

СОДЕРЖАНИЕ

Том 86, выпуск 12, 2021

ФЕНОПТОЗ

- Коэволюция мозга, культуры и продолжительности жизни: результаты компьютерного моделирования
А.В. Марков, М.А. Марков 1739
- Существуют ли доказательства в пользу субтеломерно-теломерной теории старения? (обзор)
G. Libertini, O. Shubernetskaya, G. Corbi, N. Ferrara 1766
- Альтруизм и феноптоз как программы, поддерживаемые эволюцией
Г.А. Шиловский, Т.С. Пуяткина, А.В. Марков 1782

РЕГУЛЯРНЫЕ СТАТЬИ

- Запрограммированные риски смерти у мужчин, больных сахарным диабетом
А.Г. Малыгин 1798
- Достижения и перспективы эпигенетических исследований древней ДНК (обзор)
К.В. Жур, В.А. Трифонов, Е.Б. Прохорчук 1808
- Генетическое свидетельство аутентичности локона волос, представленного как реликвия в музейном портрете цесаревича Алексея, сына последнего российского императора
Т.В. Андреева, А.Д. Манахов, С.С. Кунижева, Е.И. Погаев 1818
- Несостоявшееся интервью с Сиднеем Бреннером: превращение данных в знание, биоинформатика, Big Data и ... «Is Water H₂O?»
Л.Г. Кондратьева, М.В. Патрушев, Е.Д. Свердлов 1826
- Роль системы врождённого иммунитета и окислительного стресса в развитии сахарного диабета 1-типа. Пероксиредоксин 6 как новый антидиабетический препарат (обзор)
Е.Г. Новосёлова, О.В. Глушкова, М.О. Хренов, С.М. Лунин, Т.В. Новосёлова, С.Б. Парфенюк 1840
- Действие низких положительных температур на фотосинтетический аппарат микроводоросли *Lobosphaera incisa* IPPAS C-2047
В.В. Птушенко, Г.Н. Бондаренко, Е.Н. Виноградова, Е.С. Глаголева, О.В. Карпова, О.С. Птушенко, А.Е. Соловченко, Б.В. Трубицин, О.Б. Чивкунова, К.А. Шибзухова, П.Н. Щербаков 1853
- Биоэнергетика фиброза (обзор)
Э.И. Якупова, Д.Б. Зоров, Е.Ю. Плотников 1865
- Правила для авторов 1875

CONTENTS

Vol. 86, Publ. 12, 2021

PHENOPTOSIS

- Coevolution of the Brain, Culture, and Lifespan: Insights from Computer Simulations
Alexander V. Markov and Mikhail A. Markov 1739
- Is Evidence Supporting the Subtelomere–Telomere Theory of Aging? (Review)
Giacinto Libertini, Olga Shubernetskaya, Graziamaria Corbi, and Nicola Ferrara 1766
- Altruism and Phenoptosis as Programs Supported by Evolution
G. A. Shilovsky, T. S. Putyatina, and A. V. Markov 1782

REGULAR ARTICLES

- Programmed Risks of Death in Male Patients with Diabetes
A. G. Malygin 1798
- Achievements and Prospects for Epigenetic Studies of Ancient DNA (Review)
K. V. Zhur, V. A. Trifonov, and E. B. Prokhortchouk 1808
- Genetic Evidence of Authenticity of a Hair Shaft Relic from the Portrait of Tsesarevich Alexei,
Son of the Last Russian Emperor
T. V. Andreeva, A. D. Manakhov, S. S. Kunizheva, and E. I. Rogaev 1818
- Non-Happened Interview with Sydney Brenner: Transforming Data into Knowledge, Bioinformatics,
Big Data, and... “Is Water H₂O?”
L. G. Kondratyeva, M. V. Patrushev, and E. D. Sverdlov 1826
- The Role of Innate Immunity and Oxidative Stress in the Development of Type 1 Diabetes Mellitus.
Peroxiredoxin 6 as a New Anti-Diabetic Agent (Review)
*E. G. Novoselova, O. V. Glushkova, M. O. Khrenov, S. M. Lunin, T. V. Novoselova,
and S. B. Parfenuyk* 1840
- The Effect of Chilling on the Photosynthetic Apparatus of Microalga *Lobosphaera incisa* IPPAS C-2047
*V. V. Ptushenko, G. N. Bondarenko, E. N. Vinogradova, E. S. Glagoleva, O. V. Karpova,
O. S. Ptushenko, A. E. Solovchenko, B.V. Trubitsin, O. B. Chivkunova, K. A. Shibzukhova,
and P. N. Shcherbakov* 1853
- Bioenergetics of the Fibrosis (Review)
E. I. Yakupova, D. B. Zorov, and E. Y. Plotnikov 1865
- Instructions to Authors 1875

КОЭВОЛЮЦИЯ МОЗГА, КУЛЬТУРЫ И ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ: РЕЗУЛЬТАТЫ КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

© 2021 А.В. Марков^{1,2*}, М.А. Марков¹

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991 Москва, Россия; электронная почта: markov_a@inbox.ru

² Палеонтологический институт РАН имени А.А. Борисяка, 117997 Москва, Россия

Поступила в редакцию 22.10.2021

После доработки 04.11.2021

Принято к публикации 04.11.2021

Люди обладают рядом признаков, редких или отсутствующих у других приматов, включая большой размер мозга, культуру, язык, увеличенную продолжительность жизни (ПЖ) и длительный пострепродуктивный период жизни. В работе мы использовали компьютерную модель TribeSim, изначально разработанную для исследования автокаталитической совместной эволюции мозга и культуры у гоминин в рамках теории «культурного драйва», чтобы выяснить, как культура и мозг могут эволюционировать вместе с ПЖ (или скоростью старения). Мы показали, что в отсутствие культуры эволюция ПЖ зависит от интенсивности межгрупповой конкуренции (МГК): сильная МГК приводит к более короткой ПЖ. Культура, однако, способствует генетической эволюции большей ПЖ даже при сильной МГК. Увеличение ПЖ, в свою очередь, способствует культурному развитию, создавая тем самым положительную обратную связь. Культурная эволюция ПЖ (накопление знаний, способствующих или препятствующих выживанию) отличается от генетической эволюции того же признака, частично потому, что «мемы» (идеи, навыки и варианты поведения), снижающие риск смерти, имеют тенденцию накапливаться в пуле мемов, даже если они не приносят пользу генам. Следовательно, культурная эволюция старения имеет тенденцию приводить к большей ПЖ, чем генетическая эволюция того же признака. Если ПЖ эволюционирует как генетически, так и культурно, типичным результатом является общество, в котором молодые особи из-за своей генетической предрасположенности ведут более рискованный образ жизни в обмен на возможность получить дополнительные ресурсы, но с возрастом они накапливают полезные для выживания знания. Моделирование также показало, что культурная эволюция адаптивного поведения может способствовать генетической эволюции длительного пострепродуктивного периода жизни, например, если присутствие знающих долгожителей увеличивает конкурентоспособность группы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эволюция продолжительности жизни, старение, пострепродуктивный период, коэволюция генов и культуры, культурный драйв, быстрая коэволюция мозга и культуры.

DOI: 10.31857/S0320972521120010

ВВЕДЕНИЕ

Люди отличаются от других приматов во многих важных отношениях, включая большой размер мозга, кумулятивную культуру, обеспечиваемую языком или, в более широком смысле, улучшенными средствами социального обучения [1–3], увеличением продолжительности жизни (ПЖ) [4, 5] (вероятно, по причине «неотенического» замедления старения [6, 7]) и дли-

тельный пострепродуктивный период жизни, особенно ярко выраженный у женщин [8]. Как и почему эти признаки эволюционировали совместно в ходе антропогенеза, является предметом дискуссий [9–13]. В работе мы использовали компьютерное моделирование для изучения возможных моделей эволюционного взаимодействия между культурой, социальным обучением, размером мозга и ПЖ у социальных видов с высокой групповой сплоченностью, совместной добычей ресурсов, парными связями, высокими родительскими инвестициями в потомство и базовыми способностями к культурной передаче адаптивного поведения. Все эти признаки, вероятно, присутствовали у плейстоценовых видов *Homo* и их прямых предков [14–16].

Объем мозга увеличился в три раза за последние два миллиона лет эволюции *Homo*, не-

Принятые сокращения: МГК – межгрупповая конкуренция; ОП – объем памяти; ПЖ – продолжительность жизни; Сст – скорость старения; ЭО – эффективность охоты (полезный для группы поведенческий признак); ЭОб – эффективность обучения; ЭЭП – эффективность эгоистичного поступка (индивидуально полезный поведенческий признак); G – максимальный размер группы.

* Адресат для корреспонденции.

смотря на очевидно высокие затраты [17–22]. Этот эволюционный паттерн быстрого увеличения размеров мозга, по-видимому, количественно уникален среди приматов [23]. Эти факты подразумевают, что отбор на увеличение размеров мозга в ходе эволюции человека, вероятно, был обусловлен сильной положительной обратной связью, а не простыми экологическими факторами, такими как климат или доступность различных пищевых ресурсов (более подробное обсуждение см. в работе [13]). В текущем исследовании мы основываемся на одной из наиболее обоснованных теорий, предложенных для объяснения необычайно быстрого увеличения мозга у *Homo*: теории «культурного драйва» или «культурного мозга», предполагающей, что совместная эволюция мозга, социального обучения и культуры может быть самоподдерживающейся или автокаталитической [1, 12]. В самой простейшей форме механизм положительной обратной связи культурного драйва можно описать следующим образом: лучшее социальное обучение и познание → большее количество поведенческих инноваций закрепляется в качестве культурных традиций; более богатая культура → больше полезных навыков, которые можно перенять от сородичей; повышенная полезность способностей к социальному обучению → более сильный отбор на еще лучшее социальное обучение и познание. Увеличение размеров мозга является побочным эффектом этого отбора [11–13, 24–27].

В этом контексте возможно существование дополнительной петли положительной обратной связи через увеличение ПЖ (или замедление старения) [1, 11, 13, 28]. ПЖ (или скорость старения, Сст) может эволюционировать как генетически, так и культурно. В первом случае ожидается, что развитая культура будет способствовать отбору на более медленное старение, потому что у дольше живущих индивидов будет больше времени, чтобы учиться у своих товарищей по группе и обучать других (или служить образцом для подражания). Другими словами, индивиды, живущие дольше, извлекают больше выгоды из культуры и в то же время лучше накапливают и распространяют знания. Следовательно, ожидается, что генетическая эволюция большей ПЖ будет способствовать культурному развитию, что, в свою очередь, может способствовать отбору на увеличение ПЖ. Во втором случае (культурная эволюция ПЖ) возможна следующая петля обратной связи: развитая культура → повышенная выживаемость → большая ПЖ → лучшие предпосылки для передачи знаний от поколения к поколению → еще более прогрессивная культура → еще более высокий

уровень выживания и более сильный отбор на усиление социального обучения [12, 29, 30]. Есть основания полагать, что ПЖ человека увеличилась (а Сст уменьшилась) в ходе эволюции, и что это было связано как с генетическими изменениями, так и с развитием культуры [4, 6–7].

Этот гипотетический механизм положительной обратной связи в эволюции мозга, социального обучения и ПЖ согласуется с тем фактом, что существуют значительные положительные связи между долголетием, объемом мозга (как абсолютным, так и относительным), склонностью к социальному обучению и техническими инновациями у приматов [31–33] и китообразных [34]. Несмотря на то что в настоящее время большое внимание уделяется исследованиям эволюции параметров жизненного цикла в целом [35, 36], закономерности и последствия возможного коэволюционного взаимодействия между ПЖ и развитостью мозга, социальным обучением и культурой изучены недостаточно.

Для того чтобы исследовать эти закономерности, мы использовали компьютерную модель TribeSim, которая первоначально была разработана для имитации динамики коэволюции мозга и культуры у высокосоциальных видов. Подробное описание модели и ее сравнение с отдаленно похожей моделью «Культурный мозг» [12] было опубликовано ранее [13]. Моделирование подтвердило релевантность культурного драйва у социальных видов в социально-экологической ситуации, делающей возможным случайное изобретение нового полезного и требующего хороших когнитивных способностей поведения. Культурный драйв, скорее всего, будет запущен, если некоторые из культурно передаваемых видов поведения индивидуально полезны, в то время как другие полезны для группы. В этом случае культурный драйв возможен при различных уровнях межгрупповой конкуренции (МГК) и миграции. Моделирование также показало, что увеличение размера мозга может получить дополнительный импульс, если развивающиеся механизмы социального обучения являются дорогостоящими с точки зрения увеличения размера мозга (например, опираются на сложные нейронные цепи) и устойчивыми к сложности передаваемой информации, т.е. позволяют легко передавать непростые навыки и концепции. Человеческий язык, вероятно, подходит под это описание. Моделирование также подтвердило, что увеличение ПЖ может ускорить коэволюцию мозга и культуры [13]. Это согласуется с идеей о том, что петля положительной обратной связи через увеличение ПЖ может еще сильнее способствовать культурному развитию и увеличению размера

мозга. Тем не менее компьютерные симуляции не показали, может ли культурная эволюция (и при каких обстоятельствах) вносить вклад в эволюцию увеличения (или снижения) ПЖ. В настоящей работе мы использовали модифицированную версию TribeSim для изучения эволюции ПЖ и старения (определяемого здесь как увеличение уровня смертности с возрастом) в контексте быстрой совместной эволюции культуры и мозга.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

TRIBESIM: описание модели. Подробное описание было опубликовано ранее [13], поэтому здесь мы ограничимся кратким изложением основных принципов.

TribeSim – симуляционная модель с анализом на уровне индивида, предназначенная для имитации генетической и культурной эволюции в популяции высокосоциальных животных. Популяция состоит из конкурирующих социальных групп. Максимально возможный размер группы определяется параметром G ; по достижении этого предела группа разделяется на две половины. Члены группы предпринимают совместные усилия по извлечению ресурсов из окружающей среды, конкурируя с другими группами. Мы назвали это «коллективной охотой» [37], хотя в этом контексте можно рассматривать и другие виды сотрудничества, приносящие пользу группе. Ресурсы, приобретенные группой, распределяются затем между членами этой группы. Индивиды конкурируют друг с другом, чтобы увеличить свою долю. Таким образом, существует два уровня конкуренции за ресурсы: между группами и между отдельными особями, что похоже на модель «перетягивания каната», которая ранее использовалась для изучения влияния МГК на эволюцию внутригрупповой кооперации [38]. Результат конкуренции зависит от двух поведенческих признаков, которые могут развиваться генетически и (или) культурно: «эффективности охоты» (ЭО) и «эффективности эгоистичного поступка» [«макиавеллистского» поступка, поступка в духе Макиавелли, коварного, эгоистичного поступка, далее ЭЭП] [39, 40]. Оба признака зависят от культурно передаваемых навыков («мемов»), которые могут быть изобретены с нуля (с фиксированной низкой вероятностью) или приобретены у товарищей по группе через социальное обучение. Все индивиды рождаются с генетически детерминированными начальными значениями ЭО и ЭЭП (10 и 0 соответственно) и без мемов в памяти.

Более высокие значения ЭО приносят пользу группе (ЭО – «кооперативный признак»), потому что количество ресурсов, приобретаемых группой, пропорционально сумме индивидуальных ЭО всех членов группы, которые идут на охоту («охотничье усилие» группы). Чем выше охотничье усилие группы, тем меньше доля других групп. Это приводит к межгрупповой конкуренции, которая, предположительно, была довольно сильной у плейстоценовых гоминин [11]. Внутри групп ресурсы распределяются в соответствии с индивидуальными значениями ЭЭП. ЭЭП – это «эгоистичный признак»: высокая ЭЭП приносит пользу отдельному индивиду, но не группе.

Здесь мы вводим еще один фенотипический признак, Сст (скорость старения), который может развиваться генетически и/или культурно, и новую категорию мемов (мемы Сст). Сст-мемы влияют на возрастной риск смерти и могут как увеличивать, так и снижать выживаемость. Хотя Сст не оказывает прямого влияния на исход конкуренции за ресурсы, она может влиять на него косвенно (см. ниже).

В TribeSim отбор действует на трех уровнях:

1) Групповой отбор. МГК за ресурсы и избирательное выживание, рост и разделение групп приводят к групповому отбору, который способствует развитию кооперативных признаков [41, 42]. Мы можем регулировать интенсивность группового отбора, изменяя параметр G . Например, когда $G = 15$, есть много небольших конкурирующих групп, МГК очень интенсивна, а групповой отбор силен. Когда G превышает максимально возможный размер популяции (например, $G = 2000$), тогда вся популяция представляет собой единую группу, и групповой отбор не идет.

2) Индивидуальный отбор. Внутригрупповая конкуренция за ресурсы приводит к избирательному выживанию и размножению особей. Индивидуальный отбор способствует развитию «эгоистичных признаков», которые приносят пользу отдельному индивиду и могут быть вредными или нейтральными для группы. ЭЭП обычно нейтральна для группы, потому что усиленное размножение особей с более высокой ЭЭП компенсирует плохое воспроизводство особей с более низкой ЭЭП.

3) Отбор мемов. Мемы конкурируют за доминирование в индивидуальной памяти и в культуре группы (пул мемов). Отбор мемов отдает предпочтение мемам, которые распространяются быстрее (тем, которые легче выучить или которые требуют меньшего объема памяти для запоминания) [24]. Судьба мема также зависит от его влияния на индивидуальные и груп-

повые фенотипы. Некоторые категории мемов могут приобретать «вирусные свойства», если они помогают себе распространяться (т.е. если они делают своего носителя более эффективной машиной для распространения мемов). Обучающие (учительские) навыки — один из примеров таких мемов [13].

Особь диплоидные и размножаются половым путем. Пары формируются случайным образом в пределах групп (межгрупповая миграция представляет собой отдельный процесс); пара дает одного потомка, если у родителей достаточно ресурсов; оба родителя вкладываются в потомство; пары формируются каждый год заново.

Эволюционирующая часть генотипа включает гены, отвечающие за объем памяти (ОП), эффективность обучения (ЭОб), ЭО, ЭЭП и Сст. Каждому гену можно присвоить постоянное значение (в этом случае признак не может развиваться генетически) или разрешить мутировать и, следовательно, эволюционировать. Каждая копия гена имеет «значение», которое напрямую транслируется в фенотип: например, если начальное значение гена ОП равно 0, тогда все индивидуумы в популяции изначально имеют нулевую емкость памяти; гетерозиготный индивидуум с двумя копиями гена ОП со значениями 0 и 0,2 имеет ОП, равный 0,1.

Генотипические значения ОП и ЭОб связаны с объемом мозга: их рост приводит к увеличению размера мозга (по умолчанию объем мозга равен $20 + ОП + 30 \times ЭОб$). Это согласуется с эмпирическими корреляциями между объемом мозга и социальным обучением у приматов [32, 33], китообразных [34] и, предположительно, птиц [43]. Объем мозга — дорогостоящий признак, потому что количество ресурсов, необходимых для рождения ребенка, пропорционально объему мозга ребенка. Это согласуется с идеей, что родительские инвестиции значительно увеличиваются в ходе эволюции гоминин наряду с энергетическими и когнитивными потребностями быстрорастущего детского мозга [18, 44].

Мемы хранятся в памяти и влияют на фенотипические признаки ЭО, ЭЭП и Сст. Мемы придумываются редко, их можно передать через социальное обучение и/или забыть. Каждый мем характеризуется своей категорией (ЭО, ЭЭП или Сст), размером (величиной ОП, необходимого для хранения мема) и эффективностью (изменением фенотипического признака индивида, который знает мем). Размер и эффективность положительно коррелируют, но корреляция слаба [24]. Большие мемы могут быть изучены только особями с достаточным количеством свободного ОП; таким образом, размер мема ограничивает его распространение.

