri*, так и у человека [82].

Для каких нозологических категорий использование нотобранхиусов как модели возраст-зависимых заболеваний наиболее оправдано, обосновано и перспективно? При использовании рыб рода *Nothobranchius* в качестве модели старения человека наибольшее внимание уделяется процессам нейродегенерации. Например, было показано [4], что в глиальных клетках головного мозга *N. furzeri* с возрастом повышается регуляция глиального фибриллярного кислого белка GFAP, как это происходит при старении у млекопитающих. Из-за этого с возрастом накапливаются богатые липидами пигментные гранулы – липофусцин, что снижает поддержку и защиту нейронов, обеспечиваемых глией. Вместе с этим дегенерируют сами нейроны – в них накапливаются молекулы бета-амилоида и агрегируют, образуя бляшки, наблюдаемые у людей с болезнью Альцгеймера, самой значимой и известной нейродегенерацией у человека.

Также у состарившихся *N. furzeri* наблюдается возраст-ассоциированная нейродегенерация норадренергических и дофаминергических нейронов, что напоминает предсимптомную стадию болезни Паркинсона [83]. Данные паттерны старения нервной системы свидетельствуют о том, что естественные генетические вариации способны влиять на восприимчивость дофаминергических нейронов *N. furzeri* и могут быть использованы для выявления модифицирующих факторов возрастной нейродегенерации.

Нарушение функций зрительной системы является значимым признаком старения и проявлением многих нейродегенеративных заболеваний. Более того, были идентифицированы специфические маркеры нейродегенеративных процессов в сетчатке старых *N. furzeri* [84].

Рыбы рода *Nothobranchius* используются как модель остеопороза, ассоциированного со старением. Остеопороз – частое возрастное заболевание опорно-двигательной системы человека. С возрастом в цитологическом профиле и минеральном составе костей *N. furzeri* наблюдаются не только возрастные, но и половые различия, которые могут быть приняты во внимание при изучении гендерных аспектов возрастных заболеваний опорно-двигательного аппарата [4].

Таким образом, представители рода *Nothobranchius* – превосходные модели для тестирования не только потенциальных геропротекторов [17, 85], но возраст-ассоциированных патологий человека.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нотобранхиусы таят в себе ещё немало загадок, и в обзоре мы рассмотрели лишь наиболее актуальные вопросы, которые можно сформулировать на существующем уровне развития техники. С усовершенствованием методических подходов возникнут и новые, не менее интересные вопросы. Что же мешает двигаться вперед, и какие методические сложности испытывают исследователи при работе с нотобранхиусами?

Первый блок методических проблем затрагивает особенности содержания животных и стандартизацию всех манипуляций с ними. Специалистам хорошо известно, что далеко не всегда даже опубликованные научные результаты уважаемых коллективов удаётся воспроизвести в других лабораториях. Важно максимально внимательно относиться к унификации процессов, причём в тесном сотрудничестве с коллегами. Известно, например, что повышение температуры воды изменяет среднюю продолжительность жизни. Однако такие попытки могут иметь и негативные последствия. Создание протоколов, позволяющих избежать использование не стандартизируемых материалов, например торфа, привело к тому, что у лабораторных животных *N. furzeri* изменилось соотношение диапауз в процессе эмбриогенеза – они практически не входили в диапаузу III.

Вторая группа вопросов – создание возможности проводить малоинвазивные тесты. Это могло бы обеспечить сбор биологического материала для исследований, не только пост-мортально или подвергая организм сильному стрессовому воздействию, и, таким образом, получать данные от одного и того же животного в динамике. В настоящее время попытки использовать, например, фрагменты плавников, приводят к тому, что часть животных необратимо становятся ползунами. Причём с возрастом доля таких случаев увеличивается, а плавники регенерируют всё хуже.

И, наконец, одна из самых неразработанных в методическом плане областей – это исследования поведения нотобранхиусов. Когнитивно-поведенческие тесты требуют от экспериментатора одновременно творческого подхода, наблюдательности, педантичности и огромного временного ресурса. Однако эта область является крайне привлекательной, потому что в ней есть ещё масса вопросов, на которые можно ответить, не дожидаясь появления новых методов и приборов. Вот лишь некоторые из них. В каких направлениях необходимо оптимизировать когнитивно-поведенческие тесты, в том числе для разных видов и в разном возрасте?

Что может быть положительным подкреплением при проведении когнитивно-поведенческих тестов? То есть как построить эксперимент, не используя лишь отрицательное подкрепление, что, несомненно, вызывает у особи стресс? Как при проведении экспериментов решить проблему влияния разного иерархического статуса тестируемых особей? Или же, наоборот, как построить эксперимент, чтобы учитывать этот статус?

Данный обзор, подчёркивающий потенциал модельных рыб рода *Nothobranchius*, призван стимулировать применение данной модели в борьбе за активное долголетие.

Вклад авторов. А.В. Кудрявцева, Е.В. Булавкина – концепция и руководство работой;

Е.В. Булавкина., М.А. Гончарова., А.И. Шувалова – подготовка иллюстраций. Все авторы участвовали в анализе литературы и написании обзора.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ, Соглашение № 075-15-2019-1660.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам учреждения, в котором проводились исследования, и утверждённым правовым актам РФ и международных организаций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cellerino, A., Valenzano, D. R., and Reichard, M. (2016) From the bush to the bench: the annual *Nothobranchius* fishes as a new model system in biology, *Biol. Rev.*, **91**, 511–533, doi: 10.1111/brv.12183.
2. Hu, C.-K., and Brunet, A. (2018) The African turquoise killifish: a research organism to study vertebrate aging and diapause, *Aging Cell*, **17**, e12757, doi: 10.1111/ace1.12757.
3. Poeschla, M., and Valenzano, D. R. (2020) The turquoise killifish: a genetically tractable model for the study of aging, *J. Exp. Biol.*, **223**, jeb209296, doi: 10.1242/jeb.209296.
4. Butylina, M., Föger-Samwald, U., Gamsjaeger, S., Wahl-Figlash, K., Kothmayer, M., Paschalis, E. P., Pusch, O., and Pietschmann, P. (2022) *Nothobranchius furzeri*, the turquoise killifish: a model of age-related osteoporosis? *Gerontology*, 1–13, doi: 10.1159/000524300.
5. Dance, A. (2016) Live fast, die young, *Nature*, **535**, 453–455, doi: 10.1038/535453a.
6. Valdesalici, S., and Cellerino, A. (2003) Extremely short lifespan in the annual fish *Nothobranchius furzeri*, *Proc. Biol. Sci.*, **270**, doi: 10.1098/rsbl.2003.0048.
7. Dong, Y., Cui, P., Li, Z., and Zhang, S. (2017) Aging asymmetry: systematic survey of changes in age-related biomarkers in the annual fish *Nothobranchius guentheri*, *Fish Physiol. Biochem.*, **43**, 309–319, doi: 10.1007/s10695-016-0288-1.
8. Li, C., Song, L., Zhou, Y., Yuan, J., and Zhang, S. (2022) Identification of Isthmin1 in the small annual fish, *Nothobranchius guentheri*, as a novel biomarker of aging and its potential rejuvenation activity, *Biogerontology*, **23**, 99–114, doi: 10.1007/s10522-021-09948-5.
9. Zhikrevetskaya, S., Peregudova, D., Danilov, A., Plyusnina, E., Krasnov, G., Dmitriev, A., Kudryavtseva, A., Shaposhnikov, M., and Moskalev, A. (2015) Effect of low doses (5–40 cGy) of gamma-irradiation on lifespan and stress-related genes expression profile in *Drosophila melanogaster*, *PLoS One*, **10**, e0133840, doi: 10.1371/journal.pone.0133840.
10. Proshkina, E. N., Shaposhnikov, M. V., Sadritdinova, A. F., Kudryavtseva, A. V., and Moskalev, A. A. (2015) Basic mechanisms of longevity: A case study of *Drosophila* pro-longevity genes, *Ageing Res. Rev.*, **24**, 218–231, doi: 10.1016/j.arr.2015.08.005.
11. Proshkina, E., Lashmanova, E., Dobrovolskaya, E., Zemskaya, N., Kudryavtseva, A., Shaposhnikov, M., and Moskalev, A. (2016) Geroprotective and radioprotective activity of quercetin, (–)-epicatechin, and ibuprofen in *Drosophila melanogaster*, *Front. Pharmacol.*, **7**, doi: 10.3389/fphar.2016.00505.
12. Moskalev, A., Shaposhnikov, M., Proshkina, E., Belyi, A., Fedintsev, A., Zhikrivetskaya, S., Guvatova, Z., Sadritdinova, A., Snezhkina, A., Krasnov, G., and Kudryavtseva, A. (2016) The influence of pro-longevity gene *Gclc* overexpression on the age-dependent changes in *Drosophila* transcriptome and biological functions, *BMC Genomics*, **17**, 1046, doi: 10.1186/s12864-016-3356-0.
13. Lashmanova, E., Zemskaya, N., Proshkina, E., Kudryavtseva, A., Volosnikova, M., Marusich, E., Leonov, S., Zhavoronkov, A., and Moskalev, A. (2017) The evaluation of geroprotective effects of selected flavonoids in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*, *Front. Pharmacol.*, **8**, 884, doi: 10.3389/fphar.2017.00884.
14. Yuan, R., Tsaih, S. W., Petkova, S. B., Marin de Esvikova, C., Xing, S., Marion, M. A., Bogue, M. A., Mills, K. D., Peters, L. L., Bult, C. J., Rosen, C. J., Sundberg, J. P., Harrison, D. E., Churchill, G. A., and Paigen, B. (2009) Aging in inbred strains of mice:

- study design and interim report on median lifespans and circulating IGF1 levels: median lifespans and IGF1 levels of 31 inbred strains, *Aging Cell*, **8**, 277-287, doi: 10.1111/j.1474-9726.2009.00478.x.
15. Seidel, J., and Valenzano, D. R. (2018) The role of the gut microbiome during host ageing, *F1000Research*, **7**, 1086, doi: 10.12688/f1000research.15121.1.
 16. Smith, P., Willemsen, D., Popkes, M., Metge, F., Gandiwa, E., Reichard, M., and Valenzano, D. R. (2017) Regulation of life span by the gut microbiota in the short-lived African turquoise killifish, *eLife*, **6**, e27014, doi: 10.7554/eLife.27014.
 17. Bakhtogarimov, I. R., Kudryavtseva, A. V., Krasnov, G. S., Gladyshev, N. S., Volodin, V. V., Kudryavtsev, A. A., Bulavkina, E. V., Goncharova, M. A., Ledyeva, V. S., Pastukhov, I. S., Vershinina, Y. S., Starkova, A. M., Snezhkina, A. V., Shuvalova, A. I., Pavlov, V. S., Nikiforov-Nikishin, D. L., Moskalev, A. A., and Guvatova, Z. G. (2022) The effect of meclofenoxate on the transcriptome of aging brain of *Nothobranchius guentheri* annual killifish, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 2491, doi: 10.3390/ijms23052491.
 18. Guvatova, Z. G., Fedorova, M. S., Vershinina, Y. S., Pudova, E. A., Lipatova, A. V., Volodin, V. V., Gladyshev, N. S., Tokarev, A. T., Kornev, A. B., Pavlov, V. S., Bakhtogarimov, I. R., Krysanov, E. Y., Moskalev, A. A., Krasnov, G. S., and Kudryavtseva, A. V. (2021) *De novo* transcriptome profiling of brain tissue from the annual killifish *Nothobranchius guentheri*, *Life*, **11**, 137, doi: 10.3390/life11020137.
 19. Gao, X., Cai, T., Lin, Y., Zhu, R., Hao, W., Guo, S., and Hu, G. (2022) The function of glucose metabolism in embryonic diapause of annual killifish, *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics*, **42**, 100965, doi: 10.1016/j.cbd.2022.100965.
 20. Romney, A. L., and Podrabsky, J. E. (2017) Transcriptomic analysis of maternally provisioned cues for phenotypic plasticity in the annual killifish, *Austrofundulus limnaeus*, *EvoDevo*, **8**, 6, doi: 10.1186/s13227-017-0069-7.
 21. Romney, A. L. T., Davis, E. M., Corona, M. M., Wagner, J. T., and Podrabsky, J. E. (2018) Temperature-dependent vitamin D signaling regulates developmental trajectory associated with diapause in an annual killifish, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 12763-12768, doi: 10.1073/pnas.1804590115.
 22. Van der Merwe, P. W., Cotterill, F. P. D., Kandziora, M., Watters, B. R., Nagy, B., Genade, T., Flügel, T. J., Svendsen, D. S., and Bellstedt, D. U. (2021) Genomic fingerprints of palaeogeographic history: The tempo and mode of rift tectonics across tropical Africa has shaped the diversification of the killifish genus *Nothobranchius* (Teleostei: Cyprinodontiformes), *Mol. Phylogenet. Evol.*, **158**, 106988, doi: 10.1016/j.ympev.2020.106988.
 23. Whitlock, M. C., and Phillips, P. C. (2014) Drift: Introduction, in *eLS*, 1st ed., John Wiley & Sons, Ltd, doi: 10.1002/9780470015902.a0001698.pub2.
 24. Lambert, J. W., Reichard, M., and Pincheira-Donoso, D. (2019) Live fast, diversify non-adaptively: evolutionary diversification of exceptionally short-lived annual killifishes, *BMC Evol. Biol.*, **19**, 10, doi: 10.1186/s12862-019-1344-0.
 25. Costa, W. J. E. M. (2017) Taxonomic revision of the seasonal killifish genus *Nothobranchius* from Zanzibar, East Africa (Cyprinodontoidae: Aplocheilidae), *J. Nat. Hist.*, **51**, 1609-1624, doi: 10.1080/00222933.2017.1330976.
 26. Watters, B. R., Nagy, B., van der Merwe, P. D. W., Cotterill, F. P. D., and Bellstedt, D. U. (2022) *Review of the Nothobranchius taeniopygus species group from central and western Tanzania with descriptions of five new species and redescription of Nothobranchius taeniopygus (Teleostei: Nothobranchiidae)*, DE: Verlag Dr. Friedrich Pfeil, 2019. Accessed: Oct. 27, 2022, doi: 10.23788/IEF-1110.
 27. Nagy, B., Watters, B. R., and Raspopova, A. A. (2021) *Nothobranchius nikiforovi*, a new species of seasonal killifish from the lower Matandu drainage in south-eastern coastal Tanzania (Cyprinodontiformes: Nothobranchiidae), *Zootaxa*, **4950**, 103-122, doi: 10.11646/zootaxa.4950.1.5.
 28. Shidlovskiy, K. M., Watters, B. R., and Wildekamp, R. H. (2019) Notes on the annual killifish species *Nothobranchius rachovii* (Cyprinodontiformes; Nothobranchiidae) with the description of two new species, *Zootaxa*, **2724**, 37, doi: 10.11646/zootaxa.2724.1.3.
 29. Nagy, B. (2018) *Nothobranchius ditte*, a new species of annual killifish from the Lake Mweru basin in the Democratic Republic of the Congo (Teleostei: Nothobranchiidae), *Ichthyol. Explor. Freshw.*, **28**, 115-134.
 30. Arai, R. (2011) *Fish Karyotypes*, Tokyo, Springer Japan, doi: 10.1007/978-4-431-53877-6.
 31. Navarro, A., and Barton, N. H. (2003) Chromosomal speciation and molecular divergence – accelerated evolution in rearranged chromosomes, *Science*, **300**, 321-324, doi: 10.1126/science.1080600.
 32. Kirkpatrick, M., and Barton, N. (2006) Chromosome inversions, local adaptation and speciation, *Genetics*, **173**, 419-434, doi: 10.1534/genetics.105.047985.
 33. Noor, M. A. F., Grams, K. L., Bertucci, L. A., and Reiland, J. (2001) Chromosomal inversions and the reproductive isolation of species, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 12084-12088, doi: 10.1073/pnas.221274498.
 34. Rieseberg, L. H. (2001) Chromosomal rearrangements and speciation, *Trends Ecol. Evol.*, **16**, 351-358, doi: 10.1016/S0169-5347(01)02187-5.
 35. Krysanov, E., and Demidova, T. (2018) Extensive karyotype variability of African fish genus *Nothobranchius* (Cyprinodontiformes), *Comp. Cytogenet.*, **12**, 387-402, doi: 10.3897/CompCytogen.v12i3.25092.
 36. Krysanov, E., Demidova, T., and Nagy, B. (2016) Divergent karyotypes of the annual killifish genus *Nothobranchius* (Cyprinodontiformes, Nothobranchiidae),

- Comp. Cytogenet.*, **10**, 439-445, doi: 10.3897/CompCytogen.v10i3.9863.
37. Dorn, A., Musilová, Z., Platzer, M., Reichwald, K., and Cellerino, A. (2014) The strange case of East African annual fishes: aridification correlates with diversification for a savannah aquatic group? *BMC Evol. Biol.*, **14**, 210, doi: 10.1186/s12862-014-0210-3.
 38. Ewulonu, U. K., Haas, R., and Turner, B. J. (1985) A multiple sex chromosome system in the annual killifish, *Nothobranchius guentheri*, *Copeia*, **1985**, 503, doi: 10.2307/1444868.
 39. Kitano, J., and Peichel, C. L. (2012) Turnover of sex chromosomes and speciation in fishes, *Environ. Biol. Fishes*, **94**, 549-558, doi: 10.1007/s10641-011-9853-8.
 40. Costa, W. J. E. M. (2018) Comparative morphology, phylogeny and classification of African seasonal killifishes of the tribe Nothobranchiini (Cyprinodontiformes: Aplocheilidae), *Zool. J. Linn. Soc.*, **184**, 115-135, doi: 10.1093/zoolinnean/zlx102.
 41. Reichwald, K., Petzold, A., Koch, P., Downie, B. R., Hartmann, N., Pietsch, S., Baumgart, M., Chalopin, D., Felder, M., Bens, M., Sahm, A., Szafranski, K., Taudien, S., Groth, M., Arisi, I., Weise, A., Bhatt, S. S., Sharma, V., Kraus, J. M., Schmid, F., Priebe, S., Liehr, T., Görlach, M., Than, M. E., Hiller, M., Kestler, H. A., Volff, J. N., Schartl, M., Cellerino, A., Englert, C., and Platzer, M. (2015) Insights into sex chromosome evolution and aging from the genome of a short-lived fish, *Cell*, **163**, 1527-1538, doi: 10.1016/j.cell.2015.10.071.
 42. Nikiforov-Nikishin, A., Smorodinskaya, S., Kochetkov, N., Nikiforov-Nikishin, D., Danilenko, V., Bugaev, O., Vatlin, A., Abrosimova, N., Antipov, S., Kudryavtsev, A., and Klimov, V. (2022) Effects of three feed additives on the culturable microbiota composition and histology of the anterior and posterior intestines of Zebrafish (*Danio rerio*), *Animals*, **12**, 2424, doi: 10.3390/ani12182424.
 43. Cui, R., Willemsen, D., and Valenzano, D. R. (2020) *Nothobranchius furzeri* (African Turquoise Killifish), *Trends Genet.*, **36**, 540-541, doi: 10.1016/j.tig.2020.01.012.
 44. Terzibasi Tozzini, E., and Cellerino, A. (2020) *Nothobranchius* annual killifishes, *EvoDevo*, **11**, 25, doi: 10.1186/s13227-020-00170-x.
 45. Sahm, A., Platzer, M., and Cellerino, A. (2016) Outgroups and positive selection: the *Nothobranchius furzeri* case, *Trends Genet.*, **32**, 523-525, doi: 10.1016/j.tig.2016.06.002.
 46. Mustafin, R. N., and Khusnutdinova, E. K. (2019) The role of transposable elements in the ecological morphogenesis under the influence of stress, *Vavilov J. Genet. Breed.*, **23**, 380-389, doi: 10.18699/VJ19.506.
 47. Polačik, M., Vrtílek, M., Reichard, M., Žák, J., Blažek, R., and Podrabsky, J. (2021) Embryo ecology: Developmental synchrony and asynchrony in the embryonic development of wild annual fish populations, *Ecol. Evol.*, **11**, 4945-4956, doi: 10.1002/ece3.7402.
 48. Duerr, J. M., and Podrabsky, J. E. (2010) Mitochondrial physiology of diapausing and developing embryos of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus*: implications for extreme anoxia tolerance, *J. Comp. Physiol. B*, **180**, 991-1003, doi: 10.1007/s00360-010-0478-6.
 49. Podrabsky, J. E., Garrett, I. D. F., and Kohl, Z. F. (2010) Alternative developmental pathways associated with diapause regulated by temperature and maternal influences in embryos of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus*, *J. Exp. Biol.*, **213**, 3280-3288, doi: 10.1242/jeb.045906.
 50. Matias, J. R., and Adrias, A. Q. (2010) The use of annual killifish in the biocontrol of the aquatic stages of mosquitoes in temporary bodies of fresh water; a potential new tool in vector control, *Parasit. Vectors*, **3**, 46, doi: 10.1186/1756-3305-3-46.
 51. Briffa, M., and Weiss, A. (2010) Animal personality, *Curr. Biol.*, **20**, R912-R914, doi: 10.1016/j.cub.2010.09.019.
 52. Biro, P. A., Adriaenssens, B., and Sampson, P. (2014) Individual and sex-specific differences in intrinsic growth rate covary with consistent individual differences in behaviour, *J. Anim. Ecol.*, **83**, 1186-1195, doi: 10.1111/1365-2656.12210.
 53. Budaev, S., and Brown, C. (2011) Personality Traits and Behaviour, in *Fish Cognition and Behavior* (Brown, C., Laland, K., and Krause, J., eds) 1st Edn., Wiley, pp. 135-165, doi: 10.1002/9781444342536.ch7.
 54. Thoré, E. S. J., Steenaerts, L., Philippe, C., Grégoir, A., Brendonck, L., and Pinceel, T. (2018) Individual behavioral variation reflects personality divergence in the upcoming model organism *Nothobranchius furzeri*, *Ecol. Evol.*, **8**, 8448-8457, doi: 10.1002/ece3.4356.
 55. Jolles, J. W., King, A. J., and Killen, S. S. (2020) The role of individual heterogeneity in collective animal behaviour, *Trends Ecol. Evol.*, **35**, 278-291, doi: 10.1016/j.tree.2019.11.001.
 56. Nikiforov-Nikishin, D. L., Kochetkov, N. I., Mikodina, E. V., Nikiforov-Nikishin, A. L., Simakov, Y. G., Golovacheva, N. A., Gorbunov, A. V., Chebotarev, S. N., Kirichenko, E. Y., Zabiya, I. Y., Pastukhov, I. S., and Bren, A. B. (2022) Evaluation of age-dependent changes in the coloration of male killifish *Nothobranchius guentheri* using new photoprocessing methods, *Biology*, **11**, 205, doi: 10.3390/biology11020205.
 57. McMahon, S. J., Munday, P. L., Wong, M. Y. L., and Donelson, J. M. (2019) Elevated CO₂ and food ration affect growth but not the size-based hierarchy of a reef fish, *Sci. Rep.*, **9**, 19706, doi: 10.1038/s41598-019-56002-z.
 58. Blažek, R., Polačik, M., and Reichard, M. (2013) Rapid growth, early maturation and short generation time in African annual fishes, *EvoDevo*, **4**, 24, doi: 10.1186/2041-9139-4-24.

59. Fonseca, A. P. da, Volcan, M. V., Romano, L. A., and Robaldo, R. B. (2018) Metaplasia in swim bladder epithelium of the endangered annual fish *Austrolebias nigrofasciatus* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) results in inadequate swimming and delayed growth, *Neotropical Ichthyol.*, **16**, doi: 10.1590/1982-0224-20170038.
60. Geyfman, M., and Andersen, B. (2010) Clock genes, hair growth and aging, *Aging*, **2**, 122-128, doi: 10.18632/aging.100130.
61. Wendler, S., Hartmann, N., Hoppe, B., and Englert, C. (2015) Age-dependent decline in fin regenerative capacity in the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*, *Aging Cell*, **14**, 857-866, doi: 10.1111/ace1.12367.
62. Di Cicco, E., Tozzini, E. T., Rossi, G., and Cellerino, A. (2011) The short-lived annual fish *Nothobranchius furzeri* shows a typical teleost aging process reinforced by high incidence of age-dependent neoplasias, *Exp. Gerontol.*, **46**, 249-256, doi: 10.1016/j.exger.2010.10.011.
63. Pompei, F., Polkanov, M., and Wilson, R. (2001) Age distribution of cancer in mice: the incidence turnover at old age, *Toxicol. Ind. Health*, **17**, 7-16, doi: 10.1191/0748233701th091oa.
64. De Magalhães, J. P. (2013) How ageing processes influence cancer, *Nat. Rev. Cancer*, **13**, 357-365, doi: 10.1038/nrc3497.
65. Nordenstedt, H., White, D. L., and El-Serag, H. B. (2010) The changing pattern of epidemiology in hepatocellular carcinoma, *Dig. Liver Dis.*, **42**, S206-S214, doi: 10.1016/S1590-8658(10)60507-5.
66. Vanhooren, V., and Libert, C. (2013) The mouse as a model organism in aging research: Usefulness, pitfalls and possibilities, *Ageing Res. Rev.*, **12**, 8-21, doi: 10.1016/j.arr.2012.03.010.
67. Valenzano, D. R., Benayoun, B. A., Singh, P. P., Zhang, E., Etter, P. D., Hu, C. K., Clément-Ziza, M., Willemsen, D., Cui, R., Harel, I., Machado, B. E., Yee, M. C., Sharp, S. C., Bustamante, C. D., Beyer, A., Johnson, E. A., and Brunet, A. (2015) The African Turquoise killifish genome provides insights into evolution and genetic architecture of lifespan, *Cell*, **163**, 1539-1554, doi: 10.1016/j.cell.2015.11.008.
68. Benetos, A., Okuda, K., Lajemi, M., Kimura, M., Thomas, F., Skurnick, J., Labat, C., Bean, K., and Aviv, A. (2001) Telomere length as an indicator of biological aging: the gender effect and relation with pulse pressure and pulse wave velocity, *Hypertension*, **37**, 381-385, doi: 10.1161/01.hyp.37.2.381.
69. Harley, C. B., Futcher, A. B., and Greider, C. W. (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts, *Nature*, **345**, 458-460, doi: 10.1038/345458a0.
70. López-Otin, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G. (2013) The hallmarks of aging, *Cell*, **153**, 1194-1217, doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039.
71. Zhu, L., Hathcock, K. S., Hande, P., Lansdorp, P. M., Seldin, M. F., and Hodes, R. J. (1998) Telomere length regulation in mice is linked to a novel chromosome locus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 8648-8653, doi: 10.1073/pnas.95.15.8648.
72. Hartmann, N., Reichwald, K., Lechel, A., Graf, M., Kirschner, J., Dorn, A., Terzibasi, E., Wellner, J., Platzer, M., Rudolph, K. L., Cellerino, A., and Englert, C. (2009) Telomeres shorten while Tert expression increases during ageing of the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*, *Mech. Ageing Dev.*, **130**, 290-296, doi: 10.1016/j.mad.2009.01.003.
73. Harel, I., Benayoun, B. A., Machado, B., Singh, P. P., Hu, C. K., Pech, M. F., Valenzano, D. R., Zhang, E., Sharp, S. C., Artandi, S. E., and Brunet, A. (2015) A platform for rapid exploration of aging and diseases in a naturally short-lived vertebrate, *Cell*, **160**, 1013-1026, doi: 10.1016/j.cell.2015.01.038.
74. Barazzoni, R., Short, K. R., and Nair, K. S. (2000) Effects of aging on mitochondrial DNA copy number and cytochrome c oxidase gene expression in rat skeletal muscle, liver, and heart, *J. Biol. Chem.*, **275**, 3343-3347, doi: 10.1074/jbc.275.5.3343.
75. Tauchi, H., and Sato, T. (1968) Age changes in size and number of mitochondria of human hepatic cells, *J. Gerontol.*, **23**, 454-461, doi: 10.1093/geronj/23.4.454.
76. Yen, T.-C., Chen, Y.-S., King, K.-L., Yeh, S.-H., and Wei, Y.-H. (1989) Liver mitochondrial respiratory functions decline with age, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **165**, 994-1003, doi: 10.1016/0006-291X(89)92701-0.
77. Yui, R., Ohno, Y., and Matsuura, E. T. (2003) Accumulation of deleted mitochondrial DNA in aging *Drosophila melanogaster*, *Genes Genet. Syst.*, **78**, 245-251, doi: 10.1266/ggs.78.245.
78. Tatarenkov, A., and Avise, J. C. (2007) Rapid concerted evolution in animal mitochondrial DNA, *Proc. Biol. Sci.*, **274**, 1795-1798, doi: 10.1098/rspb.2007.0169.
79. Bratic, A., and Larsson, N.-G. (2013) The role of mitochondria in aging, *J. Clin. Invest.*, **123**, 951-957, doi: 10.1172/JCI64125.
80. Vermulst, M., Wanagat, J., Kujoth, G. C., Bielas, J. H., Rabinovitch, P. S., Prolla, T. A., and Loeb, L. A. (2008) DNA deletions and clonal mutations drive premature aging in mitochondrial mutator mice, *Nat. Genet.*, **40**, 392-394, doi: 10.1038/ng.95.
81. Hartmann, N., Reichwald, K., Wittig, I., Dröse, S., Schmeisser, S., Lück, C., Hahn, C., Graf, M., Gausmann, U., Terzibasi, E., Cellerino, A., Ristow, M., Brandt, U., Platzer, M., and Englert, C. (2011) Mitochondrial DNA copy number and function decrease with age in the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*: decline of mitochondrial function in aging fish, *Aging Cell*, **10**, 824-831, doi: 10.1111/j.1474-9726.2011.00723.x.
82. Kelmer Sacramento, E., Kirkpatrick, J. M., Mazzetto, M., Baumgart, M., Bartolome, A., Di Sanzo, S., Caterino, C., Sanguanini, M., Papaevgeniou, N., Lefaki, M., Childs, D., Bagnoli, S., Terzibasi Tozzini, E., Di Fraia, D., Romanov, N., Sudmant, P. H., Huber, W.,

- Chondrogianni, N., Vendruscolo, M., Cellierino, A., and Ori, A. (2020) Reduced proteasome activity in the aging brain results in ribosome stoichiometry loss and aggregation, *Mol. Syst. Biol.*, **16**, doi: 10.15252/msb.20209596.
83. Bagnoli, S., Fronte, B., Bibbiani, C., Terzibasi Tozzini, E., and Cellierino, A. (2022) Quantification of noradrenergic-, dopaminergic-, and tectal-neurons during aging in the short-lived killifish *Nothobranchius furzeri*, *Aging Cell*, **21**, doi: 10.1111/ace1.13689.
84. Vanhunsel, S., Bergmans, S., Beckers, A., Etienne, I., Van Houcke, J., Seuntjens, E., Arckens, L., De Groef, L., and Moons, L. (2021) The killifish visual system as an *in vivo* model to study brain aging and rejuvenation, *Npj Aging Mech. Dis.*, **7**, 22, doi: 10.1038/s41514-021-00077-4.
85. Valenzano, D. R., Terzibasi, E., Genade, T., Cattaneo, A., Domenici, L., and Cellierino, A. (2006) Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate, *Curr. Biol.*, **16**, 296-300, doi: 10.1016/j.cub.2005.12.038.

MULTIFACETED NOTHOBRANCHIUS

Review

**E. V. Bulavkina^{1,2}, A. A. Kudryavtsev², M. A. Goncharova², M. S. Lantsova²,
A. I. Shuvalova², M. A. Kovalev², and A. V. Kudryavtseva^{1,2*}**

¹ Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia; E-mail: rhizamoeba@mail.ru

² Postgenomic research laboratory, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia

Annual killifish of the genus *Nothobranchius* are seeing a rapid increase in scientific interest over the years. A variety of aspects surrounding egg-laying Cyprinodontiformes is being extensively studied, including their aging. Inhabiting the drying water bodies of Africa rarely allows surviving through more than one rainy season for *Nothobranchius* populations. Therefore, there was no lifespan-related bias in natural selection, which has ultimately led to the reparation system decreasing in efficiency. The aging of *Nothobranchius* is studied both in normal conditions and under the influence of potential geroprotectors, as well as genetic modifications. Most biogerontological studies are conducted using the species *Nothobranchius furzeri* (GRZ isolate), which has a lifespan of 3 to 7 months. However, the list of model species of *Nothobranchius* is considerably wider, and the range of advanced research areas with their participation extends far beyond gerontology. Thus, the review paper summarizes the most interesting and promising topics developing due to fish of the genus *Nothobranchius*. Both classical studies related to lifespan control and rather new ones are touched upon, including mechanisms of diapause, challenges of systematics and phylogeny, evolution of sex determination mechanisms, changes in chromosome count, occurrence of multiple repeated DNA sequences in genome, cognitive and behavioral features and social stratification, as well as methodological difficulties in working with *Nothobranchius*.

Keywords: aging, animal models of aging, *Nothobranchius*, age related diseases, diapause, neurodegeneration, lifespan, longevity, speciation, karyotype, stress

ЭВОЛЮЦИЯ ДОЛГОЛЕТИЯ КАК ВИДОВОГО ПРИЗНАКА У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

© 2022 Г.А. Шиловский^{1,2*}, Т.С. Путятин¹, А.В. Марков¹

¹ *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991 Москва, Россия; электронная почта: gregory_sh@list.ru; grgerontol@gmail.com*

² *Институт проблем передачи информации РАН, 127051 Москва, Россия*

Поступила в редакцию 10.10.2022

После доработки 17.11.2022

Принята к публикации 21.11.2022

С эволюционной точки зрения первоочередными для особи являются проблемы не долголетия, а адаптации к окружающей среде, связанные с нуждами выживания, обеспечения пищи и размножения. В эволюции продолжительности жизни (ПЖ) у млекопитающих мы видим два основных вектора. Один заключается в короткой ПЖ и многочисленном потомстве (г-стратегия). Другой состоит в разработке ценных умений, благодаря которым легче выиграть конкуренцию (К-стратегия). У видов с К-стратегией должны развиваться и совершенствоваться системы (программы антистарения), направленные на повышение устойчивости и защищённости организма, и, в конечном счёте, увеличивающие ПЖ. Среди них особенно важную роль играют сигнальные генные каскады, направленные на поддержание репарационной и антиоксидантной систем клетки. Долгоживущие виды характеризуются различным уровнем проявления благоприятных для долголетия факторов (таких как размер тела, развитие мозга, социальность, уровень активности репарационных систем организма и систем антиоксидантной защиты, устойчивость к ксенобиотикам и опухолеобразованию, наличие неотенических признаков). Чтобы не перечислять их каждый раз, набор таких признаков у определённого вида мы будем называть геронтологическим успехом. Долголетие не тождественно репродуктивному или эволюционному успеху. Наивысшего расцвета эта рассогласованность достигает у млекопитающих в связи с развитием теплокровности и коры головного мозга (цефализацией). Это приводит к возросшему уровню продукции окислительных радикалов митохондриями (что способствует ускоренному старению) и увеличению доли неделящихся дифференцированных клеток, накоплению в них возрастных повреждений и развитию нейродегенеративных заболеваний. В статье рассматриваются также математические показатели, применяемые для оценки предрасположенности к долголетию у разных видов. Эти показатели включают в себя как стандартные (уровень смертности и базальный уровень метаболизма), так и производные от них. Рассматриваются также особенности их изменения в ходе эволюции млекопитающих (включая различия между современными млекопитающими и их предковыми формами).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эволюция, фенопоз, продолжительность жизни, программы старения и антистарения, окислительный стресс, возрастные нарушения, Nrf2, героуспех, коэффициент долголетия.

DOI: 10.31857/S0320972522120132, **EDN:** NHFNPD

ВВЕДЕНИЕ

Тенденция к усложнению организации не является общим правилом в биологической эволюции, однако она отчётливо проявляется в некоторых кладах, играющих важную роль в биосфере, таких как позвоночные. В эволюции животных наиболее известными примерами усложнения организации являются появление животной многоклеточности (у первых

Metazoa), двух, а затем и трёх зародышевых листков, целома, двусторонней симметрии, появление всё большего разнообразия тканей, в том числе нервной, усложнение нервной системы, включая формирование ортогона и цефализацию, появление комплекса адаптаций, связанных с выходом на сушу, теплокровность, а также приобретение некоторыми таксонами (птицами, некоторыми млекопитающими среди позвоночных и насекомыми среди бесполо-

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; мтАФК – митохондриальные АФК; НТ – нестандартный тафацин; ПЖ – продолжительность жизни; LQ – коэффициент долголетия (longevity quotient).

* Адресат для корреспонденции.

звоночных) способности к полёту. Не все виды и не все крупные таксоны одинаково успешны биологически, о чём можно судить по численности и ареалу того или иного вида, а также по видовому разнообразию таксона. Некоторые виды оказываются менее устойчивы к смене условий существования, что приводит к их замещению другими, более успешными видами (из примеров можно назвать вытеснение протозверей и сумчатых плацентарными на большей части суши). Молекулярная основа изменчивости отражена в пластичности генных регуляторных сетей, которые управляют развитием, ростом и адаптацией многоклеточных организмов. Эта пластичность делает животных отзывчивыми к запросам естественного и искусственного отбора и даёт материал для эффективного усложнения биологических структур. В связи с этим важной задачей биоинформатики является изучение сопряжённости изменения морфологических и поведенческих признаков, с одной стороны, и нуклеотидной последовательности ответственных за это генов и аминокислотной последовательности кодируемых ими белков – с другой.

В настоящем году исполняется 25 лет с момента публикации основополагающей статьи и введения в науку термина «феноптоз» [1]. Согласно этой концепции, существует быстрая запрограммированная смерть организма (острый феноптоз) и гибель, вызываемая включением генетической программы самоликвидации особи (хронический феноптоз), и, соответственно, старение организма можно рассматривать как медленный (хронический) феноптоз [2]. Austad [3, 4] предположил, что острый феноптоз (например, гибель лососёвых рыб, самцов сумчатых мышей или осьминогов после размножения) и медленное старение высших позвоночных имеют разную природу: ускоренное старение – адаптация, непосредственно поддерживаемая отбором, т.е. существует генетическая «программа» ускоренного старения, и эта программа развилась в ходе эволюции специально для того, чтобы обеспечить ускоренное старение. Медленное же старение – это не адаптация, созданная отбором, а пассивный результат накопления случайных ошибок, для своевременного устранения которых естественный отбор по той или иной причине не смог создать достаточно эффективных средств. Ещё со времён Hargan [5] митохондрии считаются машиной, вызывающей клеточную гибель и (за счёт регуляции скорости дыхания и потребления кислорода) определяющей продолжительность жизни (ПЖ) и скорость старения организма. Поскольку как

расход энергии, так и производство активных форм кислорода (АФК) имеют прямое отношение к митохондриям, эта органелла стала центром исследований старения [6]. Согласно теории темпа жизни, фактором, вызывающим старение и определяющим его скорость, является уровень потребления энергии, т.е. уровень метаболизма и последующих биохимических процессов. При этом общий расход энергии в течение жизни, приведённый на единицу веса тела, будет сходен у разных млекопитающих [3, 4]. Митохондриальная гипотеза старения (являющаяся производной теории темпа жизни) утверждает, что скорость старения в значительной степени определяется скоростью расхода энергии.

Однако этому объяснению противоречит явная общность многих признаков двух типов старения, выделяемых в работах В.П. Скулачева (быстрого и медленного феноптоза). Под «запрограммированностью» старения понимается набор поэтапных команд (каскадов), записанных в геноме. Эти каскады могли развиваться под действием отбора, поддерживавшего генетические варианты, *которые обеспечивают оптимальные (с точки зрения приспособленности) темпы снижения жизнеспособности с возрастом* (табл. 1 и 2).

Величина ПЖ является такой же устойчивой видовой характеристикой, как размеры тела, плодовитость и длительность жизни (т.е. средний либо максимальный возраст наступления гибели), а также механизмы, определяющие характерную для данного вида ПЖ, должны быть хотя бы частично запрограммированы в геноме [7, 8]. Достижение долголетия само по себе не является первоочередной задачей в природе. Поэтому чётко направленного отбора на высокую ПЖ на всём эволюционном древе не отмечено, хотя его и можно видеть в отдельных таксонах (например, в отряде приматов).

С эволюционной точки зрения, «первоочередной задачей» живых организмов является максимизация приспособленности, которую можно определить как величину генетического вклада организма в последующие поколения. Для достижения этой цели *при прочих равных условиях* долгая жизнь всегда предпочтительнее короткой. Однако в реальности «прочие условия» в разных ситуациях не будут равными. На приспособленность влияет, помимо ПЖ, множество других факторов, таких, например, как плодовитость, распределение репродуктивного усилия по возрастам, степень защищённости потомства, величина родительского вклада и т.д. Следует отметить, что «репродуктивный успех» правильнее трактовать как успешность

передачи своих генов в следующие поколения (= дарвиновская приспособленность), а не просто как число произведённых потомков (плодовитость). Если у животного родилось 10 слабозащищённых детёнышей, из которых 9 сразу погибли, то это низкий репродуктивный успех. А если родилось 3, но все выжили, дожили до репродуктивного состояния и сами обзавелись потомством – высокий.

В ходе эволюции часто возникают «компромиссы» (trade-offs) между разными компонентами приспособленности. Например, отбор может поддержать аллель, повышающий раннюю плодовитость ценой ускоренного снижения жизнеспособности с возрастом, или, наоборот, аллель, продляющий жизнь ценой уменьшения числа потомков, производимых в единицу времени. Для этого нужно лишь, чтобы интегральное влияние аллеля на приспособленность было положительным. Понятно, что в разных ситуациях оптимальными, с эволюционной точки зрения, будут разные значения ПЖ: иногда высокие, а иногда низкие. Поэтому мы не наблюдаем единой глобальной тенденции к росту ПЖ в ходе эволюции живых организмов – точно так же, как мы не наблюдаем глобальной тенденции, скажем, к росту плодовитости или родительского вклада в потомство (хотя и высокая плодовитость, и большой родительский вклад в потомство *при прочих равных условиях* являются полезными признаками, т.е. повышают приспособленность). Поэтому виды с высокими и низкими значениями ПЖ сложным образом распределены по филогенетическому дереву животных. Анализируя это распределение, можно попытаться выявить и понять основные факторы эволюции долголетия.

В работе рассматриваются механизмы формирования ПЖ как видового признака и эволюция долголетия на примере млекопитающих, а также вводится понятие геронтологического успеха как особого типа биологического успеха. Все используемые в работе величины видовой ПЖ и коэффициентов долголетия (longevity quotient, LQ) взяты из крупнейшей базы данных AnAge [9] (если не указано иное). Для построения дерева распределения ПЖ использовали классификацию позвоночных из базы данных Ensembl [10] и данные по ПЖ из базы AnAge.

ПОНЯТИЕ ДОЛГОЛЕТИЯ И БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОГРЕССА

Долголетие – это социально-биологическое явление, характеризующееся доживаемостью особи до высоких возрастных рубежей;

предметом научного интереса, соответственно, являются механизмы и способы дожития до большого возраста. ПЖ, как длительность существования особи, в нашей работе характеризует максимальный возраст, известный для обсуждаемого вида.

Общие принципы, стратегии и признаки долголетия. Различными стратегиями, способствующими долголетию у позвоночных, являются сохранение способности к росту и регенерации во взрослом состоянии (рыбы) [11], медленный метаболизм (рептилии) [12], сохранение ювенильных признаков у взрослых животных, неотения (амфибии) [13, 14] и устойчивость к побочным продуктам высокого уровня метаболизма (птицы) [15]. Так, например, у пойклотермных позвоночных, включая рыб, рептилий и амфибий, скорость метаболизма меньше по сравнению с гомойотермными (птицами и млекопитающими) и, соответственно, ниже скорость образования окислительных радикалов митохондриями. Это может способствовать эволюции высокой ПЖ и замедленного старения у отдельных видов, в том числе появлению экстремально долгоживущих (некоторые акулы) [11], а также видов с пренебрежимым старением (некоторые представители семейства карповых) [16].

В царстве Metazoa, несмотря на явное отсутствие единой тенденции в целом (и у Mammalia, в частности), можно говорить о наличии тенденций более локальных. Первая в том, что для примитивных Metazoa характерно такое явление, как нестарение, или старение пренебрежимо медленное (negligible senescence). Большое количество таких примеров известно для примитивных животных таких, как губки (Porifera) и стрекающие (Cnidaria). Известны методические трудности, связанные с определением ПЖ у колониальных животных, например, у кораллов (Cnidaria, Anthozoa) [17]. Тем не менее Jones et al. [18] определяют коралл *Paramuricea clavata* как нестареющий вид (вероятность смерти практически не растёт с возрастом, а ПЖ составляет сотни лет) [17, 19]. Медуза *Turritopsis dohrnii* (классифицированная ранее как *Turritopsis nutricula*; Cnidaria, Hydrozoa, Anthoathecata) обладает способностью закольцовывать свой жизненный цикл (переходя от стадии медузы обратно к полипу), также достигая потенциального бессмертия. Ещё один нестареющий вид – *Hydra magnipapillata* (Cnidaria, Anthoathecata), несмотря на малые размеры и не колониальную, а одиночную (хотя и прикреплённую) форму существования, считается практически бессмертным из-за близкой к нулю (и не растущей с возрастом) смертности

в лабораторных условиях. В природе же, согласно Comfort [20], ПЖ гидры составляет не более трёх лет. Обычно осенью при понижении температуры гидра погибает. ПЖ гидры в лаборатории в самом долгом эксперименте составила 46 лет [21]. У Jones et al. [18] ПЖ₉₅ (время, за которое при данном уровне смертности умрёт 95% популяции) для *Hydra magnipapillata* составляет 1400 лет (срок непредставимо большой для животных). Эта способность гидры, видимо, обусловлена её неограниченным пролиферативным потенциалом. Хотя её размеры и невелики, идёт постоянное обновление клеток, не позволяющее накапливаться в организме сенесцентным клеткам. Выдающаяся способность к регенерации сохраняется и у более близких родственников позвоночных – иглокожих [22, 23]. Труднее объяснить закономерности изменения ПЖ у костистых рыб. ПЖ у них не растёт в ходе эволюции. Однако периодически появляются долгоживущие виды, например, у морского окуня и у некоторых карпов наблюдается ПЖ более 200 лет (самый долгоживущий из млекопитающих, кит, живёт 211 лет, т.е. приблизительно столько же) [16]. У птиц появляются много новых способностей, связанных с полётом, но самые эволюционно продвинутые птицы (воробьинообразные) малы по размеру (отсутствует увеличение размера и ПЖ в ходе эволюции новонёбных птиц). Долгоживущими же могут быть как попугаи, так и, например (не относящиеся к Neoaaves) лебеди, доживающие до 30 лет в природе и до 70 лет – в неволе [24, 25]. В то же время среди попугаев самыми долгоживущими являются самые крупные (более локальный эволюционный тренд), долголетие которых тесно связано с развитием когнитивных способностей [26].

Характеристики эволюционного успеха. Эволюционный успех в развитии таксономической группы определяется её биологическим прогрессом. Как известно, критериями биологического прогресса являются: увеличение численности особей, расширение ареала и прогрессивная дифференциация – увеличение числа систематических групп, составляющих данный таксон. Само по себе длительное присутствие той или иной группы в истории по отношению к быстрому вымиранию таксона также рассматривается как эволюционный успех. Высокую численность особей в популяции можно удерживать за счёт большого числа потомков (рождённых одновременно или за N поколений) и небольшой ПЖ (стратегия 1) или за счёт малого числа потомков (рождённых одновременно или за N поколений) и большой ПЖ (стратегия 2).

Сочетание высокой плодовитости и долгой ПЖ (стратегия 3) встречается относительно редко и, как правило, сопряжено с высокой ранней смертностью (черепахи, рыбы). В то же время среди насекомых достаточно много видов, способных долго жить и при этом хорошо плодиться, поражая своей биомассой (например, муравьи). Также ожереловые попугаи (*Psittacula krameri*) благодаря высокому числу потомков (яиц в гнезде) и долголетию (более 20 лет) в местах инвазии успешно вытесняют другие виды птиц [27]. Виды, которые обладают и небольшой ПЖ и небольшим числом потомков (стратегия 4), как правило, не могут удерживать высокую численность и вымирают.

Сама по себе высокая численность – не гарантия эволюционного успеха. Небольшая продолжительность жизни и небольшое число потомков характеризуют очень многих современных млекопитающих и людей предыдущих поколений. Для людей, живших до начала промышленной революции (XVIII век) и раньше, кривая выживания не характеризовалась ректангуляризацией, идя почти параллельно оси абсцисс, а затем резко обрываясь вниз, образуя как бы прямоугольник. Поэтому для получения дополнительной информации об особенностях распределения ПЖ используются (в том числе и нами) дополнительные показатели, включая, например, коэффициент вариации ПЖ или отношение смертности в возрасте, в котором в живых остаётся лишь 5% популяции, к средней смертности за весь период (табл. 1). Также применяется такой методический приём, как изучение параметров распределения ПЖ не целой когорты, но лишь начиная от возраста полового созревания (для человека и животных) [18].

Видовое разнообразие также различно в эволюционно успешных таксонах. Так, например, в современном мире насчитывается 834 вида мышинных и всего один вид людей [28]. Прогрессивная дифференциация рода *Homo* может вызывать сомнения, ведь человек (рекордсмен по ПЖ среди сухопутных млекопитающих) – единственный современный представитель своего рода. Ареал обитания человека охватывает всю планету, повсеместно же распространёнными видами среди млекопитающих можно, кроме человека, считать сопровождающие его виды (собак, кошек, крыс и мышей). Однако это уже следствие культурного и технического прогресса, а не только лишь накопления соответствующих биологических изменений. Численность *Homo sapiens* растёт. Наряду с явным биологическим прогрессом человек характеризуется высокой видовой ПЖ.

В случае возникновения затруднений с определением эволюционного успеха какого-либо вида можно соотнести его биологический успех с успехом таксона более высокого ранга. Из надотрядов млекопитающих афротерии (по сравнению с более успешными надотрядами Euarchontoglires и Laurasiatheria) – это небольшая группа очень разных (до развития методов биоинформатики не считавшихся родственниками) млекопитающих (то же касается протозверей и сумчатых Австралии). Также сложно представить афротериев, замыкающих пищевые цепочки или распространяющихся по глобусу (захватывая Европу и Америку). Исключением являются хоботные (Proboscidea), которые долго, вплоть до совсем недавнего времени (до конца плейстоцена), оставались системообразующими животными в Северной Евразии и Северной Америке. Однако в настоящее время семейство второго по ПЖ сухопутного млекопитающего (Elephantidae) представлено всего тремя видами. Приспособленность и разнообразие водных видов афротериев (отряд сирен) также выражена гораздо хуже, чем у лавразиатериев (китообразные, ластоногие).

Аналогично и сумчатые за пределами Австралии проиграли схватку лавразиатериям (с точностью до одного вида опоссумов) в Северной Америке и, во многом, и в Южной. В Австралии, Новой Зеландии и на островах Океании они распространились из-за ранней изоляции этих территорий. Таким образом, мы делаем вывод, что в эволюционном плане лавразиатерии успешнее сумчатых.

В сообществах морских организмов существуют таксоны с быстрым изменением родового состава в ходе эволюции («быстрые» группы), которые обычно являются экологически гомогенными, и «медленные» экологически разнообразные группы. «Быстрые» группы иногда достигают очень высокого уровня таксономического разнообразия. Их слабость в том, что они плохо переносят сильные изменения среды. Поэтому во время массовых вымираний, когда происходят резкие скачки температуры, концентрации кислорода и рН морской воды, их таксономическое разнообразие сокращается очень резко, иногда вплоть до полного вымирания группы [29]. «Медленные» группы наращивают своё таксономическое разнообразие неторопливо, зато они спокойнее относятся к переменам условий. Это особенно ярко проявляется во время массовых вымираний. Например, в палеозое доминирующими группами в донной фауне были трилобиты, брахиоподы, морские лилии и другие прикрепленные иглокожие – типичные «быстрые» группы. Во время

массового вымирания на рубеже перми и триаса эти группы пострадали очень сильно, и поэтому в мезозое баланс сместился в сторону преобладания «медленных» групп. После мел-палеогенового массового вымирания «медленные» группы, такие как брюхоногие и двустворчатые моллюски, игравшие в палеозойских сообществах второстепенную роль, окончательно заняли господствующее положение в донных сообществах [29]. Примером эволюционно успешной группы являются китообразные, предки которых были прибрежно-сухопутными и освоили моря и океаны *de novo*. Несмотря на огромную фору во времени, они успешно вытеснили виды, занимавшие до этого данную эконишу. Также можно отметить эволюционный успех, достигнутый хордовыми в целом по сравнению с Cephalopoda [29].

Обычно интеллект способствует долголетию, как и сложные формы поведения обычно связаны с увеличением ПЖ [30]. Однако, как ни парадоксально, Cephalopoda, будучи интеллектуально продвинутыми [31] не только среди моллюсков, но и среди Metazoa в целом (а интеллект является эволюционно и физиологически дорогим продуктом), тем не менее не характеризуются долгой ПЖ, но подвергаются запрограммированной гибели (сначала самцы, а потом и самки) вскоре после размножения [32]. В качестве возможных объяснений этого упоминалось повышенное давление хищников вследствие утраты раковины и различные формы антисоциального поведения, включая каннибализм [30].

Механизмы долголетия. В ходе эволюции появление долгоживущих видов – событие (относительно) редкое. Особенно редко оно наблюдается у эволюционно продвинутых и при этом некрупных животных. Долгоживущие виды обладают различным сочетанием благоприятствующих долголетию факторов, например размер тела, уровень развития (коры) головного мозга, социальность, уровень активности репарационных систем. Набор и степень развития таких признаков у определённого вида мы будем называть уровнем его геронтологического успеха. *Под героуспехом вида мы понимаем совокупность признаков, способствующих долгой ПЖ.* Эти признаки могут включать в себя также повышенную активность систем антиоксидантной защиты и репарации, устойчивость к ксенобиотикам и опухолеобразованию, устойчивость к гипоксии, наличие неотенических признаков и т.д. Как видно из вышеописанного, геронтологический успех не тождественен эволюционному успеху, в том числе репродуктивному. Факторы, определяющие

видовую ПЖ и выраженность процессов старения, весьма разнообразны. Так, у примитивных организмов зачастую не выражено старение, ни физиологическое (одряхление), ни демографическое (увеличение вероятности смерти с возрастом), а ПЖ велика. Например, у стрекающих она может достигать нескольких сотен лет [18]. В ходе эволюции происходит усложнение организмов, появление новых типов клеток и тканей, поведенческих реакций. На практике это будет означать, что с каждым витком эволюции будут появляться новые виды дегенеративных расстройств и поломок, определяющих как максимальную ПЖ, так и структуру смертности в целом. С усложнением (и увеличением размеров) организмов увеличивается количество клеток, их составляющих. В то же время различие в размерах клеток одного типа у разных видов гораздо меньше, чем различие в размерах самих организмов.

Чем примитивнее вид, тем легче ему сохранить некоторые признаки, способствовавшие долголетию у предшествующих ему на эволюционном древе таксонов. Это, например, сохранение способности к росту и регенерации, а также медленный метаболизм и низкая температура тела, которые способствуют более медленному производству в организме окислительных радикалов, что считается одним из основных механизмов старения у животных. Высокая температура тела и интенсивный метаболизм способствуют более быстрому производству окислительных радикалов. Но они же способствуют и более активной работе защитных, репарационных систем. Почему по умолчанию считается, что рост температуры и метаболизма при прочих равных должен ускорять старение, а не замедлять? Таковы признаки упомянутых далее животных – чемпионов по абсолютной ПЖ (двустворчатый моллюск и очень медленная акула).

Ещё одним важным аспектом предрасположенности к долгой жизни является устойчивость крупных животных к онкогенезу (парадокс Пето) [33]. Как уже говорилось, количество клеток в организме крупных животных гораздо выше, а для формирования опухоли теоретически достаточно одной трансформирующейся клетки. Этот парадокс более связан непосредственно с массой (как показателем количества клеток), нежели с ПЖ. Так, крайне онкоустойчивый африканский слон имеет 20 копий гена опухолевого супрессора TP53, включая частично активные 19 ретрогенов, тогда как у сходного с ним по ПЖ человека наличествует только одна копия TP53 и более высокий, чем у слона, уровень смертности от опухолей [34], что, ви-

димо, говорит о сильном отборе на онкоустойчивость у слонов.

Для нас интересны признаки, способствующие большой видовой ПЖ. Некоторые из них часто встречаются вместе (положительная ковариация). Одним из наиболее известных примеров является связь большой ПЖ с К-стратегией и/или наличием развитого мозга. В нестабильной или непредсказуемой окружающей среде преобладает г-стратегия, так как в этом случае ключевую роль играет способность быстрого размножения, а адаптационные механизмы, позволяющие конкурировать с другими организмами, ввиду быстро изменяющихся условий не столь важны [35, 36]. Характерными чертами г-стратегии являются высокая плодовитость, небольшие размеры, относительно короткое время жизни и способность быстрого и широкого распространения [37]. Так, насекомые являются абсолютными чемпионами и по видовому разнообразию, и по численности, и по местообитанию (это означает, что будут многочисленными и те, кто их ест, и соответственно те, кто ест насекомоядных). Они невелики по размерам (стать крупнее им не позволяют особенности дыхания и физико-химические свойства хитина). Относительно долгоживущие виды редки; в основном это эусоциальные насекомые [38]. Наиболее продвинутые муравьи живут столько же, сколько и землекопы (15–20 лет), избранные виды – столько же, сколько голые землекопы (свыше 30 лет) (см. обзор Shilovsky et al. [39]). Среди организмов, в ходе эволюции пришедших к г-стратегии, встречаются насекомые и травянистые растения, а также головоногие моллюски и некоторые млекопитающие (особенно небольшие грызуны). Если окружающая среда более или менее постоянная, то в ней преобладают организмы с К-стратегией, так как в этом случае на первое место выходит способность успешно конкурировать с другими организмами в условиях ограниченных ресурсов. Популяция К-стратегов, как правило, постоянна и близка к максимально возможной в данных условиях. Характерными чертами К-стратегов являются большие размеры, относительно долгий промежуток жизни и малое количество потомков, на воспитание которых отводится значительная часть времени [37, 40]. Типичными К-стратегиями являются крупные млекопитающие (слоны, бегемоты, киты), а также и животные с длительной родительской опекой (зубатые киты, человекообразные обезьяны и человек). Учитывая вышеупомянутую уязвимость сложных систем, у видов с К-стратегией должны развиваться и совершенствоваться

системы (программы), направленные на повышение надёжности и адаптивности, в том числе и обуславливающие увеличение ПЖ.

Способность организма обезвреживать обнаруживаемые АФК может являться важным фактором, определяющим индивидуальную и видовую ПЖ [41–43]. Известно, что у долгоживущих видов системы защиты от таких повреждений действуют гораздо более эффективно, чем у родственных видов с меньшей ПЖ. Ответственные за это программы, называемые также программами антистарения [44, 45], представляют собой сигнальные генные каскады, направленные на поддержание репарационной и антиоксидантной систем клетки [44, 46–50]. Таким образом, животные с большей ПЖ должны, при прочих равных условиях, обладать лучшей способностью реагировать на АФК и вызываемые ими повреждения ДНК. Это подтверждается, в частности, наличием положительной корреляции между активностью систем, вовлечённых в репарацию ДНК, и максимальной ПЖ млекопитающих [51, 52]. Представителем одной из наиболее явных клеточных программ антистарения является также система, связанная с транскрипционным фактором Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2), управляющим экспрессией генов антиоксидантных и детоксифицирующих ферментов, которые в совокупности представляют собой мощную защитную систему клетки [44, 53, 54]. Так, например, у голого землекопа *Heterocephalus glaber* значительно снижен уровень Kelch-подобного ESN-ассоциированного белка 1 (Keap1) и белка, содержащего β -трансдуциновые повторы (β -TrCP). Поскольку они подавляют активность транскрипционного фактора Nrf2, ответственного за экспрессию многих антиоксидантных и детоксифицирующих ферментов, это обуславливает более высокий уровень антиоксидантной защиты и более медленное накопление повреждений (а значит, и замедление старения) у голого землекопа [53].

Также для многих долгоживущих видов часто характерна групповая организация социума, характеризующаяся сложными формами поведения и социального взаимодействия (социальный интеллект). Сложное поведение требует развитого мозга. Среди млекопитающих высокий коэффициент энцефализации наблюдается у человекообразных, китообразных и хоботных [55, 56]. Более того, у человека и слонов наблюдается наибольшее относительное увеличение массы мозга во взрослом состоянии [57], что служит одним из оснований предположить неотению у человека [8, 44]. Наоборот, у шимпанзе относительное увеличение

массы головного мозга в постнатальный период значительно меньше, чем у человека [58, 59]. Мозг *H. sapiens* растёт примерно в течение 15 лет после рождения, достигает 95% размера взрослого человека между 7 и 11 годами и только затем завершает последние 5% роста. Объём мозга шимпанзе достигает объёма мозга взрослого животного к 5 годам [57–59]. Для сравнения, у большинства млекопитающих масса мозга при рождении составляет около 90% массы у взрослого.

Некоторые гены, связанные с первичной микроцефалией у человека, находятся под давлением положительного отбора у человекообразных обезьян [60] и китообразных, эти виды имеют высокие коэффициенты энцефализации [61]. У *Microchiroptera* в ходе эволюции стали меньше размеры по сравнению с крыланами (*Megachiroptera*), наряду с появлением специализированных умений (эхолокация) [62], а также совершенствованием способности к полёту. Такая повышенная метаболическая нагрузка сопровождается положительным отбором генов пути окислительного фосфорилирования (OXPHOS) [63]. При этом в отличие от других таксонов, несмотря на уменьшение массы, ПЖ *Microchiroptera* не только не снижается, но, наоборот, растёт. В результате при сходстве величины максимальной ПЖ в таксонах (44 и 41 год у *Mega-* и *Microchiroptera* соответственно) различие в размерах (массе) у видов с этой ПЖ (*Pteropus giganteus* и *Myotis brandtii* соответственно) колоссальны (в 100 раз). Видимо, *Microchiroptera* разработали собственные пути достижения долголетия не только по сравнению с представителями других отрядов, но и относительно *Megachiroptera*. Один из возможных механизмов предложен *Vysokikh et al.* [43]. Предполагается, что митохондрии, как органеллы, которые производят наибольшее количество АТФ и митохондриальных АФК (мТАФК) в живых клетках, оснащены универсальным механизмом, который может полностью предотвратить производство мТАФК [43]. Этот механизм заключается в мягкой деполяризации внутренней митохондриальной мембраны с целью снижения мембранного потенциала до уровня, достаточного для образования АТФ, но недостаточного для генерации мТАФК. У короткоживущих животных (например, мышей) старение сопровождается инактивацией механизма мягкой деполяризации, что приводит к хроническому отравлению организма мТАФК. Однако у долгоживущих голого землекопа (ПЖ 32 года) и летучих мышей *Carollia perspicillata* (ПЖ 17 лет) умеренная деполяризация сохраняется ещё много лет [43].

То есть технически любое животное может выработать в ходе эволюции эффективную защиту от производства мтАФК. Но делают это только те виды, для которых выбор между двумя механизмами деполяризации стал критичен, на которые действует особенно сильный отбор на продление жизни. А действует он на защищённых животных, таких как летучие мыши (способность к полёту – великолепная защита от хищников) и голые землекопы (репродуктивные особи превосходно защищены социальностью и подземным образом жизни).

МАТЕМАТИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К ДОЛГОЛЕТИЮ

Для оценки успешности долголетия вида в относительных величинах используют различные математические показатели. За основу берут используемые повсеместно кривые выживания (*pace and shape of aging*) [18], хотя для многих животных они отсутствуют, например для гренландского кита (ПЖ около 210 лет). Кривая выживания представляет собой последовательность числовых значений ПЖ. Согласно Jones et al. [18], приводящим данные выживания 45 видов животных и растений, информативными показателями, полученными на основе анализа кривых, являются предрасположенность к долголетию и устойчивость к старению.

На первый взгляд, демографические траектории у животных варьируют в широких пределах. Однако их можно разделить на 4 группы по степени «накопления смертности», определяемой как отношение смертности в терминальном возрасте к средней (ΔC_{95}) [64]. Так, для человека, относящегося к группе IV, данное отношение максимально, составляя 23 – для японок, 13,5 – для шведок и 7,5 – для индейцев аче (см. табл. 1). Столь выраженный рост относительной смертности у человека с возрастом появился в значительной степени за последнее столетие в связи с ростом величины ПЖ₉₅. Также высоким показателем (8 и 7,5 соответственно) характеризовались содержащиеся в неволе гуппи (рыбы) и находившийся на грани вымирания (и соответственно содержащийся в зоопарках под усиленным уходом) баллийский скворец. Следующая группа III также очень гетерогенна и включает в себя козатку, льва, копытных, бабуина, шимпанзе и насекомых. Группа II характеризуется невысоким отношением смертности в терминальном возрасте к средней (от 2,5 – у домашней овцы до

1,3 – у ястреба). Наконец, самая многочисленная группа I не характеризуется сколь-нибудь значительным изменением смертности с возрастом (от 1,1 – у крокодила до 0,5 – у черепахи), фактически представляя собой нестареющие виды. Из анализа графиков Jones et al. [18] представляется очевидным, что многие животные подпадают под 95%-ную отсечку задолго до достижения максимальной ПЖ. Это не снижает достоверность анализа, если перед этим уже произошло значительное повышение смертности (как, например, в группах III и IV) (табл. 1). Для повышения адекватности анализа мы рекомендовали дополнительно применять показатель относительного разброса ПЖ – коэффициент вариации ПЖ [44, 65]. Сильное его повышение у одних видов по сравнению с другими может свидетельствовать о том, что, помимо непрерывного воздействия растущей с возрастом компоненты смертности (медленного фенотоза), на распределение смертности с сопоставимой силой влияет какой-либо другой неблагоприятный фактор (болезни, давление хищников, неблагоприятные условия существования). Примечательно, что коэффициент вариации ПЖ для современных людей из развитых стран, рассчитанный нами [65] с использованием исходных данных [18], соответствует таковому, рассчитанному для современных людей из развитых стран ранее в работе группы Gavrilova et al. [66].

Коэффициент долголетия. Способность противостоять возрастным деструктивным процессам у млекопитающих хорошо исследована и определяется коэффициентом долголетия (видовая ПЖ с учётом массы тела). LQ представляет собой отношение наблюдаемой максимальной ПЖ к прогнозируемой (т.е. полученной в результате линейной регрессии зависимости величины продолжительности жизни в годах от логарифма массы в килограммах) [3, 4, 67]. Прогнозируемая ПЖ может быть рассчитана с помощью аллометрического уравнения Austad и Fischer [3] для нелетающих плацентарных млекопитающих ($y = 10,67 * m_{(кг)}^{0,189}$) или уравнения Prothero и Jurgens [68] для всех млекопитающих ($y = 5,3 * m_{(кг)}^{0,174}$).

Собственно, LQ является одной из первых попыток выражения успешности долголетия (насколько эффективно были использованы способствующие большой ПЖ признаки) в относительных величинах (через массу). Но этот показатель не очень применим к рукокрылым. Летучие мыши, занявшие ту же нишу, что и птицы (эволюционно наиболее молодая группа позвоночных), являются чемпионами по LQ среди млекопитающих. Однако их LQ сверхвысок

Таблица 1. Характеристики кривой выживания и распределения продолжительности жизни у позвоночных

Вид	Класс	ПЖ ₉₅	ПЖ ₉₅ / ПЖ _{макс}	LQ, %	КВ _{ПЖ} , %	ΔC ₉₅	Группа
<i>Gopherus agassizii</i>	Ре	64	0,80	–	160,0	0,6	I
<i>Lacerta vivipara</i>	Ре	6	0,55	–	69,3	1,1	I
<i>Crocodylus johnsoni</i>	Ре	40	0,80	–	194,5	1,5	II
<i>Poecilia reticulata</i> *	Р	3,17	0,63	–	26,5	8	IV
<i>Parus major</i>	П	4	0,26	–	54,4	1,0	I
<i>Ficedula albicollis</i>	П	5	0,51	–	40,1	1,1	I
<i>Accipiter nisus</i>	П	8	0,40	–	69,9	1,3	II
<i>Cygnus olor</i>	П	16	0,23	–	76,5	2,2	II
<i>Apus melba</i>	П	16	0,62	–	53,2	2,4	II
<i>Fulmarus glacialisoides</i>	П	33	0,73	–	29,6	7	IV
<i>Leucopsar rothschildi</i> *	П	18	0,72	–	66,1	7,5	IV
<i>Marmota flaviventris</i>	М	11	0,52	124	87,0	1,4	II
<i>Microtus oeconomus</i> *	М	0,92	0,51	61	62,4	2,0	II
<i>Ovis aries</i> *	М	12	0,53	82	53,5	2,5	II
<i>Rupicapra rupicapra</i>	М	9	0,51	71	72,3	3,5	III
<i>Pan troglodytes</i>	М	49	0,82	271	97,62	3,5	III
<i>Cervus elaphus</i>	М	17	0,63	108	68,2	4	III
<i>Capreolus capreolus</i>	М	13	0,74	77	72,1	4,6	III
<i>Papio cynocephalus</i>	М	24	0,60	135	77,2	4,8	III
<i>Panthera leo</i>	М	17	0,63	90	76,2	5,5	III
<i>Orcinus orca</i>	М	59	0,66	176	53,7	5,5	III
<i>Homo sapiens</i> ; охотники-собиратели	М	81	0,66	526	101,2	7,5	IV
<i>Homo sapiens</i> ; 1881 г.р.	М	89	0,73	526	57,9	13,5	IV
<i>Homo sapiens</i> ; 2009 г.р.	М	89	0,73	526	15,5	23	IV

Примечание. Данные сгруппированы по классам позвоночных и затем по уменьшению смертности ΔC₉₅ (и, соответственно, по уменьшению порядкового номера в таблице Jones et al. [18]) в пределах каждого класса. LQ – коэффициент долголетия, выраженный в %. Виды разделены на 4 большие группы по степени «накопления смертности» (определяемой как отношение смертности в терминальном возрасте к средней): рост смертности отрицательный или отсутствует (I); слабо выраженное увеличение (II); выраженное увеличение (III); сильное увеличение с возрастом (IV). Условные обозначения: М – млекопитающие, П – птицы, Р – рыбы, Ре – рептилии, ПЖ_{макс} – максимальная ПЖ, КВ_{ПЖ} – коэффициент вариации ПЖ (выделено полужирным), ПЖ₉₅ – терминальный возраст, когда лишь 5% когорты остаются в живых, ΔC₉₅ – отношение смертности в терминальном возрасте (ПЖ₉₅) к средней.

* Вид наблюдали в неволе.

потому, что для получения способности к полёту неизбежны перестройки анатомии, ведущие к сильной потере веса, а также потому, что полёт повышает защищённость (как и у птиц) и этим способствует эволюции долгой жизни. Это характерно и для птиц. Коэффициент долголетия никак не учитывает продолжительность периода фертильности и физическую силу (как показатель поддержания здоровья в поздних возрастах [продолжительности здоровой жизни]). А ведь, например, у гренландского кита они могут сохраняться в течение двух столетий. Таким образом, LQ является донельзя упрощённой моделью героуспеха, учитывающей только видовую ПЖ и массу тела.

Базальный уровень метаболизма и некоторые его модификации. Ещё одним показателем, связанным с долголетием, является скорость потребления кислорода, величина, положительно коррелирующая с массой тела (и ПЖ). При этом относительный уровень метаболизма (потребление кислорода на единицу массы тела), рассчитываемый по уравнению Kleiber [69], отрицательно коррелирует с ПЖ.

Коэффициенты, рассчитываемые на основании соотношения аминокислот в митохондриальных белках. Kitazoe et al. [70], проводя филогенетический анализ особенностей белкового состава митохондрий у млекопитающих, сильно различающихся по максимальной ПЖ, предложили уточнение связи базального уровня метаболизма с ПЖ. Авторы ввели таксон-специфический параметр α , который входит в формулу «метаболической мощности» митохондрии: $mtMR = A * M^{(B-1)/\alpha}$ (где A — коэффициент пропорциональности). Параметр α характеризует стабильность белков внутренней мембраны митохондрий. Удобна и другая характеристика метаболической мощности митохондрии, которая определяется, как потребление кислорода на единицу массы организма в единицу времени (basal rate of oxygen consumption) и обозначается $mtBRO_2$. С точностью до константы A эти характеристики связаны соотношением $mtMR\alpha = mtBRO_2$, где $1 \leq \alpha \leq 8$ (для разных отрядов млекопитающих). Если в целом $mtMR$ характеризует энергетические потребности, обусловленные особенностями существования видов в определённой экологической нише, то α определяется особенностями аминокислотного состава митохондриальных белков и взаимодействием белков митохондриальной мембраны [70]. В митохондриях Tetrapoda кодируется 13 белков, их суммарная длина почти не меняется и близка к 3788 а.о. В них чаще других встречаются остатки лейцина и сравнительно часто —

остатки изолейцина, фенилаланина, серина и треонина. Мы предлагаем использовать индекс, который является средним абсолютным значением коэффициентов корреляции между частотами встречаемости в промилле, когда усреднение происходит по 10 парам аминокислот (по два из пяти: F, I, L, S, T), что отображает давление положительного отбора в период формирования соответствующей таксономической группы.

В ходе эволюции позвоночных снижается способность и к регенерации. В лаборатории ИППИ РАН совместно с лабораторией А. Зарайского был обнаружен ген *c-Answer*. Кодированный им белок отвечает за регенерацию у амфибий. Но у млекопитающих этот ген не сохраняется, что, видимо, способствует (за счёт снижения активности Fgf8) развитию переднего мозга — яркому отличительному признаку высших позвоночных [71]. Известны гены, связанные с сохранением ювенильных признаков у взрослых животных, неотении (см. обзор Skulachev et al. [8]). Зачастую, однако, гены, играющие негативную роль для долголетия, настолько незаменимы, что не могут быть выключены и достаточно консервативны в эволюции. Такова, например, киназа гликогенсинтазы бета ($GSK3\beta$), ответственная за негативную регуляцию транскрипционного фактора Nrf2, который индуцирует экспрессию белков антиоксидантной защиты и детоксикации. При этом уровень экспрессии Nrf2 снижается с возрастом во всех тканях у млекопитающих (см. обзор Shilovsky [72]).

Ещё одним вариантом различий у коротко- и долгоживущих видов является наличие дополнительных изоформ у важных для функционирования организма белков. Так, тафацин отвечает за ремоделинг фосфолипида кардиолипина, играющего важную роль в поддержании оптимальной структуры и функции митохондрий, взаимодействующего со многими белками внутренней мембраны митохондрий, тем самым способствуя формированию дыхательных суперкомплексов и оптимизируя биоэнергетику митохондрий (см. обзор Shilovsky et al. [73]). Вариации пропорций изоформ этого фермента могут вызывать тяжёлые заболевания, такие как синдром Барта. Показано, что, помимо обнаруженного практически у всех видов обычного («стандартного») тафацина (содержащего 262 а.о.), у наиболее долгоживущих приматов (гоминид) есть ещё одна уникальная изоформа, содержащая в середине вставку из 30 а.о., соответствующая пятому экзону гена *Taz* [74]. Изучая распространение этой изоформы ($\Delta 5$) у других млекопитающих биоинформатическими

методами, мы обнаружили, что, действительно, она характерна только для высших приматов. Однако она присутствует и приблизительно у половины представителей семейства мартишковых (с секвенированным и собранным геномом), являющегося сестринским гоминидам на эволюционном древе. У второй же половины нами была обнаружена (помимо «стандартной» в 262 а.о.) другая изоформа (названная нами нестандартным тафацином, НТ1). Эта форма (как и обнаруженная далее НТ2) не содержала участка, соответствующего экзону 5 ($\Delta 5$), но содержала изменённые области в С-концевой части, возникающие в результате сдвигов рамки считывания относительно полноразмерного транскрипта *Taz* после пропуска экзона 9 или сохранения интрона между экзонами 10 и 11 [75]. Общей для двух этих форм является последовательность GDAQ/ESPD/S, специфичная для тафацина. Таким образом, можно было предположить наличие у высших приматов конкуренции двух изоформ, в которой победила форма $\Delta 5$, так как НТ1 у гоминид уже не встречается. Выяснилось, что, как и $\Delta 5$, так и НТ1, и НТ2 характерны для наиболее крупных и долгоживущих млекопитающих. У наземных НТ1 отмечена у крупных жвачных и мозолоногих, а также у слона, а НТ2 – у носорога и двух наиболее крупных рукокрылых. У морских млекопитающих (отличающихся и большими размерами и ПЖ) обязательно встречается (помимо классического тафацина) какая-либо из этих форм НТ. Из наземных хищных, однако, у кошкообразных такой модификации не обнаружено, тогда как у собакообразных на месте областей, соответствующих экзонам 10 и 11, в основном отмечены длинные неупорядоченные участки, не содержащие, однако, повторяющихся от вида к виду последовательностей. Лишь у самых крупных из наземных хищных (медвежьих) эта изоформа (НТ2) присутствует. Любопытно отметить, что в надотряде эуархонтоглиров изоформа НТ1 отмечена не только у крупных и долгоживущих приматов, но избирательно и у крупных и/или долгоживущих Glires (бобер, голый землекоп, а, кроме того, способный впадать в спячку при отрицательной температуре суслик *Urocyon parvulus*). Возможно, такие изоформы тафацина обеспечивают оптимальный баланс между повышенной биохимической активностью митохондрий (в результате определённых условий окружающей среды или питания) и высокой ПЖ; и функциональная роль таких изоформ связана с модификацией первичной и вторичной структур на их С-концах.

Социальность и индекс массы неокортекса (C_R). Социальность имеет глубокие эволюционные

корни и наблюдается от одноклеточных организмов до многоклеточных животных [76]. Социальные виды могут иметь большую ПЖ и более успешно адаптироваться к изменению условий среды обитания по сравнению с одиночными. В частности, социальность может приводить к появлению в популяции пострепродуктивных особей, характерных, например, для человека и косаток. Она характерна для многих батиергид, приматов, копытных и хищных, в том числе морских.

Большинство примитивных приматов, относящихся к подотряду мокроносых, Strepsirrhini (лемуры, галаго и лори), являются социальными (58,1% видов) [77]. Остальные демонстрируют сложную и часто изменчивую социальную организацию, где лишь 7% видов ведут одиночный образ жизни, а ещё 34,9% видов иногда живут парами или группами. Это противопоставляется прежним данным о том, что около половины видов мокроносых ведут одиночный образ жизни, и подтверждает предположение, что даже предок всех приматов был социальным, а не одиночным [77]. Предпринимались попытки определить и выразить числом понятие социальности и социального интеллекта. Так, Dunbar [78] проверял гипотезы, согласно которым размер головного мозга у приматов может быть пропорционален: 1) проценту фруктового рациона (чтобы добыть фрукт, приходится решать более сложную задачу, чем при питании травой и листьями); 2) площади участка, занимаемого индивидом или социальной группой (в гектарах); 3) среднему дневному переходу (в метрах); 4) размеру группы. В итоге справедливым оказалось четвёртое предположение, согласно которому размер группы приматов, с которыми может поддерживать связь отдельная особь, является логарифмической функцией размера головного мозга. Однако размер всего мозга не мог быть достоверным индикатором, т.к. известно, что мозг у большинства приматов перестаёт расти намного раньше, чем тело (человек в этом плане является одним из редких исключений) (см. обзор Skulachev et al. [8]). В связи с этим Dunbar [78] за критерий «качества» мозга взял зависимость отношения массы неокортекса (C_R) к остальной массе мозга от среднего размера группы приматов (N) различных родов:

$$\log_{10} N = 0,0093 + 3,389 \log_{10} C_R.$$

Для человека, если принять, что индекс массы неокортекса человека составляет 7–10, получается, что размер «стаи» людей,

поддерживающих социальные связи, равен 120–180 человек, в среднем – 150, что и может считаться максимальным уровнем данного показателя среди приматов.

Размер мозга и размер тела. Цефализация. Мозг непосредственно отвечает за взаимодействие животного с окружающей средой, определяя выбор действий в меняющихся условиях [79, 80]. Однако размер мозга ограничивается энергетическими потребностями, которые считаются универсальными для всех позвоночных, и, таким образом, является «компромиссом» между приспособляемостью и универсальными ограничениями роста энергетических затрат [69, 81, 82]. Размер мозга зависит от размера тела в соответствии со стандартным линейным аллометрическим степенным законом. Коэффициент масштабирования (наклон) этой аллометрии относительно стабилен для позвоночных (между $2/3$ и $3/4$) [83]. Smaers et al. [56] использовали двумерное байесовское многопиковое моделирование Орнштейна–Уленбека (bivariate Bayesian multipeak Ornstein–Uhlenbeck modeling) в сочетании с филогенетическим анализом ковариации для выявления изменений как в наклоне, так и в точке пересечения линий регрессии эволюционной аллометрии (массы мозга и тела). Были изучены взаимосвязи между мозгом и телом у 107 вымерших видов и 1311 существующих из 21 отряда млекопитающих. Выяснили, что аллометрические сдвиги ковариации размеров мозга и тела в эволюции млекопитающих имеют место у приматов, хищных и сумчатых. Наклон линии регрессии для предков млекопитающих составляет 0,51 и сохраняется в рано отделившихся отрядах, таких как златокроты, тенреки, слоновые землеройки, слоны, дюгоны и ламантины, даманы, а также у ленивцев (*Pilosa*), броненосцев (*Cingulata*), тупай, лагоморфов, белок, летающих лемуров и долгопятов [56]. Сдвиги наклона обычны и характеризуют как раннюю, так и позднюю диверсификацию. Самые ранние сдвиги наклона произошли вблизи границы мелового периода и палеогена (K-Pg; ~ 66 млн лет назад), и все они указывают на сдвиг в сторону более высокого наклона. Эта временная кластеризация предполагает, что изменения в относительной траектории роста размера мозга и тела были фундаментальными для расхождения отрядов млекопитающих после массового вымирания на границе мел-палеоген. Это согласуется с паттерном, наблюдаемым у птиц [84], предполагая, что экологическая радиация и последующее расширение ниши после массового вымирания на границе мел-палеоген сыграли важную роль в формировании траекторий, по которым

и птицы, и млекопитающие стали классами позвоночных с самым большим мозгом.

Используя самый большой набор ископаемых и существующих до сих пор собранных данных, Smaers et al. [56] обнаружили, что сдвиги аллометрического наклона (ковариация размера тела и мозга) происходят при основных переходах в эволюции млекопитающих и часто в первую очередь характеризуются заметными изменениями в размерах тела. Результаты показывают, что млекопитающие с самым большим мозгом достигли больших относительных размеров мозга сильно различающимися путями. Слоны представляют собой простейший случай, поскольку они произошли непосредственно от предков млекопитающих и достигли большого относительного размера мозга за счёт значительного увеличения размера своего тела при (ещё более быстром) увеличении размера мозга. У хищных увеличение размера мозга шло быстрее, чем размера тела. У зубатых китов и дельфиновых относительный размер мозга увеличивался ступенчато. Так, у зубатых китов по сравнению с предшествующими китообразными уменьшился размер мозга и тела, при этом размер тела уменьшился быстрее, чем размер мозга. У ластоногих значительное уменьшение наклона по сравнению с другими плотоядными произошло в первую очередь из-за уменьшения дисперсии размера мозга по сравнению с дисперсией размера тела. Это предполагает дивергентный отбор по размеру тела, на который, скорее всего, повлиял переход к полуводной нише [56].

Общая схема такого рода исследований признаков, влияющих на ПЖ, приведена на рис. 1 на примере изучения сопряжённости изменения массы тела. Так, исследуемый признак может сопоставляться с массой тела, обычно приводимой в логарифмической шкале на левой оси ординат (штрихованные столбцы на рис. 1). В парных к ним незаштрихованных столбцах приведено изменение изучаемого показателя в относительных единицах (отмечается на шкале на правой оси ординат). На основании сопоставления скоростей изменения этих показателей (например, массы тела и мозга) и делается вывод о наличии движущего (дарвиновского) или стабилизирующего (шмальгаузеновского) отбора. Так, на схеме разобран случай, когда признак по-разному ведёт себя в разных (над)отрядах млекопитающих. У большинства хищных и китопарнокопытных наблюдается резкий рост массы тела со стабильным установившимся отношением скорости роста массы тела и мозга (угол наклона соответствующей линии регрессии). Эволюционная

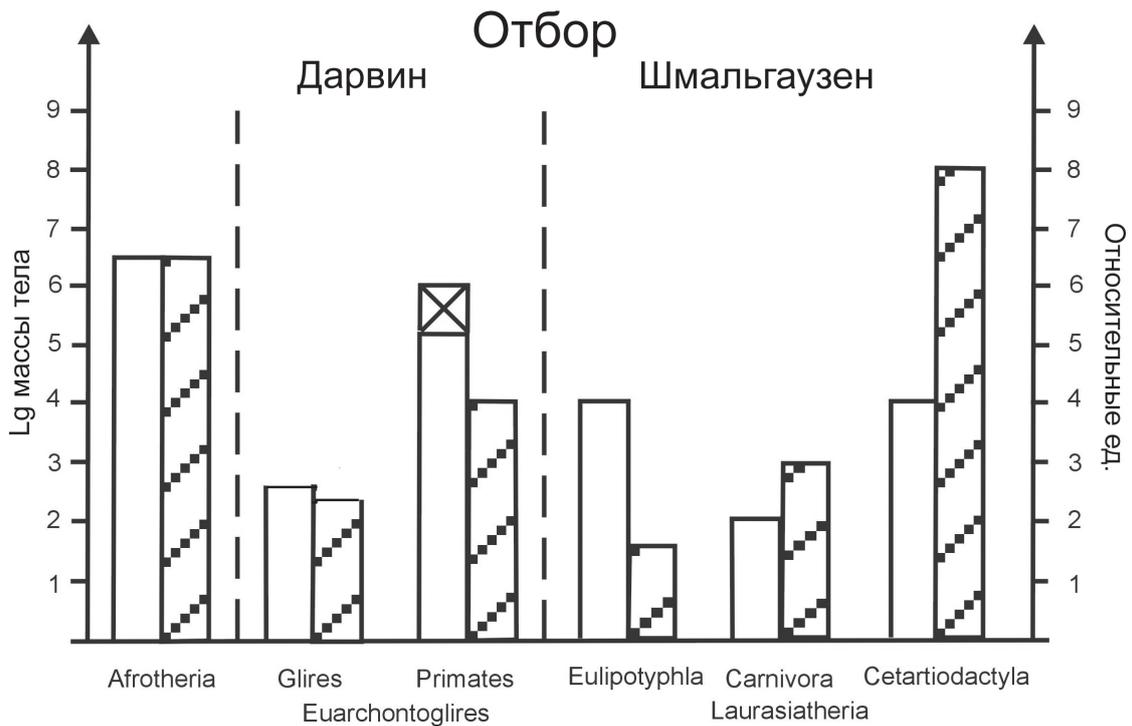


Рис. 1. Анализ сопряжённого изменения признаков в различных таксонах млекопитающих. Заштрихованные столбцы – масса тела у представителей данного таксона (в логарифмических координатах); незаштрихованные – ковариация массы мозга и тела (в относительных единицах). Диагональным крестом на незаштрихованном столбце у приматов отмечен случай резкого изменения ковариации (снижение размеров тела при резком росте размеров мозга у *Homininae*) (построено по данным из статьи Smaers et al. [56])

траектория приматов была сложной, начиная с двух последовательных уменьшений угла наклона (отражающих одновременное увеличение размера мозга и тела) у обезьян и человекообразных обезьян, за которыми следует наиболее заметное из наблюдаемых в исследовании Smaers et al. [56] увеличение наклона (одновременное уменьшение размера тела при увеличении размера мозга) у *Homininae* (отмечено диагональным крестом на рис. 1).

Аналогичную модель возможно применять для сопоставления параметров организма (масса, ПЖ и т.д.) и скорости эволюции генов, играющих важную роль в этих процессах. Быстрое накопление нуклеотидных замен в гене будет приводить к изменению физических свойств кодируемого им белка, а в некоторых случаях – даже к его потере, превращению его в псевдоген и утрате синтении. В случае стабилизирующего отбора замен в гене накапливается гораздо меньше. При это преобладают синонимичные замены, не приводящие к изменению аминокислотной последовательности белка. Таким образом, методы бионформатики позволяют выявлять различия в нуклеотидной последовательности генов и аминокислотной последовательности белков между видами, в том числе долго- и короткоживущими, а также

эволюционно успешными и неуспешными. Они позволяют выявить корреляции того или иного признака с долголетием, оценить и сравнить скорость, с которой этот признак развивается в том или ином таксоне (в настоящей работе приведена оценка такого признака, как цефализация у млекопитающих, или отдельно социализация, но как более локальный тренд в отряде приматов). Перспективно изучение исчезновения в ходе эволюции некоторых генов (в зависимости от поставленной задачи – у всех или у определённой доли) у короткоживущих животных, но сохранение у долгоживущих и наоборот [85]. Разработанная Rubanov et al. [85] математическая модель позволяет сравнивать скорость эволюции генов, ответственных за изучаемый признак, показать наличие/отсутствие положительного дарвиновского отбора по соотношению консервативных и неконсервативных замен нуклеотидов, выявить наличие/отсутствие того или иного гена/признака. При этом возможно варьировать исходные требования к частоте встречаемости гена в любых двух сопоставляемых группах животных. Это, например, амниоты против амниот, *Aroda* против четвероногих, короткоживущие против долгоживущих и т.д., которые в дальнейшем именуется «нижним»

и «верхним» множествами. Эти группы могут быть созданы на основе любого признака, который присутствует у низших видов, но не присутствует у высших видов [85].

Эволюция млекопитающих как таксона. Совершенствуясь в ходе эволюции и обеспечивая себе эволюционный успех, таксоны могут обретать одни способствующие долголетию признаки, теряя при этом другие. Рассмотрим это на примере эволюции млекопитающих. Для предшествующих им амниот (рептилий) характерны относительно большая ПЖ и низкий уровень метаболизма, а также способность ещё снижать его в холодное время года.

Динозавры и млекопитающие появились практически одновременно, в триасе, около 230 млн лет назад. Тем не менее лишь с практически полным вымиранием динозавров на рубеже мел-палеогена (66 млн лет назад) млекопитающие начинают играть важную роль в биоценозах, и лишь спустя ещё 700 000 лет появляются более или менее крупные виды млекопитающих (размером крупнее кошки, а не крысы). В связи с этим представляет интерес работа, посвящённая сравнению кривых выживания у человека и некоторых динозавров. Используя воссозданные демографические данные, была тщательно интерпретирована динамика старения динозавров *Albertosaurus sarcophagus*, *Tyrannosaurus rex* и *Gorgosaurus libratus* [86] на основе восстановленных таблиц дожития [87–89]. Несмотря на то что максимальная ПЖ динозавра меньше ПЖ человека, однако в относительных единицах (процентах от максимума) кривая смертности у динозавров гораздо более пологая, чем у млекопитающих и сходна с таковой у птиц (см., например, Jones et al. [18]).

Неизбежные на стыке эпох переходные формы будут, сохраняя достоинства предыдущих форм, содержать все недостатки как прошлых, так и настоящих таксонов, что будет обуславливать сниженную адаптивность переходных форм (например, группы однопроходных у млекопитающих, вне зависимости от их ПЖ). Newham et al. [90] изучали ископаемые останки зубов отдельных представителей древних млекопитающих, живших ~200 млн лет назад. Были просканированы около 200 окаменелостей зубов *Kuehneotherium* (14,9–32,7 г; в среднем 23,8 г) и *Morganucodon* (животного массой 10,7–25,0 г (в среднем 17,9 г), древнейшего млекопитающего, второго после признанного недавно [91] млекопитающим базилодона). Изучая линии Ретциуса на поперечных шлифах образцов, возникающие в процессе появления новых слоёв эмали по мере развития зуба, подсчитывали количество «годовых колец». Так, ПЖ *Morganucodon* со-

ставила 14 лет, а *Kuehneotherium* – до 9 лет. Для сравнения, мыши и землеройки, современные млекопитающие таких же размеров, живут в дикой природе год, редко два, а максимальная ПЖ мыши, согласно базе данных AnAge, составляет 4 года. Считается, что ключевые характеристики млекопитающих, в том числе их теплокровность, эволюционировали примерно в то же время. Примитивные млекопитающие были более медлительными, а скорость кровотока в бедренных костях у них была гораздо ниже, чем у современных, хотя и выше, чем у рептилий. У *Morganucodon* и *Kuehneotherium* были жевательные зубы и относительно большой мозг.

Тем не менее для современных млекопитающих ($n = 279$), современных нептицеподобных рептилий ($n = 252$) и ископаемых млекопитающих (в логарифмическом масштабе) филогенетическая обобщённая регрессия наименьших квадратов для десятичных логарифмов максимальной ПЖ в дикой природе (в годах) и удельной скоростью метаболизма ($\text{мл O}_2 \text{ кг}^{-1} \text{ч}^{-1}$) показывает, что ископаемые млекопитающие попадают в диапазон, характерный для современных рептилий. Наиболее близок к их максимальной ПЖ мышинный лемур *Microcebus murinus*, размер которого вторично уменьшился в ходе эволюции [92]. Только у ехидны *Tachyglossus aculeatus*, однопроходного с большой ПЖ и низкой скоростью метаболизма, отклонение от среднего значения всех млекопитающих превышает таковое значение для *Kuehneotherium*, но не для *Morganucodon*. Сравнения с помощью одностороннего филогенетического ковариационного анализа (ANCOVA) показывают, что наклоны регрессии для современных млекопитающих и рептилий статистически схожи ($p = 0,35$), но их средние значения значительно различаются ($p = 0,036$), при этом рептилии в среднем живут на 18,3 года дольше, чем млекопитающие с такой же массой тела.

Эволюция долголетия. Как уже отмечалось, в целом высокая ПЖ в природе встречается не очень часто, являясь, видимо, второстепенным по важности признаком. Большинство современных животных относится к типу членистоногих, животным небольшого размера, обусловленным хрупкостью формирующего их скелет хитина и особенностями их дыхательной системы. Действительно, представителей одного лишь семейства муравьёв насчитывается почти столько же видов, сколько млекопитающих и птиц вместе взятых.