ЭОб влияет на вероятность успешной передачи мема независимо от его размера. Причины этого обсуждаются в [13]; предполагается, что ЭОб при таком моделировании помогает понять эволюцию языковых способностей.

Индивидуальный фенотип включает пять вариабельных признаков: ЭО (рассчитывается как сумма генотипического значения ЭО и эффективности всех известных индивиду мемов ЭО), ЭЭП (генотипическое значение ЭЭП плюс суммарная эффективность всех известных мемов ЭЭП), Сст (рассчитывается аналогично; эффективность мемов Сст может быть как положительной, так и отрицательной; это соответствует мемам, ухудшающим и повышающим выживаемость); ЭОб (определена генетически, ЭОб в целом аналогична точности социального обучения, которая, как полагают, важна для коэволюции мозга и культуры [1, 2, 12]; ОП (определен генетически).

Жизнь моделируемой популяции состоит из шагов (лет). Следующие события проходят каждый год:

1) Трата ресурсов на жизнеобеспечение. В новой версии TribeSim стоимость жизнеобеспечения зависит от Сст: нужно потратить дополнительные ресурсы, чтобы снизить риск смерти (например, сделав укрытие или одежду); в противном случае можно сэкономить немного ресурсов, ведя более рискованный образ жизни. Это автоматически приводит к классическому компромиссу между размножением и выживанием [45], потому что дополнительные ресурсы, сэкономленные подверженным риску индивидуумом, скорее всего, будут потрачены на размножение. Введение ресурсной «платы» за повышение выживаемости важно для целей настоящего исследования, потому что (i) в противном случае отбор всегда будет отдавать предпочтение наименьшей возможной Сст, и (ii) все ограничения в TribeSim (например, ограничения на рождаемость и увеличение размера мозга) определяются в основном ограниченностью ресурсов, поэтому логично, что повышенная выживаемость также должна быть ограничена ресурсами. Идея затрат ресурсов на повышение выживаемости ярко иллюстрируется историей трех поросят: два из них сэкономили свои ресурсы, построив дома из соломы и прутьев, но рисковали своими жизнями, а третий потратил много ресурсов на кирпичный дом, увеличивая тем самым свои шансы на выживание. Стоимость жизнеобеспечения в год составляет $40 \times (0,3 - Сст)^2 + 2$. Эта формула гарантирует, что по мере замедления старения дальнейшая эволюция в этом направлении становится все более дорогостоящей.

2) Спонтанное изобретение новых мемов. Индивид изобретает мем данной категории с фиксированной низкой вероятностью (0,0001 в год) независимо от количества разрешенных категорий мемов.

3) Самопроизвольное забывание мемов. Каждый индивид может забыть любой мем с вероятностью 0,01 в год.

4) Коллективная охота. Все особи, обладающие достаточными ресурсами, отправляются на охоту; стоимость действия – 2 ресурса.

5) Раздел ресурсов. Ресурсы, полученные группой, распределяются между всеми членами группы. Это согласуется с традиционным поведением некоторых охотников-собирателей [46], и даже шимпанзе часто делятся мясом после успешной охоты [47]. По умолчанию доли всех равны. Однако если есть индивиды с ЭЭП > 0, они выполняют «макиавеллистские трюки» [манипуляторские, коварные, эгоистичные поступки], чтобы претендовать на большую долю. Затем ресурсы распределяются согласно индивидуальным значениям ЭЭП.

6) Обучение. Каждый индивид случайным образом выбирает себе товарища по группе и пытается выучить имеющийся в его памяти мем. Мем выбирается случайным образом из мемов, известных потенциальному учителю, но не ученику. Если таких мемов нет, или размер выбранного мема превышает размер свободного ОП обучаемого, попытка не удалась. В противном случае вероятность успеха равна ЭОб ученика.

7) Смерть. В новой версии TribeSim мы используем закон Гомпертца в его простейшей форме: вероятность смерти в течение текущего года равна $\text{НУС} \times \exp(\text{Сст} \times (\text{возраст} - 1))$, где НУС (начальный уровень смертности) является константой (в данном исследовании $\text{НУС} = 0,008$); Сст – фенотипический признак, который может развиваться генетически и культурно; возраст – это возраст индивида в годах. Кроме того, индивид может умереть от голода, если он или она не имеет достаточно ресурсов для жизнеобеспечения в течение двух лет подряд (один голодный год часто следует за рождением ребенка и не является смертельным).

8) Размножение. Каждый индивид старше шести лет пытается создать пару с другим членом группы и произвести на свет ребенка. Хотя возраст созревания имеет тенденцию зависеть от ПЖ [48, 49], в центре внимания настоящего исследования находится эволюция ПЖ; поэтому для простоты мы смоделировали фиксированный возраст созревания. Пары образуются только на один год (серийная моногамия). Если в группе нет свободных, еще не образовавших пару особей, попытка не удалась. После того как

пара сформирована, проверяется возможность рождения ребенка. Чтобы произвести на свет ребенка, родители должны потратить количество ресурсов, равное предполагаемому объему мозга ребенка, умноженному на два. Сорок процентов этих ресурсов передаются ребенку. Если у обоих родителей вместе не хватает ресурсов, попытка произвести на свет ребенка не удастся. После того как ребенок родился, при условии, что у родителей остались какие-то ресурсы, 40% из них также передаются ребенку, а оставшаяся часть распределяется поровну между родителями. Равенство родителей в TribeSim напоминает предполагаемое усиление отцовской заботы, снижение полового диморфизма и тенденцию к моногамии и кооперативному размножению у гоминин [14, 16, 50]. Для простоты смоделированные особи в TribeSim не имеют фиксированного пола; любые две особи могут образовать пару и произвести потомство.

9) Деление групп. Если группа превышает свой верхний предел G, она распадается на две равные группы.

10) Межгрупповая миграция. Индивид может покинуть свою группу и присоединиться к другой (случайно выбранной) группе с определенной вероятностью (0,001 в год по умолчанию).

Значения параметров (таблица) были выбраны произвольно на основе логики модели, а также опыта, полученного в результате предварительных прогонов модели (например, генетическое значение ЭО по умолчанию было установлено на 10, чтобы гарантировать, что популяция может выжить даже в отсутствие адаптивных знаний). Не было предпринято никаких попыток смоделировать какие-либо реальные виды приматов или получить количественно точные прогнозы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Генетическая эволюция скорости старения (Сст) и других адаптивных признаков (ЭО и ЭЭП). В первой серии симуляций мы отключили культуру (вероятность изобретения мема была установлена на ноль), чтобы исследовать взаимное влияние генетической эволюции Сст и других адаптивных признаков. Некоторые исследователи утверждают, что старение может развиваться как адаптация, направленная на повышение эволюционированности, т.е. на ускорение адаптивной эволюции других признаков [7, 51–54]. Один из гипотетических механизмов такого ускорения – более короткое время смены поколений. Мы задались вопросом, как быстро

Значения параметров по умолчанию

Параметр	Значение по умолчанию	Комментарии
Ресурсы окружающей среды, в год (R)	6000	максимальный объем ресурсов, который можно получить из окружающей среды в год; устанавливает ограничение на размер популяции. При параметрах по умолчанию размер популяции составляет ~ 700–800 особей
Частота мутаций гена, ответственного за объем памяти (ОП), среднее значение эффекта, StDev	0,04; 0; 0,4	ген ОП мутирует с вероятностью 0,04 при передаче от родителя к ребенку; к значению гена добавляется эффект мутации; если результирующее значение выходит за пределы допустимого диапазона (если ОП становится отрицательным), мутация отменяется и попытка повторяется
Скорость мутирования гена эффективности обучения (ЭОб), среднее значение эффекта, StDev	0,04; 0; 0,1	ЭОб варьирует от 0 (нулевой шанс узнать мем) до 1 (100%-ный успех)
Скорость мутирования гена скорости старения (Сст), среднее значение эффекта, StDev	0,04; 0; 0,002	при параметрах по умолчанию Сст обычно находится в диапазоне от 0 (старение отсутствует) до 0,25 (очень быстрое старение)
Частота мутаций гена эффективности охоты (ЭО), среднее значение эффекта, StDev	0,002; 0; 0,5	
Частота мутаций гена эффективности эгоистичного поступка (ЭЭП), среднее значение эффекта, StDev	0,002; 0; 0,1	
Основной объем мозга	20	минимально возможный объем мозга; объем мозга индивида равен 20, когда значения генов ОП и ЭОб являются равными нулю
Фактический объем мозга	$20 + ОП + 30 \times ЭОб$	мозг становится больше с увеличением способностей к социальному обучению
Мемы ЭЭП: среднее значение эффективности, StDev, C, R	1; 1,5; 1; 2	когда изобретен мем ЭЭП, его эффективность устанавливается равной нормально распределенному случайному значению (в случае отрицательного результата попытка повторяется); размер мема – это абсолютное значение эффективности мема, умноженное на C, плюс случайное число с нулевым средним и стандартным отклонением R
Мемы ЭО: среднее значение эффективности, StDev, C, R	4; 6; 0,25; 2	то же, что и предыдущий; эффективность не может быть отрицательной
Сст-мемы: среднее значение эффективности, StDev, C, R	0; 0,03; 5; 2	эффективность мемов Сст может быть как положительной (мемы, препятствующие выживанию), так и отрицательной (мемы, способствующие выживанию)
Вероятность забыть мем	0,01	индивид забывает каждый мем с вероятностью 0,01 в год
Стоимость охоты	2	за участие в охоте у индивида забирается 2 ресурса
Шанс миграции	0,001	вероятность перехода в другую группу (на индивида в год)
Исходное состояние: численность популяции, ресурсы на индивида	10, 20	моделирование начинается с 10 индивидов, каждый из которых обладает 20 ресурсами

будут развиваться ЭО и ЭЭП при фиксированной высокой ($Cст = 0,25$) или низкой ($Cст = 0,03$) скорости старения. В TribeSim индивиды и группы участвуют в бесконечной эво-

люционной гонке вооружений друг с другом. Группы всегда конкурируют с другими группами, тем самым способствуя эволюции ЭО путем группового отбора. Внутри групп индивиды

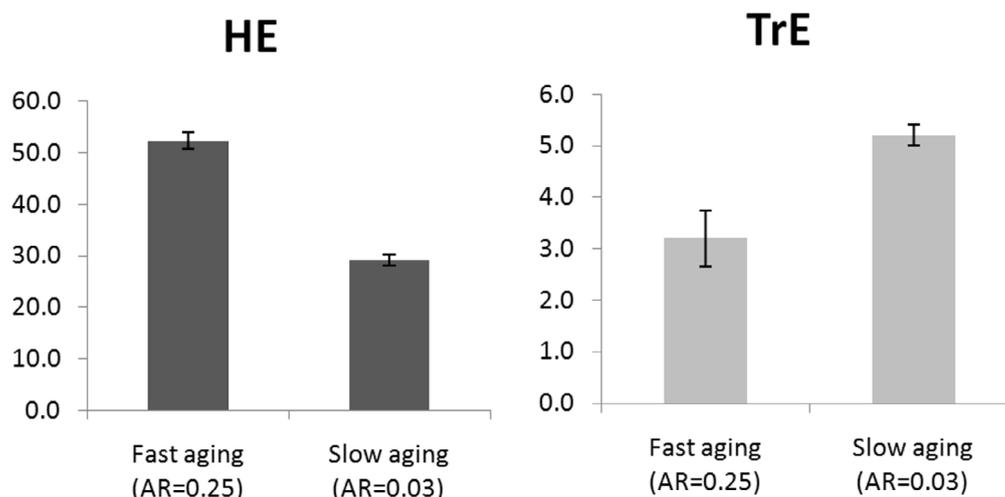


Рис. 1. Генетическая эволюция ЭО (HE) и ЭЭП (TrE) при быстром и медленном старении (AR – скорость старения, Cст) (малое и большое время смены поколений). Приведены средние значения признаков за годы 50 000–80 000 из трех прогонов модели (\pm стандартное отклонение). Диаграммы показывают, что ЭО развивается быстрее при быстром старении, а ЭЭП развивается быстрее при медленном старении. Параметры: генетическая эволюция – ЭО, ЭЭП; культура – нет; $G = 40$

всегда конкурируют со своими товарищами по группе, облегчая тем самым эволюцию ЭЭП посредством индивидуального отбора. Эта гонка никогда не прекращается, и поэтому высокая эволюционируемость явно выгодна эволюционирующим линиям, по крайней мере, в долгосрочной перспективе.

Будут ли ЭО и ЭЭП развиваться быстрее при быстром старении? В этом имитационном эксперименте мы использовали промежуточный уровень МГК ($G = 40$), который гарантирует, что как групповой, так и индивидуальный отбор достаточно эффективны. Результаты показаны на рис. 1.

Моделирование показало, что полезный для группы признак, ЭО, развивается быстрее при быстром старении, чем при медленном старении, как и ожидалось. При этом индивидуально полезный признак, ЭЭП, развивается быстрее, когда старение идет медленно. По-видимому, в этом случае замедляющий эволюцию эффект более медленной смены поколений перевешивается каким-то другим фактором. Природа этого фактора становится ясной, если мы рассмотрим, каким образом ЭЭП влияет на дарвиновскую приспособленность индивидов. Индивиды с более высокой ЭЭП получают большую долю ресурсов, приобретаемых группой, чем их товарищи по группе с более низкой ЭЭП. Это позволяет иметь больше потомства (сокращает интервалы между родами) и снижает риск голода. Первое преимущество одинаково важно и для долгожителей, и для короткоживущих особей, но второе более важно в сообществе долго-

жителей. При $Cст = 0,03$ средняя ПЖ составляет 38–40 лет при текущих параметрах; когда $Cст = 0,25$, средняя ПЖ составляет 12–13 лет. В первом случае конкуренция за ресурсы более острая, и процент смертей от голода выше (17–18% всех смертей); при $Cст = 0,25$ смертей от голода практически не происходит. Более того, в популяции долгожителей с наследственными вариациями ЭЭП наблюдается сильное ресурсное неравенство, что лишает особей с более низкой ЭЭП возможности размножения. Следовательно, в популяции долгожителей ЭЭП находится под более сильным отбором. Оказывается, это более мощная эволюционная сила, чем эффект более быстрой смены поколений. Такая ситуация приводит к более быстрой эволюции ЭЭП в популяции медленно стареющих индивидов.

Таким образом, мы видим, что ускорение старения может ускорить эволюцию некоторых, но не всех адаптивных признаков. Если положительное влияние признака на приспособленность увеличивается с ростом ПЖ, то этот признак может даже быстрее эволюционировать в популяции медленно стареющих индивидов.

Затем мы задались вопросом, может ли старение эволюционировать быстрее (или медленнее) вследствие того, что оно ускоряет развитие других адаптивных признаков. С этой целью мы смоделировали популяцию, в которой два признака ($Cст$ и ЭО или $Cст$ и ЭЭП) эволюционируют генетически, и сравнили ее с популяцией, в которой только $Cст$ эволюционирует генетически; культура отсутствует. Если более быстрое

(или более медленное) старение может эволюционировать специально для ускорения эволюции других признаков, то мы ожидали, что совместная эволюция Сст и ЭО приведет к ускоренному старению, в то время как совместная эволюция Сст и ЭЭП приведет к более медленному старению по сравнению с популяцией, в которой эволюционирует только Сст.

В этом эксперименте, а также в последующих мы использовали три различных уровня МГК: $G = 15$ (сильная МГК и групповой отбор, слабый индивидуальный отбор), $G = 40$ (умеренная МГК, групповой и индивидуальный отбор сопоставимой силы), $G = 2000$ (отсутствие МГК, отсутствие группового отбора, сильный индивидуальный отбор). Результаты моделирования показаны на рис. 2.

Диаграммы показывают, что совместная эволюция с другими признаками не оказывает существенного влияния на эволюцию Сст. Незначительные различия, видимые на диаграмме, не соответствуют вышеприведенным ожиданиям и могут быть объяснены другими факторами (небольшое количество прогонов модели и немного более низкая эффективность отбора по признаку, когда отбирается более одного признака). Таким образом, моделирование не подтвердило идею о том, что скорость старения может изменяться специально для того, чтобы ускорить эволюцию некоторых других адаптивных признаков.

Диаграммы также показывают, что более высокая МГК способствует более быстрому старению, а более низкая МГК способствует более медленному старению. Это связано с тем, что большая ПЖ очень полезна для отдельных индивидов, но не для групп (конкурентоспособность группы несильно зависит от того, насколько быстро сменяются поколения внутри группы). Когда МГК сильна, как индивидуальный, так и групповой отбор работают против чрезмерного потребления ресурсов, необходимых для повышения выживаемости, но когда МГК отсутствует, только индивидуальный отбор выполняет свою работу. С точки зрения «блага отдельного индивида» выгоды от долгой жизни перевешивают ущерб, причиненный затратами на ее продление, в то время как с точки зрения «блага группы» эти затраты не компенсируются. Следовательно, при преобладании группового отбора эволюционирует более быстрое старение, а при преобладании индивидуального отбора — более медленное старение.

Мы можем видеть, что ЭО (групповой полезный признак) эволюционирует лучше, когда МГК сильна ($G = 15$), как и ожидалось. В этом конкретном случае развитие ЭО также ускоря-

ется за счет более быстрого старения. Напротив, ЭЭП (индивидуально полезный признак) эволюционирует лучше в отсутствие МГК, когда индивидуальный отбор является самым сильным ($G = 2000$); медленное старение также способствует развитию ЭЭП.

Влияние эгоистичных и кооперативных культур на генетическую эволюцию старения. Культурные признаки отличаются от генетически детерминированных несколькими важными особенностями [55], две из которых имеют особое значение для текущего исследования. Во-первых, культурные признаки наследуются не только по вертикали (от родителей к детям), но и по горизонтали (от одного индивида к другому). Это означает, что размножение мемов не является неразрывно связанным с размножением генов. В результате мемы могут эволюционировать «эгоистично»: культурная эволюция может порождать признаки, которые снижают дарвиновскую приспособленность индивидов (т.е. ухудшают распространение их генов). Во-вторых, необходимо время, чтобы приобрести культурные признаки посредством социального обучения. Индивиды рождаются с нулевыми знаниями и могут учиться на протяжении всей своей жизни. Чем дольше они живут, тем больше знаний они могут получить и тем сильнее будет фенотипическое выражение культурно обусловленных признаков. Например, охотничье мастерство (ЭО) можно оттачивать в течение всей жизни, что делает пожилых индивидов в среднем более эффективными охотниками, чем молодые.

Нашей следующей задачей было понять, как культура (эгоистичная, кооперативная и комплексная) влияет на эволюцию Сст. Для простоты мы начали с моделирования не естественно эволюционирующей культуры (которая, согласно теории культурного драйва, эволюционирует вместе со способностью к социальному обучению), а стационарной, эволюционирующей только в заданных изначально пределах. Для этого мы установили фиксированные значения ОП = 5 (память, которая может вместить несколько больших мемов или несколько десятков маленьких) и ЭОб = 0,6 (при таком уровне эффективности обучения требуется около 10–20 лет, чтобы заполнить память мемами). Обе характеристики в этом эксперименте были «бесплатными», т.е. не влияли на объем мозга, который всегда был равен 20. С этими параметрами пул мемов популяции быстро (в течение первых сотен лет) заполняется достаточным количеством мемов, чтобы память индивидов не оставалась пустой. Результаты моделирования показаны на рис. 3, а.