Для нас интересны признаки, способствующие большой видовой ПЖ млекопитающих (в статье мы рассматриваем способность к росту и регенерации, скорость метаболизма, цефализацию, неотению). Успех млекопитающих как

таксона произошёл благодаря теплокровности, цефализации, а также увеличению размеров. Из этих трёх преимуществ наиболее благоприятным для долголетия оказался размер. Чем больше масса животного, тем дольше оно может жить. Усложнение структуры и достижение биологического прогресса идёт чрезвычайно различающимися путями и с разной эволюционной скоростью ответственных за эти признаки генов.

В каждом таксоне есть идиоадаптации, обеспечивающие его представителям успех, в том числе и обусловленные г- и К-стратегией и, соответственно, разной величиной ПЖ. Размер — это один из элементов К-стратегии. Действительно, малая ПЖ крупного животного делает его неконкурентоспособным. Однако

можно предположить, что такая корреляция не всегда эффективна. Сильное увеличение размеров делает животное более уязвимым к резкому изменению условий существования (ибо его потребность в ресурсах и чувствительность к изменению условий существования велики) [93–95].

Таким образом, сложившаяся в ходе эволюции видовая ПЖ является результатом баланса нескольких разнонаправленных эволюционных сил (представлены в систематизированном виде в табл. 1). Многие факты, обсуждаемые в статье (всё, что относится именно к эволюции старения, а не к физиологии), можно привязать к одному из пяти пунктов табл. 2. Та видовая ПЖ, которая в итоге формируется у данного вида, является результатом баланса этих пяти сил (табл. 2).

Таблица 2. Факторы эволюции продолжительности жизни (ПЖ)

Стратегии отбора	Проявления
1. Прямой отбор на замедление старения	при прочих равных условиях долгая жизнь всегда лучше короткой жизни (больше времени на размножение, значит выше приспособленность, она же генетический вклад в следующие поколения); именно поэтому нас и удивляет, почему в ходе эволюции сохраняется такой, казалось бы, очевидно вредный признак, как старение
2. Косвенный отбор на замедление старения	многие адаптации, повышающие защищённость организма от тех или иных опасностей, могут в качестве побочного эффекта приводить к продлению жизни; например, хорошая способность к регенерации, как у гидры и планарий, защищая от травм, может попутно и замедлить старение
3. Прямой отбор на ускорение старения	гипотеза фенотоза; предполагаемые механизмы: 1) старение ускоряет эволюцию каких-то полезных признаков (описан в аналитической модели «Басни о зайцах» [96]); 2) наследование ресурсов и родственный отбор, когда смерть родителя идёт на пользу потомкам (имеет место, например, у <i>Caenorhabditis elegans</i> и некоторых лососей) [97]
4. Косвенный отбор на ускорение старения	гипотеза антагонистической плейотропии Williams [98]; по-видимому, многие аллели, повышающие приспособленность в раннем возрасте (например, раннюю плодовитость), делают это ценой ускоренного снижения приспособленности в старших возрастах; отбор поддерживает такие аллели, потому что до старших возрастов всегда доживает меньше особей, чем до ранних, даже при отсутствии старения; а значит, общий ущерб для приспособленности от поздно проявляющихся вредных признаков всегда меньше, чем от рано проявляющихся («для отбора ранние признаки важнее поздних»); чем выше внешняя неизбирательная смертность, тем важнее для отбора ранние признаки по сравнению с поздними; поэтому защищённость способствует эволюции долголетия
5. Недостаточная сила прямого отбора на замедление старения	с возрастом вероятность дожить до данного возраста снижается даже у нестареющих, поскольку не бывает нулевой смертности (Medawar [99]); поэтому чем позднее проявляется вредный эффект аллеля, тем слабее отбор против него; рано или поздно обязательно наступает такой возраст, что отбор, отбраковывающий мутации, приносящие вред в этом возрасте и позже, уже не может противостоять дрейфу; такие мутации свободно накапливаются; Medawar называл это selection shadow (имея в виду возраст, до которого не достигает «свет» очищающего отбора); более общее название — drift limit (порог дрейфа); чем сильнее внешняя неизбирательная смертность, тем в более раннем возрасте находится порог дрейфа для вредных мутаций фиксированного уровня вредности; поэтому защищённость организма способствует эволюции долголетия

Практически во всех отрядах млекопитающих (гигантские носороги у непарнокопытных, гигантские хищные, хоботные и т.д.) гигантские виды вымерли, несмотря на то что их размеры делали их практически неуязвимыми. В других таксонах это были динозавры, гигантские черепахи и крокодилы, характеризующиеся крайне медленным старением (см., например, Jones et al. [18]). Многие водные животные (теряющие, по закону Архимеда, часть своего веса при сохранении массы) имеют крупные размеры [54]. Именно к водным и относится большинство долгоживущих млекопитающих (а также и долгоживущих животных в целом). Тем не менее увеличение размеров (и массы) является не очень эффективным триггером долголетия. Согласно расчётам Austad [4], в среднем увеличение массы в 16 раз даёт увеличение ПЖ всего лишь в 2 раза. Однако даже это правило работает не со всеми и не всегда. Например, домашняя кошка может жить более 30 лет, тогда как ПЖ у не имеющих врагов крупнейших кошачьих в зоопарках или дикой природе не превышает 25 лет.

К биологическому прогрессу млекопитающих привело появление теплокровности [100], обуславливающей гомойотермию, способность к относительно более быстрому передвижению и внесезонную активность. Млекопитающие обладают также значительно большей способностью к устойчивой аэробной активности по сравнению с экзотермическими животными [100]. Ещё одной причиной успеха явилось резкое усиление цефализации, связанное с развитием нового отдела ЦНС, коры головного мозга, обуславливающей новые уровни сложности нервной деятельности [55, 56, 101]. У птиц и млекопитающих независимо развился мозг относительно большего размера, чем у других классов позвоночных. Этому способствовало ослабление фенотипической интеграции между размером мозга и размером тела, что привело к увеличению доступной изменчивости и повышению гибкости в ответе на отбор [56, 102].

Обратной стороной этих бонусов является соответственно резко возросший уровень продукции окислительных радикалов митохондриями (а, следовательно, и скорости старения) и появление большей доли неделящихся дифференцированных клеток (вследствие ограничения роста организма) с одновременным снижением в ходе эволюции способности к росту и регенерации. Согласно Шмальгаузену [103], это в итоге способствует накоплению возрастных повреждений и, соответственно, развитию заболеваний, в том числе нейродеге-

неративных. У млекопитающих и птиц много делящихся, не дифференцированных клеток (мультипотентных, олигопотентных и унипотентных), потому что их сложные ткани быстро изнашиваются и нуждаются в обновлении. Регенерация традиционно подразделяется на репаративную и физиологическую. Животные с высоким уровнем метаболизма сделали ставку на физиологическую регенерацию (обновление тканей), потому что репаративная не поддерживалась отбором. Теплокровное животное, получившее серьёзную травму, не может полноценно питаться и восполнять энергетические потери, а значит погибнет раньше, чем могли бы запуститься и реализоваться процессы восстановления потерянной части тела.

Таким образом, как гомойотермия, так и цефализация способствуют снижению потенциальной максимальной ПЖ. Только самые крупные из китов имеют оценку ПЖ, равную таковой у некоторых долгоживущих костных рыб (морского окуня и некоторых карповых), но даже близко не дотягивающую до рекордов по ПЖ среди хрящевых рыб (уже упоминавшихся ранее некоторых акул). Остальные виды млекопитающих (за исключением человека) не способны преодолеть даже столетний рубеж.

Одним из следствий является показательная кривая выживания млекопитающих, характеризующаяся быстрым ростом смертности (начиная с определённого возраста) и выраженным превышением смертности в возрасте ПЖ₉₅ по сравнению со средним показателем смертности. Эта величина (смертности в возрасте ПЖ₉₅ к средней смертности) является одним из показателей скорости демографического старения (увеличения вероятности смерти с возрастом). Аналогичное повышение наблюдается только у животных, состоящих из постмитотических клеток и имеющих малые размеры (в первую очередь насекомых) [18]. В других таксонах животных, рассмотренных в данной работе (стрекающих, птиц, рептилий, а также, по некоторым оценкам [86], у динозавров), кривая смертности не имеет столь крутого подъёма с возрастом.

Существуют группы млекопитающих с низким эволюционным успехом, но высокой ПЖ. Это касается современных примитивных млекопитающих. Согласно крупнейшей базе данных AnAge, ПЖ австралийской ехидны *Tachyglossus aculeatus* достигает 49,5 года; ПЖ утконоса *Ornithorhynchus anatinus* (единственного млекопитающего, кроме голого землекопа, с пониженной температурой тела) составляет 22,6 года. Эта достаточно высокая ПЖ не является следствием каких-либо эволюцион-

ных достижений млекопитающих, а, скорее, является «отголоском» высокой ПЖ предковых форм с медленным метаболизмом. Однопроходные (Monotremata) являются эндемиками в Австралии, не выдерживая конкуренции с более быстрыми «настоящими» млекопитающими (Eutheria). Сходная ситуация складывается и с другой современной группой млекопитающих Marsupialia (сумчатые), обитающих в основном в Австралии и части Южной Америки. Разброс видовой ПЖ в различных таксонах млекопитающих и его сопоставление с другими таксонами Tetrapoda приведены на рис. 2. Austad [4], основываясь на том, что среди сумчатых нет животных с большой (по сравнению с другими млекопитающими) ПЖ, критикует теорию «темпа жизни» (утверждающую, что более медленный метаболизм сопряжён с боль-

шей ПЖ) и, следовательно, валидность такого показателя как коэффициента долголетия. Однако, на наш взгляд, это противоречие мнимое. Оно объясняется тем, что сниженный уровень метаболизма не является у сумчатых чем-то благоприобретённым (т.е. полезной в целом для увеличения ПЖ адаптацией). Он является наследием, доставшимся сумчатым от предковых форм. Ещё одним, также мнимым, исключением из этого правила являются летучие мыши – животные с большой ПЖ, а также LQ (т.е. ПЖ с учётом массы тела) и одновременно очень высоким метаболизмом, обусловленным приобретённой способностью к полёту. В этом случае увеличению ПЖ способствует развитие мощной системы клеточной защиты, аналогичной таковой у птиц (т.е. животных, занимающих аналогичную экологию) [104, 105].

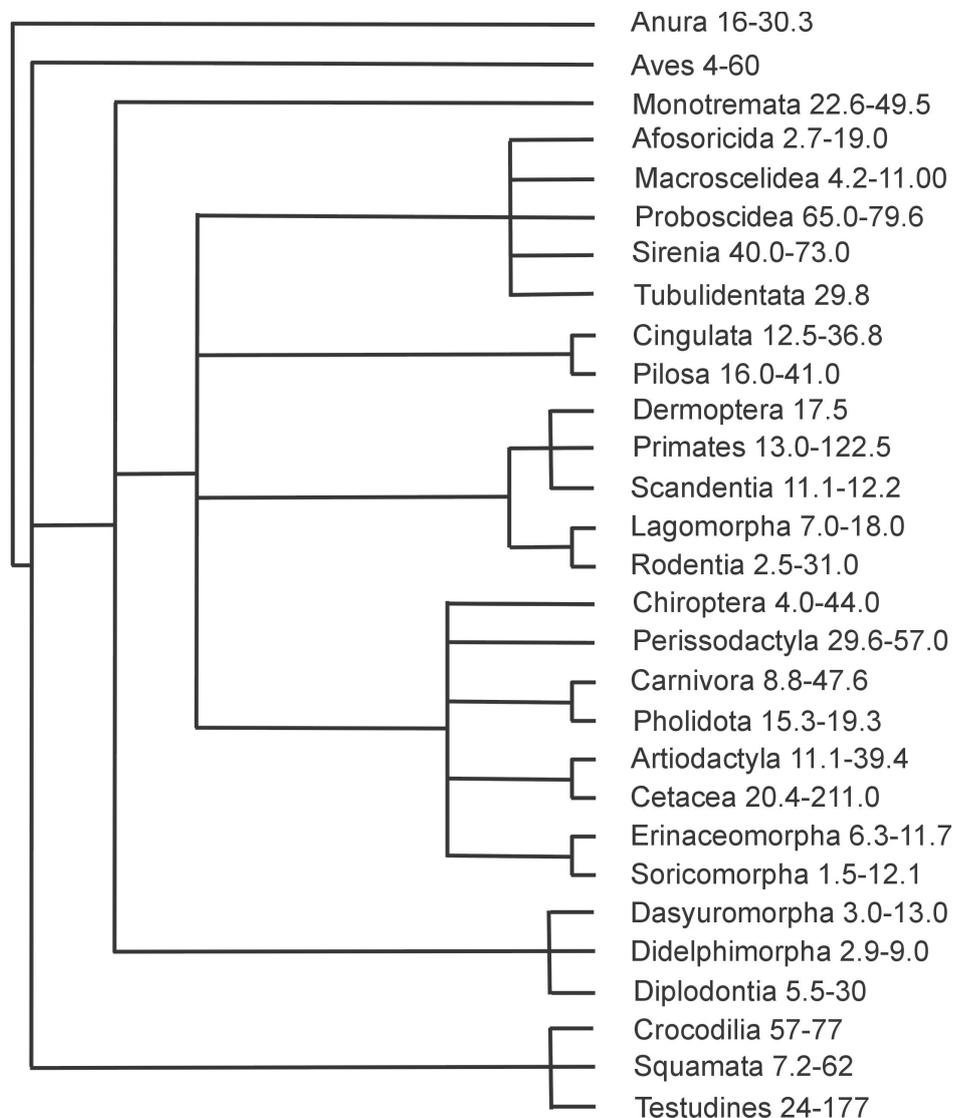


Рис. 2. Диапазон видовой продолжительности жизни (ПЖ) в различных таксонах Tetrapoda. Числовыми интервалами обозначен диапазон видовых ПЖ (в годах) в данном таксоне. В случае, если в базе данных AnAge присутствует только один вид, то в схеме приведена величина его ПЖ

Первозвери, имея недостатки примитивных млекопитающих, ухитрились сохранить некоторые особенности (в том числе высокую ПЖ) от предков. Таким образом, есть несколько направленных процессов на самых разных уровнях организации (основные перечислены в табл. 2), которые могут быть и разнонаправленными. При этом, естественно, чем меньше таксон, тем более однородны по представляемым признакам в нём животные. Это характерно для всех ключевых отрядов млекопитающих. У эуархонтоглиров (за исключением приматов) лишь небольшое число видов характеризуется высокой ПЖ или LQ. Входящий в него отряд с наибольшим эволюционным успехом (грызуны) не демонстрирует, за небольшими исключениями, развития присущих долголетию признаков. Грызуны и зайцеобразные являются ярким примером приверженности r-стратегии. Наибольшее число видов среди млекопитающих описано в отряде Rodentia. Остальные отряды представлены небольшим числом видов, проиграв эволюционную гонку раньше. Известно, что вид, активность защитных систем у которого высока, будет иметь большую ПЖ по сравнению с представителями сопоставимой или даже большей массы из того же таксона. Наиболее известным примером такого рода является голый землекоп (*Heterocephalus glaber*), ПЖ и LQ которого высоки по сравнению с другими батиергидами (семейство отряда грызунов). Однако ни численность, ни размер ареала у голого землекопа не свидетельствуют о биологическом прогрессе этого вида. Ареал у приматов (за исключением человека) также ограничен. Так, их практически нет в Европе и Северной Америке.

ПЖ и LQ человека (*Homo sapiens*) и высших приматов в целом велики по сравнению с другими представителями надотряда эуархонтоглиров (другими приматами, грызунами и зайцеобразными, а также тупайями и шерстокрылами). Некоторые отряды эуархонтоглиров (тупайи и шерстокрылы) являются эволюционно неуспешными. Отряд шерстокрылов (способных к планирующему полёту млекопитающих) представлен всего двумя видами (по сравнению, например, с полутора тысячами видов рукокрылых, способных к настоящему полёту). Среди млекопитающих эволюционную гонку явно выигрывают лавразиатерии: есть многие наземные виды, которые ходят по земле и немаленького размера (копытные), и есть те, которые замыкают пищевые цепочки. Высокой видовой ПЖ по сравнению с родственными видами того же таксона могут обладать и виды, отличающиеся по другим показателям

К-стратегии, например числу потомков, рождающихся за один раз. Так, например, в отряде хищных ПЖ у медведей в 2 раза выше, чем у представителей как других собакообразных, так и крупных кошачьих.

Тем не менее простых показателей долголетия (вроде коэффициента долголетия) для описания героуспеха лавразиатериев явно недостаточно, чтобы предположить наличие каких-либо способствующих долголетию признаков, например у китов. Киты живут долго, хотя по коэффициенту долголетия не очень «успешны». При этом среди акул, которых они потеснили в их эконише, есть чемпионка по долголетию среди всех позвоночных (гренландская акула). Также в этой эконише обитает и абсолютный рекордсмен по ПЖ среди животных (507 лет) – двустворчатый моллюск *Arctica islandica* [106]. Следует отметить, что, несмотря на огромную ПЖ и способность обитать в холодных водах, гренландская акула отнюдь не является одной из самых совершенных и конкурентоспособных, будучи одной из самых медленных акул. Ещё один пример того, как эволюционный успех не совпадает с успехом геронтологическим.

Долголетие у изученных млекопитающих часто является побочным результатом их адаптаций, таких, например, как большие размеры. Ведь большое число клеток требует улучшенной системы пролиферативного контроля, а значит, вероятность смерти от поломки этого механизма снизится. Кроме того, сам период роста большого животного до половозрелости тоже увеличивает ПЖ. Животные, вынужденные бороться с АФК и другими метаболически вредными последствиями обмена (летучие мыши, голый землекоп), усиливают «антирадикальные» инструменты для сохранения ДНК и тоже побочным образом увеличивают продолжительность жизни. Почему-то среди млекопитающих и птиц нет стратегов, решающих обе проблемы за счёт эффективной пролиферации и эффективного апоптоза, как бессмертные гидры или почти бессмертные плоские черви. Возможно, дело в сложном контроле тканевого гомеостаза, который идёт за счёт дифференцировки многих разных тканеспецифичных стволовых клеточных линий, а не единого пула предшественников (интерстициальные клетки книдарий, необласты планарий). Млекопитающие, которые используют выраженную К-стратегию, начинают, при прочих равных обстоятельствах, эволюционно зависеть от ПЖ. То есть ПЖ из побочного продукта существующих адаптаций становится фенотипическим признаком, по которому идёт отбор.

Это особенно важно для высокосоциальных видов с развитой иерархией и выраженной заботой о потомстве (слонов, косаток, гоминид).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Долгоживущие виды у позвоночных в целом и млекопитающих в частности могут появляться: 1) среди представителей эволюционно успешных таксонов (таковы, например приматы, хищные, китообразные, рукокрылые); 2) среди видов, рано отделившихся от эволюционно успешных таксонов с r-стратегией (например, представителей семейства *Bathyerigidae*). Для таких таксонов характерно появление какого-либо признака, дающего им преимущество (например, эусоциальность, способность к полёту, нахождение на верху пищевой цепочки и т.д.). Некоторые из них часто встречаются вместе (положительная ковариация). Разные признаки с разной силой влияют на ПЖ. Может быть большой набор способствующих долголетию признаков, но его эффект мал (малая героуспешность). Относительная скорость прироста ПЖ на единицу увеличения какого-либо развивающегося в данном таксоне признака (например, на единицу прироста массы или размера мозга у приматов) и будет говорить об эффективности данного признака с точки зрения долголетия (т.е. героуспеха). То же самое можно сказать и о скорости эволюции ответственных за эти признаки генов. Наличие генов, ответственных за долголетие в данном таксоне (генов репарации, онкоустойчивости, антиоксидантной защиты и т.д.) зачастую сопряжено с появлением изоформ этих генов, характерных именно для долгоживущих видов данного таксона.

Признаки, дающие преимущество тому или иному таксону (например, цефализация у приматов), будут развиваться у них быстрее или в большей степени, чем у других таксонов. На примере цефализации в работе *Smaers et al.* [56] показано, что анализ ковариации размеров мозга и тела позволяет наблюдать развитие того или иного признака даже при немонотонных (и иногда даже разнонаправленных) его изменениях в разных таксонах). На молекулярном уровне это будет означать бóльший дарвиновский отбор в ответственных за данный признак генах. Также можно отметить, что наибольшие выявленные изменения наклона линий регрессии, отражающие изменения ковариации размеров мозга и тела, обнаружены у гоминид (по сравнению с мартышковыми) и у мартышковых (по сравне-

нию с другими таксонами приматов, включая широконосых обезьян), а также у медведей и ластоногих по сравнению с другими хищными. Надо отметить, что различия именно между перечисленными таксонами мы наблюдали в отношении «нестандартных» изоформ тафацина [75]. В героуспешных таксонах часто появляются виды, успешные даже на их фоне (голый землекоп среди батиергид и человек среди гоминид). Кроме того, часто героуспешными (за счёт долгого стабилизирующего отбора) являются реликтовые виды, такие как ехидна, утконос, гаттерия, целакант, протей и т.д.

Усложнение строения тела и ускорение метаболизма может способствовать захвату новых экониш и вытеснению других групп животных из старых, например, успех группы хордовых против *Cephalopoda* [29]. Однако, с точки зрения героуспеха, это может создавать новые потенциально уязвимые сложные системы, вероятность отказа которых будет увеличиваться с возрастом (процесс биологического старения, «медленного феноптоза»). Противодействием ему будет совершенствование защитных систем организма (программ антистарения по *Skulachev et al.* [44]), что будет отражаться в эволюционных изменениях в соответствующих генах. Скорость эволюции таких генов можно сопоставить со скоростью эволюции генов антивозрастных программ (в первую очередь репарационной и антиоксидантной систем организма). Кроме того, у долгоживущих видов зачастую тем или иным способом решается проблема снижения продукции АФК митохондриями (одна из самых известных программ медленного феноптоза). Эволюция долголетия идёт сопряжённо с основными трендами эволюции, критерием которых является биологический прогресс. Само по себе долголетие очень редко является актуальным для эволюционного успеха признаком, поэтому мы не наблюдаем ни одного таксона высокого ранга, для которого причиной успеха являлся именно тренд на долголетие. Действительно, большая ПЖ редко даёт преимущества как в межиндивидуальном, так и в групповом отборе. Таким образом, совершенствуясь в ходе эволюции и обеспечивая себе эволюционный успех, таксоны могут обретать одни способствующие долголетию признаки, теряя при этом другие. Эволюцию этих процессов можно объяснить в рамках теории *Skulachev et al.* [44] о многообразии онтогенетических программ старения и антистарения у животных в целом и у млекопитающих в частности. Усложнение структуры, появление новых признаков (позволяющих выиграть эволюционную гонку)

ведёт к появлению новых потенциальных уязвимостей и «хрупкостей» (frailty). Это, наряду с увеличением ПЖ, приводит к характерным для млекопитающих (характеризующихся ректангуляризацией) кривым выживания, быстрому росту смертности, начиная с определённого момента, и соответствующим параметрам распределения ПЖ.

Вклад авторов. Г.А. Шиловский – концепция работы, написание и редактирование текста статьи, подготовка таблиц и графиков; Т.С. Путяти-

на и А.В. Марков – написание и редактирование текста статьи, подготовка таблиц и графиков.

Благодарности. Авторы благодарят А.В. Селиверстова за ценные советы в процессе написания статьи и Т.А. Шиловскую за помощь в подготовке графических материалов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. В данной работе не было никаких исследований, в которых были использованы в качестве объектов люди или животные.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Skulachev, V. P. (1997) Aging is a specific biological function rather than the result of a disorder in complex living systems: biochemical evidence in support of Weismann's hypothesis, *Biochemistry (Moscow)*, **62**, 1191-1195.
- Skulachev, M. V., and Skulachev, V. P. (2014) New data on programmed aging – slow phenoptosis, *Biochemistry (Moscow)*, **79**, 977-993, doi: 10.1134/S0006297914100010.
- Austad, S. N., and Fischer, K. E. (1991) Mammalian aging, metabolism, and ecology: evidence from bats and marsupials, *J. Gerontol.*, **46**, 47-53, doi: 10.1093/geronj/46.2.b47.
- Austad, S. N. (1997) *Why We Age*, John Wiley and Sons, New York.
- Harman, D. (1972) The biologic clock: the mitochondria? *J. Am. Ger. Soc.*, **20**, 145-147, doi: 10.1111/j.1532-5415.1972.tb00787.x.
- Austad, S. N. (2018) The comparative biology of mitochondrial function and the rate of aging, *Integr. Comp. Biol.*, **58**, 559-566, doi: 10.1093/icb/icy068.
- Skulachev, M. V., Severin, F. F., and Skulachev, V. P. (2015) Aging as an evolvability-increasing program which can be switched off by organism to mobilize additional resources for survival, *Curr. Aging Sci.*, **8**, 95-109, doi: 10.2174/1874609808666150422122401.
- Skulachev, V. P., Holtze, S., Vyssokikh, M. Y., Bakeeva, L. E., Skulachev, M. V., Markov, A. V., Hildebrandt, T. B., and Sadovnichii, V. A. (2017) Neoteny, prolongation of youth: From naked mole rats to “naked apes” (humans), *Physiol. Rev.*, **97**, 699-720, doi: 10.1152/physrev.00040.2015.
- De Magalhães, J. P., and Costa, J. (2009) A database of vertebrate longevity records and their relation to other life-history traits, *J. Evol. Biol.*, **22**, 1770-1774, doi: 10.1111/j.1420-9101.2009.01783.x.
- Martin, F. J., Amode, M. R., Aneja, A., Austine-Orimoloye, O., Azov, A. G., Barnes, I., Becker, A., Bennett, R., Berry, A., Bhai, J., Bhurji, S. K., Bignell, A., Boddu, S., Branco Lins, P. R., Brooks, L., Ramaraju, S. B., Charkhchi, M., Cockburn, A., Da Rin Fiorretto, L., Davidson, C., Dodiya, K., Donaldson, S., El Houdaigui, B., El Naboulsi, T., Fatima, R., Giron, C. G., Genez, T., Ghattaoraya, G. S., Martinez, J. G., Guijarro, C., Hardy, M., Hollis, Z., Hourlier, T., Hunt, T., Kay, M., Kaykala, V., Le, T., Lemos, D., Marques-Coelho, D., Marugán, J. C., Merino, G. A., Mirabueno, L. P., Mushtaq, A., Hossain, S. N., Ogeh, D. N., Sakthivel, M. P., Parker, A., Perry, M., Piližota, I., Prosovetskaia, I., Pérez-Silva, J. G., Salam, A. I. A., Saraiva-Agostinho, N., Schuilenburg, H., Sheppard, D., Sinha, S., Sipo, B., Stark, W., Steed, E., Sukumaran, R., Sumathipala, D., Suner, M. M., Surapaneni, L., Sutinen, K., Szpak, M., Tricomi, F. F., Urbina-Gómez, D., Veidenberg, A., Walsh, T. A., Walts, B., Wass, E., Willhoft, N., Allen, J., Alvarez-Jarreta, J., Chakiachvili, M., Flint, B., Giorgetti, S., Haggerty, L., Ilesley, G. R., Loveland, J. E., Moore, B., Mudge, J. M., Tate, J., Thybert, D., Trevanion, S. J., Winterbottom, A., Frankish, A., Hunt, S. E., Ruffier, M., Cunningham, F., Dyer, S., Finn, R. D., Howe, K. L., Harrison, P. W., Yates, A. D., and Flicek, P. (2022) Ensembl 2023, *Nucleic Acids Res.*, gkac958, doi: 10.1093/nar/gkac958.
- Nielsen, J., Hedeholm, R. B., Heinemeier, J., Bushnell, P. G., Christiansen, J. S., Olsen, J., Ramsey, C. B., Brill, R. W., Simon, M., Steffensen, K. F., and Steffensen, J. F. (2016) Eye lens radiocarbon reveals centuries of longevity in the Greenland shark (*Somniosus microcephalus*), *Science*, **353**, 702-704, doi: 10.1126/science.aaf1703.
- Congdon, J. D., Nagle, R. D., Kinney, O. M., van Loben Sels, R. C., Quinter, T., and Tinkle, D. W. (2003) Testing hypotheses of aging in long-lived painted turtles (*Chrysemys picta*), *Exp. Gerontol.*, **38**, 765772, doi: 10.1016/s0531-5565(03)00106-2.
- Voituron, Y., De Fraipont, M., Issartel, J., Guillaume, O., and Clobert, J. (2011) Extreme lifespan of the human fish (*Proteus anguinus*): a challenge for ageing mechanisms, *Biol. Lett.*, **7**, 105107, doi: 10.1098/rsbl.2010.0539.

14. Kostanjšek, R., Diderichsen, B., Recknagel, H., Gunde-Cimerman, N., Gostinčar, C., Fan, G., Kordiš, D., Trontelj, P., Jiang, H., Bolund, L., and Luo, Y. (2022) Toward the massive genome of *Proteus anguinus*-illuminating longevity, regeneration, convergent evolution, and metabolic disorders, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1507**, 5-11, doi: 10.1111/nyas.14686.
15. Delhaye, J., Salamin, N., Roulin, A., Criscuolo, F., Bize, P., and Christe, P. (2016) Interspecific correlation between red blood cell mitochondrial ROS production, cardiolipin content and longevity in birds, *Age (Dordr.)*, **38**, 433-443, doi: 10.1007/s11357-016-9940-z.
16. Kolora, S. R. R., Owens, G. L., Vazquez, J. M., Stubbs, A., Chatla, K., Jainese, C., Seeto, K., McCrea, M., Sandel, M. W., Vianna, J. A., Maslenikov, K., Bachtrog, D., Orr, J. W., Love, M., and Sudmant, P. H. (2021) Origins and evolution of extreme life span in Pacific Ocean rockfishes, *Science*, **374**, 842-847, doi: 10.1126/science.abg5332.
17. Andrews, A. H., Cordes, E. E., Mahoney, M. M., Munk, K., Coale, K. H., Cailliet, G. M., and Heifetz, J. (2002) Age, growth and radiometric age validation of a deepsea, habitat-forming gorgonian (*Primnoa resedaeformis*) from the Gulf of Alaska, *Hydrobiologia*, **471**, 101-110, doi: 10.1023/A:1016501320206.
18. Jones, O. R., Scheuerlein, A., Salguero-Gómez, R., Camarda, C. G., Schaible, R., Casper, B. B., Dahlgren, J. P., Ehrlén, J., García, M. B., Menges, E. S., Quintana-Ascencio, P. F., Caswell, H., Baudisch, A., and Vaupel, J. W. (2014) Diversity of ageing across the tree of life, *Nature*, **505**, 169-173, doi: 10.1038/nature12789.
19. Druffel, E. R., Griffin, M. S., Witter, A., Nelson, E., Southon, J., Kashgarian, M., and Vogel, J. (1995) *Gerardia*: bristlecone pine of the deep sea? *Geochim. Cosmochim. Acta*, **59**, 5031-5036, doi: 10.1016/0016-7037(95)00373-8.
20. Comfort, A. (1979) *The Biology of Senescence*, Churchill Livingstone, Edinburgh and London.
21. Martínez, D. E. (1998) Mortality patterns suggest lack of senescence in hydra, *Exp. Gerontol.*, **33**, 217-225, doi: 10.1016/s0531-5565(97)00113-7.
22. Amir, Y., Inslar, M., Giller, A., Gutman, D., and Atzmon, G. (2020) Senescence and longevity of sea urchins, *Genes (Basel)*, **11**, 573, doi: 10.3390/genes11050573.
23. Medina-Feliciano, J. G., and García-Arrarás, J. E. (2021) Regeneration in Echinoderms: molecular advancements, *Front. Cell. Dev. Biol.*, **9**, 768641, doi: 10.3389/fcell.2021.768641.
24. Charmantier, A., Perrins, C., McCleery, R. H., and Sheldon, B. C. (2006) Quantitative genetics of age at reproduction in wild swans: support for antagonistic pleiotropy models of senescence, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 6587-6592, doi: 10.1073/pnas.0511123103.
25. Terres, J. (1980) *The Audubon Society Encyclopedia of North American Birds*, Knopf, New York.
26. Wirthlin, M., Lima, N. C. B., Guedes, R. L. M., Soares, A. E. R., Almeida, L. G. P., Cavaleiro, N. P., Loss de Moraes, G. Chaves, A. V., Howard, J. T., Teixeira, M. M., Schneider, P. N., Santos, F. R., Schatz, M. C., Felipe, M. S., Miyaki, C. Y., Aleixo, A., Schneider, M. P. C., Jarvis, E. D., Vasconcelos, A. T. R., Prosdociami, F., and Mello, C. V. (2018) Parrot genomes and the evolution of heightened longevity and cognition, *Curr. Biol.*, **28**, 4001-4008.e7, doi: 10.1016/j.cub.2018.10.050.
27. Hernández-Brito, D., Carrete, M., Popa-Lisseanu, A. G., Ibáñez, C., and Tella, J. L. (2014) Crowding in the city: losing and winning competitors of an invasive bird, *PLoS One*, **9**, e100593, doi: 10.1371/journal.pone.0100593.
28. Burgin, C. J., Colella, J. P., Kahn, P. L., and Upham, N. S. (2018) How many species of mammals are there? *J. Mammal.*, **99**, 1-14, doi: 10.1093/jmammal/gyx147.
29. Knope, M. L., Bush, A. M., Frishkoff, L. O., Heim, N. A., and Payne, J. L. (2020) Ecologically diverse clades dominate the oceans via extinction resistance, *Science*, **367**, 1035-1038, doi: 10.1126/science.aax6398.
30. Amodio, P., Boeckle, M., Schnell, A. K., Ostojic, L., Fiorito, G., and Clayton, N. S. (2019) Grow smart and die young: why did cephalopods evolve intelligence? *Trends Ecol. Evol.*, **34**, 45-56, doi: 10.1016/j.tree.2018.10.010.
31. Bidel, F., Bennett, N. C., and Wardill, T. J. (2022) Octopus *bimaculoides*' arm recruitment and use during visually evoked prey capture, *Curr. Biol.*, **32**, 4727-4733, doi: 10.1016/j.cub.2022.08.080.
32. Wang, Z. Y., and Ragsdale, C. W. (2018) Multiple optic gland signaling pathways implicated in octopus maternal behaviors and death, *J. Exp. Biol.*, **221**, jeb185751, doi: 10.1242/jeb.185751.
33. Dart, A. (2022) Peto's paradox put to the test, *Nat. Rev. Cancer*, **22**, 129, doi: 10.1038/s41568-022-00447-4.
34. Bartas, M., Brázda, V., Volná, A., Červeň, J., Pečinka, P., and Zawacka-Pankau, J. E. (2021) The changes in the p53 protein across the animal kingdom point to its involvement in longevity, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 8512, doi: 10.3390/ijms22168512.
35. Pianka, E. R. (1970) On r- and K-selection, *Am. Naturalist*, **104**, 592-597, doi: 10.1086/282697.
36. Reznick, D., Bryant, M., and Bashey, F. (2002) R- and K-selection revisited: the role of population regulation in life-history evolution, *Ecology*, **83**, 1509-1520. doi:10.2307/3071970.
37. Sarkar, S., and Plutynski, A. (2010) *A Companion to the Philosophy of Biology*, Wiley-Blackwell.
38. Sieber, K. R., Dorman, T., Newell, N., and Yan, H. (2021) (Epi)genetic mechanisms underlying the evolutionary success of eusocial insects, *Insects*, **12**, 498, doi: 10.3390/insects12060498.
39. Shilovsky, G. A., Putyatina, T. S., Ashapkin, V. V., Rozina, A. A., Lyubetsky, V. A., Minina, E. P., Bychkovskaia, I. B., Markov, A. V., and Skulachev, V. P.

- (2018) Ants as object of gerontological research, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 1489-1503, doi: 10.1134/S0006297918120076.
40. Wood, B. (2015) *Wiley Blackwell Student Dictionary of Human Evolution*, Wiley-Blackwell.
 41. Lewis, K. N., Mele, J., Hayes, J. D., and Buffenstein, R. (2010) Nrf2, a guardian of healthspan and gatekeeper of species longevity, *Integr. Comp. Biol.*, **50**, 829-843, doi: 10.1093/icb/icq034.
 42. Bayersdorf, R., and Schumacher, B. (2019) Recent advances in understanding the mechanisms determining longevity, *F1000Res.*, **8**, doi: 10.12688/f1000research.19610.1.
 43. Vyssokikh, M. Y., Holtze, S., Averina, O. A., Lyamzaev, K. G., Panteleeva, A. A., Marey, M. V., Zinovkin, R. A., Severin, F. F., Skulachev, M. V., Fasel, N., Hildebrandt, T. B., and Skulachev, V. P. (2020) Mild depolarization of the inner mitochondrial membrane is a crucial component of an antiaging program, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 64916501, doi: 10.1073/pnas.1916414117.
 44. Skulachev, V. P., Shilovsky, G. A., Putyatina, T. S., Popov, N. A., Markov, A. V., Skulachev, M. V., and Sadovnichii, V. A. (2020) Perspectives of *Homo sapiens* lifespan extension: focus on external or internal resources? *Aging (Albany NY)*, **12**, 5566-5584, doi: 10.18632/aging.102981.
 45. Shilovsky, G. A., Putyatina, T. S., Morgunova, G. V., Seliverstov, A. V., Ashapkin, V. V., Sorokina, E. V., Markov, A. V., and Skulachev, V. P. (2021) A cross-talk between the biorhythms and gatekeepers of longevity: dual role of glycogen synthase kinase-3, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 433-448, doi: 10.1134/S0006297921040052.
 46. Pamplona, R., and Barja, G. (2011) An evolutionary comparative scan for longevity-related oxidative stress resistance mechanisms in homeotherms, *Biogerontology*, **12**, 409-435, doi: 10.1007/s10522-011-9348-1.
 47. Ma, S., Upneja, A., Galecki, A., Tsai, Y. M., Burant, C. F., Raskind, S., Zhang, Q., Zhang, Z. D., Seluanov, A., Gorbunova, V., Clish, C. B., Miller, R. A., and Gladyshev, V. N. (2016) Cell culture-based profiling across mammals reveals DNA repair and metabolism as determinants of species longevity, *Elife*, **5**, e19130, doi: 10.7554/eLife.19130.
 48. Seluanov, A., Gladyshev, V. N., Vijg, J., and Gorbunova, V. (2018) Mechanisms of cancer resistance in long-lived mammals, *Nat. Rev. Cancer*, **18**, 433-441, doi: 10.1038/s41568-018-0004-9.
 49. Gredilla, R., Sánchez-Román, I., Gómez, A., López-Torres, M., and Barja, G. (2020) Mitochondrial base excision repair positively correlates with longevity in the liver and heart of mammals, *Geroscience*, **42**, 653-665, doi: 10.1007/s11357-020-00158-4.
 50. Miskevich, D., Chaban, A., Dronina, M., Abramovich, I., Gottlieb, E., and Shams, I. (2021) Glutamine homeostasis and its role in the adaptive strategies of the blind mole rat, *Spalax, Metabolites*, **11**, 755, doi: 10.3390/metabo11110755.
 51. Akbari, M., Kirkwood, T. B. L., and Bohr, V. A. (2019) Mitochondria in the signaling pathways that control longevity and health span, *Ageing Res. Rev.*, **54**, 100940, doi: 10.1016/j.arr.2019.100940.
 52. Aoyagi Blue, Y., Kusumi, J., and Satake, A. (2021) Copy number analyses of DNA repair genes reveal the role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in tree longevity, *Iscience*, **24**, 102779, doi: 10.1016/j.isci.2021.102779.
 53. Lewis, K. N., Wason, E., Edrey, Y. H., Kristan, D. M., Nevo, E., and Buffenstein, R. (2015) Regulation of Nrf2 signaling and longevity in naturally long-lived rodents, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 3722-3727, doi:10.1073/pnas.1417566112.
 54. Omotoso, O., Gladyshev, V. N., and Zhou, X. (2021) Lifespan extension in long-lived vertebrates rooted in ecological adaptation, *Front. Cell. Dev. Biol.*, **9**, 704966, doi: 10.3389/fcell.2021.704966.
 55. Boddy, A. M., McGowen, M. R., Sherwood, C. C., Grossman, L. I., Goodman, M., and Wildman, D. E. (2012) Comparative analysis of encephalization in mammals reveals relaxed constraints on anthropoid primate and cetacean brain scaling, *J. Evol. Biol.*, **25**, 981-994, doi: 10.1111/j.1420-9101.2012.02491.x.
 56. Smaers, J. B., Rothman, R. S., Hudson, D. R., Balanoff, A. M., Beatty, B., Dechmann, D. K. N., de Vries, D., Dunn, J. C., Fleagle, J. G., Gilbert, C. C., Goswami, A., Iwaniuk, A. N., Jungers, W. L., Kerney, M., Ksepka, D. T., Manger, P. R., Mongle, C. S., Rohlf, F. J., Smith, N. A., Soligo, C., Weisbecker, V., and Safi, K. (2021) The evolution of mammalian brain size, *Sci. Adv.*, **7**, eabe2101, doi: 10.1126/sciadv.abe2101.
 57. Shoshani, J., Kupsky, W. J., and Marchant, G. H. (2006) Elephant brain: Part I: Gross morphology, functions, comparative anatomy, and evolution, *Brain Res. Bull.*, **70**, 124-157, doi: 10.1016/j.brainresbull.2006.03.016.
 58. Gunz, P., Neubauer, S., Falk, D., Tafforeau, P., Le Cabec, A., Smith, T. M., Williams, H. Kimbel, W. H., Fred Spoor, F., and Alemseged, Z. (2020) *Australopithecus afarensis* endocasts suggest ape-like brain organization and prolonged brain growth, *Sci. Adv.*, **6**, eaaz4729, doi: 10.1126/sciadv.aaz4729.
 59. Kaplan, H., Hill, K., Lancaster, J., and Hurtado, A. M. (2000) A theory of human life history evolution: diet, intelligence, and longevity, *Evol. Antropol.*, **9**, 156-185, doi: 10.1002/1520-6505(2000)9:4<156::AID-EVAN5>3.0.CO;2-7.
 60. Montgomery, S. H., Capellini, I., Venditti, C., Barton, R. A., and Mundy, N. I. (2011) Adaptive evolution of four microcephaly genes and the evolution of brain size in anthropoid primates, *Mol. Biol. Evol.*, **28**, 625-638, doi: 10.1093/molbev/msq237.
 61. Xu, S., Sun, X., Niu, X., Zhang, Z., Tian, R., Ren, W., Zhou, K., and Yang, G., (2017) Genetic basis of brain

- size evolution in cetaceans: insights from adaptive evolution of seven primary microcephaly (MCPH) genes, *BMC Evol. Biol.*, **17**, 206, doi: 10.1186/s12862-017-1051-7.
62. Shen, Y. Y., Liang, L., Li, G. S., Murphy, R. W., and Zhang, Y. P. (2012) Parallel evolution of auditory genes for echolocation in bats and toothed whales, *PLoS Genet.*, **8**, e1002788, doi: 10.1371/journal.pgen.1002788.
 63. Shen, Y. Y., Liang, L., Zhu, Z. H., Zhou, W. P., Irwin, D. M., and Zhang, Y. P. (2010) Adaptive evolution of energy metabolism genes and the origin of flight in bats, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 8666-8671, doi: 10.1073/pnas.0912613107.
 64. Shilovsky, G. A., Putyatina, T. S., Markov, A. V., and Skulachev, V. P. (2015) Contribution of quantitative methods of estimating mortality dynamics to explaining mechanisms of aging, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 1547-1559, doi: 10.1134/S0006297915120020.
 65. Shilovsky, G. A., Putyatina, T. S., Ashapkin, V. V., Luchkina, O. S., and Markov, A. V. (2017) Coefficient of variation of lifespan across the tree of life: is it a signature of programmed aging? *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 1480-1492, doi: 10.1134/S0006297917120070.
 66. Gavrilo, N. S., Gavrilo, L. A., Severin, F. F., and Skulachev, V. P. (2012) Testing predictions of the programmed and stochastic theories of aging: comparison of variation in age at death, menopause, and sexual maturation, *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 754-760, doi: 10.1134/S0006297912070085.
 67. Buffenstein, R. (2005) The naked mole-rat: a new long-living model for human aging research, *J. Gerontol.*, **60**, 1369-1377, doi: 10.1093/gerona/60.11.1369.
 68. Prothero, J., and Jurgens, K. D. (1987) *Scaling of maximal life span in mammals: a review*, in *Evolution of longevity in animals: a comparative approach* (Woodhead, A. D., Thompson, K. H., eds) Plenum Press, New York.
 69. Kleiber, M. (1961) *The Fire of Life: An Introduction to Animal Energetics*, John Wiley&Sons, Inc.
 70. Kitazoe, Y., Hasegawa, M., Tanaka, M., Futami, M., and Futami, J. (2017) Mitochondrial determinants of mammalian longevity, *Open Biol.*, **7**, doi: 10.1098/rsob.170083.
 71. Korotkova, D. D., Lyubetsky, V. A., Ivanova, A. S., Rubanov, L. I., Seliverstov, A. V., Zverkov, O. A., Martynova, N. Y., Nesterenko, A. M., Tereshina, M. B., Peshkin, L., and Zaraisky, A. G. (2019) Bioinformatics screening of genes specific for well-regenerating vertebrates reveals c-answr, a regulator of brain development and regeneration, *Cell Rep.*, **29**, 1027-1040.e6, doi: 10.1016/j.celrep.2019.09.038.
 72. Shilovsky, G. A. (2022) Lability of the Nrf2/Keap/ARE cell defense system in different models of cell aging and age-related pathologies, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 70-85, doi: 10.1134/S0006297922010060.
 73. Shilovsky, G. A., Putyatina, T. S., Ashapkin, V. V., Yamskova, O. V., Lyubetsky, V. A., Sorokina, E. V., Shram, S. I., Markov, A. V., and Vyssokikh, M. Y. (2019) Biological diversity and remodeling of cardiolipin in oxidative stress and age-related pathologies, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1469-1483, doi: 10.1134/S000629791912006X.
 74. Xu, Y., Zhang, S., Malhotra, A., Edelman-Novemsky, I., Ma, J., Kruppa, A., Cernicica, C., Blais, S., Neubert, T. A., Ren, M., and Schlame, M. (2009) Characterization of tafazzin splice variants from humans and fruit flies, *J. Biol. Chem.*, **284**, 29230-29239, doi: 10.1074/jbc.M109.016642.
 75. Shilovsky, G. A., Zverkov, O. A., Seliverstov, A. V., Ashapkin, V. V., Putyatina, T. S., Rubanov, L. I., and Lyubetsky, V. A. (2019) New C-terminal conserved regions of tafazzin, a catalyst of cardiolipin remodeling, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2019**, 2901057, doi: 10.1155/2019/2901057.
 76. Picard, M., and Sandi, C. (2021) The social nature of mitochondria: implications for human health, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **120**, 595-610, doi: 10.1016/j.neubiorev.2020.04.017.
 77. Agnani, P., Kauffmann, C., Hayes, L. D., and Schradin, C. (2018) Intra-specific variation in social organization of Strepsirrhines, *Am. J. Primatol.*, **80**, e22758, doi: 10.1002/ajp.22758.
 78. Dunbar, R. I. M. (1992) Neocortex size as a constraint on group size in primates, *J. Hum. Evol.*, **22**, 469-493, doi: 10.1016/0047-2484(92)90081-J.
 79. Sol, D., and Duncan, R. P., Blackburn, T. M., Cassey, P., and Lefebvre, L. (2005) Big brains, enhanced cognition, and response of birds to novel environments, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 5460-5465, doi: 10.1073/pnas.0408145102.
 80. Shultz, S., and Dunbar, R. I. (2006) Both social and ecological factors predict ungulate brain size, *Proc. Biol. Sci.*, **273**, 207-215, doi: 10.1098/rspb.2005.3283.
 81. Martin, R. D. (1981) Relative brain size and basal metabolic rate in terrestrial vertebrates, *Nature*, **293**, 57-60, doi: 10.1038/293057a0.
 82. Smith, F. A. (2022) The road to a larger brain, *Science*, **376**, 27-28, doi: 10.1126/science.abo1985.
 83. Rogell, B., Dowling, D. K., and Husby, A. (2019) Controlling for body size leads to inferential biases in the biological sciences, *Evol. Lett.*, **4**, 73-82, doi: 10.1002/evl3.151.
 84. Ksepka, D. T., Balanoff, A. M., Smith, N. A., Bever, G. S., Bhullar, B. S., Bourdon, E., Braun, E. L., Burleigh, J. G., Clarke, J. A., Colbert, M. W., Corfield, J. R., De-grange, F. J., De Pietri, V. L., Early, C. M., Field, D. J., Gignac, P. M., Gold, M. E. L., Kimball, R. T., Kawabe, S., Lefebvre, L., Marugán-Lobón, J., Mongle, C. S., Morhardt, A., Norell, M. A., Ridgely, R. C., Rothman, R. S., Scofield, R. P., Tambussi, C. P., Torres, C. R., van Tuinen, M., Walsh, S. A., Watanabe, A., Witmer, L. M., Wright, A. K., Zanno, L. E., Jarvis, E. D., and Smaers, J. B. (2020) Tempo and pattern of avian brain size evolution, *Curr. Biol.*, **30**, 2026-2036.e3, doi: 10.1016/j.cub.2020.03.060.

85. Rubanov, L. I., Zaraisky, A. G., Shilovsky, G. A., Seliverstov, A. V., Zverkov, O. A., and Lyubetsky, V. A. (2019) Screening for mouse genes lost in mammals with long lifespans, *BioData Min.*, **12**, 20, doi: 10.1186/s13040-019-0208-x.
86. Weon, B. M. (2016) Tyrannosaurs as long-lived species, *Sci. Rep.*, **6**, 19554, doi: 10.1038/srep19554.
87. Erickson, G. M., Currie, P. J., Inouye, B. D. and Winn, A. A. (2006) Tyrannosaur life tables: an example of nonavian dinosaur population biology, *Science*, **313**, 213-217, doi: 10.1126/science.1125721.
88. Ricklefs, R. E. (2007) Tyrannosaur ageing, *Biol. Lett.*, **3**, 214-217, doi: 10.1098/rsbl.2006.0597.
89. Erickson, G. M., Currie, P. J., Inouye, B. D. and Winn, A. A. (2010) A revised life table and survivorship curve for *Albertosaurus sarcophagus* based on the Dry Island mass death assemblage, *Can. J. Earth Sci.*, **47**, 1269-1275.
90. Newham, E., Gill, P. G., Brewer, P., Benton, M. J., Fernandez, V., Gostling, N. J., Habarthür, D., Jernvall, J., Kankaanpää, T., Kallonen, A., Navarro, C., Pacureanu, A., Richards, K., Brown, K. R., Schneider, P., Suhonen, H., Tafforeau, P., Williams, K. A., Zeller-Plumhoff, B., and Corfe, I. J. (2020) Reptile-like physiology in Early Jurassic stem-mammals, *Nat. Commun.*, **11**, 5121, doi: 10.1038/s41467-020-18898-4.
91. Cabreira, S. F., Schultz, C. L., da Silva, L. R., Lora, L. H. P., Pakulski, C., do Rêgo, R. C. B., Soares, M. B., Smith, M. M., and Richter, M. (2022) Diphyodont tooth replacement of Brasilodon-A Late Triassic eucynodont that challenges the time of origin of mammals, *J. Anat.*, **241**, 1424-1440, doi: 10.1111/joa.13756.
92. Yoder, A. D., Campbell, C. R., Blanco, M. B., Dos Reis, M., Ganzhorn, J. U., Goodman, S. M., Hunnicutt, K. E., Larsen, P. A., Kappeler, P. M., Rasoloarison, R. M., Ralison, J. M., Swofford, D. L., and Weisrock, D. W. (2016) Geogenetic patterns in mouse lemurs (genus *Microcebus*) reveal the ghosts of Madagascar's forests past, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 8049-8056, doi: 10.1073/pnas.1601081113.
93. Ripple, W. J., Newsome, T. M., Wolf, C., Dirzo, R., Everatt, K. T., Galetti, M., Hayward, M. W., Kerley, G. I., Levi, T., Lindsey, P. A., Macdonald, D. W., Malhi, Y., Painter, L. E., Sandom, C. J., Terborgh, J., and Van Valkenburgh, B. (2015) Collapse of the world's largest herbivores, *Sci. Adv.*, **1**, e1400103, doi: 10.1126/sciadv.1400103.
94. Smith, F. A., Elliott Smith, R. E., Lyons, S. K., and Payne, J. L. (2018) Body size downgrading of mammals over the late Quaternary, *Science*, **360**, 310-313, doi: 10.1126/science.aao5987.
95. Fraser, D., Villaseñor, A., Tóth, A. B., Balk, M. A., Eronen, J. T., Barr, A. W., Behrensmeyer, A. K., Davis, M., Du, A., Tyler Faith, J., Graves, G. R., Gotelli, N. J., Jukar, A. M., Looy, C. V., McGill, B. J., Miller, J. H., Pineda-Munoz, S., Potts, R., Shupinski, A. B., Soul, L. C., and Lyons, K. S. (2022) Late quaternary biotic homogenization of North American mammalian faunas, *Nat. Commun.*, **13**, 3940, doi: 10.1038/s41467-022-31595-8.
96. Markov, A. V., Barg, M. A., and Yakovleva, E. Y. (2018) Can aging develop as an adaptation to optimize natural selection? (Application of computer modeling for searching conditions when the "Fable of Hares" can explain the evolution of aging), *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 1504-1516, doi: 10.1134/S0006297918120088.
97. Shilovsky, G. A., Putyatina, T. S., and Markov, A. V. (2021) Altruism and phenoptosis as programs supported by evolution, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 1540-1552, doi: 10.1134/S0006297921120038.
98. Williams, G. C. (1957) Pleiotropy, natural selection and the evolution of senescence, *Evolution*, **11**, 398-411, doi: 10.1126/sageke.2001.1.cp13.
99. Medawar, P. B. (1952) *An Unsolved Problem of Biology*, H. C. Lewis & Co LTD, London.
100. Clarke, A., and Pörtner, H. O. (2010) Temperature, metabolic power and the evolution of endothermy, *Biol. Rev.*, **85**, 703-727, doi: 10.1111/j.1469-185X.2010.00122.x.
101. Manger, P. R. (2006) An examination of cetacean brain structure with a novel hypothesis correlating thermogenesis to the evolution of a big brain, *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, **81**, 293-338, doi: 10.1017/S1464793106007019.
102. Tsuboi, M., van der Bijl, W., Kopperud, B. T., Erritzøe, J., Voje, K. L., Kotrschal, A., Yopak, K. E., Collin, S. P., Iwaniuk, A. N., and Kolm, N. (2018) Breakdown of brain-body allometry and the encephalization of birds and mammals, *Nat. Ecol. Evol.*, **2**, 1492-1500, doi: 10.1038/s41559-018-0632-1.
103. Шмальгаузен И. И. (1982) Организм как целое в индивидуальном и историческом развитии, Избранные труды, Наука, Москва.
104. Munshi-South, J., and Wilkinson, G. S. (2010) Bats and birds: exceptional longevity despite high metabolic rates, *Ageing Res. Rev.*, **9**, 12-19, doi: 10.1016/j.arr.2009.07.006.
105. Wilkinson, G. S., and Adams, D. M. (2019) Recurrent evolution of extreme longevity in bats, *Biol. Lett.*, **15**, 20180860, doi: 10.1098/rsbl.2018.0860.
106. Butler, P. G., Wanamaker, A. D., Scourse, J. D., Richardson, C. A., and Reynolds, D. J. (2013) Variability of marine climate on the North Icelandic Shelf in a 1357-year proxy archive based on growth increments in the bivalve *Arctica islandica*, *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.*, **373**, 141-151, doi: 10.1016/j.palaeo.2012.01.016.

EVOLUTION OF LONGEVITY AS A SPECIES-SPECIFIC TRAIT IN MAMMALS

G. A. Shilovsky^{1,2*}, T. S. Putyatina¹, and A. V. Markov¹

¹ Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
119234 Moscow, Russia; E-mail: gregory_sh@list.ru; grgerontol@gmail.com

² Institute for Information Transmission Problems, Russian Academy of Sciences, 127051 Moscow, Russia

From an evolutionary point of view, the primary problems for an individual are not longevity, but adaptation to the environment associated with the needs of survival, food supply and reproduction. In the evolution of mammals, we see two main vectors. One is a short lifespan and numerous offspring, that is, an increase in reproductive success (r-strategy). The other is to develop valuable skills that make it easier to beat the competition (K-strategy). In species with a K-strategy, systems (=anti-aging programs) aimed at increasing reliability and adaptability, including increasing lifespan, should be developed and improved. They are signaling gene cascades aimed at maintaining the repair and antioxidant systems of the cell. Any (arbitrarily taken) of the long-lived species will thus be characterized by a different level of manifestation of factors favorable for longevity (for example, body size, brain development, sociality, the level of activity of the body's repair systems, increased activity of antioxidant defense and repair systems, resistance to xenobiotics and tumor formation, the presence of neotenic traits). In order not to list them every time, we will call the set of such traits in a certain species its gerontological success. Longevity (as well as a high species-specific lifespan) is not identical to evolutionary success, including reproductive success. This antagonism reaches its peak in mammals in connection with the development of warm-bloodedness, as well as cephalization associated with the development of the cerebral cortex. This leads to an increased level of production of oxidative radicals by mitochondria (and, consequently, to the rate of aging) and the appearance of a greater proportion of non-dividing differentiated cells, the accumulation of age-related damage in them, and the development of neurodegenerative diseases. The article also discusses the mathematical indicators used to assess the predisposition to longevity in different species (including both the standard mortality rate and the basal metabolic rate, as well as their derivatives). Peculiarities of the changes in the course of evolution of mammals (including differences between modern mammals and their ancestral forms) are also considered.

Keywords: evolution, phenoptosis, lifespan, aging and anti-aging programs, oxidative stress, age-related disorders, Nrf2, gerosuccess, longevity quotient

УДК 577.2

ДИСФУНКЦИЯ ЛАМИНА В И ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ СТАРЕНИЕ ПРИВОДЯТ К ДЕСТАБИЛИЗАЦИИ ТЕЛОМЕР В ГЕРМИНАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ *Drosophila*

© 2022 В.В. Моргунова^{1#}, О.А. Соколова^{1#}, Т.В. Сизова¹, Л.Г. Малаев^{1,2},
Д.С. Бабаев^{1,2}, Д.А. Квон³, А.И. Калмыкова^{1*}

¹ Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра
«Курчатовский институт», 123182 Москва, Россия; электронная почта: allakalm@img.ras.ru

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет биотехнологии, 119991 Москва, Россия

³ Центр геномных исследований Национального исследовательского центра
«Курчатовский институт», 123182 Москва, Россия

Поступила в редакцию 12.09.2022

После доработки 31.10.2022

Принята к публикации 14.11.2022

Пространственная организация хроматина в ядре имеет важное значение в функционировании генома и регуляции активности генов. Ядерная ламина и белки ламин, ассоциированные с ней, играют ключевую роль в этом процессе, а нарушение функций ламин приводит к декомпактизации и транскрипционной активации гетерохроматина, что связывают с синдромом преждевременного старения. Теломеры в норме расположены на периферии ядра во многих типах клеток, а ядерная ламина обеспечивает репликацию и стабильность теломер. Более того, заболевания, связанные с дефектами ламин и теломер, имеют похожие проявления и напоминают физиологические признаки старения. Особенно важно понимание динамики молекулярных изменений, связанных со старением, на организменном уровне. Целью работы было сравнить эффекты, вызванные мутацией ламина В и процессом физиологического старения в герминальных тканях модельного организма *Drosophila melanogaster*. Мы показали, что нарушение локализации ламина В приводит к декомпактизации гетерохроматина и активации транскрипции некоторых мобильных элементов и теломерных повторов. Кроме того, в клетках зародышевого пути у мутантов по ламина В наблюдались повреждения ДНК и появление признаков гомологичной рекомбинации в теломерах. Нарушение стабильности гетерохроматина, богатого повторами, может быть напрямую связано с дестабилизацией генома, гибелью герминальных клеток и стерильностью, наблюдаемых у исследуемых мутантов ламина В. В процессе физиологического старения дрозофилы наблюдаются сходные явления в герминальных клетках, что указывает на тесную связь механизмов поддержания целостности гетерохроматина на периферии ядра с механизмами старения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ламин В, теломеры, старение, герминальные клетки, гетерохроматин, ретротранспозоны, транскрипция, рекомбинация, Rad51, γ H2Av, *Drosophila*.

DOI: 10.31857/S0320972522120144, EDN: NHJKN1

ВВЕДЕНИЕ

Процесс старения клеток на молекулярном уровне ассоциирован с декомпактизацией гетерохроматина, активацией транскрипции в норме молчащих геномных повторов и нарушением гомеостаза теломер [1]. Аналогичные

признаки характерны для клеток с нарушениями функций белков ламин, ассоциированных с ядерной оболочкой. Такое наблюдение привело к появлению концепции о ламинопатии как ключевом процессе старения клетки [2]. На периферии ядра происходят важные процессы, обеспечивающие стабильность генома.

Принятые сокращения: ChIP – иммунопреципитация хроматина; RT – обратная транскрипция; qPCR – количественная ПЦР; DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол; TUNEL – внесение концевой метки dUTP с помощью терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы; H3K9me3 – триметилированная форма лизина 9 гистона 3.

* Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равный вклад в работу.

В первую очередь это поддержание гомеостаза гетерохроматина, насыщенного повторами различной природы и потому склонного к эктопической рекомбинации. Ассоциация гетерохроматина с ядерной ламиной поддерживает его компактную структуру и обеспечивает рекомбинационную стабильность [3]. Экспериментальные факты, полученные в основном на клеточных моделях, подкрепляют важную роль белков ламин в процессе старения и онкогенеза [4]. В процессе клеточного старения в сенесцентных клетках наблюдаются изменения структуры хроматина, перераспределение ламина-ассоциированных доменов (ЛАД), активация транскрипции гетерохроматиновых повторов и дисфункция теломер [5, 6]. Нарушения функций ламин приводят к сходным явлениям [7, 8]. Однако причинно-следственные связи таких сложных процессов, как старение и ламинопатия, пока остаются далёкими от понимания.

Ламины являются структурными белками, ассоциированными с ядерной оболочкой, и участвуют в таких важных процессах, как поддержание ядерной архитектуры, репликация и репарация ДНК, регуляция транскрипции [9]. Существует два основных типа ламин: ламин А/С и ламин В. Ламин А локализуется как на ядерной оболочке, так и в нуклеоплазме, а ламин В-типа находится исключительно на периферии ядра. Оба типа ламин участвуют в прикреплении к ядерной оболочке ЛАД, что лежит в основе организации ядерной архитектуры [10]. Нокдаун обоих типов ламин в клетках дрозофилы вызывал глобальные изменения в укладке хроматина – компактизацию эухроматина и разрыхление гетерохроматина [11]. Дисфункция ламин ведёт не только к структурным перестройкам генома, но и к нарушениям процессов репликации и репарации на периферии ядра [5, 12-14]. Мутация гена *LMNA* человека, кодирующего ламин А, и приводящая к образованию усечённой формы ламина, вызывает ускоренное старение – прогерия Хатчинсона – Гилфорда. Это заболевание сопровождается нарушениями экспрессии генов [15] и укорочением теломер [16]. Ламин В играет ключевую роль в обеспечении гомеостаза гетерохроматина, а нарушение взаимодействия ламина В с гетерохроматиновыми участками тесно связано с переходом клеток в состояние сенесценции или клеточного старения [17]. Теломеры также представляют собой гетерохроматиновые домены с преимущественным расположением вблизи ядерной оболочки в клетках дрожжей и млекопитающих [18]. Теломерные белки млекопитающих

физически взаимодействуют с ламинами, которые обеспечивают локализацию теломер на периферии ядра и влияют на репарацию, репликацию и транскрипцию теломер [2, 18]. Более того, заболевания, вызванные дефектами ламин или теломер, имеют похожие проявления и напоминают признаки преждевременного старения [19].

Можно ли рассматривать мутантов по ламинам у модельных объектов как модель старения на организменном уровне? Для ответа на этот вопрос необходимо выявить ключевые молекулярные процессы, ассоциированные с мутациями ламин, и сравнить их с процессами, происходящими при физиологическом старении на уровне организма. Такой подход позволит найти новые диагностические маркеры старения и, возможно, метаболические пути, воздействие на которые позволит предотвратить преждевременное старение. Исследования на модельном объекте *Drosophila melanogaster* показали, что как при старении, так и при мутациях ламина В происходит декомпактизация гетерохроматина и активация мобильных элементов в соматических тканях [20, 21]. Различные воздействия, которые подавляют активность транспозонов и поддерживают гетерохроматин, приводят к увеличению продолжительности жизни, что служит аргументом в пользу ретротранспозонной теории старения [22]. Повреждения ДНК также наблюдаются как при старении, так и у ламиновых мутантов дрозофилы [20]. Несмотря на отсутствие полного понимания механизмов старения, очевидно, что дестабилизация гетерохроматиновой части генома, связанной с ядерной периферией, является одним из важных признаков старения.

Исследования на *D. melanogaster* выявили интересный факт: ноль-мутанты ламина В жизнеспособны, но стерильны [23], что указывает на его важную роль в процессе гаметогенеза. В данной работе мы охарактеризовали влияние мутации ламина В на структуру хроматина клеток зародышевой линии *D. melanogaster*. Мы показали, что нарушение локализации ламина В в ядре приводит к активации экспрессии некоторых ретротранспозонов и теломерных повторов в герминальных клетках, а также к повышенному уровню гомологичной рекомбинации в теломерах. Сходные явления наблюдаются при физиологическом старении в зародышевой линии дрозофилы, что указывает на тесную связь процессов, происходящих в гетерохроматине на периферии ядра, с механизмами старения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Линии *D. melanogaster*. В работе использована линия с мутацией ламина В *Lam^{A25}pr¹/CyO* (коллекция линий дрозофилы Bloomington Drosophila Stock Center, BDSC, США, № 25092). Мутация вызвана сдвигом рамки считывания на С-конце и удалением СaaX-мотива. Линия *iso-1 (y¹; cn¹ bw¹ sp¹)* — это изогенизированная линия, использованная для секвенирования генома дрозофилы (коллекция BDSC, № 2057).

Вестерн-блот анализ и иммуоокрашивание.

Для вестерн-блот анализа тотальные экстракты яичников разделяли в 8%-ном ПААГ и переносили на мембрану Immobilon-P («Merck Millipore», США). Визуализация сигнала проводилась с помощью системы Immun-Star AP detection system («Bio-Rad», США). Иммуоокрашивание тканей проводилось, как описано ранее [24]. В работе использовали следующие первичные антитела: анти- γ -тубулин («Sigma», США), анти-Lamin C (LC28.26, «Developmental Studies Hybridoma Bank», DSHB, США), анти-Lamin B (ADL84.12, DSHB), анти-НОАР [25], анти- γ H2Av («Rockland», США), анти-Rad51 («GeneTex», США). Использовали вторичные антитела с минимальной перекрёстной реактивностью к IgG других видов, конъюгированные с Alexa Fluor («Jackson ImmunoResearch», США, разведение 1 : 500). ДНК окрашена DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндо́л). Окраску яичников методом внесения концевой метки dUTP с помощью терминальной дезокси-синуклеотидилтрансферазы (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling, TUNEL) проводили согласно протоколу производителя (Click-iT™ TUNEL Alexa Fluor Imaging, «Invitrogen», США). Иммуофлуоресцентные изображения были получены на конфокальном микроскопе Zeiss LSM 900 («ZEISS», Германия). Z-Стеки были сделаны с шагом 0,5 мкм. Обработка снимков проводилась с использованием программы ImageJ. Для оценки колокализации сигналов γ H2Av и Rad51 с теломерным белком НОАР было проанализировано 30–40 ядер из двух независимых образцов. Программная деконволюция была выполнена для оптических срезов на разных уровнях по оси z. Колокализация была оценена программным обеспечением ImageJ с использованием плагина Colocalization. Порог перекрытия был установлен в размере 3 пикселя. Для статистической обработки и построения графиков использовалась программа GraphPad Prism 5.0 («GraphPad Software», США, <https://www.graphpad.com>); попарное сравнение проводилось согласно U-тесту Манна – Уитни.

Обратная транскрипция (RT) и количественная ПЦР (qPCR). Тотальную РНК выделяли из яичников дрозофилы с использованием реагента ExtractRNA («Евроген», Россия). RT проводилась с 6-нуклеотидным праймером случайной последовательности и ревертазой М-MuLV («Биолабмикс», Россия). qPCR проводилась на приборе LightCycler 96 («Roche», Швейцария), цифровая ПЦР (dPCR) — на приборе QIAcuity Digital PCR System («Qiagen», США). Ген-специфичные праймеры, использованные для qPCR:

- *rp49*
5'-ATGACCATCCGCCCAGCATAC-3',
5'-GCTTAGCATATCGATCCGACTGG-3';
- *Pgd*
5'-CCAGAAGGGCACGGGCAA-3',
5'-CAGGGCAGACAGGCATCGC-3';
- *HeT-A ORF*
5'-GGAGTGATGAGCGGCGGAAA-3',
5'-CCAGGCAAGCGGACAAACGA-3';
- *HeT-A promoter*
5'-ACCACGCCCAACCCCAAA-3',
5'-GCTGGTGGAGGTACGGAGACAG-3';
- *TART-B*
5'-CACACCCACACAATATAACGACA-3',
5'-CTGATTCGCTTGTGAATTGC-3';
- *GATE*
5'-CATCACACGTTGTTGCACCGA-3',
5'-GCACTGCCAAGAAGGATAGCTCT-3';
- *light*
5'-GAAAGATCAAAATGGGACAGA-3',
5'-TGAGCATAGTTGTTCTCGTAGGA-3';
- *copia*
5'-CGACAGTGTGGAGGTTGTGCC-3',
5'-CTTGGAGACGCTTTACGGACAT-3';
- *1731*
5'-ATGTTTGTGGAAGGTGGTTTCAGG-3',
5'-GCTTTTTCATCTTGGGATTGCC-3';
- *60D*
5'-CCAGCCGAGACGAGCACCATAAAT-3',
5'-TTCCCATCCTCGAGCCCTG-3';
- *42AB*
5'-CGTCCCAGCCTACCTAGTCA-3',
5'-ACTTCCCGGTGAAGACTCCT-3';
- *38C1*
5'-GATACTGGTTCTACGGTGCGAAAAAC-3',
5'-GTGCTTGTGTGCTGTGTGAG-3'.

Рассчитывали стандартную ошибку среднего (SEM) для трёх биологических реплик. Статистическая достоверность проверялась с помощью *t*-критерия Стьюдента (* $p < 0,05$ —0,01, ** $p < 0,01$ —0,001, *** $p < 0,001$).

Иммунопреципитация хроматина (ChIP).

ChIP проводили в соответствии с ранее опубликованным протоколом [26]. Хроматин, полученный из яичников дрозофилы, преци-

питировали с антителами против гистона H3, триметилированного по Lys9 (07-523, «Merck», Германия). Праймеры, использованные в ChIP-qPCR, перечислены в предыдущем разделе. qPCR проводили с помощью прибора LightCycler 96 («Roche»). Обогащения при иммунопреципитации хроматина рассчитаны как проценты от исходного образца. Рассчитывали SEM для трёх биологических реплик. Статистическая достоверность проверялась с помощью *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В мутантах *Lam*^{A25} происходят гибель герминальных клеток и нарушения оогенеза. В геноме дрозофилы присутствуют два гена ламина

нов, *LamC*, кодирующий ламин типа А/С, и *Lam* или *Dm0*, кодирующий ламин В. Для ламинов характерно наличие С-концевого мотива СааХ, который необходим для локализации белков на внутренней поверхности ядерной мембраны [27]. Мутация *Lam*^{A25} вызвана сдвигом рамки трансляции на С-конце; это не влияет заметно на размер белка, но нарушает СааХ-бокс, что приводит к делокализации мутантного ламина В в соматических клетках [28]. В нейрональных тканях мутантов *Lam*^{A25} наблюдали повреждение ДНК и гибель нейронов [29]. Жизнеспособные мутанты ламина В, в том числе *Lam*^{A25}, развиваются до стадии имаго, но стерильны [23, 28]. Мы показали, что яичники *Lam*^{A25} значительно редуцированы по сравнению с нормой, а процесс оогенеза останавливается на средних стадиях (рис. 1, а).

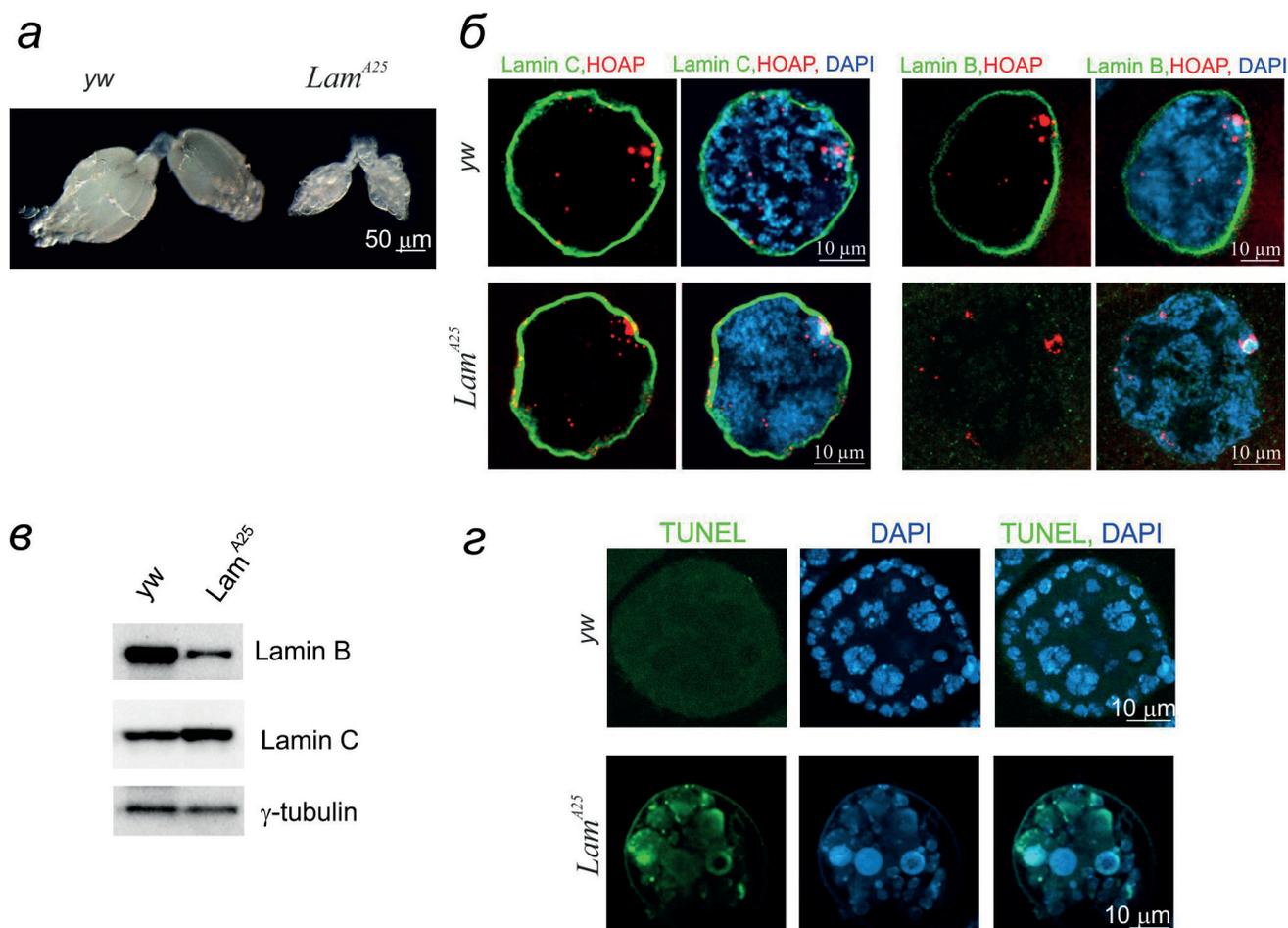


Рис. 1. Мутация ламина В *Lam*^{A25} приводит к нарушениям оогенеза у *Drosophila*. а – Общий вид яичников контрольной линии *yw* и мутантной *Lam*^{A25}. б – В линии *Lam*^{A25} наблюдается отсутствие ламина В на ядерной оболочке питающих клеток. Иммуноокрашивание яичников с использованием антител к теломерному белку HOAP (красный цвет), ламинам С и В (зелёный цвет). ДНК окрашена DAPI (синий цвет). в – Вестерн-блот анализ экстрактов яичников линии *yw* и *Lam*^{A25} с использованием антител к ламину В, ламину С и γ -тубулину в качестве контроля нанесения. г – Детекция фрагментированной ДНК с помощью TUNEL (зелёный цвет) выявляет гибель герминальных клеток и дегенерацию яйцевых камер в яичниках у мутантов *Lam*^{A25} по сравнению с контрольной линией *yw*. Показаны яйцевые камеры на 4 стадии оогенеза

Иммуноокрашивание яичников с помощью антител к N-концу ламина В выявляет очень слабые сигналы мутантного белка в нуклеоплазме питающих клеток, в то время как ламин С остаётся на ядерной мембране (рис. 1, б). Вестерн-блот анализ показал снижение количества ламина В в яичниках мутантов *Lam^{A25}*, что указывает не только на его делокализацию, но и дестабилизацию, и совпадает с наблюдениями по иммуноокрашиванию белков (рис. 1, б, в). Иммуноокрашивание теломер-специфичного белка НОАР показывает, что преимущественная локализация теломер на периферии ядра не изменилась в мутантах *Lam^{A25}* по сравнению с нормой (рис. 1, б). Здесь необходимо отметить, что исследуемые в работе герминальные питающие клетки яичника имеют полиплоидный геном, но низкий уровень политении, в результате чего теломерных сигналов детектируется гораздо больше, чем число хромосомных плеч. При этом на периферии ядра чётко выделяется крупный кластер теломер, скорее всего, принадлежащих гетерохроматиновым плечам хромосом. Окраска яичников методом TUNEL, который детектирует фрагментацию ДНК, выявила TUNEL-положительные клетки в мутантах *Lam^{A25}*; при этом наблюдалась дегенерация целых яйцевых камер – морфологических структур, где проходит оогенез (рис. 1, г). Таким образом, делокализация и дестабилизация ламина В вызывает ускоренную гибель герминальных клеток и нарушения оогенеза.

В яичниках мутантов *Lam^{A25}* снижается компактизация геномных повторов и увеличивается экспрессия ретротранспозонов и теломерных повторов. Чтобы выяснить, происходит ли изменение структуры хроматина в яичниках мутантов *Lam^{A25}*, был проведён анализ хроматина методом ChIP-qPCR с использованием антител к модификации гистона H3K9me3, ассоциированной с неактивным хроматином. Наблюдается достоверное снижение гетерохроматиновой метки H3K9me3 на некоторых ретротранспозонах и в гетерохроматиновых локусах *light*, *42AB*, *38C1*, что указывает на декомпактизацию гетерохроматина (рис. 2, а).

Теломеры дрозофилы поддерживаются за счёт ретротранспозиций на концы хромосом специализированных теломерных ретротранспозонов, основными из которых являются *HeT-A* и *TART* [30]. Несмотря на отсутствие теломеразы, многие компоненты и молекулярные механизмы регуляции биогенеза теломер дрозофилы сходны с таковыми у видов, использующих теломеразу [31]. В том числе,

для теломер характерна локализация на периферии ядра и гетерохроматиновая структура [32]. У мутантов *Lam^{A25}* наблюдается снижение H3K9me3 на теломерных повторах *HeT-A* и *TART* (рис. 2, а). Таким образом, делокализация ламина В приводит к нарушению структуры гетерохроматина, в том числе и теломерного гетерохроматина, в яичниках дрозофилы.

Затем мы проверили, меняется ли уровень транскрипции в тех районах, в которых наблюдается изменение состояния хроматина. Сравнение гомо- и гетерозиготных особей, несущих мутацию *Lam^{A25}*, позволяет максимально уменьшить влияние генетического фона и связанных с ним различий в числе копий мобильных элементов и теломерных повторов. С помощью RT-qPCR было показано, что происходит умеренное, но достоверное увеличение количества РНК некоторых ретротранспозонов и теломерных повторов в яичниках мутантов *Lam^{A25}* (рис. 2, б). Для подтверждения дерепрессии теломерных повторов был проведён более чувствительный анализ экспрессии с помощью обратной транскрипции, совмещённой с цифровой ПЦР, RT-dPCR, при этом использовался другой контроль для нормировки образцов. Такая дополнительная проверка подтвердила, что, действительно, происходит увеличение количества РНК теломерных повторов *HeT-A* и *TART* в яичниках мутантов *Lam^{A25}* (рис. 2, в).

В мутантах *Lam^{A25}* наблюдается повреждение ДНК и появление маркеров гомологичной рекомбинации на периферии ядер герминальных клеток яичника. В норме теломеры дрозофилы преимущественно расположены на периферии ядер полиплоидных питающих клеток яичников [32]. Особенно крупное скопление теломер наблюдается вблизи ядерной ламины питающих клеток в большом кластере гетерохроматина, для которого характерна более яркая окраска DAPI (рис. 1, 2). С помощью иммуноокрашивания фосфорилированной формы гистона H2Av (γ H2Av) – маркера двунитевых разрывов ДНК и репликативного стресса – мы оценили, как влияет мутация *Lam^{A25}* на стабильность теломер и генома в целом в ядрах питающих клеток яичников. В мутантных яичниках *Lam^{A25}* наблюдается появление фокусов γ H2Av, особенно хорошо заметных на периферии ядра. Часть сигналов НОАР – белка теломерного защитного комплекса – пересекается с сигналами γ H2Av, что говорит о повреждении теломерной ДНК или нарушении теломерного защитного комплекса (рис. 2, г).

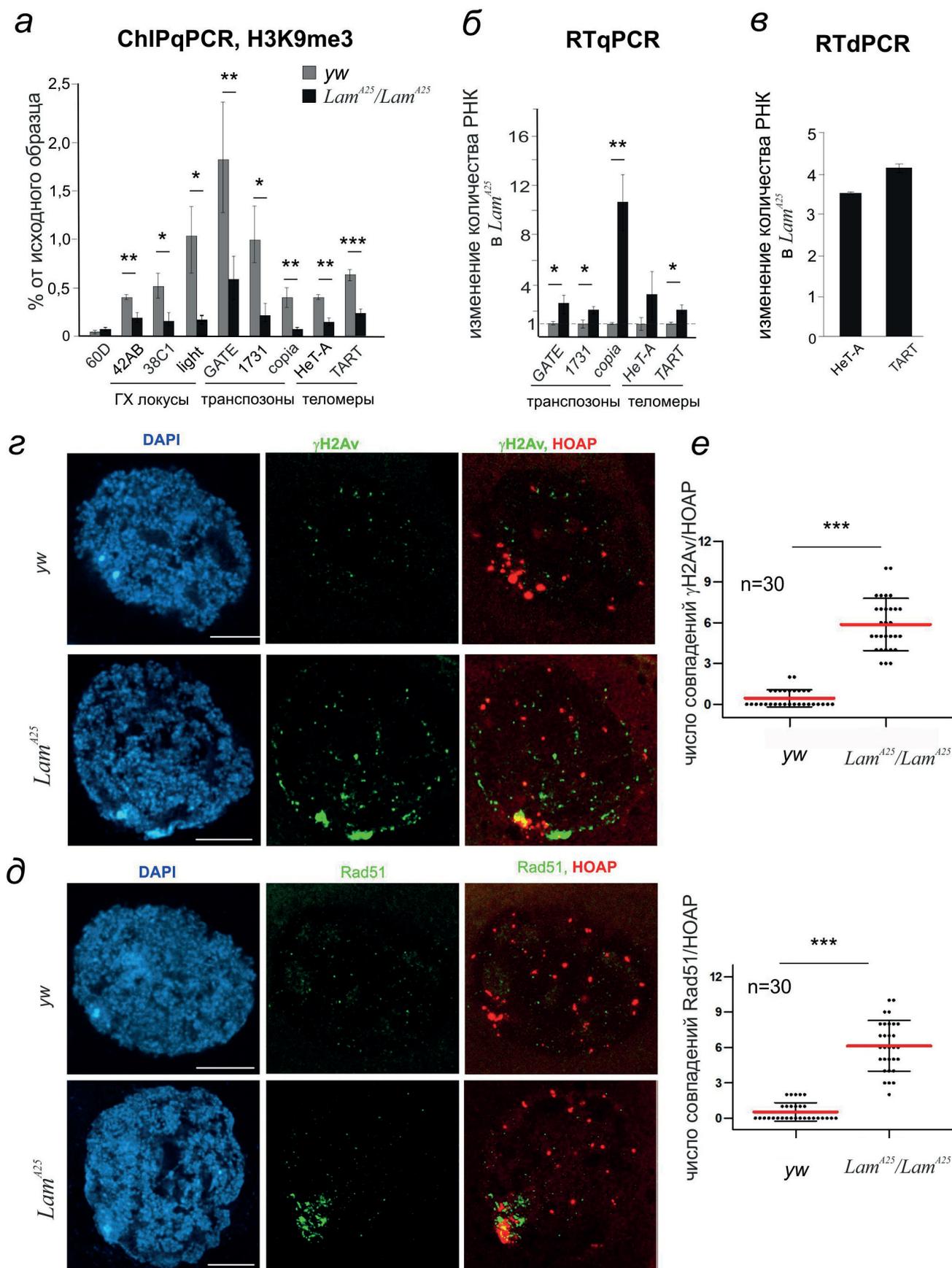


Рис. 2. См. подпись на стр. 1978

Рис. 2. Мутация ламина В оказывает влияние на гетерохроматиновые локусы, ретротранспозоны и теломеры. *a* – ChIP на яичниках контрольной (*uw*) и мутантной (*Lam^{A25}*) линий *D. melanogaster* с антителами к H3K9me3 выявляет изменения состояния хроматина теломерных повторов, ретротранспозонов и гетерохроматиновых (ГХ) локусов. Эухроматиновый локус *60D* использован как отрицательный контроль. Обогащения после ChIP рассчитаны как проценты от исходного образца. *б* – Сравнение количества транскриптов ретротранспозонов и теломерных повторов *HeT-A* и *TART* с помощью RT-qPCR в тотальной РНК, выделенной из яичников *Lam^{A25}* и содержащей мутацию в гетерозиготном (*Lam^{A25}/+*) или гомозиготном (*Lam^{A25}/Lam^{A25}*) состоянии. Нормировка образцов была проведена на количество транскриптов гена домашнего хозяйства *rp49*. SEM посчитана для трёх независимых опытов. Звёздочки обозначают статистическую достоверность (* $p < 0,05$ – $0,01$, ** $p < 0,01$ – $0,001$, *** $p < 0,001$). *в* – Изменение количества транскриптов (число раз) теломерных повторов *HeT-A* и *TART* измерено с помощью RT-dPCR в яичниках гомозигот *Lam^{A25}/Lam^{A25}* относительно гетерозигот *Lam^{A25}/+*. Нормировка образцов была проведена на количество транскриптов гена домашнего хозяйства *Pgd*. Стандартное отклонение посчитано для 3 технических реплик. *г* – Иммуноокрашивание яичников с использованием антител к теломерному белку НОАР (красный цвет) и маркеру повреждения ДНК – γ H2Av (зелёный цвет). В ядрах питающих клеток яичника линии *Lam^{A25}* наблюдается появление фокусов γ H2Av в гетерохроматине и в теломерах. Шкала 10 мкм. *д* – Иммуноокрашивание яичников с использованием антител к теломерному белку НОАР (красный цвет) и рекомбиназе Rad51 (зелёный цвет). В ядрах питающих клеток яичника линии *Lam^{A25}* наблюдается активация рекомбинации в гетерохроматиновом блоке и в теломерах. ДНК окрашена DAPI (синий цвет). Шкала 10 мкм. *е* – Статистический анализ колокализации белков γ H2Av или Rad51 с теломерным белком НОАР. *** $p < 0,0001$

Белок Rad51 является маркером рекомбинации и взаимодействует с однонитевой ДНК на стадии инвазии нити в процессе гомологичной рекомбинации. В клетках *Drosophila* активность Rad51 блокирована в гетерохроматиновых доменах, насыщенных повторами, для предотвращения эктопической рекомбинации [3]. В норме иммуноокрашивание Rad51 практически не выявляет сигналов, в то время как в мутантах *Lam^{A25}* появляются крупные скопления Rad51 на периферии ядер питающих клеток. Особенно сильное окрашивание наблюдается в области кластера гетерохроматина, отличающегося яркой окраской по DAPI (рис. 2, *д*). Сигналы теломерного белка НОАР в этой области перекрываются с сигналами Rad51. Статистический анализ колокализации белков γ H2Av или Rad51 с теломерным белком НОАР выявил достоверное увеличение числа таких пересечений у мутантов *Lam^{A25}* по сравнению с контролем (рис. 2, *е*). В совокупности наши данные показывают, что мутация *Lam^{A25}* нарушает гомеостаз на периферии ядра, что приводит к декомпактизации гетерохроматина, активации транскрипции и процесса гомологичной рекомбинации, что угрожает целостности генома и приводит к гибели герминальных клеток.

В результате старения дрозофилы увеличивается экспрессия мобильных элементов и теломерных повторов, и появляются признаки гомологичной рекомбинации в гетерохроматине герминальных клеток яичника. Ранее было показано, что потеря репрессивных меток хроматина, ведущих к активации транскрипции ретротранспозонов, наблюдалась во время старения у дрожжей и мух [33, 34]. Мы решили проверить, как меняется состояние хроматина и транскрипция теломерных повторов и ретротранспозонов в герминальных тканях дрозофилы в результате старения. Средняя продол-

жительность жизни *D. melanogaster* в природных популяциях составляет 55 дней [35]. Мы проводили исследование на изогенизированной линии *iso-1*, геном которой был секвенирован и аннотирован. Анализ хроматина методом ChIP-qPCR с использованием антител к модификации гистона H3K9me3 выявляет достоверное снижение этой гетерохроматиновой метки на теломерных повторах в яичниках 50-дневных мух (рис. 3, *а*). Количество транскриптов теломерных повторов *HeT-A* и *TART*, а также некоторых ретротранспозонов достоверно увеличивается в яичниках 50-дневных мух по сравнению с 3-дневными (рис. 3, *б*). Эти результаты показывают, что при старении происходит декомпактизация хроматина и активация транскрипции ретротранспозонов и теломерных повторов в яичниках *D. melanogaster*. Стоит отметить, что количественный уровень изменений сопоставим с теми, которые наблюдаются в мутантах *Lam^{A25}*.

Иммуноокрашивание яичников 3-дневных самок практически не выявляет сигналов γ H2Av и Rad51, в то время как у 50-дневных самок появляются многочисленные сигналы γ H2Av, маркера повреждений ДНК, в ядрах питающих клеток, преимущественно на периферии ядер; некоторые сигналы γ H2Av пересекаются с теломерным белком НОАР (рис. 3, *в, д*). Яркое иммуноокрашивание рекомбиназы Rad51 наблюдается в области гетерохроматина и в теломерах у 50-дневных самок (рис. 3, *г, д*). Окрашивание яичников с помощью метода TUNEL выявляет гибель герминальных клеток у самок 50-дневного возраста (рис. 3, *е*).

Таким образом, при физиологическом старении в герминальных клетках происходят изменения гетерохроматина на периферии ядра, поразительно сходные с теми, которые мы наблюдаем у мутантов *Lam^{A25}* с нарушенной локализацией ламина В.