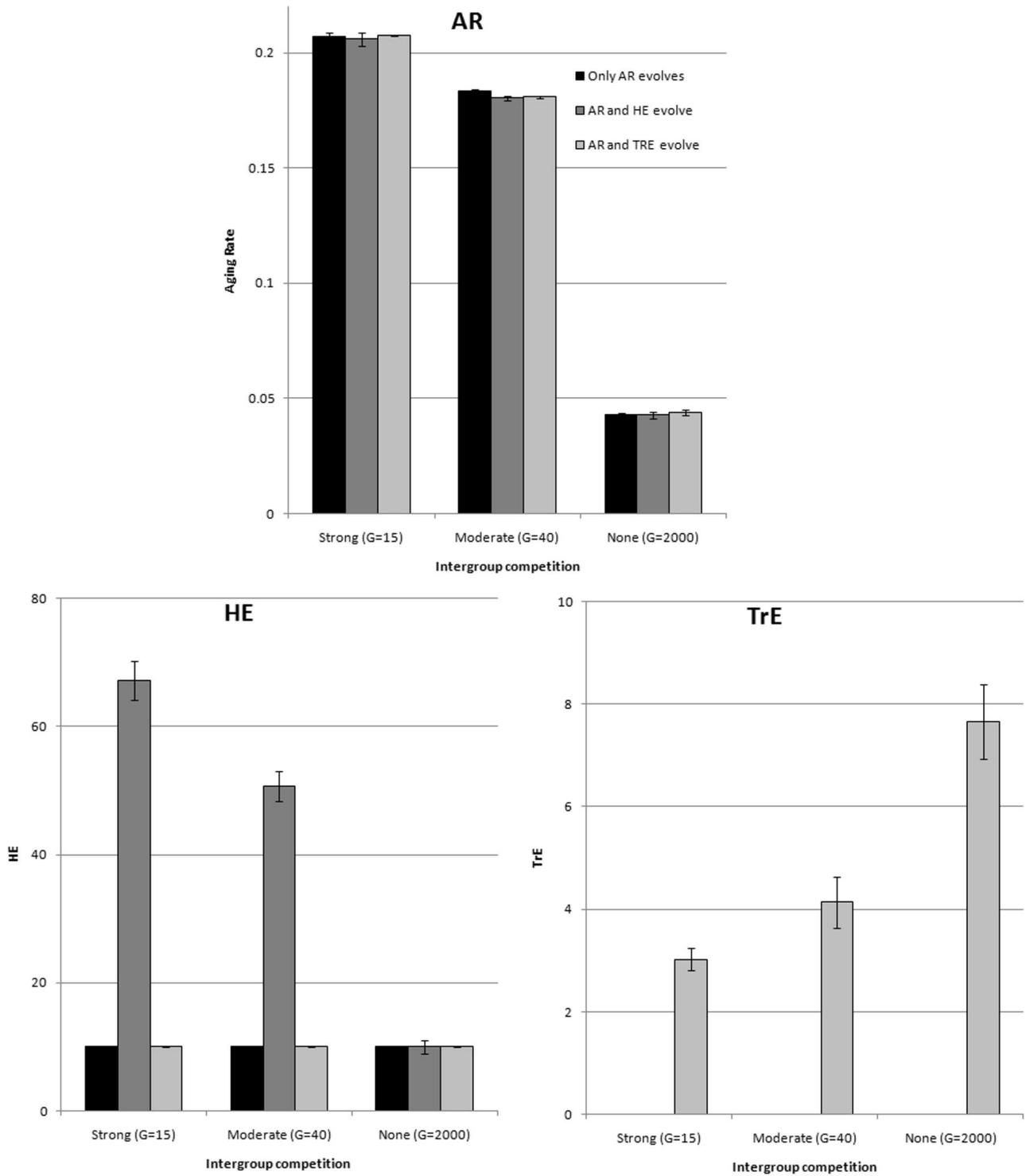


Рис. 2. Генетическая эволюция Сст (AR), ЭО (HE) и ЭЭП (TrE) в трех ситуациях: эволюционирует только Сст, эволюционирует Сст и ЭО, эволюционирует Сст и ЭЭП; культура отсутствует. Показаны средние значения из трех прогонов модели за годы 50 000–80 000 (\pm стандартное отклонение)

На рис. 3 видно, что культура имеет тенденцию способствовать замедлению старения (в каждой группе из четырех столбцов столбцы 2–4 в большинстве случаев ниже столбца 1).

Эгоистичная культура больше способствует этому, когда МГК минимальна (т.е. когда условия для развития такой культуры наиболее благоприятны). И наоборот, кооперативная культура

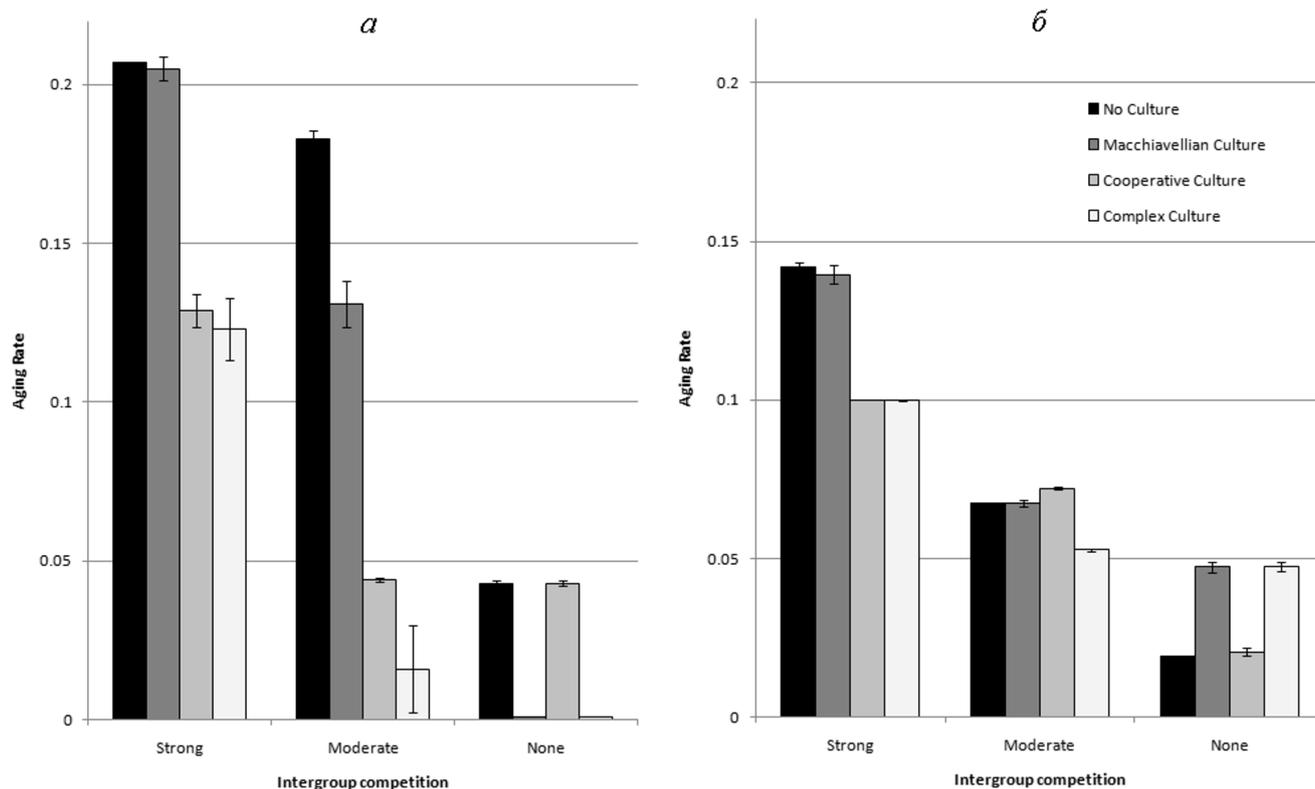


Рис. 3. Генетическая и культурная эволюция Сст. Мозг не эволюционирует (ОП = 5, ЭОб = 0,6, объем мозга = 20). Показаны средние значения из трех прогонов модели за годы 50 000–80 000 (\pm стандартное отклонение). *a* – Генетическая эволюция Сст в четырех ситуациях: культура отсутствует; культура содержит только мемы ЭЭП (эгоистичная культура); культура содержит только мемы ЭО (кооперативная культура); культура содержит оба типа мемов (комплексная культура). *б* – Культурная эволюция Сст в четырех ситуациях: разрешены только мемы Сст (культура отсутствует), мемы Сст и ЭЭП (эгоистичная культура), мемы Сст и ЭО (кооперативная культура), мемы Сст, ЭЭП и ЭО (комплексная культура). Генотипический (врожденный) уровень Сст – 0,1

способствует более медленному старению наиболее эффективно, когда МГК сильна (что означает, что условия благоприятны для развития кооперативной культуры). Комплексная культура суммирует эффекты обеих специализированных культур, усиливая отбор на замедление старения при любом уровне МГК.

Два исключения легко объяснить. В первом случае (сильная МГК, эгоистичная культура, столбец 2 в группе 1) культура развивается плохо, потому что при сильной МГК эффективность индивидуального отбора, поддерживающего «эгоистичные» признаки, мала. Соответственно, влияние культуры на эволюцию Сст незначительно. Во втором случае (без МГК, кооперативная культура, столбец 3 в группе 3) нет группового отбора для поддержки полезных для группы признаков, таких как ЭО. Соответственно, культура развивается плохо, и, что наиболее важно, она не адаптивна в эволюционном смысле, потому что ЭО не поддерживается отбором в отсутствие МГК. Такая «адаптивно нейтральная» культура, как и следовало

ожидать, никак не влияет на эволюцию старения.

Почему культура, как правило, способствует эволюции замедленного старения (рис. 3, *a*), тогда как генетическая эволюция тех же фенотипических признаков (ЭО и ЭЭП) не влияет на эволюцию Сст (рис. 2)? Причина в том, что генетически детерминированные признаки являются врожденными, а для овладения культурно детерминированными признаками требуется время. При наличии кооперативной культуры (мемы ЭО) индивиды постепенно становятся все более и более умелыми охотниками на протяжении всей своей жизни. В то же время они становятся лучшими хранителями и распространителями полезных знаний (охотничьих навыков). Следовательно, чем дольше живут особи, тем лучше для группы: в ней будет больше хороших охотников и больше полезных знаний. Следовательно, групповой отбор способствует более медленному старению.

В случае «макиавеллистской» (далее – эгоистичной) культуры (мемов ЭЭП) индивиды в

течение жизни становятся все более и более изощренными манипуляторами, эгоистами и интриганами. Это позволяет им получать больше ресурсов и, следовательно, производить больше потомства и с меньшей вероятностью умереть от голода. Следовательно, при наличии эгоистичной культуры (но не врожденных «эгоистичных инстинктов») дарвиновская приспособленность индивидов растет с большим ускорением по мере того, как увеличивается их ПЖ. Следовательно, индивидуальный отбор способствует увеличению ПЖ.

Интересно, что в отсутствие МГК чрезмерное замедление старения в сочетании с эгоистичной культурой (столбец 2 в группе 3, рис. 3, а) приводит к вымиранию популяции при параметрах, используемых по умолчанию (уровень врожденной ЭО равен 10). Чтобы завершить этот эксперимент, нам пришлось удвоить уровень врожденной ЭО (ЭО = 20), что аналогично искусственному кормлению популяции, неспособной прокормить себя. Механизм вымирания следующий: увеличение ПЖ усиливает конкуренцию за ресурсы, а эгоистичная культура делает распределение этих ресурсов чрезвычайно неравномерным (сильное неравенство ресурсов). Молодые особи почти ничего не получают, пока не выучат достаточно мемов ЭЭП. Те немногие, кому посчастливилось быстро изучить эффективные мемы ЭЭП, живут долго и успешно размножаются, но большинство молодых индивидов умирают из-за нехватки ресурсов. Возникает общество «алчных и хитрых должителей и голодающей молодежи». Острая нехватка ресурсов приводит к снижению доли особей, участвующих в коллективной охоте. Охота – дорогостоящее мероприятие, на которое индивид тратит два ресурса; если у него нет этих ресурсов, он не ходит на охоту. Уменьшение количества охотников можно было бы компенсировать увеличением охотничьего мастерства, но в данном случае это невозможно, так как врожденный уровень ЭО не развивается, и нет никаких мемов ЭО. В результате срывается деструктивная положительная обратная связь (увеличивается голод → меньше охотников → голод увеличивается еще больше), что заканчивается вымиранием популяции. Катастрофа начинается в тот момент, когда общее количество охотничьих усилий популяции становится недостаточным для добычи всех 6000 ресурсов, ежегодно предоставляемых окружающей средой. Конечно, это возможно только при отсутствии МГК. Если групповой отбор работает, он предотвратит катастрофу, благоразумно отбраковывая группы, в которых замедление старения и неравенство ресурсов зашли слишком далеко.

Именно это и происходит, например, в ситуации «эгоистичная культура, $G = 40$ » (столбец 2 в группе 2, рис. 3, а): групповой отбор не позволяет слишком сильно замедлить старение.

Культурная эволюция скорости старения. Посмотрев, как культура влияет на генетическую эволюцию S_{st} , мы повторили предыдущий эксперимент, на этот раз позволив признаку развиваться культурно, а не генетически. Для этого мы запретили мутации гена S_{st} (фиксированное значение генотипа $S_{st} = 0,1$) и ввели новую категорию мемов: мемы S_{st} . Эти мемы могут как увеличивать, так и уменьшать S_{st} . Первое соответствует рискованному поведению, которое позволяет индивиду экономить ресурсы или, что то же самое, получать дополнительные ресурсы в обмен на повышенный риск смерти («мемы соломенных хижин»). Второе соответствует трате дополнительных ресурсов для минимизации риска смерти («мемы кирпичных домов»).

Мы смоделировали те же три уровня МГК ($G = 15, 40, 2000$) и четыре варианта культуры: культура отсутствует (только S_{st} -мемы), эгоистичная культура (мемы S_{st} и ЭЭП), кооперативная культура (мемы S_{st} и ЭО), комплексная культура (мемы S_{st} , ЭЭП и ЭО). Остальные параметры были такими же, как в предыдущем эксперименте.

Мы уже знаем, к каким стабильным уровням стремится генетическая эволюция S_{st} с этими параметрами (рис. 3, а). Другими словами, мы знаем эволюционные оптимумы (или эволюционно стабильные состояния) S_{st} с точки зрения генов. Будет ли культурная эволюция S_{st} приводить к тем же стабильным состояниям? Результаты моделирования показаны на рис. 3, б.

Мы видим, что МГК влияет на культурную и генетическую эволюцию S_{st} аналогичным образом: сильная МГК способствует культурной эволюции высокой S_{st} (это позволяет группе экономить ресурсы), а слабая МГК способствует культурной эволюции низкой S_{st} . Однако то, как эгоистичные и кооперативные культуры влияют на культурную эволюцию S_{st} , сильно отличается от того, что мы наблюдали в случае генетической эволюции S_{st} . У этих различий есть несколько причин.

Первая причина заключается в том, что в культурной эволюции важную роль играет конкуренция между мемами за доминирование в памяти индивидов и в групповом пуле мемов. Косвенные аналоги этому можно найти в генетической эволюции в природе (например, компромисс между различными адаптивными признаками), но в TribeSim это не так. Например, аллели гена ЭЭП конкурируют друг с другом, но не с

аллелями генов ЭО или Сст, и эволюция врожденных эгоистичных способностей никоим образом не ограничивает эволюцию врожденных охотничьих способностей. Мемы разных категорий, напротив, конкурируют за одни и те же ресурсы: носителей (индивидов), объем их памяти и время, которое они тратят на обучение.

Вторая причина заключается в том, что определенные категории мемов могут стать вирусными, т.е. они могут ускорить свое собственное распространение, превратив своих носителей в более эффективные «машины для хранения и распространения мемов». Сст-мемы с негативным эффектом («мемы кирпичных домов») являются типичным примером вирусных мемов, поскольку они продлевают жизнь индивидов. Индивиды-долгожители накапливают в своей памяти больше мемов, дольше хранят их и передают большему количеству подражателей (учеников). Следовательно, при прочих равных, «мемы кирпичных домов» распространяются быстрее и побеждают в конкуренции «мемы соломенных хижин». Из-за этого культурная эволюция Сст часто приводит к более низким фенотипическим значениям Сст, чем это оптимально с точки зрения генов (ниже эволюционно стабильного состояния, характерного для генетической эволюции Сст).

Третья причина заключается в том, что большая ПЖ способствует культурному развитию, а короткая – тормозит [13]. Следовательно, при прочих равных условиях в обществе долгожителей любые культурно обусловленные фенотипические признаки развиваются сильнее, чем в обществе короткоживущих особей.

Давайте рассмотрим более подробно 12 ситуаций, показанных на рис. 3, б (столбцы 1–12), чтобы понять, как работают эти факторы. Следует помнить, что уровень генотипической (врожденной) Сст фиксирован и равен 0,1, а значение фенотипической Сст можно изменить только путем изучения мемов Сст.

№ 1: Сильная МГК; разрешены только мемы Сст. Как мы знаем, в этой ситуации генетическая эволюция Сст стремится к $S_{ст} \approx 0,21$ (рис. 3, а, столбец 1). Сильная МГК делает экономии ресурсов очень актуальной для групп. Групповой отбор поддерживает группы с низкой ПЖ, потому что короткоживущие особи тратят меньше ресурсов за год. В ходе культурной эволюции (рис. 3, б, столбец 1) устанавливается более низкий уровень Сст ($S_{ст} \approx 0,14$), но он все еще выше исходного генотипического уровня, равного 0,1. Это означает, что в конкурирующих группах под влиянием культурного группового отбора [42] формируется «культура соломенных хижин». Конечный уровень Сст получается ни-

же, чем при генетической эволюции, потому что «мемы соломенных хижин» сокращают жизнь своих хозяев, тем самым препятствуя своему собственному распространению. Поэтому им сложно конкурировать с «мемами кирпичных домов», которые, наоборот, сами помогают себе распространяться (являются вирусными).

№ 2: Сильная МГК; разрешены мемы Сст и ЭЭП. Сильная МГК приводит к слабому развитию «макиавеллистской» (эгоистичной) культуры. В результате мемы Сст с положительным эффектом («мемы соломенных хижин»), поддерживаемые мощным групповым отбором, вытесняют мемы ЭЭП из пула мемов. Следовательно, эгоистичная культура не влияет на конечный уровень Сст, который оказывается таким же, как и в предыдущем случае (около 0,14).

№№ 3, 4: Сильная МГК; разрешены мемы Сст и ЭО или Сст, ЭЭП и ЭО. Сильный культурный групповой отбор поддерживает группы с эффективной кооперативной (охотничьей) культурой. В результате эта культура сильно развивается, и мемы ЭО почти полностью вытесняют мемы Сст и ЭЭП из группового пула мемов. Культура Сст не может развиваться вообще, а фенотипический уровень Сст остается на исходном, генетически детерминированном уровне (0,1). Этому также способствует слабость группового отбора в пользу «мемов соломенных хижин», поскольку эволюционный оптимум в генетической эволюции Сст с этими параметрами (кооперативная культура и $G = 15$) составляет примерно 0,12–0,13 (рис. 3, а, столбцы 2 и 3), что лишь немного превышает врожденный генотипический уровень Сст в текущем эксперименте (0,1). Поэтому групповой отбор на снижение ПЖ в этой ситуации не очень силен. Более важны охотничьи навыки, для приобретения которых требуется время (т.е. более продолжительная жизнь).