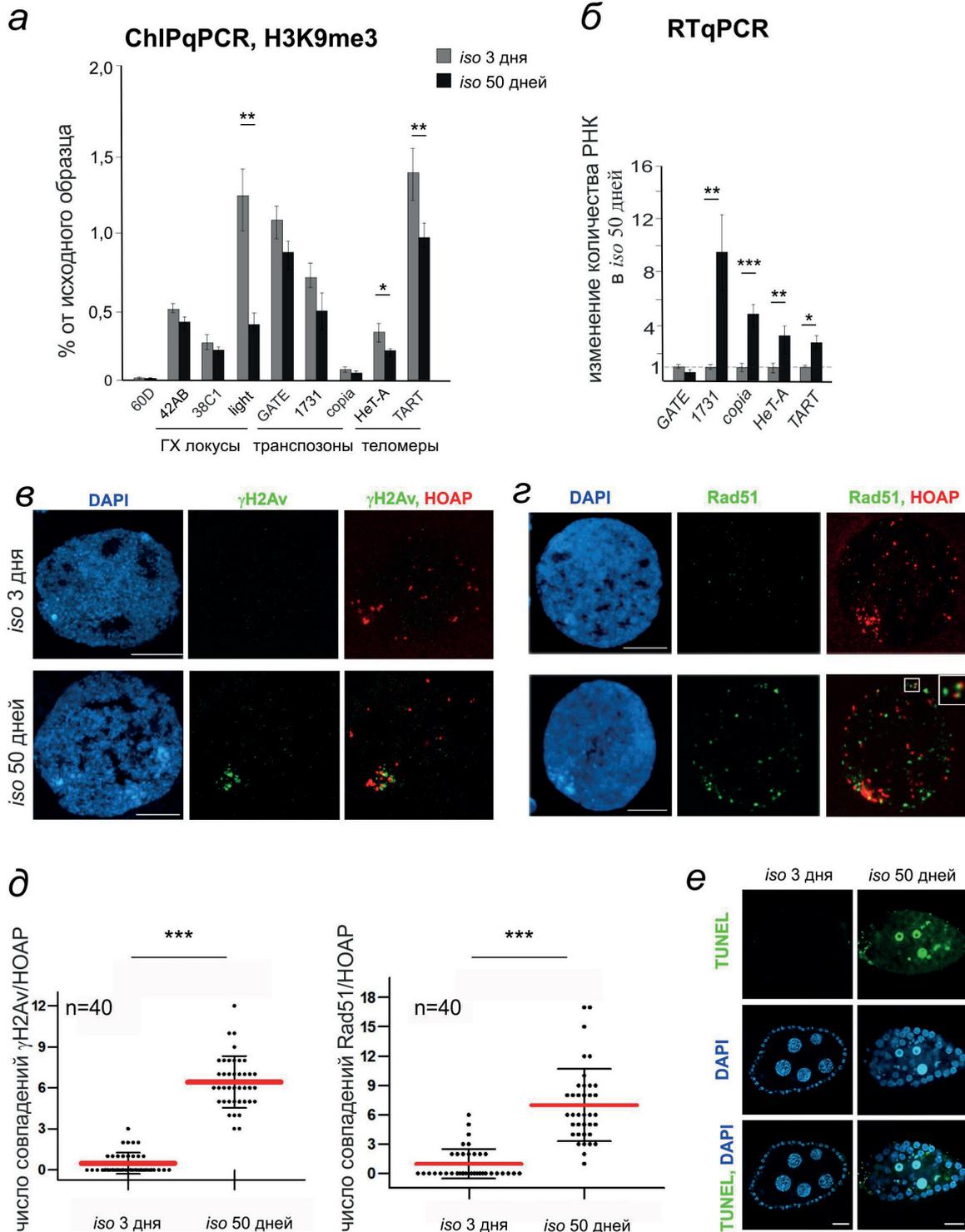


Рис. 3. В результате старения дрозофилы в герминальных клетках яичников активируется экспрессия ретротранспозонов и теломерных повторов, а также появляются повреждения ДНК и признаки гомологичной рекомбинации в гетерохроматине. *а* – ChIP на яичниках 3-дневных и 50-дневных самок *D. melanogaster* линии *iso-1* с антителами к H3K9me3 выявляет изменения состояния хроматина теломерных повторов, ретротранспозонов и гетерохроматиновых (ГХ) локусов. *б* – Сравнение количества транскриптов ретротранспозонов и теломерных повторов с помощью RT-qPCR в тотальной РНК, выделенной из яичников 3-дневных и 50-дневных самок *D. melanogaster* линии *iso-1*. *в, з* – Иммуноокрашивание яичников 3-дневных и 50-дневных самок дрозофилы с использованием антител к теломерному белку HOAP (красный цвет) и γ H2Av (зеленый цвет) (*в*) или рекомбиназе Rad51 (зеленый цвет) (*з*). В ядрах питающих клеток 50-дневных самок наблюдаются сигналы гомологичной рекомбинации в теломерах и повреждения ДНК на периферии ядра и в теломерах. ДНК окрашена с помощью DAPI (синий цвет). *д* – Статистический анализ колокализации белков γ H2Av или Rad51 с теломерным белком HOAP. *** $p < 0,0001$. *е* – Окрашивание яичников с помощью метода TUNEL (зеленый цвет) выявляет гибель герминальных клеток у самок 50-дневного возраста по сравнению с 3-дневными. Показаны яйцевые камеры на 6 стадии оогенеза. Шкала 10 мкм (*в, з, е*)

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

С понятием ламинопатии в основном связывают мутации ламина А, которые приводят к изменениям укладки хроматина, нарушению процессов репликации и репарации, а также к дисфункции теломер [5, 13, 18]. Во многих организмах ламин В выполняет сходные функции и играет особую роль в функционировании нейронов [8, 36]. Скорее всего, присутствие нескольких типов ламин со схожими свойствами может компенсировать дисфункцию одного из вариантов, но в то же время наблюдается клеточная и функциональная специализация разных ламин. Многочисленные данные указывают на важнейшую роль ламина В в процессе старения. С возрастом происходит постепенное снижение уровня ламина В за счёт его дестабилизации [37, 38], что является причиной нейродегенерации и нарушений иммунной системы у дрозофилы [38, 39]. Кроме того, на клетках млекопитающих было показано, что количество ламина В1 резко снижается в сенесцентных клетках [40-42], что делает его важным маркером клеточного старения. Тот факт, что мутации пролил-изомеразы PIN1 (белок Dodo у *Drosophila*), необходимой для поддержания структуры ламина В, дестабилизируют гетерохроматин, подчёркивает важность структурной целостности ламина В в поддержании структуры гетерохроматина [43]. В данной работе мы использовали мутацию ламина В, которая нарушает локализацию белка на ядерной оболочке. При этом происходит снижение уровня белка, что говорит о его дестабилизации, которая также наблюдается в процессе старения [38]. Мутанты *Lam^{A25}*, у которых изменена локализация и уровень ламина В, являются перспективной моделью для изучения механизмов старения на организменном уровне. Стоит отметить, что мутанты *Lam^{A25}*, как и другие жизнеспособные мутанты ламина В, развиваются до взрослого состояния, но стерильны [23, 28]. Это говорит о том, что контроль целостности генома в процессе гаметогенеза является наиболее жёстким, что обеспечивает стабильность генетической информации в ряду поколений.

На данной модели мы исследовали изменения, происходящие в ядрах питающих клеток зародышевого пути. Несмотря на присутствие в клетках ламина С, локализованного на ядерной мембране, в мутантах ламина В *Lam^{A25}* наблюдается декомпактизация гетерохроматиновых локусов, ретротранспозонов и теломер, что сопровождается умеренным повышением

уровня транскриптов некоторых мобильных элементов и теломерных повторов. Иммуноокрашивание теломерных маркеров не выявляет заметного смещения теломер от периферии ядра в мутантах *Lam^{A25}*. По-видимому, эффект мутации ламина В проявляется в нарушении формирования функционального компартмента вблизи ядерной ламины, в то время как ламин С, присутствующий в герминальных клетках, может выполнять топологические функции. Кроме декомпактизации гетерохроматина и активации транспозонов, мы наблюдаем мощное накопление рекомбиназы Rad51 в гетерохроматине при нарушении локализации ламина В, что указывает на активацию процесса рекомбинации. Белок Rad51, участвующий в гомологичной рекомбинации, незаменим при повреждениях ДНК в эухроматине, однако его активность в районах, богатых повторами, может привести к эктопической рекомбинации и хромосомным перестройкам [44]. Существуют особые механизмы, до конца не изученные, которые разобщают процессы репарации повреждений ДНК и гомологичной рекомбина-

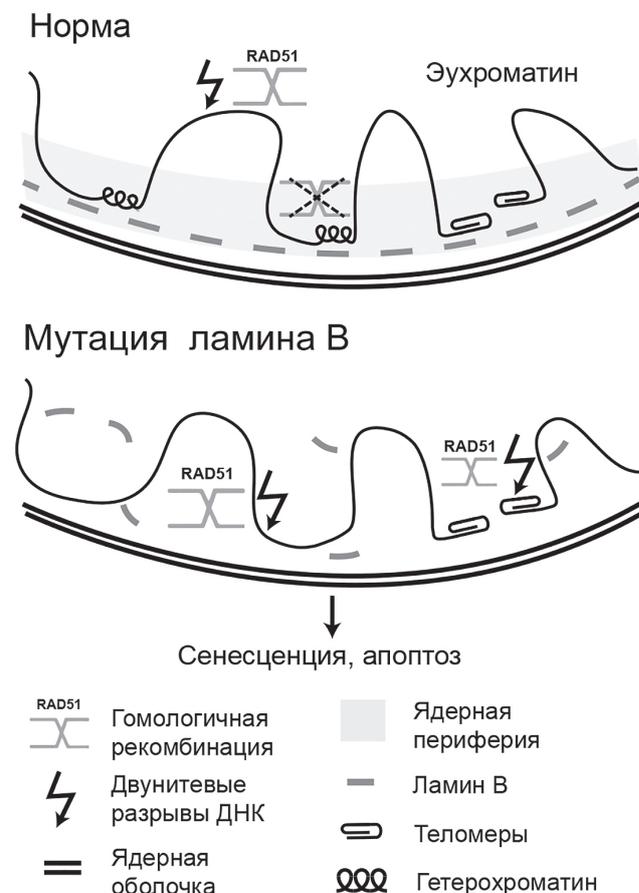


Рис. 4. Мутация ламина В приводит к активации рекомбинации в теломерах и гетерохроматине на периферии ядра (модель)

ции в гетерохроматине [45, 46]. Показано, что на периферии ядра может идти безопасная репарация ДНК в районах, обогащённых белком HP1 (heterochromatin protein 1), за счёт вытеснения Rad51 из этих участков [47, 48]. Такой механизм направлен на предупреждение незаконной рекомбинации между повторами, которыми богат гетерохроматин. То, что мы наблюдаем декомпактизацию гетерохроматина и появление признаков гомологичной рекомбинации и повреждений ДНК в теломерах и на периферии ядра, говорит о разрушении такой инфраструктуры у мутантов ламина В (рис. 4). Интересно, что такие же признаки активации гомологичной рекомбинации в теломерах и в гетерохроматине наблюдаются в процессе физиологического старения в герминальных клетках дрозофилы. Накопление формы гистона γ H2Av в мозгах у мутантов PIN1, фактора стабильности ламина В, Napolitano et al. объясняли появлением разрывов ДНК, вызванных мобилизацией транспозонов [43]. У мутантов по ламинам также наблюдались признаки повреждения ДНК, причина которых неизвестна [29]. Наши данные указывают, что дестабилизация ламина В в герминальных клетках активирует механизм, связанный, вероятно, с незаконной рекомбинацией между повторами, затрагивающей в первую очередь теломеры.

Какова связь между ламином В и рекомбинацией? Ламины играют важную роль в регуляции репарации ДНК [5, 49]. На клетках человека показано, что рекомбиназа Rad51 контактирует с ламином В1, что способствует залечиванию двуниевых разрывов ДНК и выживанию клеток, подвергнутых облучению [50]. По-видимому, в определённом геномном контексте ламина В также может препятствовать взаимодействию Rad51 с гетерохроматином, чтобы избежать мутагенной рекомбинации повторов во время репарации или репликации. Предполагается, что активация транскрипции ретротранспозонов может быть причиной клеточного старения, однако существование такой связи пока не доказано. Наши данные позволяют предположить, что эктопическая рекомбинация в гетерохроматине у мутантов по ламину В с нарушенной локализацией белка может провоцировать гибель клеток, которую мы наблюдали с использованием метода TUNEL. Возможно, что при старении и физиологической дестабилизации ламина В происходят подобные процессы, приводящие к апоптозу или митотическому аресту с участием

механизмов ответа на повреждение ДНК (DNA damage response). Интересно, что обычно проводят параллель между ламинопатией, которая вызывает глобальное изменение гетерохроматина, и теломеропатией, которая затрагивает лишь теломеры. Можно предположить, что теломеры являются особо чувствительным районом, реагирующим на изменения функций ламинов. Повышенный уровень рекомбинации, сопровождаемый повреждением ДНК, наблюдается в теломерах как у мутантов *Lam^{A25}*, так и в процессе старения, что может привести к хромосомным сшивкам. Разрывы теломерной ДНК, репликативный стресс и эктопическая рекомбинация теломерных повторов могут быть пусковым механизмом клеточной гибели при ламинопатии и старении. Подобное явление, которое может быть определено как «теломерный чекпойнт», мы наблюдали ранее при исследовании генетических нарушений, вызывающих, кроме прочих клеточных эффектов, дисфункцию теломер у *Drosophila* [25]. В последнем случае наблюдалась митотическая катастрофа и остановка развития за счёт взаимодействия теломерных рибонуклеопротеиновых комплексов с белками клеточного цикла. Дальнейшие исследования помогут прояснить сигнальную роль теломер в механизме клеточной гибели при ламинопатии и старении.

Вклад авторов. А.И. Калмыкова – концепция и руководство работой, написание текста статьи; В.В. Моргунова – проведение экспериментов, статистический анализ; Л.Г. Малаев – проведение экспериментов, подготовка рисунков, редактирование рукописи; О.А. Соколова – проведение экспериментов и редактирование текста статьи; Т.В. Сизова, Д.С. Бабаев, Д.А. Квон – проведение экспериментов.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-14-00006, рук. А.И. Калмыкова).

Благодарности. В работе было использовано оборудование Центра коллективного пользования НИЦ «Курчатовский институт»-ИМГ и геномного центра НИЦ «Курчатовский институт».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wood, J. G., and Helfand, S. L. (2013) Chromatin structure and transposable elements in organismal aging, *Front. Genet.*, **4**, 274, doi: 10.3389/fgene.2013.00274.
2. Burla, R., La Torre, M., and Saggio, I. (2016) Mammalian telomeres and their partnership with lamins, *Nucleus*, **7**, 187-202, doi: 10.1080/19491034.2016.1179409.
3. Amaral, N., Ryu, T., Li, X., and Chiolo, I. (2017) Nuclear dynamics of heterochromatin repair, *Trends Genet.*, **33**, 86-100, doi: 10.1016/j.tig.2016.12.004.
4. Ovsianikova, N. L., Lavrushkina, S. V., Ivanova, A. V., Mazina, L. M., Zhironkina, O. A., and Kireev, I. I. (2021) Lamin A as a determinant of mechanical properties of the cell nucleus in health and disease, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 1288-1300, doi: 10.1134/S0006297921100102.
5. Gonzalo, S. (2014) DNA damage and lamins, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **773**, 377-399, doi: 10.1007/978-1-4899-8032-8_17.
6. Bellanger, A., Madsen-Osterbye, J., Galigniana, N. M., and Collas, P. (2022) Restructuring of lamina-associated domains in senescence and cancer, *Cells*, **11**, 1846, doi: 10.3390/cells11111846.
7. Gonzalez-Suarez, I., Redwood, A. B., and Gonzalo, S. (2009) Loss of A-type lamins and genomic instability, *Cell Cycle*, **8**, 3860-3865, doi: 10.4161/cc.8.23.10092.
8. Camps, J., Erdos, M. R., and Ried, T. (2015) The role of lamin B1 for the maintenance of nuclear structure and function, *Nucleus*, **6**, 8-14, doi: 10.1080/19491034.2014.1003510.
9. Dechat, T., Pflieger, K., Sengupta, K., Shimi, T., Shumaker, D. K., Solimando, L., and Goldman, R. D. (2008) Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin, *Genes Dev.*, **22**, 832-853, doi: 10.1101/gad.1652708.
10. Forsberg, F., Brunet, A., Ali, T. M. L., and Collas, P. (2019) Interplay of lamin A and lamin B LADs on the radial positioning of chromatin, *Nucleus*, **10**, 7-20, doi: 10.1080/19491034.2019.1570810.
11. Ulianov, S. V., Doronin, S. A., Khrameeva, E. E., Kos, P. I., Luzhin, A. V., Starikov, S. S., Galitsyna, A. A., Nenasheva, V. V., Ilyin, A. A., Flyamer, I. M., Mikhailova, E. A., Logacheva, M. D., Gelfand, M. S., Chertovich, A. V., Gavrillov, A. A., Razin, S. V., and Shevelyov, Y. Y. (2019) Nuclear lamina integrity is required for proper spatial organization of chromatin in *Drosophila*, *Nat. Commun.*, **10**, 1176, doi: 10.1038/s41467-019-09185-y.
12. Singh, M., Hunt, C. R., Pandita, R. K., Kumar, R., Yang, C. R., Horikoshi, N., Bachoo, R., Serag, S., Story, M. D., Shay, J. W., Powell, S. N., Gupta, A., Jeffery, J., Pandita, S., Chen, B. P., Deckbar, D., Lobrich, M., Yang, Q., Khanna, K. K., Worman, H. J., et al. (2013) Lamin A/C depletion enhances DNA damage-induced stalled replication fork arrest, *Mol. Cell. Biol.*, **33**, 1210-1222, doi: 10.1128/MCB.01676-12.
13. Graziano, S., Coll-Bonfill, N., Teodoro-Castro, B., Kuppa, S., Jackson, J., Shashkova, E., Mahajan, U., Vindigni, A., Antony, E., and Gonzalo, S. (2021) Lamin A/C recruits ssDNA protective proteins RPA and RAD51 to stalled replication forks to maintain fork stability, *J. Biol. Chem.*, **297**, 101301, doi: 10.1016/j.jbc.2021.101301.
14. Butin-Israeli, V., Adam, S. A., Jain, N., Otte, G. L., Neems, D., Wiesmuller, L., Berger, S. L., and Goldman, R. D. (2015) Role of lamin b1 in chromatin instability, *Mol. Cell. Biol.*, **35**, 884-898, doi: 10.1128/MCB.01145-14.
15. Ikegami, K., Secchia, S., Almakki, O., Lieb, J. D., and Moskowicz, I. P. (2020) Phosphorylated Lamin A/C in the nuclear interior binds active enhancers associated with abnormal Transcription in progeria, *Dev. Cell*, **52**, 699-713, e611, doi: 10.1016/j.devcel.2020.02.011.
16. Huang, S., Risques, R. A., Martin, G. M., Rabinovitch, P. S., and Oshima, J. (2008) Accelerated telomere shortening and replicative senescence in human fibroblasts overexpressing mutant and wild-type lamin A, *Exp. Cell Res.*, **314**, 82-91, doi: 10.1016/j.yexcr.2007.08.004.
17. Sadaie, M., Salama, R., Carroll, T., Tomimatsu, K., Chandra, T., Young, A. R., Narita, M., Perez-Mancera, P. A., Bennett, D. C., Chong, H., Kimura, H., and Narita, M. (2013) Redistribution of the Lamin B1 genomic binding profile affects rearrangement of heterochromatic domains and SAHF formation during senescence, *Genes Dev.*, **27**, 1800-1808, doi: 10.1101/gad.217281.113.
18. Gonzalez-Suarez, I., Redwood, A. B., Perkins, S. M., Vermolen, B., Lichtensztein, D., Grotzky, D. A., Morgado-Palacin, L., Gapud, E. J., Sleckman, B. P., Sullivan, T., Sage, J., Stewart, C. L., Mai, S., and Gonzalo, S. (2009) Novel roles for A-type lamins in telomere biology and the DNA damage response pathway, *EMBO J.*, **28**, 2414-2427, doi: 10.1038/emboj.2009.196.
19. Ghosh, S., and Zhou, Z. (2014) Genetics of aging, progeria and lamin disorders, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **26**, 41-46, doi: 10.1016/j.gde.2014.05.003.
20. Chen, H., Zheng, X., Xiao, D., and Zheng, Y. (2016) Age-associated de-repression of retrotransposons in the *Drosophila* fat body, its potential cause and consequence, *Aging Cell*, **15**, 542-552, doi: 10.1111/ace.12465.
21. Li, W., Prazak, L., Chatterjee, N., Gruninger, S., Krug, L., Theodorou, D., and Dubnau, J. (2013) Activation of transposable elements during aging and neuronal decline in *Drosophila*, *Nat. Neurosci.*, **16**, 529-531, doi: 10.1038/nn.3368.

22. Wood, J. G., Jones, B. C., Jiang, N., Chang, C., Hosier, S., Wickremesinghe, P., Garcia, M., Hartnett, D. A., Burhenn, L., Neretti, N., and Helfand, S. L. (2016) Chromatin-modifying genetic interventions suppress age-associated transposable element activation and extend life span in *Drosophila*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 11277-11282, doi: 10.1073/pnas.1604621113.
23. Osouda, S., Nakamura, Y., de Saint Phalle, B., McConnell, M., Horigome, T., Sugiyama, S., Fisher, P. A., and Furukawa, K. (2005) Null mutants of *Drosophila* B-type lamin Dm(0) show aberrant tissue differentiation rather than obvious nuclear shape distortion or specific defects during cell proliferation, *Dev. Biol.*, **284**, 219-232, doi: 10.1016/j.ydbio.2005.05.022.
24. Morgunova, V., Sukhova, M. M., and Kalmykova, A. (2022) Whole-mount RNA FISH combined with immunofluorescence for the analysis of the telomeric ribonucleoproteins in the *Drosophila* germline, *Methods Mol. Biol.*, **2509**, 157-169, doi: 10.1007/978-1-0716-2380-0_10.
25. Morgunova, V., Kordyukova, M., Mikhaleva, E. A., Butenko, I., Pobeguts, O. V., and Kalmykova, A. (2021) Loss of telomere silencing is accompanied by dysfunction of Polo kinase and centrosomes during *Drosophila* oogenesis and early development, *PLoS One*, **16**, e0258156, doi: 10.1371/journal.pone.0258156.
26. Akulenko, N., Ryazansky, S., Morgunova, V., Komarov, P. A., Olovnikov, I., Vaury, C., Jensen, S., and Kalmykova, A. (2018) Transcriptional and chromatin changes accompanying de novo formation of transgenic piRNA clusters, *RNA*, **24**, 574-584, doi: 10.1261/rna.062851.117.
27. Rusinol, A. E., and Sinensky, M. S. (2006) Farnesylated lamins, progeroid syndromes and farnesyl transferase inhibitors, *J. Cell Sci.*, **119**, 3265-3272, doi: 10.1242/jcs.03156.
28. Bondarenko, S. M., and Sharakhov, I. V. (2020) Reorganization of the nuclear architecture in the *Drosophila melanogaster* Lamin B mutant lacking the CaaX box, *Nucleus*, **11**, 283-298, doi: 10.1080/19491034.2020.1819704.
29. Frost, B., Bardai, F. H., and Feany, M. B. (2016) Lamin dysfunction mediates neurodegeneration in tauopathies, *Curr. Biol.*, **26**, 129-136, doi: 10.1016/j.cub.2015.11.039.
30. Pardue, M. L., and DeBaryshe, P. G. (2003) Retrotransposons provide an evolutionarily robust non-telomerase mechanism to maintain telomeres, *Annu. Rev. Genet.*, **37**, 485-511, doi: 10.1146/annurev.genet.38.072902.093115.
31. Kordyukova, M., Olovnikov, I., and Kalmykova, A. (2018) Transposon control mechanisms in telomere biology, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **49**, 56-62, doi: 10.1016/j.gde.2018.03.002.
32. Radion, E., Morgunova, V., Ryazansky, S., Akulenko, N., Lavrov, S., Abramov, Y., Komarov, P. A., Glukhov, S. I., Olovnikov, I., and Kalmykova, A. (2018) Key role of piRNAs in telomeric chromatin maintenance and telomere nuclear positioning in *Drosophila* germline, *Epigenetics Chromatin*, **11**, 40, doi: 10.1186/s13072-018-0210-4.
33. Dang, W., Steffen, K. K., Perry, R., Dorsey, J. A., Johnson, F. B., Shilatifard, A., Kaeberlein, M., Kennedy, B. K., and Berger, S. L. (2009) Histone H4 lysine 16 acetylation regulates cellular lifespan, *Nature*, **459**, 802-807, doi: 10.1038/nature08085.
34. Wood, J. G., Hillenmeyer, S., Lawrence, C., Chang, C., Hosier, S., Lightfoot, W., Mukherjee, E., Jiang, N., Schorl, C., Brodsky, A. S., Neretti, N., and Helfand, S. L. (2010) Chromatin remodeling in the aging genome of *Drosophila*, *Aging Cell*, **9**, 971-978, doi: 10.1111/j.1474-9726.2010.00624.x.
35. Ivanov, D. K., Escott-Price, V., Ziehm, M., Magwire, M. M., Mackay, T. F., Partridge, L., and Thornton, J. M. (2015) Longevity GWAS using the *Drosophila* genetic reference panel, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **70**, 1470-1478, doi: 10.1093/gerona/glv047.
36. Coffinier, C., Jung, H. J., Nobumori, C., Chang, S., Tu, Y., Barnes, R. H. 2nd, Yoshinaga, Y., de Jong, P. J., Vergnes, L., Reue, K., Fong, L. G., and Young, S. G. (2011) Deficiencies in lamin B1 and lamin B2 cause neurodevelopmental defects and distinct nuclear shape abnormalities in neurons, *Mol. Biol. Cell*, **22**, 4683-4693, doi: 10.1091/mbc.E11-06-0504.
37. Shah, P. P., Donahue, G., Otte, G. L., Capell, B. C., Nelson, D. M., Cao, K., Aggarwala, V., Cruickshanks, H. A., Rai, T. S., McBryan, T., Gregory, B. D., Adams, P. D., and Berger, S. L. (2013) Lamin B1 depletion in senescent cells triggers large-scale changes in gene expression and the chromatin landscape, *Genes Dev.*, **27**, 1787-1799, doi: 10.1101/gad.223834.113.
38. Lin, W. Q., Ngian, Z. K., Koh, T. W., and Ong, C. T. (2022) Altered stability of nuclear lamin-B marks the onset of aging in male *Drosophila*, *PLoS One*, **17**, e0265223, doi: 10.1371/journal.pone.0265223.
39. Chen, H., Zheng, X., and Zheng, Y. (2014) Age-associated loss of lamin-B leads to systemic inflammation and gut hyperplasia, *Cell*, **159**, 829-843, doi: 10.1016/j.cell.2014.10.028.
40. Freund, A., Laberge, R. M., Demaria, M., and Campisi, J. (2012) Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker, *Mol. Biol. Cell*, **23**, 2066-2075, doi: 10.1091/mbc.E11-10-0884.
41. Shimi, T., Butin-Israeli, V., Adam, S. A., Hamanaka, R. B., Goldman, A. E., Lucas, C. A., Shumaker, D. K., Kosak, S. T., Chandel, N. S., and Goldman, R. D. (2011) The role of nuclear lamin B1 in cell proliferation and senescence, *Genes Dev.*, **25**, 2579-2593, doi: 10.1101/gad.179515.111.
42. Dreesen, O., Chojnowski, A., Ong, P. F., Zhao, T. Y., Common, J. E., Lunny, D., Lane, E. B., Lee, S. J., Vardy, L. A., Stewart, C. L., and Colman, A. (2013) Lamin B1 fluctuations have differential effects on

- cellular proliferation and senescence, *J. Cell Biol.*, **200**, 605-617, doi: 10.1083/jcb.201206121.
43. Napolitano, F., Ferrari Bravo, G., Voto, I. A. P., Santin, A., Celora, L., Campaner, E., Dezi, C., Bertossi, A., Valentino, E., Santorsola, M., Rustighi, A., Fajner, V., Maspero, E., Ansaloni, F., Cancila, V., Valenti, C. F., Santo, M., Artimagnella, O. B., Finaurini, S., Gioia, U., et al. (2021) The prolyl-isomerase PIN1 is essential for nuclear Lamin-B structure and function and protects heterochromatin under mechanical stress, *Cell Rep.*, **36**, 109694, doi: 10.1016/j.celrep.2021.109694.
44. Kramara, J., Osia, B., and Malkova, A. (2018) Break-induced replication: the where, the why, and the how, *Trends Genet.*, **34**, 518-531, doi: 10.1016/j.tig.2018.04.002.
45. Tsouroula, K., Furst, A., Rogier, M., Heyer, V., Maglott-Roth, A., Ferrand, A., Reina-San-Martin, B., and Soutoglou, E. (2016) Temporal and spatial uncoupling of DNA double strand break repair pathways within mammalian heterochromatin, *Mol. Cell*, **63**, 293-305, doi: 10.1016/j.molcel.2016.06.002.
46. Merigliano, C., and Chiolo, I. (2021) Multi-scale dynamics of heterochromatin repair, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **71**, 206-215, doi: 10.1016/j.gde.2021.09.007.
47. Chiolo, I., Minoda, A., Colmenares, S. U., Polyzos, A., Costes, S. V., and Karpen, G. H. (2011) Double-strand breaks in heterochromatin move outside of a dynamic HP1a domain to complete recombinational repair, *Cell*, **144**, 732-744, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.012.
48. Ryu, T., Spatola, B., Delabaere, L., Bowlin, K., Hopp, H., Kunitake, R., Karpen, G. H., and Chiolo, I. (2015) Heterochromatic breaks move to the nuclear periphery to continue recombinational repair, *Nat. Cell Biol.*, **17**, 1401-1411, doi: 10.1038/ncb3258.
49. Lambert, M. W. (2019) The functional importance of lamins, actin, myosin, spectrin and the LINC complex in DNA repair, *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, **244**, 1382-1406, doi: 10.1177/1535370219876651.
50. Liu, N. A., Sun, J., Kono, K., Horikoshi, Y., Ikura, T., Tong, X., Haraguchi, T., and Tashiro, S. (2015) Regulation of homologous recombinational repair by lamin B1 in radiation-induced DNA damage, *FASEB J.*, **29**, 2514-2525, doi: 10.1096/fj.14-265546.

LAMIN B DYSFUNCTION AND PHYSIOLOGICAL AGING CAUSE TELOMERE INSTABILITY IN THE *DROSOPHILA* GERMLINE

V. V. Morgunova^{1#}, O. A. Sokolova^{1#}, T. V. Sizova¹, L. G. Malaev^{1,2},
D. S. Babaev^{1,2}, D. A. Kwon³, and A. I. Kalmykova^{1*}

¹ Institute of Molecular Genetics of National Research Centre "Kurchatov Institute",
123182 Moscow, Russia; e-mail: allakalm@img.ras.ru

² Faculty of biotechnology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

³ Kurchatov Center for Genome Research of National Research Centre "Kurchatov Institute",
123182 Moscow, Russia

Chromatin spatial organization in the nucleus is essential for the genome functioning and regulation of gene activity. The nuclear lamina and lamina-associated proteins, lamins, play a key role in this process. Lamin dysfunction leads to the decompaction and transcriptional activation of heterochromatin, which is associated with the premature aging syndrome. In many cell types, telomeres are located at the nuclear periphery, where their replication and stability are ensured by the nuclear lamina. Moreover, diseases associated with defects in lamins and telomeres have similar manifestations and resemble physiological aging. Understanding molecular changes associated with aging at the organismal level is especially important. In this study, we compared the effects caused by the mutation in lamin B and physiological aging in the germline of the model organism *Drosophila melanogaster*. We have shown that the impaired localization of lamin B leads to the heterochromatin decompaction and transcriptional activation of some transposable elements and telomeric repeats. Both DNA damage and activation of homologous recombination in the telomeres were observed in the germ cells of lamin B mutants. The instability of repeat-enriched heterochromatin can be directly related to the genome destabilization, germ cell death, and sterility observed in lamin B mutants. Similar processes were observed in *Drosophila* germline in the course of physiological aging, which indicates a close link between the maintenance of the heterochromatin stability at the nuclear periphery and mechanisms of aging.

Keywords: lamin B, telomeres, aging, germline, heterochromatin, retrotransposons, transcription, recombination, Rad51, γH2Av, *Drosophila*

ГЕН *shuttle craft* ВЛИЯЕТ НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ *Drosophila melanogaster*, КОНТРОЛИРУЯ РАННЕЕ РАЗВИТИЕ И МОДИФИЦИРУЯ ПРОГРАММУ СТАРЕНИЯ

© 2022 А.В. Симоненко¹, Н.В. Рощина^{1,2}, А.В. Кременцова^{1,3},
О.Ю. Рыбина^{1,4}, Е.Г. Пасюкова^{1*}

¹ Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»,
123182 Москва, Россия; электронная почта: egras@rambler.ru

² Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991 Москва, Россия

³ Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН, 119334 Москва, Россия

⁴ ФГБОУ ВО «Московский педагогический государственный университет», 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 12.10.2022

После доработки 08.11.2022

Принята к публикации 22.11.2022

Принципиальные механизмы, лежащие в основе генетического контроля продолжительности жизни, интенсивно изучаются и обсуждаются в связи со все возрастающей важностью продления здоровой жизни человека. Ген *stc* модельного объекта *Drosophila melanogaster* кодирует транскрипционный фактор, гомолог транскрипционного фактора NF- κ B человека, вовлеченный в контроль развития нейронов, а также контроль продолжительности жизни. В данной работе мы демонстрируем, что вызванный РНК-интерференцией нокадаун *stc* в эмбриональных и нервных клетках приводит к изменению продолжительности жизни, причем характер изменения зависит от типа клеток и пола особей. Основываясь на полученных результатах, мы предполагаем, что ген *stc*, участвуя в различных процессах на молекулярном, клеточном и организменном уровне на всех этапах жизни, в результате влияет и на сложный интегральный признак — продолжительность жизни. В то же время мы показываем, что уменьшение экспрессии *stc* в нейронах позволяет смягчить негативное влияние глутамата на продолжительность жизни, возможно, препятствуя развитию глутаматной эксайтотоксичности, модифицируя программу клеточной гибели и предотвращая смерть особей в результате фенотоза.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *Drosophila melanogaster*, продолжительность жизни, старение, подвижность, эмбриональное развитие, нервная система, транскрипционные факторы, глутамат, эксайтотоксичность, фенотоз.

DOI: 10.31857/S0320972522120156, EDN: NHLUJG

ВВЕДЕНИЕ

Уже давно не вызывает сомнений, что несмотря на характерную для большинства количественных признаков достаточно низкую наследуемость (16–30%) [1, 2], продолжительность жизни контролируется геномом. В настоящее время выявлено более 2000 генов, влияющих на продолжительность жизни животных [3]. Показано, что мутации в этих генах могут увеличивать продолжительность жизни на 90, 150 и 46% у *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* и *Mus musculus* соответственно [4]. Известно также, что с возрастом определенным образом изменяется уровень экспрессии генов [5].

Обобщая имеющиеся факты и гипотезы [6], можно предположить, что продолжительность жизни может определяться либо специальной программой, контролируемой генами, либо изменением экспрессии большого числа или даже всех генов в результате постепенного «износа» организма в процессе жизни. Например, была выдвинута [7] и позднее существенно развита [8] гипотеза о существовании запрограммированной смерти организма, фенотоза. Согласно этой гипотезе, существует одна или несколько эволюционно закрепленных генетических программ, позволяющих убирать из популяции старых особей для того, чтобы освободить среду обитания и ресурсы для более молодых. В то же время тот факт, что после смерти организма в течение некоторого времени продолжается экспрессия генов [9], причем

* Адресат для корреспонденции.

экспрессируются те группы генов, активность которых существенно возрастает при старении организма [10, 11], позволяет предположить, что на молекулярном уровне процесс старения имеет сходство с началом разложения, которое происходит после смерти организма, и, следовательно, не может регулироваться какой-либо программой. Различить эти два механизма участия генов в контроле продолжительности жизни не всегда просто.

Ранее, изучая генетический контроль продолжительности жизни у модельного организма *D. melanogaster*, мы показали, что изменение транскрипции генов, кодирующих нейрональные транскрипционные факторы Stc, Escargot и Lim3, на разных этапах развития организма и в разных тканях может по-разному влиять на продолжительность жизни [12–14]. С одной стороны, наши результаты еще раз указывают на вклад транскрипционной регуляции в контроль продолжительности жизни и скорости старения. С другой стороны, свойства Stc позволяют предположить, что он может быть участником одной из программ фенотоза.

Транскрипционный фактор Stc, имеющий в своем составе несколько РНК-, ДНК- и белок-связывающих доменов, кодирует ген *shuttlecraft* (*stc*), который был открыт и описан у дрозофилы около 25 лет тому назад как гомолог фактора транскрипции NF- κ B человека [15]. Экспрессия гена *stc*, имеющего длину около 4,5 тысяч пар оснований, наблюдается в течение всей жизни. Ранее мы показали, что мутация, приводящая к небольшому (в 1,5–2 раза) уменьшению транскрипции гена на поздней эмбриональной стадии, вызывает изменение фенотипа взрослых особей – увеличение продолжительности жизни и замедление скорости старения [12]. Учитывая неординарность этого результата, мы сочли необходимым подтвердить роль эмбриональной транскрипционной регуляции *stc* в контроле продолжительности жизни, используя другую модельную генетическую систему.

Экспрессия Stc в нервной системе эмбрионов необходима для нормального развития мотонейронов и роста аксонов и, как следствие, иннервации мышечных клеток [15]. Поздние эмбрионы с мутацией *stc*, приводящей к исчезновению функционального белка, гибнут в результате нарушения мотонейронов и, как следствие, отсутствия мышечных сокращений, необходимых для вылупления молодой личинки [15]. Известно, что избыток глутамата в синаптических щелях мотонейронов может привести к индукции глутаматной эксайтотоксичности, гибели нервной ткани и фенотозу

[16]. Поскольку Stc играет ключевую роль в формировании и функции мотонейронов [15], а также взаимодействует с сигнальным путем Tor (Target of rapamycin), влияющим на работу мотонейронного глутаматного рецептора mGluR [17], мы предположили, что изменение работы Stc в нейронах может повлиять на индуцированную глутаматом программу гибели, и попытались оценить эту гипотезу экспериментально.

В этой работе мы демонстрируем результаты, показывающие, что вызванный РНК-интерференцией нокдаун *stc* в эмбрионах приводит к увеличению продолжительности жизни. Этот результат, как и полученный ранее [12], свидетельствует о том, что уровень эмбриональной транскрипции гена *stc* влияет на продолжительность жизни взрослых особей. Таким образом, *stc* играет роль как в контроле процесса развития, так и в контроле процесса старения, являясь примером гена, функции которого не ограничены участием в специализированной генетической программе, контролирующей продолжительность жизни. В то же время мы демонстрируем данные, указывающие на то, что уменьшение экспрессии нейронального транскрипционного фактора Stc в нейронах влияет на продолжительность жизни, причем эффект зависит от содержания глутамата в корме мух. Этот факт обсуждается с точки зрения предложенной гипотезы о смягчающем действии нокдауна *stc* на процесс фенотоза, вызванного глутаматной эксайтотоксичностью. В целом, полученные нами данные говорят в пользу сосуществования различных принципов, лежащих в основе генетического контроля продолжительности жизни.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Линии *Drosophila melanogaster*. Линии *w¹¹¹⁸*; *P{GD1543}v47973* (*stc*HD1) и *w¹¹¹⁸*; *P{GD1543}v47974/TM3, Ubx* (*stc*HD2) с трансгенами, локализованными во второй и третьей хромосоме соответственно, использовали для нокдауна гена *stc*, приводящего к уменьшению уровня экспрессии транскрипционного фактора Stc. Исходную линию без трансгенов *w¹¹¹⁸* (*stc*K) использовали в качестве контрольной в соответствии с рекомендацией производителя. Линии были получены из Vienna *Drosophila* Resource Center (VDRC; IDs 47973, 47974, 60000).

Линии *y¹ w¹**; *P{w⁺mW.hs}=en2.4-GAL4}e22c*; *P{w⁺mC}=tGPH}4/TM3, Ser¹* (Эмб1) и *w¹**; *P{w⁺mW.hs}=GawB}337Y* (Эмб2)

использовали для индукции нокдауна гена *stc* на эмбриональной стадии. Линии

$P\{w\{+mW.hs\}=GawB\}elav\{C155\}w\{1118\}$;

$P\{w\{+mC\}=UAS-Dcr-2.D\}2$ (HC1)

и $w\{*\}$; $P\{GAL4-elav.L\}3$ (HC2)

использовали для индукции нокдауна гена *stc* во всех нейронах. Линии были получены из Bloomington *Drosophila* Stock Center (RRID:BDSC_8165, RRID:BDSC_32119, RRID:BDSC_25750, RRID:BDSC_8760).

С помощью методики, описанной ранее [13], во всех линиях проверили присутствие *Wolbachia*, симбионта дрозофилы, способного повлиять на ее продолжительность жизни [18]. Линии, в которых была обнаружена *Wolbachia*, лечили культивированием на корме с тетрациклином (250 мг/литр) в течение трех поколений, а затем реабилитировали на корме без тетрациклина в течение трех поколений перед использованием в экспериментах.

Измерение продолжительности жизни. Девственных самцов и самок собирали в течение дня и помещали в пробирки со стандартной питательной средой (манная крупа, изюм, сахар, дрожжи, агар-агар, нипагин, пропионовая кислота, бензилпенициллин и стрептомицин), по 5 мух каждого пола/генотипа отдельно. Количество мертвых мух в пробирках регистрировали ежедневно; живых мух переносили на свежий корм раз в неделю; все культуры содержали при 25 °С и влажности 60%. В экспериментах для оценки влияния глутамата выборка составила 50 особей на вариант опыта, в остальных случаях – 100 особей на вариант опыта. Глутамат (в форме водного раствора моногидрата глутамата натрия (pharma grade) («Panreac» Германия)) добавляли при заливке остывающего корма до конечных добавленных концентраций 10 мкМ и 10 мМ. Для оценки полученных данных использовали стандартный статистический анализ продолжительности жизни [19, 20]. Для оценки статистической значимости различий между кривыми выживания использовали тест Манна–Уитни, для оценки поздних эффектов – тест Флеминга–Харрингтона. Расчеты выполняли в программе OASIS 2 [21]. Для коррекции на множественность сравнений использовали поправку Бонферрони.

Измерение подвижности. Девственных самцов и самок собирали в течение дня, помещали в пробирки с питательной средой, по 5 мух каждого пола/генотипа отдельно, и далее содержали так же, как в опытах по измерению продолжительности жизни. Спонтанную подвижность измеряли у мух в возрасте 10, 20, 40 и 50 дней в одно и то же время суток в условиях слабого искусственного освещения. Вы-

борка составила 50–100 особей на возраст/пол/генотип. Пробирки диаметром 25 мм, содержащие по 5 девственных мух одного пола/возраста/генотипа, в горизонтальном положении помещали в *Drosophila* Population Monitor («TriKinetics», США). Пересечение мухами трех светодиодных колец, работающих в инфракрасном диапазоне, регистрировали с помощью программы DAMSystem308. Подвижность характеризовали по итогам двух измерений как среднее значение суммы пересечений всех колец в пробирке за 5 мин. Для попарного сравнения средних показателей на пол/возраст/генотип использовали ANOVA (главный фактор – генотип). Для коррекции на множественность сравнений использовали поправку Бонферрони.

Количественная ПЦР в реальном времени. Определение количества мРНК проводили методом количественной ПЦР. Выделение тотальной РНК проводили из партий по 50 голов взрослых самцов с использованием реагента ExtractRNA («Evrogen», Россия); затем обрабатывали ДНКазой I («Sigma-Aldrich», США) и получали кДНК с использованием ревертазы Mint («Evrogen») и праймера oligo(dT)₁₅, согласно инструкциям производителя. Количественную ПЦР проводили с флуоресцентным красителем SYBR Green I в приборе MiniOpticon real-time PCR detection system («Bio-Rad», США).

Для определения количества кДНК *stc* применяли праймеры Stc-rt1 и Stc-rt2. Для нормализации относительной экспрессии между образцами использовали два референсных гена, *gdh* и *adh*, уровень транскрипции которых сравним с *stc*. Для амплификации кДНК референсных генов использовали праймеры (прямой и обратный): Gdh1 и Gdh2 – для *gdh*; Adhd3 и Adhr3 – для *adh* (синтезированы «Evrogen»). Последовательности праймеров представлены в таблице.

Последовательности праймеров, использованных в работе

Название праймера	Последовательность праймеров 5'→3'
Stc-rt1	AACAGGCACAGCAACAACA
Stc-rt2	CCAGGGAGAAGTTAGTGTAG
Gdh1	TATGCCACCGAGCACCAGATTCC
Gdh2	GGATGCCCTTACCTTCTGCTTCTT
Adhd3	CGGCATCTAAGAAGTGATACTCCCAAAA
Adhr3	TGAGTGTGCATCGAATCAGCCTTATT

Анализ данных ПЦР и расчет относительной нормализованной экспрессии *stc* проводили с помощью программы CFX Manager 3.1 («Bio-Rad», 2012). Среднее количество мРНК *stc* на генотип получали на основе 3–5 независимых выделений РНК и трех технических повторностей количественной ПЦР на каждый образец кДНК. Для попарного сравнения средних использовали ANOVA (главный фактор – генотип). Для коррекции на множественность сравнений использовали поправку Бонферрони.

Измерение количества АТР. Количество АТР оценивали, согласно методике Vernace et al. [22], с модификациями. К каркасам взрослых мух (по 4 на опыт) добавляли 100 мкл 2,5%-ной трихлоруксусной кислоты с последующей гомогенизацией на льду и центрифугированием (11 500 g, 10 мин при 4 °С). Уровни АТР определяли в просветленных супернатантах (20 мкл) после нейтрализации образцов добавлением 6 мкл 1 М Tris-HCl (pH 9,5). Затем образцы разводили в соотношении 1 : 500 в воде, не содержащей АТР, и 20 мкл каждого образца смешивали с 80 мкл реагента для анализа АТР из набора Enliten® ATP Assay System («Promega», США). Люминесценцию измеряли с помощью люцинометра Modulus Microplate Luminometer («Turner BioSystems», США). Чтобы нормализовать уровни АТР по концентрации белка, 80 мкл оставшихся лизатов мух нейтрализовали добавлением 24 мкл 1 М Tris-HCl (pH 9,5), и 1 мкл использовали для проведения измерения количества белка по Брэдфорду (реактивы «Bio-Rad»). Для каждого варианта опыта измерения повторяли не менее 4 раз. Для попарного сравнения средних использовали ANOVA (главный фактор – генотип). Для коррекции на множественность сравнений использовали поправку Бонферрони.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для нокдауна гена *stc*, приводящего к уменьшению уровня экспрессии транскрипционного фактора *Stc*, были использованы две линии (*stc*НД1 и *stc*НД2), полученные в VDRC (<https://stockcenter.vdrc.at/control/main>). Каждая из линий содержит одну и ту же трансгенную конструкцию, которая кодирует последовательность, позволяющую синтезировать короткие фрагменты двунизовой РНК, комплементарной гену *stc* и обеспечивающей подавление его экспрессии в результате РНК-интерференции. Согласно данным производителей, обе линии характеризуются хорошей (выше 50%)

эффективностью специфического нокдауна мРНК *stc* и полным отсутствием неспецифических мишеней (<http://www.genomernai.org/v17/reagentdetails/47973>, <http://www.genomernai.org/v17/reagentdetails/47974>). Линии различаются только местом встройки трансгена в геном исходной линии без трансгенов, которую мы использовали в качестве контрольной (*stc*K).

Эмбриональная экспрессия *stc* определяет продолжительность жизни взрослых особей. Ранее мы показали, что мутация гена *shuttle craft* (*stc*), уменьшающая его экспрессию на эмбриональной стадии, увеличивает продолжительность жизни самок дрозофилы [12]. Чтобы подтвердить или опровергнуть этот результат, мы проанализировали влияние на продолжительность жизни нокдауна *stc* в эмбрионах. Для получения особей с нокдауном гена использовали индукционную систему GAL4-UAS [23]. Самцы контрольной линии (*stc*K) и каждой из двух линий с трансгенами, содержащими конструкции, обуславливающие подавление экспрессии *stc* по механизму РНК-интерференции (*stc*НД1 и *stc*НД2), были скрещены с самками каждой из двух линий с трансгенами, способными индуцировать экспрессию конструкций в клетках эмбриона (Эмб1 и Эмб2). Продолжительность жизни была измерена у девственных самцов и самок с нокдауном *stc* и самцов и самок контрольного генотипа, полученных в потомстве от этих скрещиваний.

Нокдаун *stc* в эмбрионах увеличил среднюю продолжительность жизни самцов в пяти проанализированных вариантах опыта из шести (рис. 1, *a*, *b* и *d*; табл. S1 в Приложении, тест Манна–Уитни). В одном случае незначительный сдвиг кривой выживания вправо по сравнению с контрольной кривой не означал достоверного увеличения средней продолжительности жизни (рис. 1, *a*; *stc*НД2). Кривые выживания во всех 6 случаях отклоняются от контрольных вправо в позднем возрасте, причем достоверность отличий подтверждается тестом Флеминга–Харрингтона (табл. S1 в Приложении). Это может свидетельствовать о том, что, помимо общего влияния на продолжительность жизни, эмбриональный нокдаун *stc* специфически снижает риск смерти от факторов, играющих роль в пожилом возрасте. В целом полученные результаты, основанные на анализе двух разных линий с трансгенными конструкциями, обеспечивающими нокдаун *stc*, и двух разных линий, индуцирующих экспрессию трансгенных конструкций в эмбрионе, достаточно надежно свидетельствуют о том, что снижение экспрессии *stc* на эмбриональной стадии удлиняет жизнь самцов.

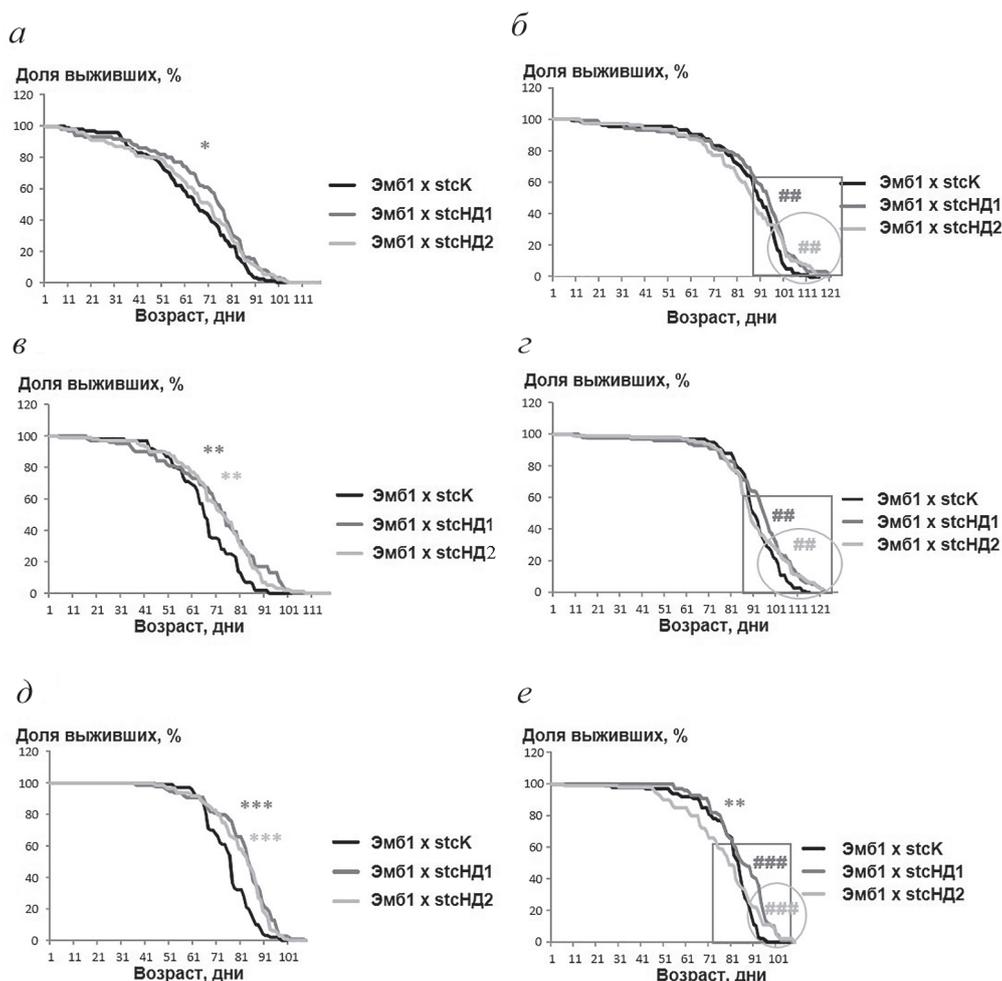


Рис. 1. Влияние эмбрионального нокдауна гена *stc* на продолжительность жизни самцов (а, в и д) и самок (б, з и е) *D. melanogaster*. Описание генотипов см. в разделе «Материалы и методы». Достоверность отличия от контрольного генотипа, тест Манна–Уитни: * $p < 0,025$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$ (попарные сравнения выполнены с учетом поправки Бонферрони). Прямоугольниками и овалами выделены области, в которых продолжительность жизни отличается у самок контрольного генотипа и самок с нокдауном *stc* (stcНД1 и stcНД2 соответственно); тест Флеминга–Харрингтона для поздних отличий: # $p < 0,025$; ## $p < 0,005$; ### $p < 0,0005$ (попарные сравнения выполнены с учетом поправки Бонферрони). Темно-серые и светло-серые звездочки и решетки – сравнение stcНД1 и stcНД2 соответственно с stcK.

Нокдаун *stc* в эмбрионах не привел к изменению средней продолжительности жизни самок в пяти проанализированных вариантах опыта из шести (рис. 1, б, з и е; табл. S1 в Приложении, тест Манна–Уитни). Однако на рис. 1 видно, что кривые выживания во всех 6 случаях отклоняются от контрольных вправо в позднем возрасте, причем достоверность отличий подтверждается тестом Флеминга–Харрингтона (табл. S1 в Приложении). Таким образом, снижение экспрессии *stc* на эмбриональной стадии увеличивает максимальную продолжительность жизни самок.

В более ранней нашей работе [12] мы показали, что мутация в гене *stc*, которая снижает экспрессию гена только на эмбриональной стадии, приводит к увеличению продолжительности жизни девственных самок, но не

меняет продолжительности жизни самцов. Пытаясь воспроизвести этот результат с помощью нокдауна *stc* в эмбрионах, мы обнаружили противоположный эффект – уменьшение экспрессии *stc* затронуло преимущественно продолжительность жизни самцов. Такая разница может объясняться как степенью подавления экспрессии гена, так и не выявленной нами разницей в тонких особенностях тканеспецифичности подавления его экспрессии. Действительно, с одной стороны, изменение количества транскрипта *stc* в результате мутации в регуляторной области гена было проверено в нескольких, но не во всех тканях. С другой стороны, специфичность использованных в данной работе линий, индуцирующих экспрессию в эмбрионах, также может быть охарактеризована не полностью. Тем не менее

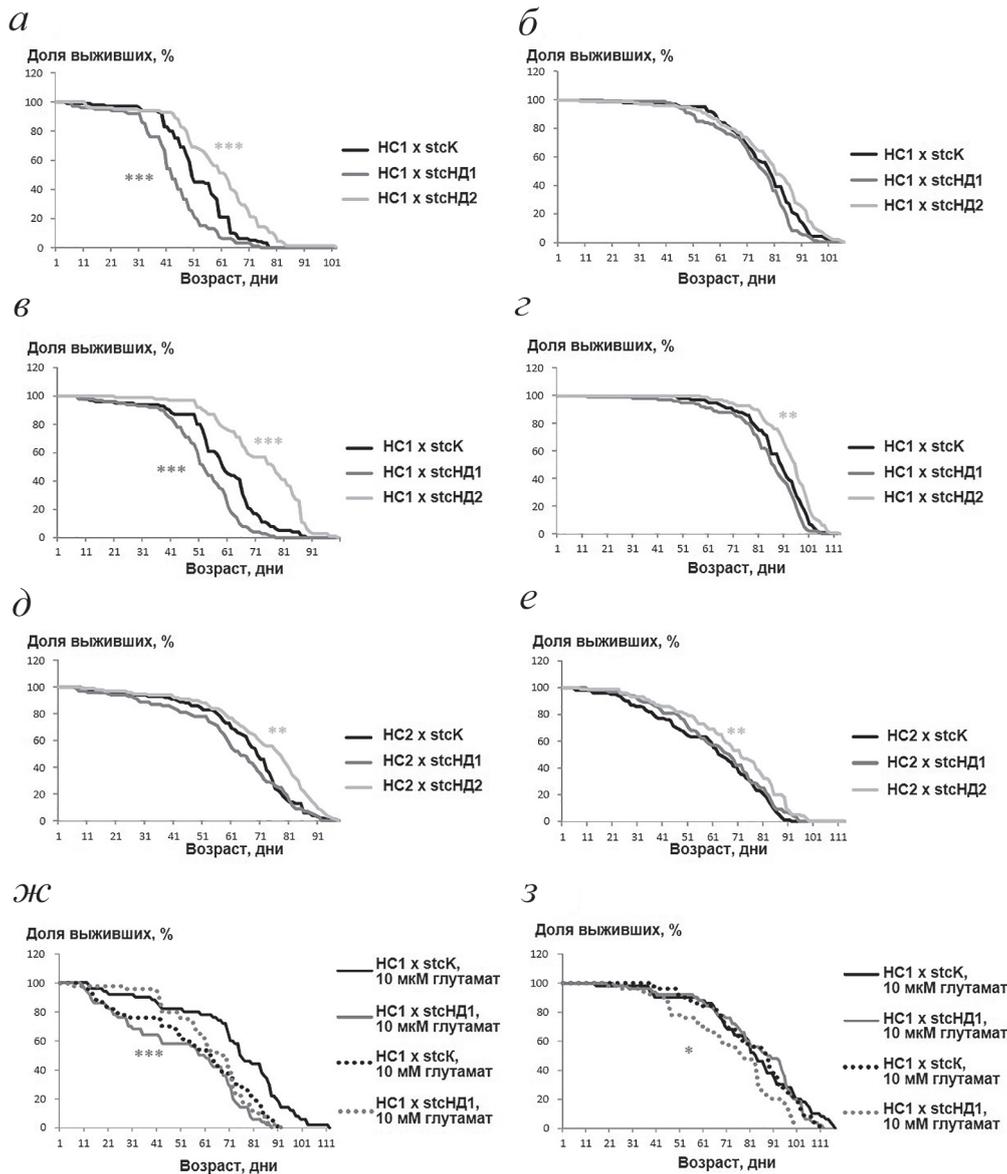


Рис. 2. Влияние нейронального нокдауна гена *stc* на продолжительность жизни самцов (а, в, д и ж) и самок (б, г, е и з) *D. melanogaster* в нормальных условиях (а–е) и при добавлении в корм глутамата (ж и з). Описание генотипов см. в разделе «Материалы и методы». Достоверность отличия от контрольного генотипа, тест Манна–Уитни: а, в, д и ж – * $p < 0,025$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$ (парные сравнения выполнены с учетом поправки Бонферрони); ж, з – * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Темно-серые и светло-серые звездочки – сравнение stcHD1 и stcHD2 соответственно с stcK

не вызывает сомнений, что экспрессия *stc* и в том, и в другом случае изменена главным образом или исключительно в клетках эмбриона, и это изменение приводит к увеличению продолжительности жизни.

Такой вывод позволяет говорить о весьма интересном принципе, лежащем в основе генетического контроля продолжительности жизни: изменение экспрессии гена в раннем возрасте может влиять на продолжительность жизни взрослых особей. Мы предполагаем, что такое влияние может быть связано с тем, что благодаря эпигенетическому наследованию

в ряду клеточных поколений у взрослых особей сохраняется уровень экспрессии мишеней транскрипционного фактора, заданный на эмбриональной стадии. Еще одна причина может заключаться в том, что у взрослых особей сохраняются структурно-функциональные особенности в первую очередь нервной системы, которые были заложены в раннем развитии. Какое бы объяснение ни оказалось верным, скорее всего, в данном случае участие генов в контроле продолжительности жизни не связано с реализацией какой-либо специфической для процесса старения генетической программы.

Нейрональная экспрессия *stc* влияет на продолжительность жизни. Учитывая, что у дрозофилы *Stc* был описан как нейрональный транскрипционный фактор [24], мы проанализировали влияние на продолжительность жизни нокдауна *stc* в нейронах. Самцы контрольной линии (*stcK*) и каждой из двух линий с трансгенами, содержащими конструкции, обуславливающие подавление экспрессии *stc* по механизму РНК-интерференции (*stcНД1* и *stcНД2*), были скрещены с самками каждой из двух линий с трансгенами, способными индуцировать экспрессию конструкций в нервных клетках (НС1 и НС2). Продолжительность жизни была измерена у девственных самцов и самок с нокдауном *stc* и самцов и самок контрольного генотипа, полученных в потомстве от этих скрещиваний.

Нокдаун *stc* в нейронах, вызванный трансгеном, локализованным в линии *stcНД1*, уменьшил среднюю продолжительность жизни самцов в двух проанализированных вариантах опыта из трех (рис. 2; табл. S1 в Приложении, тест Манна–Уитни). В третьем случае незначительный сдвиг кривой выживания влево по сравнению с контрольной кривой не означал достоверного уменьшения средней продолжительности жизни (рис. 1, д; *stcНД1*). Тем не менее в целом эти результаты позволяют говорить об уменьшении продолжительности жизни самцов с нокдауном *stc*, вызванным трансгеном, присутствующем в линии *stcНД1*. У самок продолжительность жизни не изменилась (рис. 2, б, г и е; табл. S1 в Приложении, тест Манна–Уитни).

Нокдаун *stc* в нейронах, вызванный трансгеном, локализованным в линии *stcНД2*, увеличил среднюю продолжительность жизни самцов во всех трех проанализированных вариантах опыта (рис. 2, а, в и д; табл. S1 в Приложении, тест Манна–Уитни) и самок в двух из трех проанализированных вариантов опыта (рис. 2, г и е; табл. S1 в Приложении, тест Манна–Уитни), в то время как в варианте третьего опыта небольшое визуальное увеличение не достигло уровня достоверности (рис. 2, б; табл. S1 в Приложении, тест Манна–Уитни). В целом эти результаты позволяют говорить об увеличении продолжительности жизни самцов и самок с нокдауном *stc*, вызванным трансгеном, присутствующим в линии *stcНД2*.

Учитывая, что исследуемые трансгены были активированы в нейронах, мы проверили, повлияет ли нокдаун *stc* на работу нервной системы, используя в качестве интегрального признака, характеризующего функциональный статус нервной системы, спонтанную

подвижность мух. Оказалось, что нокдаун *stc* в нейронах, вызванный трансгеном, локализованным в линии *stcНД1*, увеличил подвижность самцов в возрасте 40 и 50 дней по сравнению с контрольными самцами (рис. 3, а; табл. S2 в Приложении). Таким образом, снижение подвижности с возрастом у таких самцов идет медленнее, чем у контрольных, и можно предположить, что ресурсы нервной системы у них расходуются медленнее, что сохраняет большую ее пластичность в хронологически позднем возрасте. Этот результат находится в хорошем соответствии с предположением о том, что уменьшение экспрессии *stc* в нервной системе эмбрионов способствует сохранению ресурса функционирования нейромышечных синапсов в позднем возрасте [25]. При этом нокдаун *stc* в нейронах, вызванный трансгеном, локализованным в линии *stcНД1*, не повлиял на количество АТФ в стенке тела (каркасе) самцов, где расположена основная масса мотонейронов (рис. 3, в; табл. S2 в Приложении), следовательно, изменение их подвижности не связано с изменением энергетического статуса. Молекулярные и клеточные основы увеличения подвижности у самцов с нокдауном *stc* требуют дальнейшего изучения. У самок с нокдауном *stc* в нейронах, вызванным трансгеном, локализованным в линии *stcНД1*, подвижность, как и продолжительность жизни, не изменилась (рис. 3, б и в; табл. S2 в Приложении), в связи с чем количество АТФ у них не измеряли.

Нокдаун *stc* в нейронах, вызванный трансгеном, локализованным в линии *stcНД2*, увеличил подвижность самцов в возрасте 40 и 50 дней (рис. 3, а; табл. S1 в Приложении), а также подвижность самок в возрасте 20, 40 и 50 дней (рис. 3, б; табл. S2 в Приложении). Если рассматривать подвижность как индикатор скорости старения [26], то этот результат хорошо соответствует увеличению продолжительности жизни, вызванному нокдауном *stc* у самцов и самок рассматриваемого генотипа. У самцов увеличение подвижности в этом случае было сопряжено также с увеличением уровня энергетического обмена (рис. 3, в; табл. S2 в Приложении).

В отличие от эмбрионального нокдауна, нейрональный нокдаун, вызванный разными трансгенами, по-разному повлиял на продолжительность жизни. Различным оказалось и влияние на подвижность мух, характеризующую эффективность работы нервной системы, и количество АТФ, характеризующее уровень энергетического обмена. Полученные результаты заставили задуматься о том, чем обусловлена специфика влияния активации двух разных

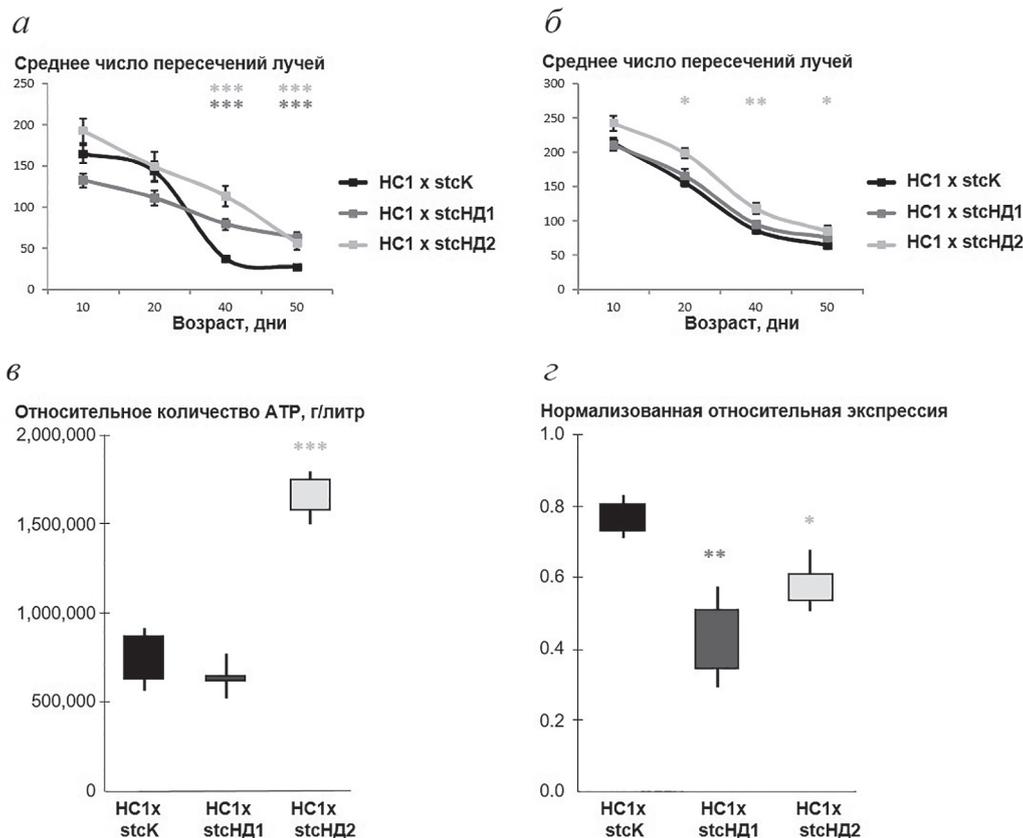


Рис. 3. Влияние нейронального нокдауна гена *stc* на подвижность самцов (а) и самок (б) *D. melanogaster*; количество АТР в каркасах самцов (в) и количество транскрипта *stc* в головах самцов (г). Описание генотипов см. в разделе «Материалы и методы». Достоверность отличия от контрольного генотипа, ANOVA: * $p < 0,025$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$ (парные сравнения выполнены с учетом поправки Бонферрони). Темно-серые и светло-серые звездочки – сравнение *stcHD1* и *stcHD2* соответственно с *stcK*

трансгенов в нейронах на эти признаки. Прежде всего, мы проверили, действительно ли активация обоих трансгенов приводит к уменьшению количества транскрипта гена *stc* в головах мух (самцов), где находится основная масса нервной ткани, и подтвердили, что это так, используя метод количественной обратной ПЦР (рис. 3, г; табл. S2 в Приложении). Следовательно, наблюдаемые различия вызваны не отсутствием эффекта нокдауна *stc* у особей с тем или иным трансгеном, содержащим конструкцию, обуславливающую подавление экспрессии *stc* по механизму РНК-интерференции, а другими причинами. Согласно информации производителя (<https://stockcenter.vdrc.at/control/main>), структура трансгенов идентична в использованных в работе линиях, однако линии отличаются местом встройки трансгена в геном, которое неизвестно. Известно, однако, что в линии *stcHD2* встройка летальна в гомозиготном состоянии, поэтому можно предположить, что именно в этой линии встройка трансгена в неизвестный район генома изменила работу какого-то важного гена. Это изменение вместе с изменением экспрессии гена *stc* могло по-

влиять на продолжительность жизни и другие признаки. По-видимому, этот гипотетический ген важен в нервной системе, но не участвует в эмбриогенезе, поэтому его эффект проявился только в нейронах. Возможно, он участвует в контроле энергетического обмена, и изменение его работы в результате встройки трансгена приводит к увеличению количества АТР и, как следствие, улучшению подвижности. Таким образом, фенотипические эффекты встройки трансгена в линии *stcHD2*, скорее всего, обусловлены суммарным влиянием уменьшения экспрессии *stc* и летальной инсерции в гетерозиготном состоянии. Было бы интересно в дальнейшем выяснить природу этой инсерции, поскольку вызванное ей изменение положительно сказывается на продолжительности жизни. О влиянии же самого нокдауна *stc* на продолжительность жизни мы можем судить, используя линию *stcHD1*.

Связь между изменением экспрессии *stc*, продолжительности жизни и свойств нервной системы имеет неоднозначный характер. Представленные в этой статье данные свидетельствуют о том, что как уменьшение, так и

увеличение продолжительности жизни может сопровождаться улучшением функционального статуса нервной системы в старости. Более того, результаты, представленные в этой статье и более ранней нашей работе [25], показывают, что уменьшение экспрессии гена *stc* может приводить как к уменьшению продолжительности жизни, сопряженному с улучшением интегрального функционального статуса нервной системы в старости, так и к увеличению продолжительности жизни, сопряженному со снижением активности синапсов в раннем возрасте, и вследствие этого к возможному сохранению ресурса их пластичности в процессе старения мух. Действительно, в последнее время появляются факты, указывающие на существование ассоциации между функциональным статусом синапсов и сохранением их пластичности, а также связи свойств синапсов с продолжительностью жизни. Так, было показано, что у мух с мутацией *sleepless*, увеличивающей синаптическую активность, снижен ресурс пластичности синапсов [27], уменьшена продолжительность жизни и увеличена скорость старения [28]. У *C. elegans* возбуждение нейронов увеличивается с возрастом, а ингибирование возбуждения во всех или только в глутаматергических или холинергических нейронах увеличивает продолжительность жизни. У человека и других млекопитающих в процессе старения также нарастает синаптическая активность и возбудимость, в частности, в глутаматергических нейронах, а когорты долгожителей на молекулярном уровне характеризуются значимым снижением экспрессии генов, связанных с синаптической активностью. Показано, что такой фенотип часто опосредуется изменением активности нейронального транскрипционного фактора REST (Repressor Element 1 Silencing Transcription factor) и его гомологов [29]. У дрозофилы отсутствуют прямые гомологи этого белка [30], также ее геном не обогащен последовательностями-мишенями, связанными с этой системой регуляции (http://bioinformatics.leeds.ac.uk/group/online/RE1db/re1db_home.htm), однако наиболее вероятным функциональным аналогом REST считается сплайсированная форма нейронального транскрипционного фактора *Chn*. Этот белок, преимущественно, локализуется в аксонах [31] и участвует в общих комплексах с *Ada2b*, вероятным партнером *Stc* [32]. Это позволяет предположить, что у дрозофилы *Stc* участвует в процессах, функционально гомологичных процессам ассоциированного снижения синаптической активности и увеличения продолжительности жизни, опосредо-

ванными нейрональным транскрипционным фактором REST и его гомологами. Связь *Stc* с регуляцией синаптической активности в мотонейронах и контролем продолжительности жизни навела нас на мысль о возможном участии этого транскрипционного фактора в программе феноптоза, индуцированного избытком глутамата.

Влияние нейрональной экспрессии *stc* на продолжительность жизни зависит от содержания глутамата в пище. Один из механизмов феноптоза связан с индукцией глутаматной эксайтотоксичности – процесса гибели нервной ткани, индуцируемого избытком глутамата, накапливающегося в процессе старения организма или выбрасываемого нейронами и глиальными клетками в ответ на различные сигналы: возрастные и нейродегенеративные заболевания, ишемию, травму. Если организм не способен, используя физиологические механизмы, снизить концентрацию глутамата в синаптических щелях, запускается цепная реакция, вызывающая его гибель [33].

Учитывая, что нейрональный транскрипционный фактор *Stc* действует в мотонейронах, контролируя рост их аксонов и формирование и функцию синапсов [15], гибель мух, связанная с глутаматной эксайтотоксичностью, вызвана в первую очередь нарастающим синаптическим возбуждением именно в мотонейронах [16], а уменьшение экспрессии *Stc* приводит к снижению активности синапсов [25], мы предположили, что нокаунт *stc* может смягчить эксайтотоксичность, вызванную избытком глутамата.

Для проверки этого предположения мы попытались спровоцировать эксайтотоксическую реакцию дрозофилы путем добавления избыточных концентраций глутамата в корм. Для добавления в корм были использованы растворы глутамата в более низкой и более высокой концентрации. Известно, что глутамат в концентрации 10 мкМ вызывает эксайтотоксический ответ у особей с генетически обусловленными нарушениями синаптической функции [34], а глутамат в добавленной концентрации 10 мМ вызывает изменение продолжительности жизни мух дикого типа [35]. В то же время в деталях эффекты алиментарного глутамата, выявленные разными авторами, отличаются, и по-видимому, зависят от базового содержания глутамата в исходных компонентах используемого корма [36]. Отметим, что конечная концентрация глутамата в корме, использованном в наших экспериментах, нам не известна. Для представленной в этой работе грубой оценки влияния глутамата на



Рис. 4. Гипотетический механизм влияния сниженной экспрессии гена *stc* на глутаматную эксайтотоксичность, приводящую к феноптозу. Схематическое описание глутаматной эксайтотоксичности основано на данных статьи Belov et al. [33]

продолжительность жизни мух со сниженной экспрессией гена *stc* мы использовали особей с нокдауном *stc* в нейронах, вызванным трансгеном, локализованным в линии *stc*ND1.

Добавление в корм глутамата в низкой концентрации (10 мкМ) не привело к изменению соотношения между продолжительностью жизни самцов и самок контрольного генотипа и самцов и самок с уменьшенной экспрессией *stc*. Как и на стандартном корме, продолжительность жизни самцов с нокдауном *stc* уменьшилась, а продолжительность жизни самок не изменилась по сравнению с контрольной (рис. 2, *ж* и *з*; табл. S1 в Приложении, тест Манна–Уитни).

Продолжительность жизни самцов контрольного генотипа, живших на корме с высокой добавленной концентрацией глутамата (10 мМ), оказалась ожидаемо более низкой, чем у самцов контрольного генотипа, живших на корме с добавлением глутамата в низкой концентрации (10 мкМ), что, предположительно,

можно объяснить развитием глутаматной эксайтотоксичности. Однако, с точки зрения проверяемого нами предположения, важно, как добавление в корм глутамата в высокой концентрации изменило соотношение между продолжительностью жизни самцов и самок контрольного генотипа и самцов и самок с уменьшенной экспрессией *stc*.

Оказалось, что в условиях избытка глутамата самцы с уменьшенной экспрессией *stc* живут не хуже самцов контрольного генотипа, поскольку различие между продолжительностью жизни тех и других недостоверно (рис. 2, *ж*; табл. S1 в Приложении, тест Манна–Уитни). Таким образом, у самцов уменьшение экспрессии *stc* в нервной системе может смягчать негативное влияние глутамата на продолжительность жизни. Возможно, этот эффект означает, что уменьшение экспрессии *stc* в нервной системе препятствует развитию глутаматной эксайтотоксичности и способно предотвратить гибель особей в результате феноптоза (рис. 4).

В этом случае исследуемый нами ген *stc* не является участником программы клеточной гибели, однако способен взаимодействовать с ней, модифицируя ее работу.

Продолжительность жизни самок контрольного генотипа, живших на корме с добавлением глутамата в высокой концентрации (10 мМ), не изменилась по сравнению с продолжительностью жизни самок контрольного генотипа, живших на корме с добавлением глутамата в низкой концентрации (10 мкМ). Таким образом, глутамат в концентрации 10 мМ не оказал негативного действия на продолжительность жизни самок с нормальным уровнем экспрессии *stc*, что, предположительно, можно объяснить отсутствием глутаматной эксайтотоксичности. Примечательно, что самки с нокаутом *stc* в нейронах на корме с добавлением глутамата в высокой концентрации (10 мМ) стали жить хуже самок контрольного генотипа. Поскольку у самок контрольного генотипа глутамат в концентрации 10 мМ, по всей видимости, не вызвал эксайтотоксичности, интерпретация данных о снижении продолжительности жизни самок с уменьшенной экспрессией *stc* в этих условиях представляется затруднительной. В целом изучение действия глутамата на продолжительность жизни в зависимости от уровня экспрессии транскрипционного фактора *Stc* в нервной системе представляется весьма интересным и заслуживает продолжения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наши исследования показывают, что ген *stc*, кодирующий транскрипционный фактор РНК-полимеразы II, участвует в контроле продолжительности жизни. Однако нам представляется, что этот ген не является участником какой-либо специальной генетической программы, связанной с регуляцией длительности жизни. Характер влияния *stc* на продолжительность жизни достаточно сложен, поскольку изменение работы гена на разных стадиях развития, в разных типах клеток, у особей разного пола изменяет ее по-разному. Мы предполагаем,

что, участвуя в многочисленных молекулярных и клеточных процессах, выполняя многообразные функции и определяя развитие и особенности работы организма на всех этапах жизни, ген в результате влияет и на один из наиболее интегральных признаков — продолжительность жизни. В то же время полученные нами данные позволяют предположить, что ген *stc* может модифицировать специальные программы клеточной гибели, в частности, феноптоз, вызванный глутаматной эксайтотоксичностью. В совокупности результаты нашей работы свидетельствуют о сосуществовании различных принципов, лежащих в основе участия генов в контроле продолжительности жизни.

Вклад авторов. Симоненко А.В., Пасюкова Е.Г. — концепция работы; Симоненко А.В., Рощина Н.В., Рыбина О.Ю. — проведение экспериментов; Симоненко А.В., Рощина Н.В., Кременцова А.В., Рыбина О.Ю., Пасюкова Е.Г. — анализ данных и обсуждение результатов исследования; Симоненко А.В., Рыбина О.Ю., Пасюкова Е.Г. — написание текста; Рощина Н.В., Кременцова А.В. — редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа была поддержана государственным заданием НИЦ «Курчатовский институт» — ИМГ, регистрационный № 121030200227.

Благодарности. Авторы выражают благодарность Пороховнику Л.Н., обратившему их внимание на возможную роль глутамата в модуляции эффектов исследуемого гена. Авторы признательны Bloomington *Drosophila* Stock Center (США, <https://bdsc.indiana.edu/index.html>) и Vienna *Drosophila* Resource Center (Австрия, <https://stockcenter.vdrc.at/control/main>) за многолетнее содействие нашим исследованиям.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Finch, C. E., and Tanzi, R. E. (1997) Genetics of aging, *Science*, **278**, 407-411, doi: 10.1126/science.278.5337.407.
2. Melzer, D., Pilling, L. C., and Ferrucci, L. (2020) The genetics of human ageing, *Nat. Rev. Genet.*, **21**, 88-101, doi: 10.1038/s41576-019-0183-6.
3. Tacutu, R., Thornton, D., Johnson, E., Budovsky, A., Barardo, D., Craig, T., Diana, E., Lehmann, G., Toren, D., Wang, J., Fraifeld, V. E., and de Magalhaes, J. P. (2018) Human Ageing Genomic Resources: new and updated databases, *Nucleic Acids Res.*, **46**, D1083-D1090, doi: 10.1093/nar/gkx1042.

4. Bunu, G., Toren, D., Ion, C. F., Barardo, D., Sarghie, L., Grigore, L. G., de Magalhaes, J. P., Fraifeld, V. E., and Tacutu, R. (2020) SynergyAge, a curated database for synergistic and antagonistic interactions of longevity-associated genes, *Sci. Data*, **7**, 366, doi: 10.1038/s41597-020-00710-z.
5. The Tabula Muris Consortium (2020) A single-cell transcriptomic atlas characterizes ageing tissues in the mouse, *Nature*, **583**, 590-595, doi: 10.1038/s41586-020-2496-1.
6. Kowald, A., and Kirkwood, T. B. L. (2016) Can aging be programmed? A critical literature review, *Ageing Cell*, **15**, 986-998, doi: 10.1111/accel.12510.
7. Weismann, A. (1889) Essays upon heredity and kindred biological problems, *Science*, **ns-14**, 237-238, doi: 10.1126/science.ns-14.348.237.b.
8. Skulachev, M. V., and Skulachev, V. P. (2018) in *Apoptosis and Beyond: The Many Ways Cells Die* (Radosевич, J., ed) Wiley, Hoboken, N. J., pp. 237-288.
9. Pozhitkov, A. E., Neme, R., Domazet-Loso, T., Leroux, B. G., Soni, S., Tautz, D., and Noble, P. A. (2017) Tracing the dynamics of gene transcripts after organismal death, *Open Biol.*, **7**, 160267, doi: 10.1098/rsob.160267.
10. Edwards, M. G., Anderson, R. M., Yuan, M., Kendzierski, C. M., Weindruch, R., and Prolla, T. A. (2007) Gene expression profiling of aging reveals activation of a p53-mediated transcriptional program, *BMC Genomics*, **8**, 80, doi: 10.1186/1471-2164-8-80.
11. Isildak, U., Somel, M., Thornton, J. M., and Donertas, H. M. (2020) Temporal changes in the gene expression heterogeneity during brain development and aging, *Sci. Rep.*, **10**, 4080, doi: 10.1038/s41598-020-60998-0.
12. Roshina, N. V., Symonenko, A. V., Kremntsova, A. V., Trostnikov, M. V., and Pasyukova, E. G. (2014) Embryonic expression of shuttle craft, a *Drosophila* gene involved in neuron development, is associated with adult lifespan, *Ageing (Albany NY)*, **6**, 1076-1093, doi: 10.18632/aging.100712.
13. Symonenko, A. V., Roshina, N. V., Kremntsova, A. V., and Pasyukova, E. G. (2018) Reduced neuronal transcription of escargot, the *drosophila* gene encoding a snail-type transcription factor, promotes longevity, *Front. Genet.*, **9**, 151, doi: 10.3389/fgene.2018.00151.
14. Rybina, O. Y., Schelkunov, M. I., Veselkina, E. R., Sarantseva, S. V., Kremntsova, A. V., Vysokikh, M. Y., Melentev, P. A., Volodina, M. A., and Pasyukova, E. G. (2019) Knockdown of the neuronal gene *Lim3* at the early stages of development affects mitochondrial function and lifespan in *Drosophila*, *Mech. Ageing Dev.*, **181**, 29-41, doi: 10.1016/j.mad.2019.111121.
15. Stroumbakis, N. D., Li, Z., and Tolia, P. P. (1996) A homolog of human transcription factor NF-X1 encoded by the *Drosophila* shuttle craft gene is required in the embryonic central nervous system, *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 192-201, doi: 10.1128/MCB.16.1.192.
16. Peng, J. J., Lin, S. H., Liu, Y. T., Lin, H. C., Li, T. N., and Yao, C. K. (2019) A circuit-dependent ROS feedback loop mediates glutamate excitotoxicity to sculpt the *Drosophila* motor system, *Elife*, **8**, e47372, doi: 10.7554/eLife.47372.
17. Schrott, G. M., Nigh, E. A., Chen, W. G., Hu, L., and Greenberg, M. E. (2004) BDNF regulates the translation of a select group of mRNAs by a mammalian target of rapamycin-phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway during neuronal development, *J. Neurosci.*, **24**, 7366-7377, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1739-04.2004.
18. McGraw, E. A., and O'Neill, S. L. (2004) *Wolbachia pipiensis*: intracellular infection and pathogenesis in *Drosophila*, *Curr. Opin. Microbiol.*, **7**, 67-70, doi: 10.1016/j.mib.2003.12.003.
19. Wilmoth, J. R., and Horiuchi, S. (1999) Rectangularization revisited: variability of age at death within human populations, *Demography*, **4**, 475-495, doi: 10.2307/2648085.
20. Carey, J. R. (2003) *Longevity: The Biology and Demography of Life Span*, Princeton University Press, Princeton.
21. Han, S. K., Lee, D., Lee, H., Kim, D., Son, H. G., Yang, J. S., Lee, S. V., and Kim, S. (2016) OASIS 2: online application for survival analysis 2 with features for the analysis of maximal lifespan and healthspan in aging research, *Oncotarget*, **7**, 56147-56152, doi: 10.18632/oncotarget.11269.
22. Vernace, V. A., Arnaud, L., Schmidt-Glenewinkel, T., and Figueiredo-Pereira, M. E. (2007) Aging perturbs 26S proteasome assembly in *Drosophila melanogaster*, *FASEB J.*, **21**, 2672-2682, doi: 10.1096/fj.06-6751com.
23. Brand, A. H., and Perrimon, N. (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes, *Development*, **118**, 401-415, doi: 10.1242/dev.118.2.401.
24. Tolia, P. P., and Stroumbakis, N. D. (1998) The *Drosophila* zygotic lethal gene shuttle craft is required maternally for proper embryonic development, *Dev. Genes Evol.*, **208**, 274-282, doi: 10.1007/s004270050182.
25. Симоненко А. В., Рощина Н. В., Кременцова А. В., Пасюкова Е. Г. (2020) Структурно-функциональная изменчивость нейрональных генов в природных популяциях определяет продолжительность жизни дрозофилы в *Дрозофила в генетике и медицине*, НИЦ «Курчатовский институт», ПИЯФ, Гатчина, стр. 94.
26. Jones, M. A., and Grotewiel, M. (2011) *Drosophila* as a model for age-related impairment in locomotor and other behaviors, *Exp. Gerontol.*, **46**, 320-325, doi: 10.1016/j.exger.2010.08.012.
27. Huang, S., Piao, C., Beuschel, C. B., Gotz, T., and Sigrist, S. J. (2020) Presynaptic active zone plasticity encodes sleep need in *Drosophila*, *Curr. Biol.*, **30**, 1077-1091 e1075, doi: 10.1016/j.cub.2020.01.019.
28. Bushey, D., Hughes, K. A., Tononi, G., and Cirelli, C. (2010) Sleep, aging, and lifespan in *Drosophila*, *BMC Neurosci.*, **11**, 56, doi: 10.1186/1471-2202-11-56.

29. Zullo, J. M., Drake, D., Aron, L., O'Hern, P., Dhamne, S. C., Davidsohn, N., Mao, C. A., Klein, W. H., Rotenberg, A., Bennett, D. A., Church, G. M., Colaiacovo, M. P., and Yankner, B. A. (2019) Regulation of lifespan by neural excitation and REST, *Nature*, **574**, 359-364, doi: 10.1038/s41586-019-1647-8.
30. Bruce, A. W., Donaldson, I. J., Wood, I. C., Yerbury, S. A., Sadowski, M. I., Chapman, M., Gottgens, B., and Buckley, N. J. (2004) Genome-wide analysis of repressor element 1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencing factor (REST/NRSF) target genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 10458-10463, doi: 10.1073/pnas.0401827101.
31. Yamasaki, Y., Lim, Y. M., Minami, R., and Tsuda, L. (2021) A splicing variant of Charlatan, a *Drosophila* REST-like molecule, preferentially localizes to axons, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **578**, 35-41, doi: 10.1016/j.bbrc.2021.09.002.
32. Gramates, L. S., Agapite, J., Attrill, H., Calvi, B. R., Crosby, M. A., Dos Santos, G., Goodman, J. L., Goutte-Gattat, D., Jenkins, V. K., Kaufman, T., Larkin, A., Matthews, B. B., Millburn, G., Strelets, V. B., and the FlyBase Consortium (2022) Fly Base: a guided tour of highlighted features, *Genetics*, **220**, iyac035, doi: 10.1093/genetics/iyac035.
33. Belov, K. D., Kriska, J., Tureckova, J., and Anderova, M. (2020) Ischemia-triggered glutamate excitotoxicity from the perspective of glial cells, *Front. Cell Neurosci.*, **14**, 51, doi: 10.3389/fncel.2020.00051.
34. Chang, S., Bray, S. M., Li, Z., Zarnescu, D. C., He, C., Jin, P., and Warren, S. T. (2008) Identification of small molecules rescuing fragile X syndrome phenotypes in *Drosophila*, *Nat. Chem. Biol.*, **4**, 256-263, doi: 10.1038/nchembio.78.
35. Zhou, X., Escala, W., Papapetropoulos, S., and Zhai, R. G. (2010) β -N-methylamino-L-alanine induces neurological deficits and shortened life span in *Drosophila*, *Toxins (Basel)*, **2**, 2663-2679, doi: 10.3390/toxins2112663.
36. Kasozi, K. I., Namubiru, S., Kiconco, O., Kinyi, H. W., Ssempijja, F., Ezeonwumelu, J. O. C., Ninsiima, H. I., and Okpanachi, A. O. (2018) Low concentrations of monosodium glutamate (MSG) are safe in male *Drosophila melanogaster*, *BMC Res. Notes*, **11**, 670, doi: 10.1186/s13104-018-3775-x.

THE GENE *shuttle craft* AFFECTS THE LIFESPAN OF *Drosophila melanogaster* BY CONTROLLING EARLY DEVELOPMENT AND MODIFYING THE AGING PROGRAM

A. V. Symonenko¹, N. V. Roshuna^{1,2}, A. V. Kremontsova^{1,3},
O. Y. Rybina^{1,4}, and E. G. Pasyukova^{1*}

¹ Institute of Molecular Genetics, National Research Center "Kurchatov Institute",
123182 Moscow, Russia; E-mail: egpas@rambler.ru

² Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Russian Academy of Sciences,
119991 Moscow, Russia

³ Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia

⁴ FSBEU HE "Moscow Pedagogical State University", 119991 Moscow, Russia

The fundamental mechanisms underlying the genetic control of lifespan are intensively studied and discussed due to the increasing importance of extending healthy human life. The *sts* gene of the model object *Drosophila melanogaster* encodes a transcription factor, a homologue of the human transcription factor NF-X1, involved in the regulation of neuronal development and other processes, as well as in the control of lifespan. In this work, we demonstrate that *stc* knockdown in embryonic and nerve cells leads to changes in lifespan, with the nature of the change depending on the cell type and sex of individuals. Based on our results, we suggest that the *stc* gene, being involved in the regulation of transcription throughout life, as a result also affects a complex integral trait — lifespan. At the same time, we show that reduction of *stc* expression in neurons can alleviate the negative effect of glutamate on longevity, possibly preventing the development of glutamate excitotoxicity, thus modifying the cell death program and preventing death of individuals due to phenoptosis.

Keywords: *Drosophila melanogaster*, lifespan, aging, locomotion, embryonic development, nervous system, transcription factors, glutamate, excitotoxicity, phenoptosis

ИСТОРИЧЕСКИЕ ТРЕНДЫ ВИДОВОЙ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ ЧЕЛОВЕКА И АКТУАРНОЙ СКОРОСТИ СТАРЕНИЯ*

© 2022 Л.А. Гаврилов^{1,2**}, Н.С. Гаврилова^{1,2}

¹Academic Research Centers, NORC at the University of Chicago, 60637 Chicago, IL, USA; e-mail: lagavril@yahoo.com

²Институт демографических исследований, ФНИСЦ РАН, 109028 Москва, Россия

Поступила в редакцию 02.11.2022

После доработки 16.11.2022

Принята к публикации 16.11.2022

В работе был проведён анализ компенсационного эффекта смертности (КЭС) с использованием данных о повозрастной смертности из Human Mortality Database (HMD). Были получены оценки видовой продолжительности жизни человека, которые оказались близки к оценкам, опубликованным ранее. Три модели (Гомперца–Мейкема, Гомперца–Мейкема с центрированным возрастом и Гомперца) дали схожие оценки видовой продолжительности жизни. Эти оценки продемонстрировали некоторое увеличение со временем. Попытки измерить скорость старения с помощью углового коэффициента регрессии в модели Гомперца привели к выводу, что актуарная скорость старения оставалась стабильной в течение большей части XX века, но недавно продемонстрировала рост в большинстве (74%) изученных популяций. Это недавнее явление, скорее всего, вызвано более быстрым историческим снижением смертности в более молодых возрастах по сравнению со старшими возрастными группами, что делает возрастной градиент смертности более крутым с течением времени. Нет никаких биомедицинских оснований полагать, что скорость старения человека увеличилась в последнее время. Из этого следует, что актуарная скорость старения, вероятно, не является хорошим показателем истинной скорости старения (скорости потери функции). Поэтому необходимо разработать более точные методы оценки скорости старения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: старение, смертность, модель Гомперца–Мейкема, видовая продолжительность жизни, скорость старения.

DOI: 10.31857/S0320972522120168, **EDN:** NIFSPX

ВВЕДЕНИЕ

Для того чтобы понять фундаментальные основы биологии старения и разработать реальные антивозрастные вмешательства, важно сначала выяснить, какова наилучшая оценка скорости старения человека, а также факторы, её определяющие. Скорость старения часто оценивают как угловой коэффициент регрессии в модели Гомперца (в полулогарифмических координатах), описывающей экспоненциальное увеличение смертности с возрастом (также известный как наклон Гомперца или Gompertz slope). Этот подход интуитивно привлекателен, поскольку гипотетические нестаряющиеся популяции имеют угловой коэффициент наклона, равный нулю, и поскольку

угловой коэффициент характеризует скорость увеличения смертности с возрастом.

Однако предыдущие предварительные исследования показали, что угловой коэффициент наклона не является идеальной мерой скорости старения как по практическим, так и по теоретическим причинам. Например, использование углового коэффициента наклона в качестве меры скорости старения приводит к контринтуитивному выводу, что женщины стареют быстрее мужчин, несмотря на более низкий уровень смертности и более высокую продолжительность жизни («парадокс мужской и женской скорости старения») [1]. Кроме того, надёжная теория старения показывает, что угловой коэффициент наклона определяется не только скоростью потери функции

Принятые сокращения: КЭС – компенсационный эффект смертности; HMD – Human Mortality Database.

* Комментарий к статье будет опубликован в журнале «Биохимия», выпуск 1 2023 г.

** Адресат для корреспонденции.

с возрастом («истинная скорость старения»), но и начальным уровнем резервирования (начальная резервная ёмкость) [1, 2]. Скорость старения на основе параметра наклона Гомперца часто называют актуарной скоростью старения, чтобы отличить её от истинной скорости старения, связанной с потерей функции [3]. Таким образом, существует необходимость в разработке более точных и адекватных оценок скорости старения.

Цель данной статьи – изучить изменения актуарной скорости старения за последнее время в человеческих популяциях. Значения актуарной скорости старения различны в разных популяциях и устроены таким образом, что более низкая начальная смертность компенсируется её более быстрым ростом с возрастом. Это означает, что высокая смертность в неблагоприятных популяциях (в пределах данного вида) компенсируется низкой актуарной скоростью старения (более длительным периодом удвоения смертности). В результате такой компенсации относительные различия в уровнях смертности имеют тенденцию уменьшаться с возрастом в пределах данного биологического вида [1]. В данном исследовании мы более подробно анализируем компенсационный эффект смертности (КЭС), уделяя особое внимание количественным показателям этого явления, таким как видовая продолжительность жизни [1].