№ 5: Умеренная МГК; разрешены только мемы Сст. В этом случае устанавливается уровень Сст $\approx 0,07$, что ниже исходного генотипического уровня (0,1) и намного ниже уровня, к которому стремится генетическая эволюция Сст в тех же условиях (0,18, рис. 3, а, столбец 5). Первое означает, что группы развили культуру «кирпичных домов». Второе означает, что эта культура развивалась, несмотря на тот факт, что для отдельных особей и групп было бы более выгодно (с точки зрения дарвиновской приспособленности) иметь более низкую ПЖ, т.е. иметь «культуру соломенных хижин». Очевидно, это результат «эгоизма» или вирусных свойств «мемов каменных домов» (см. выше).

№№ 6–8: Умеренная МГК; разрешены мемы Сст и ЭЭП, Сст и ЭО или Сст, ЭЭП и ЭО. В

случае генетической эволюции S_{st} с этими параметрами любая культура (эгоистичная, кооперативная или комплексная) приводит к снижению S_{st} (на рис. 3, а столбцы 6–8 ниже столбца 5). При культурной эволюции этого не наблюдается: конечный уровень S_{st} остается примерно таким же, как и в предыдущей ситуации (0,05–0,07; рис. 3, б, столбец 5). Причина кроется в балансе двух эволюционных сил. С одной стороны, эгоистичная и/или охотничья культура способствует индивидуальному и/или групповому отбору на долголетие. С другой стороны, эгоистичные и охотничьи мемы, поддерживаемые отбором, распространяются в пуле мемов и, таким образом, ограничивают возможности распространения «мемов кирпичных домов».

№№ 9, 11: Отсутствие МГК; допускаются мемы S_{st} или S_{st} и ЭО. В отсутствие МГК культура охоты не поддерживается отбором, мемы ЭО не распространяются и не влияют на конечный уровень S_{st} , поэтому эти две ситуации похожи. Конечный уровень S_{st} очень низкий (0,019–0,020). Это значительно ниже, чем в случае генетической эволюции S_{st} в тех же условиях (0,043). Причина опять же в «эгоизме» S_{st} -мемов с негативным эффектом (мемы «кирпичных домов»). Продлевая жизнь индивидов, эти мемы помогают себе распространяться. В результате индивиды живут дольше, чем было бы оптимально с точки зрения их дарвиновской приспособленности.

№№ 10, 12: Отсутствие МГК; разрешены мемы S_{st} и ЭЭП или S_{st} , ЭЭП и ЭО. В отсутствие МГК мемы ЭО не поддерживаются отбором и не влияют на окончательный уровень S_{st} , как уже упоминалось, поэтому эти две ситуации похожи. Конечный уровень S_{st} составляет 0,047–0,048, что значительно выше, чем в случае генетической эволюции S_{st} в этих условиях (0,001). Это также выше, чем в случае культурной эволюции S_{st} в отсутствие эгоистичной культуры (0,019–0,020, см. выше). Причина в чрезвычайно сильном развитии эгоистичной культуры с этими параметрами. Мемы ЭЭП заполняют значительную часть пула мемов (объем которого ограничен фиксированными значениями ОП и ЭОБ) и тем самым препятствуют развитию культуры «кирпичных домов». Сильное развитие эгоистичной культуры при этих параметрах объясняется тем, что долгая жизнь индивидов приводит к нехватке ресурсов, а сама эгоистичная культура создает сильное ресурсное неравенство («общество жадных, хитрых долгожителей и голодающей легкомысленной молодежи»). Сочетание этих двух факторов приводит к резкому увеличению доли смертей от голода. Эта доля увеличивается до 62–65% от общего

числа смертей за год (при отсутствии эгоистичной культуры в ситуациях 9 и 11 она составляет менее 1%). В таких обстоятельствах лучшая защита от преждевременной смерти обеспечивается не «мемами кирпичных домов» (которые фактически увеличивают потребность индивида в ресурсах), а мемами ЭЭП, которые предоставляют индивиду дополнительные ресурсы. Эгоистичные мемы, продлевая жизнь индивидов, приобретают вирусные свойства и распространяются еще быстрее, вытесняя S_{st} -мемы из пула мемов и тем самым препятствуя развитию культуры «кирпичных домов».

При отсутствии охотничьих мемов (ситуация 10) популяция вымирает так же, как и в случае генетической эволюции S_{st} с теми же параметрами (см. выше). Для завершения этого модельного эксперимента нам пришлось повысить уровень врожденной ЭО (с 10 до 20). Если охотничьи мемы разрешены (ситуация 12), то популяция выживает. Хотя охотничья культура в отсутствие МГК не поддерживается отбором, некоторые мемы ЭО все же распространяются из-за того, что можно назвать «культурным дрейфом», феноменом, который особенно сильно выражен в отсутствие МГК [13]. В результате средний уровень ЭО превышает 10, и популяция не достигает фатального порога, когда общее охотничье усилие популяции становится недостаточным для извлечения всех 6000 ресурсов, ежегодно обеспечиваемых окружающей средой.

Генно-культурная эволюция S_{st} . До сих пор мы сравнивали генетическую и культурную эволюцию S_{st} , рассматривая их по отдельности. Однако в реальном антропогенезе эти процессы, скорее всего, протекали параллельно. Есть основания полагать, что существовала как генетическая эволюция S_{st} (например, максимальная ПЖ *Homo sapiens* более чем вдвое выше, чем максимальная ПЖ других человекообразных обезьян [56]), так и культурная эволюция. Очевидно, что человечество накопило огромное количество знаний, обычаев, навыков, социальных практик и норм, влияющих на выживание и жизнеспособность [4–7].

В TribeSim, если S_{st} разрешено эволюционировать обоими способами одновременно, разворачивается сложный процесс генно-культурной эволюции признака. Генетические изменения в S_{st} влияют на развитие культурных элементов, влияющих на S_{st} , и наоборот. Рассмотрим ход генно-культурной эволюции S_{st} в двух ситуациях, различающихся направлением «эволюционных интересов» (положением эволюционных стабильных состояний или оптимумов) генов S_{st} и мемов S_{st} .

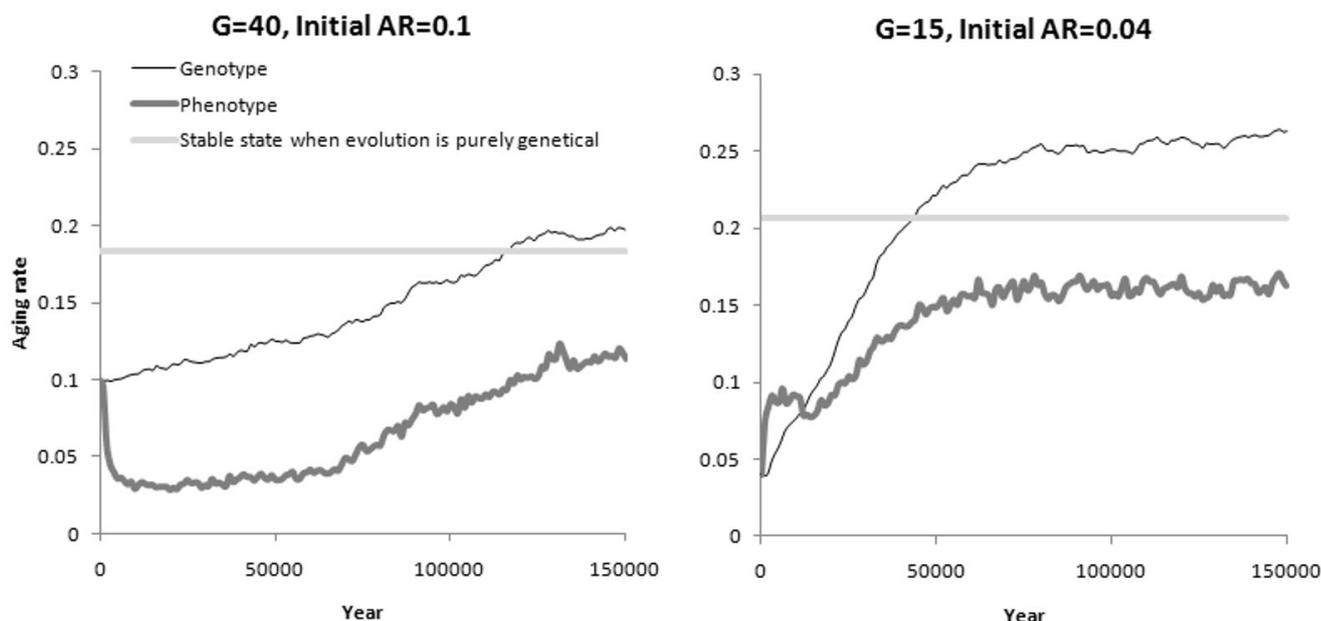


Рис. 4. Генно-культурная эволюция Сст (AR). Тонкая линия – генотипическое значение Сст, жирная линия – фенотипическое значение Сст. Прямая горизонтальная линия отмечает стабильное состояние признака, к которому генетическая эволюция Сст стремится в тех же условиях без культуры. Разница между фенотипом и генотипом отражает влияние культуры. Эта разница положительная (фенотипическое значение Сст выше генотипического), когда преобладает «культура соломенных хижин», и отрицательная, когда преобладает «культура кирпичных домов». Показаны средние значения из трех прогонов модели

1) «Интересы» генов и мемов изначально разнонаправлены. Параметры: генетическая эволюция Сст (остальные гены фиксированы); культурная эволюция Сст (другие мемы запрещены); исходный генотипический уровень Сст равен 0,1; $G = 40$ (умеренная МГК).

Из предыдущих экспериментов мы уже знаем, что при таких параметрах генетическая эволюция Сст, если ей не мешают другие факторы, стремится к равновесному уровню около 0,18, в то время как культурная эволюция из-за способности «мемов кирпичных домов» облегчать собственное распространение стремится к более низкому уровню, около 0,07.

В случае генно-культурной эволюции мемы начинают сдвигать признак вниз, в то время как гены пытаются сдвинуть его вверх и компенсировать влияние культуры (рис. 4, график слева). Культура в этом случае играет роль неадаптивной фенотипической пластичности, что способствует усиленной генетической эволюции признака в направлении, противоположном направлению пластических изменений [57]. Другими словами, поскольку культура уменьшает значение признака, гены вынуждены увеличивать его еще сильнее. Это явление известно как генетическая компенсация [58]. Генно-культурный эволюционный процесс требует значительного времени для того, чтобы прийти в стационарное

состояние, отчасти потому, что культура увеличивает изменчивость фенотипического проявления признака, и, таким образом, отбор оказывается менее эффективным. В конце концов, генотипическое значение признака поднимается выше уровня, к которому стремится чисто генетическая эволюция Сст в тех же условиях. В этом случае воздействие культуры всегда направлено на снижение фенотипического значения Сст, т.е. формируется и сохраняется культура «кирпичных домов».

2) «Интересы» генов и мемов изначально однонаправлены. Параметры: генетическая эволюция Сст (остальные гены фиксированы); культурная эволюция Сст (другие мемы запрещены); исходный генотипический уровень Сст равен 0,04; $G = 15$ (сильная МГК).

В этом случае генетическая эволюция Сст в отсутствие культуры стремится к 0,21, а культурная эволюция в отсутствие генетической эволюции стремится к 0,14. Оба уровня значительно выше, чем исходный генотипический уровень Сст в текущем эксперименте (0,04). Следовательно, на начальном этапе и мемы, и гены должны стремиться к увеличению Сст.

Действительно, в этой ситуации сначала быстро эволюционирует культура «соломенных хижин» (рис. 4: в левой части второго графика фенотипический уровень Сст выше, чем гено-

типический уровень). Генетический уровень $S_{ст}$ также растет, хотя и более медленными темпами. Достаточно скоро этот рост приводит к тому, что культура сначала становится нейтральной (мемы «соломенных хижин» и «кирпичных домов» уравнивают друг друга), а затем развивается полноценная культура «кирпичных домов». Это происходит задолго до того, как генотипическое или фенотипическое значение $S_{ст}$ приближается к 0,21 или даже 0,14, что объясняется вирусными свойствами мемов «кирпичных домов» (эти мемы, как мы помним, помогают себе распространяться, потому что продлевают жизнь их носителям). Эгоистичная эволюция мемов сдвигает уровень $S_{ст}$ ниже генетического эволюционного оптимума.

В результате в обоих случаях, показанных на рис. 4, формируется общество, в котором молодые индивиды ведут рискованный образ жизни, тем самым получая дополнительные ресурсы, и у них есть генетическая предрасположенность к этой рискованной жизни. Но с возрастом индивиды приобретают знания и навыки, которые делают жизнь безопаснее, хотя и требуют больших ресурсных затрат. Это похоже на то, что мы наблюдаем во многих человеческих популяциях.

Генетическая эволюция $S_{ст}$ и культурный драйв. До сих пор мы исследовали влияние культуры на эволюцию ПЖ и старение с фиксированными (а значит, не эволюционирующими) значениями объема памяти (ОП), эффективности обучения (ЭОб) и объема мозга. Однако в реальном антропогенезе специфические для человека эволюционные изменения ПЖ и $S_{ст}$, скорее всего, происходили на фоне быстро эволюционирующего мозга и развивающейся культуры.

Нашей следующей задачей было смоделировать эволюцию $S_{ст}$ в контексте культурного драйва (самоподдерживающейся коэволюции мозга, культуры и социального обучения). Программа TribeSim изначально была разработана специально для изучения культурного драйва [13].

Было высказано предположение, что в авткаталитической совместной эволюции мозга и культуры может присутствовать дополнительная петля положительной обратной связи через увеличение ПЖ. Культурное развитие ведет к увеличению ПЖ (как за счет культурно передаваемых навыков, которые продлевают жизнь, так и за счет отбора на долголетие, которому способствует культура). В свою очередь, долгая жизнь особей способствует еще большему развитию культуры, что стимулирует дальнейшее развитие мозга [1, 11, 12, 28–30]. Ранее мы показали с помощью TribeSim, что увеличение ПЖ

индивидов действительно способствует увеличению размера мозга и культурному развитию [13], но еще не моделировали эволюцию ПЖ (или скорости старения $S_{ст}$) в контексте культурного драйва.

Чтобы посмотреть, как коэволюция мозга и культуры взаимодействует с эволюцией $S_{ст}$, мы использовали следующие параметры: генетическая эволюция $S_{ст}$, ОП и ЭОб; начальные значения: $S_{ст} = 0,1$, ОП = 0, ЭОб = 0. ОП и ЭОб являются дорогостоящими признаками в том смысле, что их рост приводит к увеличению объема мозга (который равен $20 + ОП + 30 \times ЭОб$), а увеличение объема мозга повышает ресурсную стоимость размножения.

Мы смоделировали процесс при трех различных уровнях МГК ($G = 15, 40$ и 2000) и четырех вариантах культуры: без культуры, эгоистичной, кооперативной и комплексной. Сначала рассмотрим подробно ход процесса при $G = 40$ и комплексной культуре (рис. 5), а затем более кратко остановимся на остальных 11 комбинациях параметров (рис. 6, а).

На рис. 5 показано, что при эволюционирующей $S_{ст}$ возникает гораздо более мощный культурный драйв, чем при $S_{ст}$, зафиксированной на относительно высоком уровне ($S_{ст} = 0,1$): социальное обучение (ОП и ЭОб, от которых зависит объем мозга) и культура, особенно эгоистичная, эволюционируют сильнее. Это связано, прежде всего, с увеличением ПЖ (долгожители лучше хранят и распространяют знания), а во-вторых, с усилением развития эгоистичной культуры. Последнее на определенном этапе формирует положительную обратную связь с увеличением доли смертей от голода. Мемы ЭЭП усугубляют неравенство ресурсов, что приводит к увеличению доли смертей от голода. Это, в свою очередь, приводит к появлению сильного «жизнеспасающего» эффекта у мемов ЭЭП и, как следствие, к еще большему распространению мемов ЭЭП и еще большему неравенству ресурсов. В то же время развитие эгоистичной культуры стимулирует отбор на улучшение способностей к социальному обучению, что приводит к увеличению размера мозга.

В данном случае культурный драйв сначала запускается мемами ЭО, которые повышают конкурентоспособность групп. Объем памяти и эффективность обучения изначально находятся на нулевом уровне, но гены ОП и ЭОб мутируют, и поэтому в популяции появляются особи с ненулевыми значениями этих признаков. Пока в пуле мемов нет адаптивных знаний, гены ОП и ЭОб с ненулевыми значениями ведут себя как слабавредные аллели в равновесии мутации—от-

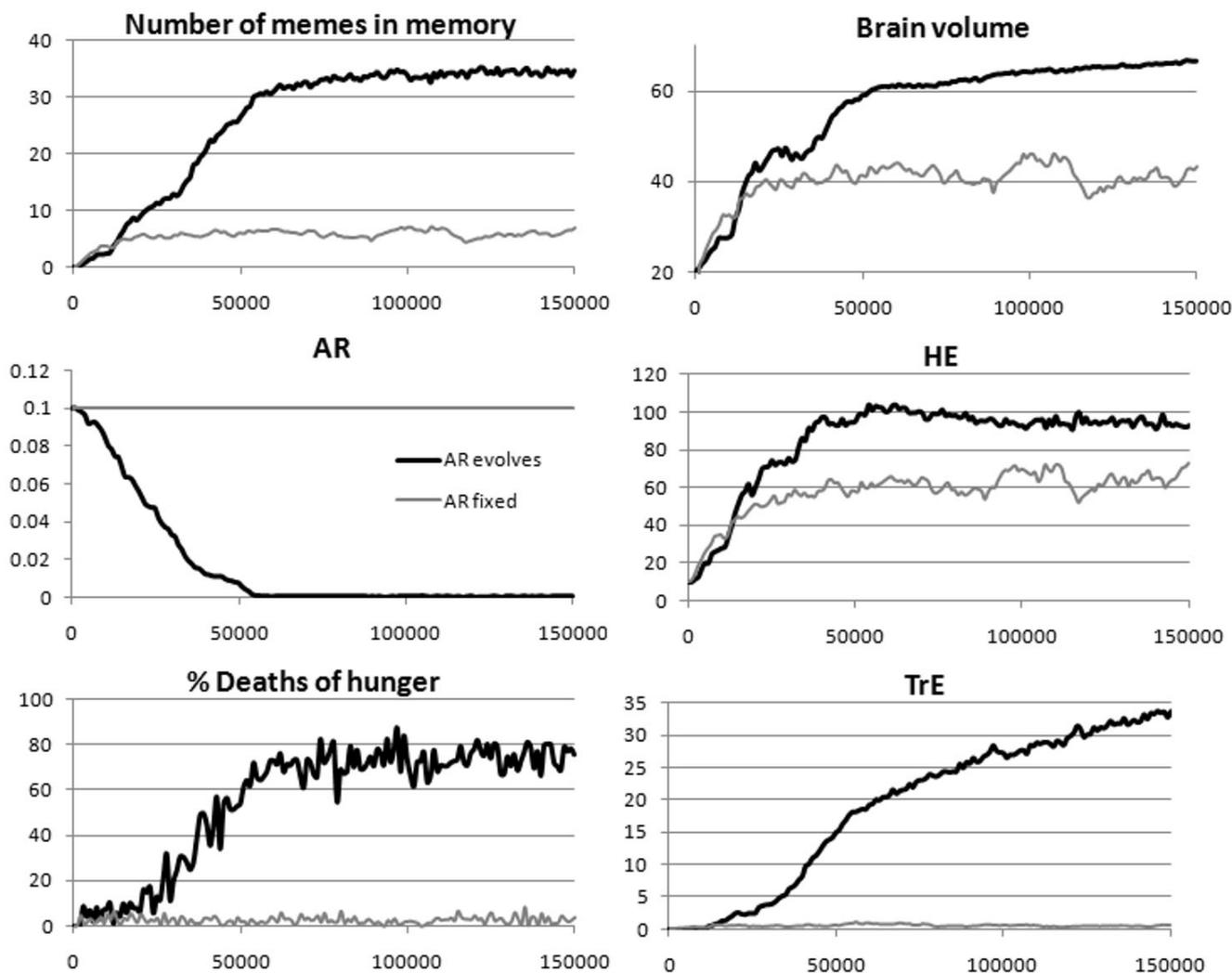


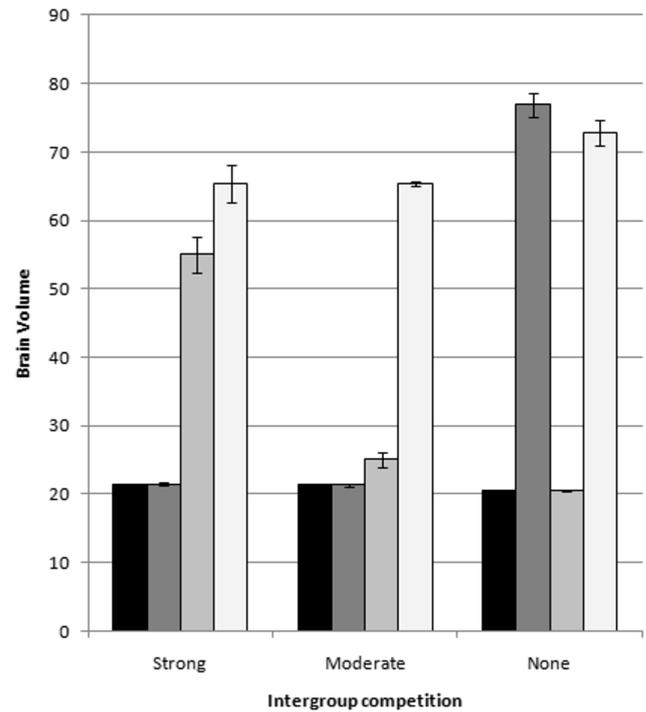
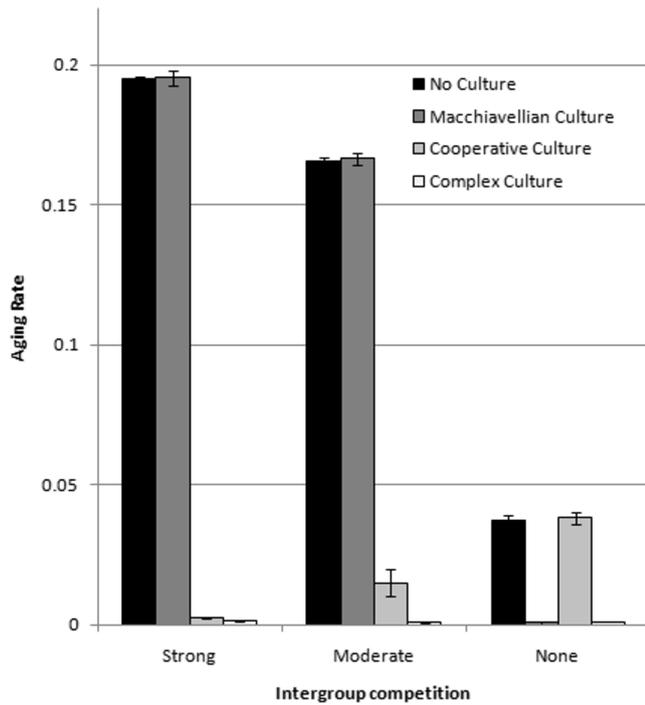
Рис. 5. Культурный драйв (автокаталитическая совместная эволюция мозга, социального обучения и культуры) с фиксированной или эволюционирующей Сст (AR). Параметры: генетическая эволюция ОП, ЭОб (или ОП, ЭОб и Сст); культурная эволюция ЭЭП (TrE) и ЭО (HE); $G = 40$; начальный уровень Сст равен 0,1. Показаны средние значения из трех прогонов модели

бор: они немного снижают приспособленность (учиться нечему, но размножение обходится дороже), но отбор не может вычистить все слабостранные аллели из генофонда. Как только хотя бы один достаточно простой (умещающийся в небольшой памяти), но эффективный мем ЭО появляется в пуле мемов, может начаться отбор на лучшее социальное обучение (группы, в которых есть индивиды, которые могут выучить и запомнить этот мем, получают преимущество, и гены более высоких значений ОП и ЭОб начинают распространяться).

На начальном этапе (первые 10 000–20 000 лет) культурный драйв поддерживается распространением мемов ЭО и групповым отбором. Развитие кооперативной культуры приводит к более сильному отбору на увеличение ПЖ,

и Сст начинает быстро снижаться. Чуть позже (через 20 000–30 000 лет после начала моделирования) старение замедляется настолько, что возникают предпосылки для развития эгоистичной культуры (долгоживущие особи получают больше пользы от этой культуры, чем короткоживущие). Эгоистичная культура еще больше усиливает отбор на увеличение ПЖ, потому что она делает долгую жизнь более полезной, и Сст продолжает быстро сокращаться. Снижение Сст в сочетании с развитием эгоистичной культуры приводит к дефициту ресурсов и увеличению ресурсного неравенства, что проявляется в увеличении доли смертей от голода. Это создает положительную обратную связь, о которой говорилось выше, что дает дополнительный импульс развитию эгоистичной культуры. Обе культуры,

a



b

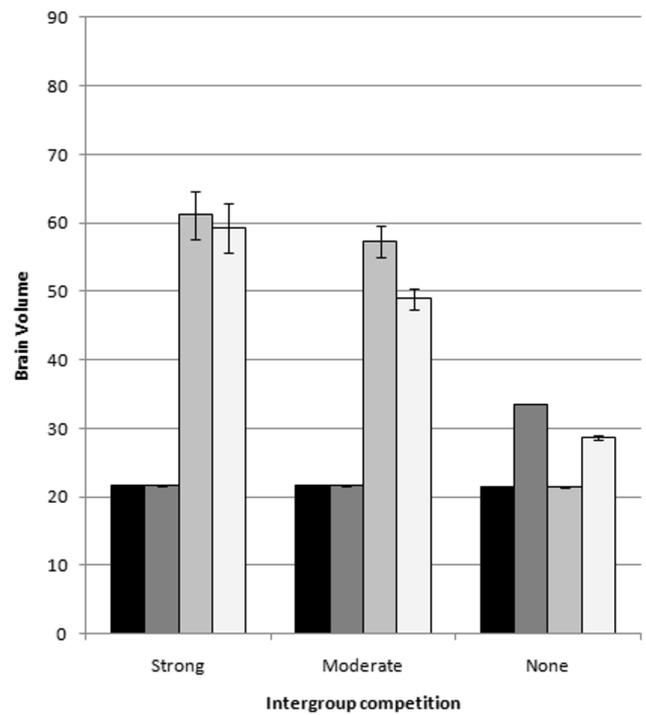
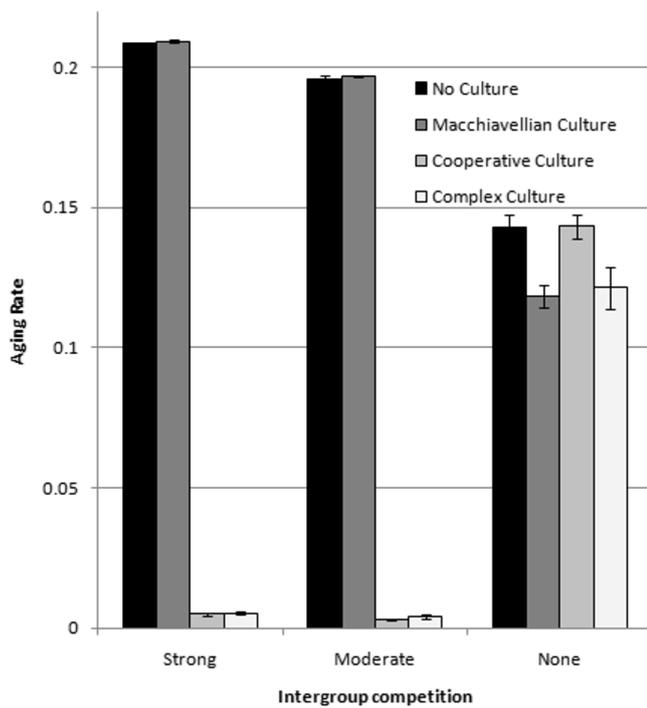


Рис. 6. Культурный драйв (автокаталитическая коэволюция мозга и культуры) и генетическая эволюция Ст. Показаны средние значения Ст (левые диаграммы) и объема мозга (20 + ОП + 30 ×ЭОб, правые диаграммы) при трех уровнях МГК и четырех вариантах культуры за годы 100 000–150 000 из трех прогонов модели (± стандартное отклонение). *a* – Особи размножаются на протяжении всей жизни (репродуктивный период от 6 лет до смерти), *b* – репродуктивный период от 6 до 18 лет

кооперативная и эгоистичная, стимулируют эволюцию социального обучения, что, в свою очередь, способствует дальнейшему культурному развитию.

Если Сст не эволюционирует, эгоистичная культура при этих параметрах не развивается, второй этап культурного драйва не наступает, мозг и социальное обучение эволюционируют слабее, и их развитие раньше выходит на стационарный уровень.

Как мы видели из результатов предыдущих экспериментов, с этими параметрами и без культуры Сст стабилизируется на уровне около 0,18 (рис. 3, а, столбец 5). При комплексной культуре, но без эволюции мозга, Сст стабилизируется на уровне 0,016 (рис. 3, а, столбец 8). Здесь мы видим, что в контексте культурного драйва Сст снижается почти до нуля (рис. 5). Это означает, что не только увеличение ПЖ ведет к более сильному культурному развитию, но и культурное развитие способствует эволюции более долгой жизни. Таким образом, моделирование подтвердило теоретическую возможность петли положительной обратной связи, которая способствует развитию мозга и социального обучения за счет эволюции более медленного старения или более длительной жизни. Этот цикл работает, даже если лишь небольшой части индивидов удастся реализовать свою врожденную способность жить долго, а большинство (в данном случае около 75%) индивидов умирает преждевременно из-за нехватки ресурсов.

На рис. 6, а показаны значения Сст и объема мозга (средние уровни за 100 000–150 000 лет) для симуляций с культурным драйвом, эволюционирующей Сст, трех уровней МГК и четырех вариантов культуры.

Культурный драйв имел место в 6 случаях из 12 (на что указывает объем мозга, значительно превышающий исходный уровень, равный 20). В трех случаях (столбцы 1, 5, 9) культурный драйв не мог начаться из-за отсутствия культуры. В случаях 2 и 6 (сильная или умеренная МГК, эгоистичная культура) культурный драйв не начался, потому что мемы ЭЭП в этих ситуациях недостаточно полезны для запуска отбора на более крупный мозг, по крайней мере, пока ПЖ остается низкой. В случае 11 (нет МГК, кооперативная культура) культурный драйв не начался, потому что мемы ЭО не поддерживаются индивидуальным отбором, а групповой отбор не работает в отсутствие МГК.

Во всех случаях, когда культурный драйв начинался, он приводил к резкому снижению Сст, которое было более выраженным, чем при наличии «бесплатной», изначально ограниченной культуры (рис. 3, а).

Интересно, что в ходе совместной эволюции мозга, культуры и ПЖ (Сст) различные компоненты комплексной культуры «помогают» друг другу развиваться. Например, рис. 5 показывает, что культурный драйв сначала был инициирован кооперативным компонентом культуры (мемом ЭО). Со временем это создало предпосылки для быстрого развития «эгоистичного» компонента (мемов ЭЭП), что, в свою очередь, способствовало дальнейшему развитию кооперативного компонента. Эволюция мозга может быть стимулирована одним из компонентов культуры (наиболее выгодным на данный момент), но когда дорогостоящий мозг уже развит, это может быть использовано другим компонентом культуры для своей эволюции. Например, если с теми же параметрами, что и на рис. 5 (и рис. 6, а, столбец 8), разрешена только эгоистичная культура, то культурный драйв вообще не начинается, и культура не эволюционирует (рис. 6, а, столбец 6). Если разрешена только кооперативная культура, то культурный драйв запускается, но работает плохо, и мозг остается довольно маленьким (рис. 6, а, столбец 7). Если оба компонента культуры разрешены одновременно, то совместная эволюция мозга, социального обучения, культуры и долголетия будет происходить очень быстро и может привести к впечатляющим результатам (рис. 5; рис. 6, а, столбец 8).

Генетическая и культурная эволюция Сст на фоне культурного драйва. В предыдущем разделе мы смоделировали ситуацию, когда на фоне совместной эволюции мозга, социального обучения и культуры также происходит генетическая эволюция Сст (или ПЖ). Однако в реальном антропогенезе почти наверняка имела место не чисто генетическая эволюция этого признака, а генно-культурная.

Нашей следующей задачей было смоделировать генно-культурную эволюцию Сст в рамках культурного драйва. Мы использовали тот же сбалансированный (и, вероятно, реалистичный) набор параметров, что и на рис. 5: умеренная МГК, комплексная культура. Единственная разница в том, что сейчас, наряду с генетической эволюцией Сст, также разрешена культурная эволюция Сст. Результаты моделирования представлены на рис. 7.

Мы видим, что культурный драйв быстро стартовал, и мозг в конечном итоге увеличился почти до того же объема, что и в случае чисто генетической эволюции Сст. Основные отличия заключаются в следующем.

Культура «кирпичных домов» сильно развилась: в пуле мемов накопились продляющие жизнь мемы Сст. Эта культура играет роль эво-

люционного буфера (адаптивной фенотипической пластичности), что ослабляет давление отбора на генетический компонент Сст. В результате генетическая эволюция в сторону более низкого уровня врожденной Сст не зашла очень далеко. Получившаяся популяция состоит из рискованной, безрассудной молодежи и осторожных индивидов старшего возраста. Возможно, нечто подобное имело место и в реальном антропогенезе: генетически скорость старения не сильно снизилась по сравнению с другими обезьянами, но реальный («фенотипический») потенциал долголетия значительно увеличился благодаря достижениям культуры (в реальных человеческих культурах есть множество элементов, похожих на продляющие жизнь мемы Сст).

Благодаря своим вирусным свойствам мемы Сст заполнили пул мемов и препятствовали раз-

витию мощной эгоистичной культуры. Кооперативная культура, которая спровоцировала культурный драйв вначале, достигла пика примерно через 20 000 лет, а затем пришла в упадок, поскольку мемы Сст постепенно вытесняли мемы ЭО из пула мемов. И кооперативная, и эгоистичная культура не исчезли полностью, а остались в стабильном, умеренно развитом состоянии.

Средняя ПЖ стабилизировалась на отметке 41 год. Интересно, что при чисто генетической эволюции Сст средняя ПЖ составляет всего около 31 года, несмотря на более низкое фенотипическое значение Сст. Объясняется это тем, что при чисто генетической эволюции Сст чрезвычайно высокоразвитая эгоистичная культура порождает «общество жадных, хитрых долгожителей и голодающей молодежи». В таком обществе значительная часть молодых индивидов,

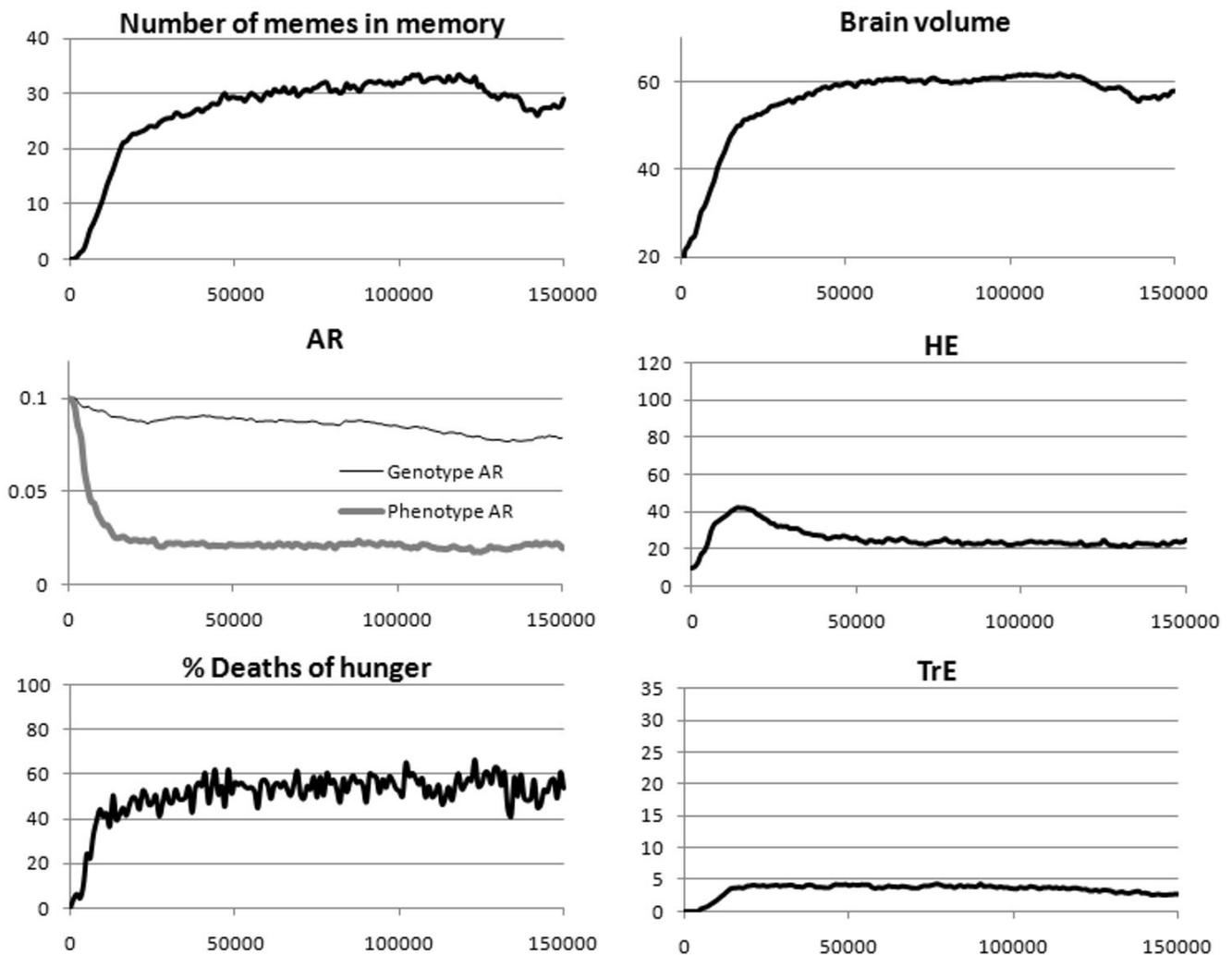


Рис. 7. Культурный драйв с генно-культурной эволюцией скорости старения (Сст). Параметры: генетическая эволюция ОП, ЭОб и Сст; культурная эволюция ЭЭП (TrE), ЭО (HE) и Сст (AR); $G = 40$; исходный генетический уровень Сст равен 0,1. Показаны средние значения из восьми прогонов модели