Корреляция Стрелера–Милдвана. В 1960 г. американские исследователи Бернард Л. Стрелер и Альберт С. Милдван опубликовали статью под названием «Общая теория смертности и старения» в ведущем научном журнале *Science* [4]. В этой статье они описали обратную зависимость между параметрами закона Гомперца:

$$\mu_x = A + R_0 \exp(\alpha x), \quad (1)$$

где μ_x – интенсивность смертности в возрасте x , а A , R_0 и α – параметры.

Стрелер и Милдван, пренебрегая параметром Мейкема (A) уравнения (1), обнаружили, что в тех странах, где значения предэкспоненциального множителя (обозначаемого как R_0) были высокими, значения экспоненциального индекса (α) уменьшались. Впоследствии это наблюдение стало известно как корреляция Стрелера–Милдвана, и оно приобрело статус фундаментального закона, описывающего выживаемость организмов.

Легко заметить, что это явление, если оно действительно существует, имеет большое значение для определения видоспецифических

характеристик продолжительности жизни. Действительно, параметры корреляции Стрелера–Милдвана, связывающие величины R_0 и α , будут видоспецифическими инвариантами вследствие самого принципа, используемого для их расчёта. Гаврилов и Гаврилова подвергли сомнению подход Стрелера–Милдвана и показали, что изменения параметра Мейкема (A) от 0 до 0,01 в год достаточно для получения ложной корреляции Стрелера–Милдвана [1]. Сравнение этой ложной корреляции с корреляцией, опубликованной Стрелером и Милдваном (1960), показало очень хорошее совпадение между этими двумя корреляциями. Попытки использовать корреляцию Стрелера и Милдвана при построении математических моделей старения могут привести к абсурдным результатам. Действительно, из данных, приведённых в статье Стрелера и Милдвана (1960), следует, что угловой коэффициент наклона линейной регрессии $\ln R_0$ по α составляет всего 68,5 лет. Однако, согласно «Общей теории смертности и старения» Стрелера и Милдвана (1960), эта величина должна соответствовать возрасту, в котором так называемая жизнеспособность, «способность индивидуального организма оставаться живым» (стр. 15), становится равной нулю. На нелепость этих результатов, полученных из корреляции Стрелера и Милдвана, указывалось неоднократно [5, 6].

Компенсационный эффект смертности. Позже Гаврилов и Гаврилова попытались усовершенствовать подход, применённый Стрелером и Милдваном, и учесть параметр Мейкема (A). В ходе этого исследования был обнаружен так называемый компенсационный эффект смертности [1]. Оказалось, что в пределах данного биологического вида значения смертности, зависящей от возраста (слагаемое Гомперца в уравнении Гомперца–Мейкема), коррелируют таким образом, что при экстраполяции сходятся в одной точке. КЭС означает схождение кривых смертности, когда более высокие значения параметра наклона (в функции Гомперца) компенсируются более низкими значениями параметра пересечения R_0 в различных популяциях данного биологического вида [1, 7]. КЭС может быть количественно оценен с помощью обратной линейной зависимости параметров Гомперца в уравнении Гомперца–Мейкема:

$$\ln R_0 = \ln M - B\alpha. \quad (2)$$

Координата, соответствующая возрасту, в котором пересекаются все траектории смертности (B), была названа видовой продолжи-

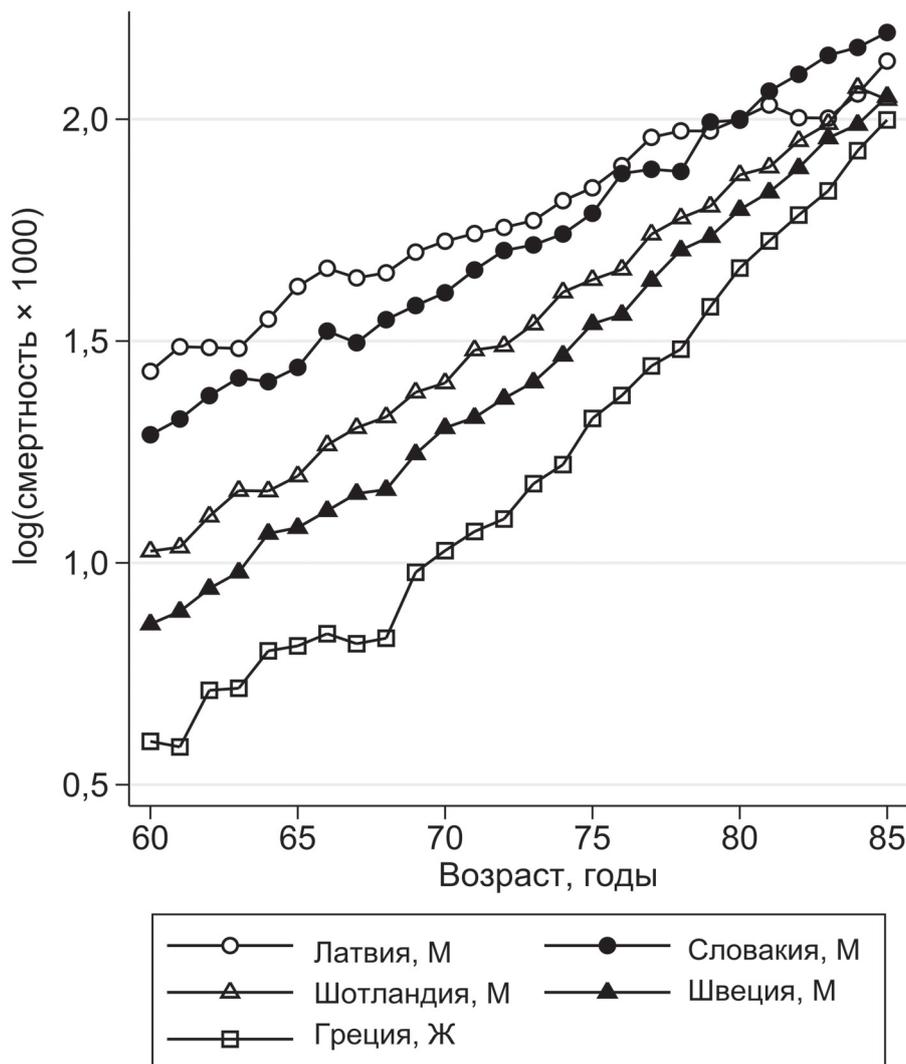


Рис. 1. Сближение траекторий смертности в пожилом возрасте для пяти европейских популяций в 2010 г., иллюстрирующее компенсационный эффект смертности для мужчин (М) и женщин (Ж)

тельностью жизни [1]. Установлено, что для человека её значение равно 95 ± 2 годам [1]. Следует отметить, что компенсационный эффект смертности можно наблюдать при простом визуальном сравнении траекторий смертности без расчёта параметров Гомперца (см. рис. 1). Кроме того, КЭС можно наблюдать не только у человека, но и у некоторых других биологических видов [1, 7].

Обобщая эти ранние исследования по данной теме, необходимо отметить, что они были проведены давно, и с тех пор было выполнено не так много новых эмпирических исследований КЭС или корреляции Стрелера–Милдвана. Большинство исследований по данной теме посвящены теоретическим разработкам теории старения Стрелера–Милдвана [8–11]. В нескольких эмпирических исследованиях на эту тему не учитывался параметр Мейкема, что приводило к ложной корреляции между оцен-

ками параметра Гомперца [3, 12]. Этот подход уже подвергался критике со стороны некоторых исследователей [13]. В двух публикациях представлены графики обратной корреляции между параметрами Гомперца с использованием данных из базы Human Mortality Database (HMD) [14, 15], но не делается никаких попыток оценить количественные показатели КЭС.

Одна из задач данного исследования – провести широкомасштабное эмпирическое изучение корреляции между параметрами Гомперца с учётом параметра Мейкема (также известного как фоновая смертность [1, 16]) и проверить компенсационный эффект смертности, используя современные данные. Особое внимание было уделено количественным показателям КЭС и исторической эволюции видовой продолжительности жизни. Также рассмотрены возможные факторы, которые могут вызвать ложную зависимость между параметрами

Гомперца [7]. Bongaarts показал, что в современных популяциях фоновая смертность (параметр Мейкема) действительно не зависит от возраста, и её значения близки к нулю [16]. По этой причине мы предполагаем, что в случае современных популяций учёт параметра Мейкема не так важен, как это было в прошлом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Одной из целей данного исследования было проверить компенсационный эффект смертности, обнаруженный в более ранних работах [1, 17], используя современные данные. Для обеспечения преемственности результатов компенсационный эффект смертности проверялся с использованием поперечных или текущих данных о смертности, как это было сделано в предыдущих исследованиях на ту же тему [1, 4, 14, 17]. Поперечные данные о смертности позволяют исследователям анализировать информацию за более длительные исторические периоды и широко используются демографами в исследованиях параметрических моделей смертности, включая модель Гомперца [16, 18–20].

Методы. На первом этапе анализа были рассчитаны параметры R_0 и α модели Гомперца–Мейкема (уравнение 1). Параметры модели Гомперца–Мейкема оценивали методом нелинейной регрессии в возрастном интервале 30–80 лет (процедура `nlm` в пакете Stata, версия 14), как это было предложено ранее [18]. Пороговое значение 30 лет было выбрано для того, чтобы избежать избытка внешних смертей в более молодом возрасте. Некоторые исследователи используют логистическую модель с параметром Мейкема для изучения исторических изменений смертности, чтобы учесть замедление смертности после 85-летнего возраста [16, 18]. В нашем исследовании мы анализируем смертность в возрасте до 85 лет, поэтому применение моделей Гомперца или Гомперца–Мейкема вместо логистической является обоснованным.

Параметры оценивались для следующих трёх моделей:

1. Традиционная модель Гомперца–Мейкема.
2. Модель Гомперца–Мейкема с центрированным возрастом ($x - 60$).
3. Модель Гомперца, использованная Стрелером–Милдваном.

Модель №2 основана на традиционных статистических подходах использования центрированных переменных для уменьшения

коллинеарности [21, 22]. Этот подход уменьшает коллинеарность, но не устраняет её полностью [22]. Было показано, что подгонка по методу наименьших квадратов часто приводит к проблеме оптимизации, которая чрезвычайно чувствительна к выборочным ошибкам [23]. Наилучшая подгонка для параметров Гомперца в этом случае оказывается реализованной формой корреляции Стрелера–Милдвана [23]. Свойство регрессионной модели заключается в том, что она всегда проходит через средние значения x и y . В результате статистическая вариация минимальна при центрированных значениях x . Таким образом, чтобы уменьшить проблему ложной корреляции между параметрами Гомперца, мы оцениваем параметры уравнения Гомперца–Мейкема, используя возраст, центрированный на 60 лет (примерно середина возрастного интервала для оценки параметров).

Наконец, модель №3 – это модель Гомперца, использованная Стрелером и Милдваном (1960) [4]. Эта модель используется для демонстрации величины смещения, вызванного игнорированием параметра Мейкема. Мы предполагаем, что оценки параметров для этой модели будут схожи с оценками для моделей с параметром Мейкема, учитывая почти нулевую фоновую смертность в современных популяциях [16, 18].

Для каждой модели была оценена линейная регрессия между параметрами Гомперца ($\ln R_0$ и α) в форме, представленной в уравнении 2. Таким образом, была оценена видовая продолжительность жизни (параметр наклона, B) и свободный член ($\ln M$).

При исследовании недавних исторических изменений актуарной скорости старения параметры модели Гомперца–Мейкема оценивались для каждой популяции (страны) методом нелинейной регрессии в возрастном интервале 60–85 лет. Оценки смертности, полученные для однолетних возрастных интервалов, демонстрируют значительный статистический разброс и более стабильны в старших возрастах (см. рис. 1). Поэтому возрастным интервалом 60–85 лет был выбран для получения более стабильных оценок параметров Гомперца–Мейкема и избежания колебаний смертности в более молодых возрастах, характерных для современных популяций с низкой смертностью. Для изучения исторических изменений актуарной скорости старения параметры оценивались для традиционной модели Гомперца–Мейкема.

Данные. В качестве источника данных о смертности для данного исследования использовалась база данных HMD (www.mortality.org).

Эта база данных содержит данные о смертности для 45 стран с достаточно хорошим качеством демографической статистики. В целом, мы использовали повозрастные коэффициенты смертности для 3662 популяций, доступных в НМД, охватывающие периоды с 1900 по 2014 г. Изучение исторических изменений актуарной скорости старения было сосредоточено на последних тенденциях после 2000 г. В базе данных имеются показатели смертности мужчин и женщин для возрастов от 0 до 110 лет и старше. Данные о повозрастной смертности доступны с шагом в один год по возрасту и времени, обозначаемые как M_x , где x означает один год возраста. Смерти в возрасте 110 лет и старше объединены вместе.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Компенсационный эффект смертности. В таблице 1 приведены количественные характеристики КЭС, полученные с использованием данных НМД. Оценки видовой продолжительности жизни на основе традиционной модели Гомперца–Мейкема и данных НМД ($83,4 \pm 0,6$) оказались ниже, по сравнению с ранее опубликованными оценками (95 ± 2 года) [1].

Оценки видовой продолжительности жизни, основанные на модели Гомперца, дают более высокие значения: $89,4 \pm 0,6$ года. Эти значения находятся ближе к оценкам, опубликованным ранее [1].

В модели с центрированной переменной возраста наблюдается значительное снижение значений коэффициента корреляции между оценками параметров Гомперца (см. таблицу 1). Сила связи между параметрами Гомперца может быть выражена путём возведения коэффициента корреляции в квадрат и умножения на 100. После центрирования возраста процент объясняемой дисперсии снизился с 86,5% ($r = -0,93$) до 32,5% ($r = -0,57$) при учёте статистической корреляции между оценками параметров. Таким образом, 54% вариации может быть объяснено статистической ложной корреляцией между параметрами Гомперца. Тем не менее корреляция между оценками параметров Гомперца не исчезает полностью после процедуры центрирования, и видовые оценки продолжительности жизни остаются такими же, как и в случае модели Гомперца–Мейкема (см. таблицу 1).

Как и ожидалось, модель Гомперца даёт оценки видовой продолжительности жизни, близкие к оценкам, полученным с помощью

Таблица 1. Характеристики компенсационного эффекта смертности, основанные на трёх моделях

Популяция	Коэффициенты регрессии*		Коэффициент корреляции между $\ln R_0$ и α	Число популяций
	$\ln M \pm \sigma$	$B \pm \sigma$, годы		
Стандартная модель Гомперца–Мейкема				
Мужчины	$-1,76 \pm 0,03$	$84,62 \pm 0,37$	$-0,9665$	3662
Женщины	$-1,50 \pm 0,06$	$89,01 \pm 0,50$	$-0,9473$	3662
Оба пола	$-2,04 \pm 0,06$	$83,44 \pm 0,56$	$-0,9264$	3662
Модель Гомперца–Мейкема с возрастом, центрированным на 60 лет				
Мужчины	$-1,76 \pm 0,03$	$24,62 \pm 0,37$	$-0,7383$	3662
Женщины	$-1,50 \pm 0,06$	$29,01 \pm 0,50$	$-0,6941$	3662
Оба пола	$-2,04 \pm 0,06$	$23,44 \pm 0,56$	$-0,5685$	3662
Модель Гомперца				
Мужчины	$-1,31 \pm 0,04$	$89,80 \pm 0,45$	$-0,9571$	3662
Женщины	$-1,18 \pm 0,06$	$92,60 \pm 0,56$	$-0,9400$	3662
Оба пола	$-1,49 \pm 0,06$	$89,42 \pm 0,63$	$-0,9209$	3662

Примечание. * Расчёты параметров регрессии проводились в интервале 30–80 лет.

модели Гомперца–Мейкема, когда используются современные данные с низкой фоновой смертностью (см. таблицу 1).

Оценки R_0 и α (особенно α), полученные в пределах одной страны в разные моменты времени, часто очень стабильны в истории [1, 18, 24]. В результате обратная корреляция между $\ln R_0$ и α сильно зависит от точности оценки параметра Гомперца для каждого отдельного года времени. По этой причине мы провели дополнительный анализ данных (см. таблицу 2) и оценили параметры обратной зависимости между параметрами Гомперца для следующих отдельных календарных лет: 1925, 1955, 1985 и 2010. Таким образом, были проанализированы изменения в оценках параметров обратной зависимости, происходящие во времени. Этот анализ показал увеличение оценок видовой продолжительности жизни с течением времени: с 73 ± 7 лет в 1925 г. до 90 ± 3 лет в 2010 г. (модель Гомперца–Мейкема). Аналогичные результаты были получены и для других ис-

следованных моделей. Единственное различие наблюдалось для модели Гомперца–Мейкема и модели Гомперца в 1925 г. Фоновая смертность (слагаемое Мейкема) в 1925 г. была относительно высокой для всех стран, поэтому её игнорирование в случае модели Гомперца должно было привести к появлению ложной корреляции Стрелера–Милдвана. Действительно, видовая продолжительность жизни, полученная с помощью модели Гомперца (64 ± 7 лет), была ниже по сравнению с оценкой, полученной с помощью модели Гомперца–Мейкема (73 ± 7 лет). Оценка видовой продолжительности жизни для модели Гомперца близка к оценке, полученной Стрелером и Милдваном (68,5 лет) [4]. Оценки видовой продолжительности жизни, полученные для более позднего периода времени (2010 г.), близки к оценкам, опубликованным ранее [1]. Оценки видовой продолжительности жизни могут зависеть не только от исторического периода, но и от возрастного интервала оценки параметров.

Таблица 2. Характеристики компенсационного эффекта смертности, основанные на трёх моделях, в зависимости от календарного периода

Год	Коэффициенты регрессии*		Коэффициент корреляции между $\ln R_0$ и α	Число популяций
	$\ln M \pm \sigma$	$B \pm \sigma$, годы		
Модель Гомперца–Мейкема				
1925	$-2,73 \pm 0,72$	$73,08 \pm 7,22$	$-0,9222$	20
1955	$-2,09 \pm 0,25$	$81,02 \pm 2,47$	$-0,9867$	31
1985	$-2,30 \pm 0,28$	$81,31 \pm 2,82$	$-0,9751$	45
2010	$-1,87 \pm 0,26$	$90,40 \pm 2,53$	$-0,9840$	44
Модель Гомперца–Мейкема с возрастом, центрированным на 60 лет				
1925	$-2,73 \pm 0,72$	$13,08 \pm 7,22$	$-0,3927$	20
1955	$-2,09 \pm 0,25$	$21,02 \pm 2,47$	$-0,8446$	31
1985	$-2,30 \pm 0,28$	$21,31 \pm 2,82$	$-0,7553$	45
2010	$-1,87 \pm 0,26$	$30,40 \pm 2,53$	$-0,8802$	44
Модель Гомперца				
1925	$-3,46 \pm 0,63$	$64,15 \pm 6,97$	$-0,9082$	20
1955	$-2,10 \pm 0,27$	$80,89 \pm 2,78$	$-0,9833$	31
1985	$-2,02 \pm 0,34$	$84,22 \pm 3,51$	$-0,9647$	45
2010	$-1,84 \pm 0,27$	$91,37 \pm 2,73$	$-0,9818$	44

Примечание. * Расчёты параметров регрессии проводились в интервале 30–80 лет (оба пола вместе).

Таблица 3. Характеристики компенсационного эффекта смертности, основанные на стандартной модели Гомперца–Мейкема*

Популяция	Коэффициенты регрессии		Коэффициент корреляции между $\ln R_0$ и α	Число популяций
	$\ln M \pm \sigma$	$B \pm \sigma$, годы		
Интервал для расчёта параметров: 30–80 лет				
Мужчины	$-1,76 \pm 0,03$	$84,62 \pm 0,37$	$-0,9665$	3662
Женщины	$-1,50 \pm 0,06$	$89,01 \pm 0,50$	$-0,9473$	3662
Интервал для расчёта параметров: 60–85 лет				
Мужчины	$-1,06 \pm 0,02$	$92,13 \pm 0,21$	$-0,9909$	3601
Женщины	$-0,62 \pm 0,06$	$97,17 \pm 0,17$	$-0,9944$	3601

Примечание. * Расчёты параметров регрессии проводились в интервале 30–80 лет (верхняя панель) и 60–85 лет (нижняя панель).

Показатели смертности в более молодом возрасте подвержены значительным колебаниям и искажениям экспоненциального роста смертности. Оценки смертности в возрастном интервале 60–85 лет выглядят более гладкими и лучше следуют стандартному экспоненциальному росту с возрастом, чем в более молодом возрасте, когда смертность крайне низка. В таблице 3 представлены оценки видовой продолжительности жизни при оценке параметров Гомперца–Мейкема с использованием различных возрастных интервалов. Можно заметить, что оценка параметров в возрастном интервале 60–85 лет даёт более высокие значения видовой продолжительности жизни.

В целом, мы можем заключить, что оценки видовой продолжительности жизни, основанные на современных данных, демонстрируют хорошее соответствие с более ранней публикацией [1]. Это означает, что количественные показатели КЭС для человека достаточно стабильны. В современных популяциях фоновая смертность очень низка [1, 16, 18], поэтому для количественной оценки КЭС можно использовать модель Гомперца без параметра Мейкема.

Исторические изменения актуарной скорости старения. Мы проанализировали по-возрастные коэффициенты смертности за 1900–2014 гг., используя поперечные данные. При работе с данными стало ясно, что оценки смертности в возрасте до 60 лет имеют очень большой разброс и не являются стабильными. По этой причине параметры модели Гомперца–Мейкема оценивались в возрастном интервале 60–85 лет. С помощью этих оценок мы пересчитали параметры компенсационного эффекта смертности (см. таблицу 3). Отме-

тим, что оценки видовой продолжительности жизни с использованием вновь рассчитанных параметров модели Гомперца–Мейкема ближе к значению видовой продолжительности жизни, полученному ранее (95 ± 3 года) [1]. Эти результаты ещё раз подтверждают существование компенсационного эффекта смертности и стабильность его количественных характеристик.

Наличие исторических данных по актуарной скорости старения дало возможность изучить тенденции актуарной скорости старения в разных странах. Наши предыдущие исследования показали, что значения актуарной скорости старения относительно стабильны во времени, по крайней мере, до 1960-х гг. [1, 24]. Исследования Bongaarts подтвердили этот первоначальный вывод [16, 18]. При использовании более длинных временных рядов стало ясно, что значения актуарной скорости старения имеют более сложные траектории после 1960-х гг. На рис. 2 и 3 показаны исторические тренды актуарной скорости старения в Финляндии и Норвегии. Эти результаты подтверждают стабильность значений актуарной скорости старения до 1970-х гг., в то время как после этого времени значения актуарной скорости старения начали расти в соответствии с более сложными траекториями.

Принимая во внимание эти сложные временные траектории актуарной скорости старения, мы проанализировали самые последние её тенденции после 2000 г. Для каждой страны была оценена линейная регрессия актуарной скорости старения (параметра наклона Гомперца) как функции времени, чтобы оценить общую тенденцию для актуарной скорости старения.

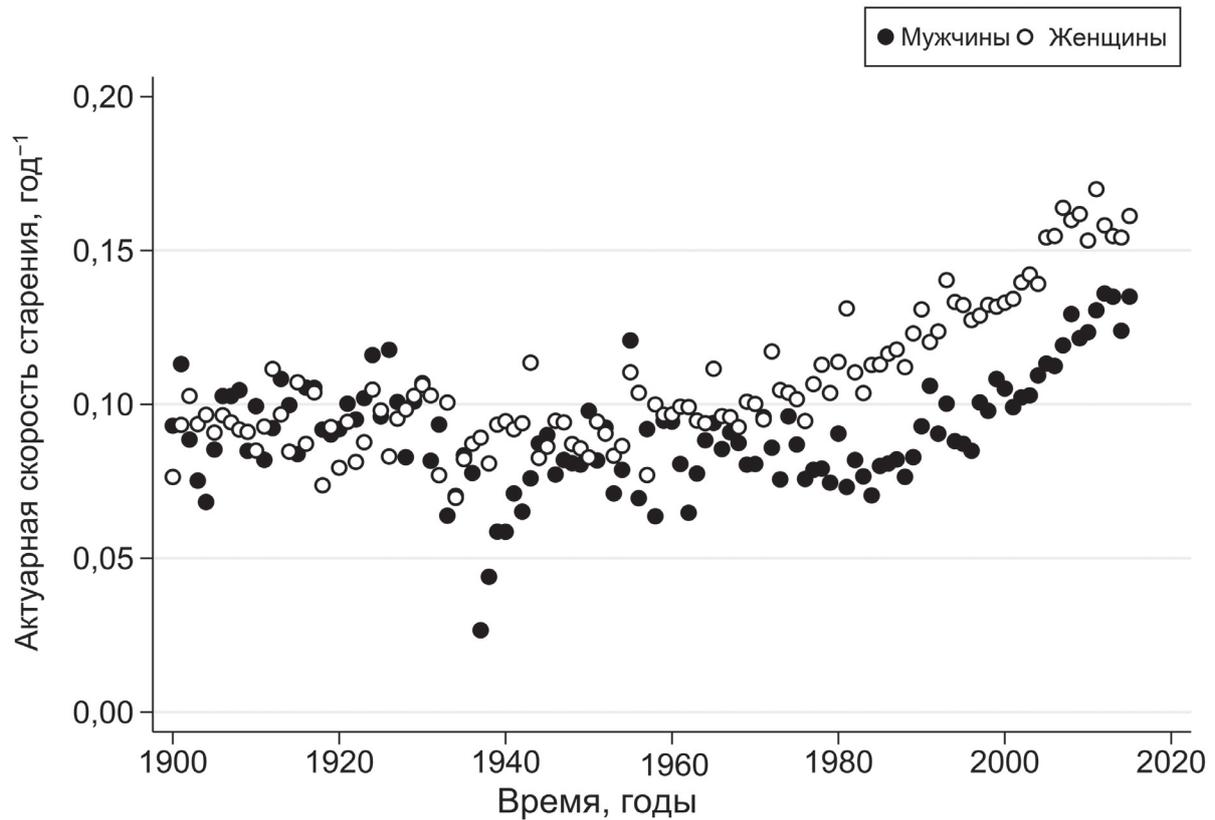


Рис. 2. Исторические тренды актуарной скорости старения (параметр углового наклона в модели Гомперца–Мейкема) в Финляндии. Актуарная скорость старения оценивалась в возрастном интервале 60–85 лет

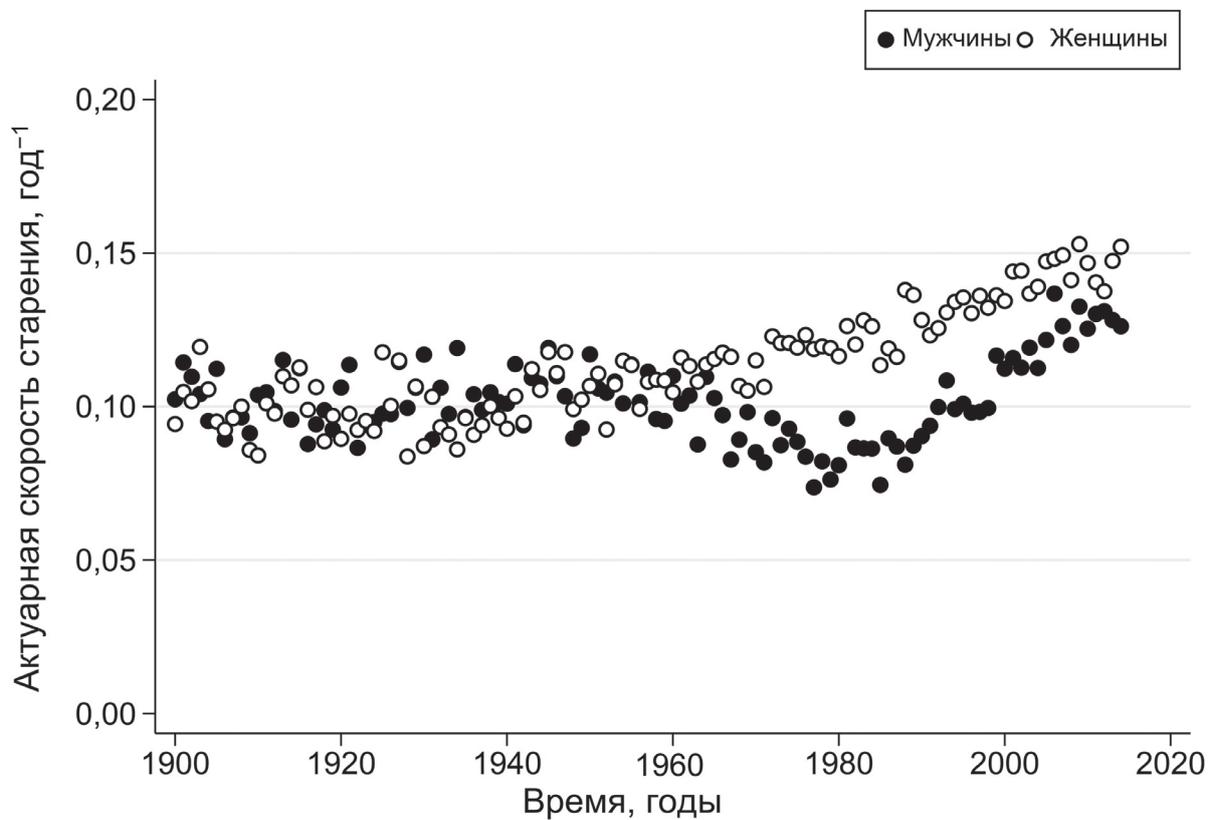


Рис. 3. Исторические тренды актуарной скорости старения (параметр углового наклона в модели Гомперца–Мейкема) в Норвегии. Актуарная скорость старения оценивалась в возрастном интервале 60–85 лет

Таблица 4. Исторические изменения значений актуарной скорости старения* после 2000 г.

Страна	Мужчины		Женщины		Число популяций
	Коэффициент наклона линейной регрессии, $\times 10^3$	<i>p</i> -значение	Коэффициент наклона линейной регрессии, $\times 10^3$	<i>p</i> -значение	
Австралия	1,5114	0,001	1,2951	<0,001	12
Австрия	2,7407	<0,001	1,9276	<0,001	15
Бельгия	1,8230	<0,001	1,4875	0,001	16
Болгария	2,4305	0,054	1,8606	0,010	11
Беларусь	0,3843	0,386	1,2828	0,001	15
Канада	1,0965	0,026	-0,0790	0,769	12
Швейцария	2,1124	<0,001	0,8233	0,026	15
Чешская Республика	2,1886	<0,001	2,3290	<0,001	15
Чили	2,7909	0,220	3,4081	0,002	6
Восточная Германия	1,8330	0,017	2,4485	<0,001	14
Германия	2,1047	<0,001	2,4264	<0,001	14
Западная Германия	2,1980	<0,001	2,4446	<0,001	14
Дания	2,6976	<0,001	1,2245	<0,001	15
Испания	1,6905	<0,001	1,4617	<0,001	15
Эстония	0,8753	0,296	0,5735	0,225	14
Финляндия	2,4491	<0,001	1,7940	0,001	16
Франция, гражданское население	2,2854	<0,001	1,5790	0,001	15
Франция, всё население	2,2854	<0,001	1,5790	0,001	15
Англия и Уэльс, гражданское население	2,0366	<0,001	1,8550	<0,001	14
Англия и Уэльс, всё население	2,0366	<0,001	1,8550	<0,001	14
Северная Ирландия	1,1501	0,136	2,1498	0,002	14
Великобритания	1,9767	<0,001	1,7956	<0,001	14
Шотландия	1,9311	<0,001	1,5401	0,001	14
Греция	2,1401	0,005	3,2622	<0,001	14
Венгрия	1,7999	0,004	1,9305	<0,001	15
Ирландия	2,4650	<0,001	2,4127	<0,001	15

Таблица 4 (продолжение)

Страна	Мужчины		Женщины		Число популяций
	Коэффициент наклона линейной регрессии, $\times 10^3$	<i>p</i> -значение	Коэффициент наклона линейной регрессии, $\times 10^3$	<i>p</i> -значение	
Исландия	2,3997	0,130	3,8444	0,075	14
Израиль	2,2684	<0,001	1,4485	0,003	15
Италия	3,2138	<0,001	2,2241	<0,001	13
Япония	1,5498	<0,001	1,0220	<0,001	15
Литва	2,3446	0,001	2,2812	<0,001	14
Люксембург	-0,3850	0,731	1,8877	0,183	15
Латвия	-1,3286	0,194	0,6781	0,242	14
Нидерланды	1,7530	<0,001	0,9418	0,006	13
Норвегия	1,2504	0,003	0,5473	0,108	15
Новая Зеландия, не маори	2,0541	0,063	-0,0909	0,937	9
Новая Зеландия	1,5989	0,005	0,7302	0,185	14
Польша	1,4253	<0,001	2,3798	<0,001	15
Португалия	2,9999	<0,001	3,5276	<0,001	13
Россия	-0,6028	0,019	1,3931	<0,001	15
Словакия	1,7801	0,003	2,5763	<0,001	15
Словения	2,7497	0,020	2,1366	0,011	15
Швеция	1,2518	<0,001	0,4516	0,146	15
Тайвань	-0,8695	0,015	0,3212	0,114	15
Украина	-0,8367	0,003	0,4007	0,091	14
США	0,2857	0,026	-0,1836	0,214	15

Примечание. Коэффициенты наклона линейной регрессии зависимостей актуарной скорости старения от времени.

* Расчёты оценок параметров модели Гомперца–Мейкема осуществлялись в возрастном интервале 60–85 лет. Статистически значимые изменения отмечены жирным шрифтом.

В таблице 4 представлены угловые коэффициенты наклона линейной регрессии и соответствующие *p*-значения. Отметим, что в большинстве стран актуарная скорость старения увеличилась со временем. Актуарная скорость старения увеличилась в 34 случаях для мужчин, в 34 случаях для женщин, и в 30 случаях она увеличилась для обоих полов. В 9 случаях для мужчин и 12 случаях для женщин актуар-

ная скорость старения не показала статистически значимых изменений. Таким образом, 74% исследованных популяций показали увеличение актуарной скорости старения после 2000 г.

Можно сделать вывод, что на поперечных данных актуарная скорость старения за последнее время увеличилась. Возможным объяснением тенденции увеличения актуарной скорости старения в поперечных данных может быть

неодинаковая скорость исторического снижения смертности среди старших и младших возрастных групп взрослого населения. Было установлено, что смертность столетних людей не снижается с течением времени, по крайней мере, в течение последних 20–30 лет. Впервые это явление было замечено Drefahl для лиц столетнего возраста в Швеции [25]. Позже это явление было обнаружено для США [26] и четырёх европейских стран [27]. В то же время смертность в более молодых возрастах продолжает снижаться [28]. В этом случае возрастные траектории смертности неизбежно становятся более крутыми. До этого времени наблюдался параллельный сдвиг смертности вниз (в полупологарифмических координатах), а актуарная скорость старения оставалась стабильной [29]. Основываясь на этом явлении, Bongaarts предложил свой метод прогнозирования смертности (метод сдвига смертности) [18].

ДИСКУССИЯ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование количественных показателей компенсационного эффекта смертности с использованием современных данных подтвердило, что обратная корреляция между $\ln(R_0)$ и параметром наклона Гомперца (α) уравнения Гомперца–Мейкема действительно существует и является высоко статистически значимой при сравнении различных популяций человека. Оценки видовой продолжительности жизни (параметр B) для современных популяций близки к оценкам, полученным в более ранней публикации [1]. Также было обнаружено, что оценки видовой продолжительности жизни являются более низкими в исторически более ранние периоды даже после учёта фоновой смертности. С течением времени эти оценки увеличиваются.

Использование центрированных значений возраста для учёта коллинеарности приводит к снижению оценок коэффициентов корреляции между параметрами Гомперца, но не изменяет оценок видовой продолжительности жизни. Недавно было заявлено, что корреляция Стрелера–Милдвана может быть вызвана статистическим артефактом из-за ложной корреляции между оценками параметров Гомперца [23]. Уменьшение коллинеарности с использованием центрированных оценок возраста показывает, что ложная корреляция между оценками параметров Гомперца может быть ответственна за 54% объясняемой вариации, но не устраняет полностью корреляцию между оценками параметров Гомперца. Голубев [7] рассмотрел два

источника возможных артефактов, вызывающих ложную корреляцию Стрелера–Милдвана: статистическую корреляцию между параметрами Гомперца [23] и игнорирование параметра Мейкема [1]. Он предположил, что обобщённый закон Гомперца–Мейкема имеет чёткую биологическую интерпретацию своих параметров, несмотря на существующие проблемы (которые могут быть устранены) [7].

Также было установлено, что фоновая смертность в современных популяциях очень низкая [1, 16] и, следовательно, не оказывает заметного влияния на оценки видовой продолжительности жизни (см. таблицу 1 и 2).

В данном исследовании также были изучены последние тенденции актуарной скорости старения. Было установлено, что на протяжении большей части XX века актуарная скорость старения демонстрировала удивительную стабильность, когда снижение смертности было вызвано преимущественно уменьшением параметра Мейкема (фоновой смертности) [1, 16, 18]. Это наблюдение подтверждается данными по Финляндии и Норвегии, представленными на рис. 2 и 3. Однако в последние 20–30 лет значения актуарной скорости старения начали увеличиваться во многих странах. Здесь необходимо упомянуть работу Tai и Nozmer, которые провели крупномасштабное исследование актуарной скорости старения для всех популяций, доступных в HMD, в историческом аспекте, начиная с XIX века [14]. Авторы измеряли актуарную скорость старения, используя модели Гомперца и Гомперца–Мейкема, хотя очевидно, что несмещённые исторические тренды актуарной скорости старения могут быть получены только с помощью последней модели. Тем не менее авторы поместили в свою аннотацию следующий вводящий в заблуждение вывод: «С течением времени в человеческих популяциях параметр наклона Гомперца увеличивался, что указывает на всё более крутой рост смертности с увеличением возраста». Однако их собственные результаты, основанные на модели Гомперца–Мейкема, ясно показывают, что показатели актуарной скорости старения стабильны в течение очень долгого времени, а затем (примерно в 1990-х гг.) испытывают рост (рис. 6 и 7 в работе Tai et al. [14]). Стабильность актуарной скорости старения была более выражена для мужчин [14].

Tai и Nozmer представили свои данные для смеси многих популяций, доступных в HMD, поэтому из их работы невозможно сделать вывод о том, является ли недавнее увеличение актуарной скорости старения общим явлением, или оно наблюдается лишь в небольшом

количестве популяций. В нашем исследовании мы проанализировали исторические тренды актуарной скорости старения для каждой популяции (страны) отдельно. Оказалось, что действительно большинство популяций (74%) демонстрирует увеличение актуарной скорости старения после 2000 г. При этом в 23% популяций показатели актуарной скорости старения остаются стабильными.

Наблюдаемый рост актуарной скорости старения показывает, что попытки измерить скорость старения с помощью параметра наклона Гомперца представляются проблематичными. Недавнее увеличение актуарной скорости старения контринтуитивно, поскольку нет никаких биомедицинских оснований полагать, что темпы старения человека в последнее время ускорились. На самом деле, противоположная гипотеза кажется более правдоподобной, учитывая снижение уровня повозрастной смертности и увеличение продолжительности жизни.

Изучая этот парадокс увеличения актуарной скорости старения, мы обнаружили, что он, скорее всего, вызван более быстрым историческим снижением смертности в младших возрастных группах взрослого населения по сравнению со старшими, что делает возрастной градиент смертности более крутым с течением времени. Это явление ставит под сомнение существующий метод прогнозирования смертности, основанный на стабильности актуарной скорости старения во времени [16, 18]. Недавнее увеличение актуарной скорости старения

делает траектории смертности более крутыми и, таким образом, будет способствовать компрессии смертности и заболеваемости, когда больные и немощные организмы будут быстро умирать. Компрессию смертности можно сравнить с медленным фенотозом, когда старый организм быстро погибает по собственному механизму острого фенотоза для устранения особей, которые не могут быть вовлечены в естественный отбор [30]. Недавний рост актуарной скорости старения показывает, что актуарная скорость старения не является хорошей мерой скорости биологического старения, поэтому необходимо разработать более совершенные показатели скорости старения.

Вклад авторов. Л.Г. разрабатывал план исследований, анализировал полученные результаты, редактировал рукопись. Н.Г. проводила статистический анализ данных и подготавливала рукопись.

Финансирование. Работа частично поддержана грантом Национального института здоровья (NIH R21AG054849).

Благодарности. Авторы благодарят анонимных рецензентов статьи за конструктивные замечания.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или иной сфере.

Соблюдение этических норм. Данная статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов изучения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gavrilov, L. A., and Gavrilova, N. S. (1991) *The Biology of Life Span: A Quantitative Approach*, Harwood Academic Publisher, New York.
- Gavrilov, L. A., and Gavrilova, N. S. (2006) Reliability Theory of Aging and Longevity, in *Handbook of the Biology of Aging* (Masoro, E. J., and Austad, S. N. eds) 6 Edn., Academic Press, San Diego, pp. 3-42.
- Hawkes, K., Smith, K. R., and Blevins, J. K. (2012) Human actuarial aging increases faster when background death rates are lower: a consequence of differential heterogeneity? *Evolution*, **66**, 103-114, doi: 10.1111/j.1558-5646.2011.01414.x.
- Strehler, B. L., and Mildvan, A. S. (1960) General theory of mortality and aging, *Science*, **132**, 14-21, doi: 10.1126/science.132.3418.14.
- Гаврилов Л.А. (1984). Существует ли предел продолжительности жизни? *Биофизика*, **29**, 908-909.
- Le Bras, H. (1976) Mortality laws and limited age, *Population*, **31**, 655-692, doi: 10.2307/1530761.
- Golubev, A. (2019) A 2D analysis of correlations between the parameters of the Gompertz-Makeham model (or law?) of relationships between aging, mortality, and longevity, *Biogerontology*, **20**, 799-821, doi: 10.1007/s10522-019-09828-z.
- Burger, O., and Missov, T. I. (2016) Evolutionary theory of ageing and the problem of correlated Gompertz parameters, *J. Theor. Biol.*, **408**, 34-41, doi: 10.1016/j.jtbi.2016.08.002.
- Li, T., and Anderson, J. J. (2015) The Strehler-Mildvan correlation from the perspective of a two-process vitality model, *Popul. Stud.*, **69**, 91-104, doi: 10.1080/00324728.2014.992358.
- Yashin, A. I., Ukraintseva, S. V., Boiko, S. I., and Arbeeve, K. G. (2002) Individual aging and mortality rate: how are they related? *Soc. Biol.*, **49**, 206-217, doi: 10.1080/19485565.2002.9989059.
- Li, T., Yang, Y. C., and Anderson, J. J. (2013) Mortality increase in late-middle and early-old age:

- heterogeneity in death processes as a new explanation, *Demography*, **50**, 1563-1591, doi: 10.1007/s13524-013-0222-4.
12. Yashin, A. I., Begun, A. S., Boiko, S. I., Ukraintseva, S. V., and Oeppen, J. (2002) New age patterns of survival improvement in Sweden: do they characterize changes in individual aging? *Mech. Ageing Dev.*, **123**, 637-647, doi: 10.1016/s0047-6374(01)00410-9.
 13. Golubev, A. (2004) Does Makeham make sense? *Biogerontology*, **5**, 159-167, doi: 10.1023/B:BGEN.0000031153.63563.58.
 14. Tai, T. H., and Noymer, A. (2018) Models for estimating empirical Gompertz mortality: with an application to evolution of the Gompertzian slope, *Popul. Ecol.*, **60**, 171-184, doi: 10.1007/s10144-018-0609-6.
 15. Yashin, A. I., Begun, A. S., Boiko, S. I., Ukraintseva, S. V., and Oeppen, J. (2001) The new trends in survival improvement require a revision of traditional gerontological concepts, *Exp. Gerontol.*, **37**, 157-167, doi: 10.1016/s0531-5565(01)00154-1.
 16. Bongaarts, J. (2009) Trends in senescent life expectancy, *Popul. Stud.*, **63**, 203-213, doi: 10.1080/00324720903165456.
 17. Гаврилов Л.А., Гаврилова Н.С., Ягужинский Л.С. (1978) Основные закономерности старения и гибели животных с точки зрения теории надежности, *Ж. общей биологии*, **39**, 734-742.
 18. Bongaarts, J. (2005) Long-range trends in adult mortality: Models and projection methods, *Demography*, **42**, 23-49, doi: 10.1353/dem.2005.0003.
 19. Missov, T. I., Lenart, A., Nemeth, L., Canudas-Romo, V., and Vaupel, J. (2015) The Gompertz force of mortality in terms of the modal age at death, *Demogr. Res.*, **32**, 1031-1047, doi: 10.4054/DemRes.2015.32.36.
 20. Wilmoth, J. R., and Horiuchi, S. (1999) Rectangularization revisited: variability of age at death within human populations, *Demography*, **36**, 475-495, doi: 10.2307/2648085.
 21. Velilla, S. (2018) A note on collinearity diagnostics and centering, *Am. Stat.*, **72**, 140-146, doi: 10.1080/00031305.2016.1264312.
 22. Wood, F. S. (1984) Comment: effect of centering on collinearity and interpretation of the constant, *Am. Stat.*, **38**, 88-90, doi: 10.2307/2683240.
 23. Tarkhov, A. E., Menshikov, L. I., and Fedichev, P. O. (2017) Strehler-Mildvan correlation is a degenerate manifold of Gompertz fit, *J. Theor. Biol.*, **416**, 180-189, doi: 10.1016/j.jtbi.2017.01.017.
 24. Gavrilov, L. A., Gavrilova, N. S., and Nosov, V. N. (1983) Human life span stopped increasing: why? *Gerontology*, **29**, 176-180, doi: 10.1159/000213111.
 25. Drefahl, S., Lundstrom, H., Modig, K., and Ahlbom, A. (2012) The era of centenarians: mortality of the oldest old in Sweden, *J. Intern. Med.*, **272**, 100-102, doi: 10.1111/j.1365-2796.2012.02518.x.
 26. Gavrilov, L. A., Gavrilova, N. S., and Krut'ko, V. N. (2017) The future of human longevity, *Gerontology*, **63**, 524-526, doi: 10.1159/000477965.
 27. Robine, J. M., and Cubaynes, S. (2017) Worldwide demography of centenarians, *Mech. Ageing Dev.*, **165**, 59-67, doi: 10.1016/j.mad.2017.1003.1004.
 28. Tuljapurkar, S., Li, N., and Boe, C. (2000) A universal pattern of mortality decline in the G7 countries, *Nature*, **405**, 789-792, doi: 10.1038/35015561.
 29. Гаврилов Л.А., Гаврилова Н.С. (2020) Что мы можем узнать о старении и COVID-19, изучая смертность? *Биохимия*, **85**, 1766-1772, doi: 10.31857/S0320972520120039.
 30. Skulachev, V. P., Shilovsky, G. A., Putyatina, T. S., Popov, N. A., Markov, A. V., Skulachev, M. V., and Sadovnichii, V. A. (2020) Perspectives of *Homo sapiens* lifespan extension: focus on external or internal resources? *Aging*, **12**, 5566-5584, doi: 10.18632/aging.102981.

TRENDS IN HUMAN SPECIES-SPECIFIC LIFESPAN AND ACTUARIAL AGING RATE*

Leonid A. Gavrilov^{1,2**} and Nataliya S. Gavrilova^{1,2}

¹ Academic Research Centers, NORC at the University of Chicago,
60637 Chicago, IL, USA; e-mail: lagavril@yahoo.com

² Institute for Demographic Research, Federal Center of Theoretical and Applied Sociology,
Russian Academy of Sciences, 109028 Moscow, Russia

The compensation effect of mortality (CEM) was tested and species-specific lifespan was estimated using data on one-year age-specific death rates from the Human Mortality Database (HMD). CEM was confirmed using this source of the data and human species-specific lifespan estimates were obtained, which were similar to the estimates published before. Three models (Gompertz–Makeham, Gompertz–Makeham with mean-centered age, and Gompertz) produced similar estimates of the species-specific lifespan. These estimates demonstrated some increase over time. Attempts to measure aging rates through the Gompertz

slope parameter led to the conclusion that actuarial aging rates were stable during most of the 20th century, but recently demonstrated an increase over time in the majority (74%) of studied populations. This recent phenomenon is most likely caused by more rapid historical decline of mortality at the younger adult age groups compared to the older age groups, thus making the age gradient in mortality steeper over time. There is no biomedical reason to believe that human aging rates accelerated recently, so that the actuarial aging rate is probably not a good measure of true aging rate (rate of functional loss). Therefore, better measures of aging rate need to be developed.

Keywords: aging, mortality, Gompertz–Makeham model, species-specific lifespan, aging rate

ВРОЖДЁННЫЙ ИММУНИТЕТ И ФЕНОПТОЗ

© 2022 Б.В. Черняк^{1*}, К.Г. Лямзаев^{1,2}

¹ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119992 Москва, Россия; электронная почта: bchernyak1@gmail.com

² Российский геронтологический научно-клинический центр,
Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
129226 Москва, Россия; электронная почта: lyamzaev@gmail.com

Поступила в редакцию 24.10.2022

После доработки 14.11.2022

Принята к публикации 14.11.2022

Представлена гипотеза, согласно которой основным механизмом реализации феноптоза (запрограммированной гибели организма) служит активация реакций врождённой иммунной системы. В подтверждение гипотезы обсуждаются: (1) данные об активном выбросе из клетки сигнальных молекул, вызывающих избыточное воспаление; (2) данные об участии митохондриальной продукции активных форм кислорода в иммунном ответе.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMPs), повреждение-ассоциированные молекулярные паттерны (DAMPs), митохондриально-направленные антиоксиданты, воспаление, инфламмосома, запрограммированная гибель, феноптоз.

DOI: 10.31857/S032097252212017X, EDN: N1NYOF

Концепция феноптоза как альтруистической запрограммированной гибели отдельных организмов во благо популяции и вида была предложена Владимиром Петровичем Скулачёвым более двух десятилетий назад [1, 2]. В.П. Скулачёв предположил, что дарвиновский отбор мог сформировать механизмы «очищения родственного сообщества от организмов или популяции от особей, которые стали вредными для этого сообщества». В частности, «септический шок... и вызванные стрессом ишемические заболевания мозга и сердца» предлагалось рассматривать как примеры феноптоза [1]. В то же время «медленный феноптоз» был предложен как эквивалентный термин для запрограммированного старения [1–3].

Концепция феноптоза приобрела значительную популярность и послужила катализатором для проведения многочисленных как теоретических, так и экспериментальных исследований. В рамках этой концепции, как нам представляется, существовал важный пробел, а именно: не был предложен специфиче-

ский механизм или механизмы, которые бы осуществляли приговор, вынесенный особи при феноптозе. Подобные механизмы были выявлены для различных типов запрограммированной гибели клеток, таких как апоптоз, некроптоз и пироптоз. В этой заметке мы кратко представим гипотезу, согласно которой основным механизмом реализации феноптоза служит активация реакций врождённой иммунной системы организма. Более детальный анализ литературы в этой области был опубликован нами ранее [4].

Хорошо известно, что активация врождённого иммунитета в ответ на вирусные (включая COVID-19) и бактериальные инфекции, а также на массивные травмы (в частности, при хирургических вмешательствах), ишемические и токсические поражения часто ведёт к тяжёлому течению заболеваний и к смерти. Традиционно принято считать, что это результат ошибочной гиперстимуляции защитных реакций, который служит эволюционной расплатой (trade-off) за высокую эффективность

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; митоАФК – митохондриальные активные формы кислорода; DAMPs – damage-associated molecular patterns, молекулярные паттерны, связанные с повреждением.

* Адресат для корреспонденции.

иммунной системы. Основываясь на многочисленных наблюдениях, мы предположили, что такие опасные свойства системы врождённого иммунитета являются следствием закреплённой в эволюции альтруистической суицидальной стратегии, защищающей популяцию от распространения эпидемий и опасных патологий.

Убедительные свидетельства в пользу нашей гипотезы следуют из рассмотрения основных принципов работы врождённого иммунитета. Эти принципы, сформулированные С. А. Janeway [5], гласят, что патогены в организме распознаются относительно небольшим числом рецепторов, которые настроены не на индивидуальные особенности патогена (как в случае адаптивного иммунитета), а на общие черты, присущие большим группам патогенов — так называемыми молекулярными паттернами распознавания патогенов (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs). Эти паттерны включают липополисахариды бактериальной стенки, некоторые белки и пептиды, а также нуклеиновые кислоты вирусов и бактерий. Главным свойством PAMPs является их отсутствие в организме хозяина. Вскоре, однако, выяснилось, что те же рецепторы распознают многие молекулярные компоненты хозяйских клеток. Они получили название «паттернов, связанных с повреждением» (*damage-associated molecular patterns*, DAMPs). Первоначально предполагалось, что эти молекулы выходят во внеклеточную среду исключительно из повреждённых клеток, однако постепенно стали накапливаться данные о том, что многие DAMPs активно выбрасываются живыми клетками. Например, важным источником DAMPs служат митохондрии. Отчасти это объясняется их происхождением из эндосимбиотических бактерий, хотя некоторые митохондриальные DAMPs не имеют бактериальных гомологов. Митохондрии в клетке производят АТФ сопряжённо с дыханием и неизбежно генерируют активные формы кислорода (АФК). АФК повреждают митохондрии, и одним из механизмов, с помощью которых клетка освобождается от повреждённых органелл, служит их выброс из клетки [6]. Механизмы этого активного процесса не вполне ясны. Возможно, часть митохондриальных DAMPs попадает во внеклеточную среду в качестве мусора, однако показано, что воспалительная активация иммунных клеток значительно усиливает выброс митохондрий, создавая петлю усиления воспаления. Другим примером активного выброса DAMPs служит секреция везикул гранулоцитами. Эти иммунные клетки выбрасывают секреторные гранулы, начинённые

антимикробными пептидами и литическими ферментами, для защиты от патогенов, однако многие из этих молекул распознаются как DAMPs. Важными низкомолекулярными метаболитами, участвующими в активации воспаления при выходе из клетки, служат АТФ, мочевиная кислота и сукцинат. Для всех этих молекул известны системы активного выброса.

Самым ярким примером подвергающихся активному выбросу DAMPs являются ядерные белки HMGB1 и C1RP. В норме они участвуют в регуляции репликации и транскрипции, но оказавшись вне клетки, служат мощными активаторами иммунного ответа. Активное высвобождение ядерных DAMPs требует их посттрансляционной модификации, что позволяет им выйти в цитоплазму, а далее выброс происходит благодаря экзоцитозу секреторных лизосом [7, 8]. Видимо, это связано с активным участием реакций врождённого иммунитета в репарации повреждений тканей. В то же время показано, что эти и другие DAMPs критически важны для развития многих патологий. Так, например, мыши с нокаутом гена *C1RP* выживают при сепсисе, вызывающем гибель контрольных животных [8]. Введение антител, перехватывающих некоторые DAMPs или блокирующих их рецепторы, предотвращает развитие сепсиса, асептического системного воспаления, ишемических поражений и т.д. [9]. Ингибиторы HMGB1 и C1RP рассматриваются как перспективные терапевтические средства для различных воспалительных патологий. Эти наблюдения очень трудно объяснить с точки зрения защитной функции иммунитета, но они хорошо согласуются с гипотезой об участии иммунных реакций в феноптозе.

Другим важным направлением исследований, результаты которых свидетельствуют в пользу нашей гипотезы, являются исследования роли митохондрий в механизмах врождённого иммунитета. Для двух основных типов клеток врождённого иммунитета, нейтрофилов и макрофагов, показана важнейшая роль митохондриальной продукции АФК в воспалительной активации. В нейтрофилах генерация митохондриальных АФК (митоАФК) стимулирует сборку и активацию NADPH-оксидазы на плазматической мембране, что ведёт к массивному выбросу радикалов («окислительному взрыву») [10]. Кроме того, митоАФК способствуют выбросу из нейтрофилов различных видов везикул, заполненных литическими ферментами (так называемая дегрануляция). Наконец, некоторые стимулы вызывают выброс из нейтрофилов ядерного хроматина, который деконденсируется и образует внеклеточные

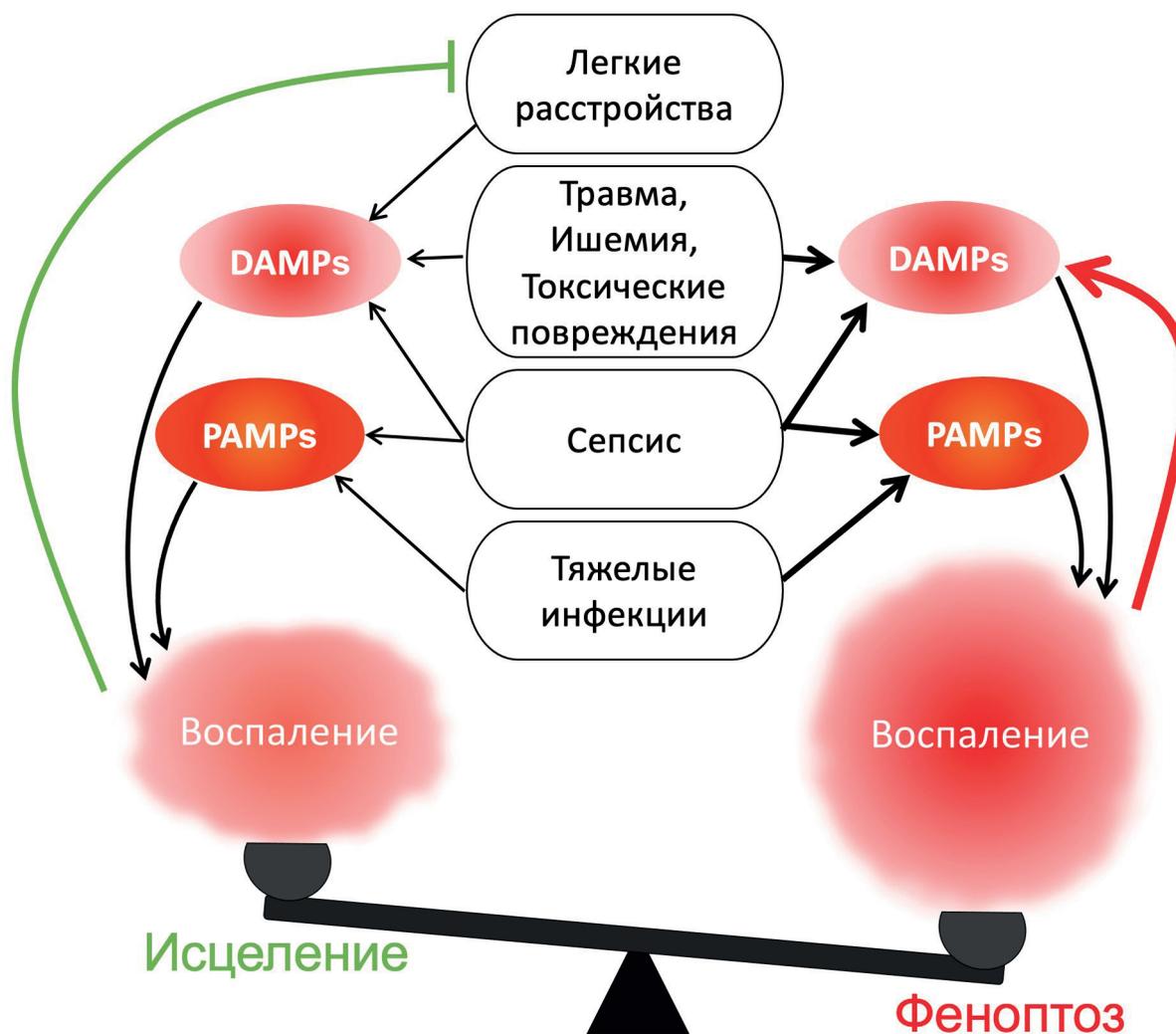
ловушки (neutrophil extracellular traps, NET), что сопровождается некротической гибелью клеток, НЕТозом. Генерация митоАФК является обязательным условием НЕТоза, по крайней мере для некоторых типов стимуляции [11]. В макрофагах митоАФК также служат важным сигналом для воспалительной активации клеток [12].

Наряду с иммунными клетками важную роль в работе системы врождённого иммунитета играют клетки эндотелия. В ответ на воспалительные стимулы они продуцируют воспалительные цитокины, а также экспрессируют на поверхности молекулы адгезии, которые необходимы для проникновения нейтрофилов из крови в очаги воспаления. Как показали наши исследования, для воспалительной активации эндотелия необходима генерация митоАФК [13]. Как в иммунных клетках, так и в эндотелии важным компонентом воспалительного ответа является активация инфламасомы NLRP3, большого мультибелкового комплекса, который катализирует созревание важных воспалительных цитокинов. Установлено, что инфламасомы локализуются на поверхности митохондрий и активируются при участии митоАФК [14].

Данные о роли митоАФК во врождённом иммунитете во многом были получены благодаря применению митохондриально-направленных антиоксидантов (МНА). Эти соединения избирательно накапливаются в отрицательно заряженном матриксе митохондрий благодаря входящему в их состав катионному остатку и нейтрализуют действие митоАФК. Эти антиоксиданты эффективно блокируют воспалительные реакции как иммунных клеток, так и эндотелия. За последнее десятилетие накоплен большой объём данных о терапевтическом действии МНА в животных моделях различных патологий. Наиболее детально исследован SkQ1 [15], митохондриально-направленный антиоксидант, разработанный под руководством В.П. Скулачёва. Показано, что SkQ1 спасает мышей в модели острого асептического воспаления при внутривенном введении фактора некроза опухолей [16], а также в модели пиелонефрита, где острое воспаление было вызвано введением бактериальных препаратов [17]. Кроме того, SkQ1 оказывал терапевтическое действие в моделях ишемического инсульта и инфаркта миокарда, а также в моделях глазных заболеваний [15]. Все эти патологии во многом зависят от воспалительных процессов, и это позволяет предполагать, что противовоспалительное действие SkQ1 по крайней мере отчасти определяет его терапевтическую эффективность. Приведённые данные показывают,

что нормальные клеточные функции (в частности, генерация митоАФК) участвуют в формировании иммунных реакций, которые могут вести к гибели организма (феноптозу). Следует отметить, что как в экспериментальных, так и в клинических исследованиях долговременный приём традиционных (как правило, природных) антиоксидантов не показал ни значительного терапевтического действия, ни увеличения продолжительности жизни [18]. Можно полагать, что основных причин этому две: (1) низкая эффективность природных антиоксидантов в приемлемых дозах, и (2) существование многочисленных побочных эффектов, обусловленных тем, что АФК необходимы для нормальных физиологических процессов. Имеющиеся данные позволяют надеяться, что митохондриально-направленные антиоксиданты могут быть лишены этих недостатков. Исследования, цитированные выше, показали, что в моделях острых воспалительных патологий SkQ1 обладал выраженным терапевтическим действием. Длительный приём не сопровождался развитием каких-либо патологий у мышей [19]. SkQ1 заметно увеличивал среднюю продолжительность жизни лабораторных мышей [20], и особенно ярко этот эффект был выражен у мутантной короткоживущей линии [21]. Можно предполагать, что такое действие SkQ1 хотя бы отчасти было связано с подавлением врождённого иммунитета.

Концепция феноптоза В.П. Скулачёва включает представление о «медленном феноптозе», который эквивалентен запрограммированному старению. Гипотеза о роли врождённого иммунитета в феноптозе может быть распространена и на этот случай. Во многом она перекликается с гипотезой «воспалительного старения» (inflammaging), предложенной С. Franceschi [22]. В полном согласии с этой гипотезой многолетние эксперименты по селекции долгоживущих мух дрозофил привели к отбору мух с подавленной иммунной системой [23]. Похожий эксперимент, по-видимому, был поставлен в природе в ходе эволюции летучих мышей. У этих животных благодаря точечной мутации одного гена существенно снижен антивирусный иммунитет [24]. Летучие мыши пошли по пути мирного сосуществования с множеством вирусов, что сделало их резервуаром крайне опасных патогенов. Возможно, именно благодаря ослаблению иммунитета летучие мыши живут значительно дольше (10–20 лет, а некоторые виды до 40 лет) большинства животных сходного размера. Предполагается, что снижение иммунитета в этом случае компенсируется очень высокой температурой тела, которая возникает при полёте.



Схема, иллюстрирующая гипотезу о связи реакций врождённого иммунитета и феноптоза. Под «лёгкими расстройствами» на схеме подразумеваются заболевания и повреждения, при которых защитная функция врождённого иммунитета преобладает над самоубийственной. Сепсис, который развивается как ответ организма на инфекцию, отделён от самих инфекций, чтобы подчеркнуть его неконтагиозность

Не исключено, что подобная стратегия реализуется также у некоторых птиц (альбатросы, крупные попугаи), которые живут значительно дольше (100 лет и более), чем их нелетающие сородичи.

Отдельного обсуждения заслуживают недавно обнаруженные особенности иммунной системы у долгоживущих грызунов: голого землекопа (*Heterocephalus glaber*) и слепыша (*Spalax spp.*). У голого землекопа наблюдается более высокое соотношение миелоидных и лимфоидных клеток по сравнению с мышами, усиленная продукция провоспалительных цитокинов в макрофагах, а также присутствует особая субпопуляция нейтрофилов, активно вырабатывающая антимикробные пептиды, что указывает на высокую активность врождённого иммунитета [25]. В то же время у него мутированы гены RIPK3 и MLKL, которые необ-

ходимы для некроптоза – типа некротической гибели клеток, который вызывает сильное воспаление. Это коррелирует с ослабленной инфильтрацией иммунных клеток в повреждённые участки кожи [26]. Интересно, что тот же фенотип наблюдается при ингибировании киназной активности RIPK3 или при нокауте соответствующего гена у мышей [26]. Кроме того, у голого землекопа отсутствуют важные для врождённого иммунитета естественные клетки-киллеры (NK cells), способные уничтожать заражённые вирусом клетки [25]. Адаптивный иммунитет голого землекопа также имеет свои особенности. Показано, что у голого землекопа уменьшено содержание цитотоксических Т-клеток, что коррелирует с замедленной инволюцией тимуса [27]. У слепыша инволюция тимуса при старении протекает нормально, но при этом не повышается уровень экспрессии

факторов дифференцировки Т-клеток, а также генов, отвечающих за цитотоксичность, что характерно для быстро стареющих грызунов. Кроме того, анализ иммуноглобулинов-М у слепыша указывает на более короткую память В-клеток [28]. Все приведённые данные указывают на то, что у долгоживущих грызунов особенности иммунной системы могут способствовать реализации различных стратегий, ведущих к увеличению продолжительности жизни. Возможно, некоторые из стратегий отменяют (как у землекопа) или замедляют (как у слепыша) исполнение программы фенотоза.

Предложенная нами гипотеза на первый взгляд глубоко пессимистична, так как предполагает, что одна из основных защитных систем организма запрограммирована на его уничтожение в критических условиях. Однако если эта гипотеза верна и нам известен механизм, лежащий в основе множества тяжёлых заболеваний и старения, то можно надеяться на разработку средств, которые бы его ослабляли. В конце концов, человек может позволить себе хотя бы на время подавить врождённый иммунитет, ведь у нас есть ещё и адаптивный иммунитет, антибиотики и противовирусные препараты. Одним из прототипов

«лекарства против фенотоза» могут стать митохондриально-направленные антиоксиданты, такие как SkQ1. Хочется верить, что разработка и применение подобных препаратов может сделать нашу жизнь более продолжительной и менее отягощённой самыми различными заболеваниями.

Вклад авторов. Б.В.Ч. выдвинул обсуждаемую гипотезу, Б.В.Ч. и К.Г.Л. работали над текстом, К.Г.Л. создал схему, иллюстрирующую гипотезу.

Финансирование. Работа выполнена в рамках Госзадания «Исследование механизмов преобразования энергии в мембранных системах, связанных с циклическим переносом ионов водорода и натрия ферментами электрон-транспортных цепей, механизмов продукции активных форм кислорода и их роли в физиологии клетки» (АААА-А19-119031390114-5).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Skulachev, V. P. (1999) Phenoptosis: programmed death of an organism, *Biochemistry (Moscow)*, **64**, 1418-1426.
2. Skulachev, V. P. (1997) Aging is a specific biological function rather than the result of a disorder in complex living systems: biochemical evidence in support of Weismann's hypothesis, *Biochemistry (Moscow)*, **62**, 1191-1195.
3. Skulachev, V. P., Shilovsky, G. A., Putyatina, T. S., Popov, N. A., Markov, A. V., Skulachev, M. V., and Sadovnichii, V. A. (2020) Perspectives of *Homo sapiens* lifespan extension: focus on external or internal resources, *Aging (Albany NY)*, **12**, 5566-5584, doi: 10.18632/aging.102981.
4. Chernyak, B. V., Lyamzaev, K. G., and Mulkidjanian, A. Y. (2021) Innate immunity as an executor of the programmed death of individual organisms for the benefit of the entire population, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 13480, doi: 10.3390/ijms222413480.
5. Janeway, C. A. (1989) Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **54 Pt. 1**, 1-13, doi: 10.1101/sqb.1989.054.01.003.
6. Lyamzaev, K. G., Zinovkin, R. A., and Chernyak, B. V. (2022) Extrusion of mitochondria: garbage clearance or cell-cell communication signals? *J. Cell Physiol.*, **237**, 2345-2356, doi: 10.1002/jcp.30711.
7. Andersson, U., Yang, H., and Harris, H. (2018) High-mobility group box 1 protein (HMGB1) operates as an alarmin outside as well as inside cells, *Semin. Immunol.*, **38**, 40-48, doi: 10.1016/j.smim.2018.02.011.
8. Aziz, M., Brenner, M., and Wang, P. (2019) Extracellular CIRP (eCIRP) and inflammation, *J. Leukoc. Biol.*, **106**, 133-146, doi: 10.1002/JLB.3MIR1118-443R.
9. Denning, N. L., Aziz, M., Gurien, S. D., and Wang, P. (2019) DAMPs and NETs in sepsis, *Front. Immunol.*, **10**, 2536, doi: 10.3389/fimmu.2019.02536.
10. Vorobjeva, N., Prikhodko, A., Galkin, I., Pletjushkina, O., Zinovkin, R., Sud'ina, G., Chernyak, B., and Pinegin, B. (2017) Mitochondrial reactive oxygen species are involved in chemoattractant-induced oxidative burst and degranulation of human neutrophils *in vitro*, *Eur. J. Cell. Biol.*, **96**, 254-265, doi: 10.1016/j.ejcb.2017.03.003.
11. Vorobjeva, N., Galkin, I., Pletjushkina, O., Golyshev, S., Zinovkin, R., Prikhodko, A., Pinegin, V., Kondratenko, I., Pinegin, B., and Chernyak, B. (2020) Mitochondrial permeability transition pore is involved in oxidative burst and NETosis of human neutrophils, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, **1866**, 165664, doi: 10.1016/j.bbadis.2020.165664.
12. Yin, M., and O'Neill, L. A. J. (2021) The role of the electron transport chain in immunity, *FASEB J.*, **35**, e21974, doi: 10.1096/fj.202101161R.

13. Zinovkin, R. A., Romaschenko, V. P., Galkin, I. I., Zakharova, V. V., Pletjushkina, O. Y., Chernyak, B. V., and Popova, E. N. (2014) Role of mitochondrial reactive oxygen species in age-related inflammatory activation of endothelium, *Aging (Albany NY)*, **6**, 661-674, doi: 10.18632/aging.100685.
14. Zhou, R., Yazdi, A. S., Menu, P., and Tschopp, J. (2011) A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation, *Nature*, **469**, 221-225, doi: 10.1038/nature09663.
15. Skulachev, V. P., Anisimov, V. N., Antonenko, Y. N., Bakeeva, L. E., Chernyak, B. V., Elichev, V. P., Filenko, O. F., Kalinina, N. I., Kapelko, V. I., and Kolosova, N. G. (2009) An attempt to prevent senescence: a mitochondrial approach, *Biochim. Biophys. Acta*, **1787**, 437-461, doi: 10.1016/j.bbabi.2008.12.008.
16. Zakharova, V. V., Pletjushkina, O. Y., Galkin, I. I., Zinovkin, R. A., Chernyak, B. V., Krysko, D. V., Bachert, C., Krysko, O., Skulachev, V. P., and Popova, E. N. (2017) Low concentration of uncouplers of oxidative phosphorylation decreases the TNF-induced endothelial permeability and lethality in mice, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, **1863**, 968-977, doi: 10.1016/j.bbadis.2017.01.024.
17. Plotnikov, E. Y., Morosanova, M. A., Pevzner, I. B., Zorova, L. D., Manskikh, V. N., Pulkova, N. V., Galkina, S. I., Skulachev, V. P., and Zorov, D. B. (2013) Protective effect of mitochondria-targeted antioxidants in an acute bacterial infection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, E3100-3108, doi: 10.1073/pnas.1307096110.
18. Conti, V., Izzo, V., Corbi, G., Russomanno, G., Manzo, V., De Lise, F., Di Donato, A., and Filippelli, A. (2016) Antioxidant supplementation in the treatment of aging-associated diseases, *Front. Pharmacol.*, **7**, 24, doi: 10.3389/fphar.2016.00024.
19. Anisimov, V. N., Bakeeva, L. E., Egormin, P. A., Filenko, O. F., Isakova, E. F., Manskikh, V. N., Mikhelson, V. M., Panteleeva, A. A., Pasyukova, E. G., Pilipenko, D. I., Piskunova, T. S., Popovich, I. G., Roshchina, N. V., Rybina, O. Y., Saprunova, V. B., Samoylova, T. A., Semenchenko, A. V., Skulachev, M. V., Spivak, I. M., Tsybul'ko, E. A., Tyndyk, M. L., Vyssokikh, M. Y., Yurova, M. N., Zabezhinsky, M. A., and Skulachev, V. P. (2008) Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 5. SkQ1 prolongs lifespan and prevents development of traits of senescence, *Biochemistry (Moscow)*, **73**, 1329-1342, doi: 10.1134/s0006297908120055.
20. Anisimov, V. N., Egorov, M. V., Krasilshchikova, M. S., Lyamzaev, K. G., Manskikh, V. N., Moshkin, M. P., Novikov, E. A., Popovich, I. G., Rogovin, K. A., Shabalina, I. G., Shekarova, O. N., Skulachev, M. V., Titova, T. V., Vygodin, V. A., Vyssokikh, M. Y., Yurova, M. N., Zabezhinsky, M. A., and Skulachev, V. P. (2011) Effects of the mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 on lifespan of rodents, *Aging (Albany NY)*, **3**, 1110-1119, doi: 10.18632/aging.100404.
21. Shabalina, I. G., Vyssokikh, M. Y., Gibanova, N., Csikasz, R. I., Edgar, D., Hallden-Waldemarson, A., Rozhdestvenskaya, Z., Bakeeva, L. E., Vays, V. B., Pustovidko, A. V., Skulachev, M. V., Cannon, B., Skulachev, V. P., and Nedergaard, J. (2017) Improved health-span and lifespan in mtDNA mutator mice treated with the mitochondrially targeted antioxidant SkQ1, *Aging (Albany NY)*, **9**, 315-339, doi: 10.18632/aging.101174.
22. Franceschi, C., Garagnani, P., Parini, P., Giuliani, C., and Santoro, A. (2018) Inflammaging: a new immunometabolic viewpoint for age-related diseases, *Nat. Rev. Endocrinol.*, **14**, 576-590, doi: 10.1038/s41574-018-0059-4.
23. Fabian, D. K., Garschall, K., Klepsatel, P., Santos-Matos, G., Sucena, É., Kapun, M., Lemaitre, B., Schlötterer, C., Arking, R., and Flatt, T. (2018) Evolution of longevity improves immunity in *Drosophila*, *Evol. Lett.*, **2**, 567-579, doi: 10.1002/evl3.89.
24. Banerjee, A., Baker, M. L., Kulcsar, K., Misra, V., Plowright, R., and Mossman, K. (2020) Novel insights into immune systems of bats, *Front. Immunol.*, **11**, 26, doi: 10.3389/fimmu.2020.00026.
25. Hilton, H. G., Rubinstein, N. D., Janki, P., Ireland, A. T., Bernstein, N., Fong, N. L., Wright, K. M., Smith, M., Finkle, D., Martin-McNulty, B., Roy, M., Imai, D. M., Jojic, V., and Buffenstein, R. (2019) Single-cell transcriptomics of the naked mole-rat reveals unexpected features of mammalian immunity, *PLoS Biol.*, **17**, e3000528, doi: 10.1371/journal.pbio.3000528.
26. Oka, K., Fujioka, S., Kawamura, Y., Komohara, Y., Chujo, T., Sekiguchi, K., Yamamura, Y., Oiwa, Y., Omamiuda-Ishikawa, N., Komaki, S., Sutoh, Y., Sakurai, S., Tomizawa, K., Bono, H., Shimizu, A., Araki, K., Yamamoto, T., Yamada, Y., Oshiumi, H., and Miura, K. (2022) Resistance to chemical carcinogenesis induction via a dampened inflammatory response in naked mole-rats, *Commun. Biol.*, **5**, 287, doi: 10.1038/s42003-022-03241-y.
27. Emmrich, S., Tolibzoda Zakusilo, F., Trapp, A., Zhou, X., Zhang, Q., Irving, E. M., Drage, M. G., Zhang, Z., Gladyshev, V. N., Seluanov, A., and Gorbunova, V. (2021) Ectopic cervical thymi and no thymic involution until midlife in naked mole rats, *Aging Cell*, **20**, e13477, doi: 10.1111/accel.13477.
28. Izraelson, M., Metsger, M., Davydov, A. N., Shagina, I. A., Dronina, M. A., Obratsova, A. S., Miskevich, D. A., Mamedov, I. Z., Volchkova, L. N., Nakonechnaya, T. O., Shugay, M., Bolotin, D. A., Staroverov, D. B., Sharonov, G. V., Kondratyuk, E. Y., Zagaynova, E. V., Lukyanov, S., Shams, I., Britanova, O. V., and Chudakov, D. M. (2021) Distinct organization of adaptive immunity in the long-lived rodent *Spalax galili*, *Nat. Aging*, **1**, 179-189, doi: 10.1038/s43587-021-00029-3.

INNATE IMMUNITY AND PHENOPTOSIS

Hypothesis

B. V. Chernyak¹ and K. G. Lyamzaev^{1,2}¹ *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia*² *The “Russian Clinical Research Center for Gerontology” of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Pirogov Russian National Research Medical University, 129226 Moscow, Russia*

The hypothesis is presented, according to which the main mechanism for the realization of phenoptosis (programmed death of the organism) is the activation of the innate immune system reactions. In support of the hypothesis, we discuss (1) data on the active release of signaling molecules from the cell causing excessive inflammation; (2) data on the involvement of mitochondrial production of reactive oxygen species in the immune response.

Keywords: pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), damage-associated molecular patterns (DAMPs), mitochondrially-targeted antioxidants, inflammation, inflammasome, programmed death, phenoptosis

ПЛАНЕТАРНЫЙ МЕТРОНОМ КАК РЕГУЛЯТОР ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ И ТЕМПА СТАРЕНИЯ: МЕТРОНОМНАЯ ГИПОТЕЗА

© 2022 А.М. Оловников

*Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН,
119334 Москва, Россия; электронная почта: olovnikov@gmail.com*

Поступила в редакцию 11.11.2022

После доработки 16.11.2022

Принята к публикации 16.11.2022

Предложен метрономный механизм управления длительностью периодов онтогенетического цикла животного организма. Метрономная система состоит из серии компонентов. В их числе: вентрикулярная система мозга, планета Земля как участница генерации метрономных сигналов и темпоральная ДНК (тДНК) как субстрат, эпигенетически маркируемый для учета истекшего времени онтогенеза. Метрономная система генерирует повторяющиеся сигналы в виде гидродинамических возмущений в спинномозговой жидкости (СМЖ). Метрономный эффект возникает благодаря наложению двух процессов – пристеночного однонаправленного потока СМЖ и осцилляций в движениях планеты. Гидродинамические удары метронома трансформируются в нервные импульсы, которые инициируют акты эпигенетической модификации тДНК в нейронах, меняя содержание факторов, экспрессируемых этой ДНК для иннервируемых мишеней организма. Продолжительность периодов онтогенетического цикла, включая продолжительность взрослой жизни, зависит от темпа актов модификации тДНК. Этот темп зависит главным образом от частоты метрономных сигналов, используемых каждым конкретным биологическим видом. Но на эти эпигенетические акты могут также влиять факторы, способные модулировать метаболизм и темп модификаций хроматина, например калорийно ограниченная диета и др.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: онтогенез, старение, теории старения, вентрикулярная система мозга, СМЖ-контактирующие нейроны, гипоталамус, движения Земли, нутации, полярное движение.

DOI: 10.31857/S0320972522120181, **EDN:** NIKQYE

ВВЕДЕНИЕ

Теории процесса старения делятся на два основных класса – стохастические и программные [1–4]. Накапливается все больше данных в пользу запрограммированности процесса, вызывающего старение. Ведущая к старению предполагаемая программа онтогенеза исторически восходит к Weismann [5]. Она обсуждается уже более сотни лет [6], но продолжают появляться ее новые варианты, как и альтернативные подходы к проблемам эволюционной геронтологии [7–9].

Несмотря на несомненные достижения биогеронтологии, некоторые исследователи оценивают ее текущее состояние как кризисное. В частности, Gems и de Magalhães [10] указывают на настоятельную необходимость искать новую

парадигму, которая бы революционизировала эту область. Подчеркивая необходимость универсальной концепции старения, Gladyshev [11] сравнивает ее потенциальную будущую роль со значением таких идей, как «роль протонного градиента в синтезе АТФ, периодическая таблица химических элементов и эволюция путем естественного отбора».

Высказывалась, впрочем, уверенность, что нужная парадигма уже существует, и что ею является идея гиперфункции [12, 13]. Однако, согласно альтернативному мнению, ни идея гиперфункции, ни другие теории пока не предложили той интегративной концепции, которая может помочь поставить правильные вопросы для дальнейшего продвижения в изучении старения [11]. К аналогичному заключению приходят и другие авторы, подчеркивая отсутствие целостного понимания взаимодействий генетики и окружающей среды в объяснении старения и продолжительности жизни (ПЖ) [14].

Принятые сокращения: СМЖ – спинномозговая жидкость; ПЖ – продолжительность жизни; тДНК – темпоральная ДНК.

В любом случае успехи, достигнутые в идентификации и изучении индикаторов старения (нестабильность генома, укорочение теломера, эпигенетические изменения, потеря протеостаза, нарушение чувствительности к питательным веществам, митохондриальная дисфункция, клеточное старение, истощение стволовых клеток и изменение межклеточной коммуникации) уже позволяют заглянуть за горизонт [15]. Тот факт, что появление признаков старения упорядочено во времени, по-видимому, ясно говорит нам, что за этим стоит работа программы. Но какой программы?

К списку иерархически упорядоченных показателей старения, иллюстрирующих гиперфункциональную активность стареющего человека, в частности, были отнесены следующие: гипертония, гиперлипидемия, гиперинсулинемия, гипергликемия, провоспаление, гиперплазия, измененный протеолиз и др. [13]. Интерпретация длинного и важного списка возраст-ассоциированных патологий как проявлений гиперфункции создает, однако, некоторую иллюзию достигнутого понимания главного механизма старения. В упомянутой работе Gems и de Magalhães, критикующих подобную иллюзию, метко сказано, что как муха-журчалка, не имея жала, мимикрирует под осу, так и некоторые классификации признаков старения создают видимость найденной парадигмы [10]. Ведь то обстоятельство, что «постростовое» нарушение внутриклеточных сигнальных путей ведет к возрастным заболеваниям на организменном уровне, еще не является объяснением. Требуется понять первичную причину этих возраст-зависимых внутриклеточных отклонений, инициирующих старение. Кризис современной биogerонтологии объясняется отсутствием понимания того, что же именно является движущей силой старения. Хотя из двух противоборствующих позиций – стохастика или программа – все больше доводов в пользу программы, остается по-прежнему загадкой, что является драйвером развертывания во времени той онтогенетической программы, выполнение которой приводит к старению. Сегодня это неизвестно, и именно поэтому, по оценкам некоторых авторов, биogerонтология находится на распутье.

ОНТОГЕНЕЗ И ХОД БИОЛОГИЧЕСКОГО ВРЕМЕНИ

Разметка событий онтогенеза во времени, по-видимому, не может быть организована только на основе событий типа стимул → ответ, индукция → дифференцировка и пролифера-

ция. Организм многоклеточных животных не способен самостоятельно, без использования внешнего независимого источника, обеспечить необходимую продолжительность времени разных периодов своего онтогенетического цикла. Для этого он нуждается в помощи внешнего источника. В качестве такового, как я полагаю, может служить сама планета Земля с ее неравномерными движениями в космическом пространстве.

Однако для детекции темпоральных подсказок планеты животные должны были создать особую физиологическую систему, обозначенную здесь как метрономная, и расположить ее в желудочках мозга. Вполне возможно, что и создание самой центральной нервной системы на основе нервной трубки, и появление желудочков мозга в эволюции в значительной мере было подчинено этой центральной задаче – созданию аппарата для контроля за течением времени в ходе выполнения онтогенетического цикла.

РОЛЬ ПЛАНЕТЫ ЗЕМЛЯ В РАБОТЕ МЕТРОНОМА ЖИВОТНЫХ

Известных в молекулярной биологии факторов, таких как транскрипция, трансляция и т.д., по-видимому, принципиально недостаточно для измерения хода времени. ДНК самостоятельно, без особого процесса, вероятно, не может участвовать в контроле хода времени. И сам этот процесс клетки самостоятельно организовать тоже не могут. Но если биохимические и биофизические факторы оказываются недостаточными, то ничто не мешало изобретательной Природе обратиться в таком случае к помощи геофизических факторов. К их числу относятся особенности неравномерного движения Земли в космическом пространстве. Именно это свойство нашей планеты животные могли взять за основу при создании метрономной системы, используемой ими для темпоральной разметки онтогенеза.

Движения Земля в пространстве включают ряд периодически повторяющихся процессов, в том числе изменения скорости осевого вращения Земли, а также полярное движение Земли, т.е. движение оси вращения Земли относительно ее коры, и, кроме того, нутации, т.е. покачивания оси вращения Земли. Мультимасштабные вариации параметров вращения Земли состоят из высокочастотных вариаций полярных движений и более длиннопериодичных флуктуаций [16, 17]. Полярные движения Земли, или колебания земного полюса, – это

смещения оси вращения в теле Земли, т.е. изменения ориентации этой оси в космическом пространстве. Осцилляции оси вращения Земли, называемые нутациями, зависят от притяжения экваториального избытка масс Земли Луной и Солнцем, от наклона оси вращения Земли к плоскости орбиты, а также от непрерывных изменений позиции небесных тел, гравитационно взаимодействующих с Землей и между собой. Осцилляции Земли зависят также от динамических изменений в структурах Земли, как в недрах, так и на поверхности [18–22].

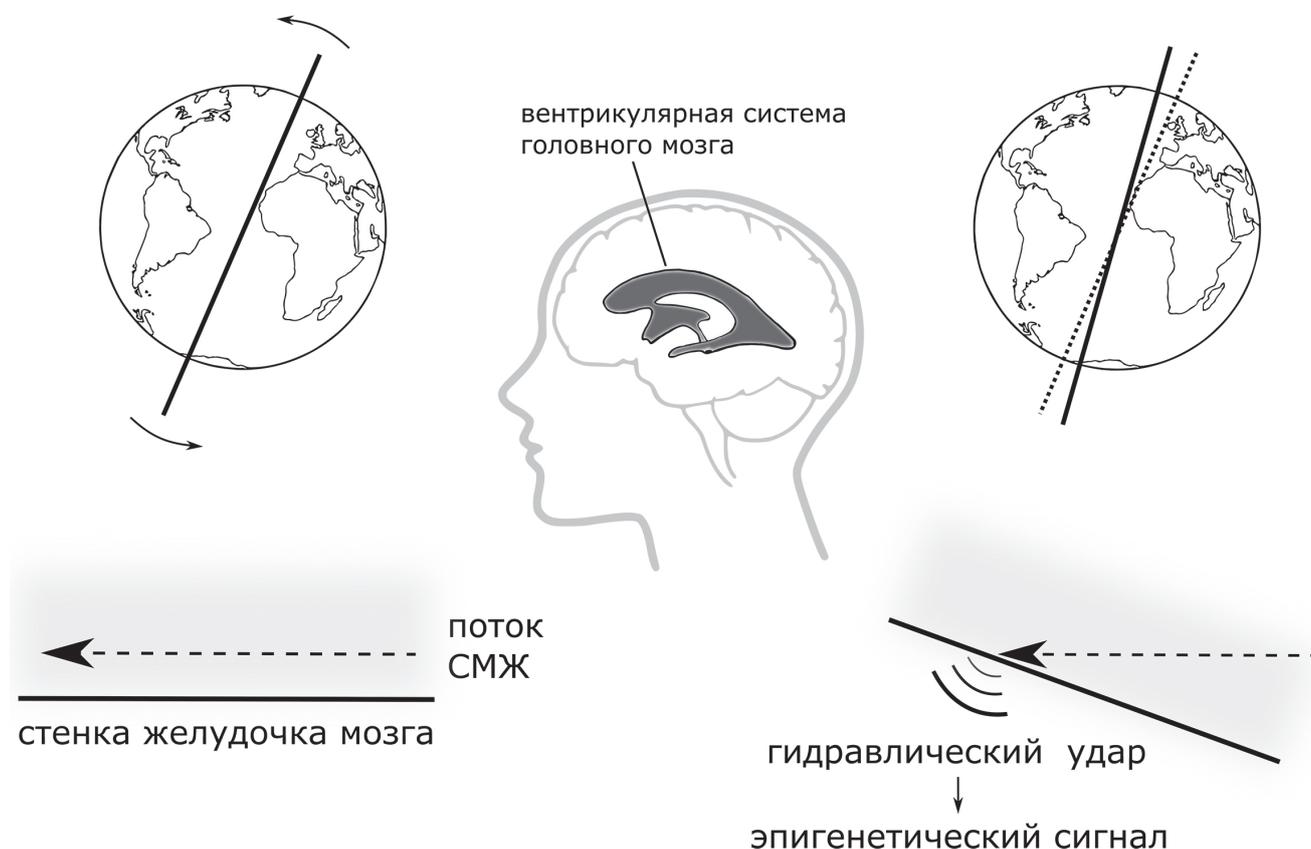
Гравитационное притяжение, в основном со стороны Солнца и Луны, а также от других небесных тел (приливные силы), вызывает небольшие периодические изменения в ориентации оси вращения Земли, которые можно измерить, используя наблюдения за очень далекими квазарами; приливное воздействие в суточном диапазоне частот вызывает резонансное возбуждение нутации свободного жидкого ядра и свободные нутации внутреннего ядра [23, 24].

Таким образом, к основным типам движения оси вращения Земли, влияющим на периодические изменения ее ориентации в пространстве и тем самым обуславливающим

осцилляции планеты, относятся: полярное движение (колебание оси вращения Земли вокруг оси ее фигуры), нутация (кивающее движение оси вращения планеты) и вариации длины суток. Что касается нутации, то она состоит из множества микронутаций, имеющих небольшую амплитуду и высокую частоту. Амплитуды нутации зависят также от внутренней структуры планеты, в том числе от жидкого ядра внутри постоянно вращающейся мантии как системы, подверженной внешнему приливному воздействию; дополнительный вклад в картину осцилляций оси вращения Земли вносят также поверхностные процессы, связанные с океанами и атмосферой [25–28].

Колебательно-вращательные процессы в движении Земли, в том числе изменения ориентации оси вращения, можно наблюдать как перемещения полюсов в пространстве. В возмущенных вращательно-колебательных движениях Земли под действием моментов гравитационных сил от Солнца и Луны выявлен приливной механизм возбуждения колебаний полюса, обусловленный вращательно-поступательным движением барицентра «двойной планеты» Земля–Луна вокруг Солнца [29].

Периодические геофизические колебания



Основные принципы метрономной теории старения (модель)

Основные характеристики этих колебаний остаются стабильными. Анализ данных наблюдений и измерений движений полюса Земли на длительном интервале времени показал, что осцилляции полюса Земли синфазны с прецессионными движениями орбиты Луны, отражающими изменения ориентации оси вращения Луны в пространстве [30]. Продемонстрировано также существование внутрисуточных колебаний полюса Земли, вызванных гравитационно-приливными моментами Солнца и Луны [31].

В процессе орбитального движения планеты Земля все время испытывает небольшие колебания мгновенной оси вращения, которые характеризуются различными частотами. Серии коротких периодов колебаний вызываются большей частью приливными моментами Солнца и Луны. Многие колебания Земли имеют субсуточные частоты, хотя вариации планетарных колебаний меняются во временных масштабах от субсуточных до многодесятилетних [19, 27, 32]. Вклад в эти гравитационно-опосредованные колебания вносят и геофизические процессы в виде перераспределения масс внутри Земли и в ее внешней оболочке, т.е. океанах и атмосфере. В совокупности гравитационные силы Солнца, Луны и геофизические процессы, ассоциированные с их воздействиями, участвуют в краткосрочных и долгосрочных периодических изменениях ориентации оси вращения Земли в космическом пространстве [17, 33–37].

Итак, Земля постоянно испытывает такие физические движения, как небольшие колебания и вращение в различных формах. Ориентация оси вращения Земли постоянно меняется во времени. Что касается траектории полета Земли в космическом пространстве, разнообразные малые осцилляции являются проявлением постоянных отклонений от равномерного и строго однонаправленного движения планеты. Благодаря этому Земля как планета способна играть роль «трансформатора», который транслирует свои гравитационно обусловленные движения в такой вид гидродинамических сигналов спинномозговой жидкости (СМЖ), которые могут быть распознаны специализированными структурами живых существ. У высших животных, включая человека, за это отвечает метрономная система, возникшая в эволюции на базе желудочков мозга и потока СМЖ. Аналог метрономной системы должен существовать и работать также у беспозвоночных. Зависимость работы метронома от периодических геофизических колебаний показана на рисунке.