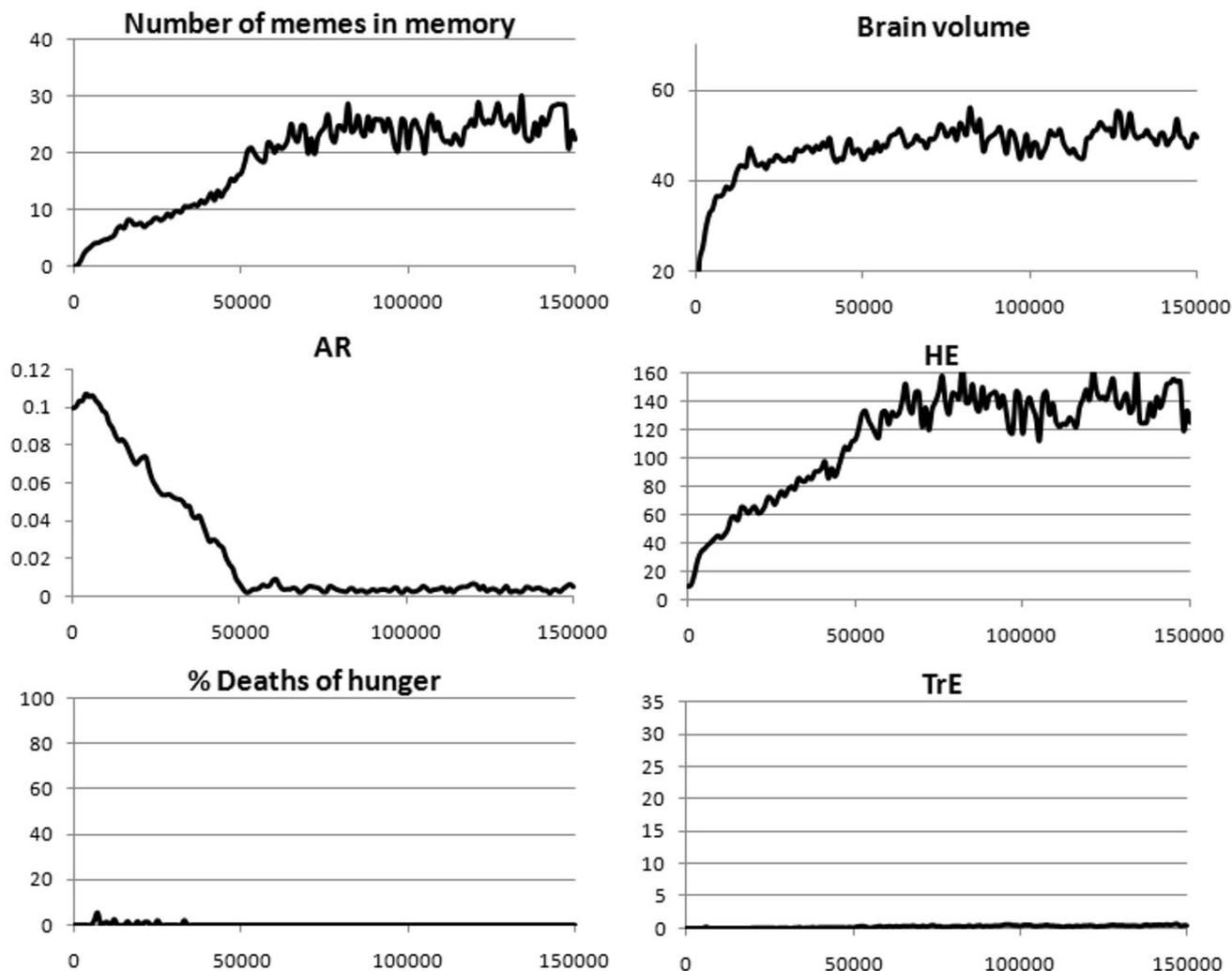


Рис. 8. Козволюция мозга (объем мозга), культуры (ЭО [HE], ЭЭП [TrE]) и возрастной динамики вероятности смерти (Сст [AR]) в случае прекращения размножения в определенном возрасте. Все параметры – как на рис. 5, за исключением того, что индивиды не могут производить потомство после 18 лет. Показаны средние значения из трех прогонов модели

которым не удалось быстро выучить достаточное количество мемов ЭЭП, умирает от нехватки ресурсов. Это приводит к уменьшению средней ПЖ.

В целом развитие, которое мы наблюдаем с этим набором параметров (умеренная МГК, комплексная культура, генетическая эволюция дорогостоящих средств социального обучения [ОП и ЭОб], генно-культурная эволюция возрастной динамики вероятности смерти), вероятно, является адекватным приближением к реальным эволюционным процессам, которые имели место в ходе антропогенеза (хотя эффект Сст-мемов, вытесняющих другие мемы из пула мемов, возможно, преувеличен).

Культурный драйв и эволюция пострепродуктивного периода. В описанных выше эксперимен-

тах репродуктивный потенциал особей не снижался с возрастом. Однако у людей фертильность снижается с возрастом, особенно у женщин, репродуктивная функция которых полностью прекращается в определенном возрасте (менопауза) [59, 60]. Нашей следующей задачей было смоделировать возрастное снижение репродуктивного потенциала, чтобы ответить на следующие вопросы: (1) как это повлияет на коэволюцию мозга, культуры и возрастной динамики вероятности смерти; (2) способен ли отбор, управляемый и опосредуемый культурой, привести к эволюции длительного пострепродуктивного периода, и если да, то при каких условиях?

Мы повторили моделирование, описанное в разделе «Генетическая эволюция Сст и культурный драйв», с одним только изменением: инди-

виды больше не могли производить потомство после 18 лет (репродуктивный период от 6 до 18 лет; ранее репродуктивный период составлял от 6 лет до смерти).

На рис. 8 показаны подробные результаты для $G = 40$ и комплексной культуры. На рис. 6, б представлены результаты для трех уровней МГК и четырех типов культуры. Эти рисунки можно сравнить с рис. 5 и 6, а, чтобы увидеть влияние прекращения размножения в определенном возрасте на совместную эволюцию мозга, культуры и возрастной динамики вероятности смерти.

На рис. 8 видно, что при умеренной МГК и комплексной культуре (мемы ЭЭП и ЭО) отключение репродуктивной функции в возрасте 18 лет не препятствует ни культурному драйву, ни эволюции долгой жизни. Более того, в этом случае особи живут в среднем намного дольше (в среднем ПЖ = 88,6 лет), чем в случае возможности размножения до самой смерти (рис. 5, ПЖ = 30,7 лет), потому что в популяции почти нет смертей от голода. Отсутствие смертей от голода объясняется тем, что после 18 лет индивиды перестают тратить ресурсы на размножение, а рождаемость в целом низкая. Это приводит к относительному избытку ресурсов в популяции. К тому же эгоистичная культура практически не эволюционирует (см. ниже), а значит, ресурсного неравенства в группах почти нет.

Почему отбор поддерживает долгую жизнь особей, если она не способствует их репродуктивному успеху? В данном случае это происходит исключительно по той причине, что присутствие пожилых особей, у которых было достаточно времени, чтобы накопить много мемов ЭО (т.е. умелых охотников), значительно увеличивает конкурентоспособность группы. Такие особи полезны по двум причинам: во-первых, они хорошие охотники и получают много ресурсов для группы, а во-вторых, они хорошие хранители и распространители знаний. Следовательно, групповой отбор поддерживает группы с низкими значениями Сст.

В отличие от охотничьей культуры, которая в этой ситуации развивается сильнее, чем когда размножение продолжается до самой смерти (рис. 5), эгоистичная культура практически не развивается. Это связано с тем, что при коротком репродуктивном периоде мемы ЭЭП не могут значительно повысить репродуктивный успех индивида. Они могли бы защитить от голода, но эта проблема и так не возникает по причинам, указанным выше. Следовательно, мемы ЭЭП в этой ситуации не приобретают вирусных свойств, не получают широкого распространения и не стимулируют развитие мозга. В резуль-

тате объем мозга стабилизируется на более низком уровне, чем при продолжении размножения до смерти.

Эти выводы подтверждаются результатами моделирования, представленными на рис. 6, б. Сравнение рис. 6, а и б показывает, что прекращение размножения в определенном возрасте приводит к следующим эволюционным последствиям (по сравнению с размножением на протяжении всей жизни):

1) Индивидуальный отбор на долголетие в целом слабее. Особенно это заметно в отсутствие МГК, когда работает только индивидуальный отбор. Например, при $G = 2000$ и эгоистичной [«макиавеллистской»] культуре скорость старения Сст составит 0,037 (медленное старение, средняя ПЖ = 39,6 лет), если размножение продолжается до смерти (рис. 6, а), и 0,143 (быстрое старение, ПЖ = 18,1 года), если размножение прекращается к 18 годам (рис. 6, б).

2) Индивидуально выгодная эгоистичная культура развивается слабо, потому что в случае короткого репродуктивного периода она приносит относительно мало пользы для индивидов. Эта культура по-прежнему способна запускать культурный драйв в отсутствие МГК, но даже в этом случае, получающийся в результате объем мозга меньше, чем с теми же параметрами и пожизненным размножением. Эгоистичная культура не способствует эволюции длительного пострепродуктивного периода. Например, при $G = 2000$ и эгоистичной культуре скорость старения (Сст) составит 0,118, а средняя ПЖ – 20,1 года. С теми же параметрами, но с пожизненным размножением, скорость старения стремится к нулю (Сст < 0,001), а средняя ПЖ будет равна 54,8 года.

3) При наличии МГК и кооперативной культуры, полезной для группы, групповой отбор поддерживает медленное старение, несмотря на то что старые особи не размножаются. Это объясняется тем, что долгожители приносят пользу группе, поскольку накапливают множество мемов ЭО и становятся эффективными охотниками и распространителями полезных знаний. При некоторых комбинациях параметров ($G = 40$, кооперативная культура) мозг эволюционирует даже сильнее, чем в случае размножения до смерти. Это связано с тем, что из-за отсутствия смертей от голода реальная ПЖ выше, что способствует развитию культуры и усиливает культурный драйв. Случаи смерти от голода отсутствуют, потому что долгожители не тратят ресурсы на размножение, а рождаемость в целом ниже.

4) Эффект «взаимопомощи» между кооперативными и эгоистичными культурами исчезает: поскольку эгоистичная культура становится ме-

нее полезной, она больше не может значительно улучшить развитие мозга. В результате на первый план выходит конкуренция между мемами: мемы ЭЭП, присутствующие в пуле мемов как практически ненужный балласт, не помогают, а немного мешают развитию кооперативной культуры.

Очевидно, что снижение важности эгоистичной культуры, вызванное прекращением размножения в определенном возрасте, будет менее выраженным, если пострепродуктивные особи смогут передавать ресурсы или иным образом помогать своему потомству или другим родственникам (т.е. при развитии «кумовстве» [nepotism]). Действительно, модельные пострепродуктивные особи не тратят ресурсы на размножение, и поэтому, с одной стороны, они обычно накапливают много ресурсов, а с другой стороны, эти избыточные ресурсы не повышают их дарвиновскую приспособленность (потому что они не размножаются). Если бы индивиды умели передавать избыточные ресурсы родственникам, это повысило бы их инклюзивную приспособленность, и эгоистичная культура снова стала бы очень полезной. В этом случае ситуация, показанная на рис. 6, б, стала бы больше похожей на ситуацию, изображенную на рис. 6, а. Тогда длительный пострепродуктивный период смог бы появиться не только при сильной МГК и кооперативной культуре, но также при слабой МГК и эгоистичной культуре. Это согласуется с гипотезой эволюции менопаузы, называемой также «гипотезой бабушки», которая предполагает, что пожилые женщины повышают свою инклюзивную приспособленность, помогая своему потомству [61–64].

Другая возможность эволюции длительного пострепродуктивного периода при слабой МГК связана с культурной эволюцией ПЖ. Как уже упоминалось, продлевающие жизнь мемы являются вирусными, потому что они делают своих хозяев более эффективными распространителями мемов. Этот эффект не зависит от того, способны ли долгожители к размножению: достаточно того, что они могут распространять знания. Например, если в ситуации, соответствующей столбцу 10 на рис. 6, б (генетическая эволюция ОП, ЭОб и Сст; мемы ЭЭП; прекращение размножения в 18 лет; $G = 2000$), мы допускаем культурную эволюцию Сст вместо генетической (генетическая эволюция ОП и ЭОб; мемы Сст и ЭЭП; прекращение размножения в 18 лет; $G = 2000$), то вместо Сст $\approx 0,118$ (средняя ПЖ равна 20,1 года) мы будем иметь Сст $\approx 0,074$ (средняя ПЖ равна 27,9 лет) (среднее значение из трех прогонов модели для 100 000–150 000 лет). Другими словами, при этих параметрах ге-

нетическая эволюция Сст не приводит к формированию длительного пострепродуктивного периода, поскольку долгая жизнь не улучшает дарвиновскую приспособленность индивидов, а групповой отбор отсутствует. Однако культурная эволюция Сст приводит к появлению значительного пострепродуктивного периода (средняя ПЖ в 1,5 раза превышает возраст, в котором заканчивается размножение), потому что это полезно для мемов Сст с негативным эффектом («мемы кирпичных домов»). В результате мемы, соблюдая собственные «эгоистичные интересы», заставляют индивидов жить дольше, чем было бы оптимально с точки зрения их генов.

Интересно, что в этой ситуации (генетическая эволюция ОП и ЭОб; Сст- и ЭЭП-мемы; прекращение репродукции в 18 лет; $G = 2000$) из-за вирусных свойств мемов Сст прогрессивная совместная эволюция мозга и культуры поворачивается вспять, мозг в конечном итоге возвращается почти к своему первоначальному объему, и эгоистичная культура деградирует. Культурный драйв сначала запускается мемами ЭЭП, которые не очень полезны для индивидов, которые прекращают размножаться после 18 лет, но все же достаточно полезны, чтобы вызвать отбор на более крупный мозг. Но как только ОП и ЭОб начинают расти, продлевающие жизнь мемы Сст («мемы кирпичных домов») быстро распространяются в пуле мемов. Они не увеличивают дарвиновскую приспособленность индивидов (поскольку размножение все равно прекращается в 18), но они распространяются благодаря своим вирусным свойствам и вытесняют мемы ЭЭП из культуры. После этого мозг начинает уменьшаться, потому что с этими параметрами «в интересах» генов поддерживать большой мозг ради мемов ЭЭП, но не ради мемов Сст. С деградацией мозга культура, особенно эгоистичная, постепенно угасает. Остаточная культура «кирпичных домов» всё же сохраняет среднюю ПЖ на уровне около 27,9 лет, что в 1,5 раза превышает возраст, в котором прекращается размножение.

Способность культурной эволюции генерировать длинный пострепродуктивный период независимо от дарвиновской приспособленности особей проявляется еще более отчетливо в идеализированной ситуации «бесплатной», но ограниченной культуры и неэволюционирующего мозга (рис. 3, б). Например, если $G = 40$ и разрешены только мемы Сст, а размножение продолжается до смерти, то в результате величина Сст составляет около 0,067, ПЖ $\approx 30,1$ (рис. 3, б, столбец 5). В этом случае пострепродуктивного периода нет, т.к. размножение продолжается на протяжении всей жизни. Если с те-

ми же параметрами размножение прекращается после 18 лет, то в результате величина $S_{ст}$ составляет около 0,014, ПЖ $\approx 86,9$ лет. Таким образом, в ходе культурной эволюции появляется очень длинный пострепродуктивный период. В этом случае ни группа не нуждается в нем (нет охотничьей культуры, так что все индивиды охотятся с одинаковой эффективностью, независимо от возраста), ни гены индивидов (потому что долгожители не размножаются). Единственными действующими агентами, которые «хотят», чтобы индивиды жили дольше, являются мемы: длинный пострепродуктивный период возникает в результате эгоистичной культурной (меметической) эволюции. Групповой отбор не мешает этому, потому что (1) долгожители не тратят ресурсы на размножение и поэтому никогда не пропускают охоту вследствие нехватки ресурсов; (2) уровень рождаемости низок, и поэтому конкуренция за ресурсы не очень интенсивна; (3) из-за отсутствия эгоистичной культуры ресурсы в пределах групп делятся поровну между всеми членами группы; (4) молодые особи, которые еще не выучили много мемов $S_{ст}$, не тратят дополнительные ресурсы на жизнеобеспечение, но расходуют их вместо этого на размножение. Таким образом, культура «кирпичных домов» не ухудшает конкурентоспособность группы, и групповой отбор не препятствует ее эволюции. Для сравнения, в ситуации с теми же параметрами, но с генетической (а не культурной) эволюцией $S_{ст}$, величина $S_{ст}$ стабилизируется на уровне около 0,185, ПЖ $\approx 15,5$ (если размножение продолжается до смерти; рис. 3, а, столбец 5) или $S_{ст} \approx 0,208$, ПЖ $\approx 14,4$ (если размножение прекращается после 18). Это консенсус, достигнутый групповым и индивидуальным отбором по вопросу об «эволюционных интересах генов». Как мы видим, гены в этой ситуации «не нуждаются» в наличии пострепродуктивного периода.

Эти примеры показывают, что культурная эволюция $S_{ст}$ способна приводить к появлению длинного пострепродуктивного периода в различных ситуациях, включая те, в которых генетическая эволюция $S_{ст}$ не способна этого сделать.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многие специалисты полагают, что основные механизмы дарвиновской эволюции (такие как отбор, мутации, дрейф, миграция и рекомбинация) лишь частично объясняют эволюцию людей и других животных, способных к социальному обучению, и что некоторые аспекты их эволюции лучше описываются теорией «двой-

ной наследственности» и моделями генно-культурной коэволюции [1, 9, 11, 55, 65, 66]. В соответствии с этим представлением моделирование выявило сложное взаимодействие между (1) культурной эволюцией полезных для группы и индивидуально полезных поведенческих признаков, (2) генетической эволюцией мозга и способностей к социальному обучению и (3) генетической и (или) культурной эволюцией старения и ПЖ у моделируемых социальных животных.

Особого упоминания заслуживают следующие моменты.

Скорость старения, или увеличения вероятности смерти с возрастом ($S_{ст}$), по-разному влияет на скорость эволюции других адаптивных признаков. Моделирование подтвердило, что $S_{ст}$ и ПЖ могут влиять на скорость развития других адаптивных признаков (как индивидуально полезных, так и выгодных для группы). Направление этого влияния может быть разным. Быстрое старение может ускорить развитие некоторых признаков благодаря более быстрой смене поколений, но замедлить эволюцию других. Например, если признак более полезен (сильнее увеличивает дарвиновскую приспособленность особей) в популяции долгожителей, чем в популяции короткоживущих, то этот признак будет находиться под более сильным давлением отбора при низкой $S_{ст}$. Этот эффект может быть сильнее, чем эффект более длительного времени смены поколений, и в результате признак будет быстрее эволюционировать в популяции долгоживущих особей.

$S_{ст}$ не эволюционирует ради ускорения эволюции других признаков (старение не является адаптацией для более быстрой адаптивной эволюции). Моделирование не подтверждает, что старение может эволюционировать как средство для ускорения эволюции других адаптивных признаков [67]. Дело в том, что скорость старения сама по себе является важным адаптивным признаком, который находится под прямым и очень строгим контролем естественного отбора. Конкретнее, увеличение ПЖ, при прочих равных условиях, значительно повышает дарвиновскую приспособленность особей, в то время как затраты ресурсов, необходимых для повышения выживаемости, уменьшают ее. В результате устанавливается равновесный уровень $S_{ст}$, зависящий от параметров. На фоне этого первичного, прямого давления отбора на $S_{ст}$, гипотетические вторичные, косвенные эффекты, связанные с тем, что некоторые другие признаки эволюционируют быстрее или медленнее при разных уровнях $S_{ст}$, не обнаруживаются (даже при наличии сильного группового отбора).

Равновесные (эволюционно устойчивые) уровни Сст и ПЖ зависят от МГК. Если увеличение ПЖ связано с затратами ресурсов, а группы конкурируют за ресурсы, то в отсутствие культуры групповой отбор работает на уменьшение ПЖ. При слабой МГК индивидуальный отбор на увеличение ПЖ выходит на первый план, и в ходе эволюции может развиться большая ПЖ, потому что на индивидуальном уровне выгоды от продления жизни могут перевесить значительные затраты ресурсов.

Культура обычно способствует генетической эволюции медленного старения и долгой жизни, что, в свою очередь, способствует культурному развитию. Культурная эволюция может создавать новые культурно сконструированные среды, которые приводят к новым направлениям отбора, действующего на гены (создание культурной ниши) [9, 68, 69]. В соответствии с этим мы показали, что культурное развитие (накопление адаптивных знаний, передаваемых путем социального обучения) может привести, наряду с другими факторами, к более сильному отбору на увеличение ПЖ (т.е. на более медленное старение). Долгая жизнь позволяет индивидам накапливать больше знаний и, таким образом, делает культуру более полезной (т.е. усиливает положительное влияние культуры на дарвиновскую приспособленность индивидов и конкурентоспособность групп). Другими словами, если в общем пуле мемов популяции много полезных знаний, то как для отдельных индивидов, так и для групп выгоднее, чтобы индивиды жили дольше. Индивидуально полезная (например, эгоистичная или макиавеллистская) культура сильнее способствует генетической эволюции долгожительства, когда МГК слаба, в то время как культура, полезная для группы (например, охотничья) делает это, когда МГК сильна. Более того, поскольку долгая ПЖ способствует развитию культурно обусловленных признаков (потому что долгожители накапливают больше мемов и передают их большему количеству реципиентов), может возникнуть положительная обратная связь между генетической эволюцией ПЖ и культурной эволюцией других адаптивных признаков.

Культурная эволюция Сст (ПЖ) в целом подчиняется тем же законам, что и генетическая эволюция, но имеет свои особенности. Различия между культурной эволюцией ПЖ и генетической эволюцией того же признака объясняются несколькими причинами, из которых две, вероятно, являются наиболее важными. Во-первых, из-за того, что воспроизводство мемов не связано неразрывно с воспроизводством генов, некоторые категории мемов могут приобретать

вирусные свойства, а культурная эволюция может создавать признаки, снижающие дарвиновскую приспособленность индивидов. Типичным примером являются мемы, которые снижают риск смерти (мемы Сст с негативным эффектом): они могут распространяться в пуле мемов, даже если это невыгодно для генов, просто потому что эти мемы делают своих хозяев более эффективными распространителями мемов. Из-за этого чисто культурная эволюция Сст часто приводит к более низким значениям этого признака (и большей ПЖ), чем чисто генетическая эволюция того же признака. Во-вторых, мемы разных категорий конкурируют за одни и те же ресурсы (объем памяти индивидов и время обучения). Из-за этой конкуренции сильное развитие одних аспектов культуры (например, распространение мемов ЭО) может препятствовать развитию других (например, распространению мемов Сст).

Генетическая и культурная эволюции Сст (ПЖ) сложным образом влияют друг на друга. Если ПЖ эволюционирует как генетически, так и культурно, как это, вероятнее всего, имело место в реальной эволюции человека [4–7], то разворачивается сложный и довольно медленный процесс генно-культурной коэволюции. Типичным результатом этого процесса является общество, в котором молодые особи из-за генетической предрасположенности ведут более рискованный образ жизни в обмен на возможность получить дополнительные ресурсы. Однако с возрастом они накапливают знания, которые помогают снизить риск смерти за счет дополнительных затрат. Вероятно, это похоже на то, что происходило в реальной эволюции: врожденная Сст снизилась у людей умеренно по сравнению с другими обезьянами, но популяции накопили большое количество способствующих выживанию знаний и способов поведения. Последнее действовало как эволюционный буфер (аналог адаптивной фенотипической пластичности [57]), который замедлял генетическую эволюцию низкой Сст и долгой жизни.

Культурный драйв способствует развитию большей ПЖ, что, в свою очередь, усиливает культурный драйв. Моделирование подтвердило эффективность гипотетической петли положительной обратной связи, которая усиливает культурный драйв (автокаталитическую совместную эволюцию мозга, социального обучения и культуры) за счет продления жизни особей. Долгая жизнь способствует развитию культуры и мозга, а развитая культура, в свою очередь, способствует эволюции большей ПЖ.

Культура может вносить вклад в развитие длительного пострепродуктивного периода.

Моделирование подтвердило возможность генетической эволюции длительного пострепродуктивного периода за счет «культурного группового отбора». Это может произойти, если наличие долгожителей, которые с помощью социального обучения накопили ценные знания, повышает конкурентоспособность группы. Предпосылками являются наличие МГК и культуры, полезной для группы. В отсутствие МГК культурный драйв стимулируется только индивидуально полезными знаниями и индивидуальным отбором, в то время как культуре, полезной для группы, отбор не благоприятствует. Индивидуальный отбор не может обеспечить генетическую эволюцию пострепродуктивного периода, т.к. индивидуальная приспособленность не увеличивается из-за того, что индивиды остаются в живых после прекращения размножения независимо от наличия или отсутствия культуры. Кроме того, индивидуально полезное знание перестает быть полезным с эволюционной точки зрения, когда размножение прекращается. Однако очевидно, что если пострепродуктивные особи могут делиться своими ресурсами с родственниками, то пострепродуктивный период может эволюционировать генетически даже в отсутствие МГК, т.к. это увеличивает инклюзивную (совокупную) приспособленность [8, 64]. Другая возможность эволюции пострепродуктивного периода в отсутствие МГК и полезной для группы культуры связана с культурной эволюцией Ст (ПЖ), т.е. с распро-

странением знаний, которые непосредственно удлиняют жизнь. Такие мемы имеют вирусные свойства: они распространяются в пуле мемов и «заставляют» индивидов жить дольше, даже если это приводит к снижению дарвиновской приспособленности особей.

В целом, моделирование показало многочисленные и разнообразные возможности сложных взаимодействий между эволюцией мозга, культуры и ПЖ. Потребуется много дополнительных исследований, чтобы понять, какие из этих взаимодействий действительно имели место в процессе эволюции человека и какова их относительная важность.

Благодарности. Мы благодарим В.И. Голощапова за оптимизацию программного кода, позволившую завершить моделирование в разумные сроки, Е.Б. Наймарк за содержательное обсуждение статьи, двух анонимных рецензентов за полезные замечания, Г.А. Шиловского за неоценимую помощь при подготовке русского текста статьи.

Финансирование. Это исследование не получало какого-либо специального финансирования.

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

- Laland, K. N. (2017) *Darwin's Unfinished Symphony. How Culture Made the Human Mind*, Princeton & Oxford: Princeton University Press.
- Lewis, H. M., and Laland, K. N. (2012) Transmission fidelity is the key to the build-up of cumulative culture, *Phil. Trans. R. Soc. B*, **367**, 2171-2180, doi: 10.1098/rstb.2012.0119.
- Morgan, T. J. H., Uomini, N. T., Rendell, L. E., Chouinard-Thuly, L., Street, S. E., et al. (2015) Experimental evidence for the co-evolution of hominin tool-making teaching and language, *Nat. Commun.*, **6**, 6029, doi: 10.1038/ncomms7029.
- Finch, C. E. (2010) Evolution of the human lifespan and diseases of aging: Roles of infection, inflammation, and nutrition, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 1718-1724.
- Finch, C. E., and Stanford, C. B. (2004) Meat-adaptive genes and the evolution of slower aging in humans, *Q. Rev. Biol.*, **79**, 3-50.
- 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.
- Skulachev, V. P., Shilovsky, G. A., Putyatina, T. S., Popov, N. A., Markov, A. V., et al. (2020) Perspectives of *Homo sapiens* lifespan extension: focus on external or internal resources? *Aging (Albany NY)*, **12**, 5566.
- Johnstone, R. A., and Cant, M. A. (2010) The evolution of menopause in cetaceans and humans: the role of demography, *Proc. R. Soc. B*, **277**, 3765-3771.
- Ross, C. T., and Richerson, P. J. (2014) New frontiers in the study of human cultural and genetic evolution, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **29**, 103-109.
- Kirkwood, T. B. L. (2003) Age differences in evolutionary selection benefits, In *Understanding Human Development* (Staudinger, U. M., and Lindenberger, U., eds) Springer, Boston, MA, pp. 45-57.
- Henrich, J. (2015) *The Secret of our Success: How Culture is Driving Human Evolution, Domesticating our Species, and Making us Smarter*, Princeton, Princeton University Press.
- Muthukrishna, M., Doebeli, M., Chudek, M., and Henrich, J. (2018) The cultural brain hypothesis: how culture drives brain expansion, sociality, and life history, *PLoS Comput. Biol.*, **14**, e1006504, doi: 10.1371/journal.pcbi.1006504.
- Markov, A. V., and Markov, M. A. (2020) Runaway brain-culture coevolution as a reason for larger brains: exploring the "cultural drive" hypothesis by computer modeling, *Ecol. Evol.*, **10**, 6059-6077, doi: 10.1002/ece3.6350.
- Lovejoy, C. O. (2009) Reexamining human origins in light of *Ardipithecus ramidus*, *Science*, **326**, 74-74.e8, doi: 10.1126/science.1175834.

15. Raghanti, M. A., Edler, M. K., Stephenson, A. R., Munger, E. L., Jacobs, B., et al. (2018) A neurochemical hypothesis for the origin of hominids, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, E1108-E1116, doi: 10.1073/pnas.1719666115.
16. Stanyon, R., and Bigoni, F. (2014) Sexual selection and the evolution of behavior, morphology, neuroanatomy and genes in humans and other primates, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **46**, 579-590, doi: 10.1016/j.neubiorev.2014.10.001.
17. Holloway, R. L. (2015) The evolution of the hominid brain, In *Handbook of Paleoanthropology* (Henke, W., and Tattersall, I., eds) Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag, pp. 1961-1987.
18. Leigh, S. R. (2012) Brain size growth and life history in human evolution, *Evol. Biol.*, **39**, 587-599, doi: 10.1007/s11692-012-9168-5.
19. Neubauer, S., and Hublin, J.-J. (2012) The evolution of human brain development, *Evol. Biol.*, **39**, 568-586, doi: 10.1007/s11692-011-9156-1.
20. Rightmire, G. P. (2004) Brain size and encephalization in early to Mid-Pleistocene Homo, *Am. J. Phys. Anthropol.*, **124**, 109-123, doi: 10.1002/ajpa.10346.
21. Roth, G., and Dicke, U. (2005) Evolution of the brain and intelligence, *Trends Cognit. Sci.*, **9**, 250-257, doi: 10.1016/j.tics.2005.03.005.
22. Sherwood, C. C., Subiaul, F., and Zawidzki, T. W. (2008) A natural history of the human mind: tracing evolutionary changes in brain and cognition, *J. Anatomy*, **212**, 426-454, doi: 10.1111/j.1469-7580.2008.00868.x.
23. Miller, I. F., Barton, R. A., and Nunn, C. L. (2019) Quantitative uniqueness of human brain evolution revealed through phylogenetic comparative analysis, *eLife*, **8**, e41250, doi: 10.7554/eLife.41250.
24. Gavrilets, S., and Vose, A. (2006) The dynamics of Machiavellian intelligence, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 16823-16828, doi: 10.1073/pnas.0601428103.
25. Heyes, C. (2012) New thinking: the evolution of human cognition, *Phil. Trans. R. Soc. B*, **367**, 2091-2096, doi: 10.1098/rstb.2012.0111.
26. Laland, K. N., and Rendell, L. (2013) Cultural memory, *Curr. Biol.*, **23**, R736-R740, doi: 10.1016/j.cub.2013.07.071.
27. Whiten, A., Ayala, F. J., Feldman, M. W., and Laland, K. N. (2017) The extension of biology through culture, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 7775-7781, doi: 10.1073/pnas.1707630114.
28. Kaplan, H. S., and Robson, A. J. (2002) The emergence of humans: the coevolution of intelligence and longevity with intergenerational transfers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 10221-10226.
29. Caspari, R., and Lee, S.-H. (2004) Older age becomes common late in human evolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 10895-10900.
30. Crews, D. E. (2003) *Human Senescence: Evolutionary and Biocultural Perspectives*, Cambridge University Press, Cambridge.
31. Navarrete, A. F., Reader, S. M., Street, S. E., Whalen, A., and Laland, K. N. (2016) The coevolution of innovation and technical intelligence in primates, *Phil. Trans. R. Soc. B*, **371**, 20150186, doi: 10.1098/rstb.2015.0186.
32. Reader, S. M., and Laland, K. N. (2002) Social intelligence, innovation, and enhanced brain size in primates, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 4436-4441, doi: 10.1073/pnas.062041299.
33. Street, S. E., Navarrete, A. F., Reader, S. M., and Laland, K. N. (2017) Coevolution of cultural intelligence, extended life history, sociality, and brain size in primates, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 7908-7914.
34. Fox, K. C. R., Muthukrishna, M., and Shultz, S. (2017) The social and cultural roots of whale and dolphin brains, *Nat. Ecol. Evol.*, **1**, 1699-1705, doi: 10.1038/s41559-017-0336-y.
35. Frankenhuys, W. E., and Nettle, D. (2020) Current debates in human life history research, *Evol. Hum. Behav.*, **41**, 469-473.
36. Stearns, S. C., and Rodrigues, A. M. M. (2020) On the use of "life history theory" in evolutionary psychology, *Evol. Hum. Behav.*, **41**, 474-485.
37. Stanford, C. B. (1999) *The Hunting Apes: Meat Eating and the Origins of Human Behavior*, Princeton University Press, Princeton.
38. Reeve, H. K., and Hölldobler, B. (2007) The emergence of a superorganism through intergroup competition, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 9736-9740, doi: 10.1073/pnas.0703466104.
39. Byrne, R. W., and Whiten, A. (1988) *Machiavellian Intelligence: Social Expertise and the Evolution of Intellect in Monkeys, Apes and Humans*, Clarendon Press, Oxford.
40. Humphrey, N. K. (1976) The social function of intellect, in *Growing Points in Ethology* (Bateson, P. P. G., and Hinde, R. A. eds) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 303-317.
41. Darwin, C. R. (1874) *The Descent of Man, and Selection in Relation to Sex* (2nd Edn.) Appleton, New York, NY.
42. Richerson, P. J., Baldini, R., Bell, A. V., Demps, K., Frost, K., et al. (2016) Cultural group selection plays an essential role in explaining human cooperation: A sketch of the evidence, *Behav. Brain Sci.*, **39**, e30.
43. Van Schaik, C. P., Isler, K., and Burkart, J. M. (2012) Explaining brain size variation: from social to cultural brain, *Trends Cognit. Sci.*, **16**, 277-284, doi: 10.1016/j.tics.2012.04.004.
44. Hublin, J.-J., Neubauer, S., and Gunz, P. (2015) Brain ontogeny and life history in Pleistocene hominins, *Phil. Trans. R. Soc. B*, **370**, 20140062.
45. Bolund, E. (2020) The challenge of measuring trade-offs in human life history research, *Evol. Hum. Behav.*, **41**, 502-512.
46. Hawkes, K., O'Connell, J. F., and Blurton Jones, N. G. (2001) Hadza meat sharing, *Evol. Hum. Behav.*, **22**, 113-142, doi: 10.1016/S1090-5138(00)00066-0.
47. Gilby, C. (2006) Meat sharing among the Gombe chimpanzees: Harassment and reciprocal exchange, *Animal Behav.*, **71**, 953-963, doi: 10.1016/j.anbehav.2005.09.009.
48. Sear, R. (2020) Do human 'life history strategies' exist? *Evol. Hum. Behav.*, **41**, 513-526.
49. Del Giudice, M. (2020) Rethinking the fast-slow continuum of individual differences, *Evol. Hum. Behav.*, **41**, 536-549.
50. Kramer, K. L., and Russell, A. F. (2015) Was monogamy a key step on the hominin road? Reevaluating the monogamy hypothesis in the evolution of cooperative breeding, *Evol. Anthropol.*, **24**, 73-83.
51. Skulachev, V. P. (1999) Phenoptosis: programmed death of an organism, *Biochemistry (Moscow)*, **64**, 1418-1426.
52. Weismann, A. (1889) *Essays upon Heredity and Kindred Biological Problems*, Clarendon press, Oxford.
53. Longo, V. D., Mitteldorf, J., and Skulachev, V. P. (2005) Programmed and altruistic ageing, *Nat. Rev. Genet.*, **6**, 866-872, doi: 10.1038/nrg1706.
54. 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.
55. Creanza, N., Kolodny, O., and Feldman, M. W. (2017) Cultural evolutionary theory: How culture evolves and why it matters, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 7782-7789.

56. Tacutu, R., Thornton, D., Johnson, E., Budovsky, A., Barardo, D., et al. (2018) Human Ageing Genomic Resources: new and updated databases, *Nucleic Acids Res.*, **46**, D1083-D1090.
57. Ghalambor, C. K., Hoke, K. L., Ruell, E. W., Fischer, E. K., Reznick, D. N., et al. (2015) Non-adaptive plasticity potentiates rapid adaptive evolution of gene expression in nature, *Nature*, **525**, 372-375.
58. Grether, G. F. (2005) Environmental change, phenotypic plasticity, and genetic compensation, *Am. Nat.*, **166**, E115-E123.
59. Lahdenperä, M., Gillespie, D. O. S., Lummaa, V., and Russell, A. F. (2012) Severe intergenerational reproductive conflict and the evolution of menopause, *Ecol. Lett.*, **15**, 1283-1290, doi: 10.1111/j.1461-0248.2012.01851.x.
60. Maklakov, A. A., and Lummaa, V. (2013) Evolution of sex differences in lifespan and aging: causes and constraints, *BioEssays*, **35**, 717-724.
61. Williams, G. C. (1957) Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence, *Evolution*, **11**, 398-411.
62. Hamilton, W. D. (1966) The moulding of senescence by natural selection, *J. Theor. Biol.*, **12**, 12-45.
63. Hawkes, K., O'Connell, J. F., Blurton-Jones, N. G., Alvarez, H., and Charnov, E. L. (1998) Grandmothering, menopause, and the evolution of human life histories, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 1336-1339.
64. Sear, R., and Mace, R. (2008) Who keeps children alive? A review of the effects of kin on child survival, *Evol. Hum. Behav.*, **29**, 1-18.
65. Whitehead, H., Laland, K. N., Rendell, L., Thorogood, R., and Whiten, A. (2019) The reach of gene-culture coevolution in animals, *Nat. Commun.*, **10**, 2405, doi: 10.1038/s41467-019-10293-y.
66. Boyd, R., and Richerson, P. J. (1985) *Culture and the Evolutionary Process*, The University of Chicago Press.
67. Markov, A. V., Barg, M. A., and Yakovleva, E. Yu. (2018) Can aging develop as an adaptation to optimize natural selection? (Application of computer modeling for searching some conditions when the "fable about hares" is possible to explain the evolution of aging), *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 1504-1516.
68. Laland, K. N., and O'Brien, M. J. (2011) Cultural niche construction: an introduction, *Biol. Theory*, **6**, 191-202, doi: 10.1007/s13752-012-0026-6.
69. Laland, K. N., Odling-Smee, J., and Feldman, M. W. (2001) Cultural niche construction and human evolution, *J. Evol. Biol.*, **14**, 22-33, doi: 10.1046/j.1420-9101.2001.00262.x.