ВЕНТРИКУЛЯРНАЯ СИСТЕМА МОЗГА КАК СТРУКТУРА ДЛЯ ГЕНЕРАЦИИ МЕТРОНОМНЫХ УДАРОВ С УЧАСТИЕМ ПЛАНЕТЫ ЗЕМЛЯ И ПРИСТЕНОЧНОГО ПОТОКА СПИНОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ

Можно предположить, что постоянные отклонения в траектории движений Земли используются ее животными обитателями в работе метрономной системы, предлагаемой здесь на роль ключевого средства юстировки продолжительности периодов онтогенетического цикла. Структурой, которую могли бы избрать для такой цели обладатели мозга (или его аналога), является вентрикулярная система. Она представлена соединенными полостями, вдоль которых как по каналам течет СМЖ.

Желудочки и центральный канал спинного мозга выстланы эпендимоцитами (клетками нейроглии). Эпендимальные клетки экспонируют свои подвижные реснички, миниатюрные хлыстообразные органеллы, в желудочки головного мозга и способствуют оттоку СМЖ. Подвижные реснички эпендимальных клеток строго координируют свои сокращения, чтобы способствовать мощному и направленному току СМЖ. Этот поток может участвовать в питании, защите мозга и удалении отходов [38]. Кроме того, молодые нейробласты, рождающиеся в субвентрикулярной зоне взрослого мозга, используют этот поток в своей миграции от стенок боковых желудочков до обонятельной луковицы [39].

Сложная и внешне даже причудливая архитектура вентрикулярной системы мозга, однако, не может быть объяснена только перечисленным [40]. Различные популяции подвижных реснитчатых клеток (и биение их ресничек) пространственно организованы так, чтобы направленный поток СМЖ ограничивался отдельными желудочковыми полостями с небольшим обменом жидкости между желудочками, несмотря на пульсирующие смещения СМЖ, вызванные сердцебиением [41].

Яркой особенностью этой системы являются нейроны мозга, напрямую омываемые потоком СМЖ. Vigh et al. [42, 43] подробно описали морфологию системы СМЖ-контактирующих нейронов, подчеркнув, что они, очевидно, играют роль в восприятии разных сигналов, так или иначе связанных с СМЖ. Эти нейроны контактируют с СМЖ через свои дендриты, перикарионы или аксоны, и большинство из них посылает дендритные отростки в полость желудочка, где они образуют реснитчатые окончания.

Значительная часть этих сенсорных клеток присутствует в различных областях гипоталамуса, таких как паравентрикулярный орган и сосудистый мешок. Было высказано предположение, что СМЖ-контактирующие нервные клетки из специализированных ядер гипоталамуса, распознавая в СМЖ различные биоактивные субстанции, участвуют в гипоталамо-аденогипофизарной регуляции. Другие СМЖ-контактирующие нейроны, по мнению той же группы исследователей, могли бы быть чувствительными к давлению или потоку СМЖ, а также к световому воздействию на ткани мозга [42].

СМЖ-контактирующие клетки, которые присутствуют в стенках желудочков головного мозга и центрального канала спинного мозга, найдены у всех исследованных позвоночных. При использовании миноги, как удобной модели спинного мозга, показана способность реснитчатых соматостатин/ГАМК-экспрессирующих СМЖ-контактирующих нейронов работать как рН-сенсорами, так и механорецепторами. СМЖ-контактирующие нейроны локализируются в основном в гипоталамической области и спинном мозге. Доказано, что гипоталамические СМЖ-контактирующие нейроны отвечают на механическую стимуляцию движений жидкости вдоль стенки третьего желудочка [44]. В гипоталамусе миноги этот ответ осуществляется через каналы, подобные кислоточувствительным ионным каналам 3 (ASIC3). Эти механорецепторные СМЖ-контактирующие нейроны гипоталамуса имеют обширные аксональные разветвления. Подобные нейроны есть и у грызунов.

Что касается самой СМЖ, то эта прозрачная как вода жидкость, омывающая центральную нервную систему, совершает пульсирующие движения. Сердечная и артериальная пульсации являются основными источниками пульсирующего движения СМЖ, за исключением глубокого брюшного дыхания, которое тоже способно помогать направленному потоку СМЖ [45, 46].

Пристеночный поток и поток жидкости в просвете каналов вентрикулярной системы организованы подвижными ресничками, которые действуют как наномашинки, которые перемещают жидкость в одном направлении по внутренней поверхности каналов [41, 47, 48]. Пристеночный поток СМЖ вынужден, благодаря эффекту инерции, постоянно стремиться сохранять свое мгновенное направление в пространстве, несмотря на тоже мгновенные смещения планеты. Стенки вентрикулярного канала, по которому течет пристеночный по-

ток СМЖ, вместе с планетой и одновременно с ней меняют свою позицию в пространстве. Поэтому поток СМЖ, кратковременно сохраняя прежнее направление движения, при таких условиях должен ударяться в стенку канала либо отклоняется от нее в зависимости от направления мгновенного смещения планеты. Эти меняющиеся механические взаимодействия потока жидкости со стенками канала служат причиной неизбежного возникновения гидродинамических возмущений в пристеночном потоке СМЖ.

Таким образом, потоковые гидродинамические возмущения неизбежно должны возникать в непосредственной близости от ограничивающей поверхности вентрикулярной системы. Именно там, т.е. на внутренней поверхности полостей мозговых желудочков, выставлены, как отмечено выше, механосенсорные окончания нервов перивентрикулярной сети нервной системы, которые способны улавливать механические возмущения, возникающие в пристеночном потоке жидкости вследствие неравномерных движений планеты. Реснички своими биениями поддерживают строгую однонаправленность пристеночного потока СМЖ, что как раз и позволяет сенсорным нейронам вентрикулярной системы распознавать отклонения движений Земли и переводить гидродинамические сигналы потока СМЖ на язык нервной системы, т.е. генерировать специфические нервные импульсы.

Из множества гидродинамических возмущений, генерируемых движениями планеты в пристеночном потоке СМЖ, каждый вид многоклеточных животных, обладающих вентрикулярной системой или, у более примитивных, ее аналогом, выбирает в ходе эволюции такие возмущения, которые повторяются с оптимальной для данного вида частотой. Эти периодические возмущения транслируются в нервные импульсы в специализированных нейронах перивентрикулярной области, которые можно обозначить как «хрононейроны». Периодически возникающие в хрононейронах нервные импульсы служат теми метрономными сигналами, которые необходимы для упорядочивания продолжительности каждого периода онтогенетического цикла. Выбранная в эволюции частота многократно повторяющихся метрономных ударов должна быть оптимальна для каждого вида.

Сигналы метронома отвечают за темп эпигенетических модификаций темпоральной ДНК (тДНК) в хрононейронах. При прочих равных условиях редкие удары метронома

благоприятны для организации медленного расходования тДНК и, в частности, для долгой репродуктивной жизни. Метрономный ритм высокой частоты, напротив, соответствует более быстрому исчерпанию тДНК, контролирующей продолжительность определенного онтогенетического периода. Сказанным, однако, не исключается, что один и тот же вид животных в разные периоды своего онтогенетического цикла может ориентироваться на удары метронома, совершающиеся с разной частотой. Движения Земли генерируют в потоке СМЖ широкий спектр возмущений, так что недостатка в эволюционном выборе необходимых вариантов не существует.

Учитывая сложное устройство вентрикулярной системы, исследователи неоднократно предполагали, что у СМЖ, эволюционно консервативной транспортной системы мозга, должна существовать какая-то еще, возможно, ключевая физиологическая функция, до сих пор остающаяся неизвестной [38, 49].

В целом, создается впечатление, что каждый желудочек выполняет свою часть некоей общей задачи, ради выполнения которой вся вентрикулярная система сформировалась. Сложная и, как выше упомянуто, причудливая форма системы полостей мозга может быть объяснена тем, что ее определенные компартменты имеют нервные связи с разными регионами мозга и, соответственно, тела для того, чтобы посылать в них разные регион-специфичные метрономные сигналы. Не исключено, что в разных желудочках их метрономная система эволюционно настроена на генерируемые планетой гидродинамические сигналы, имеющие разные характеристики. Чем больше период, через который следует очередной метрономный удар, тем при прочих равных условиях медленнее меняется биологический возраст мишени, темпоральная биологическая судьба которой подконтрольна метрономным сигналам конкретного вентрикулярного компартмента. В конечном итоге это могло бы вести к гетерохронности осуществления онтогенетических процессов в разных органах и тканях единого организма, т.е. к неидентичному темпу развития, созревания и старения его разных тканей и органов.

Следует особо подчеркнуть, что движения самого организма несопоставимо медленнее, чем мгновенные смещения осциллирующей планеты. Поэтому его индивидуальные движения не могут оказывать влияния на характеристики генерируемых метрономных сигналов.

Механосенсорные гены способствуют поляризации эпителиальных клеток желудочков

головного мозга, и такая архитектура, в свою очередь, способствует организации направленных потоков жидкости в вентрикулярных полостях мозга, что важно для успешной работы предложенной метрономной системы [50].

Равномерные биения ресничек детерминируют направление пристеночного потока жидкости в каждом желудочке независимо от размера его полости. Поэтому механизм способен выполнять роль метронома независимо от размера мозга. Сложность нервной системы для его работы не важна, он может работать как у позвоночных, так и у беспозвоночных. Достаточно иметь в нервной системе стабильно работающий пристеночный поток жидкости и в нем механосенсорные нейроны.

Контактирующие с СМЖ нейроны присутствуют во всем исследованном филуме позвоночных. Они армированы ресничками, помогающими воспринимать гидродинамические эффекты в СМЖ. Вентрикулярная система, подобно органу слуха, конвертирует энергию колебаний в процесс нервного возбуждения [44]. Механосенсорные, погруженные в поток жидкости, нейроны являются, по-видимому, идеальным кандидатом для улавливания сигналов, генерируемых движениями планеты.

Каждый специфический для вида метрономный сигнал, обработанный в специализированных нейронах мозга, хронейронах, инициирует в них акт очередной эпигенетической записи путем последовательной модификации регуляторных сайтов. Полное заполнение этими записями региона тДНК, отведенного эволюцией на выполнение очередного периода онтогенетического цикла, есть необходимое и достаточное условие для перехода к следующему периоду онтогенеза. Частоты ударов метронома, и значит, периоды метрономного ритма, очевидно, сильно отличаются у коротко- и долгоживущих видов, таких как муха и слон.

Следует подчеркнуть, что ритм, используемый видом в работе своего метронома, принципиально отличается от биологических ритмов, иногда привлекаемых с целью объяснения особенности развития или старения, ведь метрономный ритм имеет экзогенное, а не эндогенное происхождение. И потому он стабильнее, что существенно для разметки больших интервалов времени. Вероятно, именно с целью создания будущего метронома нервная система проходит, как упомянуто выше, через стадию нервной трубки, из которой в дальнейшем развивается система полостей, известная как вентрикулярная система мозга.

ГИДРОМЕХАНИЧЕСКИЕ УДАРЫ ПОТОКА СМЖ ПО МЕХАНОСЕНСОРНЫМ НЕЙРОНАМ

В чем состоит смысл поддержания строго направленного пристеночного потока СМЖ в желудочках мозга? Это необходимо для генерации сигналов метрономной системы. Механосенсорные окончания нейронов находятся в стенках желудочков мозга и омываются потоком СМЖ. Пока планета Земля, а вместе с ней и организм с его потоком СМЖ несутся с огромной скоростью в космическом пространстве в постоянном направлении, механосенсорные нейроны не получают механических сигналов. Однако, когда Земля производит очередное небольшое изменение в ориентации своего движения, происходит следующее событие.

Организм и стенка его вентрикулярного канала вместе с планетой меняют свою позицию, тогда как траектория движения пристеночного потока СМЖ, в силу инерции движения потока, сохраняет прежнее направление. То есть поток СМЖ, поддерживая по инерции траекторию своего движения, вынужден сталкиваться со стенкой канала, которая мгновенно поменяла свою позицию в пространстве, причем одновременно с организмом и всей осциллирующей планетой. В итоге механосенсорные нейроны желудочка, погруженные в поток СМЖ, подвергаются неизбежному гидромеханическому воздействию, т.е. получают удар. Благодаря этому периодические возмущения в потоке жидкости, воспринимаемые механосенсорами, могут использоваться организмом как тиканье своеобразных планетарных часов, которые функционируют благодаря гравитационным взаимодействиям Земли с другими небесными телами, главным образом с Луной и Солнцем. В результате механосенсоры, встроенные в стенку вентрикулярного канала, получают механические сигналы, потенциально способные выполнять роль внешних сигналов. Каждый сигнал, оцененный как специфичный для данного биологического вида, служит триггером для осуществления акта нанесения очередного эпигенетического маркера на темпоральную ДНК в хрононейронах, отвечающих за контроль времени.

Существенно отметить, что организму совершенно не требуется воспринимать все движения Земли через гидромеханическую систему потока СМЖ. Более того, это дезорганизовало бы всю работу метрономной системы. Достаточно воспринимать лишь определенные гидромеханические сигналы, игнорируя все прочие сигналы, к которым метрономная

система каждого животного вида утратила чувствительность в ходе эволюции. Необходимая фильтрация достигается либо на уровне нейросенсоров, погруженных в СМЖ, либо на уровне сети хрононейронов.

Важно также учитывать, что скорость самостоятельных движений организма несопоставимо меньше скоростей осциллирующих смещений Земли в пространстве. Поэтому произвольные изменения позиции организма не могут влиять на необходимые характеристики генерируемых метрономных сигналов.

В целом, метрономная конструкция, используя столь разные факторы, как механосенсорные нейроны, поток СМЖ и движения планеты, выполняет в организме важную физиологическую функцию, а именно упорядочение онтогенетических периодов во времени. Происходит в том числе и упорядочение хода старения.

ТЕМПОРАЛЬНАЯ ДНК КАК СУБСТРАТ ДЛЯ ПЛАНЕТАРНОГО МЕТРОНОМА В ЕГО КОНТРОЛЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ РАЗНЫХ ПЕРИОДОВ ОНТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ЦИКЛА, ВКЛЮЧАЯ СТАРЕНИЕ И ПЖ

Основные периоды онтогенетического цикла многоклеточного животного организма включают развитие, рост, половое созревание, продолжительность репродуктивной жизни и пострепродуктивного периода жизни. Все эти процессы являются примерами время-зависимых изменений, их текущее изучение сосредоточено в основном на межорганных связях и регуляции размеров тела [51, 52]. Все больше данных в этой области указывают на ключевую роль эпигенома в регуляции генов в гипоталамусе и гипофизе [53].

В настоящей работе предлагается темпоральный механизм, объясняющий с единой позиции регуляцию продолжительности жизни животных и происхождение их старения. Предполагается, что по крайней мере позвоночные животные для регуляции во времени деталей своего онтогенетического цикла используют две важные сущности – метрономную систему и специализированную тДНК. Совместно они выполняют функцию хронографа, отмечающего пройденную часть онтогенетического цикла, т.е. продолжительность уже прожитого организмом времени.

Что заставляет организм животного или человека, только что завершившего развитие и рост, генерировать условия, чреватые

отклонениями, ведущими к старению? Почему организм не может остановиться на достигнутом? Как именно и каким способом регламентируется продолжительность взрослой репродуктивной жизни, а также и других основных периодов онтогенетического цикла?

Все периоды онтогенеза осуществляются, как известно, при участии множества генов и сигнальных путей, но, как здесь постулируется, они находятся под интеграционным контролем особого механизма, который в своей работе использует несколько совершенно разнородных компонентов, выполняющих единую функцию. К ним относятся: 1) желудочки мозга (вентрикулярная система), 2) темпоральная ДНК (тДНК), специализирующаяся на учете хода времени в онтогенезе, и 3) планета Земля, постоянно совершающая небольшие осциллирующие движения в ходе своего основного орбитального движения вокруг Солнца. Представление об этом механизме, названном метрономным по его ключевой функции, предлагается здесь в качестве фундамента недостающего пока объяснения происхождения организменного старения и путей регуляции видовой ПЖ.

Каждому периоду онтогенеза соответствует своя последовательность тДНК. «Расходование» тДНК (в виде ее эпигенетического маркирования) происходит в нейронах, или хрононейронах, специализирующихся на контроле течения онтогенетического времени. Эпигенетическое маркирование сайтов тДНК, отвечающих за контроль продолжительности периода взрослой репродуктивной жизни, снижает эффективность функционирования генов, работа которых модулируется регуляторными РНК, транскрибируемыми с матриц тДНК. Снижение продуктивности маркируемой тДНК (в отношении, возможно, и состава, и концентрации ее транскриптов) могло бы быть связано не только с модификацией ее промоторов, но и других последовательностей тДНК. Суммарно эти процессы ведут к формированию возраст-зависимых дисфункций в организме, т.е. к старению. Старение характеризуется, среди прочего, потерей оптимальных взаимодействий между клетками в разных тканях и органах и ослаблением их координации. Так, например, два наиболее распространенных возрастных нейродегенеративных заболевания — болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона — характеризуются синаптической дисфункцией, а это ведет к потере контроля над мишенями [54].

Следует подчеркнуть, что координирующие функции транскриптов, кодируемых тДНК, вероятно, лишь в малой мере имеют шанс про-

являть свои координирующие свойства в клеточной культуре и, наоборот, в наибольшей степени — в целостном организме.

Геронтологи неоднократно предлагали рассматривать старение как следствие процесса развития [13, 55–59], в том числе развивая идеи Дильмана относительно роли гипоталамуса в старении.

Почему отбор не может устранить старение как неадаптивное явление? Вряд ли из-за «заботы» о защите экологической ниши от переполнения. Истинная причина существования старения подавляющего большинства видов животных (и человека), как можно предположить, заключается в совершенно другом: физически один и тот же субстрат в виде тДНК отвечает как за продолжительность репродуктивной производительности организма, так и у большинства видов за ПЖ. Что касается значительного увеличения пострепродуктивной продолжительности жизни, например, у человека и косаток, то это, вероятно, есть просто вторичное приобретение, созданное естественным отбором в качестве ответа на пользу длительной заботы родителей о потомстве [60].

Работа программы продолжительности репродуктивной жизни как части программы онтогенетического цикла животных осуществляется на уровне нейронов (хрононейронов), обрабатывающих сигналы метронома, поступающие из вентрикулярной системы. В хрононейронах с каждым ударом метронома имеет место один акт последовательной эпигенетической модификации очередного сайта их тДНК. Это происходит на уровне промотора или другой специфической последовательности тДНК. В ходе выполнения репродуктивного периода онтогенетического цикла указанный процесс эпигенетической модификации тДНК мог бы вести, в частности, к постепенному ослаблению деятельности некоторых ингибиторных путей регуляции, вызывая в ответ, например, неблагоприятное для организма гиперфункционирование соответствующих процессов. Другие эпигенетические модификации могли бы вести к потере эффективного протеостаза и иным неблагоприятным для выживания событиям.

Важно подчеркнуть, что при этом непрерывно работает адаптивная программа регуляции продолжительности фертильного периода, поддерживаемая естественным отбором. При таком раскладе вред для организма оказывается прямым побочным следствием указанной пользы. Таким образом, как упомянуто выше, процесс последовательного эпигенетического маркирования тДНК, выполняя программу продолжительности репродуктивной

жизни, оказывается вынужденным параллельно вызывать старение, а затем и дряхление организма. Ярким примером отклонения от подобного сценария являются случаи острого феноптоза, такие как, например, запрограммированная гибель тихоокеанских лососей сразу после нереста, осуществляемая ради успешного выживания их потомства [8].

На исполнение функции тДНК могли бы, в частности, претендовать некоторые сегменты хромосом, которые у животных ассоциированы с их продолжительностью жизни. Так, например, при поисках мышинных локусов, ассоциированных с долгожительством, проводившихся в ходе межвидовых сравнений генетически гетерогенных мышей с геномами других млекопитающих, были идентифицированы несколько частей генома, влияющих на продолжительность жизни мышей. Эти хромосомные участки оказались большими. Одна часть хромосомы 12 влияла на продолжительность жизни у всех мышей. На ожидаемую продолжительность жизни самок также влиял участок мышинной хромосомы 3. Некоторые из этих генетических признаков различались у самцов и самок мышей, а некоторые влияли на продолжительность жизни только после определенного возраста [14].

Как правило, генетическая картография долголетия направлена на поиски генов, сочетаний генов и генетических путей, отвечающих за долголетие [61–64]. Анализ продолжительности жизни дрозофилы показал, что большинство локусов ПЖ пол-специфичны [65]. С одной стороны, бесконечный поиск соответствующих генов вполне оправдан, поскольку и старение, и долголетие – очень сложные признаки, в реализацию которых вовлечено множество процессов. Однако можно предположить, что применительно к контролю величины ПЖ Природа пошла в эволюции по новому пути. Сформировалась особая фракция ДНК, которая, помимо кодирования регуляторных продуктов, выполняет принципиально новую миссию – она играет роль своеобразного «расходного» материала. Точнее, роль этой тДНК частично похожа на роль ленты для диктофона. По сути, организм использует эту ДНК как ленту своеобразного хронографа. Эпигенетически маркируя тДНК, он учитывает величину того интервала времени, которое уже истекло в ходе выполнения организмом прожитой части его сложного онтогенетического цикла.

Поскольку старение – зависящее от времени функциональное изменение многих процессов [15], представляется оправданным предположить, что именно способность оце-

нивать ход времени является центральной для понимания проблемы старения и организации продолжительности жизни организмов.

Что закодировано в тДНК? Наиболее вероятно, что ее экспрессия сопряжена с поставкой к мишеням нейронов таких факторов, как нейрорепептиды, нейромедиаторы, регуляторные РНК и др., с участием которых, специализированные на темпоральный контроль нейроны (хрононейроны) обеспечивают регуляцию подчиненных им мишеней, включая клетки автономной нервной системы и другие системы, которые, в свою очередь, важны для согласованной работы всех тканей и органов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Цель живой природы – поддержание жизни. Этой цели подчинена и структура онтогенетического цикла каждого вида. Соотношение величин отдельных темпоральных периодов этого цикла согласовано между собой и в конечном счете подчинено решению главной задачи – обеспечению размножения вида. Естественный отбор работает на главную цель жизни, на ее вечное продолжение, и только поэтому он пренебрегает параллельным появлением возрастных патологий.

При прочих равных условиях, оперируя именно с тДНК, отбор может создавать вариации, характерные для видов с большой и малой ПЖ, с их часто радикальными различиями по численности потомства. Большинство видов с короткой продолжительностью жизни имеют много потомков, а виды с большой продолжительностью жизни имеют мало потомства, и этих животных, согласно их разным типам онтогенетического цикла, относят к R- и K-стратегам соответственно [66, 67]. Отбор на отсроченное воспроизводство обычно создает популяции с повышенной продолжительностью жизни, и эти популяции часто демонстрируют повышенную плодовитость в конце жизни [68]. Сообщалось, что селективное размножение мышей с повышенным репродуктивным долголетием приводило к коррелированному улучшению репродуктивного долголетия и увеличению ПЖ [69]. Исследование исторических данных, касающихся Самских женщин, обнаружило, что естественный отбор благоприятствовал более раннему началу и более позднему прекращению размножения. Хотя общая плодовитость не была связана с продолжительностью жизни, но женщины, давшие последнее потомство в продвинутом возрасте, также жили дольше всех,

т.е. репродуктивное долголетие и продолжительность жизни взрослого человека в этих популяциях были сопряжены [70].

Признаки старения и механизмы, усугубляющие состояние стареющего организма [15, 71], представляют собой, как можно предположить, следствие некоего первичного процесса, который ранее не учитывался в теориях старения. В настоящей работе постулированы два взаимодополняющих и незаменимых фактора онтогенеза, важных для понимания видовых лимитов продолжительности жизни и происхождения старения. Предполагается, что существует темпоральная программа продолжительности взрослой репродуктивной жизни, и что селекция способствует репродуктивному долголетию, коррелирующему с продолжительностью жизни.

Что касается инфрадианных биоритмов как иногда предполагаемой основы темпоральной разметки онтогенеза, то сама их стабильность, вероятно, зависит от экзогенных геофизических синхронизаторов. Это резко ограничивает возможности использования эндогенных биоритмов как реперных точек онтогенеза. Применимость в дикой природе для той же цели циркадианных ритмов еще менее вероятна для большинства долгоживущих видов ввиду чрезмерно короткого периода таких ритмов. Метрономная система, предложенная здесь, полностью свободна от подобных ограничений.

В рассматриваемом контексте важен еще один вопрос — за счет чего взрослая жизнь может оказываться несколько длиннее репродуктивной? Ответ состоит в следующем. Для эффективности репродуктивной жизни организм должен иметь достаточно высокую жизнеспособность. Поэтому к концу завершения репродуктивной жизни у организма должна еще оставаться небольшая фракция темпоральной ДНК, все еще продолжающая экспрессироваться. Если ПЖ существенно длиннее фертильного периода, как в вышеупомянутом случае с косатками и людьми, то тут эффект связан, по-видимому, с дополнительной работой отбора.

Только лишаясь в продвинутом возрасте достаточного уровня координирующей поддержки нейрональных факторов (эта поддержка со стороны эпигенетически модифицируемой тДНК с течением времени постепенно снижается), некоторые гены, возможно, могли бы начинать вести себя как вредные, проявляя признаки антагонистической плейотропии. В самих генах никакой вредоносности нет, вредна лишь утрата их согласованных действий на фоне дефицита факторов, контролируемых тДНК.

При прочих равных условиях, чем больше хрононейронов заложено в ходе развития, тем больше может оказаться ПЖ. Причина некоторого увеличения ПЖ в этом случае заключается в том, что суммарный уровень нейрональных продуктов (нейропептиды, микроРНК и др.) вблизи их мишеней будет выше при большей численности хрононейронов, чем при небольшой.

Калорийно ограниченная диета замедляет эпигенетическую реализацию сигналов, поступающих из метрономной системы, и поэтому увеличивает ПЖ. Вносят вклад и другие факторы, такие как измененная в условиях этого дефицита активность митохондрий и гормонов, но все эти факторы вторичны по отношению к роли частоты ударов и запаса тДНК. Хотя известно, например, что мыши с генетическим дефектом или резистентностью к гормону роста живут дольше, чем их нормальные братья и сестры [72], основной причиной эффекта увеличения ПЖ в этой ситуации является, возможно, замедленный процесс эпигенетического маркирования тДНК.

В ходе эволюции отбор, вероятно, должен был способствовать снижению чувствительности тех сенсорных систем, которые позволяют мозгу осознавать влияние скачкообразных изменений в ориентации Земли в пространстве. Слишком высокая чувствительность всех сенсоров мозга по отношению к движениям Земли, отражающимся на гидродинамическом поведении спинномозговой жидкости, мешала бы сознанию, доставляя массу неудобств и работая как контрадаптивный механизм, систематически вызывающий беспричинное беспокойство или нарушения жизнедеятельности.

Существенно отметить, что движения самого организма несопоставимо медленнее, чем мгновенные смещения осциллирующей планеты. Поэтому самостоятельные передвижения организма не способны систематически влиять на генерацию метрономных сигналов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В этой работе рассмотрен механизм, объясняющий с единой позиции происхождение старения и регуляцию продолжительности жизни животных и человека. Предполагается, что они используют для регуляции своего развития во времени, т.е. для темпоральной регуляции онтогенетического цикла, две важные сущности — метрономную систему и специализированную на учет хода времени темпоральную ДНК. На выполнение каждого периода онтогенеза в геноме каждого вида эволюцией

отведена определенная длина тДНК, хотя и с некоторыми индивидуальными отклонениями в сторону ее уменьшения или увеличения. Она специфична в отношении отдельных периодов онтогенеза. Видовая тДНК и метроном с его видоспецифической частотой ударов, на которую эволюционно настроена система их восприятия у каждого вида, в совокупности выполняют функцию хронографа. Он записывает выполненную на данный момент часть онтогенетического цикла, фиксируя уже прожитый организмом срок его жизни.

В структурах и функциях животного организма, уже завершившего развитие и рост, наблюдаются отклонения, ведущие к старению. Это происходит потому, что процесс старения обусловлен теми же эпигенетическими модификациями той тДНК, которая используется для адаптивно ценного контроля над продолжительностью репродуктивной жизни. Представление об этом предлагается здесь и как объяснение первопричины организменного старения, и как путь регуляции видовой продолжительности жизни. Старение в подавляющем большинстве случаев – процесс явно неадаптивный, но, являясь итогом работы адаптивной программы продолжительности репродуктивной жизни, закодированной в тДНК, он становится вынужденным побочным феноменом. Поддерживая метроном-зависимое выполнение полезной программы продолжительности репродуктивной жизни, естественный отбор не имеет возможности отвергнуть старение именно потому, что оба процесса выполняются с участием общего для них субстрата – одной и той же последовательности тДНК. Итак, следует подчеркнуть, что самостоятельной программы старения для большинства видов животных не

существует, а упорядоченность процессов старения во времени есть следствие выполнения организмом программы продолжительности репродуктивной жизни.

Система желудочков как полостей вентрикулярной системы мозга является органом, который был создан эволюцией, по-видимому, в первую очередь ради работы метрономной системы и темпоральной разметки онтогенеза. Вероятно, именно ради этого нервная система как архитектура развивается в эмбриогенезе на основе нервной трубки, на базе которой формируются не только отделы мозга, но система циркуляции спинномозговой жидкости, без которой метроном работать не может.

При выполнении своей функции метрономная система использует небольшие колебания, совершаемые нашей планетой. Ранее я рассмотрел роль неравномерных движений Земли, которыми могут пользоваться растения в их сложном процессе ориентации относительно вектора силы тяжести [73]. Здесь роль движений планеты предложена в связи с потребностями темпоральной организации онтогенетического цикла животных. Если предлагаемый механизм правильный, то контроль над процессом старения возможен через управление предложенной здесь новой физиологической системой – метрономной.

Благодарности. Выражаю благодарность А.И. Калмыковой и И.А. Оловникову за помощь в редактировании, за советы и обсуждение.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Работа выполнена без привлечения животных и людей в качестве испытуемых.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Medvedev, Z. A. (1990) An attempt at a rational classification of theories of ageing, *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, **65**, 375-398, doi: 10.1111/j.1469-185x.1990.tb01428.x.
2. Kirkwood, T. B. (2011) Systems biology of ageing and longevity, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B Biol. Sci.*, **366**, 64-70, doi: 10.1098/rstb.2010.0275.
3. Khokhlov, A. N. (2013) Does aging need its own program, or is the program of development quite sufficient for it? Stationary cell cultures as a tool to search for anti-aging factors, *Curr. Aging Sci.*, **6**, 14-20, doi: 10.2174/18746098112059990009.
4. Olovnikov, A. M. (2022) Aging theories, *Encyclopedia of Gerontology and Population Aging*, Springer International Publishing, doi: 10.1007/978-3-030-22009-9_32.
5. Weismann, A. (1889) *Essays upon Heredity and Kindred Biological Problems*, Clarendon Press, Oxford.
6. Kirkwood, T. B., and Cremer, T. (1982) Cytogerontology since 1881: a reappraisal of August Weismann and a review of modern progress, *Hum. Genet.*, **60**, 101-121, doi: 10.1007/BF00569695.
7. Libertini, G., Corbi, G., Conti, V., Shubernetskaya, O., and Ferrara, N. (2021) *Evolutionary Gerontology and Geriatrics: Why and How We Age*, Springer Nature, doi: 10.1007/978-3-030-73774-0_1.
8. Skulachev, V. P. (2012) What is “phenoptosis” and how to fight it? *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 689-706, doi: 10.1134/S0006297912070012.
9. Skulachev, V. P., Shilovsky, G. A., Putyatina, T. S., Popov, N. A., Markov, A. V., Skulachev, M. V.,

- and Sadovnichii, V. A. (2020) Perspectives of *Homo sapiens* lifespan extension: focus on external or internal resources? *Aging (Albany NY)*, **12**, 5566-5584, doi: 10.18632/aging.102981.
10. Gems, D., and de Magalhães, J. P. (2021) The hoverfly and the wasp: a critique of the hallmarks of aging as a paradigm, *Ageing Res. Rev.*, **70**, 101407, doi: 10.1016/j.arr.2021.101407.
 11. Gladyshev, V. N. (2016) Aging: progressive decline in fitness due to the rising deleteriome adjusted by genetic, environmental, and stochastic processes, *Aging Cell*, **15**, 594-602, doi: 10.1111/ace1.12480.
 12. Gems, D. (2022) The hyperfunction theory: an emerging paradigm for the biology of aging, *Ageing Res. Rev.*, **74**, 101557, doi: 10.1016/j.arr.2021.101557.
 13. Blagosklonny, M. V. (2022) Hallmarks of cancer and hallmarks of aging, *Aging (Albany NY)*, **14**, 4176-4187, doi: 10.18632/aging.204082.
 14. Bou Sleiman, M., Roy, S., Gao, A. W., Sadler, M. C., von Alvensleben, G. V. G., Li, H., Sen, S., Harrison, D. E., Nelson, J. F., Strong, R., Miller, R. A., Kutalik, Z., Williams, R. W., and Auwerx, J. (2022) Sex- and age-dependent genetics of longevity in a heterogeneous mouse population, *Science*, **377**, eabo3191, doi: 10.1126/science.abo3191.
 15. Lopez-Otin, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G. (2013) The hallmarks of aging, *Cell*, **153**, 1194-1217, doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039.
 16. Sibois, A. E., Desai, S. D., Bertiger, W., and Haines, B. J. (2017) Analysis of decade-long time series of GPS-based polar motion estimates at 15-min temporal resolution, *J. Geodesy*, **91**, 965-983, doi: 10.1007/S00190-017-1001-6.
 17. Zajdel, R., Sośnica, K., Bury, G., Dach, R., Prange, L., and Kazmierski, K. (2021) Sub-daily polar motion from GPS, GLONASS, and Galileo, *J. Geodesy*, **95**, 1-27, doi: 10.1007/S00190-020-01453-W.
 18. Bizouard, C. (2020) *Geophysical Modelling of the Polar Motion*, de Gruyter GmbH & Co KG.
 19. Dehant, V., Mathews, P. M. (2015) *Precession, Nutation, and Wobble of the Earth*, Cambridge University Press.
 20. Loper, D. E. (2017) *Geophysical Waves and Flows. Theory and Applications in the Atmosphere, Hydrosphere and Geosphere*, Cambridge University Press.
 21. Sidorenkov, N. S. (2009) *The Interaction Between Earth's Rotation and Geophysical Processes*, John Wiley & Sons.
 22. Wei, E., Jin, S., Wan, L., Liu, W., Yang, Y., and Hu, Z. (2015) High frequency variations of Earth Rotation Parameters from GPS and GLONASS observations, *Sensors (Basel, Switzerland)*, **15**, 2944-2963, doi: 10.3390/S150202944.
 23. Amoruso, A., and Crescentini, L. (2020) Parameters of the Earth's free core nutation from diurnal strain tides, *Sci. Rep.*, **10**, 9756, doi: 10.1038/s41598-020-66426-7.
 24. Triana, S. A., Trinh, A., Requier, J., Zhu, P., and Dehant, V. (2021) The viscous and ohmic damping of the Earth's free core nutation, *J. Geophys. Res. Solid Earth*, **126**, e2020JB021042, doi: 10.1029/2020JB021042.
 25. Krylov, S. S., Perepelkin, V. V., and Soe, W. Y. (2021) Short-term forecast of the Earth's pole motion, taking into account lunar disturbances, *Mech. Solids*, **55**, 892-897, doi: 10.3103/S002565442006014X.
 26. Requier, J. (2022) Free core nutation and its relation to the spin-over mode, *Planet. Sci. J.*, **3**, 133, doi: 10.3847/PSJ/AC6CE2.
 27. Requier, J., Chao, B. F., Chen, J., Dehant, V., Rosat, S., and Zhu, P. (2021) Earth's rotation: observations and relation to deep interior, *Surveys Geophys.*, **43**, 149-175, doi: 10.1007/S10712-021-09669-X.
 28. Zotov, L., Bizouard, C., Shum, C. K., Zhang, C., Sidorenkov, N., and Yushkin, V. (2022) Analysis of Earth's polar motion and length of day trends in comparison with estimates using second degree stokes coefficients from satellite gravimetry, *Adv. Space Res.*, **69**, 308-318, doi: 10.1016/J.ASR.2021.09.010.
 29. Akulenko, L. D., Kumakshev, S. A., Markov, Y. G., and Rykhlova, L. V. (2005) A gravitational-tidal mechanism for the Earth's polar oscillations, *Astron. Rep.*, **49**, 847-857, doi: 10.1134/1.2085254.
 30. Perepelkin, V. V., Rykhlova, L. V., and Soe, W. Y. (2022) In-phase variations in the parameters of the Earth's pole motion and the lunar orbit precession, *Astron. Rep.*, **66**, 80-91, doi: 10.1134/S1063772922020081.
 31. Markov, Y. G., Perepelkin, V. V., Rykhlova, L. V., Filippova, A. S., and Le Zung, N. (2014) Modeling intraday oscillations of the Earth's pole, *Astron. Rep.*, **58**, 194-203, doi: 10.1134/S106377291402005X.
 32. Bizouard, C., Nurul Huda, I., Ziegler, Y., and Lambert, S. (2020) Frequency dependence of the polar motion resonance, *Geophys. J. Int.*, **220**, 753-758, doi: 10.1093/GJI/GGZ463.
 33. Ziegler, Y., Lambert, S. B., Nurul Huda, I., Bizouard, C., and Rosat, S. (2020) Contribution of a joint Bayesian inversion of VLBI and gravimetric data to the estimation of the free inner core nutation and free core nutation resonance parameters, *Geophys. J. Int.*, **222**, 845-860, doi: 10.1093/GJI/GGAA181.
 34. Dehant, V., Laguerre, R., Requier, J., Rivoldini, A., Triana, S. A., Trinh, A., Van Hoolst, T., and Zhu, P. (2017) Understanding the effects of the core on the nutation of the Earth, *Geodesy Geodynam.*, **8**, 389-395, doi: 10.1016/J.GEOG.2017.04.005.
 35. Kumakshev, S. A. (2018) Gravitational-tidal model of oscillations of Earth's poles, *Mech. Solids*, **53**, 159-163, doi: 10.3103/S0025654418020061.
 36. Chao, B. F. (2017) On rotational normal modes of the Earth: Resonance, excitation, convolution, deconvolution and all that, *Geodesy Geodynam.*, **8**, 371-376, doi: 10.1016/J.GEOG.2017.03.014.
 37. Yatskiv, Y. S. (1980) Nearly Diurnal Free Polar Motion Derived from Astronomical Latitude and Time

- Observations, in *Nutation and the Earth's Rotation. International Astronomical Union/Union Astronomique Internationale* (Fedorov, E. P., Smith, M. L., Bender, P. L., eds) vol. 78, Springer, Dordrecht, doi: 10.1007/978-94-010-9568-6_11.
38. Kumar, V., Umair, Z., Kumar, S., Goutam, R. S., Park, S., and Kim, J. (2021) The regulatory roles of motile cilia in CSF circulation and hydrocephalus, *Fluids Barr. CNS*, **18**, 31, doi: 10.1186/s12987-021-00265-0.
 39. Sawamoto, K., Wichterle, H., Gonzalez-Perez, O., Cholfin, J. A., Yamada, M., Spassky, N., Murcia, N. S., Garcia-Verdugo, J. M., Marin, O., Rubenstein, J. L., Tessier-Lavigne, M., Okano, H., and Alvarez-Buylla, A. (2006) New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain, *Science*, **311**, 629-632, doi: 10.1126/science.1119133.
 40. Ringers, C., Olstad, E. W., and Jurisch-Yaksi, N. (2020) The role of motile cilia in the development and physiology of the nervous system, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B. Biol. Sci.*, **375**, 20190156, doi: 10.1098/rstb.2019.0156.
 41. Olstad, E. W., Ringers, C., Hansen, J. N., Wens, A., Brandt, C., Wachten, D., Yaksi, E., and Jurisch-Yaksi, N. (2019) Ciliary beating compartmentalizes cerebrospinal fluid flow in the brain and regulates ventricular development, *Curr. Biol.*, **29**, 229-241. e226, doi: 10.1016/j.cub.2018.11.059.
 42. Vigh, B., Manzano e Silva, M. J., Frank, C. L., Vincze, C., Czirok, S. J., Szabo, A., Lukats, A., and Szel, A. (2004) The system of cerebrospinal fluid-contacting neurons. Its supposed role in the nonsynaptic signal transmission of the brain, *Histol. Histopathol.*, **19**, 607-628, doi: 10.14670/HH-19.607.
 43. Vigh-Teichmann, I., and Vigh, B. (1983) The system of cerebrospinal fluid-contacting neurons, *Arch. Histol. Japon.*, **46**, 427-468, doi: 10.1679/AOHC.46.427.
 44. Jalalvand, E., Robertson, B., Tostivint, H., Low, P., Wallen, P., and Grillner, S. (2018) Cerebrospinal fluid-contacting neurons sense pH changes and motion in the hypothalamus, *J. Neurosci.*, **38**, 7713-7724, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3359-17.2018.
 45. Yildiz, S., Grinstead, J., Hildebrand, A., Oshinski, J., Rooney, W. D., Lim, M. M., and Oken, B. (2022) Immediate impact of yogic breathing on pulsatile cerebrospinal fluid dynamics, *Sci. Rep.*, **12**, 10894, doi: 10.1038/s41598-022-15034-8.
 46. Kedarasetti, R. T., Drew, P. J., and Costanzo, F. (2020) Arterial pulsations drive oscillatory flow of CSF but not directional pumping, *Sci. Rep.*, **10**, 10102, doi: 10.1038/s41598-020-66887-w.
 47. Siyahhan, B., Knobloch, V., de Zelicourt, D., Asgari, M., Schmid Daners, M., Poulikakos, D., and Kurtcuoglu, V. (2014) Flow induced by ependymal cilia dominates near-wall cerebrospinal fluid dynamics in the lateral ventricles, *J. R. Soc. Interf.*, **11**, 20131189, doi: 10.1098/rsif.2013.1189.
 48. Salman, H. E., Jurisch-Yaksi, N., and Yalcin, H. C. (2022) Computational modeling of motile cilia-driven cerebrospinal flow in the brain ventricles of zebrafish embryo, *Bioengineering*, **9**, 421, doi: 10.3390/bioengineering9090421.
 49. Faubel, R. J., Santos Canellas, V. S., Gaesser, J., Beluk, N. H., Feinstein, T. N., Wang, Y., Yankova, M., Karunakaran, K. B., King, S. M., Ganapathiraju, M. K., and Lo, C. W. (2022) Flow blockage disrupts cilia-driven fluid transport in the epileptic brain, *Acta Neuropathol.*, **144**, 691-706, doi: 10.1007/s00401-022-02463-y.
 50. Ohata, S., Herranz-Perez, V., Nakatani, J., Boletta, A., Garcia-Verdugo, J. M., and Alvarez-Buylla, A. (2015) Mechanosensory genes Pkd1 and Pkd2 contribute to the planar polarization of brain ventricular epithelium, *J. Neurosci.*, **35**, 11153-11168, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0686-15.2015.
 51. Texada, M. J., Koyama, T., and Rewitz, K. (2020) Regulation of body size and growth control, *Genetics*, **216**, 269-313, doi: 10.1534/genetics.120.303095.
 52. Malita, A., and Rewitz, K. (2021) Interorgan communication in the control of metamorphosis, *Curr. Opin. Insect Sci.*, **43**, 54-62, doi: 10.1016/j.cois.2020.10.005.
 53. Shalev, D., and Melamed, P. (2020) The role of the hypothalamus and pituitary epigenomes in central activation of the reproductive axis at puberty, *Mol. Cell Endocrinol.*, **518**, 111031, doi: 10.1016/j.mce.2020.111031.
 54. Wakhloo, D., Oberhauser, J., Madira, A., and Mahajani, S. (2022) From cradle to grave: neurogenesis, neuroregeneration and neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases, *Neural Regen. Res.*, **17**, 2606-2614, doi: 10.4103/1673-5374.336138.
 55. Dilman, V. M. (1971) Age-associated elevation of hypothalamic, threshold to feedback control, and its role in development, ageing, and disease, *Lancet*, **1**, 1211-1219, doi: 10.1016/s0140-6736(71)91721-1.
 56. Zwaan, B. J. (2003) Linking development and aging, *Sci. Aging Knowledge Environ.*, **2003**, pe32, doi: 10.1126/sageke.2003.47.pe32.
 57. Partridge, L., and Gems, D. (2002) A lethal side-effect, *Nature*, **418**, 921, doi: 10.1038/418921a.
 58. Dilman, V. M. (1994) *Development, Aging and Disease: A New Rationale for an Intervention Strategy*, Routledge.
 59. De Magalhães, J. P., and Church, G. M. (2005) Genomes optimize reproduction: aging as a consequence of the developmental program, *Physiology (Bethesda)*, **20**, 252-259, doi: 10.1152/physiol.00010.2005.
 60. Khan, N., Kim, S. K., Gagneux, P., Dugan, L. L., and Varki, A. (2020) Maximum reproductive lifespan correlates with CD33rSIGLEC gene number: Implications for NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in aging, *FASEB J.*, **34**, 1928-1938, doi: 10.1096/fj.201902116R.

61. Hook, M., Roy, S., Williams, E. G., Bou Sleiman, M., Mozhui, K., Nelson, J. F., Lu, L., Auwerx, J., and Williams, R. W. (2018) Genetic cartography of longevity in humans and mice: current landscape and horizons, *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis Dis.*, **1864**, 2718-2732, doi: 10.1016/j.bbadis.2018.01.026.
62. Capri, M., Santoro, A., Garagnani, P., Bacalini, M. G., Pirazzini, C., Olivieri, F., Procopio, A., Salvioli, S., and Franceschi, C. (2014) Genes of human longevity: an endless quest? *Curr Vasc. Pharmacol.*, **12**, 707-717, doi: 10.2174/15701611116666131219110301.
63. Brooks-Wilson, A. R. (2013) Genetics of healthy aging and longevity, *Hum. Genet.*, **132**, 1323-1338, doi: 10.1007/s00439-013-1342-z.
64. Caruso, C., Ligotti, M. E., Accardi, G., Aiello, A., Duro, G., Galimberti, D., and Candore, G. (2022) How important are genes to achieve longevity? *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 5635, doi: 10.3390/ijms23105635.
65. Nuzhdin, S. V., Pasyukova, E. G., Dilda, C. L., Zeng, Z. B., and Mackay, T. F. (1997) Sex-specific quantitative trait loci affecting longevity in *Drosophila melanogaster*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 9734-9739, doi: 10.1073/pnas.94.18.9734.
66. Van Bodegom, D., May, L., Meij, H. J., and Westendorp, R. G. (2007) Regulation of human life histories: the role of the inflammatory host response, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1100**, 84-97, doi: 10.1196/annals.1395.007.
67. Reznick, D., Bryant, M. J., and Bashey, F. (2002) R- and K-selection revisited: the role of population regulation in life-history evolution, *Ecology*, **83**, 1509-1520, doi: 10.2307/3071970.
68. McHugh, K. M., and Burke, M. K. (2022) From microbes to mammals: the experimental evolution of aging and longevity across species, *Evolution*, **76**, 692-707, doi: 10.1111/evo.14442.
69. Nagai, J., Lin, C. Y., and Sabour, M. P. (1995) Lines of mice selected for reproductive longevity, *Growth Dev. Aging*, **59**, 79-91.
70. Helle, S., Lummaa, V., and Jokela, J. (2005) Are reproductive and somatic senescence coupled in humans? Late, but not early, reproduction correlated with longevity in historical Sami women, *Proc. Biol. Sci.*, **272**, 29-37, doi: 10.1098/rspb.2004.2944.
71. Campisi, J., Kapahi, P., Lithgow, G. J., Melov, S., Newman, J. C., and Verdin, E. (2019) From discoveries in ageing research to therapeutics for healthy ageing, *Nature*, **571**, 183-192, doi: 10.1038/s41586-019-1365-2.
72. Bartke, A. (2022) Somatotropic axis, pace of life and aging, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, **13**, 916139, doi: 10.3389/fendo.2022.916139.
73. Olovnikov, A. M. (2021) Role of the Earth's Motions in plant orientation – planetary mechanism, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 1388-1394, doi: 10.1134/S0006297921110031.

PLANETARY METRONOME AS A REGULATOR OF LIFESPAN AND AGING RATE: METRONOMIC HYPOTHESIS

A. M. Olovnikov

*N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences,
119334 Moscow, Russia; E-mail: olovnikov@gmail.com*

The metronome mechanism for controlling the duration of periods of the ontogenetic cycle of an animal organism is proposed. The metronome system consists of a series of components. Among them: the ventricular system of a brain, the planet Earth as a participant in the generation of metronome signals and the temporal DNA (tDNA) as a substrate epigenetically labeled to account for the elapsed time of ontogeny. The metronome system generates repetitive signals in the form of hydrodynamic perturbations in the cerebrospinal fluid (CSF). The metronome effect arises due to the superposition of two processes – the near-wall unidirectional CSF flow and oscillations in the motions of the planet. Hydrodynamic beats of the metronome are transformed into nerve impulses that initiate acts of epigenetic modification of tDNA in neurons, changing the content of factors expressed by this DNA for innervated targets of the body. Duration of the periods of the ontogenetic cycle, including the duration of adult life, depends on the rate of tDNA modification acts. This rate depends mainly on the frequency of the metronomic signals used by each particular biological species. But these epigenetic acts can also be influenced by factors that can modulate metabolism and the rate of chromatin modifications, such as a calorie-restricted diet, etc.

Keywords: ontogeny, aging, theories of aging, ventricular system of the brain, CSF-contacting neurons, hypothalamus, Earth motions, nutations, polar motion

ВЫЯСНЕНИЕ РОЛИ АДАПТЕРНОГО БЕЛКА Anks1a В РЕГУЛЯЦИИ ПОДВИЖНОСТИ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

© 2022 А.О. Жолудева¹, М.Е. Ломакина^{1,2}, Е.А. Орлова¹, Я. Ванг², А. Фокин²,
А. Полесская², А.М. Готро², А.Ю. Александрова^{1*}

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, 115478 Москва, Россия; электронная почта: tonya_alex@yahoo.com

² Национальный центр научных исследований Франции, Политехническая школа,
Парижский политехнический институт, 91120 Палезо, Франция

Поступила в редакцию 20.09.2022

После доработки 30.10.2022

Принята к публикации 31.10.2022

Критическим этапом опухолевой прогрессии является эпителиально-мезенхимальный переход, в результате которого опухолевые клетки (ОК) приобретают способность к мезенхимальной миграции, основным регулятором которой является сигнальный путь Ras→WAVE→Arp2/3. Ранее было показано, что белки, взаимодействующие с Ras, могут регулировать мезенхимальную миграцию и влиять на эффективность метастазирования. Поиск новых регуляторов миграции является актуальной теоретической и практической задачей. Одним из белков, взаимодействующих с Ras, является адаптерный белок Anks1a, изменение экспрессии которого показано для многих опухолей. Задачей исследования было выяснение вопроса, влияет ли Anks1a на подвижность ОК и каков механизм его действия. Предполагается, что Anks1a может оказывать влияние на миграцию ОК либо как эффектор Ras1, либо за счет усиления интенсивности обмена рецепторов к эпидермальному фактору роста HER2. Был исследован эффект усиления и подавления экспрессии Anks1a на миграцию клеток рака молочной железы (МЖ) с разным статусом HER2. Показано, что Anks1a взаимодействует с активированной формой Ras1. В линии MDA-MB-231 (тройной негативный рак), в которой отсутствуют HER2, Anks1a накапливается на активном крае клетки, для которого характерно обогащение активным Ras1. Тогда как у клеток SK-BR-3 (HER2 сверхэкспрессирован) не наблюдалось концентрации Anks1a на активном крае. Подавление экспрессии Anks1a практически не влияет на подвижность ОК, лишь немного увеличивается скорость миграции у MDA-MB-231. Сверхэкспрессия Anks1a приводит к увеличению скорости движения лишь у клеток SK-BR-3, т.е. оказывает влияние на миграцию только в том случае, когда есть сверхэкспрессия HER2. Мы показали, что Anks1a является эффектором активированного Ras1, но его влияние в этом качестве на исследованные нами клетки МЖ минимально. Anks1a может оказывать влияние на подвижность клеток МЖ благодаря его участию в механизме обмена рецепторов к EGF.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: Anks1a, клеточная подвижность, рак молочной железы, метастазирование.

DOI: 10.31857/S0320972522120193, **EDN:** NIPAVU

ВВЕДЕНИЕ

Приобретение клетками подвижного мезенхимального фенотипа в процессе роста злокачественной опухоли является следствием эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) и одним из ключевых событий, ведущих к образованию метастазов [1]. Поиск новых подходов, позволяющих остановить ми-

грацию опухолевых клеток и, следовательно, метастазирование – это важнейшая задача, на решение которой направлены работы многих лабораторий. Известно, что в основе клеточного движения лежат перестройки актинового цитоскелета [2], однако попытки остановить миграцию опухолевых клеток с помощью прямого разрушения актиновых филаментов или ингибирования их перестроек оказались

Принятые сокращения: МЖ – молочная железа; ОК – опухолевые клетки; РТК – рецептор тирозин киназы; Anks1a – белок, содержащий анкириновый повтор и стерильный альфа-мотив 1A; EGF – эпидермальный фактор роста; HER2 – рецептор 2 эпидермального фактора роста человека.

* Адресат для корреспонденции.

невозможными из-за очень большой токсичности подобных агентов [3]. Поэтому представляется целесообразным искать более тонкие регуляторы, влияющие на процессы клеточной миграции. Важными регуляторами перестроек актинового цитоскелета и клеточной подвижности являются малые ГТФазы семейства Rho – Cdc42, Rac и Rho [4, 5]. При этом каждая из этих ГТФаз выполняет строго определенные функции, они также взаимно регулируют друг друга. Так, Cdc42 отвечает за формирование филоподий, RhoA способствует росту сократимости, образованию и сокращению актиновых пучков и формированию специфических протрузий – бляшек, являющихся основой амебоидной миграции опухолевых и стволовых клеток [6, 7]. Формирование клеточных протрузий, обеспечивающих мезенхимальную миграцию клеток, – ламеллиподий и филоподий – регулируется сигнальным каскадом Rac→WAVE→Arp2/3, который отвечает за Arp2/3-зависимую полимеризацию актиновых филаментов. Активность многих белков, вовлеченных в этот каскад, изменяется при развитии злокачественных опухолей [8–9]. Было показано, что даже незначительные изменения общей активности Rac оказывают влияние на характер миграции клеток, в частности, регулируют направленность движения клеток разных типов [10]. Значение регуляторного пути Rac1 в опухолевой прогрессии было показано в недавно опубликованной работе, прямо иллюстрирующей вовлечение Rac1 в процесс ЭМП и регуляцию метастазирования [11]. Увеличение экспрессии белка WAVE2, регулирующего активность комплекса Arp2/3, коррелирует с возрастанием риска метастазирования при различных типах опухолей [12–13], а подавление такой экспрессии с помощью РНК-интерференции приводит к существенному снижению метастатической активности клеток рака поджелудочной железы [14–15] и высоко метастазирующих клеток рака молочной железы MDA-MB-231 [14]. Усиление экспрессии кофилина, отвечающего за возобновление пула глобулярного актина, необходимого для дальнейшей полимеризации [16], наблюдается во многих опухолях (в глиомах, при раке легких, раке яичников, плоскоклеточном раке полости рта и др.) [17–18]. Оверэкспрессия регулятора активности кофилина, LIM-киназы 1, отмечена в метастазирующих опухолях молочной железы (МЖ) и простаты [19–20]. Несмотря на огромный интерес к изучению внутриклеточных механизмов, регулирующих движение клеток, многие вопросы исследованы недостаточно, в частности, в последнее время были

открыты новые регуляторы процессов полимеризации актина. Описание таких ранее неизвестных участников процесса представляет отдельный интерес, потому что именно они могут быть использованы в качестве мишеней для разработки противоопухолевых агентов, останавливающих метастазирование. Изменение их экспрессии также может служить полезным прогностическим фактором при выборе стратегии лечения и оценке прогнозов данного конкретного пациента. С целью выявления новых возможных регуляторов клеточной миграции был проведен поиск новых ранее неизвестных эффекторов Rac, и среди прочих белков функция эффектора Rac была показана для белка Anks1a.

Anks1a (Ankyrin Repeat and Sterile Alpha Motif Domain Containing 1A), (другое название – ODIN) – белок, относящийся к семейству Anks1, в состав которого входит всего два белка Anks1a и Anks1b. По своей структуре Anks1a является адаптерным белком, который обеспечивает связь тирозинкиназных рецепторов (РТК) типа EGFR, PDGFR и EphA8, с их эффекторами [21–22]. РТК являются ключевыми регуляторами многих сигнальных путей в клетках, и нарушение их функционирования связано с развитием многих типов опухолей [23–24]. Anks1a активно экспрессируется в клетках млекопитающих, в нервных клетках его экспрессия характерна для эмбриональных клеток мозга мыши, но подавлена в клетках взрослого мозга мыши [25]. Недавнее исследование большой когорты пациентов с немелкоклеточным раком легких на поздних стадиях выявило ANKS1A в числе 17 генов, однонуклеотидный полиморфизм (single nucleotide polymorphisms, SNP) в которых ассоциирован с плохим прогнозом болезни [26]. Подавление экспрессии Anks1a с помощью shRNA в клетках колоректального рака (СТ26 – клетки, полученные из карциномы толстой кишки) и в клетках, полученных из первичных опухолей MMTV-Neu мышей, приводило к снижению способности этих клеток формировать колонии в мягком агаре и к подавлению образования опухолей при перевивке у мышей. Согласно данным Lee et al. [27], подавление Anks1a в клетках карциномы молочной железы SK-BR-3 также приводило к снижению способности этих клеток к образованию колоний в мягком агаре.

Основным механизмом, посредством которого Anks1a участвует в регуляции развития злокачественных новообразований, считается его участие в обмене РТК и вовлечение в сигналинг EphA2/ErbB2. На клетках HEK293 и на линии клеток немелкоклеточного рака легко-

го RVH6849 было показано, что усиленная экспрессия Anks1a приводит к усилению циркуляции EGFR, а подавление экспрессии Anks1a приводит к увеличению скорости деградации EGFR в лизосомах [28]. На основании этих и других данных предложена модель, согласно которой Anks1a выступает как регулятор сигнальных путей, активируемых ростовыми факторами [21, 29].

Играет ли какую-нибудь роль в определении характера миграции и пролиферации опухолевых клеток функция Anks1a в качестве эффектора ГТФазы Ras, остается неизвестным.

Нас интересовало, как влияет изменение экспрессии Anks1a на миграцию клеток опухоли МЖ человека и зависит ли это влияние от статуса рецепторов к EGF в этих клетках. Поэтому мы исследовали эффекты усиления и подавления экспрессии Anks1a на линиях клеток рака молочной железы с разным статусом рецепторов к эпидермальному фактору роста 2 (HER2, human epidermal growth factor receptor-2). Так, линия клеток SK-BR-3 обладает повышенным содержанием HER2, а клетки MDA-MB-231 (тройной негативный рак МЖ) характеризуются отсутствием экспрессии HER2. В качестве контроля мы использовали клетки условно-нормального эпителия молочной железы MCF-10A.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии. Были использованы следующие клеточные линии: MCF-10A — условно нормальные эпителиальные клетки молочной железы человека с нормальной экспрессией HER2, а также их производная — MCF-10A RacQL, для которой характерна экспрессия конститутивно активного Ras (обе линии получены из лаборатории биохимии Политехнической школы, Палезо, Франция), и две клеточные линии аденокарцином МЖ человека — SK-BR-3 («ATCC», США) с амплификацией *HER2/neu* и MDA-MB-231 («ATCC»), относящаяся к тройному негативному типу рака, т.е. не содержащая прогестеронового и эстрогенового рецепторов и не экспрессирующая HER2. Клетки MCF-10A и MCF-10A RacQL культивировали в среде DMEM/F12 («Sigma», США) с добавлением 5% лошадиной сыворотки (Horse Serum, «PAA Laboratories» Австрия), 10 мкг/мл инсулина, 100 нг/мл холерного токсина (Cholera Toxin), 0,5 мкг/мл гидрокортизона и 20 нг/мл EGF («Sigma», США), а также 32,5 мкг/мл NaHCO₃ и антибиотиков (по 100 ед./мл пенициллина и стрептомицина) («ПанЭко», Россия) при 37 °С

во влажной атмосфере в присутствии 5% CO₂. Клеточные линии аденокарцином культивировали в среде DMEM («Sigma», США), содержащей 10% эмбриональной сыворотки теленка («PAA Laboratories») и антибиотиков (по 100 ед./мл пенициллина и стрептомицина), при 37 °С во влажной атмосфере в присутствии 5% CO₂.

Трансфекция плазмидами. Для получения клеток с оверэкспрессией Anks1a проводили трансфекцию клеток линий MCF-10A, SK-BR-3 и MDA-MB-231 плазмидами. За 24 ч до трансфекции клетки пересевали на чашки Петри в полную среду DMEM/F12 в присутствии 5% лошадиной сыворотки и других добавок (см. выше) без антибиотиков, так чтобы к моменту трансфекции клетки образовывали субмонослой. В качестве контрольной плазмиды мы использовали MXS AAVS1L SA2A PurobGHpA EF1Flag GFP Blue SV40pA AAVS1R (1929c), собранную при помощи MXS-клонирования в лаборатории А. Готро [30, 31]. В качестве плазмид, трансфекция которых приводила к оверэкспрессии исследуемого белка, мы использовали два варианта: плазмиды, содержащие последовательности мышиного (1929m) и человеческого (1929h) *ANKS1A*. Для создания плазмиды 1929m кодирующая последовательность *ANKS1A* мыши, любезно предоставленная нам доктором С. Север (Центральная больница штата Массачусетс, Отделение нефрологии, США) [27], была амплифицирована из кДНК (BC050847), полученной при помощи обратной транскрипции из тотальной РНК клеток мыши, а затем клонирована нами по сайтам эндонуклеаз рестрикции FseI и AseI в плазмиду 1929c, вместо бактериального репортера Blue. Кроме того, из кДНК *ANKS1A* (NP_056060), полученной посредством обратной транскрипции из тотальной РНК клеток человека линии MCF-10A при помощи набора NucleoSpin RNA Plus Kit («Macherey-Nagel», Франция), мы выделили мРНК *ANKS1A-ΔC* с отсутствующим участком длиной 60 нуклеотидов на С-конце. Для создания плазмиды 1929h эта кодирующая последовательность была амплифицирована по частям с использованием следующих пар праймеров: прямой — 5'-CCCGGAGACGGAAAGTTTGG-3' и обратный — 5'-GAGGTAGCCCACTCTCTTGC-3'; прямой — 5'-AGCTGGAGGAGACGGGTG-3' и обратный — 5'-GTCTTCAGAGCTGCAGGTGA-3'. Затем последовательность *ANKS1A-ΔC* была отсеквенирована на соответствие мРНК *ANKS1A* (NM_015245) и клонирована в вышеописанную плазмиду 1929c по сайтам FseI и AseI.

Изготовление праймеров и секвенирование проводилось компанией «Eurofins Genomics» (Эберсберг, Германия).

Временную трансфекцию клеток плазмидами проводили с использованием Lipofectamine LTX («Invitrogen», США), согласно протоколу производителя. Спустя сутки инкубации при 37 °С во влажной атмосфере в присутствии 5% CO₂ каждую чашку рассаживали на 3 эксперимента: одну чашку со стеклами для дальнейшего иммунофлуоресцентного окрашивания, другую – для анализа методом Вестерн-блот; и в 4-луночную μ-слайд-камеру («Ibidi», Дания) для съемки на видеомикроскопе.

РНК-интерференция. Для подавления экспрессии исследуемого белка Anks1a использовали малые интерферирующие РНК, подготовленные эндорибонуклеазой, нацеленные на человеческий ген *ANKS1A* (human Anks1a esiRNA, esiAnks1a) («Sigma», Германия); Esi egfr (esiGFP) («Sigma», Германия) в концентрации 320 нМ, использовали в качестве негативного контроля. Для трансфекции использовали Lipofectamine RNAi MAX Reagent («Invitrogen», США) в концентрации, рекомендованной производителем. Спустя сутки инкубации при 37 °С во влажной атмосфере в присутствии 5% CO₂ каждую чашку рассаживали на две в полную среду, добавляя в одну из чашек ростовой фактор EGF; еще через сутки чашки рассаживали для дальнейшего иммунофлуоресцентного окрашивания, анализа методом Вестерн-блот; и в 4-луночную μ-слайд-камеру («Ibidi», Дания) для видеомикроскопии.

Флуоресцентная микроскопия. Для последующего проведения флуоресцентного окрашивания и выявления внутриклеточной локализации Anks1a, актина и клеточных ядер применяли фиксацию 3,7%-ным параформальдегидом (PFA). В качестве первичных антител использовали поликлональные кроличьи антитела к белку Anks1a («Bethyl Laboratories, Inc», США). В качестве вторичных антител использовали анти-кроличьи антитела, конъюгированные с флуоресцентной меткой (Alexa 594) («Jackson Immuno Research», США). Актиновые филаменты выявляли при помощи фаллоидина с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 488 («Molecular Probes», США), а ядра окрашивали красителем DAPI («Sigma-Aldrich», США). При окрашивании антитела использовали в разведениях, рекомендованных производителями. Препараты исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse-Ti («Nikon», Япония).

Измерение интенсивности флуоресценции. Для построения профилей флуоресценции

на изображениях с иммунофлуоресценцией F-актина и Anks1a использовали программу Fiji/ImageJ. Для этого строили прямую линию длиной 20 мкм (400 пикселей) перпендикулярно активному краю клетки так, чтобы центр прямой находился на краю клетки. График построили по средним значениям 25 профилей (25 разных зон на активном крае) на клетках из трех независимых экспериментов.

Видеомикроскопия. Через 24 ч после перенесения клеток в 4-луночную μ-слайд-камеру среду меняли на бесцветную DMEM/F12 со всеми добавками и с 15 мМ HEPES. Для работы мы использовали дифференциальную интерференционно-контрастную (DIC) микроскопию на микроскопе Nikon Eclipse-Ti с объективом Plan Fluor 20×. Видеосъемку проводили в режиме Time-Lapse в течение 10 ч с межкадровым интервалом 5 мин, при температуре 37 °С при помощи цифровой камеры с охлаждением ORCA-ER («Hamamatsu Photonics», Япония), используя программное обеспечение NIS-Elements AR 3.22 software («Nikon»).

Анализ миграционной способности клеток. Для определения траекторий и скорости движения исследуемых клеток в культуре мы строили треки движения клеток на последовательностях видеок кадров в программе ImageJ. Подсчет средних скоростей клеток на основании построенных треков был проведен в программе MS Excel при помощи макросов Speed, Plot_at-Origin и Dir_Ratio [32]. Для каждой клеточной линии были получены данные по трем опытам, оценивалось в среднем около 20 полей зрения в каждом опыте. Подвижными считали клетки, которые смещались на расстояние больше своего радиуса.

Приготовление белковых лизатов. Трансфицированные и контрольные клетки, рассаживаемые на чашки Петри промывали холодным фосфатным буфером (1× PBS, pH 7,4) и лизировали в буфере RIPA (50 мМ Tris-HCl, pH 7,4 («MP Biomedicals», Франция); 150 мМ NaCl («Sigma», США); 2 мМ EDTA («Sigma», США); 1% NP-40 («Fluka», США); 0,1% SDS («Appli-Chem», Испания)) с добавлением коктейля ингибиторов протеаз («Roche», Германия) в течение 20–30 мин на льду. После инкубации лизаты центрифугировали при 19 721 g в течение 30 мин. Отбирали супернатант (лизат) в новые пробирки и измеряли концентрацию белка методом Бредфорда, после чего лизаты хранили при –20 °С.

Анализ GST pull-down. Клетки MCF-10A лизировали в буфере XB-NP-40 (50 мМ HEPES, 50 мМ KCl, 1% NP-40, 10 мМ EDTA, pH 7,7) с добавлением протеазного ингибитора в

течение 30 мин при 4 °С, после чего центрифугировали при 19 721 g 15 мин. 20 мкг очищенных GST-белков инкубировали с 20 мкл гранул глутатион-сефарозы («GE Healthcare», США) в 500 мкл буфера (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, 1% (w/v) Triton X-100, 5% (v/v) глицерина, 1 mM DTT, pH 8,0) при 4 °С в течение 1 ч. Гранулы глутатион-сефарозы отмывали и инкубировали в 1 мл клеточного экстракта MCF-10A 1 ч при 4 °С. Затем отмывали буфером XB-NP-40 и исследовали состав иммунопреципитата методом Вестерн-блота.

Вестерн-блот. Данный метод использовали для качественного и количественного анализа экспрессируемого клетками белка Anks1a, для оценки эффективности проведенной трансфекции, а также для анализа содержания иммунопреципитата. Нормализованные по концентрации белка образцы клеточных лизатов смешивали с 5× буфером для нанесения (250 mM Tris-HCl (pH 6,8), 10% SDS, 30% (v/v) глицерин, 5% β-меркапто-этанол, 0,02% бромфеноловый синий) и инкубировали при 95 °С в течение 10 мин. Далее образцы наносили на 7,5%-ный SDS-полиакриламидный гель и проводили вертикальный электрофорез согласно протоколу («Bio-Rad», США). Белки после электрофореза переносили с гелей на Amersham Hybond-P PVDF-мембраны («GE Healthcare»). Мембраны блокировали 5%-ным раствором молока («Fluka», США) на фосфатном буфере (1× PBS, pH 7,4) с добавлением 0,1% (v/v) Tween-20 («AppliChem», Испания) в течение 1 ч на качалке. Далее мембраны инкубировали с первичными антителами 16 ч при 4 °С. В качестве первичных антител использовали поликлональные кроличьи антитела к белку Anks1a. В качестве контроля загрузки использовали моноклональные мышинные антитела к γ-тубулину GTU88 («Sigma», США). После отмывки фосфатным буфером с добавлением 0,1% (v/v) Tween-20 мембраны инкубировали со вторыми антителами, конъюгированными с пероксидазой («Jackson ImmunoResearch», Великобритания), в течение 1 ч при комнатной температуре. Сигнал детектировали с помощью Pierce ECL Western Blotting Substrate («Thermo Fisher Scientific», США), изображения получали с помощью прибора Image Quant LAS 4000 («GE Healthcare»). Для денситометрии полученных изображений блотов использовали программу ImageJ. Значения относительного поглощения полос Anks1a (в у.е.) нормировали на маркерный белок – γ-тубулин.

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку данных и построе-

ние графиков во всех количественных экспериментах проводили в программе MS Excel («Microsoft», США), используя *t*-критерий Стьюдента. Данные представляли как среднее значение ± стандартная ошибка среднего (standard error of mean, SEM).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка способности Anks1a взаимодействовать с Rac1. Чтобы выяснить, способен ли Anks1a образовывать комплекс с малой ГТФазой Rac1, был проведен анализ GST pull-down для Rac1 (WT) и RacQ61L (активированная форма Rac1). Мы определили, что Anks1a способен связываться с Rac1, но только в том случае, когда Rac1 находится в активированном состоянии (рис. 1, а). Это говорит о потенциале Anks1a быть эффектором активированной малой ГТФазы Rac. Мы рассмотрели, как распределяется Anks1a в псевдонормальных клетках МЖ MCF-10A и клетках MCF-10A с конститутивно активным Rac – MCF-10A RacQL. В контрольных MCF-10A Anks1a выявляется в околоядерном пространстве, а также наблюдается усиление интенсивности окрашивания на активном крае в зоне ламеллиподий, где активность Rac наиболее высока [33–34]. Клетки MCF-10A RacQL с конститутивно активным Rac сильно распластаны, но мало подвижны, Anks1a располагается как в околоядерном пространстве, так и на активном крае клетки (рис. 1, б), причем увеличение концентрации Anks1a на активном крае выражено гораздо сильнее, чем у контрольных клеток.

Таким образом, Anks1a взаимодействует с активированной формой Rac1, и в клетках с конститутивно активным Rac1 Anks1a частично перераспределяется к активному клеточному краю, что указывает на то, что Anks1a может принимать участие в регуляции клеточной подвижности в качестве эффектора Rac.

Распределение Anks1a в опухолевых клетках молочной железы. Для исследования участия Anks1a в регуляции движения клеток МЖ в качестве опухолевых линий МЖ мы выбрали клетки SK-BR-3 и MDA-MB-231 с разным статусом HER2. Опухолевые клетки обеих линий (SK-BR-3 и MDA-MB-231) в редкой культуре не образуют плотных островков и располагаются или в разреженных островках, или поодиночке, при этом имеют активные края с ярко выраженными ламеллиподиями, что хорошо видно при окраске актина фаллоидином (рис. 2). С помощью Вестерн-блота мы оценили количество Anks1a в исследуемых линиях. Разницы в количестве Anks1a

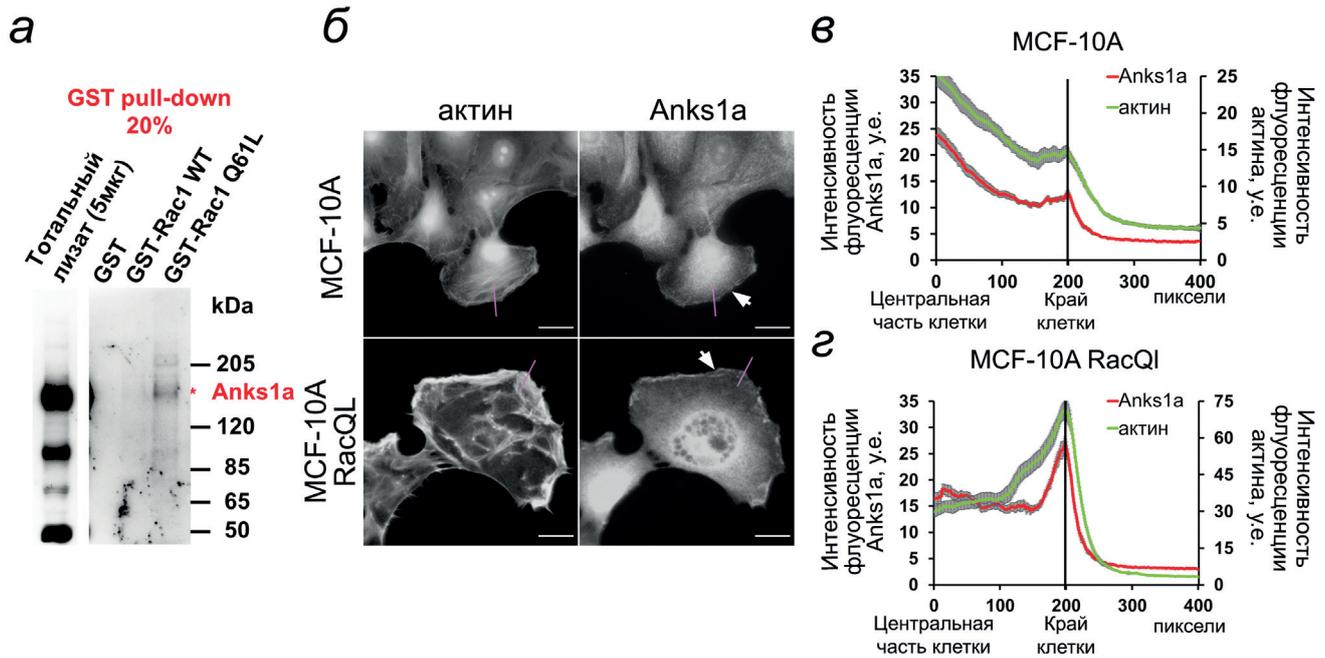


Рис. 1. Взаимодействие Anks1a с Rac1. *a* – GST pull-down-анализ. Для Вестерн-блота использовали 20% от полученного объема лизата после отмывки гранул глутатион-сефарозы. Звездочкой обозначена молекулярная масса Anks1a (170 kDa). *б* – Распределение Anks1a в псевдонормальных (MCF-10A) клетках и в клетках с конститутивно активным Rac1 (MCF-10A RacQL). Окрашивание актина – фаллоидин–Alexa 488. Стрелкой указано распределение Anks1a на краю клетки. Масштабная линия – 10 мкм. *в* и *г* – Графики изменения интенсивности флуоресценции белка Anks1a вдоль фиолетовой линии (*б*), на активном крае клеток MCF-10A (*в*) и MCF-10A RacQL (*г*). Показана средняя интенсивность флуоресценции ± SEM; *n* = 25 клеток для каждого графика

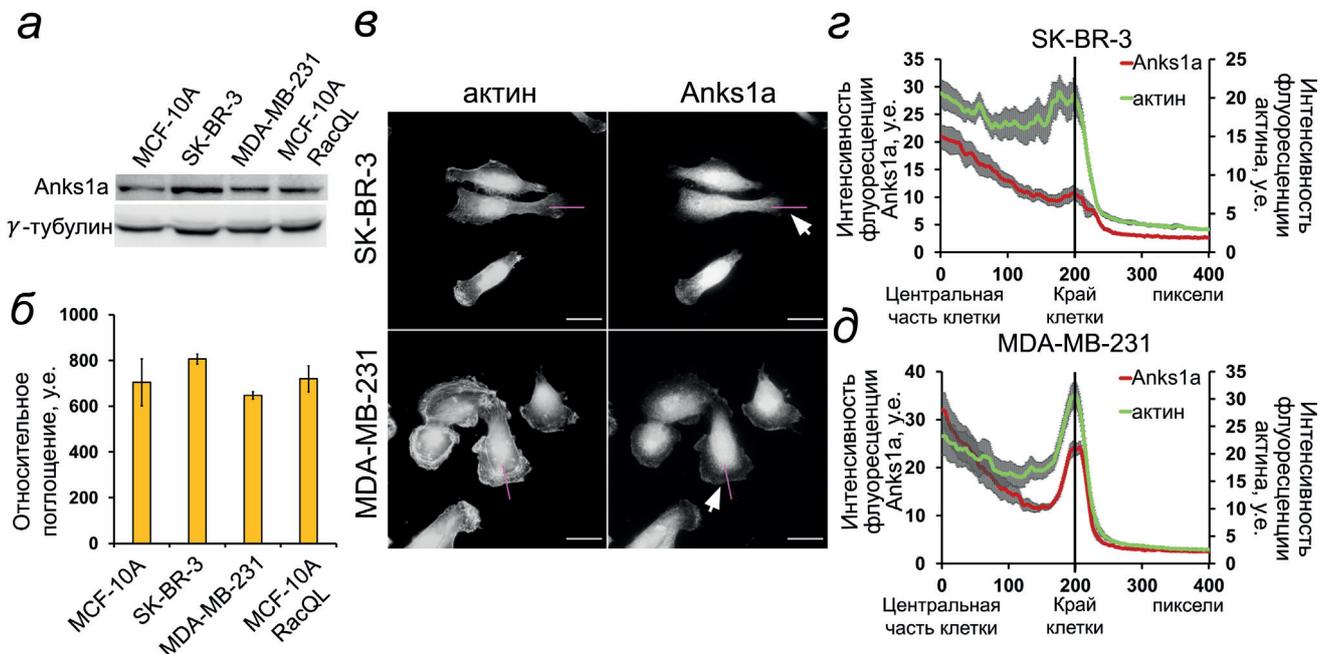


Рис. 2. Распределение белка Anks1a в опухолевых клетках молочной железы. *a* – Вестерн-блот клеточных линий MCF-10A, SK-BR-3, MDA-MB-231 и MCF-10A RacQL с окрашиванием на Anks1a и γ -тубулин. *б* – Денситометрия Вестерн-блота, приведенного на панели *a*, с выравниванием по γ -тубулину. *в* – Распределение белка Anks1a в опухолевых клетках (SK-BR-3 и MDA-MB-231) МЖ человека. Окрашивание актина – фаллоидин–Alexa 488. Масштабная линия – 20 мкм. *г* и *д* – Графики изменения интенсивности флуоресценции белка Anks1a на активном крае клеток SK-BR-3 (*г*) и MDA-MB-231 (*д*) вдоль фиолетовых линий на панели *в*. Показана средняя интенсивность флуоресценции ± SEM; *n* = 25 клеток для каждого графика

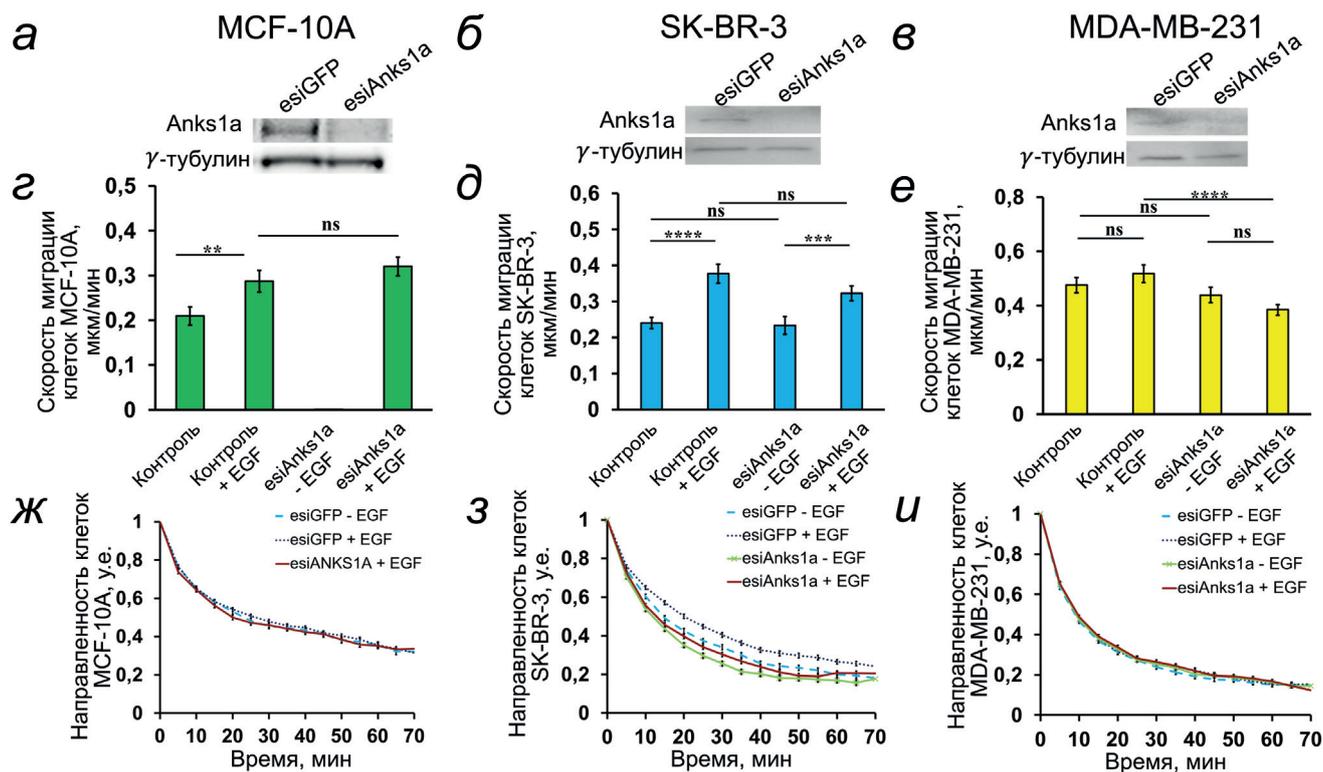


Рис. 3. Влияние подавления экспрессии Anks1a на миграционную активность клеток МЖ. *a–в* – Контроль экспрессии Anks1a после подавления Anks1a с помощью esiRNA (esiAnks1a), нормирование по γ -тубулину; *г–е* – скорости миграции клеток; *ж–и* – оценка направленности движения клеток с подавленной экспрессией белка Anks1a в присутствии и при отсутствии EGF. Данные представляют собой среднее значение \pm SEM, $n = 25$, использованы данные по меньшей мере от трех независимых экспериментов. Статистическая значимость различий определена по *t*-критерию Стьюдента: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ns – статистически незначительные изменения

среди исследуемых культур обнаружено не было (рис. 2, *a* и *б*). При этом у SK-BR-3 Anks1a локализуется в центральной части клетки и в ядре, а на активном крае Anks1a практически не выявляется (рис. 2, *в* и *г*). У клеток MDA-MB-231 (тройной негативный рак) Anks1a выявляется как в центральной части клеток, так и на активном крае: там, где происходит Arp2/3-зависимая полимеризация актина (рис. 2, *в* и *д*).

Таким образом, в линии MDA-MB-231, в которой отсутствуют HER2, локализация Anks1a наблюдается в зоне краевой активности, тогда как у клеток SK-BR-3 не наблюдалось концентрации Anks1a на активном крае.

Влияние подавления экспрессии Anks1a на миграционную активность клеток МЖ. Экспрессия Anks1a была подавлена с помощью трансфекции клеток малыми интерферирующими РНК (Anks1a esiRNA). Контроль за подавлением экспрессии осуществляли с помощью Вестерн-блота (рис. 3, *a–в*). Мы оценивали количество движущихся клеток и характер их движения в контрольных культурах и в культурах, трансфицированных Anks1a esiRNA.

Клетки MCF-10A в редкой культуре малоподвижны, образуют островки. При добав-

лении EGF их подвижность увеличивается, увеличивается количество активно мигрирующих клеток, наблюдается расплывание клеток из островка. Подавление Anks1a при отсутствии EGF приводило к почти полной остановке клеток, а при добавлении EGF скорости движения подвижных контрольных клеток и клеток с подавленной экспрессией Anks1a практически не различались (рис. 3, *г*). Направленность движения MCF-10A также не менялась при подавлении Anks1a (рис. 3, *ж*).

Клетки SK-BR-3 (оверэкспрессирован HER2) очень чувствительны к присутствию EGF в среде, при добавлении EGF количество подвижных клеток увеличивается примерно на 10% (с 55 до 65%), а также возрастает скорость их миграции (рис. 3, *д*). Подавление активности Anks1a не оказывает существенного влияния на миграционные способности этих клеток как при отсутствии, так и в присутствии EGF, однако несколько снижает стимулирующий эффект EGF, хотя разница недостоверна. В то же время при подавлении экспрессии Anks1a движение клеток SK-BR-3 становится более хаотичным, направленность их движения по сравнению с контрольными значениями снижается (рис. 3, *з*).

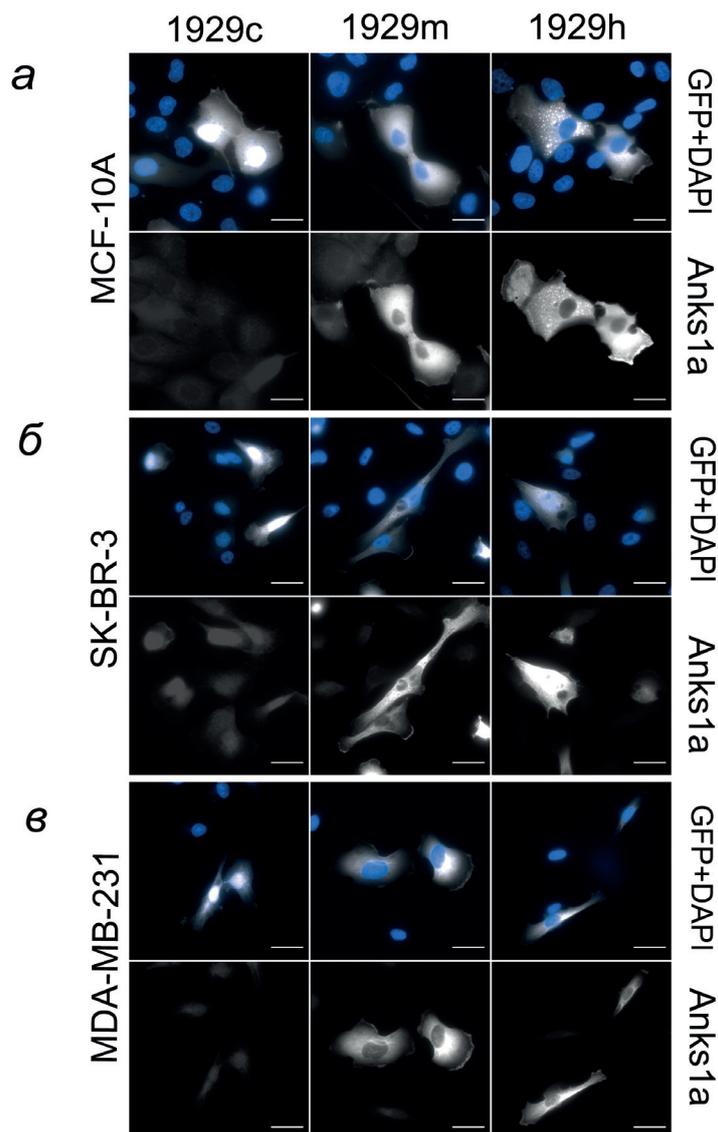


Рис. 4. Распределение Anks1a при гиперэкспрессии. 1929c, 1929m и 1929h – клетки, трансфицированные контрольной плазмидой 1929c и плазмидами 1929m и 1929h соответственно, трансфекция которыми приводит к увеличению экспрессии белка Anks1a. Окрашивание на Anks1a, DAPI, GFP. Трансфицированными считаем клетки, в которых детектируется свечение GFP, DAPI демонстрирует общее количество клеток на препарате. *a* – Распределение Anks1a в клетках MCF-10; *b* – распределение Anks1a в клетках SK-BR-3 с гиперэкспрессией HER2; *c* – распределение Anks1a в клетках MDA-MB-231 (трижды негативный рак). Флуоресцентная микроскопия. Масштабная линия – 20 мкм

Миграционная активность клеток MDA-MB-231 (отсутствуют HER2), как и следовало ожидать, практически не зависит от наличия EGF. Подавление экспрессии Anks1a не влияло на количество мигрирующих клеток, но скорость миграции активированных EGF клеток достоверно снижалась, направленность движения при этом не менялась (рис. 3, *e* и *u*). Этот эффект не зависит от участия Anks1a в обмене рецепторов HER2, и, таким образом, может зависеть от другой активности Anks1a, например, от его функции как эффектора Ras.

Внутриклеточное распределение Anks1a при гиперэкспрессии. Опыты по исследованию влияния гиперэкспрессии Anks1a на подвижность

клеток мы проводили в обычной для этих клеток культуральной среде без дополнительного стимулирования EGF. Контрольными считали клетки, полученные за счет трансфекции плазмидой 1929c, экспрессирующие GFP. В клетках MCF-10A в результате трансфекции контрольной плазмидой 1929c при флуоресцентном окрашивании интенсивность и распределение свечения Anks1a не менялись. В клетках с гиперэкспрессией Anks1a (полученной за счет трансфекции как плазмидой 1929m, так и плазмидой 1929h) наблюдается существенное увеличение интенсивности флуоресценции Anks1a, кроме того, наблюдается перераспределение Anks1a к активному свободному краю клеток

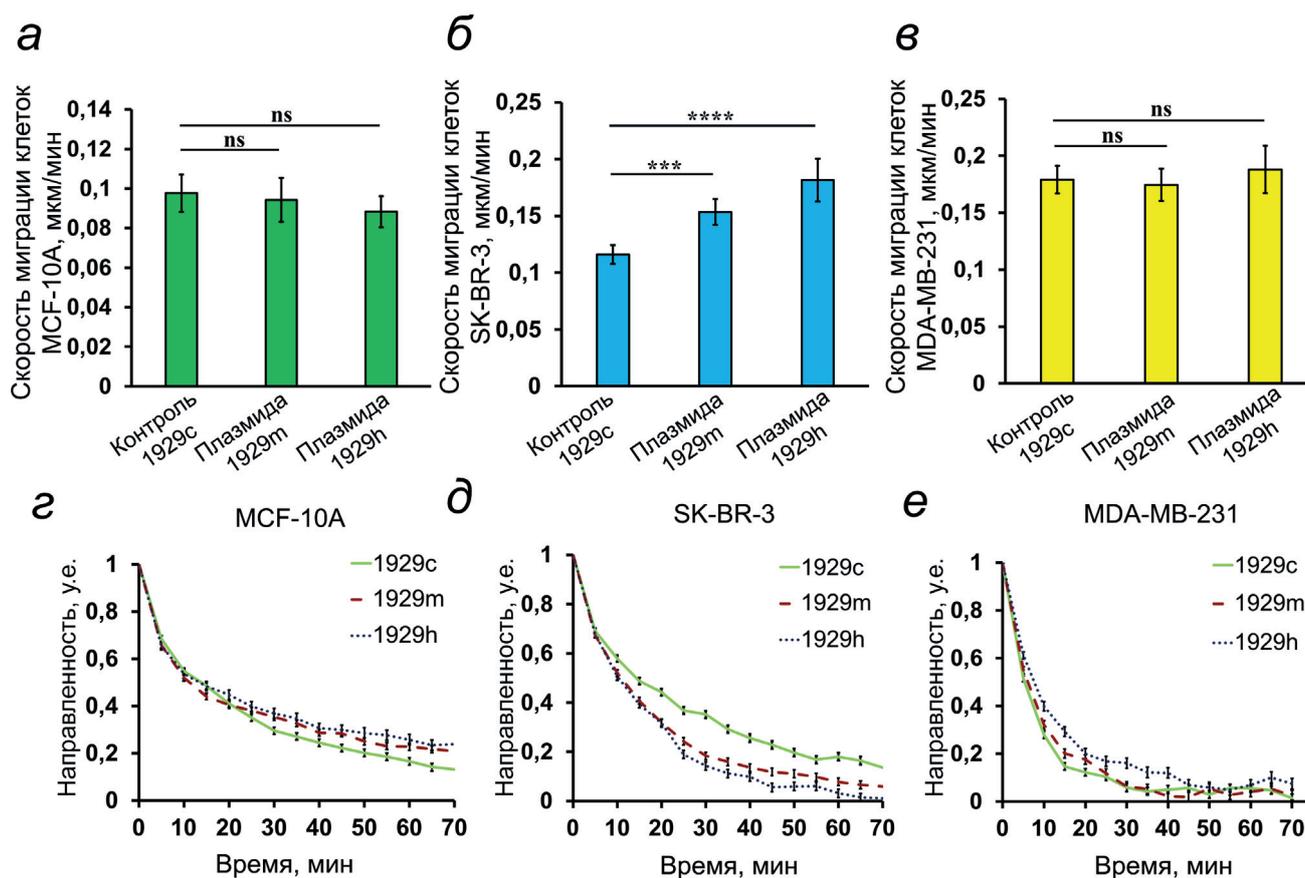


Рис. 5. Влияние сверхэкспрессии Anks1a на миграционную активность клеток МЖ. *а–в* – Скорости и *г–е* – направленность движения клеток с сверхэкспрессией белка Anks1a. 1929с, 1929m и 1929h – клетки, трансфицированные контрольной плазмидой 1929с и плазмидами 1929m и 1929h соответственно, трансфекция которых приводит к увеличению экспрессии белка Anks1a. Данные представляют собой среднее значение \pm SEM по меньшей мере трех независимых экспериментов. Статистическая значимость различия определена по *t*-критерию Стьюдента: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ns – статистически незначительные изменения

(обозначено белыми стрелками) (рис. 4, *а*). Степень распластанности клеток с сверхэкспрессией Anks1a существенно не отличается от контрольной.

Клетки аденокарциномы SK-BR-3 мелкие, преимущественно одиночные, часто поляризованы, образуют ламеллиподию на ведущем крае.

В контрольных SK-BR-3, трансфицированных 1929с, Anks1a располагается в околоядерной области. Клетки с сверхэкспрессией Anks1a, полученной в результате трансфекции плазмидами 1929m и 1929h, выглядят более распластанными, по сравнению с контрольными, наблюдается перераспределение Anks1a, увеличивается его свечение на активном крае клетки (рис. 4, *б*).

Контрольные клетки трижды негативной аденокарциномы МЖ человека MDA-MB-231 имеют фибробластоподобную форму. В культуре, преимущественно, располагаются одиночно или парами, редко небольшими островками.

В клетках MDA-MB-231, трансфицированных 1929с (контроль), Anks1a располагается

в околоядерной области, а также на активном крае клетки. В клетках с сверхэкспрессией Anks1a не наблюдается заметного перераспределения Anks1a. Степень распластанности клеток с сверхэкспрессией Anks1a также существенно не отличается от контрольных (рис. 4, *в*).

Влияние сверхэкспрессии Anks1a на миграционную активность клеток. Мы анализировали изменение скорости движения клеток при сверхэкспрессии Anks1a (рис. 5). Полученные данные свидетельствуют, что достоверное значимое изменение в скорости миграции происходит только при сверхэкспрессии белка в клетках SK-BR-3, при этом эффект увеличения скорости миграции происходит как в клетках, трансфицированных плазмидой 1929m, так и плазмидой 1929h. При этом уменьшалась направленность движения этих клеток. В клетках MCF-10A и MDA-MB-231 при сверхэкспрессии Anks1a достоверных изменений скорости движения отмечено не было, незначительно увеличивалась направленность движения MCF-10A.

Таким образом, сверхэкспрессия Anks1a большее влияние оказывает на подвижность тех клеток, в которых отмечено повышенное содержание HER2. Вероятно, это можно объяснить участием Anks1a в обмене тирозинкиназных рецепторов (РТК) и вовлечением в сигналинг EphA2/ErbB2.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Целью нашей работы была оценка участия Anks1a в регуляции миграции клеток и выяснение возможных клеточных механизмов такого участия. По имеющимся литературным данным, Anks1a участвует в обмене рецепторов к эпидермальному фактору роста HER2 [27]. Методом GST pull-down мы показали, что Anks1a способен связываться с активированным Rac1, т.е. теоретически может быть его эффектором. Согласно результатам Вестерн-блот-анализа, количество белка Anks1a среди исследуемых культур не различалось. При этом в клетках с нормальным содержанием рецепторов к EGF и при их отсутствии Anks1a выявляется с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания как в центральной части клеток, так и на клеточном крае в местах ламеллиподиальной активности. Таким образом, его распределение на активном крае совпадает с распределением активного Rac, отвечающего за образование протрузий и за миграцию клеток [34–37]. В клетках SK-BR-3 с сверхэкспрессией рецептора EGF Anks1a выкрашивается в центральной части клеток и в ядре, а на краю ламеллиподии отсутствует. Можно предположить, что при сверхэкспрессии рецептора весь пул Anks1a оказывается вовлечен в обмен рецепторов, и он не поступает в места активности Rac.

Подвижность клеток MDA-MB-231, характеризующихся отсутствием экспрессии HER2, практически не зависела от присутствия EGF, но подавление Anks1a с помощью малых интерферирующих РНК приводило к незначительному снижению скорости миграции этих клеток. Также подавление экспрессии Anks1a привело к практически полной остановке движения клеток MCF-10A при отсутствии EGF и значительному снижению скорости этих клеток в присутствии EGF. Известно, что понижение активности Rac приводит к нарушению клеточной миграции [38]. Это позволяет предположить, что в клетках с недостатком рецепторов EGF Anks1a может принимать участие в регуляции миграции в качестве эффектора Rac, но, вероятно, этот эффект незначителен.

Поскольку, согласно литературным данным, в опухолях Anks1a часто сверхэкспресси-

рован [26], мы исследовали, как сверхэкспрессия Anks1a влияет на миграционное поведение нормальных и опухолевых клеток МЖ. Мы показали, что при сверхэкспрессии Anks1a в клеточных линиях MCF-10A и SK-BR-3, содержащих HER2, наблюдалось увеличение степени распластанности клеток. При этом интенсивность свечения Anks1a на активном крае клеток возрастала (рис 4, а и б). Это может являться следствием того, что при сверхэкспрессии избыток Anks1a может аккумулироваться в местах взаимодействия с активированным Rac и проявлять активность в качестве его эффектора. А клетки SK-BR-3 с амплифицированным HER2 в результате сверхэкспрессии Anks1a приобретали большую скорость и меньшую направленность миграции. Поскольку такого эффекта не наблюдалось в других исследованных клеточных линиях, действие Anks1a в этом случае, скорее всего, опосредовано его активностью при регуляции обмена тирозинкиназных рецепторов.

Таким образом, мы предполагаем, что Anks1a является эффектором активированного Rac, но влияние его в этом качестве, по крайней мере на исследованных нами клетках МЖ, минимально. Этот белок способен оказывать влияние на подвижность клеток МЖ благодаря его участию в механизме обмена рецепторов к EGF, а в клетках, где данные рецепторы отсутствуют (тройной негативный рак МЖ), значимого влияния Anks1a на миграционный потенциал опухолевых клеток отмечено не было. Из этого следует, что имеет смысл рассматривать подавление Anks1a в качестве возможного терапевтического подхода для подавления метастазирования только в случае опухолей, у которых отмечена повышенная экспрессия HER2/Neu, EphA2/ErbB2 или других РТК [23, 27]. Эффект такого подавления сводится не только к ингибированию миграции опухолевых клеток, но и будет обладать более широким действием, так как РТК вовлечены в регуляцию многих клеточных функций [23, 24].

Вклад авторов. А.Ю. Александрова, А.М. Готро – концепция и руководство работой; А.О. Жолудева, М.Е. Ломакина, Е.А. Орлова, Я. Ванг, А. Фокин, А. Полесская – проведение экспериментов; А.Ю. Александрова, А.М. Готро, А.О. Жолудева, М.Е. Ломакина, А. Фокин, А. Полесская – обсуждение результатов исследования; А.Ю. Александрова, А.О. Жолудева, М.Е. Ломакина, А. Фокин – написание и редактирование текста.

Финансирование. Работа выполнена в рамках Международной ассоциированной лабора-

тории (ЛИА) «Поиск и характеристика новых белков, регулирующих клеточное движение и отвечающих за диссеминацию опухолевых клеток» и поддержана Российским фондом фундаментальных исследований НЦНИЛ_а (грант № 18-54-16006).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, **144**, 646-674, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Svitkina, T. (2018) The actin cytoskeleton and actin-based motility, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **10**, a018267, doi: 10.1101/cshperspect.a018267.
- Bonello, T. T., Stehn, J. R., and Gunning, P. W. (2009) New approaches to targeting the actin cytoskeleton for chemotherapy, *Future Med. Chem.*, **1**, 1311-1331, doi: 10.4155/fmc.09.99.
- Raftopoulou, M., and Hall, A. (2004) Cell migration: Rho GTPases lead the way, *Dev. Biol.*, **265**, 23-32, doi: 10.1016/j.ydbio.2003.06.003.
- Hall, A., and Nobes, C. D. (2000) Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **355**, 965-970, doi: 10.1098/rstb.2000.0632.
- Krugmann, S., Jordens, I., Gevaert, K., Driessens, M., Vandekerckhove, J., and Hall, A. (2001) Cdc42 induces filopodia by promoting the formation of an IRSp53: Mena complex, *Curr. Biol.*, **11**, 1645-1655, doi: 10.1016/s0960-9822(01)00506-1.
- Charras, G., and Paluch, E. (2008) Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 730-736, doi: 10.1038/nrm2453.
- Wang, W., Wyckoff, J. B., Frohlich, V. C., Oleynikov, Y., Hüttelmaier, S. et al. (2002) Single cell behavior in metastatic primary mammary tumors correlated with gene expression patterns revealed by molecular profiling, *Cancer Res.*, **62**, 6278-6288.
- Wang, W., Wyckoff, J. B., Goswami, S., Wang, Y., Sidani, M., et al. (2007) Coordinated regulation of pathways for enhanced cell motility and chemotaxis is conserved in rat and mouse mammary tumors, *Cancer Res.*, **67**, 3505-3511, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3714.
- Pankov, R., Endo, Y., Even-Ram, S., Araki, M., Clark, K., Cukierman, E., Matsumoto, K., and Yamada, K. M. (2005) A Rac switch regulates random versus directionally persistent cell migration, *J. Cell Biol.*, **170**, 793-802, doi: 10.1083/jcb.200503152.
- Zhou, K., Rao, J., Zhou, Z. H., Yao, X. H., Wu, F., Yang, J., Yang, L., Zhang, X., Cui, Y.-H., Bian, X.-W., Shi, Yu, and Ping, Yi-F. (2018), RAC1-GTP promotes epithelial-mesenchymal transition and invasion of colorectal cancer by activation of STAT3, *Lab. Invest.*, **98**, 989-998, doi: 10.1038/s41374-018-0071-2.
- Kurisu, S., Suetsugu, S., Yamazaki, D., Yamaguchi, H., and Takenawa, T. (2005) Rac-WAVE2 signaling is involved in the invasive and metastatic phenotypes of murine melanoma cells, *Oncogene*, **24**, 1309-1319, doi: 10.1038/sj.onc.1208177.
- Rana, P. S., Alkrekshi, A., Wang, W., Markovic, V., and Sossey-Alaoui, K. (2021) The role of WAVE2 signaling in cancer, *Biomedicines*, **9**, 1217, doi: 10.3390/biomedicines9091217.
- Taniuchi, K., Yawata, T., Tsuboi, M., Ueba, T., and Saibara, T. (2019) Efficient delivery of small interfering RNAs targeting particular mRNAs into pancreatic cancer cells inhibits invasiveness and metastasis of pancreatic tumors, *Oncotarget*, **10**, 2869-2886, doi: 10.18632/oncotarget.26880.
- Takahashi, K., and Suzuki, K. (2011) WAVE2, N-WASP, and Mena facilitate cell invasion via phosphatidylinositol 3-kinase-dependent local accumulation of actin filaments, *J. Cell Biochem.*, **112**, 3421-3429, doi: 10.1002/jcb.23276.
- Wang, W., Eddy, R., and Condeelis, J. (2007) The cofilin pathway in breast cancer invasion and metastasis, *Nat. Rev. Cancer*, **7**, 429-440, doi: 10.1038/nrc214.
- Sinha, P., Hütter, G., Köttgen, E., Dietel, M., Schandendorf, D., and Kage, H. (1999) Increased expression of epidermal fatty acid binding protein, cofilin, and 14-3-3-sigma (stratifin) detected by two-dimensional gel electrophoresis, mass spectrometry and microsequencing of drug-resistant human adenocarcinoma of the pancreas, *Electrophoresis*, **20**, 2952-2960, doi: 10.1002/(SICI)1522-2683(19991001)20:14<2952::AID-ELPS2952>3.0.CO;2-H.
- Gunnensen, J. M., Spirkoska, V., Smith, P. E., Danks, R. A., and Tan, S. S. (2000) Growth and migration markers of rat C6 glioma cells identified by serial analysis of gene expression, *Glia*, **32**, 146-154.
- Davila, M., Frost, A. R., Grizzle, W. E., and Chakrabarti, R. (2003) LIM kinase 1 is essential for the invasive growth of prostate epithelial cells: implications in prostate cancer, *J. Biol. Chem.*, **278**, 36868-36875, doi: 10.1074/jbc.M306196200.
- Yoshioka, K., Foletta, V., Bernard, O., and Itoh, K. (2003) A role for LIM kinase in cancer invasion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 7247-7252, doi: 10.1073/pnas.1232344100.
- Pandey, A., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Fernandez, M., Nielsen, M., Kristiansen, T. Z., Ohara, O.,

- Podtelejnikov, A. V., Roche, S., Lodish, H. F., and Mann, M. (2002) Cloning of a novel phosphotyrosine binding domain containing molecule, Odin, involved in signaling by receptor tyrosine kinases, *Oncogene*, **21**, 8029-8036, doi: 10.1038/sj.onc.1205988.
22. Shin, J., Gu, C., Park, E., and Park, S. (2007) Identification of phosphotyrosine binding domain-containing proteins as novel downstream targets of the EphA8 signaling function, *Mol. Cell Biol.*, **27**, 8113-8126, doi: 10.1128/MCB.00794-07.
 23. Casaletto, J. B., and McClatchey, A. I. (2012) Spatial regulation of receptor tyrosine kinases in development and cancer, *Nat. Rev. Cancer*, **12**, 387-400, doi: 10.1038/nrc3277.
 24. Lemmon, M. A., and Schlessinger, J. (2010) Cell signaling by receptor tyrosine kinases, *Cell*, **141**, 1117-1134, doi: 10.1016/j.cell.2010.06.011.
 25. Park, S., Lee, H., Lee, J., Park, E., and Park, S. (2019) Ependymal cells require Anks1a for their proper development, *Mol. Cells*, **42**, 245-251, doi: 10.14348/molcells.2018.0432.
 26. Lee, Y., Yoon, K. A., Joo, J., Lee, D., Bae, K., Han, Ji-Y., and Lee, J.-S. (2013) Prognostic implications of genetic variants in advanced non-small cell lung cancer: a genome-wide association study, *Carcinogenesis*, **34**, 307-313, doi: 10.1093/carcin/bgs356.
 27. Lee, H., Noh, H., Mun, J., Gu, C., Sever, S., and Park, S. (2016) Anks1a regulates COPII-mediated anterograde transport of receptor tyrosine kinases critical for tumorigenesis, *Nat. Commun.*, **7**, 12799, doi: 10.1038/ncomms12799.
 28. Tong, J., Sydorsky, Y., St-Germain, J. R., Taylor, P., Tsao, M. S., and Moran, M. F. (2013) Odin (ANKS1A) modulates EGF receptor recycling and stability, *PLoS One*, **8**, e64817, doi: 10.1371/journal.pone.006481.
 29. Kristiansen, T. Z., Nielsen, M. M., Blagoev, B., Pandey, A., and Mann, M. (2004) Mouse embryonic fibroblasts derived from Odin deficient mice display a hyperproliferative phenotype, *DNA Res.*, **11**, 285-292.
 30. Sladitschek, H. L., and Neveu, P. A. (2015) MXS-chaining: a highly efficient cloning platform for imaging and flow cytometry approaches in mammalian systems, *PLoS One*, **10**, e0124958, doi: 10.1371/journal.pone.0124958.
 31. Molinie, N., Rubtsova, S. N., Fokin, A., Visweshwaran, S. P., Rocques, N., Polesskaya, A., Schnitzler, A., Vacher, S., Denisov, E. V., Tashireva, L. A., Perelmuter, V. M., Cherdyntseva, N. V., Bièche, I., and Gautreau, A. M. (2019) Cortical branched actin determines cell cycle progression, *Cell Res.*, **29**, 432-445, doi: 10.1038/s41422-019-0160-9.
 32. Gorelik, R., and Gautreau, A. (2014) Quantitative and unbiased analysis of directional persistence in cell migration, *Nat. Protoc.*, **9**, 1931-1943, doi: 10.1038/nprot.2014.131.
 33. Holliday, D. L., and Speirs, V. (2011) Choosing the right cell line for breast cancer research, *Breast Cancer Res.*, **13**, 215, doi: 10.1186/bcr2889.
 34. Kraynov, V. S., Chamberlain, C., Bokoch, G. M., Schwartz, M. A., Slabaugh, S., and Hahn, K. N. (2000) Localized Rac activation dynamics visualized in living cells, *Science*, **290**, 333-337, doi: 10.1126/science.290.5490.333.
 35. Mehidi, A., Rossier, O., Schaks, M., Chazeau, A., Binamé, F., Remorino, A., Coppey, M., Karatas, Z., Sibarita, J.-P., Rottner, K., Moreau, V., and Giannone, G. (2019) Transient activations of Rac1 at the lamellipodium tip trigger membrane protrusion, *Curr. Biol.*, **29**, 2852-2866.e5, doi: 10.1016/j.cub.2019.07.035.
 36. Itoh, R. E., Kurokawa, K., Ohba, Y., Yoshizaki, H., Mochizuki, N., and Matsuda, M. (2002) Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells, *Mol. Cell Biol.*, **22**, 6582-6591, doi: 10.1128/MCB.22.18.6582-6591.2002.
 37. Steffen, A., Ladwein, M., Dimchev, G. A., Hein, A., Schwenkmezger, L., Arens, S., Ladwein, K. I., Holleboom, J. M., Schur, F., Small, J. V., Schwarz, J., Gerhard, R., Faix, J., Stradal, T. E. B., Brakebusch, C., and Rottner, K. (2013) Rac function is crucial for cell migration but is not required for spreading and focal adhesion formation, *J. Cell Sci.*, **126**, 4572-4588, doi: 10.1242/jcs.118232.
 38. Weiss-Haljiti, C., Pasquali, C., Ji, H., Gillieron, C., Chabert, C., Curchod, M. L., Hirsch, E., Ridley, A. J., van Huijsduijnen, R. H., Camps, M., and Rommel, C. (2004) Involvement of phosphoinositide 3-kinase gamma, Rac, and PAK signaling in chemokine-induced macrophage migration, *J. Biol. Chem.*, **279**, 43273-43284, doi: 10.1074/jbc.M402924200.

ROLE OF THE ADAPTER PROTEIN Anks1a IN REGULATING BREAST CANCER CELL MOTILITY

A. O. Zholudeva¹, M. E. Lomakina^{1,2}, E. A. Orlova¹, Y. Wang², A. Fokin², A. Polesskaya²,
A. M. Gautreau², and A. Y. Alexandrova^{1*}

¹ Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia,
115478 Moscow, Russia; e-mail: tonya_alex@yahoo.com

² CNRS UMR7654, Ecole Polytechnique, Institut Polytechnique de Paris, 91120 Palaiseau, France

A critical step in tumor progression is the epithelial-mesenchymal transition, as a result of which cancer cells (CCs) acquire the ability to mesenchymal migration, the main regulator of which is the Rac→WAVE→Arp2/3 signaling pathway. It was previously shown that proteins interacting with Rac can regulate mesenchymal migration and thus determine the metastasis efficiency. The search for new regulators of migration is an actual theoretical and practical task. The adaptor protein Anks1a is one of the proteins interacting with Rac, the change in its expression has been shown for many tumors. The aim of this study was to find out whether Anks1a affects CC migration and to identify the mechanism underlying its effect. It has been suggested that Anks1a can influence CC migration either as a Rac1 effector or by activation of exchange of human epidermal growth factor receptor-2 (HER2). The effect of enhancing and downregulation of Anks1a expression on the migration of breast cancer cells with different HER2 status was investigated. Anks1a was shown to interact with the activated form of Rac1. In the MDA-MB-231 cells (triple negative cancer), which lacks HER2, Anks1a accumulates at the active cell edge, which is characterized by enrichment with active Rac1, whereas in SK-BR-3 cells (HER2 overexpressed) no concentration of Anks1a at the active edge was observed. Inhibition of *ANKS1a* expression by esiRNA had almost no effect on the CC motility; there was only a slight increase in the average rate of cell migration in MDA-MB-231 cells. Overexpression of Anks1a leads to an increase in migration rate of only SK-BR-3 cells, i.e., it affects migration only in case of overexpression of HER2. We showed that Anks1a is an effector of activated Rac1, but its influence on cell migration in this capacity is minimal, at least on the breast cell cultures we studied. Anks1a affects the motility of breast cancer cells due to its involvement in the mechanism of EGF receptor exchange.

Keywords: Anks1a, cell migration, breast cancer, metastasis

БИОЛОГИЯ КОРОНАВИРУСА SARS-CoV-2

Обзор

© 2022 Р.Н. Мингалеева^{1*}, Н.А. Нигматулина², Л.М. Шарафетдинова¹, А.М. Ромозанова¹, А.Г. Габдулхакова¹, Ю.В. Филина¹, Р.Ф. Шавалиев², А.А. Ризванов¹, Р.Р. Мифтахова¹

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет,
420008 Казань, Россия; электронная почта: rimta.mingaleeva@gmail.com

² Республиканская клиническая больница Министерства здравоохранения Республики Татарстан,
420064 Казань, Россия

Поступила в редакцию 13.07.2022

После доработки 05.10.2022

Принята к публикации 17.10.2022

Новая коронавирусная инфекция Covid-19, возникшая в конце 2019 г. в Китае, вызвала сильнейший социальный и экономический кризис, затронувший весь мир. Высокая частота ошибок в репликации РНК-вирусов, зоонозный характер передачи, высокая трансмиссивность позволили бета-коронавирусам вызвать уже третью пандемию в мире с начала 2003 г.: SARS-CoV – в 2003 г, MERS-CoV – в 2012 г и SARS-CoV-2 – в 2019 г. Последняя пандемия объединила научное сообщество и послужила мощным толчком в изучении биологии коронавирусов: были выявлены новые пути проникновения вируса в организм человека, изучены особенности репликативного цикла, выявлены новые функции белков коронавируса. Стоит учитывать, что пандемия сопровождалась необходимостью в получении и публикации результатов в короткие сроки, что привело к появлению массива противоречивых данных и низкой воспроизводимости результатов исследований. Нами была систематизирована и проанализирована научная литература, проведена фильтрация результатов по достоверности применяемых методов анализа и подготовлен обзор, описывающий молекулярные механизмы функционирования коронавируса SARS-CoV-2. В работе рассмотрена организация генома вируса SARS-CoV-2, механизмы экспрессии его генов и входа вируса в клетку, приведена информация по ключевым мутациям, характеризующим разные варианты вируса, и их вклад в патогенез заболевания.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: SARS-CoV-2, Covid-19, S-белок, мутация, VOC.

DOI: 10.31857/S032097252212020X, **EDN:** NIWMWX

ВВЕДЕНИЕ

Коронавирусы определяют как группу родственных РНК-содержащих вирусов, поражающих млекопитающих и птиц. Инфицируя человека, эти вирусы вызывают заболевания дыхательных путей различной степени тяжести: от инфекций верхних дыхательных путей, сходных с симптомами сезонных простуд, до

тяжёлых инфекций нижних дыхательных путей, включая бронхит, пневмонию и атипичную пневмонию – тяжёлый острый респираторный синдром (SARS). Вирус птичьего инфекционного бронхита (IBV) стал первым обнаруженным коронавирусом [1]. Коронавирусы, поражающие человека, HCoV-229E и HCoV-OC43, впервые были обнаружены в 1966 и 1967 гг. В 2003 г. в Китае был обнаружен зоонозный

Принятые сокращения: ACE2 – ангиотензин-превращающий фермент 2 (angiotensin-converting enzyme 2); DMV – двухмембранные везикулы, специальные органеллы репликации (double-membrane vesicle); E – белок оболочки; HCoV – коронавирус человека (Human coronavirus); HE – гемагглютинин-эстераза; HR – гептадный повтор (heptad repeat); IBV – вирус птичьего инфекционного бронхита (infectious bronchitis virus); M – мембранный белок; MERS – ближневосточный респираторный синдром (Middle East respiratory syndrome); M^{pro} – 3CL-подобная протеаза; N – нуклеокапсидный белок; nsp – неструктурные белки (non-structural proteins); ORF – открытая рамка считывания; pp – полипротеин; RBD – рецептор-связывающий домен (receptor-binding domain); S – Spike-белок; S1 и S2 – субъединицы S-белка; SARS – тяжёлый острый респираторный синдром (severe acute respiratory syndrome); TRS – последовательности, регулирующие транскрипцию (transcription-regulating sequence); VOC – варианты, вызывающие озабоченность (variant of concern).

* Адресат для корреспонденции.

коронавирус SARS-CoV, распространение которого привело к эпидемии с охватом 8000 задокументированных случаев и коэффициентом летальности 10%. Это породило всплеск острого интереса к коронавирусам, в результате которого впоследствии было выявлено ещё два вируса: HCoV-NL63 (Нидерланды, 2004 г.) и HCoV-NKU1 (Гонконг, 2004 г.), которые ежегодно циркулируют по всему миру. В 2012 г. в Саудовской Аравии был выявлен второй высокопатогенный коронавирус зоонозного происхождения, MERS-CoV, который до сих пор периодически детектируется у людей. Согласно данным на июль 2022 г, MERS-CoV был подтверждён у 2591 человека. Он поражает лёгкие и вызывает тяжёлые клинические проявления, коэффициент летальности заболевания – до 35% (World Health Organization, <https://www.who.int/>).

Седьмым обнаруженным коронавирусом, поражающим людей, стал SARS-CoV-2, вызывающий заболевание Covid-19. Согласно данным Университета Джона Хопкинса (Johns Hopkins University Coronavirus Resource Center, <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>), число заболевших Covid-19, по состоянию на сентябрь 2022 г., составило 612 млн человек, среди которых умерло 6,5 млн. В России, по данным на март 2022 г., Covid-19 зарегистрирован у 20 млн человек, 378 тыс. человек скончалось (коэффициент летальности – 1,9%). Масштабы распространения SARS-CoV-2, лёгкость передачи вируса от человека к человеку, предположительное существование промежуточных межвидовых форм новых коронавирусов диктуют потребность в разработке методов детекции и борьбы с ними [2].

СЕМЕЙСТВО КОРОНАВИРУСОВ

Коронавирусы относятся к порядку Nidovirales, семейству Coronaviridae, подсемейству Orthocoronavirinae, внутри которого выделяют 4 рода коронавирусов: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* и *Deltacoronavirus*. Представители первых двух родов инфицируют исключительно млекопитающих, тогда как представители двух последних имеют более широкий спектр хозяев, включая птиц [3]. К роду *Alphacoronavirus* относятся HCoV-229E и HCoV-NL63; HCoV-NKU1, SARS-CoV, MERS-CoV, HCoV-OC43 и SARS-CoV-2 являются представителями *Betacoronavirus*.

Для вирусов, имеющих ветеринарное значение, описано множество случаев межвидового переноса коронавирусной инфекции между млекопитающими. Считается, что коронави

вирус, поражающий собак (CCoV), кошек (FCoV), и коронавирус, вызывающий трансмиссивный гастроэнтерит у свиней (TGEV), имеют один прототип – *Alphacoronavirus 1*. Показано, что вспышка синдрома острой диареи свиней (SADS) была вызвана коронавирусом SADS-CoV – потомком коронавируса летучих мышей BatCoV-NKU2, принадлежащего к роду *Alphacoronavirus*. Сходство коронавируса альпак (ACoV), относящегося также к роду *Alphacoronavirus*, с вирусом человека HCoV-229E наводит на мысль о зооножном происхождении последнего. Считается, что HCoV-OC43 произошёл от бычьего коронавируса (BCoV) примерно в 1890-х гг. [4].

Кошки, хорьки, собаки и другие млекопитающие заражаются не только коронавирусами, характерными для их видов, но также инфицируются SARS-CoV-2 [4]. Предполагают, что SARS-CoV и SARS-CoV-2, попали в популяцию людей от летучих мышей через промежуточных хозяев. Высокая степень гомологии генома коронавирусов пальмовых циветт и SARS-CoV указывает на большую вероятность перехода вируса к человеку именно от них [5]. Происхождение SARS-CoV-2 более спорно. Промежуточными хозяевами для этого вируса могли служить панголины или другие виды животных, но, возможно, вирус перешёл к человеку непосредственно от летучих мышей [6]. Опубликованы работы, согласно которым весь рецептор-связывающий мотив вируса SARS-CoV-2 мог быть введён путём рекомбинации с коронавирусами панголинов [7]. В недавних исследованиях показано, что SARS-CoV-2 может представлять собой мозаичный геном, который объединяет геномы трёх коронавирусов летучих мышей (RmYN02, RpYN06 и RaTG13), обнаруженных в китайской провинции Ухань [8]. В целом, летучие мыши имеют свыше 1300 видов, образуют огромные стаи (до нескольких млн особей в группе), перемещаются на большие расстояния и присутствуют на всех континентах, приобретая и распространяя множество вирусов. Среди идентифицированных вирусов летучих мышей как минимум 60 могут быть патогенными для человека [9]. Предполагают, что историю происхождения большинства коронавирусов человека можно проследить до вирусов летучих мышей. Это предположение основано на двух фактах: (1) разнообразие и количество коронавирусов летучих мышей намного превышает разнообразие этих вирусов у других млекопитающих; (2) были выявлены коронавирусы летучих мышей, очень похожие на вирусы человека (Bat-229E-подобный, Bat-NL63-подобный и Bat-SARS-подобный вирусы). Вероятность

перескока этих вирусов от вида к виду определяется, во-первых, совместимостью вируса с рецепторами, расположенными на клетках организма-хозяина (восприимчивостью клеток); во-вторых, способностью вируса реплицироваться в клетках организма-хозяина (пермиссивностью клеток); в-третьих, доступностью клеток, восприимчивых к вирусу; в-четвёртых, способностью уклоняться от иммунного ответа хозяина. Центральную роль в процессе перескока коронавирусов к человеку играет вирусный белок S (Spike) [10].

SARS-CoV-2 впервые был обнаружен в декабре 2019 г. Отсутствие иммунитета к новой инфекции позволило вирусу беспрепятственно размножаться и, как следствие, мутировать. В марте 2020 г. Европа превратилась в эпицентр пандемии нового коронавируса – появился вариант вируса, имеющий преимущество перед вирусом дикого типа: единственная мутация D614G в S-белке позволила сделать вирус более трансмиссивным. В апреле 2020 г. был задокументирован 1 млн случаев заболевания Covid-19. Вариант вируса с D614G продолжил накапливать мутации, направленные на быстрое изменение антигена (S-белка) и повышение трансмиссивности вируса. С декабря 2020 г. стали появляться новые варианты, которые были классифицированы Всемирной Организацией Здравоохранения как варианты, вызывающие озабоченность (variant of concern, VOC). Вариант V.1.1.7 (Альфа) впервые был обнаружен 14 декабря 2020 г. в Великобритании. Следующим вариантом стал V.1.351 (Бета) – он был обнаружен 18 декабря 2020 г. в Южной Африке. Третий вариант, P.1 (V.1.1.28.1, Гамма), выявили 6 января 2021 г. в Токио у туриста из Бразилии. В декабре 2020 г. появился вариант V.1.617.2 (Дельта), который заместил собой все остальные варианты вируса. На смену варианту Дельта в ноябре 2021 г. пришёл, обнаруженный в Южной Африке, вариант Омикрон (V.1.1.529) [11]. Подварианты Омикрона BA.1, BA.2 и BA.3 запустили четвёртую волну Covid-19, следом за которой пришла уже пятая, бушующая и сейчас, волна, сформированная подвариантами BA.4 и BA.5, среди которых BA.5 пока занимает лидирующее положение. По данным Европейского центра предотвращения и контроля над заболеваемостью (ECDC), к сентябрю 2022 г. в категории VOC остались подварианты Омикрона BA.2, BA.4 и BA.5, а пристальное внимание уделяется подвариантам BA.4, BA.5, BA.2.75 и BA.2.12.1. На сайте <https://covariants.org> читатель сможет ознакомиться с филогенетическим деревом возникновения основных вариантов SARS-CoV-2.

АРХИТЕКТУРА КОРОНАВИРУСОВ

Коронавирусы имеют сферическую форму вириона диаметром 80–120 нм, обрамлённую так называемыми «шипами» – тримерами S-белка (рис. 1). У коронавирусов HCoV-OC43 и HCoV-NKU1 в формировании так называемой «короны» участвует также гемагглютинин-эстераза (HE). Вирусная оболочка поддерживается мембранным белком (M) и содержит небольшие вкрапления белка оболочки (E). Под оболочкой вириона находится спирально-симметричный нуклеокапсид, образованный одноцепочечной геномной РНК, покрытой нуклеокапсидным белком (N) [12].

S и HE – трансмембранные белки, отвечающие за проникновение вируса в клетку. S-Белок (128–160 кДа) определяет тропизм вируса, он связывается с рецепторами, локализованными на поверхности клетки-мишени. У вирусов HCoV-OC43 и HCoV-NKU1 белок HE (48–67 кДа) облегчает прикрепление вируса к клетке [13]. Для некоторых коронавирусов показано, что присутствие S-белка на поверхности инфицированной клетки способствует её слиянию с соседней неинфицированной клеткой. Благодаря такой стратегии образуются гигантские многоядерные клетки, или синцитий, функцией которого является облегчение распространения вируса между клетками [14].

N-Белок определяет архитектуру генома вируса, образуя нуклеокапсид с геномной РНК. Локализуясь в области эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи, он участвует в сборке и отпочковывании вирусных частиц.

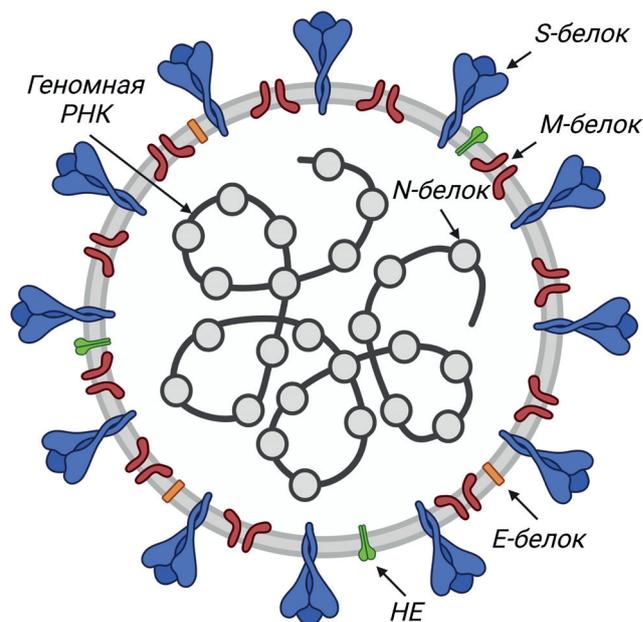


Рис. 1. Строение коронавируса: указаны структурные белки N, S, M, E, HE и геномная РНК; объяснения в тексте

Считается, что N-белок также участвует в регуляции и модулировании репликации и транскрипции. Было показано, что он способен не только неспецифически связывать РНК, но и специфически взаимодействовать с некоторыми последовательностями, регулирующими транскрипцию (TRS). Нуклеокапсидные белки различных коронавирусов взаимодействуют с множеством других белков, в том числе с nsp 3 (неструктурный белок 3) и РНК-геликазой DDX1 клетки-хозяина. Предполагается, что комплекс, образованный DDX1 и фосфорилированным нуклеокапсидным белком, контролирует баланс между репликацией и транскрипцией путём модулирования уровня переключения матрицы на последовательности TRS-B. N-Белок SARS-CoV-2 способствует ассоциации РНК с комплексом nsp 7–nsp 8–nsp 12 и, вероятно, инициации репликации и транскрипции [15].

M-Белок является коровым мембранным белком. Он встроен в липидный бислой тремя трансмембранными доменами, гликозилированный эктодомен белка выступает наружу. M-Белок поддерживает вирусную оболочку, определяет форму и размер вирусного капсида, поскольку именно он взаимодействует с другими структурными белками. Взаимодействие M и S необходимо для удержания S-белка в промежуточном компартменте между ЭПР и аппаратом Гольджи (ERGIC) и включения его в новые вирионы. Связывание M и N стабилизирует нуклеокапсид, а также внутренний кор вириона и в конечном счёте способствует завершению

сборки вируса. Взаимодействия M и E достаточно для производства и высвобождения вирусных частиц [2, 13].

E-Белок является небольшим интегральным белком (8–12 кДа), он заякорен в мембрану трансмембранным доменом, его эктодомен гликозилирован, а эндодомен пальмитирован. Для вирусов SARS-CoV и IBV показано, что E-белок образует гомопентамеры, действующие как ионные каналы. Такие структуры модулируют процесс высвобождения вирионов, принимая активное участие в заражении клетки. Интересно, что E-белок в избытке образуется внутри инфицированной клетки, и только часть его включается в оболочку вириона, а большая часть находится там, где собираются и отпочковываются вирусные частицы [14].

СТРОЕНИЕ ГЕНОМА КОРОНАВИРУСОВ И МЕХАНИЗМЫ ЕГО ЭКСПРЕССИИ

Коронавирусы имеют самые длинные не-сегментированные геномы среди РНК-содержащих вирусов [16]. Так, геном SARS CoV-2 размером от 26 до 32 т.н. кодирует информацию о 16 неструктурных (nsp 1–16), 4 структурных (S, M, N и E) и 11 дополнительных белках (ORF3a, ORF3b, ORF3c, ORF3d, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9b, ORF9c и ORF10) [12, 17]. Носителем генетической информации коронавирусов является смысловая одноцепочечная РНК. Каждый вирусный транскрипт,

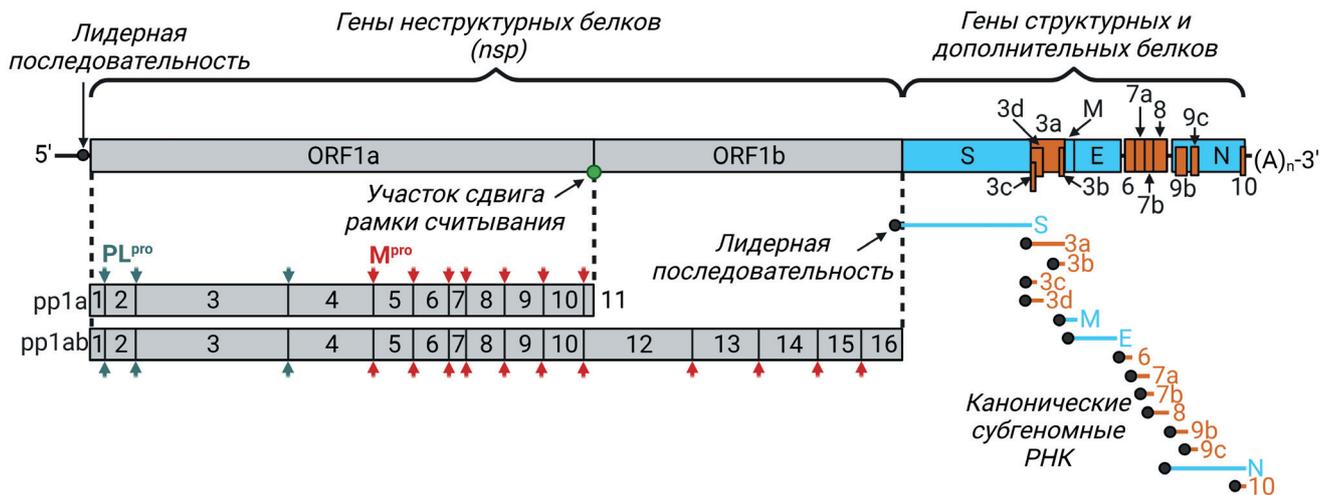


Рис. 2. Организация генома коронавируса на примере SARS-CoV-2. Наличие 5'-кэп и 3'-поли(А)-хвоста на концах геномной РНК позволяет сразу транслировать в клетке неструктурные белки с рамок считывания ORF1a и ORF1b. Рамки разделены между собой участком сдвига рамки считывания. Результатом трансляции являются две полипротеиновые цепи pp1a и pp1ab. Отдельные неструктурные белки образуются в результате протеолитического процессинга pp1a и pp1ab папаин-подобной протеазой PL^{pro} и 3CL-подобной протеиназой M^{pro}. Гены структурных и дополнительных белков транскрибируются в набор субгеномных мРНК. Геномная РНК и все субгеномные мРНК содержат одинаковую лидерную последовательность на своих 5'-концах. Неструктурные белки и их гены обозначены серым цветом, гены структурных и дополнительных белков и их транскрипты обозначены голубым и оранжевым цветом соответственно

как и геномная РНК, кэпированы с 5'-конца и полиаденилированы – с 3'-конца. Такое строение генома позволяет рибосоме клетки распознавать геномную РНК как мРНК и сразу включать её в процесс трансляции вирусных белков без необходимости упаковки в вирион транскрипционного комплекса. Кроме того, все вирусные РНК имеют специальную лидерную последовательность на своём 5'-конце, благодаря которой происходит разграничение вирусных и клеточных РНК (рис. 2) [18].

При адаптации под процессы, происходящие в эукариотической клетке, коронавирусы выработали разные механизмы трансляции

своего генома. Так, неструктурные белки образуются сразу после проникновения вируса в клетку в виде двух крупных полипротеинов, которые в дальнейшем подвергаются процессингу. Для транскрипции структурных и дополнительных белков коронавирусы образуют специальные органеллы репликации – DMV, которые представляют собой ретикуловезикулярную сеть двухмембранных везикул с взаимосвязанными внешними мембранами (рис. 3) [19]. Вирусы производят DMV из мембран ЭПР клетки-хозяина путём их последовательных перестроек под регуляцией неструктурных белков nsp 3, nsp 4 и nsp 6, а

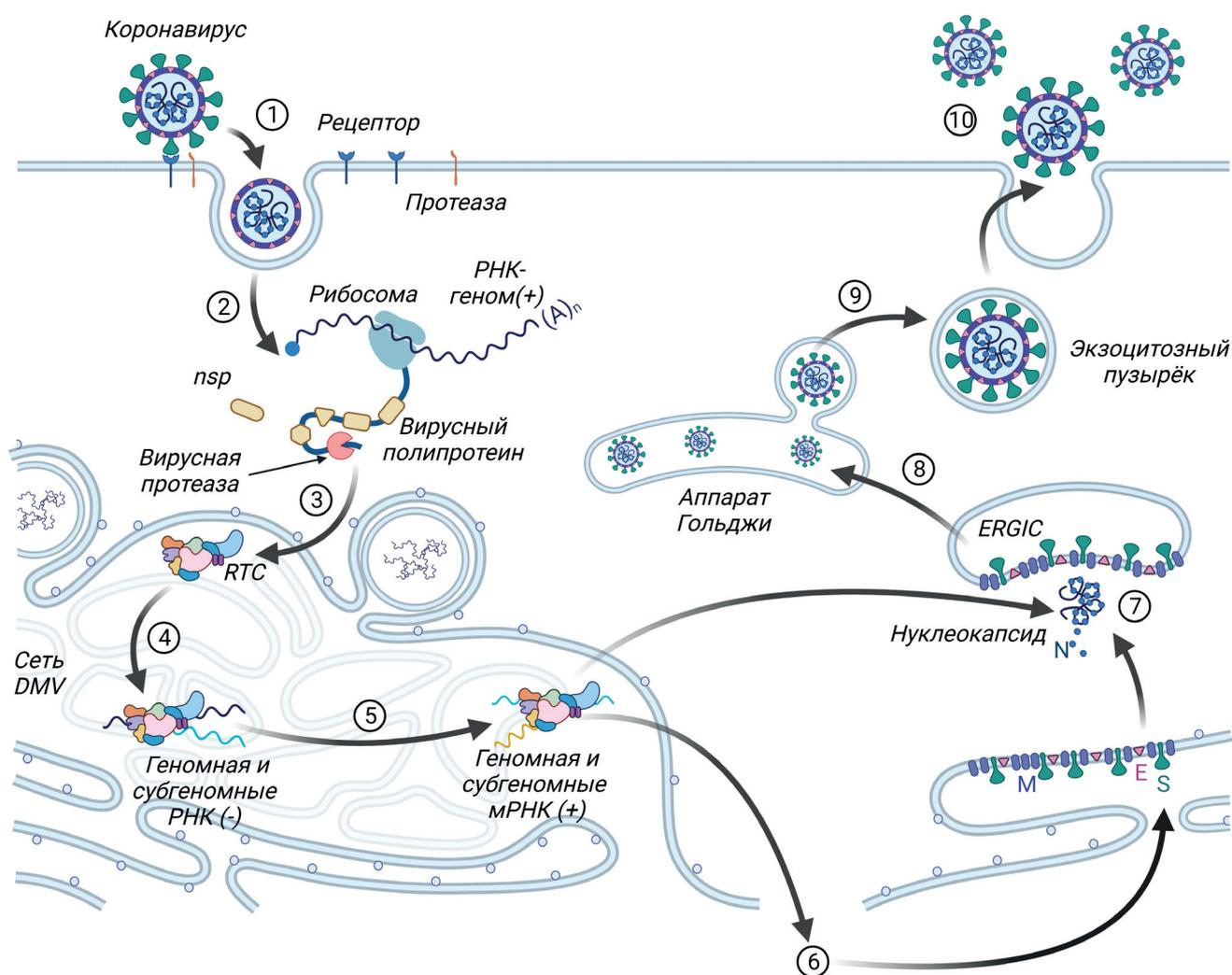


Рис. 3. Жизненный цикл коронавирусов. Поверхность вируса покрыта S-белком, который взаимодействует с рецептором и активирует слияние вируса с мембраной клетки после своего расщепления протеазой, находящейся на поверхности клетки (1). Геномная РНК, попадая внутрь клетки, сразу распознаётся рибосомой, и происходит трансляция полипротеинов и их процессинг до отдельных неструктурных белков (2). В мембранах эндоплазматической сети происходит формирование двухмембранных везикул (DMV), внутри которых происходит сборка репликационно-транскрипционного комплекса (RTC) (3). Геномная смысловая РНК сначала переводится в антисмысловую форму с образованием геномной и субгеномных РНК (4), а затем в смысловую форму геномной РНК и субгеномных мРНК (5). В эндоплазматической сети с субгеномных мРНК происходит трансляция структурных и дополнительных белков (6). Геномная РНК взаимодействует с N-белком, образуя нуклеокапсид (7), который, объединяясь со структурными белками, формирует вирион (8). Зрелый вирион (9) выводится из клетки путём экзоцитоза (10)

также белков клетки-хозяина [17]. В репликативно-транскрипционных комплексах DMV проходят процессы репликации и транскрипции субгеномных РНК коронавируса [20]. Образование органелл репликации в целом свойственно РНК-вирусам со смысловой цепью генома. Оно оправдано с нескольких позиций: (1) происходит скопление в одном месте всех факторов вируса и клетки-хозяина, необходимых для репликации и транскрипции; (2) промежуточные продукты репликации и транскрипции не выходят за пределы DMV и не распознаются системами клеточного противовирусного ответа; (3) идёт более строгая координация процессов репликации и транскрипции [21]. Наряду с трансляцией неструктурных белков, в клетке сразу происходит накопление полноразмерных антисмысловых геномных копий, которые используются как матрицы для образования новых смысловых геномных РНК. Синтезированные смысловые геномы используются либо для трансляции большого количества неструктурных белков и репликативно-транскрипционных комплексов, либо упаковываются в новые вирионы. Кроме того, смысловая РНК используется для транскрипции субгеномных РНК путём прерывистой транскрипции. Образуются сначала промежуточные антисмысловые субгеномные РНК, которые «переводятся» в смысловые субгеномные мРНК. Структурные и дополнительные белки синтезируются и перемещаются сначала в ERGIC, а затем мигрируют в аппарат Гольджи, где происходит образование зрелого вириона. Вирион отщепляется от клетки путём конститутивного экзоцитоза (рис. 3) [22, 23].

НЕСТРУКТУРНЫЕ БЕЛКИ: ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ СИНТЕЗ И ФУНКЦИИ

Две трети генома с 5'-конца занимают рамки считывания ORF1a и ORF1b. В них закодирована информация обо всех неструктурных белках вируса (для SARS CoV-2 – это nsp 1–16), гены этих белков слиты между собой и не имеют стоп-кодонов, за исключением участка на стыке рамок считывания. Неструктурные белки определяют репликацию вируса и сборку его транскрипционного комплекса, в котором проходит транскрипция, процессинг, модификация РНК, а также коррекция неправильно встроенных нуклеотидов.

Трансляция ORF1a и ORF1b приводит к образованию двух полипептидных цепей (pp1a и pp1ab). Стоп-кодон, расположенный на стыке рамок считывания ORF1a и ORF1b, позволяет рибосоме закончить синтез в этом месте с образованием pp1a (440–500 кДа). Иногда рибосома, дойдя до специальной регуляторной последовательности (slippery sequence) X XXY YYZ (X – три одинаковых нуклеотида; Y – A/U; Z – A/C/G), расположенной непосредственно около стоп-кодона ORF1a, стремится выскользнуть из рамки считывания и перескочить на 1 нуклеотид назад. У коронавируса этот процесс усилен, поскольку сразу следом за регуляторной последовательностью находится стабильная РНК-структура (псевдоузел), наткнувшись на которую рибосома делает паузу, и вероятность перескока увеличивается (рис. 4). Если сдвиг рамки считывания произошёл, то образуется pp1ab (740–810 кДа), который своим N-концом сходен с pp1a.

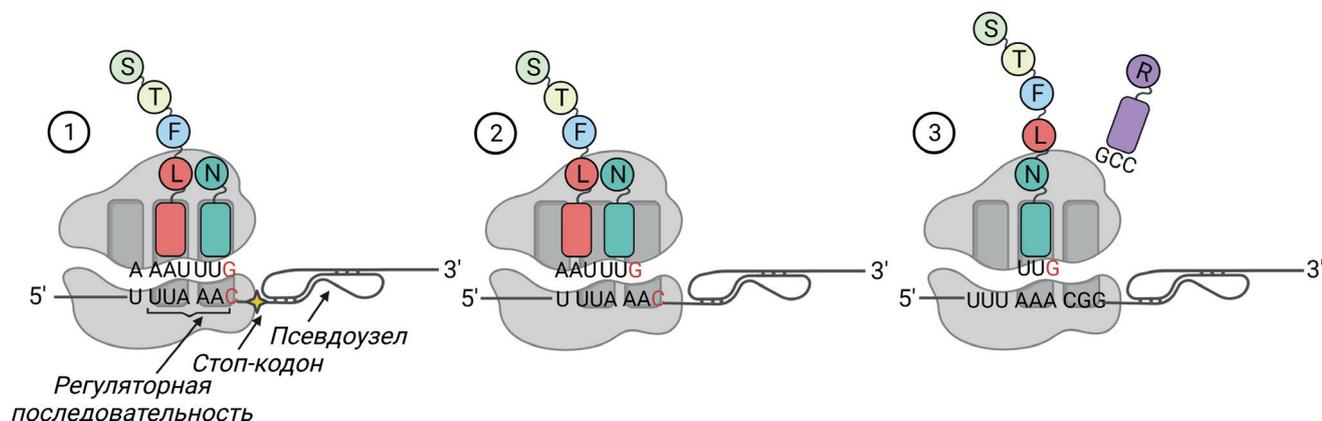


Рис. 4. Сдвиг рамки считывания при синтезе pp1ab SARS-CoV-2. Недалеко от регуляторной последовательности (slippery sequence) располагается стоп-кодон, а следом за ним – стабильная РНК-структура (псевдоузел) (1). Когда рибосома подходит к псевдоузлу, скорость трансляции замедляется, благодаря чему становится возможным перескок рибосомы на 1 нуклеотид назад. Это приводит к изменению кодонного состава, что связано с исчезновением стоп-кодона (2). Высвобожденный третий нуклеотид триплета становится первым в новом триплете. К нему подходит соответствующая тРНК, и трансляция белка продолжается (3)

Расположенные внутри белки высвобождаются после протеолитического расщепления двумя цистеиновыми протеазами – папаин-подобной протеазой PL^{pro} и 3CL-подобной протеиназой M^{pro} (major protease, 3CL^{pro}), первая из которых находится внутри гена nsр 3, а вторая – nsр 5. Папаин-подобная протеаза процессирует nsр 1, nsр 2, nsр 3, а также высвобождает N-конец nsр 4, тогда как M^{pro} отвечает за процессинг большинства неструктурных белков: C-конца nsр 4 и белков nsр 5–16 (рис. 2) [23]. Но, прежде чем начать выполнять свои функции, эти протеазы подвергаются аутолитическому процессингу [24, 25]. Полипротеин pp1a процессируется до 11 белков, а pp1ab – до 15 белков [18]. Образование нескольких белков с одной рамки считывания позволяет ускорить выработку белков вируса при использовании моноцистронного принципа трансляции в эукариотической клетке.

Расположение неструктурных белков и их процессинг, по-видимому, отражает необходимость этих белков в процессе трансляции генома. Попав в клетку, вирус начинает её «захват» – синтез большого числа pp1a. Когда произошла модуляция работы клетки под вирусную систему, необходим синтез ферментов вируса – идёт сдвиг рамки считывания на стыке ORF1a и ORF1ab, синтезируется pp1ab. Далее происходит сборка репликазно-транскрипционного комплекса, транскрипция субгеномных РНК, их трансляция в структурные и дополнительные белки. Появляется возможность собирать вирионы и выходить из клетки.

В жизненном цикле коронавирусов очень быстро появляется неструктурный белок nsр 1. Он отвечает за подавление экспрессии генов клетки-хозяина. Связываясь с 40S-субъединицей рибосомы, он блокирует трансляцию невирусных белков, в результате чего мРНК клет-

ки-хозяина начинает деградировать с 5'-конца. При этом трансляция вирусных РНК продолжает идти, поскольку их 5'-концы защищены лидерными последовательностями [18].

Nsp 2–16 составляют вирусный репликационно-транскрипционный комплекс (RTC), они нацелены на определённые субклеточные участки, где происходит их взаимодействие с факторами клетки-хозяина, что определяет ход цикла репликации. Nsp 2–11 помогают накоплению вирусных RTC, моделируя внутриклеточные мембраны, участвуют в уклонении от иммунной системы и обеспечивают кофакторами для репликации. Процесс эспирования РНК протекает при участии nsр 10 (он выступает как кофактор), nsр 13 (обладает 5'-трифосфатной активностью), nsр 14 (является N⁷-метилтрансферазой) и nsр 16 (имеет 2'-O-метилтрансферазную активность). В 3'-нетранслируемой области коронавирусов находится последовательность AAUAAA, которая служит сигналом полиаденилирования для белка nsр 8 [26]. Nsp 12–16 берут на себя основные ферментативные функции: участвуют в синтезе, модификации и коррекции РНК (табл. 1) [27]. Nsp 15, уникальная уридилат-специфичная эндорибонуклеаза, укорачивает поли(U)-участки, которые присутствуют на 5'-конце вирусной антисмысловой РНК, что способствует уклонению от системы врождённого иммунитета [15].

РНК-зависимая РНК-полимераза коронавирусов представлена белком nsр 12. Сам по себе он обладает минимальной полимеразной активностью, которая существенно возрастает при взаимодействии с факторами процессивности nsр 7 и nsр 8. Считается, что связка nsр 12–nsр 7–nsр 8 представляет собой холофермент РНК-полимеразы, минимальный комплекс, необходимый для полимеризации нуклеотидов [28]. Полимераза nsр 12 имеет

Таблица 1. Функции белков, принимающих участие в формировании комплекса РНК-зависимой РНК-полимеразы

Название белка	Участие в репликазно-транскрипционном комплексе
nsр 7, nsр 8	субъединицы холофермента РНК-полимеразы
nsр 9	связывание с РНК и с репликазным комплексом (предположительно)
nsр 10	активаторная субъединица экзонуклеазной активности nsр 14 и метилтрансферазной активности nsр 16; регуляция сдвига рамки считывания в рибосоме
nsр 12	РНК-зависимая РНК-полимераза, нуклеотидилтрансфераза
nsр 13	геликаза, РНК 5'-фосфатаза
nsр 14	3'→5' экзорибонуклеаза, N ⁷ -метилтрансфераза
nsр 16	образование кэпа РНК, рибозо 2'-O-метилтрансфераза

высокую степень консервативности — более 95% гомологии среди коронавирусов.

С холоферментом РНК-полимеразы коронавирусов также взаимодействует белок nsp 14, благодаря которому происходит экпирование РНК за счёт его метилтрансферазной активности. Другой очень важной его функцией является способность исправлять неправильно встроенные нуклеотиды за счёт своей 3'→5' экзонуклеазной активности, не свойственной другим РНК-содержащим вирусам. Способность к коррекции неправильно встроенных нуклеотидов позволяет поддерживать целостность огромного генома за счёт снижения частоты мутаций склонной к ошибкам РНК-зависимой РНК-полимеразы.

Экзонуклеазная активность обеспечивается при взаимодействии двух белков: nsp 14 и nsp 10, где каталитическую функцию выполняет nsp 14, а активирует его nsp 10 (рис. 5). Последовательность и структура экзонуклеазного домена nsp 14 сильно отличается от известных клеточных экзонуклеаз, что делает этот фермент привлекательной мишенью для разработки противовирусных препаратов [29].

СИНТЕЗ СТРУКТУРНЫХ И ДОПОЛНИТЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ

В последней трети генома коронавирусов кодируются структурные и дополнительные белки. Для их трансляции в инфицированных клетках образуются субгеномные матричные РНК. Эти молекулы вирус получает особым способом — путём «прерывистой» транскрипции, которая встречается у коронавирусов и большинства членов порядка Nidovirales, но не детектирована у других РНК-вирусов [30].

Вирусные смысловые РНК на 5'-конце имеют одинаковую лидерную последовательность — TRS-L (TRS-lider), варьирующую у разных коронавирусов от 55 до 92 нуклеотидов [31]. В субгеномных мРНК эта последовательность «слита» с другой регуляторной последовательностью — TRS-B (или TRS-body). В геноме коронавирусов последовательность TRS-B находится непосредственно перед каждой открытой рамкой считывания в районе структурных и дополнительных генов (за некоторым исключением), а TRS-L — только в одном месте (на 5'-конце).

В процессе синтеза антисмысловой цепи РНК-зависимая РНК-полимераза доходит до TRS-B, после копирования которой она останавливает свою работу и перескакивает

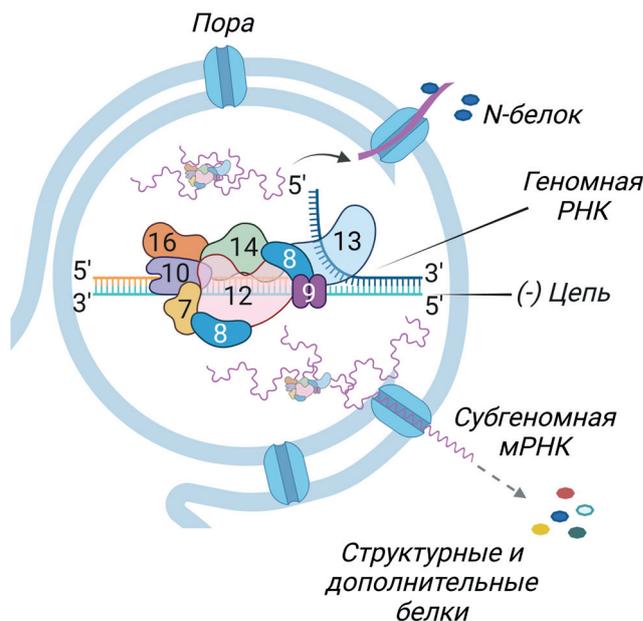


Рис. 5. Внутри двухмембранной везикулы DMV проходит репликация геномной РНК и транскрипция субгеномных РНК. Полимеразный комплекс составляют неструктурные белки nsp 7, nsp 8, nsp 9, nsp 10, nsp 12, nsp 13, nsp 14 и nsp 16 (обозначены цифрами). РНК, полученные внутри DMV, выходят наружу через поры в мембране. Субгеномные РНК транслируются в неструктурные и дополнительные белки, N-белок встречается с геномной РНК и образует нуклеокапсид

на начало геномной РНК (на участок TRS-L) для повторной инициации синтеза. Происходит взаимодействие между комплементарными TRS: один расположен на зарождающейся антисмысловой цепи РНК (TRS-B), а второй — на матричной смысловой геномной РНК (TRS-L). Взаимодействие TRS происходит по консервативной последовательности (5'-ACGAAC-3' для SARS-CoV и SARS-CoV-2), окружённой вариабельными последовательностями переменной длины, которые также могут способствовать взаимодействию TRS-B и TRS-L [15]. После реинициации синтеза РНК на TRS-L копия лидерной последовательности, расположенной на матричной цепи, добавляется к зарождающейся РНК, и синтез антисмысловых субгеномных РНК завершается. Эти промежуточные РНК затем используются для транскрипции в субгеномные мРНК, которые имеют смысловую цепь и используются как мРНК для трансляции структурных и дополнительных белков (рис. 6) [18]. Субгеномные мРНК совпадают своими 3'- и 5'-концами, но варьируют по внутренним участкам. Такие РНК считаются полицистронными, однако функционально они моноцистронны, поскольку трансляция ограничивается одной открытой рамкой считывания, ближайшей к 5'-лидерной последовательности [15].

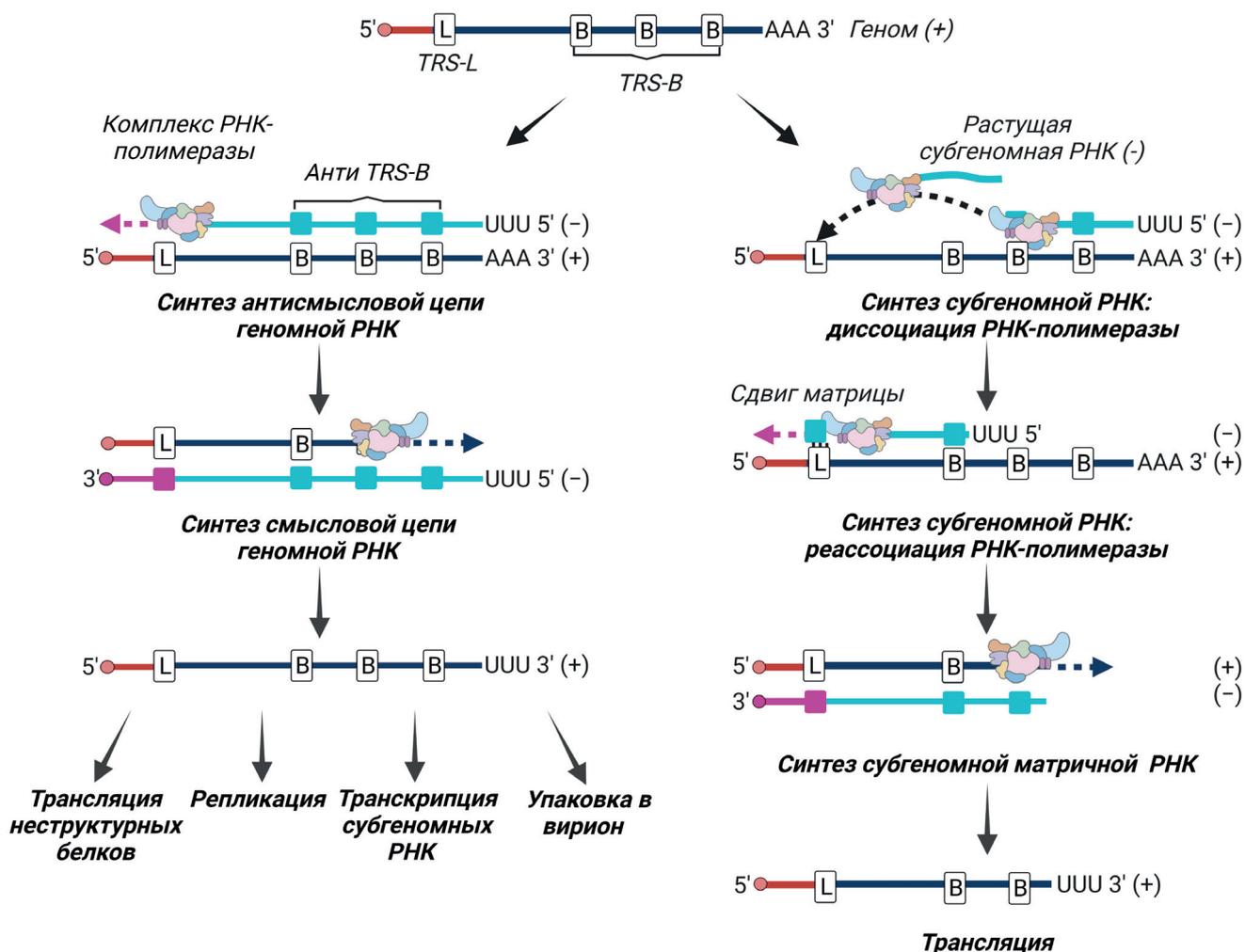


Рис. 6. Репликация и «прерывистая» транскрипция. Геномная РНК вируса служит матрицей для синтеза новых копий геномной РНК (слева) и для транскрипции в субгеномные мРНК по «прерывистому» принципу (справа). Копии геномных РНК используются для синтеза неструктурных белков, репликации, транскрипции в субгеномные РНК и упаковки в вирион. Субгеномные мРНК транслируются в структурные и дополнительные белки

Количество отдельных субгеномных РНК, синтезируемых в инфицированных клетках, зависит от локализации и эффективности считывания каждого TRS-B [26]. Показано, что плотность посадки рибосомы определяет количество транскриптов с данного TRS [15].

Для большинства представителей коронавирусов идентифицировано от 5 до 8 субгеномных РНК, 4 из которых кодируют обязательные структурные белки вириона (S, E, M и N), а остальные относятся к дополнительным белкам. В клетках, инфицированных SARS-CoV-2 и SARS-CoV, идентифицировано 11 и 10 субгеномных мРНК соответственно [17].

Кроме канонических субгеномных РНК, были обнаружены другие, неканонические РНК-продукты прерывистой транскрипции [31]. И здесь много интригующего: есть те, в которых 5'-лидерные последовательности присоединены к неожиданным 3'-сайтам (TRS-L-независимые длинные гибриды и продукты,

полученные в результате делеций структурных и дополнительных генов) [15]. Неканонические субгеномные РНК могут составлять до 1/3 от общего количества субгеномных РНК [32]. Leary et al. [33] исследовали вариант SARS-CoV-2, содержащий мутацию D614G и 3 соседних нуклеотидных замены, охватывающих два остатка нуклеокапсидного белка (R203K/G204R; вариант B.1.1). Анализ последовательности предполагает, что эти замены являются результатом гомологичной рекомбинации основной последовательности TRS-L. Благодаря этому появилась новая TRS между доменами связывания РНК и доменами димеризации нуклеокапсиды, что привело к появлению нового транскрипта субгеномной РНК. Вирусы с мутацией K203/R204 могут также иметь повышенную экспрессию субгеномной РНК из других открытых рамок считывания. Способность SARS-CoV-2 вводить новые мотивы TRS в свой геном с потенциалом для новых транскриптов

субгеномных РНК предполагает, что это средство повышения эффективности и адаптации. В данном исследовании также говорится о том, что сам SARS-CoV-2 может выступать как источник гомологичной рекомбинации [33].

Многие неканонические субгеномные РНК обладают кодирующим потенциалом, и их продукты могут представлять собой укороченные версии дополнительных белков или сами по себе быть не исследованными белками. На примере SARS-CoV-2 показана субгеномная РНК, которая способна транслироваться в укороченный с *N*-конца (делеция в 143 а.о.) S-белок. Подобный белок был идентифицирован в респираторном коронавирусе свиней [31]. Davidson et al. [34] представили доказательства картирования пептидов с помощью тандемной масс-спектрометрии, указывающие на обнаружение ранее неизвестных вирусных белков, часть которых может иметь происхождение от неканонических субгеномных РНК [34]. Также неканонические субгеномные РНК могут функционировать как дефектные интерферирующие РНК [35].

Наличие неканонических РНК показано для разных коронавирусов (например, для MHV, HCoV-229E, SARS-CoV-2). Не ясно, синтезируются ли эти неканонические РНК в результате необычной прерывистой транскрипции (хотя и показано использование TRS-подобных последовательностей для синтеза субгеномных транскриптов [15]) или они представляют собой продукты рекомбинации.

Считается, что TRS представляют собой «горячие точки» рекомбинации, а вторичные РНК-структуры способствуют переключению матрицы TRS-независимым способом. В экспериментах по транскриптомике и профилированию рибосом был продемонстрирован сложный ландшафт РНК и потенциальных белков SARS-CoV-2, который выходит далеко за рамки «канонической» программы экспрессии генов коронавирусов. Аналогичные наблюдения были сделаны и в отношении других коронавирусов [15]. Детальное изучение этих процессов ещё впереди.

На данный момент чётко не установлено, идентичен ли состав репликационно-транскрипционных комплексов, выполняющих синтез антисмысловых геномных РНК и субгеномных РНК. Вероятно, баланс между репликацией и транскрипцией определяется взаимодействием со специфическими белковыми факторами.

Дополнительные белки являются самыми неизученными элементами коронавирусов.

Они не являются важными участниками процесса репликации, однако, по-видимому, играют важную роль в патогенезе вируса, то есть при взаимодействии вируса с организмом хозяина. Большинство функций, приписываемых дополнительным белкам, связаны с механизмами уклонения от действия иммунной системы организма хозяина. К таким функциям относится, например, подавление секреции цитокинов при участии ORF9c или антагонизм интерферона первого типа при участии ORF3b, ORF6, ORF7a, ORF8 или ORF9b. Кроме того, эти вспомогательные белки (например, ORF3a) влияют на такие важные клеточные процессы, как аутофагия или апоптоз. ORF3b влияет на функционирование митохондрий, а ORF9b активирует воспаление [17]. Многие функции этих белков остаются неизвестными ввиду недостаточной гомологии с известными белками [23].

МЕХАНИЗМ ПРОНИКНОВЕНИЯ ВИРУСА В КЛЕТКУ

Коронавирусы проникают в клетку по завершению двух последовательных событий: (1) вирусный S-белок взаимодействует со своим рецептором на поверхности клетки и (2) S-белок расщепляется клеточной протеазой до своей активной формы, способной стимулировать слияние вирусной и клеточной мембран.

Описано 4 рецептора, которые используются коронавирусами для связывания с клеткой организма-хозяина. S-белки коронавируса HCoV-229E, вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней (TGEV) и вируса инфекционного перитонита кошек (FIPV) взаимодействуют с аминокептидазой N (APN). Причём для превращения аминокептидазы свиньи в рецептор вируса человека HCoV-229E достаточно изменить участок всего из 8 а.о. в гипервариабельной области рецептор-связывающего домена (RBD) [36]. Молекула адгезии CEACAM1 является рецептором для входа вируса гепатита мышей (MHV), относящегося к роду *Betacoronavirus*. RBD S-белка этого вируса расположен в необычном для коронавирусов месте, в его *N*-концевом домене, где он функционирует как лектин, связывая остатки углеводов. Когда-то это позволило древнему коронавирусу расширить свой тропизм и повысить инфекционность. SARS-CoV, SARS-CoV-2 и некоторые SARS-родственные вирусы летучих мышей используют для входа в клетку ангиотензин-превращающий

фермент ACE2. MERS-CoV, верблюжий MERS-CoV и BatCoV-HKU4 используют белковый рецептор DPP4 [10].

Три из указанных выше рецепторов (APN, ACE2 и DPP4) обладают пептидазной активностью. Однако показано, что протеолитическая активность этих молекул не важна для успешного связывания и проникновения коронавируса. Связывание RBD и рецептора происходит на внешней стороне рецептора, не затрагивая участок его каталитического центра. Но присутствие трансмембранных протеаз, например, TMPRSS2 (трансмембранная сериновая протеаза 2), критически важно [10].

S-Белок (180–200 кДа, 1273 а.о.) располагается на поверхности вириона в виде тримера, формируя выпуклую «головку» и «стебель». Каждый тример покрыт 66 гликанами, маскирующими вирус от узнавания иммунной системой хозяина и помогающими вирусу прикрепляться. Выделяют 2 субъединицы S-белка: S1 отвечает за связывание с рецептором, а S2 — за слияние вируса с мембраной клетки-хозяина. Основными доменами субъединицы S1 являются *N*-концевой домен (NTD) и RBD. Внутри домена RBD выделяют рецептор-связывающий мотив (RBM), который непосредственно связывается с рецептором. RBD-домены тримера S-белка могут существовать в двух различных конформациях: открытой (up-конформация, состояние доступности рецептору) и закрытой (down-конформация, со-

стояние недоступности к взаимодействию с рецептором) [37]. В субъединице S2 выделяют пептид слияния FP, два домена, содержащих гептадный повтор (HR1 и HR2), трансмембранный (TMD) и цитоплазматический (CTD) домены. На примере ACE2 показано, что с одним димером рецептора связывается 2 тримера S-белка, что ускоряет процесс проникновения вируса.

В нативной конформации субъединица S1 «обёртывает» субъединицу S2, которая образует центр белка. После отщепления субъединицы S1 внутри субъединицы S2 происходят масштабные перестройки, в том числе рефолдинг домена HR1, благодаря чему пептид слияния FP высвобождается и встраивается в мембрану клетки-хозяина [37].

S-Белок содержит 2 участка, последовательное расщепление которых приводит к его активации на клеточной поверхности. Первый участок, S1/S2, расположен на стыке двух субъединиц. У некоторых, но далеко не у всех коронавирусов, он узнаётся протеазами, расположенными на поверхности клетки, и катепсинами. MERS-CoV, IBV, SARS-CoV и SARS-CoV-2 являются примерами вирусов, у которых происходит расщепление по S1/S2 [38]. Относительно других коронавирусов SARS-CoV-2 имеет эволюционное преимущество — вставку полиосновного сайта расщепления в этом участке, а он является минимальным сайтом узнавания фуринами —

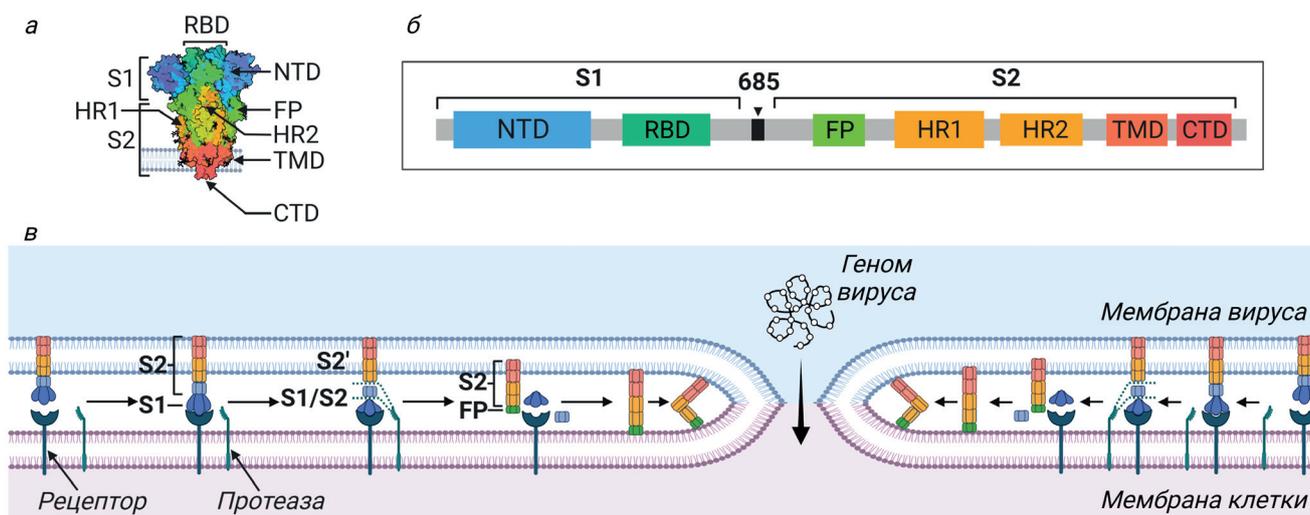


Рис. 7. Доменная организация S-белка и его участие в процессе слияния вирусной частицы с клеткой. Кристаллографическая (а) и первичная (б) структура S-белка SARS-CoV-2. Внутри субъединиц S1 и S2 выделяют следующие домены: NTD — *N*-концевой домен, RBD — рецептор-связывающий домен, пептид слияния FP, домены HR1 и HR2, трансмембранный (TMD) и цитоплазматический (CTD) домены. в — Схема взаимодействия клетки и коронавирусной частицы. S-Белок, расположенный на поверхности вирусной мембраны, находит на клеточной мембране соответствующий рецептор. После их взаимодействия друг с другом клеточная протеаза расщепляет S-белок по сайтам S1/S2 и S2'. Это приводит к высвобождению активированной субъединицы S2 с торчащим по направлению к клетке пептидом слияния FP. Пептид встраивается в мембрану клетки, домены HR1 и HR2 взаимодействуют друг с другом, «подтягивая» обе мембраны друг к другу

пептидазами, широко представленными на эпителиальных клетках. Это позволило SARS-CoV-2 использовать широкий спектр разных протеаз для активации процесса проникновения в клетку. Второй участок находится внутри субъединицы S2 и называется S2'. Его расщепление может проходить во внеклеточном пространстве или на поверхности клетки при участии сериновых протеаз, таких как трипсин, TMPRSS2 или нейтрофильная эластаза. При отсутствии расщепления S1/S2 активация S2' все ещё возможна катепсинами (катепсином L) в момент созревании вириона при прохождении эндоцитозного пути. То есть коронавирусы могут сливаться с плазматической мембраной клетки или эндосомами, используя ранний и поздний пути. Ранний путь предполагает расщепление сначала по S1/S2, а затем — по S2' внеклеточными и клеточными трансмембранными протеазами (трипсин, нейтрофильная эластаза, TMPRSS2), тогда как в позднем пути процессом руководят эндосомальные протеазы, такие как катепсин L [39].

После расщепления на участке S2' пептид слияния FP экспонируется наружу и происходит запуск слияния с мембраной клетки-хозяина. Затем возникают гидрофобные взаимодействия между доменами HR1 и HR2 субъединицы S2, в результате чего образуется структура, состоящая из 6 цепей, которая заставляет мембраны вируса и клетки сблизиться друг с другом, образуя пору. Пору увеличивается до тех пор, пока внутрь клетки не зайдёт генетический материал вируса (рис. 7).

МУТАЦИИ SARS-CoV-2

Эволюция вируса происходит постоянно. Считается, что особенно интенсивно мутации возникают и закрепляются при длительной персистенции вируса в организме человека с ослабленным иммунитетом [40]. Мутации и их сочетание модулируют вирулентность или контагиозность, влияют на клиническую картину и тяжесть последствий Covid-19 (табл. 2).

На заре образования вариантов вируса SARS-CoV-2 мутация D614G в гене S-белка [52] способствовала быстрому распространению вируса и стала первой мутацией, сохранившейся во всех вариантах, появившихся после Уханьского [53]. D614G характеризуется заменой аспарагиновой кислоты на глицин в положении 614 в S-белке. Остаток 614 находится на границе раздела субъединиц S1 и S2 и может влиять на их взаимодействие и стабилизацию S-белка. Петля, разупорядоченная в

S-тримере D614, вклинивается между доменами внутри протомера в шипе G614. Это дополнительное взаимодействие, по-видимому, предотвращает преждевременную диссоциацию тримера G614, в результате которой S-белок становится более стабильным, чем в исходном варианте вируса. Наличие данной мутации связано с высокой вирусной нагрузкой у инфицированных пациентов и высокой инфекционностью на модели псевдотипированных по системе VSVΔ*G/GFP вирусов *in vitro*. При этом наличие мутации D614G не коррелирует с тяжестью заболевания [54].

Для варианта Дельта описано 4 критические мутации, влияющие на характеристики вируса: D614G и G142D повышают аффинность к ACE2, а L452R и T478K обеспечивают высокую аффинность и неспособность антител нейтрализовать вирус (табл. 2). Эти мутации не уникальны и встречаются в других вариантах, но их сочетание в варианте Дельта может определять длительное и тяжёлое течение заболевания. В работе Zhang et al. [55], опубликованной в журнале Science, были описаны 2 характеристики варианта Дельта, объясняющие его более высокую трансмиссивность. Во-первых, даже при низких уровнях ACE2 слияние S-белка вируса варианта Дельта с клеткой происходит эффективно. Во-вторых, инфицирование клеток-мишеней вирусами этого варианта происходит значительно быстрее, чем вирусами других вариантов. Таким образом, при относительно коротком воздействии Дельта может быстро заражать гораздо большее количество клеток, что приводит к короткому инкубационному периоду и большей вирусной нагрузке во время инфекции [55].

Planas et al. [56] исследовали чувствительность вируса варианта Дельта к моноклональным антителам и антителам, присутствующим в сыворотке крови людей, переболевших Covid-19 или получивших вакцину от Covid-19. Было показано, что некоторые моноклональные антитела против N-концевого домена (NTD) и против RBD, включая бамланивимаб, утратили способность связываться с S-белком и больше не были способны нейтрализовать вирус варианта Дельта. Сыворотки, собранные у людей, переболевших Covid-19 в течение 12 мес. после появления симптомов, были в 4 раза менее эффективны против варианта Дельта по сравнению с вариантом Альфа (B.1.1.7). Сыворотки людей, получивших одну дозу вакцины Pfizer или AstraZeneca, показали едва заметное ингибирующее действие на вирус варианта Дельта. Сыворотки людей, получивших оба компонента вакцины,

Таблица 2. Мутации S-белка, характерные для VOC SARS-CoV-2 [41, 42] и влияющие на иммунный ответ и аффинность связывания с рецептором ACE2

Мутации	Обозначение вариантов									Уклонение от нейтрализующих антител ³	Изменение аффинности связывания с ACE2 ³
	Альфа ¹	Бета	Гамма	Дельта	Омикрон						
	B.1.1.7 ²	B.1.351	P.1	B.1.617.2	BA.1	BA.2	BA.3	BA.4	BA.5		
L18F										[43]	
G142D										[44]	
del143/145										[44]	
del144/144										[45]	
R214_insEPE										[44]	
del242/244											
G339D										[44]	
S371L										[44]	↑ [40]
S373P										[44]	↑ [40]
S375F											↑ [40] ↓ [44]
D405N											↓ [46]
R408S										[44]	
K417N											↓ [45]
K417T										[44]	↓ [45]
N440K										[44]	↓ [46]
G446S										[47]	
L452R										[45, 64]	↑ [40]
S477N										[45, 48]	↑ [45], ↓ [46]
T478K										[44, 45]	↑ [40]
E484A										[44, 45]	↓ [46]
E484K											↓ [46]
F486L										[64]	↑ [64]
Q493R										[49]	↑ [40]
G496S											↑ [46]
Q498R											↑ [40]
N501Y										[49]	↑ [40, 44, 45]
D614G											↑ [50]
N764K										[44]	
V1176F											↑ [51]

Примечание. Ячейки с серым фоном – наличие у варианта мутации, которая изменяет ответ на нейтрализующие антитела или аффинность связывания с ACE2; ячейки с бесцветным фоном – отсутствие мутации. ¹ – Обозначение ВОЗ; ² – обозначение Pango, ³ – в столбце приведены ссылки на литературные источники, в которых описано влияние мутаций на способность вируса уклоняться от нейтрализующих антител или изменять аффинность к ACE2: повышать (↑) или понижать (↓) её.

показали нейтрализующий эффект в отношении этого варианта, но были примерно в 3–5 раз менее эффективны, чем против варианта Альфа [56]. В другом исследовании было показано, что введение двух доз вакцины даёт лучшую защиту, однако это также зависит от варианта вируса. Так, эффективность вакцины Pfizer против Дельта снижается до 88%, тогда как для Альфа её эффективность составляет 93,4%. Вакцинация препаратом AstraZeneca была эффективна на уровне 66,1% при Альфа-варианте и 59,8% – при варианте Дельта [57].

Повсеместное и быстрое распространение варианта Омикрон привело к значительной эволюции вируса в пределах этого VOC. Для мутаций этого варианта собрано особенно много сведений о возможности уклонения от нейтрализующих антител и изменениях аффинности к рецептору (табл. 2). В нем мы можем наблюдать значительное количество мутаций, расположенных в различных участках генома. В S-белке Омикрона число мутации составляет более 30 [58], из них более 10 расположены в RBD. По некоторым данным, существование большого количества мутаций в вирусе этого варианта указывает на его происхождение от людей с ослабленным иммунитетом [40].

Мутации с изменением аффинности внутри одного варианта/подварианта Омикрон зачастую имеют противоположный эффект и могут нейтрализовать друг друга, что может быть причиной довольно лёгкого течения Covid-19, вызванного этим вариантом. В то же время способность к уклонению от нейтрализующих антител могла привести к широкому распространению Омикрона: вариант B.1.1.529 в 3,3 раза более трансмиссивен, чем Дельта [59]. Многие мутации варианта Омикрон встречаются в ранее обнаруженных вариантах SARS-CoV-2. Уникальной мутацией подварианта BA.1 является инсерция R214_insEPE. Данная инсерция, по-видимому, появилась в результате рекомбинации у людей, инфицированных одновременно несколькими коронавирусами. Была установлена идентичная последовательность в S-белке HCoV-229E, которую можно использовать для переключения матрицы [60].

Мутациями, встречающимися во всех подвариантах Омикрона, являются G142D (кроме BA.1, у которого G142), G339D, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, S477N, T478K, E484A, Q498R, N501Y, Y505H, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, Q954H и N969K. Среди них мутации N501Y и Q498R, как предполагают, усиливают связывание с рецептором ACE2, а мутации H655Y, N679K и P681H увеличивают расщепление S-белка и облегчают передачу

вируса [42]. Мутация T9I E-белка, наблюдаемая во всех подвариантах Омикрона и расположенная в трансмембранном домене, может влиять на конфигурацию этого белка, обеспечивая более сильное закоривание вирусной мембраны [61]. У вариантов Бета и Омикрон было выявлено несколько критических сайтов связывания RBD с рецептором ACE2: K417N, E484K, Q493H, N501Y – для варианта Бета и Q493R, Q498R, N501Y – для варианта Омикрон. Предполагают, что мутации в этих сайтах могут привести к расширению тропизма этого вируса [62, 63].

S-Белок доминантных, на сентябрь 2022 г., подвариантов BA.4 и BA.5 идентичен и очень похож на спайковый белок BA.2. Отличие состоит в том, что эти два подварианта имеют делецию 69–70, кроме того, характерную для Дельта мутацию L452R, новую мутацию F486V, а также реверсную мутацию R493Q. В других частях генома имеются дополнительные мутации. Например, для подварианта BA.4 характерны мутации L11F – в ORF7b, P151S – в гене N-белка, делеция 141–143 – в nsp 1, тогда как BA.5 имеет мутацию D3N в гене M-белка [64].

Предполагают, что замены в S-белке в положениях 452, 486 и 493 изменяют связывание с ACE2 и влияют на взаимодействие с антителами. Мутации в положении L452 с заменами на R/M/Q встречались в вариантах Дельта, Каппа и Эпсилон, но также независимо возникли в нескольких подвариантах BA.2 в разных географических точках (например, L452Q в BA.2.12.1). Мутация в этом положении ослабляет способность антител нейтрализовать вирус [64]. Фенилаланин в положении 486 участвует в связывании вируса с рецептором ACE2. Мутация в этом положении приводит к снижению нейтрализующей активности антител классов I и II и поликлональной сыворотки. Предполагают, что именно F486 даёт большое преимущество вирусу при уклонении от действия нейтрализующих антител, включая антитела, нейтрализующие BA.1. То есть BA.4 и BA.5 приобрели механизм ещё более эффективного уклонения от действия антител, чем предыдущие подварианты [64]. Кроме того, BA.5 обладает наибольшей трансмиссивностью, согласно еженедельным сводкам ВОЗ по состоянию на сентябрь 2022 г., BA.2.12.1 и BA.2.75 также являются производными BA.2. В районе S-белка BA.2.12.1 присутствуют замены L452Q и S704F, а для BA.2.75 – K147E, W152R, F157L, I210V, G257S, D338H, G446S, N460K и реверсная мутация Q493R.

Спустя несколько месяцев после начала пандемии Covid-19 в инфицированных образ-

цах начали выявляться рекомбинантные геномы. В целом это было предсказуемо – у коронавирусов довольно часто происходит гомологичная и негомологичная рекомбинация. Гомологичная рекомбинация, как предполагают, идёт по общей схеме с отщеплением РНК-зависимой РНК-полимеразы от матрицы в процессе синтеза РНК и её присоединением к гомологичному участку матрицы другого генома с последующей элонгацией. Негомологичная рекомбинация может возникать между геномной РНК и субгеномными мРНК в результате коллапса транскрипционного комплекса во время прерывистой транскрипции. Для того, чтобы рекомбинационное событие имело место, необходима одновременная циркуляция в популяции двух и более подвариантов и появление внутри одной клетки разных геномов.

Впервые геном, производный двух разных вариантов SARS CoV-2 (20A и 20B по классификации NextStrain), был зафиксирован в феврале 2021 г. [65]. Впоследствии среди секвенированных последовательностей часто появлялись разные гибридные геномы. В исследовании Focosi и Maggi [66] можно ознакомиться с подробным описанием 40 вариантов зафиксированных гибридных геномов, полученных в результате рекомбинационных событий (гибриды Альфа–Дельта, Бета–Дельта, Дельта–Омикрон, разных подвариантов Омикрона). Рекомбинантный вариант XD представляет собой геном Дельта AY.4, в который «вклинилась» последовательность гена S-белка BA.1 (нуклеотиды в положениях с 21643 по 25581); XD содержит уникальную мутацию nsp 2: E172D [67]; гибрид XF также представляет собой рекомбинант варианта Дельта AY.4 и BA.1 с точкой разрыва вблизи конца nsp 3 (нуклеотид 5386), в нём фрагменты двух разных геномов расположены последовательно друг за другом; XE-рекомбинант объединяет геномы BA.1 и BA.2, при этом большая часть генома, включая ген S-белка, принадлежит BA.2. Появились гибриды и последних на сегодняшний день вариантов SARS-CoV-2, например, BA.2.12.1–BA.5; BA.2.76–BA.5.2; BA.5–BA.2–BA.5.1 [66].

В настоящее время считается, что эти варианты не представляют собой угрозу более высокой трансмиссивности или ухудшения течения заболевания (Global Virus Network, gvn.org/covid-19). Это связано с тем, что волны пандемии последних вариантов вируса становятся все короче, минимизируя время совместной циркуляции разных вариантов; высокий индекс репродукции последних вариантов ставит высокую планку для рекомбинантных

форм; в связи с лёгким течением Омикрона время репликации вируса внутри организма ограничено, делая минимальной вероятность коинфекции или суперинфекции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Механизмы репликации и транскрипции генов, взаимодействие белков коронавирусов с рецепторами человека ранее были изучены на примерах SARS-CoV и MERS-CoV. Но отсутствие препаратов для эффективной терапии коронавирусных инфекций позволяет нам заключить, что выявлены не все молекулярные механизмы функционирования коронавирусов. Исследование SARS-CoV-2 позволило улучшить наше понимание механизмов внедрения вируса в клетку, определить структуру и функции белков коронавируса, выявить ключевые мутации, влияющие на контагиозность и трансмиссивность вируса, на клинические проявления заболевания. Для SARS-CoV-2 была детально описана уникальная способность к сдвигу рамки считывания в процессе транскрипции своей геномной РНК, в результате чего увеличилась вариабельность синтезируемых белков. Данные белки способны «строить» внутриклеточные везикулы, где происходит репликация и транскрипция вирусной РНК, а также последующая сборка вирусных частиц. Формирование синцития ранее было показано для некоторых вирусов, например, для ВИЧ, вируса простого герпеса. Однако механизмы возникновения такой структуры во многом были не изучены до появления SARS-CoV-2. К примеру, было показано, что способность клеток к слиянию при формировании синцития определяется наличием уникальной для S-белка SARS-CoV-2 вставкой четырёх аминокислот (PRRA) на стыке субъединиц S1 и S2.

Критическое и многоролевое участие S-белка в патогенезе SARS-CoV-2 само по себе очень интересно. Он участвует в слиянии с клеткой, образовании синцития, уклонении от иммунного ответа, гликаны на его поверхности защищают вирус от быстрого распознавания иммунной системой. Нуклеотидные последовательности S-белка вирусов SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2 во многом схожи. Тем не менее ответ организма человека на каждый из этих вирусов отличается. Пандемия Covid-19 дала нам возможность наблюдать воочию эволюцию вируса. Мы стали свидетелями того, как сильно различается исход заболевания от количества и сочетания мутаций

в вирусных вариантах. Аминокислотный состав S-белка определяет эффективность проникновения вируса в клетку, его патогенность, трансмиссивность и эволюцию.

На данный момент невозможно определить реальный объём мировых последствий, вызванных пандемией вируса SARS-CoV-2 как для системы здравоохранения, так и для социальной и экономической сфер в целом. Однозначно можно сказать, что ближайшее десятилетие мы будем наблюдать и исследовать последствия коронавирусной инфекции, оценивать изменения в медицинской статистике, изучать риски отложенных осложнений, таких как ожидаемое увеличение аутоиммунных и нейродегенеративных заболеваний; анализировать тенденции и риски для пациентов с хроническими и онкологическими заболеваниями, исследовать состояние здоровья беременных и детей, инфицированных SARS-CoV-2 в гестационный период. Особую группу исследований займут работы по оценке неврологических последствий, связанных с социальным дистанцированием, в том числе у детей и подростков. Кроме того, актуальным вопросом остаётся вероятность эволюции вируса SARS-CoV-2. Теоретическая возможность эволюции вируса и комбинации трансмиссивности SARS-CoV-2 и летальности MERS-CoV ставят перед мировым научным сообществом вопрос о глобализации и разработке новых методов

борьбы с вирусными инфекциями. Стала очевидна необходимость отслеживания и контроля форм коронавирусов в живой природе, необходимость реформы в процессах регистрации и внедрения медицинских изделий для инфекционных заболеваний, но самое главное – создания динамичной среды с доступом к новейшему научному инструментарию и высокоспециализированным научным и медицинским кадрам для быстрого реагирования на биологические вызовы в будущем.

Вклад авторов. Мифтахова Р.Р., Ризванов А.А., Шавалиев Р.Ф. – концепция и структура работы и редактирование текста; Мингалеева Р.Н., Нигматулина Н.А., Шарафетдинова Л.М., Ромозанова А.М., Габдулхакова А.Г., Филина Ю.В. – анализ литературы, написание текста; подготовка иллюстраций.

Финансирование. Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

Дополнительная информация. Рисунки, представленные в обзоре, выполнены с использованием сайта <https://biorender.com>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Reagan, R. L., Yancey, F., and Brueckner, A. L. (1955) Studies of the avian infectious bronchitis virus (wachtel strain) in the cynomolgus monkey, *Poultry Sci.*, **34**, 1448, doi: 10.3382/ps.0341448.
2. Alharbi, S. N., and Alrefaei, A. F. (2021) Comparison of the SARS-CoV-2 (2019-nCoV) M protein with its counterparts of SARS-CoV and MERS-CoV species, *J. King Saud. Univ. Sci.*, **33**, 101335, doi: 10.1016/j.jksus.2020.101335.
3. Paul, D., Kolar, P., and Hall, S. G. (2021) A review of the impact of environmental factors on the fate and transport of coronaviruses in aqueous environments, *npj Clean Water*, **4**, 7, doi: 10.1038/s41545-020-00096-w.
4. Chan, T., Klaus, J., Meli, M. L., and Hofmann-Lehmann, R. (2021) SARS-CoV-2 infections in cats, dogs, and other animal species: Findings on infection and data from Switzerland, *Schweiz Arch. Tierheilkd*, **163**, 821-835, doi: 10.17236/sat00329.
5. Guan, Y., Zheng, B. J., He, Y. Q., Liu, X. L., Zhuang, Z. X., et al. (2003) Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China, *Science*, **302**, 276-278, doi: 10.1126/science.1087139.
6. Zhu, Z., Lian, X., Su, X., Wu, W., Marraro, et al. (2020) From SARS and MERS to COVID-19: a brief summary and comparison of severe acute respiratory infections caused by three highly pathogenic human coronaviruses, *Respiratory Res.*, **21**, 224, doi: 10.1186/s12931-020-01479-w.
7. Li, X., Giorgi, E. E., Marichannegowda, M. H., Foley, B., Xiao, C., et al. (2020) Emergence of SARS-CoV-2 through recombination and strong purifying selection, *Sci. Adv.*, **6**, doi: 10.1126/sciadv.abb9153.
8. Hassanin, A., Rambaud, O., and Klein, D. (2022) Genomic Bootstrap Barcodes and Their Application to Study the Evolution of Sarbecoviruses, **14**, 440, doi: 10.3390/v14020440.
9. He, B., Li, Z., Yang, F., Zheng, J., Feng, Y., et al. (2013) Virome profiling of bats from Myanmar by metagenomic analysis of tissue samples reveals more novel mammalian viruses, *PLoS One*, **8**, e61950, doi: 10.1371/journal.pone.0061950.

10. Millet, J. K., Jaimes, J. A., and Whittaker, G. R. (2021) Molecular diversity of coronavirus host cell entry receptors, *FEMS Microbiol. Rev.*, **45**, fuaa057, doi: 10.1093/femsre/fuaa057.
11. Gómez, C. E., Perdiguero, B., and Esteban, M. (2021) Emerging SARS-CoV-2 variants and impact in global vaccination programs against SARS-CoV-2/COVID-19, *Vaccines (Basel)*, **9**, 243, doi: 10.3390/vaccines9030243.
12. Bai, Z., Cao, Y., Liu, W., and Li, J. (2021) The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein and its role in viral structure, biological functions, and a potential target for drug or vaccine mitigation, *Viruses*, **13**, 1115, doi: 10.3390/v13061115.
13. Liu, D. X., Liang, J. Q., and Fung, T. S. (2021) Human coronavirus-229E, -OC43, -NL63, and -HKU1 (Coronaviridae), *Encyclopedia of Virology*, 428-440, doi: 10.1016/B978-0-12-809633-8.21501-X.
14. Schoeman, D., and Fielding, B. C. (2019) Coronavirus envelope protein: current knowledge, *Virol. J.*, **16**, 69, doi: 10.1186/s12985-019-1182-0.
15. Malone, B., Urakova, N., Snijder, E.J. et al. . (2022) Structures and functions of coronavirus replication–transcription complexes and their relevance for SARS-CoV-2 drug design., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **23**, 21-39, doi: 10.1038/s41580-021-00432-z.
16. Maclachlan, N. J., and Dubovi, E. J. (2016) *Fenner's Veterinary Virology*, Academic press.
17. Redondo, N., Zaldívar-López, S., Garrido, J. J., and Montoya, M. (2021) SARS-CoV-2 accessory proteins in viral pathogenesis: knowns and unknowns, *Frontiers in Immunology*, **12**, doi: 10.3389/fimmu.2021.708264.
18. Kim, D., Lee, J.-Y., Yang, J.-S., Kim, J. W., Kim, V. N., et al. (2020) The architecture of SARS-CoV-2 transcriptome, *Cell*, **181**, 914-921.e910, doi: 10.1016/j.cell.2020.04.011.
19. Báez-Santos, Y. M., St John, S. E., and Mesecar, A. D. (2015) The SARS-coronavirus papain-like protease: structure, function and inhibition by designed antiviral compounds, *Antiviral Res.*, **115**, 21-38, doi: 10.1016/j.antiviral.2014.12.015.
20. Angelini, M. M., Akhlaghpour, M., Neuman, B. W., and Buchmeier, M. J. (2013) Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural proteins 3, 4, and 6 induce double-membrane vesicles, *mBio*, **4**, e00524-13, doi: 10.1128/mBio.00524-13.
21. Wolff, G., Melia, C. E., Snijder, E. J., and Bárcena, M. (2020) Double-membrane vesicles as platforms for viral replication, *Trends Microbiol.*, **28**, 1022-1033, doi: 10.1016/j.tim.2020.05.009.
22. Medina-Enríquez, M. M., Lopez-León, S., Carlos-Escalante, J. A., Aponte-Torres, Z., Cuapio, A., et al. (2020) ACE2: the molecular doorway to SARS-CoV-2, *Cell Biosci.*, **10**, 148, doi: 10.1186/s13578-020-00519-8.
23. V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., and Thiel, V. (2021) Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2, *Nat. Rev. Microbiol.*, **19**, 155-170, doi: 10.1038/s41579-020-00468-6.
24. Xia, B., and Kang, X. (2011) Activation and maturation of SARS-CoV main protease, *Protein Cell*, **2**, 282-290, doi: 10.1007/s13238-011-1034-1.
25. Yang, Y., Hussain, S., Wang, H., Ke, M., and Guo, D. (2009) Translational control of the subgenomic RNAs of severe acute respiratory syndrome coronavirus, *Virus Genes*, **39**, 10-18, doi: 10.1007/s11262-009-0357-y.
26. Brant, A. C., Tian, W., Majerciak, V., Yang, W., and Zheng, Z.-M. (2021) SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication, *Cell Biosci.*, **11**, 136, doi: 10.1186/s13578-021-00643-z.
27. Denison, M. R., Graham, R. L., Donaldson, E. F., Eckerle, L. D., and Baric, R. S. (2011) Coronaviruses: an RNA proofreading machine regulates replication fidelity and diversity, *RNA Biol.*, **8**, 270-279, doi: 10.4161/rna.8.2.15013.
28. Kirchdoerfer, R. N., and Ward, A. B. (2019) Structure of the SARS-CoV nsp12 polymerase bound to nsp7 and nsp8 co-factors, *Nat. Commun.*, **10**, 2342, doi: 10.1038/s41467-019-10280-3.
29. Rona, G., Zeke, A., Miwatani-Minter, B., de Vries, M., Kaur, R., et al. (2021) The NSP14/NSP10 RNA repair complex as a Pan-coronavirus therapeutic target, *Cell Death Differ.*, **29**, 285-292, doi: 10.1038/s41418-021-00900-1.
30. Sola, I., Almazán, F., Zúñiga, S., and Enjuanes, L. (2015) Continuous and discontinuous RNA synthesis in coronaviruses, *Annu. Rev. Virol.*, **2**, 265-288, doi: 10.1146/annurev-virology-100114-055218.
31. Hussain, S., Pan, J., Chen, Y., Yang, Y., Xu, J., et al. (2005) Identification of novel subgenomic RNAs and noncanonical transcription initiation signals of severe acute respiratory syndrome coronavirus, *J. Virol.*, **79**, 5288-5295, doi: 10.1128/JVI.79.9.5288-5295.2005.
32. Nomburg, J., Meyerson, M., and DeCaprio, J. A. (2020) Pervasive generation of non-canonical subgenomic RNAs by SARS-CoV-2, *Genome Med.*, **12**, 108, doi: 10.1186/s13073-020-00802-w.
33. Leary, S., Gaudieri, S., Parker, M. D., Chopra, A., James, I., et al. (2021) Generation of a novel SARS-CoV-2 sub-genomic RNA due to the R203K/G204R variant in nucleocapsid: homologous recombination has potential to change SARS-CoV-2 at both protein and RNA level, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.04.10.029454.
34. Davidson, A. D., Williamson, M. K., Lewis, S., Shoemark, D., Carroll, M. W., et al. (2020) Characterisation of the transcriptome and proteome of SARS-CoV-2 reveals a cell passage induced in-frame deletion of the furin-like cleavage site from the spike glycoprotein, *Genome Med.*, **12**, 68, doi: 10.1186/s13073-020-00763-0.
35. Wang, D., Jiang, A., Feng, J., Li, G., Guo, D., et al. (2021) The SARS-CoV-2 subgenome landscape and its novel regulatory features, *Mol. Cell*, **81**, 2135-2147.e5, doi: 10.1016/j.molcel.2021.02.036.
36. Kolb, A. F., Hegyi, A., and Siddell, S. G. (1997) Identification of residues critical for the human

- coronavirus 229E receptor function of human aminopeptidase N, *J. Gen. Virol.*, **78** (Pt 11), 2795-2802, doi: 10.1099/0022-1317-78-11-2795.
37. Jackson, C. B., Farzan, M., Chen, B., and Choe, H. (2022) Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **23**, 3-20, doi: 10.1038/s41580-021-00418-x.
 38. Chan, Y. A. Z., Shing Hei (2022) The emergence of the spike furin cleavage site in SARS-CoV-2, *Mol. Biol. Evol.*, **39**, msab327, doi: 10.1093/molbev/msab327.
 39. Stevens, C. S. O., Kasopefoluwa Y., and Lee, B. (2021) Proteases and variants: context matters for SARS-CoV-2 entry assays, *Curr. Opin. Virol.*, **50**, 49–58, doi: 10.1016/j.coviro.2021.07.004.
 40. Kumar, S., Thambiraja, T. S., Karuppanan, K., and Subramaniam, G. (2022) Omicron and Delta variant of SARS-CoV-2: a comparative computational study of spike protein, *J. Med. Virol.*, **94**, 1641-1649, doi: 10.1002/jmv.27526.
 41. Gangavarapu, K., Latif, A. A., Mullen, J. L., Alkuzweny, M., Hufbauer, E., et al. (2022) Outbreak.info genomic reports: scalable and dynamic surveillance of SARS-CoV-2 variants and mutations, *medRxiv*, doi: 10.1101/2022.01.27.22269965.
 42. Desingu, P. A., Nagarajan, K., and Dhama, K. (2022) Emergence of Omicron third lineage BA. 3 and its importance, *J. Med. Virol.*, **94**, 1808-1810, doi: 10.1002/jmv.27601.
 43. McCallum, M., De Marco, A., Lempp, F. A., Tortorici, M. A., Pinto, D., et al. (2021) N-terminal domain antigenic mapping reveals a site of vulnerability for SARS-CoV-2, *Cell*, **184**, 2332-2347.e16, doi: 10.1016/j.cell.2021.03.028.
 44. Pastorio, C., Zech, F., Noettger, S., Jung, C., Jacob, T., et al. (2022) Determinants of spike infectivity, processing and neutralization in SARS-CoV-2 Omicron subvariants BA.1 and BA.2, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2022.04.13.488221.
 45. Harvey, W. T., Carabelli, A. M., Jackson, B., Gupta, R. K., Thomson, E. C., et al. (2021) SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape, *Nat. Rev. Microbiol.*, **19**, 409-424, doi: 10.1038/s41579-021-00573-0.
 46. Kumar, S., Karuppanan, K., and Subramaniam, G. (2022) Omicron (BA. 1) and sub-variants (BA.1, BA.2 and BA.3) of SARS-CoV-2 Spike infectivity and pathogenicity: a comparative sequence and structural-based computational assessment, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2022.02.11.480029.
 47. Starr, T. N., Greaney, A. J., Addetia, A., Hannon, W. W., Choudhary, M. C., et al. (2021) Prospective mapping of viral mutations that escape antibodies used to treat COVID-19, *Science*, **371**, 850-854, doi: 10.1126/science.abf9302.
 48. Liu, Z., VanBlargan, L. A., Bloyet, L.-M., Rothlauf, P. W., Chen, R. E., et al. (2021) Identification of SARS-CoV-2 spike mutations that attenuate monoclonal and serum antibody neutralization, *Cell Host Microbe*, **29**, 477-488.e4, doi: 10.1016/j.chom.2021.01.014.
 49. Wright, D. W., Harvey, W. T., Hughes, J., Cox, M., Peacock, T. P., et al. (2022) Tracking SARS-CoV-2 mutations and variants through the COG-UK-mutation explorer, *Virus Evol.*, **8**, veac023, doi: 10.1093/ve/veac023.
 50. Ozono, S., Zhang, Y., Ode, H., Sano, K., Tan, T. S., et al. (2021) SARS-CoV-2 D614G spike mutation increases entry efficiency with enhanced ACE2-binding affinity, *Nat. Commun.*, **12**, 848, doi: 10.1038/s41467-021-21118-2.
 51. Majumdar, P., and Niyogi, S. (2021) SARS-CoV-2 mutations: The biological trackway towards viral fitness, *Epidemiol. Infect.*, **149**, e110, doi: 10.1017/S0950268821001060.
 52. Morais, I. J., Polveiro, R. C., Souza, G. M., Bortolin, D. I., Sasaki, F. T., et al. (2020) The global population of SARS-CoV-2 is composed of six major subtypes, *Sci. Rep.*, **10**, 18289, doi: 10.1038/s41598-020-74050-8.
 53. Zhang, J., Cai, Y., Xiao, T., Lu, J., Peng, H., et al. (2021) Structural impact on SARS-CoV-2 spike protein by D614G substitution, *Science*, **372**, 525-530, doi: 10.1126/science.abf2303.
 54. Korber, B., Fischer, W. M., Gnanakaran, S., Yoon, H., Theiler, J., et al. (2020) Tracking changes in SARS-CoV-2 spike: evidence that D614G increases infectivity of the COVID-19 virus, *Cell*, **182**, 812-827.e19, doi: 10.1016/j.cell.2020.06.043.
 55. Zhang, J., Xiao, T., Cai, Y., Lavine, C. L., Peng, H., et al. (2021) Membrane fusion and immune evasion by the spike protein of SARS-CoV-2 Delta variant, *Science*, **374**, 1353-1360, doi: 10.1126/science.eabl9463.
 56. Planas, D., Veyer, D., Baidaliuk, A., Staropoli, I., Guivel-Benhassine, F., et al. (2021) Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody neutralization, *Nature*, **596**, 276-280, doi: 10.1038/s41586-021-03777-9.
 57. Lopez Bernal, J., Andrews, N., Gower, C., Gallagher, E., Simmons, R., et al. (2021) Effectiveness of Covid-19 vaccines against the B.1.617.2 (Delta) variant, *N. Engl. J. Med.*, **385**, 585-594, doi: 10.1056/NEJMoa2108891.
 58. Shen, X. (2022) Boosting immunity to Omicron, *Nat. Med.*, **28**, 445-446, doi: 10.1038/s41591-022-01727-0.
 59. Nishiura, H., Ito, K., Anzai, A., Kobayashi, T., Piantham, C., et al. (2021) Relative reproduction number of SARS-CoV-2 Omicron (B.1.1.529) compared with Delta variant in South Africa, *J. Clin. Med.*, **11**, 30, doi: 10.3390/jcm11010030.
 60. Venkatakrishnan, A., Anand, P., Lenehan, P. J., Suratekar, R., Raghunathan, B., et al. (2021) Omicron variant of SARS-CoV-2 harbors a unique insertion mutation of putative viral or human genomic origin, *OSF Preprints*, doi: 10.31219/osf.io/f7txy.
 61. Abbas, Q., Kusakin, A., Sharrouf, K., Jyakhwo, S., and Komissarov, A. S. (2022) Follow-up investigation and detailed mutational characterization of the SARS-CoV-2 Omicron variant lineages (BA.1, BA.2, BA.3 and BA.1.1), *bioRxiv*, doi: 10.1101/2022.02.25.481941.

62. Pan, T., Chen, R., He, X., Yuan, Y., Deng, X., et al. (2021) Infection of wild-type mice by SARS-CoV-2 B.1.351 variant indicates a possible novel cross-species transmission route, *Signal Transduct. Target. Ther.*, **6**, 420, doi: 10.1038/s41392-021-00848-1.
63. Xu, Z., Liu, K., and Gao, G. F. (2022) Omicron variant of SARS-CoV-2 imposes a new challenge for the global public health, *Biosaf. Health*, **4**, 147-149, doi: 10.1016/j.bsheat.2022.01.002.
64. Tegally, H., Moir, M., Everatt, J., Giovanetti, M., Scheepers, C., et al. (2022) Emergence of SARS-CoV-2 Omicron lineages BA.4 and BA.5 in South Africa, *Nat. Med.*, **28**, 1785-1790, doi: 10.1038/s41591-022-01911-2.
65. Pedro, N., Silva, C. N., Magalhães, A. C., Cavadas, B., Rocha, A. M., et al. (2021) Dynamics of a dual SARS-CoV-2 lineage co-infection on a prolonged viral shedding COVID-19 case: insights into clinical severity and disease duration, *Microorganisms*, **9**, 300, doi: 10.3390/microorganisms9020300.
66. Focosi, D., and Maggi, F. (2022) Recombination in coronaviruses with a focus on SARS-CoV-2, *Viruses*, **14**, 1239, doi: 10.3390/v14061239.
67. Yamasoba, D., Kimura, I., Nasser, H., Morioka, Y., Nao, N., et al. (2022) Virological characteristics of SARS-CoV-2 Omicron BA.2 spike, *Cell*, **185**, 2103-2115.e19, doi: 10.1016/j.cell.2022.04.035.

BIOLOGY OF THE SARS-CoV-2 CORONAVIRUS

Review

**R. N. Mingaleeva^{1*}, N. A. Nigmatulina², L. M. Sharafetdinova¹, A. M. Romozanova¹,
A. G. Gabdulkhakova¹, Yu. V. Filina¹, R. F. Shavaliyev², A. A. Rizvanov¹, and R. R. Miftakhova¹**

¹ Kazan (Volga Region) Federal University, 420008 Kazan, Russia; E-mail: rimma.mingaleeva@gmail.com

² Republican Clinical Hospital of the Ministry of Health of the Republic of Tatarstan, 420064 Kazan, Russia

The new coronavirus infection Covid-19, which emerged in late 2019 in China, caused a severe social and economic crisis that affected the whole world. The high frequency of errors in the replication of RNA viruses, the zoonotic nature of transmission, and high transmissibility allowed betacoronaviruses to cause the third pandemic in the world since the beginning of 2003: SARS-CoV in 2003, MERS-CoV in 2012 and SARS-CoV-2 in 2019. The latest pandemic brought the scientific community together and provided a powerful impetus to the study of the biology of coronaviruses: new ways of penetration of the virus into the human body have been identified, the features of the replication cycle have been studied, and new functions of coronavirus proteins have been identified. It should be taken into account that the pandemic was accompanied by the need to obtain and publish results in a short time, which led to the emergence of an array of conflicting data and low reproducibility of research results. We systematized and analyzed the scientific literature, filtered the results according to the reliability of the methods of analysis used, and prepared a review describing the molecular mechanisms of the functioning of the SARS-CoV-2 coronavirus. The paper considers the organization of the genome of the SARS-CoV-2 virus, the mechanisms of its gene expression and the entry of the virus into the cell, provides information on key mutations that characterize different variants of the virus, and their contribution to the pathogenesis of the disease.

Keywords: SARS-CoV-2, Covid-19, S-protein, mutation, VOC

ПОЛЯРИЗАЦИОННЫЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА В МОЛОКЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОДНОДОМЕННЫХ АНТИТЕЛ

© 2022 Л.И. Мухаметова^{1*}, С.А. Еремин¹, Д.А. Арутюнян¹, О.С. Горяйнова²,
Т.И. Иванова², С.В. Тиллиб^{2*}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет,
119234 Москва, Россия; электронная почта: liliya106@mail.ru

² Институт биологии гена РАН, 119334 Москва, Россия; электронная почта: tillib@genebiology.ru

Поступила в редакцию 24.06.2022

После доработки 27.10.2022

Принята к публикации 27.10.2022

Благодаря уникальной структуре и свойствам лактоферрин в молоке человека (hLF) обладает множеством необходимых для младенцев питательных и укрепляющих здоровье функций, например, обеспечивает защиту от бактериальных инфекций и воспаления. Недостаток лактоферрина в женском молоке или в молочных смесях может приводить к нежелательному ослаблению иммунитета детей. Определение уровня hLF необходимо для контроля качества молока с целью возможной терапевтической коррекции. Перспективным методом количественного определения и контроля концентрации hLF в молоке и молочных продуктах может стать неконкурентный формат поляризационного флуоресцентного иммуноанализа (FPIA), не требующий обязательного разделения связанных и свободных форм белков и длительной пробоподготовки образцов. Применение в качестве распознающих реагентов флуоресцентно меченных однодоменных антител верблюда («нанотел») позволяет количественно определять молекулы (антигены) относительно большего размера, в частности лактоферрин человека, методом FPIA. В данной работе использованы конъюгаты с флуоресцеин изотиоцианнатом (FITC) двух ранее полученных однодоменных антител anti-hLf5 и anti-hLf16, специфически узнающих различные эпитопы лактоферрина человека, но не узнающих лактоферрин козы. Изучена кинетика взаимодействия FITC-меченных нанотел с hLF. Определены в растворе константы диссоциации (K_D) для антител FITC-anti-Lf5 и FITC-anti-Lf16 с hLF, которые составили $3,2 \pm 0,3$ нМ и $4,9 \pm 0,4$ нМ соответственно, что свидетельствует об их высокоаффинном связывании с лактоферрином человека. Разработан протокол FPIA, подобраны концентрации FITC-anti-hLf5 и FITC-anti-hLf16, которые дают оптимальный флуоресцентный сигнал и стабильное значение поляризации. Получена зависимость поляризации флуоресценции от концентрации hLF для неконкурентного FPIA с антителами FITC-anti-hLf5 и определены аналитические характеристики: предел обнаружения $2,1 \pm 0,2$ мкг/мл и линейный диапазон для определения концентраций – 3–10 мкг/мл. Метод FPIA обычно применяется для определения низкомолекулярных веществ. Однако в данной работе продемонстрирована принципиальная возможность распространения этого метода и для определения высокомолекулярных белков (лактоферрина человека) в биологической жидкости (молоке), если использовать в качестве распознающего реагента флуоресцентно меченные малые однодоменные антитела.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: однодоменное антитело, нанотело, лактоферрин, поляризация флуоресценции, иммуноанализ.

DOI: 10.31857/S0320972522120211, **EDN:** NIWPGN

ВВЕДЕНИЕ

Лактоферрин (LF) – гликопротеин массой примерно 80 кДа, содержащий 690 а.о., является членом семейства трансферринов и имеет

60% идентичности аминокислотной последовательности с трансферрином сыворотки крови [1, 2]. Впервые LF был выделен из коровьего молока в 1939 г. Соренсенем, а в 1960 г. Йохансоном был выделен лактоферрин из молока

Принятые сокращения: anti-hLf – нанотела против лактоферрина человека; FITC – флуоресцеин-5-изотиоцианнат изомер 1; FP – поляризация флуоресценции; FPIA – поляризационный флуоресцентный иммуноанализ; hLF – лактоферрин человека; LF – белок лактоферрин.

* Адресат для корреспонденции.

человека (hLF) [1]. В настоящее время известно, что LF присутствует не только в молоке млекопитающих, но также является компонентом многих физиологических жидкостей, таких как слюна, слезы, сперма и секреты слизистых оболочек, а также является важным компонентом нейтрофильных гранул лейкоцитов [1, 3]. В организме человека hLF участвует во многих биологических процессах, таких как защита организма, ингибирование роста опухоли, он обладает антимикробной, антибактериальной, противовирусной и противопаразитарной активностями и регулирует ферментативную активность рибонуклеазы А, клеточную пролиферацию и дифференцировку [4–6]. LF эффективно связывает ионы Fe^{3+} (с K_D около 10^{-20} М) [7] и играет важную роль в регулировании уровня свободного железа в жидкостях организма [8].

Концентрация лактоферрина в грудном молоке человека выше, чем в коровьем молоке [9]. Кроме того, концентрация LF в молоке сильно варьируется в зависимости от стадий лактации и у разных видов. Человеческое молоко содержит более 5 г/литр hLF по сравнению с 2–3 г/литр в зрелом грудном молоке. Содержание LF в коровьем молозиве составляет приблизительно 0,8 г/литр, тогда как в коровьем молоке содержится всего 0,03–0,49 г/литр. Более высокое количество hLF в молозиве обеспечивает защиту младенцев, находящихся на грудном вскармливании, от бактериальной инфекции и воспаления. В тех случаях, когда содержание лактоферрина в молоке матери оказывается чрезвычайно низким, считается целесообразным добавлять его к рациону детей, особенно недоношенных. Это также важно для детей, которые находятся на искусственном вскармливании, в случае вынужденного прекращения грудного вскармливания при болезни матери или приеме препаратов, которые могут оказать негативное действие на здоровье грудного ребенка [10]. Пастеризация грудного молока для кормления недоношенных и больных детей, процессы переработки молока и молочных продуктов могут нарушать структуру и, как следствие, функцию LF, что может повлиять на стабильность его свойств [5]. В связи с вышесказанным очевидна востребованность разработки быстрых, эффективных и экономичных методов количественного определения hLF в молоке и молочных продуктах.

К настоящему времени продемонстрировано множество различных подходов для определения LF (в основном на моделях LF из молока коровы): иммуноферментный анализ (ELISA) [11], поверхностный плазмонный

резонанс на основе иммуносенсоров [12], капиллярный электрофорез [13], ультра-высокоэффективная жидкостная хроматография в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (UHPLC-MS/MS) [14], высокоэффективная жидкостная хроматография с обращенной фазой (RP-HPLC) [15, 16]. Показана возможность определения лактоферрина человека гомогенным иммунохимическим методом с использованием переноса возбуждения и флуориметрии с фазовым разрешением [17]. Для определения лактоферрина человека сегодня чаще всего используют иммуноферментный анализ (ELISA), и на рынке присутствуют коммерческие наборы, например, <https://www.hycultbiotech.com/hk329-02>. Указанный набор, базирующийся на «sandwich-ELISA», позволяет примерно за 3,5 ч. определить концентрацию hLF в разных биологических жидкостях человека (после соответствующих разведений до нужного диапазона) с высокой чувствительностью (0,4–100 нг/мл). Метод UHPLC-MS/MS, обладающий особенно высокой чувствительностью, может быть использован для определения LF в переработанном молоке и молочных продуктах. Однако количественная оценка LF была разработана с применением в качестве стандартов пептидов, полученных из гидролизатов бычьего лактоферрина, а это означает, что UHPLC-MS/MS не может отличить нативный лактоферрин от денатурированного. RP-HPLC можно использовать для определения нативного лактоферрина, однако показано, что результаты, полученные данным методом, не сочетались с методом HPLC. Таким образом, RP-HPLC может быть недостаточно чувствительным для определения лактоферрина в коммерческом молоке и молочных продуктах с низким содержанием лактоферрина. Разработаны и апробированы колонки с NITRAP™ Heparin HP [18] или аптамером [19] для обогащения лактоферрином с последующим количественным определением на HPLC. Однако к недостаткам данных методов можно отнести длительную пробоподготовку, использование дорогостоящего оборудования и высококвалифицированного персонала.

На основе проведенного анализа литературных данных и нашего предшествующего опыта мы предположили, что для определения нативного лактоферрина в женском молоке весьма перспективным может оказаться использование метода поляризационного флуоресцентного иммуноанализа (FPIA), в котором флуоресцентно меченные однодоменные антитела («нанотела») используются в качестве распознающих реагентов. FPIA не требует сложных

операций, например, таких как разделение связанных и свободных форм белков, длительной пробоподготовки образцов и трудоемких процедур, которые обычно используют в анализе пищевых продуктов, клинических и биомедицинских анализах [20]. Важно отметить, что длительность анализа составляет не более 5 мин и калибровочная зависимость стабильна и не требует повторения при каждом анализе. Методика FPIA для определения лактоферрина в женском молоке позволила бы быстро и точно определять данный белок. Большинство методик FPIA являются конкурентными анализами, в которых анализируемый и меченый флуоресцентной меткой аналит (трейсер) конкурентно связываются с антителом. Первоначально данный метод был разработан для определения низкомолекулярных аналитов (антибиотиков, микотоксинов, пестицидов) [20, 21]. Величина сигнала поляризации флуоресценции (FP) теоретически может изменяться от 0 до 0,5; в расчетах обычно используют величину миллиполяризации флуоресценции (mP). FP зависит от гидродинамического радиуса (относительного размера) флуоресцирующего соединения, и при связывании низкомолекулярного трейсера (с молекулярной массой меньше 5 кДа) с белками или антителами существенно большего размера гидродинамический радиус заметно увеличивается и наблюдается большее изменение степени поляризации (ΔmP). В случае же крупного анализируемого вещества, такого, например, как белок среднего размера (примерно 60 кДа), ΔmP будет небольшим и применение FPIA затруднительно, поскольку разница в гидродинамическом радиусе между свободным аналитом и аналитом, связанным с белком близкого размера или антителом, в этом случае крайне невелика.

Применение неконкурентного формата FPIA позволяет разработать методы анализа для определения крупных молекул. С помощью флуоресцентно меченых Fab-фрагментов антител был разработан неконкурентный FPIA для количественного определения С-реактивного белка [22]. Метод FPIA был продемонстрирован для обнаружения вирусных частиц [23–25]. Однако применение таких вариантов неконкурентного FPIA ограничено высоким фоном или низкой чувствительностью. Кроме проблемы малого изменения сигнала поляризации флуоресценции при взаимодействии молекул с высокой молекулярной массой часто возникает неспецифическая адсорбция, которая также может быть серьезной проблемой в FPIA. Таким образом, выбор антигенсвязывающих молекул с более низкой молекулярной массой является перспективным для развития метода FPIA.

Использование миниатюрных верблюжьих однодоменных антител («нанотел») размером 12–15 кДа (2×4 нм) может быть перспективным для разработки FPIA-определения белков. Нанотело (наноантитело, VHH) представляет собой рекомбинантный белок, соответствующий вариабельному антигенсвязывающему домену особых антител, состоящих из гомодимера укороченной тяжелой цепи при отсутствии легких цепей. Такие антитела были обнаружены у представителей семейства Верблюдовые и у хрящевых рыб [26, 27]. Нанотела очень стабильны в широком диапазоне температур и pH, способны быстро ренатурировать с полным восстановлением активности, они способны узнавать особые эпитопы антигенов (активные центры ферментов, небольшие углубления), которые не узнаются классическими антителами. В лаборатории соавторов этой статьи уже на протяжении 20 лет ведется работа по получению и использованию нанотел для широкого спектра приложений [28–31], в том числе при их участии были получены высокоспецифические нанотела против лактоферрина человека [29]. Нанотела все активнее используются в последние годы для многих иммунобиотехнологических исследований, и их можно рассматривать как перспективный дополнительный инструмент наряду с традиционными антителами и их производными. Благодаря своей небольшой молекулярной массе флуоресцентно меченное нанотело может быть перспективным в качестве распознающего реагента для целевого белка-мишени, имеющего существенно больший размер, чем нанотело в методе неконкурентного FPIA.

Цель настоящей работы – демонстрация принципиальной возможности использования однодоменных антител для разработки методов определения в биологической жидкости целевого антигена на основе неконкурентного FPIA. Полученные нами ранее нанотела против лактоферрина человека были использованы в качестве распознающего реагента для определения лактоферрина человека в молоке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

FITC (флуоресцеин-5-изотиоцианнат изомер 1, «Sigma» США), клоны-продуценты нанотел верблюда против лактоферрина человека anti-hLf5 (20,1 кДа) и anti-hLf16 (20 кДа) [29], лактоферрин человека (hLF, 80 кДа) и четыре образца женского молока (№№ 1–4) были любезно предоставлены Садчиковой Е.Р. (Институт биологии гена РАН, Москва). Так же в

работе использовали смесь апо- и холо-трансферринов человека (hTF), бычий сывороточный альбумин (BSA), сывороточный альбумин человека (HSA), лизоцим человека (LYZ) и казеин (Cas) фирмы «Sigma-Aldrich» США.

Получение FITC-меченных нанотел против hLF. Используя ранее полученные бактериальные клоны-продуценты [29], нанотела LF5 и LF16, специфически узнающие лактоферрин человека (анти-hLf), но не узнающие лактоферрин козы, были наработаны в периплазме бактерий, выделены из периплазматического экстракта с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии, охарактеризованы с помощью хроматографического, электрофоретического и иммуноферментного анализа, как описано ранее [29]. Полученные нанотела конъюгировали с FITC и очищали, как описано ранее [32], и характеризовали как по содержанию белка, так и по степени модификации аминокрупп белка спектрофотометрически. Концентрации антител были определены, используя расчетные коэффициенты экстинкции $\epsilon_{280} = 29780 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (anti-hLf-5 0,68 мг/мл) и $\epsilon_{280} = 28260 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (anti-hLf-16 0,71 мг/мл) [33]. Молярный коэффициент экстинкции FITC – $73,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Имуноферментный метод определения (ELISA) лактоферрина человека был проведен, используя набор LF ELISA («ХЕМА», Россия), согласно инструкции производителя. Поглощение для LF ELISA было измерено при длине волны 450 нм, используя микропланшетный фотометр Bio-Rad 680 («Bio-Rad Laboratories Inc.», США).

Неконкурентный FPIA был выполнен на портативном флуориметре Sentry-200 («Ellie», США), при $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 495/530 \text{ nm}$. Готовили рабочий раствор (TWS) FITC-anti-hLf, чтобы интенсивность флуоресценции раствора составляла около 200 000. Готовили стандартные растворы hLF, проверяя в нескольких разведениях концентрацию спектрофотометрически, используя $\epsilon_{280} = 8,85 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [34]. Затем к 950 мкл TWS добавляли 50 мкл стандартного раствора hLF различных концентраций (0, 0,01; 0,1; 1; 3; 10; 20; 40; 100 и 1000 мкг/мл) и измеряли изменение сигнала поляризации флуоресценции (mP) и интенсивность исследуемого раствора после 5 мин инкубации при комнатной температуре. Каждый эксперимент был выполнен в двух повторах и трех аппаратных измерениях. Перекрестные реакции данных нанотел были изучены, измеряя изменение поляризации флуоресценции при добавлении к 950 мкл рабочему раствору трейсера (FITC-anti-hLf) 50 мкл стандартных растворов казеина, бычьего сывороточного аль-

бумина, сывороточного альбумина человека, трансферрина человека и др. Концентрации стандартных растворов реагентов составляли (0, 1, 10, 100 и 1000 мкг/мл).

Анализ образцов молока. Для оценки определения лактоферрина человека в натуральное козье молоко был добавлен стандартный раствор hLF до конечных концентраций 0,5 и 1 мг/мл. Молоко центрифугировали 15 мин (4000 g) для удаления жира, разбавляли в 20, 40 и 80 раз 10 мМ фосфатным буфером (pH 7,4), содержащим 150 мМ NaCl, и использовали для неконкурентного FPIA. Для валидации метода FPIA все образцы молока были проанализированы методом иммуноферментного анализа с использованием набора hLF ELISA («ХЕМА»), который в настоящее время проходит регистрацию и выпускается как опытная партия.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе были использованы однодоменные нанотела верблюда, anti-hLf5 и anti-hLf16, ранее полученные к различным эпитомам лактоферрина человека [29]. Было показано, что каждое нанотело связывает практически весь hLF в молоке [29], из чего можно предположить, что узнаваемые этими нанотелами эпитопы hLF остаются доступными для связывания как в случае мономерных, так и в случае олигомерных форм hLF. По предварительным данным относительно связывания нанотелами пептидов, полученных при частичном переваре hLF пепсином, при использовании нанотела anti-hLf5 связывания не наблюдали, тогда как нанотело anti-hLf16 сохраняло способность связывать в переваре наибольший пептид размером 35 кДа. Таким образом, можно предполагать, что по крайней мере одно (anti-hLf16) из двух используемых в работе нанотел способно связывать не только целый белок, но и отдельный пептид этого белка (или денатурированный белок, содержащий этот пептид). Мы не наблюдали заметных различий в результатах при использовании по отдельности каждого из этих двух нанотел в качестве трейсеров. Можно предполагать, что эффекты возможной частичной денатурации hLF не являются существенными при детекции hLF с помощью используемых нанотел. Данные антитела высокоспецифичны к hLF и не связываются с лактоферрином козы [29].

В данной работе использовали адаптированные нанотела, содержащие на C-конце длинную линкерную последовательность (из 28 а.о. длинного варианта шарнирного участ-

ка неканонического верблюжьего антитела), после которой расположены два пептидных фрагмента: фрагмент из 9 а.о. YPYDVPDYA (NA-tag) и последовательность из 6 остатков гистидина (His-tag). Линкерный линейный участок содержит 4 удобно расположенные и хорошо доступные а.о. лизина, по которым удобно проводить конъюгирование с другими молекулами.

В работе были получены и охарактеризованы FITC-меченные производные данных антител: FITC-anti-hLf5 и FITC-anti-hLf16 соответственно.

Соотношение anti-hLf/FITC определяли по спектрам поглощения меченных антител в 10 mM PBS (pH 7,4) по уравнению (1):

$$\frac{\text{FITC}}{\text{anti-hLf}} = \frac{A_{492} * \epsilon_{\text{anti-hLf}}}{(A_{280} - C * A_{492}) * \epsilon_{\text{FITC}}}, \quad (1)$$

где A_{492} – поглощение конъюгата на длине волны максимума поглощения FITC (492 нм), A_{280} – поглощение образца на длине волны максимума поглощения антител (280 нм), $\epsilon_{\text{anti-hLf}}$ – молярный коэффициент экстинкции антитела на длине волны 280 нм, ϵ_{FITC} – мольный коэффициент экстинкции FITC на длине волны максимума поглощения ($73\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$), C – фактор коррекции для FITC на длине волны 280 нм ($C = 0,35$). Соотношение FITC/anti-hLf составило приблизительно 1 : 1, данное соотношение является оптимальным, поскольку дальнейшее увеличение соотношения белок/краситель не приводит к увеличению флуоресцентного сигнала.

Необходимым условием для разработки эффективных диагностических систем является полная характеристика специфичности и аффинности применяемых антител [35]. Для аналитического метода на основе FPIA важным является определение константы связывания антигена с антителом в растворе, которая может существенно отличаться от константы связывания с антителами, иммобилизованными на поверхности. Мы определили аффинности антител FITC-anti-hLf5 и FITC-anti-hLf16 в отношении hLF и оценили возможность их использования для количественного определения лактоферрина в молоке методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа.

Для разработки протокола FPIA были выбраны рабочие растворы FITC-anti-hLf5 и FITC-anti-hLf16 с концентрациями, которые дают оптимальный флуоресцентный сигнал и, следовательно, стабильное значение поляризации. При концентрациях в интервале 2,5–5 нМ соотношение сигнал/шум было оптимальным. Флуоресцентно меченные ан-

титела FITC-anti-hLf5 и FITC-anti-hLf16 продемонстрировали значение поляризации флуоресценции 125 ± 1 мР.

Изучение кинетики связывания нанотел FITC-anti-hLf5 и FITC-anti-hLf16 с лактоферрином человека изучали в широком диапазоне концентраций белка. Были приготовлены стандартные растворы hLF (0,125 нМ – 12 мкМ) в 10 mM фосфатном буфере pH 7,4, содержащем 150 mM NaCl (PBS). Для измерения сигнала FP в пробирке смешивали 50 мкл стандартного раствора hLF с 950 мкл рабочих растворов антител FITC-anti-hLf5 или FITC-anti-hLf16. Пробирку помещали в портативный флуориметр Sentry-200 и изучали кинетику связывания лактоферрина (конечные концентрации hLF составили 6 пМ – 625 нМ с рабочими растворами FITC-anti-hLf5 или FITC-anti-hLf16 в течении 1 ч). На рис. 1 в качестве примера представлена зависимость сигнала FP от времени при конечной концентрации hLF 10 нМ. Быстрое увеличение сигнала и достижение равновесия за 1–2 мин при комнатной температуре свидетельствовало о высокоаффинном связывании белок/нанотело (рис. 1). В дальнейшем при изучении связывания флуоресцентно меченных нанотел с лактоферрином сигнал FP мы измеряли после 5 мин инкубации. В настоящее время известно, что лактоферрин способен образовывать ассоциаты, а уровень олигомеризации зависит от концентраций hLF, KCl, NaCl, а также от продолжительности хранения белка в растворе [36]. Для того, чтобы исключить влияние олигомеризации hLF мы изучили стабильность сигнала FP в широком диапазоне концентраций hLF (6 пМ – 625 нМ). Нами показано, что для всего изученного диапазона концентраций сигнал FP после достижения максимального значения в течение 2 мин инкубации сохранялся в течение часа. Эти данные могут свидетельствовать о том, что за время инкубации не происходит агрегации лактоферрина в исследуемом растворе, которая приводила бы к увеличению сигнала FP. Кроме того, кинетика связывания лактоферрина с нанотелами FITC-anti-hLf5 и FITC-anti-hLf16 была также изучена при различном времени прединкубации стандартных растворов лактоферрина (125 пМ – 12 мкМ) перед измерением FP. Однако даже при прединкубации стандартных растворов при комнатной температуре в течение 8 ч перед проведением анализа сигнал FP оставался на том же уровне (данные не приведены), что свидетельствует об отсутствии влияния возможной олигомеризации hLF на анализ.

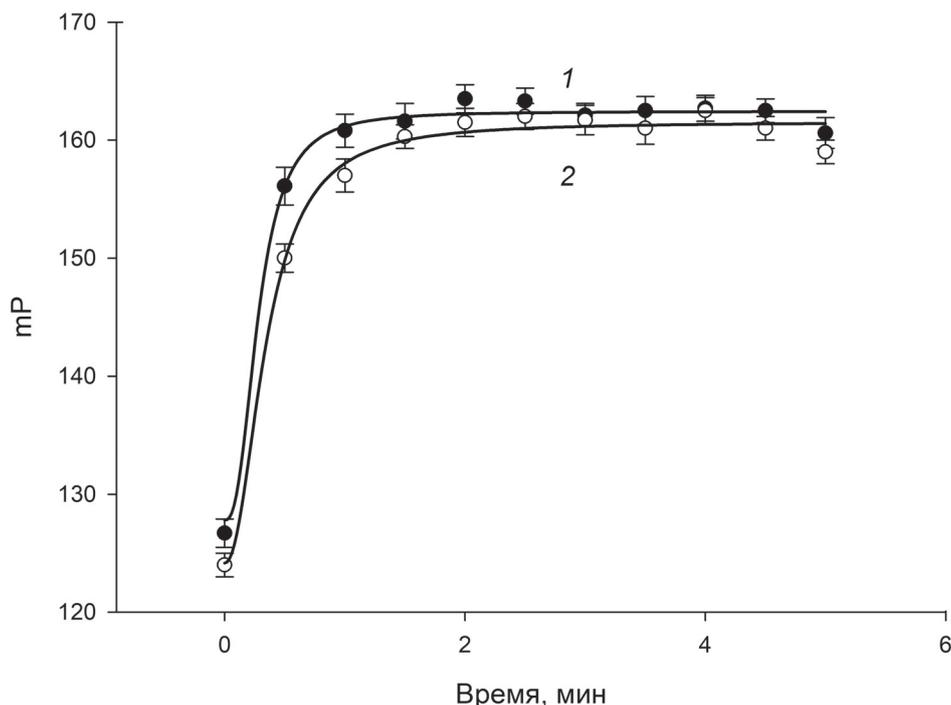
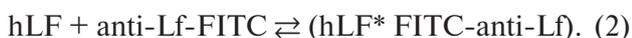


Рис. 1. Кинетика связывания FITC-anti-hLf5 (1) и FITC-anti-hLf16 (2) (оба в концентрации 5 нМ) с hLf (10 нМ) в 10 мМ PBS (рН 7,4) при 25 °С. Измерения проводили трижды, результаты представлены как среднее значение \pm SD

Известно, что метод FPIA удобен для характеристики взаимодействий белок/лиганд [34, 36]. Уравнение (2) описывает реакцию связывания между трейсером (FITC-anti-Lf) и белком hLF:



Если концентрация [FITC-anti-Lf] много меньше концентрации [hLF], поляризация флуоресценции может быть выражена уравнением (3) [37]:

$$mP = (mP_{\max} - mP_{\min}) \cdot \frac{[hLF]}{K_D + [hLF]} + mP_{\min}, \quad (3)$$

где mP_{\min} — это поляризация флуоресценции свободного флуорофора FITC-anti-Lf5, mP_{\max} — FP для комплекса hLF*FITC-anti-Lf5; [hLF] — концентрация лактоферрина, а K_D — константа диссоциации комплекса hLF*FITC-anti-Lf.

На рис. 2 представлена кривая связывания трейсеров FITC-anti-Lf5 и FITC-anti-Lf16 (2,5 нМ) и различных концентраций hLF. Как видно, с увеличением концентрации белка hLF величина FP увеличивается и достигает максимальных значений при полном связывании трейсера с антителом. Как видно из представленного рисунка, изменение поляризации флуоресценции (ΔmP) составило 30–35 ед. Данная величина была достигнута благодаря применению однодоменных нанотел, которые имеют низкий молекулярный вес (около 20 кДа).

Флуоресцентно меченные нанотела FITC-anti-Lf5 и FITC-anti-Lf16 были получены нами в трех независимых экспериментах, и вариация сигнала FP в данном эксперименте не превышала 10%.

Константу диссоциации (K_D) для пар FITC-anti-Lf5 и hLF определяли с использованием постоянной концентрации трейсера 2,5 нМ, при которой получались устойчивые значения FP, оптимальное соотношение сигнал/шум и, кроме того, они были ниже ожидаемой величины K_D и увеличивающихся концентраций hLF, превосходящих ожидаемую величину K_D . Концентрации hLF варьировали от 0 до 50 нМ. Величины сигнала поляризации флуоресценции (mP) были аппроксимированы по уравнению (2) и вычислены K_D . Равновесные константы диссоциации для антител FITC-anti-Lf5- и FITC-anti-Lf16- составили $3,2 \pm 0,3$ нМ и $4,9 \pm 0,4$ нМ соответственно. Как видно, оба антитела имеют достаточно низкие константы диссоциации, что свидетельствует о высокоаффинном связывании с лактоферрином.

Белки, входящие в состав матрицы физиологических жидкостей, как и белки, которые часто используются в приготовлении буферов или структурно подобные лактоферрину, потенциально могут влиять на значение сигнала FP и на точность анализа. Мы исследовали на этот предмет ряд нецелевых белков (сывороточный альбумин быка и человека, казеин,

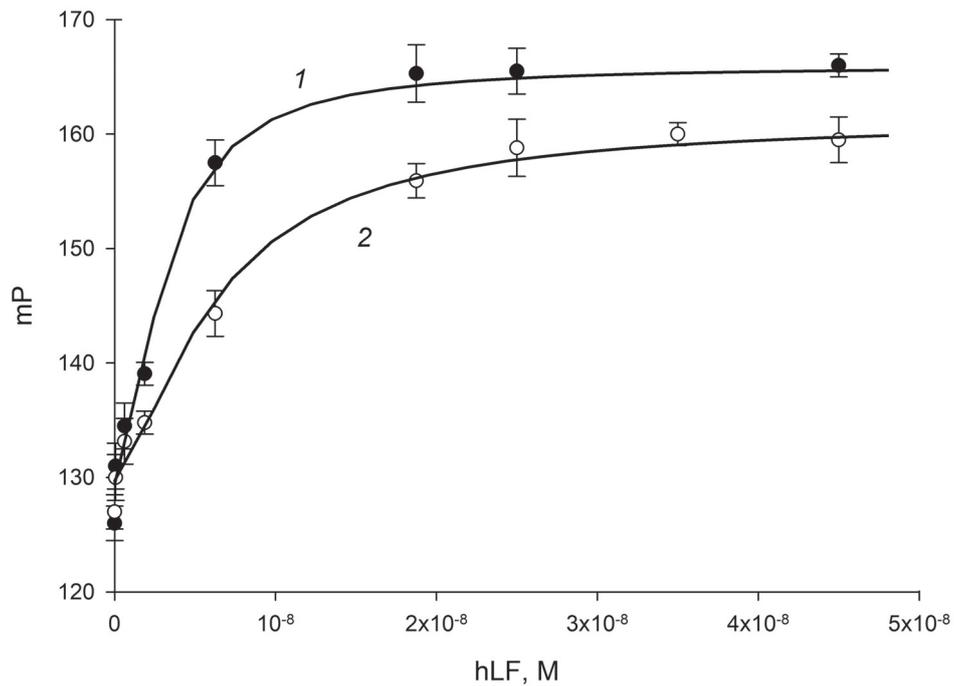


Рис. 2. Изменение сигнала FP в зависимости от концентрации hLF в присутствии 2,5 нМ FITC-anti-Lf5 (1) и FITC-anti-Lf16 (2) (pH 7,4) при 25 °С. Измерения проводили трижды, результаты представлены как среднее значение ± SD

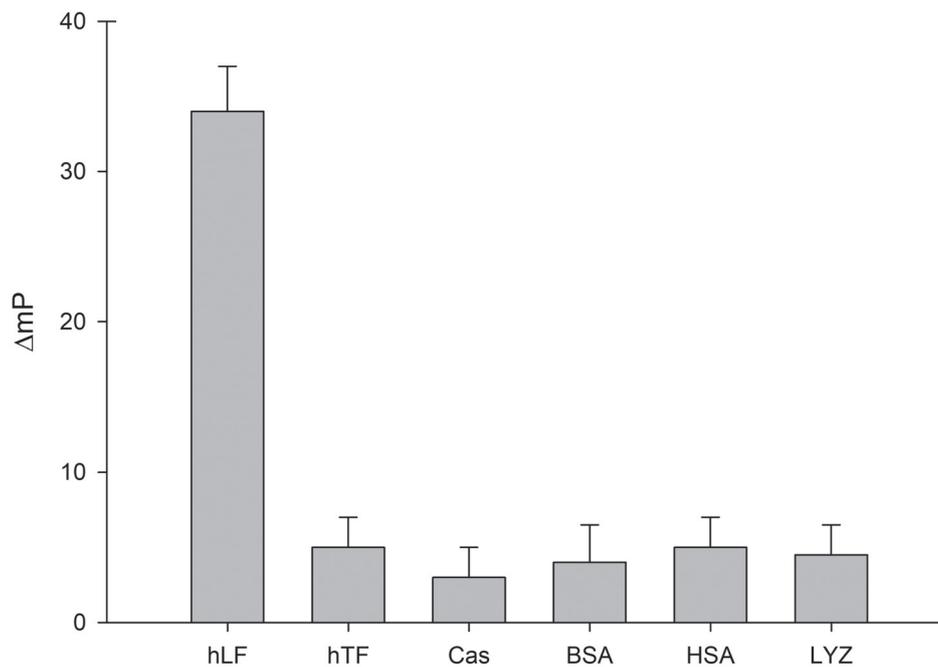


Рис. 3. Специфичность основных белков на связывание с FITC-anti-hLf5 и FITC-anti-hLf16 (pH (7,4) при 25 °С). Концентрация стандартного раствора hLF составила 40 мкг/мл, других реагентов – 1000 мкг/мл. Измерения проводили трижды, результаты представлены как среднее значение ± SD

лизоцим, трансферрин человека) в неконкурентном FPIA, используя FITC-anti-hLf5 и FITC-anti-hLf16 (рис. 3). К рабочему раствору антител добавляли различные концентрации вышеперечисленных белков (1–1000 мкг/мл) и измеряли сигнал поляризации флуоресценции через 5 мин инкубации. При данных концентрациях потенциальных кросс-реагентов изменение сигнала FP практически не наблю-

далось, что свидетельствует о высокой аффинности используемых антител только к hLF. На рис. 3 представлено изменение сигнала FP при высоких концентрациях этих белков, и, как видно из данного рисунка, они не вызывали изменения сигнала, что свидетельствует о высокоспецифичном связывании FITC-anti-hLf5 и FITC-anti-hLf16 с лактоферрином человека.

Для определения лактоферрина человека в молоке был использован метод введено/найденно. Антитела anti-hLf5 и anti-hLf16 не связываются с лактоферрином козы, поэтому в экспериментах использовали натуральное козье молоко, в которое добавляли точное количество hLF.

Известно, что молоко является довольно сложной матрицей для проведения анализа, поскольку в молоке присутствует большое количество компонентов, которые могут влиять на аналитический сигнал. Наиболее распространенным способом уменьшения матричного эффекта в молоке является его разбавление для снижения концентрации веществ, которые могут мешать анализу. Молоко первоначально центрифугировали для обезжиривания и готовили образцы с последовательным двукратным разбавлением 10 мМ фосфатным буфером (рН 7,4), содержащим 150 мМ NaCl. После чего определяли оптимальный коэффициент разбавления молока для проведения анализа следующим образом: к рабочим растворам FITC-anti-hLf5 и FITC-anti-hLf16 добавляли 50 мкл молока в различных разведениях и через 5 мин инкубации измеряли сигнал ФР. Было обнаружено, что уже при предварительном разведении в 8–10 раз (конечное разведение в анализируемом растворе составило 160–200 раз) образцы показали значение ФР, аналогичное сигналу рабочих растворов FITC-anti-hLf5 и FITC-anti-hLf16 с 50 мкл буфера (данные не представлены). Таким образом, даже при разведении молока в анализируемом растворе в 160 раз полностью удалось снять влияние матричного эффекта, однако высокое содержание лактоферрина в молоке (0,5–1 мг/мл) позволяет нам

определять содержания данного белка при разведении более чем в 200 раз методом FPIA.

Так как FITC-anti-hLf5 связывалось с hLF с большим сродством, то в качестве распознающего реагента было выбрано данное нанотело. На рис. 4, а представлена стандартная зависимость поляризации флуоресценции от концентрации hLF, полученная при неконкурентном анализе FPIA с антителами FITC-anti-hLf5, и ее линейный участок (б). Предел обнаружения определен как $(mP_0 + 3 SD)$, который составил $2,1 \pm 0,2$ мкг/мл и линейный диапазон для определения концентраций составил 3–50 мкг/мл.

Для проверки воспроизводимости метода получения флуоресцентно меченный конъюгат FITC-anti-hLf5 был синтезирован и очищен, как описано в работе [32], в трех независимых экспериментах и обнаружено, что калибровочные зависимости и их аналитические характеристики во всех трех случаях различались между собой не более чем на 10%.

Поскольку нанотело anti-hLf5 высокоспецифично к лактоферрину человека и не связывается с лактоферрином козы [29], натуральное козье молоко с добавленным hLF было использовано для подтверждения возможности определения данного белка в молоке. В образцы козьего молока был добавлен лактоферрин человека до конечных концентраций 0,5 и 1 мг/мл. Затем образцы молока разбавили в 20, 40 и 80 раз; как уже упоминалось выше, при разведении образцов в 10 раз полностью устраняется матричный эффект. При каждом разведении измеряли значение ФР и определяли содержание лактоферрина в образце, результаты представлены в табл. 1.

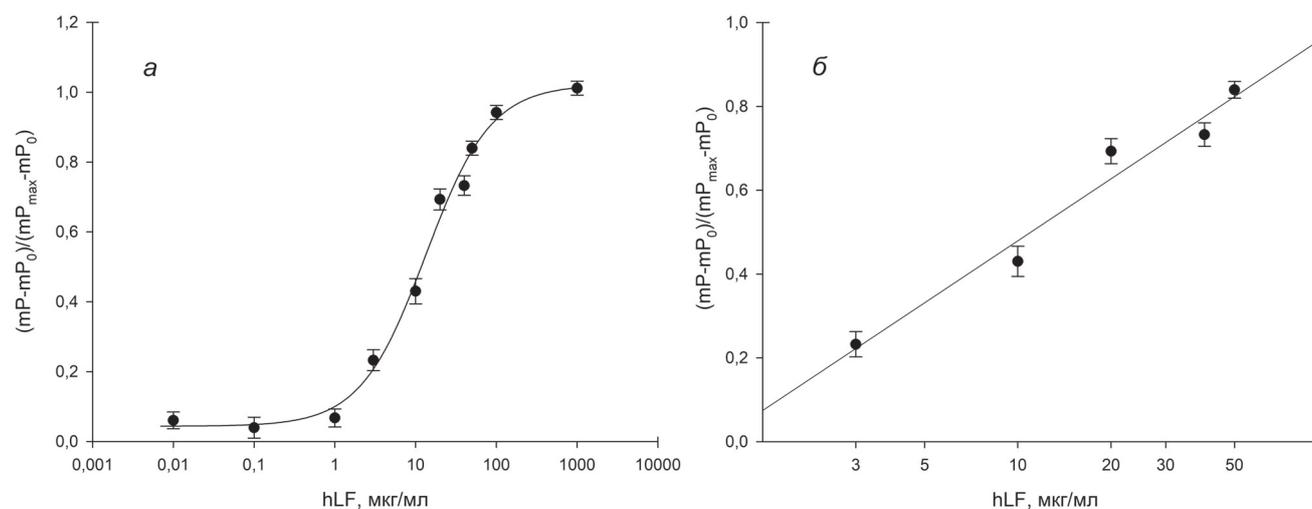


Рис. 4. Нормированная кривая зависимости поляризации флуоресценции от концентрации hLF (а) и ее линейный участок (б), полученные при неконкурентном анализе FPIA с антителом FITC-anti-hLf5 (рН 7,4 и 25 °С). Измерения проводили трижды, результаты представлены как среднее значение \pm SD

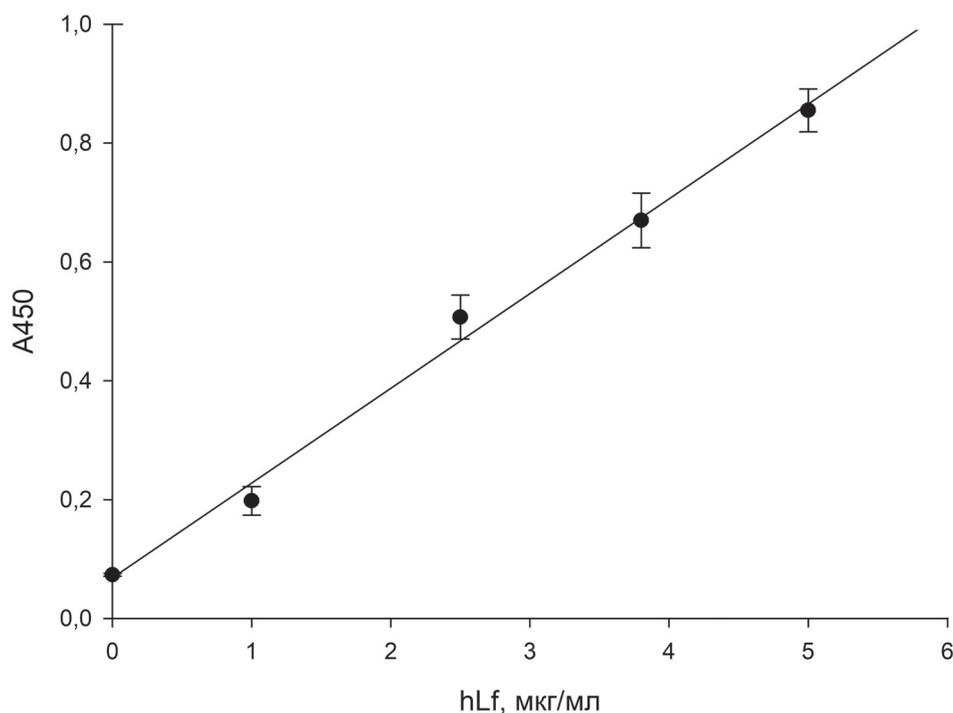


Рис. 5. Калибровочная зависимость определения hLF методом иммуноферментного анализа. Измерения дублировали, результаты представлены как среднее значение \pm SD

Таблица 1. Результаты обнаружения hLF в молоке методом введено/найдено с помощью FPIA и LF ELISA

Введено, мг/мл	FPIA				hLF ELISA			
	разведение образца	мкг/мл	найдено, мг/мл	% открытия	разведение образца	мкг/мл	найдено, мг/мл	% открытия
0,5	1 : 20	24,0 \pm 0,5	0,52 \pm 0,02	104	1 : 200	2,55 \pm 0,02	0,54 \pm 0,02	108
	1 : 40	13,2 \pm 0,3			1 : 400	1,35 \pm 0,04		
	1 : 80	7,0 \pm 0,2			1 : 800	0,70 \pm 0,05		
1	1 : 20	53,5 \pm 0,3	1,12 \pm 0,03	111	1 : 200	5,10 \pm 0,05	1,10 \pm 0,05	110
	1 : 40	26,4 \pm 0,2			1 : 400	2,72 \pm 0,06		
	1 : 80	15,5 \pm 0,4			1 : 800	1,51 \pm 0,4		

Примечание. % – Соответствие (в процентах) полученного результата с ожидаемым, исходя из предварительных данных.

В тех же образцах было определено содержание лактоферрина методом иммуноферментного анализа на лактоферрин hLF ELISA. На рис. 5 представлена калибровочная зависимость поглощения (A) от концентрации стандартных растворов hLF. Образцы молока предварительно разбавляли в 200, 400 и 800 раз. Результаты представлены в табл. 1. В образце козьего молока без добавления лактоферрина методами FPIA и ELISA не было обнаружено увеличение аналитического сигнала, что свидетельствует о высокоспецифичном связывании антител с лактоферрином человека.

Как видно из рис. 4, б и рис. 5, предел обнаружения для иммуноферментного метода

определения ниже предела обнаружения для FPIA 0,3 и 2,1 мкг/мл соответственно. Однако содержание лактоферрина в молоке составляет 1 мг/мл или больше и разбавление испытуемых образцов до определяемых концентраций позволяет полностью избавиться от матричного эффекта, влияющего на точность анализа. Но метод FPIA благодаря своим преимуществам позволяет избежать длительного и трудоемкого иммуноферментного анализа, существенно снизив время его проведения с 3,5 до 5 мин. Кроме того, калибровочная зависимость для полученных нами иммунореагентов была стабильна и не было необходимости при тестировании образцов ее повторять.

Таблица 2. Сравнение результатов обнаружения hLF в реальных образцах женского молока при их различном разведении с помощью FPIA и hLF ELISA

Образец молока	FPIA			hLF ELISA		
	разведение образца	содержание hLF в разведенных образцах, мкг/мл	содержание hLF в образцах, мг/мл	разведение образца	содержание hLF в разведенных образцах, мкг/мл	содержание hLF в образцах, мг/мл
№ 1	1 : 100	24,0 ± 0,5	2,19 ± 0,02	1 : 1500	1,56 ± 0,08	2,34 ± 0,12
	1 : 150	13,2 ± 0,3		1 : 2000	1,17 ± 0,15	
№ 2	1 : 100	25,2 ± 0,3	2,26 ± 0,14	1 : 1500	1,69 ± 0,11	2,24 ± 0,11
	1 : 150	13,5 ± 0,2		1 : 2000	0,98 ± 0,10	
№ 3	1 : 100	20,0 ± 0,4	1,95 ± 0,05	1 : 1500	1,41 ± 0,12	1,95 ± 0,12
	1 : 150	12,8 ± 0,2		1 : 2000	0,90 ± 0,12	
№ 4	1 : 100	18,1 ± 0,2	1,85 ± 0,05	1 : 1500	1,13 ± 0,20	1,79 ± 0,18
	1 : 150	12,1 ± 0,3		1 : 2000	0,95 ± 0,15	

Для проверки адекватности разработанного метода FPIA на образцах женского молока мы воспользовались четырьмя образцами женского молока (№№ 1–4). В этих образцах мы параллельно определяли содержание лактоферрина с помощью традиционного метода иммуноферментного анализа (с помощью набора фирмы «ХЕМА»).

Как видно из представленной табл. 2, при разбавлении образца молока в 100 и 150 раз удается определить близкое к ожидаемому содержание лактоферрина методом FPIA.

При проверке этих же образцов женского молока методом иммуноферментного анализа показано, что для получения достоверных результатов необходимо было разбавить образцы молока более, чем в 1000 раз, поскольку метод hLF ELISA имеет более низкий предел обнаружения; однако он является более длительным и трудоемким.

Как видно из приведенных в табл. 2 результатов, количество лактоферрина в образцах женского молока, определенное методом FPIA, находится в хорошей корреляции с данными, полученными с помощью более традиционного метода ELISA.

Для верификации метода в данной статье мы смогли получить и использовать только четыре образца женского молока, которые были ранее в работе у наших коллег и хранились уже в серии разведений в замороженном виде. В статье мы показали, что переход к реальным биологическим образцам молока не вызывает возникновения новых проблем с определением лактоферрина, требующих радикально менять используемую нами методику.

Таким образом, в данной работе продемонстрирована принципиальная возможность использования однодоменных антител в качестве распознающего реагента для определения в биологической жидкости (молоке) целевого антигена (лактоферрина) методом неконкурентного FPIA. По сравнению с традиционным иммуноферментным анализом FPIA занимает всего 5 мин, связывание антиген/антитело происходит в гомогенной среде и не требует сложных операций. Данный метод показал высокую чувствительность и специфичность для определения лактоферрина человека в молоке, как в образцах козьего молока с добавленным hLF, так и в реальных образцах женского молока, и показал хорошую корреляцию с традиционным методом hLF ELISA. Флуоресцентно меченные однодоменные антитела anti-LF5 и anti-LF16 являются перспективными для создания тест-системы определения лактоферрина человека в молоке и физиологических жидкостях методом FPIA.

Вклад авторов. Еремин С.А., Тиллиб С.В., Мухаметова Л.И. – концепция и руководство работой; Мухаметова Л.И., Арутюнян Д.А. – проведение FPIA-экспериментов; Горяйнова О.С., Иванова Т.И., Тиллиб С.В. – наработка и мечение нанотел; Еремин С.А., Тиллиб С.В., Мухаметова Л.И. – обсуждение результатов исследования; Мухаметова Л.И. – написание текста; Еремин С.А., Тиллиб С.В. – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-14-00305).

Благодарности. Мы выражаем благодарность Садчиковой Е.Р. (Институт биологии гена РАН, Москва) за предоставление для данной работы очищенного лактоферрина человека и образцов женского молока.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- González-Chávez, S. A., Arévalo-Gallegos, S., and Rascón-Cruz, Q. (2009) Lactoferrin: Structure, function and applications, *Int J. Antimicrob. Agents*, **33**, 301.e1-301.e8, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.07.020.
- Karav, S., German, J. B., Rouquié, C., Le Parc, A., and Barile, D. (2017) Studying lactoferrin N-glycosylation, *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, 870, doi: 10.3390/ijms18040870.
- Rosa, L., Cutone, A., Lepanto, M. S., Paesano, R., and Valenti, P. (2017) Lactoferrin: a natural glycoprotein involved in iron and inflammatory homeostasis, *J. Mol. Sci.*, **18**, 1985, doi: 10.3390/ijms18091985.
- Adlerova, L., Bartoskova, A., and Faldyna, M. (2008) Lactoferrin: a review, *Vet. Med.*, **53**, 457-468, doi: 10.17221/1978-VETMED.
- Murphy, M. E., Kariwa, H., Mizutani, T., Tanabe, H., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., and Takashima, I. (2001) Characterization of in vitro and in vivo antiviral activity of lactoferrin and ribavirin upon hantavirus, *J. Vet. Med. Sci.*, **63**, 637-645, doi: 10.1292/jvms.63.637.
- Legrand, D., and Mazurier, J. (2010) A critical review of the roles of host lactoferrin in immunity, *Biometals*, **23**, 365-376, doi: 10.1007/s10534-010-9297-1.
- Baker, E. N. (2004) Lactoferrin and iron: structural and dynamic aspects of binding and release, *BioMetals*, **17**, 209-216, doi: 10.1023/B:BIOM.0000027694.
- Nagasako, Y., Saito, H., Tamura, Y., Shimamura, S., and Tomita, M. (1993) Iron-binding properties of bovine lactoferrin in iron-rich solution, *J. Dairy Sci.*, **76**, 1876-1881, doi: 10.3168/jds.S0022-0302(93)77520-7.
- Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P., and O'Mahony, J. (2015) Biologically Active Compounds in Milk, in: *Dairy Chemistry and Biochemistry*, Springer. Cham, doi: 10.1007/978-3-319-14892-2_11.
- Садчиков П. Е., Гольдман И. Л., Намазова-Баранова Л. С., Яцык Г. В., Боровик Т. Э., Черноусов А. Д., Романченко А. И., Садчикова Е. Р., Лукоянова О. Л., Звонкова Н. Г., Беляева И. А. (2016) Лактоферрин в проблеме противoinфекционной защиты детей первого года жизни, *Педиатрическая фармакология*, **13**, 607-613, doi: 10.15690/pf.v13i6.1677.
- Chen, P.-W., and Mao, F.C. (2004) Detection of lactoferrin in bovine and goat milk by enzyme-linked immunosorbent assay, *J. Food Drug Anal.*, **12**, doi: 10.38212/2224-6614.2653.
- Tomassetti, M., Martini, E., Campanella, L., Favero, G., Sanzò, G., and Mazzei, F. (2013) Lactoferrin determination using flow or batch immunosensor surface plasmon resonance: Comparison with amperometric and screen-printed immunosensor methods, *Sens. Actuat. B Chem.*, **179**, 215-225, doi: 10.1016/j.snb.2012.09.096.
- Chen, H., Wang, Z., Fan, F., Shi, P., Xu, X., Du, M., and Wang, C. (2021) Analysis method of lactoferrin based on uncoated capillary electrophoresis, *eFood*, **2**, 147-153, doi: 10.2991/efood.k.210720.001.
- Zhang, J., Lai, S., Cai, Z., Chen, Q., Huang, B., and Ren, Y. (2014) Determination of bovine lactoferrin in dairy products by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry based on tryptic signature peptides employing an isotope-labeled winged peptide as internal standard, *Anal. Chim. Acta*, **829**, 33-39, doi: 10.1016/j.aca.2014.04.025.
- Palmano, K. P., and Elgar, D. F. (2002) Detection and quantitation of lactoferrin in bovine whey samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography on polystyrene-divinylbenzene, *J. Chromatogr. A*, **947**, 307-311, doi: 10.1016/s0021-9673(01)01563-1.
- Tsakali, E., Chatzilazarou, A., Houhoula, D., Koulouris, S., Tsaknis, J., and Van Impe, J. (2019) A rapid HPLC method for the determination of lactoferrin in milk of various species, *J. Dairy Res.*, **86**, 238-241, doi: 10.1017/s0022029919000189.
- Nithipatikom, K., and McGown, L. B. (1987) Homogeneous immunochemical technique for determination of human lactoferrin using excitation transfer and phase-resolved fluorometry, *Anal. Chem.*, **59**, 423-427, doi: 10.1021/ac00130a010.
- Chen, M. X., Wen, F., Zhang, Y. D., Li, P., Zheng, N., and Wang, J. Q. (2019) Determination of native lactoferrin in milk by HPLC on HiTrap Heparin HP column, *Food Anal. Method.*, **12**, 2518-2526, doi: 10.1007/s12161-019-01572-x.
- Wang, N., Jiang, X., Xu, X., Liu, Y., Liu, L., Lu, A., Lu, J., and Luan, Y. (2021) An aptamer affinity column for purification and enrichment of lactoferrin in milk, *J. Chromatography B*, **1178**, 122724, doi: 10.1016/j.jchromb.2021.122724.
- Hendrickson, O. D., Taranova, N. A., Zherdev, A.V., Dzantiev, B. B., and Eremin, S. A. (2020) Fluorescence polarization-based bioassays: new horizons, *Sensors*, **20**, 7132, doi: 10.3390/s20247132.
- Zhang, H., Yang, S., De Ruyck, K., Beloglazova, N., Eremin, S. A., De Saeger, S., Zhang, S., Shen, Ji., and Wang, Z. (2019) Fluorescence polarization assays for chemical contaminants in food and environmental

- analyses, *Trends Anal. Chem.*, **114**, 293-313, doi: 10.1016/j.trac.2019.03.013.
22. Nishiyama, K., Fukuyama, M., Maeki, M., Ishida, A., Tani, H., Hibara, A., Tokeshi, M. (2021) One-step non-competitive fluorescence polarization immunoassay based on a Fab fragment for C-reactive protein quantification, *Sensors Actuators B Chem.*, **326**, 128160, doi: 10.1016/j.snb.2020.128982.
 23. Nishiyama, K., Takeda, Y., Takahashi, K., Fukuyama, M., Maeki, M., Ishida, A., Tani, H., Shigemura, K., Hibara, A., Ogawa, H., and Tokeshi, M. (2021) Non-competitive fluorescence polarization immunoassay for detection of H5 avian influenza virus using a portable analyzer, *Anal. Bioanal. Chem.*, **413**, 4619-4623, doi: 10.1007/s00216-021-03193-y.
 24. Nishiyama, K., Takahashi, K., Fukuyama, M., Kasuya, M., Imai, A., Usukura, T., Maishi, N., Maeki, M., Ishida, A., Tani, H., Hida, K., Shigemura, K., Hibara, A., and Tokeshi, M. (2021) Facile and rapid detection of SARS-CoV-2 antibody based on a noncompetitive fluorescence polarization immunoassay in human serum samples, *Biosens. Bioelectron.*, **190**, 113414, doi: 10.1016/j.bios.2021.113414.
 25. Takeda, Y., Yonezawa, Y., Asake, S., Ogawa, H., and Imai, K. (2020) A fluorescence polarization immunoassay for the rapid detection of antibody against influenza A virus in chicken and goat sera, *J. Vet. Diagn. Invest.*, **32**, 887-891, doi: 10.1177/1040638720960046.
 26. Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E.B., Bendahman, N., and Hamers, R. (1993) Naturally occurring antibodies devoid of light chains, *Nature*, **363**, 446-448, doi: 10.1038/363446a0.
 27. Flajnik, M. F., and Kasahara, M. (2010) Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures, *Nat. Rev. Genet.*, **11**, 47-59, doi: 10.1038/nrg2703.
 28. Тиллиб, С. В., Иванова, Т. И., Васильев Л. А. (2010) Фингерпринтный анализ селекции наноантител методом фагового дисплея с использованием двух вариантов фагов-помощников, *Acta Naturae*, **2**, 100-108.
 29. Tillib, S. V., Privezentseva, M. E., Ivanova, T. I., Vasilev L. F., Efimov, G. A., Gurskiy, Ya. G., Georgiev, G. P., Goldman, I. L., and Sadchikova, E. R. (2014) Single-domain antibody-based ligands for immunoaffinity separation of recombinant human lactoferrin from the goat lactoferrin of transgenic goat milk, *J. Chromatogr. B*, **949-950**, 48-57, doi: 10.1016/j.jchromb.2013.12.034.
 30. Горяйнова О. С., Иванова Т. И., Рутовская М. В., Тиллиб С. В. (2017) Метод параллельного и последовательного генерирования однодоменных антител для протеомного анализа плазмы крови человека, *Мол. биол.*, **51**, 985-996.
 31. Тиллиб С. В. (2020) Перспективы использования однодоменных антител в биомедицине, *Мол. биол.*, **54**, 362-373, doi: 10.31857/S0026898420030167.
 32. Schreiber, A. B., and Yfimovich, J. (1983) Quantitative fluorometric assay for detection and characterization of Fc receptors, *Meth. Enzymol.*, **93**, 147-155, doi: 10.1016/s0076-6879(83)93039-2.
 33. Pace, C. N, Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein, *Protein Sci.*, **11**, 2411-23, doi: 10.1002/pro.5560041120.
 34. Chung, T., and Raymond, K. (1993) Lactoferrin: the role of conformational changes in its iron binding and release, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 6765-6768, doi: 10.1021/ja00068a037
 35. Мухаметова Л. И., Крылов В. Б., Соловьев А. С., Яшунский Д. В., Матвеев А. Л., Тикунова Н. В., Еремин С. А., Нифантьев Н. Э. (2021) Характеристика аффинности анти- β -(1 \rightarrow 3)-d-глюканового моноклонального антитела 3G11 методом поляризационно-флуоресцентного иммуноанализа, *Известия Академии наук. Сер. хим.*, **5**, 975-980.
 36. Nevinskii, A. G., Soboleva, S. E., Tuzikov, F. V., Buneva, V. N., and Nevinsky, G. A. (2009) DNA, oligosaccharides, and mononucleotides stimulate oligomerization of human lactoferrin, *J. Mol. Recognit.*, **22**, 330-342, doi: 10.1002/jmr.952.
 37. Zhang, S., Chen, L., Kumar, S., Wu, L., Lawrence, D. S., and Zhang, Z.-Y. (2007) An affinity-based fluorescence polarization assay for protein tyrosine phosphatases, *Methods*, **42**, 261-267, doi: 10.1016/j.ymeth.2007.02.008.

FLUORESCENCE POLARIZATION IMMUNOASSAY OF HUMAN LACTOFERRIN IN MILK USING SMALL SINGLE-DOMAIN ANTIBODIES

L. I. Mukhametova^{1*}, S. A. Eremin¹, D. A. Arutyunyan¹, O. S. Goryainova²,
T. I. Ivanova², and S. V. Tillib^{2*}

¹ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, 119234 Moscow, Russia; email: liliya106@mail.ru

² Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia; email: tillib@genebiology.ru

Due to its unique structure and properties, lactoferrin in human milk (hLF) has many nutritional and health-promoting functions for infants, such as protection against bacterial infections and inflammation. A lack of lactoferrin in human milk or formula milk can lead to an undesirable weakening of the infant's immune system. A promising method for the quantitative determination and control of the concentration of hLF in milk and dairy products can be a non-competitive format of polarization fluorescence immunoassay (FPIA), which does not require mandatory separation of bound and free forms of proteins and long-term sample preparation. The use of fluorescently labeled single-domain camel antibodies ("nanobodies") as recognition reagents makes it possible to quantify relatively larger molecules (antigens), in particular, human lactoferrin by FPIA. In this work, conjugates with fluorescein isothiocyanate (FITC) of two previously obtained anti-hLf5 and anti-hLf16 nanobodies, which specifically recognize various human lactoferrin epitopes, but do not recognize goat lactoferrins, were used. The kinetics of the interaction of FITC labeled nanobodies with hLF was studied. The dissociation constants (K_D) for antibodies anti-Lf5-FITC and anti-Lf16-FITC with hLF were determined to be 3.2 ± 0.3 nM and 4.9 ± 0.4 nM, respectively, indicating their high affinity binding to human lactoferrin. The FPIA protocol was developed, and the concentrations of FITC-anti-hLf5 and FITC-anti-hLf16 were selected, which give the optimal fluorescent signal and a stable polarization value. The dependence of fluorescence polarization on hLF concentration for non-competitive FPIA with FITC-anti-hLf5 antibodies was obtained and analytical characteristics were determined: detection limit 2.1 ± 0.2 $\mu\text{g/ml}$ and linear range for determining concentrations 3-10 $\mu\text{g/ml}$. The FPIA method is usually used to determine low molecular weight substances, but high molecular weight proteins can be determined using fluorescein-labeled small nanobodies; in particular, this work shows the possibility of quantitative determination of human lactoferrin in milk by the FPIA method using fluorescently labeled nanobodies as a recognition reagent.

Keywords: single-domain antibody, nanobody, lactoferrin, fluorescence polarization, immunoassay

УДК 577.29

НАСКОЛЬКО ЧАСТО ФИЛЬТРАЦИЯ КОЛОНОК ВЫРАВНИВАНИЯ УЛУЧШАЕТ РЕКОНСТРУКЦИЮ ФИЛОГЕНИИ ДВУХДОМЕННЫХ БЕЛКОВ?

© 2022 А.И. Сигорских¹, Д.Д. Латорцева¹, А.С. Карягина^{2,3,4}, С.А. Спири^{3,5*}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119992 Москва, Россия

² Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии
им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, 123098 Москва, Россия

³ НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119992 Москва, Россия; электронная почта: sas@belozersky.msu.ru

⁴ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии,
127550 Москва, Россия

⁵ НИУ «Высшая школа экономики», 109028 Москва, Россия

Поступила в редакцию 23.09.2022

После доработки 01.11.2022

Принята к публикации 01.11.2022

Реконструкция филогении белков обычно проводится по множественному выравниванию их аминокислотных последовательностей. Одной из проблем является наличие в таких выравниваниях участков различной консервативности, в том числе таких, где качество выравнивания сомнительно. Для решения этой проблемы часто применяется фильтрация колонок выравнивания, для чего разработано специальное программное обеспечение. В данной работе исследованы различные подходы к реконструкции филогении на примере белков с двумя эволюционными доменами. Последовательности таких белков заведомо неоднородны по консервативности благодаря наличию как эволюционных доменов, так и линкеров между доменами, а также *N*- и *C*-концевых частей. Показано, что фильтрация колонок выравнивания в среднем улучшает качество реконструкции только при использовании полноразмерных последовательностей и только при работе с эукариотическими белками. Показано также, что ограничение выравнивания на эволюционные домены с отбрасыванием менее консервативных линкеров и концевых последовательностей в среднем ухудшает качество филогенетической реконструкции.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: филогенетическая реконструкция, эволюционные домены, фильтрация множественного выравнивания.

DOI: 10.31857/S0320972522120223, EDN: NIYEQG

ВВЕДЕНИЕ

Практически любое современное исследование в области молекулярной биологии и генетики включает в себя молекулярно-филогенетический анализ, основанный на множественном выравнивании последовательностей нуклеиновых кислот или белков. Распространённым методом подготовки множественного выравнивания белков к филогенетическому анализу является фильтрация (или «тримминг») колонок выравнивания. Это делается с целью удалить колонки выравнивания,

в которых «шум» превалирует над «филогенетическим сигналом». Шум может возникнуть, например, в очень быстро эволюционирующих регионах, поскольку в них велика вероятность возвратных мутаций и, как следствие, гомоплазии. Кроме того, качество выравнивания (то есть соответствие распределения остатков по колонкам реальной эволюционной истории) на таких участках заметно ниже.

Для фильтрации выравниваний разработано многочисленное программное обеспечение, отбирающее «информативные» колонки

* Адресат для корреспонденции.

по таким признакам, как принадлежность к блоку без участков идущих подряд неконсервативных позиций (программа Gblocks [1]), процент гэпов ниже определённого порога (trimAl [2]) или предсказанный на основе математической модели уровень гомоплазии (NOISY [3]). Большинство опубликованных протоколов реконструкции филогении белков включают фильтрацию в качестве необходимого этапа, см., например, статью Jermiin et al. [4]. В частности, фильтрация входит по умолчанию в популярные программные конвейеры phylogeny.fr [5] и NGPhylogeny.fr [6].

В статье Tan et al. [7] было проведено тестирование ряда популярных программ фильтрации и показано, что они в среднем не улучшают качество реконструкции, а большинство их (например, довольно популярная программа Gblocks [1]), наоборот, заметно его ухудшают. По результатам этого исследования наибольшие шансы улучшить результат имеет фильтрация программой NOISY; это единственная из семи протестированных программ, которая при параметрах по умолчанию не приводит к достоверному ухудшению качества реконструкции. В связи с этим возникает вопрос о возможных условиях, при которых фильтрация выравниваний программой NOISY имеет смысл.

В качестве материала для тестирования эффективности фильтрации представляется разумным выбрать некоторый класс белков, чьи последовательности были бы неоднородны по своей эволюционной консервативности. Таким классом могут быть белки, в которых банк Pfam [8] диагностирует два эволюционных домена. Междоменный линкер, а также *N*- и *C*-концевые последовательности, как представляется, должны быть подвержены заметно более высокой частоте замен аминокислот по сравнению с доменами. Таким образом, последовательности вне доменов могут содержать больше гомоплазий, а их выравнивание может быть менее достоверным. Поэтому, как представляется, их фильтрация должна быть в среднем более целесообразна, чем фильтрация последовательностей доменов. Не исключено, что плохие результаты фильтрации в тестах из работы Tan et al. [7] вызваны превалированием в тестовых данных однодоменных белков.

В данной работе мы тестируем программу NOISY на наборе семейств белков, в которых банк Pfam диагностирует два эволюционных домена. Для этого мы создали шесть новых тестовых наборов, состоящих из ортологических рядов двухдоменных белков, при этом три

набора содержат прокариотические и три — эукариотические белки. На том же материале, помимо тестирования результатов фильтрации, нами был проверен тезис о повышенной скорости накопления аминокислотных замен в междоменном линкере и концевых последовательностях по сравнению с последовательностями доменов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

База последовательностей двухдоменных белков. Из шести таксонов: царства многоклеточных животных (Metazoa), царства зелёных растений (Viridiplantae), царства грибов (Fungi), надцарства архей (Archaea), отдела актинобактерий (Actinobacteria) и отдела протеобактерий (Proteobacteria) было отобрано по 80 видов так, чтобы количество семейств эволюционных доменов, согласно версии 35 банка Pfam [8], представленных в белках всех 80 организмов, являлось максимально возможным. Для всех наборов, кроме полученного из архей, накладывались ограничения на близость видов, а именно: для Metazoa все виды были взяты из разных отрядов, для Fungi — из разных семейств, для Viridiplantae, Actinobacteria и Proteobacteria — из разных родов. Отбор видов проводился написанной нами программой, доступной по адресу <https://github.com/belozersky321/PhyloBench/blob/main/selectmnems.py>.

Для каждого набора из 80 видов были отобраны наборы ортологических белков по следующим критериям:

- каждый белок включает ровно два эволюционных домена согласно Pfam;
- белки, включающие ровно два домена из этих же семейств в том же порядке, представлены не менее чем в 15 из 80 видов того же набора;
- для каждого из 80 видов имеется не более одного белка, включающего два домена из тех же семейств в том же порядке.

Тем самым отобранные белки образуют ортологические ряды объёмом от 15 до 80 белков. Списки белков, составляющих эти ортологические ряды, с указанием границ доменов доступны по адресу: https://github.com/belozersky321/2-Domain_proteins_data. Количество полученных ортологических рядов двухдоменных белков см. в таблице 1. Аминокислотные последовательности белков брались из файла pfamseq банка Pfam (<http://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/Pfam/releases/Pfam35.0/pfamseq.gz>).

Таблица 1. Ортологические ряды двухдоменных белков

Таксон	Число ортологических рядов	Среднее число белков ортологического ряда
Archaea	332	34,3
Actinobacteria	529	35,5
Proteobacteria	683	35,0
Fungi	1045	40,0
Metazoa	1742	29,6
Viridiplantae	1152	28,0

Использованное программное обеспечение.

Для множественного выравнивания последовательностей использовалась программа MUSCLE [9]. Для фильтрации выравниваний использовалась программа NOISY [3]. Для филогенетической реконструкции использовалась программа FastME [10]. Все перечисленные программы использовались с параметрами по умолчанию. Бутстреп-поддержка ветвей деревьев вычислялась программой FastME с опцией -b.

Подходы к филогенетической реконструкции.

Сравнивались следующие подходы. Во-первых, реконструкция делалась по: (1) выравниванию полноразмерных последовательностей белков каждого ортологического ряда; (2) выравниваниям первого или (3) второго эволюционных доменов; (4) конкатенированному выравниванию обоих доменов; (5) выравниванию обоих доменов вместе с линкером между ними, но без концевых последовательностей (отбрасывались участки до первого и после второго доменов). Во-вторых, в каждом из перечисленных вариантов реконструкция делалась по нефилтрованному и филтрованному выравниваниям. Другой обработки выравниваний не проводилось, в частности, не удалялись никакие последовательности, даже очень близкие к другим последовательностям того же выравнивания.

Сравнение филогенетических деревьев и статистическая обработка результатов. Для каждого реконструированного филогенетического дерева было вычислено расстояние Робинсона–Фолдса [11] до дерева соответствующих видов, полученного из таксономии NCBI [12] (деревья видов в формате Newick для всех шести сформированных нами наборов доступны по адресу https://github.com/belozersky321/2-Domain_proteins_data). Расстояние считалось написанной нами программой `rf_dist_n`, код

которой доступен по адресу <https://github.com/belozersky321/TreeDist>. Считалось, что из двух реконструкций лучшей является та, расстояние от которой до дерева видов меньше. Для двух наборов реконструкций (например, полученных из филтрованных и нефилтрованных выравниваний) набор разностей расстояний сравнивался с 0 посредством Z-критерия, то есть средняя разность делилась на стандартную ошибку средней разности, и полученное Z-значение рассматривалось как распределённое при нулевой гипотезе (эквивалентности методов реконструкций) по стандартному нормальному закону.

Для оценки статистической значимости зависимости эффекта фильтрации от различных характеристик выравнивания (числа последовательностей, длины) и связи эффекта фильтрации с бутстреп-поддержкой ветвей реконструированных деревьев использовался критерий хи-квадрат для таблиц сопряжённости.

Подбор оптимального порога по толщине выравнивания.

Для подбора оптимального порога толщины выравнивания использовался принцип подбора наиболее достоверного порога, подобный описанному в работе Kalinina et al. [13]: для всех порогов была составлена таблица сопряжённости 3×2, по строкам – количества выравниваний, у которых фильтрация привела к ухудшению качества филогенетической реконструкции, не изменила качества или улучшила качество; по столбцам – толщина выше порога или толщина не выше порога. Для всех таблиц были посчитаны *p*-значения по критерию хи-квадрат. За оптимальный порог было принято значение толщины, при котором полученное *p*-значение было минимальным.

Визуализация результатов. Для построения визуализаций использовались библиотеки языка Python, а именно matplotlib версии 3.5.2 и seaborn версии 0.11.2 (функции `kdeplot` для плотностей распределений и `barplot` для столбчатых диаграмм).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Характеристики материала исследования.

Из шести таксонов было отобрано 5483 ортологических ряда двухдоменных белков, в каждом было от 15 до 80 белков, см. таблицу 1. Приведём некоторые характеристики последовательностей этих белков. Для наглядности на иллюстрациях мы объединили вместе три прокариотических набора и отдельно – три эукариотических. Для всех характеристик различия между различными прокариотическими

и различными эукариотическими наборами выравниваний оказались минимальны.

Доля последовательностей белков, занятой доменами. На рис. 1 приведены плотности распределения долей последовательностей, покрытых двумя эволюционными доменами, для отобранных нами белков. Для прокариотических белков эта доля в большинстве случаев велика, эукариотические белки более разнообразны по этой характеристике.

Скорость эволюции различается в эволюционных доменах и вне их. Для проверки предположения о более высокой скорости аминокислотных замен вне доменов мы сравнили расстояния между парами полноразмерных последовательностей, тех же последовательностей без N-концов (до первого домена) и C-концов (после второго домена), а также слитых последовательностей двух доменов без

линкера между ними. Результаты в виде плотностей распределений доли расстояний, которые оказались больше в одном варианте по сравнению с другим, приведены на рис. 2. Видно, что во всех случаях чем большие части последовательностей вне доменов используются, тем чаще расстояния оказываются больше, чем при использовании только последовательностей доменов. Следовательно, исходные предположения, повлиявшие на выбор материала исследования, верны. Между различными таксономическими группами внутри прокариот и эукариот существенных различий не наблюдается, см. плотности для всех групп отдельно: https://github.com/belozersky321/2-Domain_proteins_data

Результат фильтрации. На рис. 3 приведены плотности распределения долей колонок выравниваний полноразмерных белков,

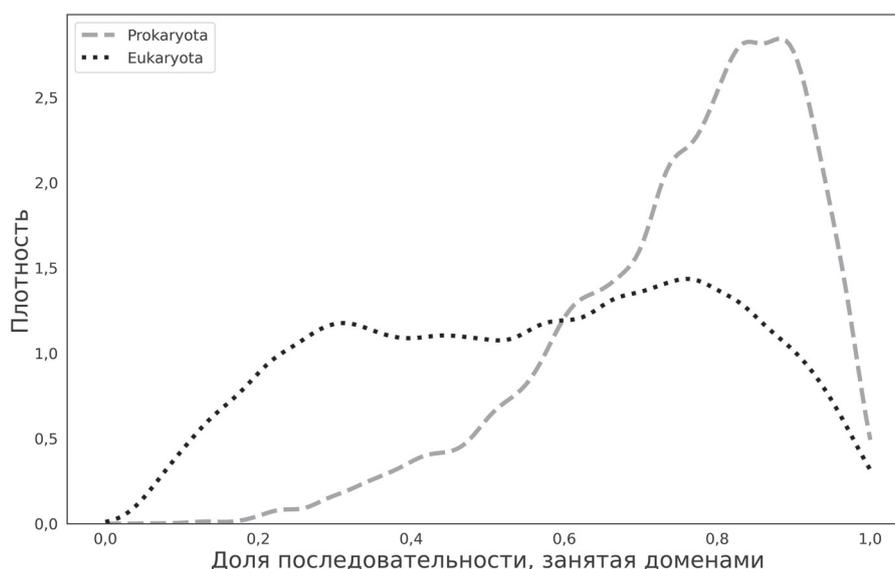


Рис. 1. Плотность распределения доли последовательностей, занятых двумя эволюционными доменами

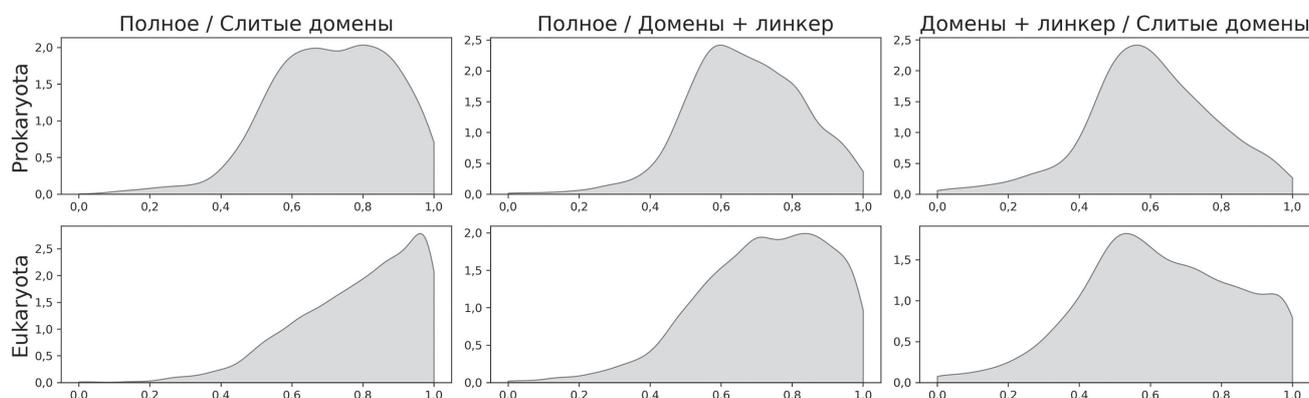


Рис. 2. Плотность распределения доли расстояний между последовательностями, которые оказываются больше в случае использования большей части последовательностей белков

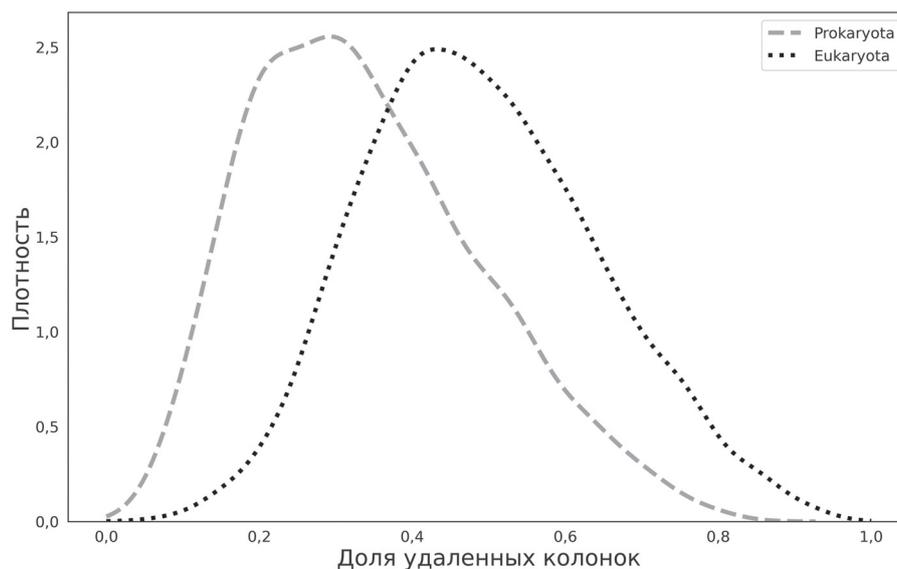


Рис. 3. Плотность распределения доли удаленных при фильтрации колонок выравниваний

которые удаляются программой фильтрации. Видно, что фильтрация затрагивает различные выравнивания в очень разной степени, причём на эукариотические влияет в среднем существенно сильнее.

Сравнение результатов филогенетической реконструкции. Результаты сравнения вариантов филогенетической реконструкции, а именно: по полноразмерным белкам, отдельным доменам, слитым доменам и доменам с линкером, с фильтрацией и без, представлены в табл. 2 и 3, а также на рис. 2. Таблица 2 содержит средние расстояния до референсного дерева для всех вариантов. Чтобы продемонстрировать статистическую значимость различий, в таблице 3

мы приводим Z -значения для сравнения результатов по разным выравниваниям с вариантом «по умолчанию», то есть с реконструкцией по полному выравниванию без фильтрации. Эффект от фильтрации для разных вариантов выравниваний проиллюстрирован на рис. 4. Показано, что фильтрация даёт в среднем преимущество только для эукариотических наборов (белков грибов, животных и растений) и только на полноразмерных белках, в остальных случаях средний результат реконструкции ухудшается от применения фильтрации. При этом достоверное улучшение ($p < 0,001$, Z -критерий) наблюдается только для полноразмерных белков Metazoa. Кроме того, из таблицы 2

Таблица 2. Среднее расстояние от реконструированного дерева до референсного дерева видов

Фильтрация	Выравнивание	Archaea	Actinobacteria	Proteobacteria	Fungi	Metazoa	Viridiplantae
Нет	полное	0,450	0,538	0,602	0,453	0,523	0,552
	домен 1	0,523	0,6231	0,657	0,605	0,644	0,664
	домен 2	0,538	0,618	0,658	0,615	0,633	0,654
	слитые домены	0,470	0,549	0,613	0,497	0,552	0,589
	домены + линкер	0,460	0,547	0,606	0,470	0,525	0,562
Да	полное	0,458	0,538	0,604	0,447	0,516	0,550
	домен 1	0,530	0,630	0,661	0,606	0,650	0,668
	домен 2	0,542	0,625	0,659	0,622	0,637	0,660
	слитые домены	0,479	0,557	0,616	0,501	0,556	0,591
	домены + линкер	0,469	0,548	0,608	0,471	0,527	0,562

Примечание. Жирным выделено наименьшее значение в каждой колонке.

Таблица 3. Z-Значения для сравнения разных вариантов реконструкции с реконструкцией по полному выравниванию без фильтрации

Фильтрация	Выравнивание	Archaea	Actinobacteria	Proteobacteria	Fungi	Metazoa	Viridiplantae
Нет	домен 1	12,0	13,4	13,6	29,5	31,5	25,7
	домен 2	13,3	12,4	13,5	30,4	28,4	23,7
	слитые домены	5,41	2,66	4,08	11,9	9,71	11,7
	домены + линкер	3,02	2,44	1,94	5,36	0,558	4,08
Да	полное	3,18	0,176	0,903	-2,41	-4,50	-0,852
	домен 1	12,8	14,7	13,9	29,3	33,4	26,1
	домен 2	14,0	13,6	13,4	31,7	28,8	25,1
	слитые домены	6,39	4,86	4,42	12,8	10,9	12,3
	домены + линкер	4,79	2,70	2,56	5,38	1,44	3,74

Примечание. Отрицательное значение означает преимущество варианта, указанного в строке, положительное – преимущество реконструкции по полному выравниванию без фильтрации.

видно, что полноразмерные белки во всех случаях дают лучшие результаты по сравнению с фрагментами.

Мы видим, что для неполноразмерных выравниваний эффект фильтрации во всех случаях отрицательный. Что касается полноразмерных белков, то у всех прокариот эффект фильтрации отрицательный, а у всех эукариот – положительный. В связи с этим далее мы ограничились полноразмерными выравниваниями и объединили все группы прокариот (т.е. археи, актинобактерии и протеобактерии) вместе и все группы эукариот (т.е. животных, растения и грибы) также вместе.

Связь между относительным качеством реконструкции и размером выравнивания. В следующей серии компьютерных экспериментов исследовали зависимость между влиянием фильтрации на качество филогенетической реконструкции и характеристиками входного множественного выравнивания: длиной (чис-

лом колонок) и толщиной (числом последовательностей). Медианная длина выравнивания прокариотических белков на нашем материале оказалась равной 512 аминокислотным остаткам (а.о.), медианная длина выравнивания эукариотических белков – 911 а.о. В табл. 4 приведено количество выравниваний при их разделении по длине (меньше или равной медианной либо большей медианной) и по эффекту фильтрации (в результате фильтрации расстояние от эталона уменьшилось, не изменилось либо увеличилось), отдельно для прокариотических и эукариотических выравниваний. Видно, что различия между строками незначительны для прокариот (*p*-значение по критерию хи-квадрат 0,62). При этом для эукариот $p = 1,9 \cdot 10^{-5}$. Таким образом, можно утверждать, что длина выравнивания связана с эффектом от фильтрации только для выравниваний эукариотических белков. Однако стоит отметить, что для эукариот длина выравнива-

Таблица 4. Количество выравниваний, для которых фильтрация программой NOISY привела к различным эффектам, в зависимости от длины входного выравнивания

Организмы	Эффект	Длина ≤ медианы	Длина > медианы
Прокариоты	NOISY улучшает	86	75
	NOISY не даёт эффекта	591	589
	NOISY ухудшает	98	105
Эукариоты	NOISY улучшает	553	500
	NOISY не даёт эффекта	967	1106
	NOISY ухудшает	451	362

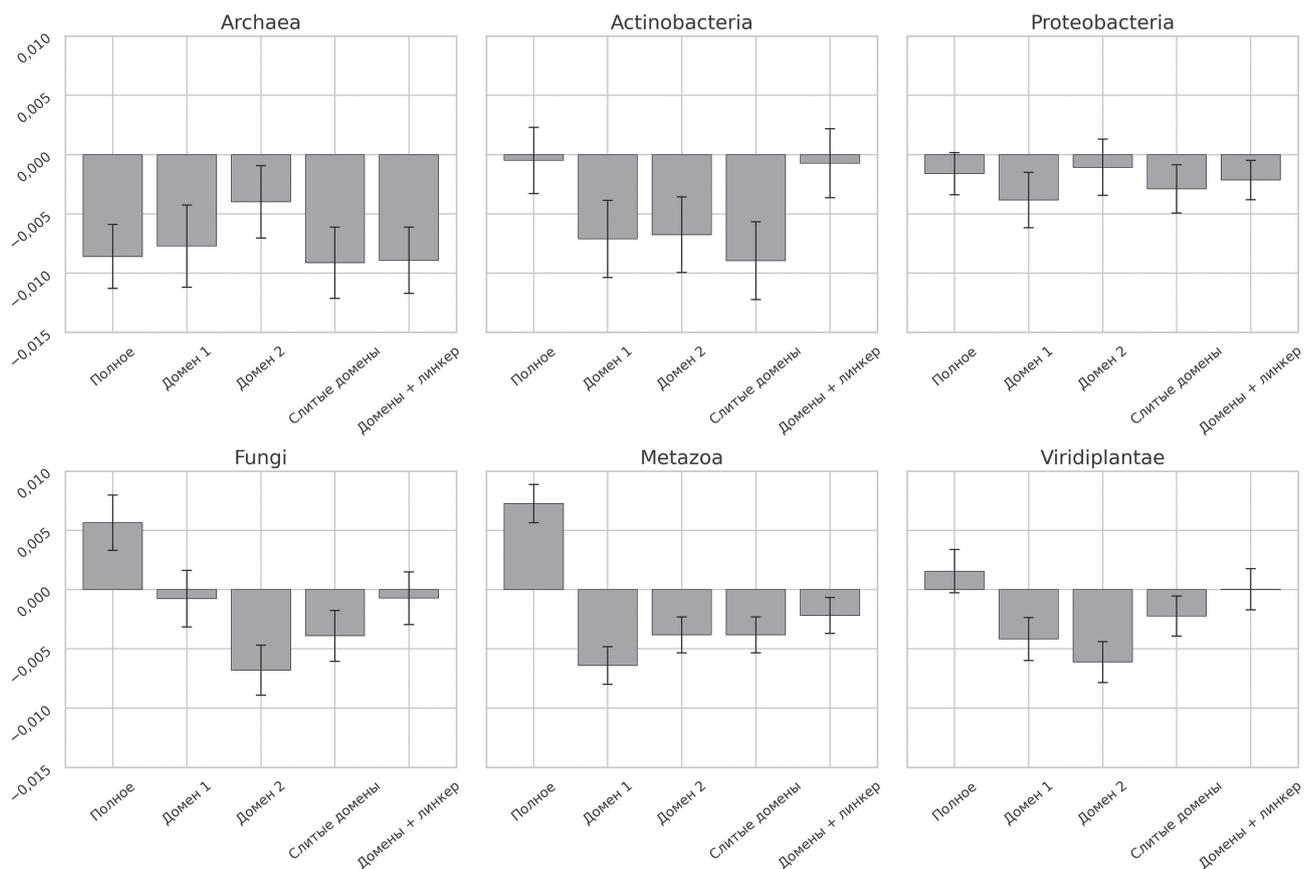


Рис. 4. Столбчатые диаграммы средних разностей между расстояниями от дерева видов до двух реконструкций: по фильтрованному и нефильтованному выравниваниям. Из расстояния до реконструкции по нефильтованному выравниванию вычиталось расстояние до реконструкции по фильтрованному, тем самым отрицательные значения означают преимущество нефильтованного выравнивания. «Усы» обозначают стандартную ошибку средней разности

ния влияет прежде всего на долю случаев, когда фильтрация не имела никакого (ни положительного, ни отрицательного) эффекта.

Медианная толщина выравнивания оказалась равной 27 как для прокариот, так и для эукариот. Таблица 5, устроенная аналогично таблице 4, показывает, что толщина имеет значение: фильтрация даёт положительный эффект на выравниваниях из большого числа

последовательностей существенно чаще, чем на выравниваниях из малого числа последовательностей. *P*-Значения по критерию хи-квадрат составляют 0,013 для прокариот и $6,6 \cdot 10^{-38}$ для эукариот.

Видно, что для эукариотических выравниваний преимущество фильтрации существенно для «толстых» выравниваний и незначительно для «тонких». Что касается прокариот, то даже

Таблица 5. Количество выравниваний, для которых фильтрация программой NOISY привела к различным эффектам, в зависимости от толщины входного выравнивания, т.е. от числа последовательностей в нём

Организмы	Эффект	Толщина \leq медианы	Толщина $>$ медианы
Прокариоты	NOISY улучшает	69	92
	NOISY не даёт эффекта	616	564
	NOISY ухудшает	89	114
Эукариоты	NOISY улучшает	393	660
	NOISY не даёт эффекта	1265	808
	NOISY ухудшает	371	442

Таблица 6. Количество выравниваний, для которых фильтрация программой NOISY привела к различным эффектам, в зависимости от изменения средней бутстреп-поддержки ветвей реконструированных деревьев

Организмы	Эффект	Поддержка возросла	Поддержка не возросла
Прокариоты	NOISY улучшает	105	56
	NOISY не даёт эффекта	694	486
	NOISY ухудшает	104	99
Эукариоты	NOISY улучшает	670	383
	NOISY не даёт эффекта	1166	907
	NOISY ухудшает	468	345

Примечание. Столбец «поддержка возросла» содержит количество выравниваний, для которых средняя бутстреп-поддержка ветвей дерева, построенного по фильтрованному выравниванию, выше, чем средняя поддержка ветвей дерева, построенного по исходному выравниванию; столбец «поддержка не возросла» – количество остальных выравниваний.

после подбора порога на число последовательностей по минимуму p -значений, который даёт оптимальный порог 35, мы получили для выравниваний толще полученного порога, что фильтрация улучшает реконструкцию в 81 случаях и ухудшает в 85 случаях. Следовательно, для прокариотических выравниваний фильтрацию программой NOISY нельзя рекомендовать независимо от числа последовательностей в них. При этом для эукариот подбор порога дал значение 27, то есть равное медиане, поэтому для них в таблице 5 можно видеть результат разделения по оптимальному порогу.

Связь между относительным качеством реконструкции и бутстреп-поддержкой ветвей деревьев. Для оценки качества филогенетической реконструкции часто применяется бутстреп [14], позволяющий присвоить каждой ветви реконструированного дерева число («поддержку») от 0 до 100, косвенно характеризующее достоверность реконструкции данной ветви. Естественно было предположить, что если фильтрация выравнивания улучшает реконструкцию дерева, то и средняя поддержка ветвей дерева, построенного по фильтрованному выравниванию, окажется выше, чем для дерева, построенного по исходному выравниванию, и *vice versa*. В таблице 6 приведены количества выравниваний, для которых наблюдаются различные эффекты фильтрации с точки зрения расстояния до эталона и средней бутстреп-поддержки. Видно, что имеется несильная, но достоверная связь между изменением средней поддержки, с одной стороны, и изменением качества реконструкции, с другой стороны (p -значения по критерию хи-квадрат – 0,02 для прокариот и 0,0005 – для эукариот). При этом из данных следует, что для прокариот даже увеличение поддержки

не может служить весомым аргументом в пользу применения фильтрации.

При сравнении табл. 5 и 6 возникает естественный вопрос о сочетании двух признаков выравнивания: числа последовательностей и увеличения поддержки ветвей после реконструкции по исходному и фильтрованному выравниваниям. Как видно из таблиц, этот вопрос актуален только для эукариотических выравниваний. В таблице 7 приведены количества случаев улучшения и ухудшения качества реконструкции для всех четырёх сочетаний этих признаков.

Из таблицы 7 следует, что существенные шансы улучшить реконструкцию в результате фильтрации есть только для эукариотических выравниваний, для которых одновременно выполняются оба условия: число последовательностей больше 27, и средняя поддержка ветвей дерева после фильтрации увеличивается. Впрочем, даже при выполнении только одного из этих условий количество случаев, когда фильтрация улучшает реконструкцию,

Таблица 7. Количество эукариотических выравниваний, в которых качество реконструкции изменилось после фильтрации, в зависимости от числа последовательностей и изменения бутстреп-поддержки

Толщина	Поддержка не возросла	Поддержка возросла
Толщина ≤ 27	142/126 $\approx 1,13$	229/267 $\approx 0,86$
Толщина > 27	203/257 $\approx 0,79$	239/403 $\approx 0,59$

Примечание. В каждой ячейке в числителе – количество выравниваний, для которых фильтрация ухудшила результат, в знаменателе – количество выравниваний, для которых фильтрация улучшила результат. После каждого отношения приведено его приближённое значение в виде десятичной дроби.

достоверно ($p < 0,05$, критерий знаков) превышает количество случаев с противоположным эффектом.

Мы также изучали связь относительно качества реконструкции (то есть разницы между расстояниями от эталона до деревьев, построенных по исходному и отфильтрованному выравниванию) со следующими характеристиками: доля отфильтрованных позиций, доля длины, занимаемой эволюционными доменами, доля пар последовательностей, между которыми после фильтрации уменьшаются расстояния, среднее расстояние между последовательностями. Ни для одной из перечисленных характеристик значимых зависимостей обнаружено не было (данные не приведены).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что фильтрация входного выравнивания, то есть удаление из него предположительно неинформативных, «зашумляющих» колонок, часто применяется при филогенетической реконструкции. В популярных сервисах phylogeny.fr [5] и NGphylogeny.fr [6] фильтрация включена в вариант «One click», то есть по умолчанию. В наборе программ для построения филогенетических конвейеров ETE tools [15] фильтрация выравнивания является одним из рекомендованных шагов. Проведённое несколько лет назад [7] тестирование нескольких программ фильтрации множественных выравниваний показало отсутствие положительного эффекта фильтрации. Однако не исключено, что такой результат был следствием особенностей тестовой выборки. В частности, в работе Tan et al. [7] использовалась выборка выравниваний по 30 последовательностей в каждом, что, вполне возможно, мало для эффективного выявления неинформативных колонок. Кроме того, большинство белков той выборки были небольшой длины (менее 300 а.о.) и, вероятно, включали только один эволюционный домен.

В этой связи представлялось важным исследовать эффект от фильтрации на выравниваниях, отличающихся заведомо неравномерной по колонкам структурой. Для таких выравниваний были выбраны белки с двумя эволюционными доменами. Предположительно, эволюция последовательностей в пределах доменов идёт несколько иначе, чем вне их. Мы косвенно подтвердили это сравнением расстояний между последовательностями, измеренными по полным белкам и по слитым доменам (рис. 2). В качестве программы фильтрации была выбрана NOISY [3], поскольку

только для неё в работе Tan et al. [7] не было показано достоверно отрицательного эффекта её применения, в отличие от шести других программ фильтрации.

Прежде всего мы выяснили, что выравнивания полноразмерных белков всегда дают лучшие реконструкции, чем выравнивания с удалёнными частями. Тем самым распространённая рекомендация ограничиваться при реконструкции последовательностями Pfam-доменов (см., например, протокол Song et al. [16]) вводит в противоречие с нашими результатами.

На нашей выборке двухдоменных белков показано, что фильтрацию программой NOISY имеет смысл применять только к выравниваниям эукариотических белков, и при этом не во всех случаях. Так, NOISY не даёт в среднем положительного эффекта, если число последовательностей в выравнивании мало (27 или меньше). Вероятно, это связано с особенностями алгоритма, основанного на оценке числа гомоплазий в каждой колонке выравнивания, что можно сделать с достаточной надёжностью лишь при достаточном числе последовательностей. Также положительный эффект фильтрации отсутствует, если из выравнивания исключены *N*- и *C*-концы белков (до начала первого домена и после второго, см. рис. 4). Ещё одним признаком целесообразности фильтрации может служить увеличение средней бутстреп-поддержки ветвей дерева (см. табл. 6). Однако этот признак оказался надёжным только в случае выполнения остальных условий, то есть в случае выравнивания достаточно большого числа эукариотических белков (см. табл. 7).

Для эукариотических белков выявилась небольшая, но достоверная ($p = 1,9 \cdot 10^{-5}$) связь эффекта фильтрации с длиной выравнивания. Однако внимательное рассмотрение таблицы 4 показывает, что длина влияет главным образом на процент случаев, когда фильтрация не оказывает никакого, ни положительного, ни отрицательного, влияния на качество реконструкции, а на соотношение между количеством случаев с положительным и отрицательным эффектом длина практически не влияет.

На основании полученных данных мы можем с некоторой осторожностью рекомендовать применение программы NOISY в случае работы с достаточно большим числом эукариотических белков, контролируя при этом изменение бутстреп-поддержки, возникающее после фильтрации. Экстраполяция данной рекомендации с двухдоменных на произвольные белки требует подтверждения. В связи с этим мы планируем проведение аналогичного исследования на эукариотических белках с

различным числом эволюционных доменов и с рассмотрением выравниваний большего числа последовательностей, чем максимально исследованное в данной работе, то есть 80. Связи эффекта фильтрации колонок со средним расстоянием между последовательностями выявлено не было, тем самым представляется маловероятным, что результаты изменятся, если убирать из выравниваний очень близкие последовательности, но мы планируем проверить и это. Возможно, стоит также протестировать программы фильтрации колонок, появившиеся после работы Tan et al. [7] 2015 года и поэтому не исследованные в ней.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе показано, что фильтрация колонок выравниваний последовательностей белков достаточно редко приводит к улучшению качества филогенетической реконструкции, даже если рассматривать двухдоменные белки, то есть такие, где весьма вероятно очень различное качество выравнивания на разных участках. Практически можно ре-

комендовать фильтрацию программой NOISY только для выравниваний достаточно большого числа (более 27) полноразмерных последовательностей эукариотических белков. При выполнении указанных условий аргументом в пользу фильтрации служит увеличение бутстреп-поддержки ветвей. В остальных случаях фильтрация чаще приводит к ухудшению, нежели к улучшению качества филогенетической реконструкции.

Вклад авторов. С.А. Спири́н – концепция и руководство работой; Д.Д. Латорцева, А.И. Сигорских – проведение компьютерных экспериментов; С.А. Спири́н, А.И. Сигорских – обсуждение результатов исследования; А.С. Карягина – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-14-00135).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Talavera, G., and Castresana, J. (2007) Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments, *System. Biol.*, **56**, 564-577, doi: 10.1080/10635150701472164.
2. Capella-Gutiérrez, S., Silla-Martínez, J. M., and Gabaldón, T. (2009) TrimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses, *Bioinformatics*, **25**, 1972-1973, doi: 10.1093/bioinformatics/btp348.
3. Dress, A. W., Flamm, C., Fritsch, G., Grünwald, S., Kruspe, M., Prohaska, S. J., and Stadler, P. F. (2008) Noisy: identification of problematic columns in multiple sequence alignments, *Algorithms Mol. Biol.*, **3**, 7, doi: 10.1186/1748-7188-3-7.
4. Jermiin, L. S., Catullo, R. A., and Holland, B. R. (2020) A new phylogenetic protocol: dealing with model misspecification and confirmation bias in molecular phylogenetics, *NAR Genom. Bioinform.*, **2**, lqaa041, doi: 10.1093/nargab/lqaa041.
5. Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.-F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J.-M., and Gascuel, O. (2008) Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist, *Nucleic Acids Res.*, **36**, W465-W469, doi: 10.1093/nar/gkn180.
6. Lemoine, F., Correia, D., Lefort, V., Doppelt-Azeroual, O., Mareuil, F., Cohen-Boulakia, S., and Gascuel, O. (2019) NGPhylogeny.fr: new generation phylogenetic services for non-specialists, *Nucleic Acids Res.*, **47**, W260-W265, doi: 10.1093/nar/gkz303.
7. Tan, G., Muffato, M., Ledergerber, C., Herrero, J., Goldman, N., Gil, M., and Dessimoz, C. (2015) Current methods for automated filtering of multiple sequence alignments frequently worsen single-gene phylogenetic inference, *System. Biol.*, **64**, 778-791, doi: 10.1093/sysbio/syv033.
8. Mistry, J., Chuguransky, S., Williams, L., Qureshi, M., Salazar, G. A., Sonnhammer, E. L. L., Tosatto, S. C. E., Paladin, L., Raj, S., Richardson, L. J., Finn, R. D., and Bateman, A. (2021) Pfam: The protein families database in 2021, *Nucleic Acids Res.*, **49**, D412-D419, doi: 10.1093/nar/gkaa913.
9. Edgar, R. C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Res.*, **32**, 1792-1797, doi: 10.1093/nar/gkh340.
10. Lefort, V., Desper, R., and Gascuel, O. (2015) FastME 2.0: a comprehensive, accurate, and fast distance-based phylogeny inference program, *Mol. Biol. Evol.*, **32**, 2798-2800, doi: 10.1093/nar/gkh340.
11. Robinson, D. F., and Foulds, L. R. (1981) Comparison of phylogenetic trees, *Math. Biosci.*, **53**, 131-147, doi: 10.1016/0025-5564(81)90043-2.

12. Federhen, S. (2012) The NCBI taxonomy database, *Nucleic Acids Res.*, **40**, D136-D143, doi: 10.1093/nar/gkr1178.
13. Kalinina, O. V., Novichkov, P. S., Mironov, A. A., Gelfand, M. S., and Rakhmaninova, A. B. (2004) SDPpred: a tool for prediction of amino acid residues that determine differences in functional specificity of homologous proteins, *Nucleic Acids Res.*, **32**, W424-W428, doi: 10.1093/nar/gkh391.
14. Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap, *Evolution*, **39**, 783-791, doi: 10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x.
15. Huerta-Cepas, J., Serra, F., and Bork, P. (2016) ETE 3: reconstruction, analysis, and visualization of phylogenomic data, *Mol. Biol. Evol.*, **33**, 1635-1638, doi: 10.1093/molbev/msw046.
16. Song, L., Wu, S., and Tsang, A. (2018) Phylogenetic analysis of protein family, in *Fungal Genomics. Methods in Molecular Biology* (de Vries, R., Tsang, A., Grigoriev, I., eds) vol. 1775, Humana Press, New York, pp. 267-291, doi: 10.1007/978-1-4939-7804-5_21.

HOW OFTEN DOES FILTERING ALIGNMENT COLUMNS IMPROVE PHYLOGENETIC INFERENCE OF TWO-DOMAIN PROTEINS?

A. I. Sigorskikh¹, D. D. Latortseva¹, A. S. Karyagina^{2,3,4}, and S. A. Spirin^{3,5*}

¹ Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia

² Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 123098 Moscow, Russia

³ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia; e-mail: sas@belozersky.msu.ru

⁴ All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, 127550 Moscow, Russia

⁵ National Research University Higher School of Economics, 109028 Moscow, Russia

The phylogeny of proteins is usually reconstructed based on multiple alignments of their amino acid sequences. One of the problems of such alignments is the presence of regions of different conservation, including those regions where the quality of the alignment is questionable. To solve this problem, the filtering of alignment columns is often used, with special software developed for this purpose. In this work, various approaches to phylogeny reconstruction are investigated using proteins with two evolutionary domains as examples. The sequences of such proteins are inherently heterogeneous in conservation due to the presence of both evolutionary domains and linkers between domains, as well as N- and C-termini. It is shown that filtering the alignment columns on average improves the quality of reconstruction only when full-length sequences are used and only for eukaryotic proteins. It is also shown that restriction of an alignment to evolutionary domains with rejection of less conserved linkers and end sequences worsens the quality of phylogenetic reconstruction on average.

Keywords: phylogenetic inference, evolutionary domains, filtration of multiple sequence alignment

ИНДУКЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ФОТОЗАЩИТНЫХ БЕЛКОВ PsbS И LhcSR В КЛЕТКАХ ЗЕЛЁНОЙ МИКРОВОДОРОСЛИ *Lobosphaera incisa* IPPAS C-2047 ПОД ДЕЙСТВИЕМ НИЗКОЙ ПОЛОЖИТЕЛЬНОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ

© 2022 В.В. Птушенко^{1,2*}, Г.Н. Бондаренко³, Е.Н. Виноградова^{4,5}, Е.С. Глаголева^{1,4},
О.В. Карпова⁴, О.С. Птушенко^{1,4}, К.А. Шибзухова^{1,4}, А.Е. Соловченко^{4,6}, Е.С. Лобакова⁴

¹ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского
Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
119992 Москва, Россия; электронная почта: ptush@belozersky.msu.ru

² Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН, 119334 Москва, Россия

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет,
119991 Москва, Россия

⁴ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
119991 Москва, Россия

⁵ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», 123182 Москва, Россия

⁶ Псковский государственный университет, 180000 Псков, Россия

Поступила в редакцию 06.10.2022

После доработки 03.11.2022

Принята к публикации 03.11.2022

Во всех группах организмов, осуществляющих оксигенный фотосинтез, существенную роль в защите фотосинтетического аппарата (ФСА) от повреждающего действия избыточного освещения играет нефотохимическое тушение (НФТ) возбуждённых состояний хлорофилла. У зелёных водорослей, а также у ряда других групп водорослей и мохообразных ключевым компонентом механизма НФТ является белок LhcSR, родственный белкам фотосинтетической антенны. У сосудистых растений этот белок отсутствует, а его функции выполняет белок фотосистемы II (ФСII) PsbS, принадлежащий к тому же суперсемейству антенных белков. PsbS также встречается и выполняет защитную функцию по крайней мере у некоторых мохообразных. Долгое время считалось, что в клетках зелёных водорослей PsbS не активен, хотя и присутствует в их геноме. Лишь шесть лет назад появились свидетельства о накоплении PsbS в клетках модельного организма *Chlamydomonas reinhardtii* в ответ на рост интенсивности света. Однако наблюдаемое возрастание содержания PsbS было кратковременным (часы). Мы обнаружили у зелёной водоросли *Lobosphaera incisa* сохраняющийся в течение четырёх суток значительный (более чем на три порядка) рост уровня экспрессии PsbS в ответ на спровоцированный низкой температурой световой стресс, а менее значительное (порядка десятикратного) повышение уровня экспрессии PsbS сохранялось до девяти суток. Тем самым в настоящей работе мы впервые показываем продолжительное возрастание уровня экспрессии PsbS в клетках зелёных водорослей (Chlorophyta) в ответ на стресс. Это может означать, что функция PsbS в ФСА Chlorophyta не сводится к роли «первого эшелона» защиты в переходных состояниях, как предполагали ранее, а включает полноценное участие в долговременной защите ФСА от стрессовых условий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: тепловая диссипация энергии света, PsbS, LhcSR, световой стресс, низкотемпературная акклимация, Chlorophyta.

DOI: 10.31857/S0320972522120235, EDN: NJCOKI

ВВЕДЕНИЕ

Для оксигенных фотосинтезирующих организмов избыточное освещение является стресс-

совым фактором, поскольку может инициировать фотоокислительные реакции, приводящие к повреждению организма [1]. Защита фотосинтетического аппарата (ФСА) от избыточного

Принятые сокращения: Кс – ксантофиллы; НФТ – нефотохимическое тушение; ФСII – фотосистема II; ФСА – фотосинтетический аппарат; Хл – хлорофилл; $\Phi_{\text{ФСII}}$ – квантовый выход фотохимической реакции в ФСII.

* Адресат для корреспонденции.

освещения включает в себя ряд механизмов, среди которых одну из ключевых ролей играет так называемое нефотохимическое тушение флуоресценции (НФТ). В ходе этого процесса происходит преобразование в тепло энергии электронного возбуждения молекул хлорофилла (Хл). В результате снижается вероятность реакции возбуждённого Хл с растворённым в среде кислородом и, следовательно, образования активных форм кислорода [2]. При этом также происходит снижение квантового выхода (тушение) флуоресценции Хл, с чем и связано закрепившееся название этого процесса (эпитет «нефотохимическое» означает, что это тушение не связано с фотохимической реакцией в фотосинтетическом реакционном центре).

В наблюдаемом снижении квантового выхода флуоресценции Хл, как правило, отчетливо наблюдаются несколько фаз. Самая быстрая, протекающая в секундном диапазоне времён, определяется образованием ΔpH на тилакоидной мембране и называется энергозависимым (также энергетическим или pH -зависимым) НФТ (qE). Изменения других характеристик системы защиты ФСА приводят к возникновению более медленных фаз индукции НФТ. НФТ обеспечивается взаимодействием нескольких молекулярных компонентов – пигментов ксантофиллов (Кс) [3, 4] и белков, локализованных в тилакоидной мембране и взаимодействующих с ксантофиллами и/или с фотосинтетическими антенными комплексами. Известно два белка, непосредственно обеспечивающих НФТ: LhcSR (Light-Harvesting Complex Stress-Related proteins) [5, 6] и компонент фотосистемы II (ФСII) PsbS [7]. Оба белка относятся к суперсемейству антенных белков. Белок LhcSR имеет пространственную структуру, схожую со структурой минорной антенны ФСII (CP29) или мономеров комплекса ЛНСII (включающую три трансмембранных альфа-спиральных столба), и, подобно им, также связывает молекулы Хл и Кс (7 молекул Хл *a* и одну дополнительную молекулу Хл *a* или *b* и 3 или 4 молекулы Кс, включая лютеин и виолаксантин) [8]. Существуют различные представления о том, каким образом LhcSR или близкие к нему белки ЛНСХ вызывают тушение электронного возбуждения Хл в антенне: за счёт переноса возбуждения с Хл на Кс с последующей быстрой конверсией K_s^* в Кс, за счёт переноса электрона с Кс на Хл или же за счёт образования экситонного сопряжения между молекулами Хл и Кс [9, 10], однако в любом из этих случаев предполагается, что именно LhcSR является центром тушения.

Некоторое время аналогичный механизм тушения предполагался и для PsbS [11, 12]. Однако появившиеся в 2000-х гг. данные о биохимических свойствах PsbS [13], а также по мутагенезу PsbS [14], а затем и данные о трёхмерной структуре этого белка [15] показали, что он не содержит молекул пигментов. В отличие от LhcSR и антенных белков, PsbS имеет дополнительную (четвёртую) трансмембранную спираль и более компактную структуру, которая не оставляет достаточно пространства для связывания Хл и Кс [15]. В связи с этим высказываются различные гипотезы о возможном механизме участия PsbS в тушении возбуждения в антенне, предполагающие его взаимодействие (непосредственное или с участием молекул Кс) с белками внешней и внутренней антенн и переключение самих этих антенн в «тушащее» состояние. Это переключение сопряжено с кластеризацией внешних антенных комплексов ФСII, ЛНСII [16] и, возможно, связано с изменением взаимодействия ЛНСII с их липидным окружением и, как результат, их подвижности в тилакоидной мембране [17].

Однако независимо от молекулярных механизмов, которыми обеспечивается LhcSR- и PsbS-зависимое тушение, полагают, что каждый из этих белков служит детектором pH в тилакоидном люмене и, следовательно, обеспечивает энергозависимый компонент НФТ (qE). А именно: закисление люмена приводит к протонированию экспонированных в люмен аминокислотных остатков и образованию центра тушения в самом белке или же в контактирующих с ним антенных комплексах. Более того, оба белка оказываются аналогами друг друга в эволюционной перспективе. Так, LhcSR (или близкие к нему ЛНСХ-подобные белки) выполняет фотопротекторную функцию у зелёных (включая Chlorophyta и Charophyta), бурых, диатомовых, гаптофитовых и других групп водорослей [18, 19], а также мхов (насколько нам известно, в литературе упоминается лишь главный модельный объект из этой группы – *Physcomitrella patens* [20]). Он исчезает у сосудистых растений, у которых его функции выполняет белок PsbS. У мхов также обнаруживается PsbS, где он работает вместе с LhcSR [20]. Так, для *P. patens* показано, что в стресс-индуцированном НФТ участвуют оба белка, хотя основной вклад в фотозащиту даёт LhcSR [21], особенно при флуктуирующем освещении [22], что связано, скорее всего, не с различием в эффективности LhcSR и PsbS, а с малым содержанием последнего [23]. Для харовых водорослей было показано, что световой стресс вызывает рост экспрессии гена,

кодирующего PsbS. У зелёных водорослей ген, кодирующий PsbS, был обнаружен в геноме, но детектировать белок или обнаружить его дифференциальную экспрессию в каких-либо условиях долгое время не удавалось, из чего делали вывод об отсутствии функциональной активности белка у этой группы фотосинтетических организмов [24, 25]. Позже условия, стимулирующие рост уровня мРНК PsbS в клетке, были найдены для клеток модельной зелёной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*: азотное голодание [26] и фотопериод (переход от темноты к освещению) [27]. Лишь несколько лет назад сам белок PsbS и стресс-индуцированные изменения его содержания были обнаружены в клетках водоросли *C. reinhardtii* в ответ на значительное повышение освещённости [21, 28] или перенос из темноты на свет [29]. Однако этот ответ был очень кратковременным (порядка нескольких часов, хотя при низкой концентрации CO₂ в среде его удавалось продлить более чем на сутки [28]), в отличие от значительно более пролонгированного влияния стресса на экспрессию LhcSR. На этом основании был сделан вывод о вспомогательной функции PsbS для LhcSR-зависимого тушения [28].

В данной статье мы сообщаем об обнаружении у зелёной водоросли *Lobosphaera incisa* IPPAS C-2047, исследованной нами ранее [30], возрастания уровня экспрессии PsbS в ответ на спровоцированный низкой температурой световой стресс. При этом значительное возрастание (более чем на три порядка) сохранялось в течение четырёх суток после начала стресса, а менее значительное повышение уровня экспрессии PsbS (порядка десятикратного по сравнению с уровнем до начала стресса) сохранялось по крайней мере до 9 суток. Тем самым в настоящей работе мы впервые показываем продолжительное возрастание уровня экспрессии PsbS в клетках зелёных водорослей (Chlorophyta) в ответ на стресс. Это может означать, что функция PsbS в фотосинтетическом аппарате Chlorophyta не сводится к роли «первого эшелона» защиты в переходных состояниях, как предполагали ранее, а включает полноценное участие в защите фотосинтетического аппарата от стрессовых условий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Условия культивирования микроводорослей и отбор проб. Суспензионную культуру зелёной водоросли *L. incisa* IPPAS C-2047 (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) выращивали в фотобио-

реакторе в 0,7-литровой стеклянной колонне (внутренний диаметр 45 мм) при температуре 25–26 °С, постоянном барботировании отфильтрованным атмосферным воздухом (0,4 л/мин) и непрерывном освещении (50 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹) светодиодными панелями, оснащёнными нейтральными белыми светодиодами SMD 2835 («Arlight», Россия). По достижении оптической плотности OD₆₇₈ = 0,4–0,5 производили отбор проб культуры для проведения физиологического и биохимического анализов, затем культуру охлаждали до 0 °С со скоростью 0,4–0,8 °С/мин. Инкубацию при температуре около 0 °С продолжали в течение следующих 9 суток. Для термостатирования культуры использовали охлаждающую циркуляционную баню-термостат, оснащённую контроллером температуры STC-1000 («Elitech», Великобритания) и сопряжённую с культивационной колонной с помощью тонкого (не мешающего освещению культуры) змеевика, погружённого в суспензионную культуру.

В ходе инкубации проводили отбор проб через 16 ч, 2, 4 и 9 суток после охлаждения культуры. Сразу после отбора каждой пробы её подвергали центрифугированию при 0 °С для осаждения клеток; в полученный осадок добавляли нетоксичный водный фиксатор, предназначенный для быстрой стабилизации клеточной РНК – IntactRNA («Евроген», Россия), в количестве 8 : 1 по отношению к объёму осадка. Полученную суспензию перемешивали, инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч, затем 24 ч в холодильнике, после чего повторно центрифугировали и замораживали полученный осадок при –80 °С.

Выделение РНК и количественная ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Выделение суммарной РНК из клеток, синтез одноцепочечной кДНК, подбор праймеров и ПЦР-РВ выполнены в соответствии с протоколом, детально описанным нами ранее [30] (с использованием того же оборудования и реактивов), а также в Приложении к настоящей работе. Последовательности праймеров приведены в таблице. Предсказанные размеры продуктов ПЦР составляли: для кДНК белка PsbS – 146 п.н., LhcSR – 121 п.н., Act – 77 п.н., Ubi – 147 п.н., размеры участка геномной ДНК между праймерами – 400 п.н., 372 п.н., 301 п.н. и 441 п.н. соответственно. Эффективность всех используемых праймеров составляла не менее 80%.

Постановка ПЦР включала 35 циклов с температурным профилем 95 °С (10 с, плавление), 58 °С (15 с, отжиг праймеров), 72 °С (15 с, элонгация) и 81 °С (15 с, измерение репортёрной флуоресценции). Графики амплификации

Последовательности праймеров для целевых (*PsbS*, *LhcSR*) и референсных (*Act*, *Ubi*) генов

Ген	Праймеры	
	прямой	обратный
<i>PsbS</i>	CACCTTCAGCGAGTCCAAC	ACAGCTCGTTCCTTCTGGTG
<i>LhcSR</i>	CTGGTGTTCGCCATCGG	GGTCAAAGCCCAGGTTACC
<i>Act</i>	CCATCTATGAGGGCTATGCG	CATGTAGTCGGTCAGGTCG
<i>Ubi</i>	CTACCTGAACATCAAGTCCCTG	TTTTCCCTTCGCACCTCC

приведены на рис. П.1 Приложения. Специфичность ПЦР была подтверждена с использованием электрофореза продуктов ПЦР, который показал наличие в продуктах лишь предсказанных транскриптов (рис. П2 и П3 Приложения). В качестве референсных генов (эндогенного контроля) были выбраны гены актина (*Act*) и убиквитинлигазы (*Ubi*). Содержание специфических транскриптов рассчитывали относительно полусуммы уровней транскриптов *Act* и *Ubi* в той же культуре до начала низкотемпературной акклимации.

Измерения фотохимической активности фотосинтетического аппарата выполняли непосредственно сразу после отбора проб с помощью импульсно-модулированного хлорофилл-флуориметра Fluor Pen FP 100 («Photon Systems Instruments», Чехия). Суспензию помещали в кварцевую кювету и адаптировали к темноте в течение 10 мин при 0 или 25 °С (для опытных и контрольных образцов соответственно), после чего производили запись световой кривой квантового выхода фотохимической активности ФСII (Φ_{FSII}).

Измерения фотосинтетического выделения кислорода были выполнены с помощью системы измерения уровня респирации и фотосинтеза образцов в жидкой фазе Chlorolab 3 («Hansatech Instruments», Великобритания), использующей электрод Кларка, и термостатируемую 20-мл камеру для суспензии с магнитной мешалкой. Освещение суспензии осуществлялось красным светом (максимум длины волны 660 нм, ширина спектра на полувысоте около 15 нм) с помощью светодиодного светильника.

Статистическая обработка данных. Измерения содержания транскриптов целевых и референсных генов выполнены с трёхкратной биологической повторностью и с трёхкратной аналитической повторностью, измерения фотосинтетического выделения кислорода и фотохимической активности ФСII – с четы-

рёхкратной биологической и трёхкратной аналитической повторностью. Результаты представляют среднее значение (M) \pm стандартное отклонение (SD). Для результатов количественной ПЦР усреднение проводили сначала по аналитическим, затем по биологическим повторностям. SD оценивали по разбросу биологических повторностей, т.к. он существенно превосходил разброс между аналитическими повторностями. Для остальных данных SD оценивали по разбросу всех повторностей. Достоверность отличия изменений уровня экспрессии от единицы оценивали на основе доверительных интервалов для математического ожидания нормальной выборки с уровнем доверия $p = 99\%$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

После охлаждения суспензии до 0 °С мы наблюдали рост экспрессии генов обоих защитных белков ФСА, *PsbS* и *LhcSR*. К моменту первого измерения, через 16 ч после охлаждения, экспрессия достигала наибольшего уровня, наблюдавшегося за всё время низкотемпературной инкубации клеток. В случае белка *PsbS* этот уровень поднимался по сравнению с уровнем до воздействия низкой температуры более чем на три порядка (рис. 1, а). В течение первых двух суток изменение уровня экспрессии было незначительным, а к концу четвёртых суток падало в 3–5 раз. К концу девятых суток инкубации уровень экспрессии снижался уже значительно (в 200–300 раз по сравнению с максимальным уровнем), однако всё ещё оставался примерно в 7–10 раз выше, чем до начала стресса.

В случае белка *LhcSR* изменения были менее значительными. Через 16 ч воздействия низкой температуры уровень экспрессии его гена возрастал приблизительно в 10 раз, после чего медленно снижался: примерно в два раза

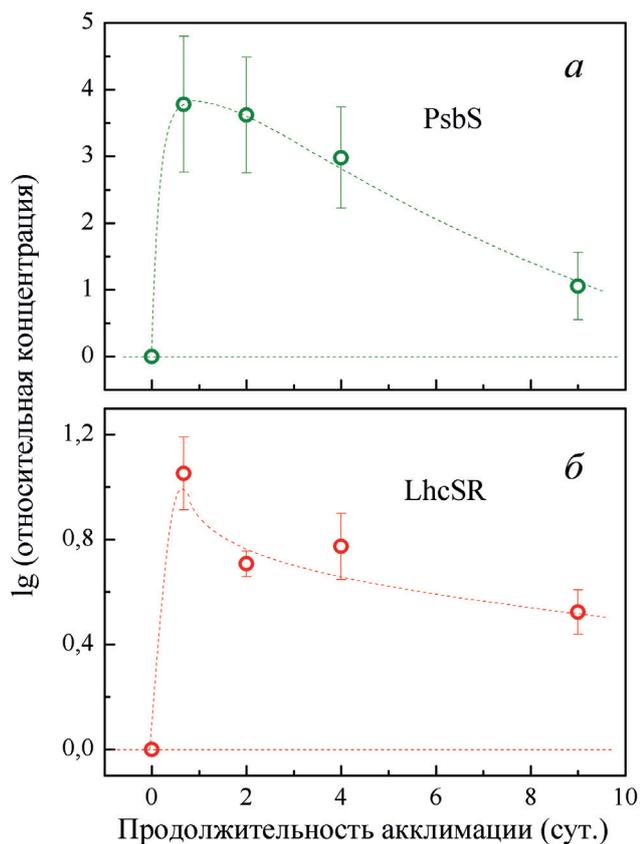


Рис. 1. Кинетика изменений уровня экспрессии генов белков PsbS (а) и LhcSR (б) в клетках *L. incisa* IPPAS С-2047 в результате акклимации к температуре 0 °С (приведён десятичный логарифм относительного изменения уровня транскрипта, RQ). Приведены средние значения \pm SD ($n = 3$). Уровень экспрессии обоих генов в ходе всего времени акклимации клеток к низкой температуре достоверно отличается от их начального уровня экспрессии ($t = 0$ на графике) с уровнем доверия $p = 99\%$

к концу вторых суток и ещё в 1,5–1,8 раза через 9 дней после начала низкотемпературной инкубации (рис. 1, б).

Приведённые данные выявляют совершенно иной характер участия PsbS в ответе на стресс у зелёных водорослей (Chlorophyta), чем это предполагалось ранее. Так, ранее ответ, связанный с дифференциальной экспрессией и накоплением PsbS в клетках другой зелёной водоросли, *C. reinhardtii*, наблюдался лишь в течение короткого времени (порядка нескольких часов) после начала воздействия на клетку стрессовых условий. Так, при переносе культуры *C. reinhardtii* с 45 на 400, 800 или 1200 мкмоль фотонов $m^{-2} s^{-1}$ концентрация мРНК PsbS возрастала в течение менее чем 30 мин, далее спадая практически до нуля в течение 14 ч. При этом динамика изменений концентрации самого белка несколько отставала от мРНК: содержание PsbS возрастало до максимума за 4–8 ч, а через 32 ч белок прак-

тически не детектировался [21]. При периодической смене периодов темноты и освещения (интенсивностью 200 мкмоль фотонов $m^{-2} s^{-1}$), моделирующей суточные колебания освещённости, уровень экспрессии гена PsbS возрастал на время около 1 ч после начала освещения и сохранялся сколь-либо заметным в течение 2–3 ч [29]. Изменения уровня экспрессии гена PsbS в течение суток в естественных условиях были также недавно обнаружены у многоклеточной зелёной водоросли *Ulva prolifera*; наблюдаемые колебания содержания мРНК (приблизительно 10-кратные) были сходными для PsbS и LhcSR как по динамике, так и по величине; вероятно, они отражали суточные колебания освещённости и температуры [31]. Интересно, что у *C. reinhardtii* более плавное (в течение 2 ч) нарастание интенсивности света или снижение её максимальной величины (до 60 мкмоль фотонов $m^{-2} s^{-1}$) приводило к снижению концентрации мРНК, но не к изменению характерного времени её исчезновения после достижения максимума. Содержание самого белка (PsbS) также достигало максимума в течение первого часа и ещё сохранялось сколь-либо заметным через 3 ч после начала освещения. Световой стресс (резкое повышение интенсивности света с 30 до 480 мкмоль фотонов $m^{-2} s^{-1}$) на фоне низкой (ниже атмосферной) концентрации CO_2 позволял продлить присутствие PsbS в клетке до 48 ч, хотя и при концентрациях много меньших, чем в максимуме (6–10 ч), в то время как при атмосферной концентрации CO_2 через 24 ч его уже не удавалось детектировать [28]. У двойного мутанта *prq4lhcsr1*, лишённого обеих форм защитного белка LhcSR, LhcSR1 и LhcSR3, падение концентрации PsbS было ещё более замедленным. Однако о сопутствующих изменениях содержания мРНК в этой работе не сообщается [28].

В связи с этим у PsbS в клетках зелёных водорослей предполагалась лишь вспомогательная [28] фотопротекторная функция в переходные периоды (в начале стресса) [6]. Такой характер индукции синтеза PsbS существенно отличал этот белок от его функционального аналога, белка LhcSR. Для последнего наблюдался значительно более длительный период стресс-индуцированного возрастания экспрессии и практически постоянное [29] или, по крайней мере, значительно более длительное присутствие в повышенных концентрациях в течение действия стрессовых условий [21, 28, 29]. В наших экспериментах мы также отмечали повышенную экспрессию LhcSR в течение всего времени воздействия стрессовых условий. Но при этом

одновременно наблюдали значительно более длительное повышение концентрации мРНК PsbS в ходе индукции стресса, продолжающееся (хотя и со значительным снижением по сравнению с пиковыми значениями) до 9 суток. Однако даже период пиковых значений был растянут в исследованном нами случае на 2–4 суток. По-видимому, это говорит о том, что роль PsbS у зелёных водорослей в ответе их ФСА на стрессовые условия может быть значительно более существенной, чем это ожидалось ранее, и не ограничиваться лишь ролью «первого эшелона» защиты.

При этом стоит заметить, что сама индукция синтеза и накопления PsbS в клетках зелёных водорослей ранее была показана лишь для единственного модельного объекта из этой группы (отдел Chlorophyta), *C. reinhardtii*, поэтому вопрос о распространённости PsbS-зависимого механизма защиты ФСА среди зелёных водорослей до сих пор остаётся неясным. Приводимые здесь данные позволяют думать, что этот механизм не является уникальным для *C. reinhardtii* и может быть достаточно широко распространён среди представителей отдела Chlorophyta.

Полученные нами данные говорят о возрастании уровня экспрессии гена белка PsbS. В то же время для многих белков увеличение экспрессии гена слабо коррелирует с накоплением кодируемого им белка [32]. Однако в случае PsbS *C. reinhardtii* было показано, что содержание белка следует за изменением экспрессии гена [29]. Поэтому можно ожидать, что и у *L. incisa* наблюдаемая нами динамика изменений уровня экспрессии гена белка PsbS отражает характер изменений концентрации белка.

Обнаруженное нами длительное возрастание содержания мРНК, кодирующей белок PsbS, и, как мы предполагаем, также самого белка может быть связано с особенностями физиологии и экологии фотосинтеза исследуемого штамма *L. incisa* IPPAS C-2047. Однако нельзя исключить, что оно обусловлено в первую очередь иным характером стресса, который испытывали клетки водоросли в нашем исследовании по сравнению с обсуждавшимися выше исследованиями на *C. reinhardtii* [21, 28, 29]. PsbS-зависимое нефотохимическое тушение является защитной реакцией ФСА на избыток световой энергии, то есть компонентом светового стресса. В настоящей работе для индукции светового стресса у клеток *L. incisa* мы не использовали непосредственное увеличение интенсивности освещения, как это делается в большинстве работ, исследующих световой стресс у фотосинтезирующих организмов. Вместо этого индуцировали световой стресс понижением температуры на фоне достаточно низкой освещённости (50 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$), которая существенно ниже значений освещённости, насыщающих фотосинтез или вызывающих фотоповреждение у большинства изученных групп зелёных водорослей [33]. Разумеется, мы не можем отождествлять это воздействие на водоросли и их реакцию на него с реакцией на возрастание интенсивности света. Тем не менее мы можем утверждать, что понижение температуры в наших условиях вызывает световой стресс, о чём свидетельствуют наши данные о существенном снижении насыщающей интенсивности света (рис. 2, а). В то время как при нормальной температуре инкубации (25 °С)

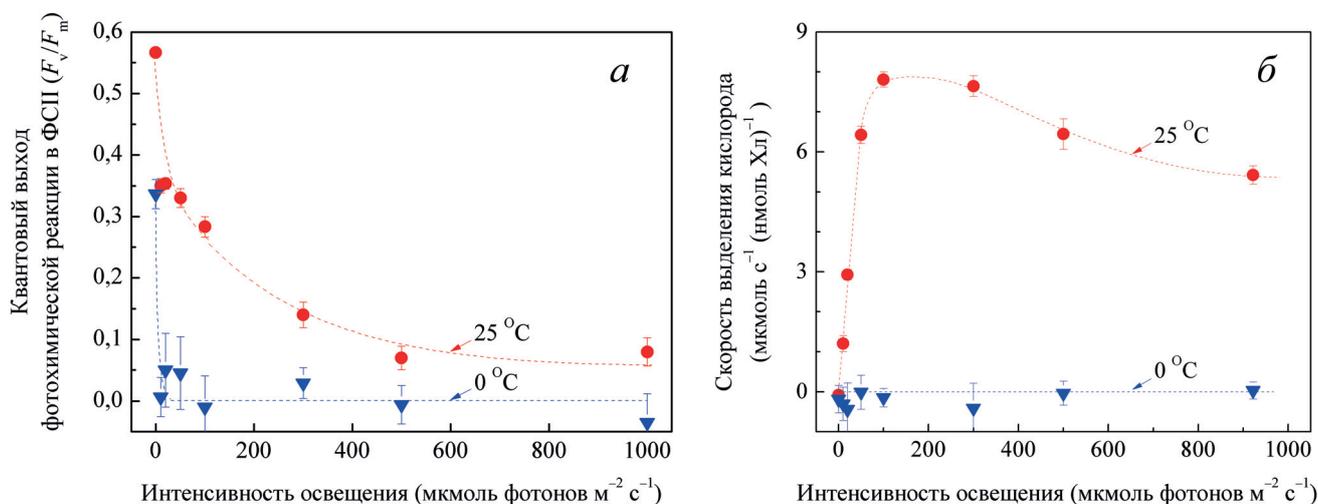


Рис. 2. Зависимость Φ_{PSII} (а) и скорости фотосинтетического выделения кислорода (б) суспензией клеток *L. incisa* IPPAS C-2047, инкубируемой при температуре 25 °С (круги) и 0 °С (треугольники) в течение 4 суток, от интенсивности освещения. Приведены средние значения \pm SD ($n = 4$)

суспензии *L. incisa* снижение Φ_{PSII} в два раза происходит при интенсивности света около 100 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$, у культуры, инкубируемой при 0 °С в течение 4 суток, уже свет интенсивности 10 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ вызывает снижение Φ_{PSII} как минимум в 6–8 раз. В результате скорость фотосинтетического выделения кислорода падает практически до нуля во всём диапазоне исследованных значений освещённости (рис. 2, б). К сожалению, точность наших измерений не позволила надёжно установить степень отличия от нуля скорости выделения кислорода в этих условиях и определить точное значение полунасыщающей интенсивности света; можно лишь утверждать, что она ниже 10 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$.

Световой стресс развивается в клетках *L. incisa* достаточно быстро: так, уже в течение нескольких часов после начала охлаждения Φ_{PSII} при той освещённости, при которой инкубируется суспензионная культура (50 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$), падает приблизительно в 3 раза, хотя некоторое падение продолжается и в последующие несколько дней (рис. 3). Таким образом, на фоне холодового стресса мы ранее наблюдали развитие признаков светового стресса, таких как снижение активности ФСII и рост тепловой диссипации энергии поглощённого света в фотосинтетической антенне [30]. Однако при этом не наблюдали изменения общего содержания хлорофилла в клетках, изменения количества антенных комплексов в расчёте на реакционный центр, а также изменения содержания и состава каротиноидов. Отсутствие изменений этих характеристик, которые также являются маркерами светового стресса, мы ранее объяснили относительной «мягкостью» условий, при которых наиболее «экономной» стратегией адаптации, по-видимому, оказывается индукция LhcSR-зависимого НФТ [30]. Теперь мы видим, что, наряду с LhcSR, в индукции НФТ может участвовать и его эволюционно более поздний аналог – белок PsbS. Поскольку на протяжении как минимум 4–5 суток этот ответ остаётся основным [30], то можно предположить, что одновременно возрастает необходимость продления периода повышенной экспрессии белка. Подчеркнём, однако, что наблюдаемый нами долговременный рост содержания транскриптов гена PsbS хотя и является важным указанием на роль этого белка в обеспечении защиты ФСА от избыточного освещения при пониженной температуре, но ещё не служит доказательством этой роли. Чтобы доказать её и оценить вклад PsbS в суммарную фотопротекторную реакцию ФСА, необходимы до-

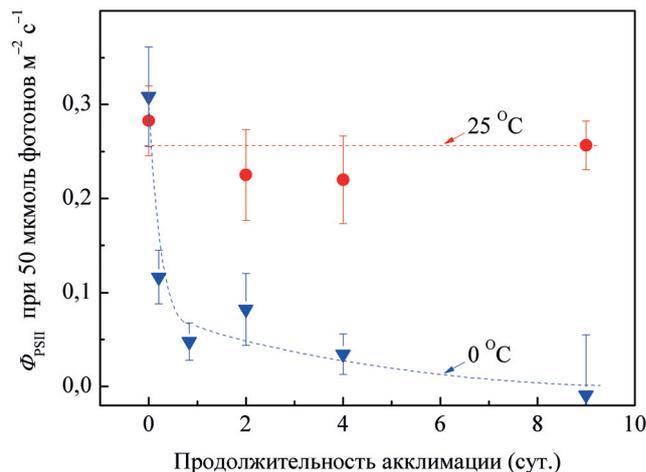


Рис. 3. Кинетика изменений Φ_{PSII} *L. incisa* IPPAS C-2047 при интенсивности освещения 50 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$. Показаны изменения для суспензии клеток, инкубируемой при температуре 25 °С (круги) и 0 °С (треугольники) в течение 9 суток. Приведены средние значения \pm SD (n = 4)

полнительные исследования с привлечением мутантов, лишённых одного или нескольких других фотопротекторных механизмов.

Это предположение позволяет сформулировать следующую гипотезу: экспрессия гена PsbS в клетках зелёных водорослей (или, во всяком случае, в *L. incisa*) будет снижаться в условиях, когда будут активно включаться другие механизмы защиты ФСА от избыточного освещения (в том числе связанные с накоплением и изменением состава каротиноидов, снижением содержания Хл и изменением стехиометрии компонентов фотосинтетической электрон-транспортной цепи). Иными словами, мы можем ожидать отрицательную корреляцию между экспрессией PsbS и активностью других защитных механизмов при одном и том же количестве полезной поглощённой световой энергии (потраченной на активацию фотосинтетического транспорта электронов) в расчёте на единицу биомассы водоросли. Проверка данной гипотезы должна стать целью последующих работ в этой области.

Вклад авторов. Проведение экспериментов по ПЦР-РВ – О.К., Е.В., Е.Г., В.П.; получение, ведение культуры микроводорослей и контроль её состояния – К.Ш., Г.Б., А.С., Е.Л.; обработка результатов – О.П., В.П.; концепция и руководство работой, написание текста – В.П.; обсуждение результатов исследования – все авторы.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00323).

Благодарности. Спектрофотометрические измерения были выполнены с использованием оборудования ЦКП «Фенотипирование фототрофных организмов» МГУ имени М.В. Ломоносова научной школы МГУ «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология». Авторы благодарны Р.А. Зиновкину и М.Д. Логачевой за советы и помощь с обеспечением реактивами и оборудованием.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Demmig-Adams, B., Cohu, C. M., Muller, O., and Adams III, W. W. (2012) Modulation of photosynthetic energy conversion efficiency in nature: from seconds to seasons, *Photosynth. Res.*, **113**, 75-88, doi: 10.1007/s11120-012-9761-6.
- Müller, P., Li, X.-P., and Niyogi, K. K. (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy, *Plant Physiol.*, **125**, 1558-1566, doi: 10.1104/pp.125.4.1558.
- Demmig-Adams, B. (1990) Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin, *Biochim. Biophys. Acta*, **1020**, 1-24, doi: [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(90\)90088-L](https://doi.org/10.1016/0005-2728(90)90088-L).
- García-Plazaola, J. I., Esteban, R., Fernández-Marín, B., Kranner, I., and Porcar-Castell, A. (2012) Thermal energy dissipation and xanthophyll cycles beyond the Arabidopsis model, *Photosynth. Res.*, **113**, 89-103, doi: 10.1007/s11120-012-9760-7.
- Peers, G., Truong, T. B., Ostendorf, E., Busch, A., Elrad, D., Grossman, A. R., Hippler, M., and Niyogi, K. K. (2009) An ancient light-harvesting protein is critical for the regulation of algal photosynthesis, *Nature*, **462**, 518-521, doi: 10.1038/nature08587.
- Pinnola, A. (2019) The rise and fall of Light-Harvesting Complex Stress-Related proteins as photoprotection agents during evolution, *J. Exp. Bot.*, **70**, 5527-5535, doi: 10.1093/jxb/erz317.
- Li, X.-P., Müller-Moulé, P., Gilmore, A. M., and Niyogi, K. K. (2002) PsbS-dependent enhancement of feedback de-excitation protects photosystem II from photoinhibition, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 15222-15227, doi: 10.1073/pnas.232447699.
- Guarnetti Prandi, I., Sláma, V., Pecorilla, C., Cupellini, L., and Mennucci, B. (2022) Structure of the stress-related LHCSR1 complex determined by an integrated computational strategy, *Commun. Biol.*, **5**, 1-10, doi: 10.1038/s42003-022-03083-8.
- Pinnola, A., Staleva-Musto, H., Capaldi, S., Ballottari, M., Bassi, R., and Polívka, T. (2016) Electron transfer between carotenoid and chlorophyll contributes to quenching in the LHCSR1 protein from *Physcomitrella patens*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1857**, 1870-1878, doi: 10.1016/j.bbabi.2016.09.001.
- Park, S., Steen, C. J., Lyska, D., Fischer, A. L., Endelman, B., Iwai, M., Niyogi, K. K., and Fleming, G. R. (2019) Chlorophyll-carotenoid excitation energy transfer and charge transfer in *Nannochloropsis oceanica* for the regulation of photosynthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 3385-3390, doi: 10.1073/pnas.1819011116.
- Li, X.-P., Björkman, O., Shih, C., Grossman, A. R., Rosenquist, M., Jansson, S., and Niyogi, K. K. (2000) A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting, *Nature*, **403**, 391-395, doi: 10.1038/35000131.
- Aspinall-O'Dea, M., Wentworth, M., Pascal, A., Robert, B., Ruban, A. V., and Horton, P. (2002) The PsbS subunit of photosystem II binds zeaxanthin and activates it for non-photochemical fluorescence quenching, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 16331-16335, doi: 10.1073/pnas.252500999.
- Dominici, P., Caffarri, S., Armenante, F., Ceoldo, S., Crimi, M., and Bassi, R. (2002) Biochemical properties of the PsbS subunit of photosystem II either purified from chloroplast or recombinant, *J. Biol. Chem.*, **277**, 22750-22758, doi: 10.1074/jbc.M200604200.
- Bonente, G., Howes, B. D., Caffarri, S., Smulevich, G., and Bassi, R. (2008) Interactions between the photosystem II subunit PsbS and xanthophylls studied in vivo and in vitro, *J. Biol. Chem.*, **283**, 8434-8445, doi: 10.1074/jbc.M708291200.
- Fan, M., Li, M., Liu, Z., Cao, P., Pan, X., Zhang, H., Zhao, X., Zhang, J., and Chang, W. (2015) Crystal structures of the PsbS protein essential for photoprotection in plants, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **22**, 729-735, doi: 10.1038/nsmb.3068.
- Ruban, A. V., and Wilson, S. (2021) The mechanism of non-photochemical quenching in plants: localization and driving forces, *Plant Cell Physiol.*, **62**, 1063-1072, doi: 10.1093/pcp/pcaa155.
- Daskalakis, V., Papadatos, S., and Kleinekathoefer, U. (2019) Fine tuning of the photosystem II major antenna mobility within the thylakoid membrane of higher plants, *Biochim. Biophys. Acta*, **1861**, 183059, doi: 10.1016/j.bbamem.2019.183059.

18. Niyogi, K. K., and Truong, T. B. (2013) Evolution of flexible non-photochemical quenching mechanisms that regulate light harvesting in oxygenic photosynthesis, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **16**, 307-314, doi: 10.1016/j.pbi.2013.03.011.
19. Giovagnetti, V., and Ruban, A. V. (2018) The evolution of the photoprotective antenna proteins in oxygenic photosynthetic eukaryotes, *Biochem. Soc. Trans.*, **46**, 1263-1277, doi: 10.1042/BST20170304.
20. Alboresi, A., Gerotto, C., Giacometti, G. M., Bassi, R., and Morosinotto, T. (2010) Physcomitrella patens mutants affected on heat dissipation clarify the evolution of photoprotection mechanisms upon land colonization, *Proc. Natl. Acad. of Sci. USA*, **107**, 11128-11133, doi: 10.1073/pnas.1002873107.
21. Tibiletti, T., Auroy, P., Peltier, G., and Caffarri, S. (2016) Chlamydomonas reinhardtii PsbS protein is functional and accumulates rapidly and transiently under high light, *Plant Physiol.*, **171**, 2717-2730, doi: 10.1104/pp.16.00572.
22. Gao, S., Pinnola, A., Zhou, L., Zheng, Z., Li, Z., Bassi, R., and Wang, G. (2022) Light-harvesting complex stress-related proteins play crucial roles in the acclimation of physcomitrella patens under fluctuating light conditions, *Photosynth. Res.*, **151**, 1-10, doi: 10.1007/s11120-021-00874-8.
23. Gerotto, C., Alboresi, A., Giacometti, G. M., Bassi, R., and Morosinotto, T. (2012) Coexistence of plant and algal energy dissipation mechanisms in the moss Physcomitrella patens, *New Phytologist*, **196**, 763-773, doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04345.x.
24. Anwaruzzaman, M., Chin, B. L., Li, X.-P., Lohr, M., Martinez, D. A., and Niyogi, K. K. (2004) Genomic analysis of mutants affecting xanthophyll biosynthesis and regulation of photosynthetic light harvesting in Chlamydomonas reinhardtii, *Photosynth. Res.*, **82**, 265-276, doi: 10.1007/s11120-004-2439-y.
25. Bonente, G., Passarini, F., Cazzaniga, S., Mancone, C., Buia, M. C., Tripodi, M., Bassi, R., and Caffarri, S. (2008) The occurrence of the psbS gene product in Chlamydomonas reinhardtii and in other photosynthetic organisms and its correlation with energy quenching, *Photochem. Photobiol.*, **84**, 1359-1370, doi: 10.1111/j.1751-1097.2008.00456.x.
26. Miller, R., Wu, G., Deshpande, R. R., Vieler, A., Gärtner, K., Li, X., Moellering, E. R., Zäuner, S., Cornish, A. J., Liu, B., Bullard, B., Sears, B. B., Kuo, M.-H., Hegg, E. L., Shachar-Hill, Y., Shiu, S.-H., and Benning, C. (2010) Changes in transcript abundance in Chlamydomonas reinhardtii following nitrogen deprivation predict diversion of metabolism, *Plant Physiol.*, **154**, 1737-1752, doi: 10.1104/pp.110.165159.
27. Zones, J. M., Blaby, I. K., Merchant, S. S., and Umen, J. G. (2015) High-resolution profiling of a synchronized diurnal transcriptome from Chlamydomonas reinhardtii reveals continuous cell and metabolic differentiation, *Plant Cell*, **27**, 2743-2769, doi: 10.1105/tpc.15.00498.
28. Correa-Galvis, V., Redekop, P., Guan, K., Griess, A., Truong, T. B., Wakao, S., Niyogi, K. K., and Jahns, P. (2016) Photosystem II subunit PsbS is involved in the induction of LHCSR protein-dependent energy dissipation in Chlamydomonas reinhardtii, *J. Biol. Chem.*, **291**, 17478-17487, doi: 10.1074/jbc.M116.737312.
29. Strenkert, D., Schmollinger, S., Gallaher, S. D., Salomé, P. A., Purvine, S. O., Nicora, C. D., Mettler-Altmann, T., Soubeyrand, E., Weber, A. P. M., Lipton, M. S., Basset, G. J., and Merchant, S. S. (2019) Multiomics resolution of molecular events during a day in the life of Chlamydomonas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 2374-2383, doi: 10.1073/pnas.1815238116.
30. Птушенко В. В., Бондаренко Г. Н., Виноградова Е. Н., Глаголева Е. С., Карпова О. В., Птушенко О. С., Соловченко А. Е., Трубицин Б. В., Чивкунова О. Б., Шибзухова К. А., Щербаков П. Н. (2021) Действие низких положительных температур на фотосинтетический аппарат микроводоросли Lobosphaera incisa IPPAS C-2047, *Биохимия*, **86**, 1853-1864, doi: 10.31857/S0320972521120095.
31. Zhao, X., Tang, X., Hu, S., Zhong, Y., Qu, T., and Wang, Y. (2019) Photosynthetic response of floating Ulva prolifera to diurnal changes of in-situ environments on the sea surface, *J. Oceanol. Limnol.*, **37**, 589-599, doi: 10.1007/s00343-019-8081-5.
32. Maier, T., Güell, M., and Serrano, L. (2009) Correlation of mRNA and protein in complex biological samples, *FEBS Lett.*, **583**, 3966-3973, doi: 10.1016/j.febslet.2009.10.036.
33. Richardson, K., Beardall, J., and Raven, J. A. (1983) Adaptation of unicellular algae to irradiance: an analysis of strategies, *New Phytologist*, **93**, 157-191, doi: 10.1111/j.1469-8137.1983.tb03422.x.

**CHILLING UPREGULATES EXPRESSION OF THE PsbS AND LhcSR GENES
IN THE CHLOROPLASTS OF THE GREEN MICROALGA
Lobosphaera incisa IPPAS C-2047**

V. V. Ptushenko^{1,2*}, G. N. Bondarenko³, E. N. Vinogradova^{4,5}, E. S. Glagoleva^{1,4}, O. V. Karpova⁴,
O. S. Ptushenko^{1,4}, K. A. Shibzukhova^{1,4}, A. E. Solovchenko^{4,6}, and E. S. Lobakova⁴

¹ *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia*

² *Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia*

³ *Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

⁴ *Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

⁵ *National Research Center "Kurchatov Institute", 123182 Moscow Russia*

⁶ *Pskov State University, 128000 Pskov, Russia*

Non-photochemical quenching (NPQ) of excited chlorophyll states is essential for protecting the photosynthetic apparatus (PSA) from the excessive light-induced damage in all groups of oxygenic photosynthetic organisms. The key component of the NPQ mechanism in green algae and some other groups of algae and mosses is the LhcSR protein of the light harvesting complex (LHC) protein superfamily. In vascular plants, LhcSR is replaced by PsbS, another member of the LHC superfamily and a subunit of photosystem II (PSII). PsbS also performs the photoprotective function in mosses. For a long time, PsbS had been believed to be nonfunctional in green algae, although the corresponding gene was discovered in the genome of these organisms. The first evidence of the PsbS accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii* in response to the increase in irradiance was obtained only six years ago. However, the observed increase in the PsbS content was short-termed (on an hour-timescale). Here, we report a significant (more than three orders of magnitude) and prolonged (four days) upregulation of PsbS expression in response to the chilling-induced high-light stress followed by a less significant (~ tenfold) increase in the PsbS expression for nine days. This is the first evidence for the long-term upregulation of the PsbS expression in green alga (Chlorophyta) in response to stress. Our data indicate that the role of PsbS in the PSA of Chlorophyta is not limited to the first-line defense against stress, as it was previously assumed, but includes full-scale participation in the photoprotection of PSA from the environmental stress factors.

Keywords: thermal dissipation of light energy, PsbS, LhcSR, high-light stress, chilling acclimation, Chlorophyta



ОЛОВНИКОВ АЛЕКСЕЙ МАТВЕЕВИЧ
(10.10.1936–06.12.2022)

DOI: 10.31857/S0320972522120247, EDN: NJCYZD

А.М. Оловников известен всему мировому научному сообществу как автор теломерной теории старения, выдвинутой в начале 70-х годов и получившей всемирное признание и блестящее экспериментальное подтверждение. Он является лауреатом Демидовской премии, одной из самых престижных и почетных научных наград России. Несмотря на признание теломерной теории на клеточном уровне, Алексей Матвеевич видел, что теория не находит подтверждения на организменном уровне, и нашел смелость отказаться от укорочения теломер как единственного объяснения развития и старения. Он продолжал работать над этой проблемой буквально до последних дней и успел отправить в печать теоретическую работу, объясняющую весь цикл онтогенеза.

А.М. Оловников был очень талантливым ученым-теоретиком с удивительным даром научного предвидения и абсолютно незаурядным подходом к различным проблемам геронтологии, эволюции, молекулярной биологии. Будучи скромным и интеллигентным, он мог резко критиковать конъюнктурные работы. Алексей Матвеевич был Настоящим Ученым, бесконечно преданным своей науке, для которого не важны звания, регалии, почести и карьера. Таким мы запоемнм Алексея Матвеевича. Таким он навсегда останется в наших сердцах.

Светлая Вам память, дорогой Алексей Матвеевич!

*Редакция и редколлегия
журнала «Биохимия»*

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

1. Общие положения

1.1. Ежемесячный международный журнал «Биохимия»/Biochemistry (Moscow), учредителем которого является Российская академия наук, издается и распространяется одновременно на русском и английском языках.

1.2. Журнал «Биохимия» публикует работы по всем разделам биохимии, а также концептуально важные работы по биохимическим аспектам смежных областей (молекулярной биологии, биофизики, биоорганической химии, микробиологии, иммунологии, физиологии, нейробиологии, геронтологии, биомедицинских наук и др.), направленные на понимание молекулярных и клеточных основ биологических процессов. В журнале печатаются описания новых экспериментальных методик в области биохимии, теоретических достижений, имеющих значение для биохимии, а также обзоры современных биохимических тем исследования и мини-обзоры. Журнал не рассматривает чисто феноменологические работы, которые описывают изменения биохимических параметров или маркеров биологических процессов без связи с механизмами, вызвавшими эти изменения или являющимися следствием таких изменений, а также работы по клонированию и экспрессии (в том числе в трансгенных животных и растениях) индивидуальных генов и материалы по анализу геномных полиморфизмов.

1.3. К публикации принимаются законченные оригинальные работы, содержащие новые экспериментальные результаты; методические работы, включающие описание новых методов биохимических исследований; материалы теоретического характера с изложением новых принципов, подходов для решения тех или иных биохимических задач. Не принимаются статьи с результатами, новизна которых заключается только в том, что изучаемый хорошо известный объект получен из другого источника.

Раздел «Краткие сообщения» публикует короткие экспериментальные статьи заявочного, приоритетного характера, требующие скорейшей публикации. В сопроводительном письме в редакцию авторам следует мотивировать необходимость ускоренного прохождения материала. Срок публикации таких сообщений 1–2 месяца.

Журнал печатает заказанные редколлегией (или предлагаемые авторами и одобренные редколлегией) обзоры по наиболее актуальным проблемам биохимии и смежных наук. К обзорным статьям предъявляются следующие требования: 1) у авторов должны быть свои работы по теме обзора; 2) список цитированной литературы должен включать работы, опубликованные по данной теме в течение последних 5 лет; 3) обзор не должен быть пересказом и, подчас, дословным цитированием кусков ранее опубликованных работ, в нем должен быть критический разбор цитируемых материалов и своя концепция, свое видение проблемы, побудившее авторов написать данный обзор. Редакция и рецензенты строго следят за плагиатом.

Раздел «Дискуссии» предоставляет авторам возможность опубликовать комментарии, критические замечания и иные соображения по поводу напечатанных ранее на страницах журнала работ, выступить с новой гипотезой. Раздел носит полемический характер и печатает ответные реплики затронутых в публикациях сторон.

1.4. Журнал индексируется и включен в библиографические базы данных Web of Sciences, Biochemistry and Biophysics Citation Index, Biological Abstracts, BIOSIS Database, Chemical Abstracts, Chemical Titles, Current Contents/Life Science, Excerpta Medica, Index Internacional de Cardiologia, Index Medicus (MEDLINE/Pubmed), International Abstracts of Biological Sciences, The ISI Alerting Service, Science Citation Index, Science Citation Index Expanded, SCOPUS, Compendx; РИНЦ. Журнал включен в Перечень рецензируемых научных изданий ВАК.

1.5. Правила для авторов и информацию о журнале можно найти на сайтах журнала

<https://biochemistrymoscow.com>,
<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>,
а также на порталах издательств Pleiades
<https://pleiades.online/ru/journal/biochmsc/>
и Springer
<https://link.springer.com/journal/10541>.

На сайте журнала на английском языке представлены содержания всех выпусков, начиная с 1996 г., с резюме статей, ключевыми словами и адресами авторов, а также в полном объеме – тематические выпуски журнала, посвященные наиболее актуальным проблемам биохимии.

1.6. Импакт-фактор Biochemistry (Moscow) в 2021 г. составил 2.824, импакт-фактор РИНЦ для «Биохимии» – 2.908. По данным Scopus журнал находится во 2-й квартили (Q2) среди журналов медико-биологического профиля.

1.7. Для увеличения охвата читательской аудитории и повышения цитируемости своей работы вы можете опубликовать статью в Biochemistry (Moscow) в режиме открытого доступа (Open Access). Всю информацию о публикации статьи в свободном доступе можно найти на сайте издательства:

<http://pleiades.online/ru/authors/openaccess/>
или обратившись в редакцию.

2. Порядок подачи рукописей

2.1. Редакция принимает на рассмотрение рукописи, присланные по электронной почте в форме присоединенных файлов (attachment) на адреса редакции:

editorial@biochemistrymoscow.com
ozrina@bio.chem.msu.ru,

а также поданные через Авторский портал издательства:

<https://publish.sciencejournals.ru>.

2.2. Материал статьи – текст, включая резюме на русском и английском языках, список литературы, рисунки с подписями и таблицы – оформляется одним файлом; каждый рисунок дополнительно оформляется отдельным файлом. Если пересылаемый материал велик по объему, следует использовать программы для архивирования.

Все страницы рукописи, в том числе содержащие список литературы, таблицы и подписи к ним, следует пронумеровать; строки также следует последовательно пронумеровать.

На отдельной странице прилагаются сведения об авторах с указанием адресов, контактных телефонов, факса и электронной почты, а также указывается автор, ответственный за переписку с редакцией и работу с корректурой.

2.3. Одновременно с русским желателен представить аутентичный английский вариант рукописи.

2.4. При подаче рукописи авторам следует прислать в редакцию сопроводительное письмо, в котором надо указать, что: 1) представленный материал (или его части) не был ранее нигде опубликован и не находится на рассмотрении на предмет публикации в других изданиях; 2) авторы ознакомились с этическими нормами, предписанными международными соглашениями о публикациях научных статей, и соблюдают их; 3) авторами представлена ин-

формация о потенциальных конфликтах интересов; 4) авторы ознакомились с правилами проведения исследований с участием человека и/или животных и соблюдают их; 5) каждый соавтор сообщает о своем согласии на авторство в статье (см. соответствующие Положения на сайтах журнала и на порталах Springer и Pleiades).

3. Требования к оформлению рукописей

3.1. Текст статьи должен быть изложен по возможности сжато и тщательно отредактирован, но без ущерба для ее понимания и воспроизведения результатов.

3.2. Рукопись должна быть построена следующим образом: 1) индекс УДК; 2) заглавие; 3) инициалы и фамилии авторов; 4) полные названия учреждений, индекс, город и электронная почта (аффилиация); 5) резюме на русском языке; 6) ключевые слова; 7) краткое заглавие статьи (колонтитул); 8) текст статьи, включающий список цитированной литературы, таблицы, подписи к рисункам; 9) резюме на английском языке (с переводом названия статьи, фамилий авторов, аффилиации и ключевых слов).

Индекс УДК (уникальной десятичной классификации) выделяется курсивом и ставится в верхнем левом углу первой страницы.

Заглавие должно быть максимально кратким, информативным и без сокращений.

Если авторы статьи являются сотрудниками разных учреждений, то учреждения следует пронумеровать и после каждой фамилии надстрочным знаком указать соответствующий номер; звездочкой справа от цифры необходимо отметить автора, ответственного за переписку с редакцией. Для каждого из авторов приводится полное название учреждения с индексом, городом и страной; для автора, ответственного за переписку, указывается также адрес электронной почты. Авторы, внесшие равный вклад в работу, обозначаются знаком решетки (#).

Резюме должно быть кратким (не более 250 слов), сжато и ясно описывающим основные конкретные результаты работы и вытекающие из них выводы.

Ключевых слов – не более 15.

При использовании нестандартных сокращений должен быть добавлен раздел Принятые сокращения.

Текст экспериментальной статьи следует разбить на разделы: 1) Введение, 2) Материалы и методы, 3) Результаты исследования,

4) Обсуждение результатов (объединенный раздел «Результаты и их обсуждение» допускается в тех случаях, когда обсуждение невелико по объему), 5) Заключение, 6) Список литературы, 7) Резюме на английском языке.

Во введении кратко излагается история вопроса с обязательным рассмотрением работ, в которых аналогичные или близкие исследования уже проводились, и формулируется цель исследования.

Основное требование к изложению методов исследования состоит в том, чтобы процедуры были описаны максимально кратко, но по описанию можно было воспроизвести эксперименты; сюда же должны быть включены использованные в работе материалы, реактивы и приборы с указанием фирмы и страны-производителя, например: глицерин («Sigma-Aldrich», США), электронный микроскоп JEM 100C («JEOL», Япония). Только новые методы следует детально описывать; на ранее опубликованные и общеизвестные достаточно сослаться в списке литературы, указав автора и/или название метода (например, концентрацию белка определяли по методу Бредфорда [7]). Если метод известен не слишком широко, желательно изложить его принцип и указать автора. Не допускаются ссылки на методы по типу «нуклеазу измеряли методом [7]» или «по [7]» (ссылка не может быть самостоятельным членом предложения).

Результаты исследования обычно представлены рисунками и таблицами; те эксперименты, которые не нуждаются в документации, описываются в тексте. В этом разделе не следует приводить обсуждение результатов, можно ограничиться объяснением причинно-следственных связей между описываемыми экспериментами.

Раздел «Обсуждение результатов» должен содержать интерпретацию результатов (но не их повторение) и сравнение с ранее опубликованными результатами. Желательно основные результаты иллюстрировать простой и наглядной схемой.

В случае необходимости рукопись завершается заключением, которое отделяется от раздела «Обсуждение результатов» отбивкой.

В связи с участием журнала в международном Комитете по этике публикаций (Committee on Publication Ethics – COPE) авторам следует внести в конце статьи несколько фраз, демонстрирующих приверженность международным этическим стандартам. Ниже приведены образцы представления соответствующих разделов в заключительной части статьи.

1) Следует описать вклад каждого из авторов в работу и подготовку рукописи (раздел

«Вклад авторов»). Например: А.Б. Иванов и В.Г. Петров – концепция и руководство работой; Д.Е. Сидоров и З.И. Дроздов – проведение экспериментов; А.Б. Семенов и В.Г. Петров – обсуждение результатов исследования; С.И. Холодов и В.Г. Антонов – написание текста; А.Б. Иванов, В.Г. Петров, А.Б. Семенов – редактирование текста статьи.

2) Если работа выполнена при поддержке какой-либо организации, в разделе «Финансирование» следует указать, каким фондом и грантом поддержано данное исследование и каждая часть работы в отдельности, если источники финансирования разные. Следует приводить полные названия институтов и организаций-спонсоров.

3) В разделе «Благодарности» по желанию авторов сообщается информация о любой помощи в проведении работы и подготовке статьи: о полезных обсуждениях и дискуссиях, благодарности коллегам; о предоставлении материалов, научных данных, компьютерного оборудования, приборов; о проведении исследований в центрах коллективного пользования; о помощи в технической подготовке текста.

4) В разделе «Конфликт интересов» авторы заявляют о наличии или отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере. Данный раздел является обязательным.

5) Обязательным является также раздел «Соблюдение этических норм». Если исследования проводились на животных, то в данном разделе указывается: «Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам учреждения, в котором проводились исследования, и утвержденным правовым актам РФ и международных организаций». Если исследования проводились с участием людей, то в разделе «Соблюдение этических норм» указывается: «Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие». Если в статьях не содержится описания исследований с участием людей или использованием животных и выполненных кем-либо из авторов, в разделе «Соблюдение этических норм» указывается: «Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов».

б) Если статья содержит персональную информацию об участниках исследования, то необходимо включить следующее положение в раздел «Информированное согласие»: «От всех участников, чья персональная информация содержится в этой статье, получено дополнительное письменное добровольное согласие».

Список цитируемой литературы должен быть максимально кратким (не более 150 ссылок), но содержащим ссылки на все принципиально важные последние публикации по данному вопросу. В журнале принята последовательная нумерационная система цитирования, т.е. по ходу изложения указывается порядковый номер процитированного источника (в квадратных скобках), соответствующий номеру в Списке литературы. Авторам следует очень внимательно проверить последовательность нумерации ссылок в тексте и соответствие номера каждой ссылки в тексте и списке литературы. Не допускается включение в список литературы ссылок на веб-сайты, необходимо ссылаться на публикации авторов, предлагающих эти электронные ресурсы (программы/базы данных). Если такие публикации отсутствуют, ссылается в тексте так же, как на другие неопубликованные материалы (например, База данных структур бактериальных углеводов, <http://csdb.glycoscience.ru/bacterial>).

Ссылки на неопубликованные данные не допускаются. Можно сослаться на личное сообщение кого-либо, в таком случае необходимо указать инициалы и фамилию источника, а также место работы.

Следует избегать появления дублированных ссылок в списке литературы, а также ссылок на отозванные статьи.

Список литературы печатается как отдельный раздел рукописи с указанием фамилий и инициалов всех авторов, названия цитируемой статьи и выходных данных. Кроме этого, желательно дать doi статьи. Ниже приводятся примеры ссылок на журналы, книги, сборники, диссертации.

1. Beltrami, C., Besnier, M., Shantikumar, S., Shearn, A. I. U., Rajakaruna, C., et al. (2017) Human pericardial fluid contains exosomes enriched with cardiovascular-expressed microRNAs and promotes therapeutic angiogenesis, *Mol. Ther.*, **25**, 679-693, doi: 10.1016/j.ymthe.2016.12.022.
2. Tran, Q. M., Fong, C., Rothery, R. A., Maklashina, E., and Cecchini, G. (2012) Out of plane distortions of the heme *b* of *Escherichia coli* succinate dehydrogenase, *PLoS One*, **7**, e32641, doi: 10.1371/journal.pone.0032641.
3. Анисимов В. Н. (2008) *Молекулярные и физиологические механизмы старения*, Наука, СПб.
4. Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
5. Tanphaichitr, V. (2001) in *Handbook of Vitamins* (Rucker, R., and Suttie, J., eds) Marcell Dekker, N.Y., pp. 275-316.
6. Гендролис А. А., Серебрянников Н. В., Гандель В. Г. (1978) В кн. *Простагландины* (под ред. Ажгихина И.С.) Медицина, Москва, с. 332-347.
7. Гандельман О. А. (1992) *Кинетика и механизм биологического окисления люциферина светляков*. Дис. канд. хим. наук, МГУ, Москва.
8. Rosenkranz, A. A., Slastnikova, T. A., Durymanov, M. O., and Sobolev, A. S. (2013) Malignant melanoma and melanocortin 1 receptor, *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 1228-1237, doi: 10.1134/S0006297913110035.

Для авторов, использующих систему EndNote, редакция предоставляет стиль, который поддерживает форматирование цитат в тексте и список литературы. Стилевой файл можно найти на сайтах журнала

<https://biochemistrymoscow.com>,

<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>.

В конце статьи дается резюме на английском языке, являющееся аутентичным переводом заглавия статьи, инициалов и фамилий авторов в английской транскрипции, названий учреждений с индексами, названиями городов и адресами электронной почты, текста аннотации и ключевых слов.

3.3.1. Объем экспериментальной статьи, включая список литературы, таблицы, рисунки (3 рисунка считаются за 1 страницу) и подписи к ним, резюме на английском языке, не должен превышать 20 машинописных страниц, количество рисунков – не более 8; краткое сообщение – не более 12 страниц (включая не более 4 рисунков и/или таблиц); мини-обзор – не более 16 страниц (включая не более 5 рисунков); обзор – не более 35 страниц (включая не более 8 рисунков); сообщения в разделе «Дискуссии» – до 4 страниц.

3.3.2. Текстовые файлы следует представлять в формате Microsoft Word (версия 6.0 и более поздние), шрифты для основного текста – Times New Roman, размер букв 12, полтора интервала, в одну колонку без выравнивания по правому краю, без переноса слов, с полями 3 см с левой стороны, на странице – не более 30 строк.

Для оформления текста можно использовать курсив, полужирные начертания, подстрочные и надстрочные индексы, греческие и математические символы (шрифт Times New

Roman) в соответствии со стилевым оформлением журнала.

Стиль оформления текстового материала должен быть простым: без запрограммированных заголовков, вставок, шаблонов, ссылок на литературные источники (гиперссылки); без увеличения межстрочных и межбуквенных интервалов; без использования шаблонов – в окне «стиль» должно быть «обычный». Особенно это относится к «Списку литературы», т.к. запрограммированные порядковые номера при переносе в издательскую программу исчезают.

Авторы не должны использовать такие функции программы Word, как «Закладка», «Примечание», «Сноска», «Концевая сноска», потому что они неправильно интерпретируются издательской программой. Если в тексте встречается сноска (или концевая сноска), то сразу после предложения или абзаца с ее номером, следует набрать «{Footnote}», т.е. «{Сноска}», и далее непосредственно текст сноски.

Если при подготовке статьи была использована функция «Рецензирование», то перед сохранением файла нужно отменить функцию «Рецензирование» и затем использовать функцию «Принять все изменения в документе».

Таблицы следует приводить в тех случаях, когда данные не могут быть приведены в тексте. Каждая таблица оформляется на отдельной странице и имеет свой заголовок. Колонки в таблице должны быть озаглавлены, с указанием через запятую размерности приводимых величин. Необходимо стремиться к максимальной краткости заголовков колонок, не давать величин, легко выводимых из имеющихся (например, разность или проценты). Повторение одних и тех же данных в тексте, в таблицах или на рисунках не допускается. Таблицы принимаются только в формате Word (doc, docx). Если таблицы содержат графические вставки, эти вставки следует прислать в виде отдельных графических файлов высокого качества.

3.3.4. Рисунки с подрисуночными подписями следует располагать в тексте по месту ссылки на каждый рисунок. Кроме того, рисунки должны быть представлены в виде отдельных файлов, удовлетворяющих следующим требованиям:

– для схем и графиков без полутоновых вставок: файлы в формате tiff, jpg или pdf, в черно-белом режиме (Line-art, Black-and-White, Bitmap). Пикселизированные (растровые) рисунки принимаются только в форматах tiff или jpg;

– для полутоновых рисунков или графиков с полутоновыми вставками: файлы в формате tiff, jpg или pdf, в полутоновом черно-белом режиме (градации серого – Grayscale). Пикселизированные (растровые) рисунки принимаются только в форматах tiff или jpg;

– для цветных рисунков: файлы в формате tiff, jpg или pdf, в цветном режиме CMYK (для цветной печати), RGB (для цветных рисунков в электронной версии). Пикселизированные (растровые) рисунки принимаются только в форматах tiff или jpg.

– независимо от типа графики, рисунок должен обладать высоким реальным разрешением: не ниже 300 dpi для полутоновых иллюстраций; не ниже 600 dpi для штриховых и смешанных (полутоновых/штриховых) иллюстраций. Пикселизация изображений в форматах растровой графики не должна быть грубой. Линии рисунков должны быть толщиной не менее 3 пунктов (point). Следует избегать чрезмерно мелких обозначений (букв, цифр, значков и т.д.). Пикселизированные (растровые) рисунки не следует вставлять в документ Word или переводить в формат pdf, так как это ухудшает их качество;

– рисунки должны иметь размеры, соответствующие их информативности. Размер рисунка на одну колонку не должен быть менее 8 см; на две колонки – менее 17 см. Рисунки не должны быть чрезмерно крупными;

– векторные иллюстрации не должны содержать точечных закрасок, таких как «Noise», «Black & White noise», «Top noise». Для векторной графики все использованные шрифты должны быть включены в файл;

– шрифты внутри рисунков выбираются из гарнитуры Arial размером 9 пунктов;

– следует избегать сканирования рисунков из книг и других печатных изданий.