COEVOLUTION OF THE BRAIN, CULTURE, AND LIFESPAN: INSIGHTS FROM COMPUTER SIMULATIONS

Alexander V. Markov^{1,2*} and Mikhail A. Markov¹

¹ *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119991 Moscow, Russia; e-mail: markov_a@inbox.ru*

² *Paleontological Institute of the Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia*

Humans possess a number of traits which are rare or absent in other primates, including large brain size, culture, language, extended lifespan (LS) and long post-reproductive period. Here, we use a computer model, TribeSim, originally designed to explore the autocatalytic coevolution of the hominin brain and culture within the framework of the "cultural drive" theory, to find out how culture and brain could coevolve with LS (or rate of aging). We show that in the absence of culture, the evolution of LS depends on the intensity of between-group competition (BGC): strong BGC results in shorter LS. Culture, however, favors the genetic evolution of longer LS even if BGC is strong. Extended LS, in turn, enhances cultural development, thus creating positive feedback. Cultural evolution of LS (accumulation of survival-enhancing or survival-impairing knowledge) differs from the genetic evolution of the same trait, partially because those "memes" (ideas, skills, and behaviors) that reduce the risk of death tend to spread in the meme pool even if it is not beneficial to genes. Consequently, cultural evolution of aging tends to result in longer LS than genetic evolution of the same trait. If LS evolves both genetically and culturally, the typical result is a society in which young individuals, due to their genetic predisposition, lead a riskier lifestyle in exchange for a chance to gain additional resources, but with age, they accumulate survival-enhancing knowledge. Simulations also showed that cultural evolution of adaptive behaviors can contribute to the genetic evolution of a long post-reproductive period, e.g., if the presence of knowledgeable long-livers increases the competitiveness of the group.

Keywords: evolution of lifespan, aging, post-reproductive period, gene-culture coevolution, cultural drive, runaway brain-culture coevolution

УДК 577.24

СУЩЕСТВУЮТ ЛИ ДОКАЗАТЕЛЬСТВА В ПОЛЬЗУ СУБТЕЛОМЕРНО-ТЕЛОМЕРНОЙ ТЕОРИИ СТАРЕНИЯ?

Обзор

© 2021 G. Libertini^{1,2*}, O. Shubernetskaya³, G. Corbi^{4,5}, and N. Ferrara^{2,6}

¹ Member of the Italian Society for Evolutionary Biology (SIBE), 14100 Asti, Italy; e-mail: giacinto.libertini@yahoo.com

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

³ Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, 117997 Moscow, Russia

⁴ Department of Medicine and Health Sciences, University of Molise, 86100 Campobasso, Italy

⁵ Italian Society of Gerontology and Geriatrics (SIGG), 50129 Firenze, Italy

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

Поступила в редакцию 16.06.2021

После доработки 30.07.2021

Принята к публикации 02.09.2021

Теломерная теория описывает механизм клеточного старения, согласно которому старение происходит в основном за счет укорочения теломер при каждой дупликации клеток. Субтеломерно-теломерная теория лишена ряда недостатков первой теории и постулирует значительную роль субтеломерной ДНК в механизмах старения. В настоящей работе проведен углубленный анализ соответствия между положениями и следствиями субтеломерно-теломерной теории и результатами экспериментов. В частности, проанализированы данные касательно взаимосвязи между старением и i) эпигенетическими модификациями; ii) окислением и воспалением; iii) защитой теломеры; iv) теломерным гетерохроматиновым кэпом; v) постепенным клеточным старением; vi) клеточным старением; vii) угасанием организма по мере укорочения теломер. В целом, приведенные в работе данные свидетельствуют в пользу субтеломерно-теломерной теории или, по крайней мере, ей не противоречат. Вкратце, феномен клеточного старения, которое через различные пути в конечном итоге обуславливает старение всего организма, в значительной степени зависит от эпигенетических модификаций, регулируемых системой субтеломера–теломера–теломерный кэп–теломераза. Процессы, опосредующие клеточное старение, по-видимому, не являются случайными, неизбежными и необратимыми, а, скорее, вызываются и регулируются генетически предопределенными механизмами, соответственно, они подвержены изменениям и могут быть обратимы соответствующими способами. В целом, приведенные данные поддерживают тезис о том, что старение является генетически запрограммированным и регулируемым фенотипическим явлением и свидетельствуют против предположения, что старение вызвано случайным и неизбежным действием дегенеративных факторов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: старение, фенотипоз, теломера, субтеломера, эпигенетические изменения, постепенное клеточное старение, клеточное старение, теломерный гетерохроматиновый кэп.

DOI: 10.31857/S0320972521120022

ВВЕДЕНИЕ

В этом разделе будет представлен набор концепций и фактов, уже рассмотренных в недавно опубликованных работах [1–3], и для краткости большинство ссылок будут опущены.

Для объяснения феномена старения используются две противоположные парадигмы. В случае первой парадигмы, «непрограммированного или неадаптивного старения», последнее обусловлено случайным накоплением эффектов различных дегенеративных факторов, которым не было оказано достаточного противостояния в ходе естественного отбора.

Многие теории принадлежат к первой парадигме [3]. В первой большой группе теорий высказывается предположение, что старение является неизбежным следствием накопления повреждений различного типа. На сегодняшний день многие теории из этой группы представляют интерес только с исторической точки зрения. Они берут начало в XIX и первой половине XX века и объясняют старение «износом» клеток, механохимическим разрушением клеточных коллоидов, неизбежными тканеспецифичными изменениями (нервной, эндокринной, сосудистой и соединительнотканной систем), токсичными продуктами жизнедеятельности кишечных бактерий, накоплением «метаплазмы» или метаболитов и др. К этой группе также

* Адресат для корреспонденции.

относятся различные модернизированные популярные теории и современные концепции, которые связывают старение с накоплением химических повреждений из-за ошибок транскрипции ДНК, пагубными последствиями окисления, воздействием свободных радикалов на весь организм в целом, а также на митохондрии или ДНК, воспалительными явлениями и возраст-зависимыми нарушениями работы иммунной системы (инфламейджинг, «inflammaging»). Отдельные работы, посвященные этим теориям, процитированы ниже в разделе «Старение, окисление и воспаление».

В других популярных теориях непрограммированного старения, таких как гипотеза накопления мутаций, гипотеза антагонистической плейотропии и гипотеза одноразовой сомы, все же в какой-то мере учитываются механизмы эволюции.

Несмотря на огромное разнообразие этих теорий, всех их объединяет одна фундаментальная концепция. Поскольку старение определенно вредно для индивида, то естественный отбор может работать только на то, чтобы противостоять старению. Следовательно, недопустимо или неприемлемо существование адаптивных физиологических механизмов любого рода, которые могут определять старение.

В случае второй парадигмы, «программированного или адаптивного старения», оно предопределено и модулируется генами, которым на супраиндивидуальном уровне благоприятствует естественный отбор, даже в том случае, когда они имеют негативный эффект на уровне индивида и принадлежат к категории фенотипического феномена (принесение в жертву индивида согласно механизмам супраиндивидуального отбора) [4, 5].

Теорий, принадлежащих ко второй парадигме, немного [3], и они требуют существования специфических механизмов, опосредующих старение. Следовательно, эмпирические данные, демонстрирующие существование таких механизмов, решительно поддерживают обоснованность теорий, принадлежащих второй парадигме, и выступают против допустимости первой парадигмы и соответствующих ей теорий.

В течение определенного периода в основном в контексте и в поддержку второй парадигмы считалось, что прогрессирующее укорочение теломер при каждой дупликации клеток может быть прямым и достаточным объяснением старения (данное положение можно сформулировать как «теломерная теория старения»). Тем не менее выводы, следующие из этой теории, оказались в противоречии с различными фактами, например:

i) У хомяков и мышей теломеры обладают большей длиной по сравнению с человеком, но при этом продолжительность их жизни намного короче [6]. При сравнении различных видов не было обнаружено соответствия между продолжительностью жизни и длиной теломеры [7]. Более того, в различных экспериментах было продемонстрировано аналогичное отсутствие соответствия у индивидов одного вида, но с различной длиной теломеры в первых зародышевых клетках (например, между донором и клонированным животным [8, 9]; другие примеры и более подробные обсуждения см. в работе [10], стр. 59–61).

ii) Elizabeth Blackburn обнаружила [11], что в синхронно делящихся культурах клеток клеточное старение достигается не после определенного числа дупликаций, а уже с первых дупликаций наблюдается прогрессивно возрастающая вероятность активации процесса клеточного старения [12, 13]. Таким образом, запуск программы клеточного старения инициируется не при достижении теломерой определенной критической длины – существует лишь вероятностная связь между активацией клеточного старения и уменьшением длины теломеры.

Указанные несоответствия теломерной теории, которая на самом деле представляет собой чрезмерно и неприемлемо упрощенное видение клеточного старения, могут быть устранены путем инкорпорирования в нее влияния укорочения теломеры на субтеломеру [10], что было сформулировано как «субтеломерно-теломерная теория» [1–3]. Эту теорию мы вкратце обсудим ниже со ссылкой на оригинальные работы, содержащие большую часть свидетельств в пользу этой теории:

1) теломеры представляют собой концевые участки молекул хромосомной ДНК, и, следовательно, число теломер в два раза превышает число таких молекул, поскольку каждая хромосома имеет два конца. В половых клетках длина каждой теломеры варьирует, и этот признак наследуется [14–16];

2) в первой клетке организма каждая теломера должна быть покрыта гетерохроматиновым капюшоном или кэпом (англ. «cap»), который соответствует длине теломеры (предположение);

3) длина кэпа при каждой последующей дупликации не изменяется (предположение), даже если при каждой дупликации происходит укорочение теломеры, обусловленное механизмом работы ДНК-полимеразы (если укорочение не полностью компенсируется теломеразой – ферментом, активность которого зависит от типа клетки);

4) в случае укорочения теломеры кэп, который, согласно предположению, имеет фиксированную длину, скользит по участку молекулы ДНК, прилегающему к теломере, называемому «субтеломера R» («R» означает регуляторный) [2], который содержит последовательности TERRA, кодирующие первичные регуляторные последовательности РНК (транскрипты TERRA), а не белки. Известны два типа последовательностей TERRA (TelBam3.4 и TelSau2.0) [17, 18], однако не исключено, что существуют и другие типы таких последовательностей;

5) последовательности TERRA характерны для эукариотических клеток и эволюционно консервативны [19];

6) последовательности TERRA могут быть охарактеризованы как «регуляторные последовательности первого уровня», а регулируемые ими последовательности — как «регуляторные последовательности второго уровня», поскольку транскрипты TERRA оказывают три типа регуляторных эффектов, включающих: (а) воздействие (повышение экспрессии) на участок молекулы ДНК, прилегающий к субтеломере R, названный «субтеломера A» («A» — амплификатор) [2], на той же теломере и других, содержащих регуляторные последовательности второго уровня, способствующих усилению и амплификации эффектов TERRA-транскриптов; б) воздействие (повышение или понижение уровня экспрессии) других регуляторных последовательностей второго уровня и локализованных на других (не субтеломерных участках) как на той же самой молекуле ДНК, так и на других молекулах ДНК в клетке; в) регуляторное влияние системы защиты теломеры с использованием кэпа. Были получены экспериментальные данные, подтверждающие, что: i) «TERRA связывается с мишенями на хроматине по всему геному ...TERRA связывается с теломерами как в *cis*-, так и в *trans*-положении в последовательностях генов или вблизи них» [20]; ii) продемонстрированы «...значительные изменения уровня экспрессии мишеней TERRA относительно участков, не являющихся мишенями, после деплеции TERRA...», что указывает на то, что гены-мишени TERRA с большей вероятностью страдают от деплеции TERRA... Интересно, что экспрессия субтеломерных генов-мишеней всегда снижалась...Экспрессия внутренних генов-мишеней может при этом как повышаться, так и понижаться...» [20]; iii) «TERRA связывается со многими локусами, расположенными вне теломер, в которых некодирующие последовательности ДНК, по-видимому, играют важную регуляторную роль, связанную с генной экспрессией [19–21]»; iv) «Подавляющее боль-

шинство сайтов связывания последовательностей TERRA было обнаружено за пределами теломерных участков в основном в отдаленных межгенных и интронных участках генома, где эти последовательности регулируют экспрессию генов. При этом важно то, что деплеция транскриптов TERRA в эмбриональных стволовых клетках (ЭСК, ESC — embryonic stem cells) также была ассоциирована со снижением уровня защиты теломер, указывая на то, что TERRA все же необходимы для целостности теломер мыши...» [19]; v) деплеция транскриптов TERRA, по-видимому, ассоциирована со снижением защиты теломер [20, 21];

7) вероятно, существует огромное множество регуляторных последовательностей второго уровня («В геноме эмбриональных стволовых клеток мыши мы идентифицировали тысячи *cis* и *trans* хроматин-связывающих сайтов» [20]), которые влияют на функционирование огромного числа генов и других предположительных регуляторных последовательностей;

8) в связи с нарастающей степенью репрессии последовательностей TERRA происходит постепенное изменение клеточных функций, которое определяется как «постепенное клеточное старение» [2], снижение уровня защиты теломер и повышение риска запуска процесса клеточного старения, «фундаментальной клеточной программы» [22], которая характеризуется стереотипными модификациями (изменение клеточных функций в высшей степени, т.е. постепенное клеточное старение, секреторный фенотип, ассоциированный с клеточным старением (SASP — senescence-associated secretory phenotype), повышающий риск возникновения онкологических заболеваний [23], блокирование способности к репликации, иначе — репликативное клеточное старение [22, 24], устойчивость к апоптозу [25, 26]). Усиливающееся подавление транскрипции последовательностей TERRA обуславливает увеличение доли клеток, находящихся в состоянии: 1) постепенного клеточного старения или 2) клеточного старения, т.е. изменения клеточных функций, включая SASP. Накопление этих двух типов клеток с измененными функциями и снижающееся число пролиферирующих клеток в процессе клеточного старения приводит к усилению изменений во всех органах и тканях, определяемое как «синдром атрофии», и далее — к снижению уровня физического состояния (формы), т.е. к старению [3];

9) в итоге первоначальные наблюдения Blackburn были ею подтверждены в соответствии с функциями, которые в дальнейшем были приписаны последовательностям TERRA (см. выше), что приводило к следующим поло-

жениям: 1) теломера слабо ассоциирована с кэ-пом и может находиться в двух состояниях («колебаться» между ними), закрытом и открытом («capped» и «uncapped»); 2) в открытом состоянии она подвергается активации блокирования способности к репликации (т.е. клеточному старению); 3) по мере укорочения теломеры доля открытого состояния увеличивается. Поэтому клетки, вероятно, существуют в двух состояниях: клетки, которые проходят клеточный цикл (cycling cells) и клетки, вышедшие из клеточного цикла. С самого начала пассирования отдельные клетки случайным образом выпадают из популяции клеток, проходящих клеточный цикл. Частота выпадения из клеточного цикла постоянно увеличивается до тех пор, пока популяция как целое не перестанет удваиваться ... полагают, что даже в начале пассирования теломеры, хотя и относительно длинные, имеют конечную (хотя исходно низкую) вероятность декэпирования... декэпированная теломера подает сигнал клетке выйти из клеточного цикла... случайная и увеличивающаяся вероятность переключения в декэпированное состояние и перехода клетки в состояние вне клеточного цикла. Такие положения могли бы объяснить ряд наблюдений. В культурах клеток человека две митотические сестринские клетки могут обладать сильно различающимися возможностями пролиферации [13], даже если они имеют сходные по длине теломеры... у нокаутированных по теломеразе мышей слияние теломер и влияние недостатка теломеразы возрастают неуклонно по частоте и тяжести с увеличением числа последующих поколений, а не проявляются внезапно только в поздних поколениях... У дрожжей клеточное старение также стохастично и прогрессирует в клеточной популяции... новая модель избавляет от необходимости в определении «критической» длины теломеры» [11].

Указанные положения представлены в кратком виде на рис. 1.

Что касается длительноживущих клеток, то ухудшение их состояния объясняется сокращением числа сателлитных клеток, что обсуждается в других работах [27].

В настоящей работе мы попытались проверить, противоречат ли имеющиеся экспериментальные данные субтеломерно-теломерной теории (или хотя бы являются совместимыми с ней) или же, напротив, они её подтверждают.

МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК ПРИ СТАРЕНИИ

Эпигенетические модификации ДНК непосредственным образом связаны с возрастом ор-

ганизма. В частности, метилирование ДНК (метилирование остатка цитозина по 5-му положению в динуклеотиде CpG) является предметом растущего числа исследований, показывающих, среди прочего, что в эмбриональных и индуцированных плюрипотентных стволовых клетках (иПСК, iPSCs – induced pluripotent stem cells) оно близко к нулю и коррелирует с числом пассажей клеток [28, 29]. Эпигенетические характеристики ДНК различаются в зависимости от типа клеток и тканей [30, 31], аналогичные вариации наблюдаются в случае возрастных изменений [32, 33].

Метилирование ДНК, связанное с возрастом, в отдельных случаях представляет собой гиперметилирование, а в других – гипометилирование [32, 34–36].

Помимо эпигенетических вариаций, связанных с типом клеток и тканей, полом и наличием заболеваний, существуют последовательности CpG, для которых также характерны возрастные изменения профиля метилирования ДНК [35–40].

Для генома человека были предложены индикаторы, предсказывающие возраст с использованием только этих типов метилирования ДНК [28, 40, 41]. Самым надежным оказался индикатор, предложенный Horvath, который демонстрирует корреляцию с возрастом, равную 0,96, и ошибку, равную 3,6 года [28]. Существование сходных эпигенетических модификаций было продемонстрировано и для млекопитающих в целом в работе на 59 типах тканей, принадлежащих 128 видам из 15 филогенетических родов (с максимальной продолжительностью жизни от 3,8 до 211 лет и весом взрослых особей от 0,004 до 100 кг). Были смоделированы эпигенетические часы «с превосходной точностью ($r > 0,96$)» и со «средней относительной ошибкой менее 3,5%» [29].

Помимо метилирования ДНК, существуют и другие возрастные эпигенетические изменения, которые включают снижение уровня ремоделинга гетерохроматина, нуклеосом, изменение гистоновых меток [42, 43], метилирование гистонов [44, 45], «снижение общего уровня основных гистонов, изменение паттерна посттрансляционной модификации гистонов..., замену канонических гистонов на их различные модификации, а также изменение уровня экспрессии некодирующих РНК» [46]. Тем не менее надежных индексов для предсказания возраста на основе таких эпигенетических модификаций, подобных индексам, описанным для метилирования ДНК, предложено не было [28, 29].

Эти данные легли в основу концепции, заключающейся в том, что на клеточном уровне старение представляет собой эпигенетическое

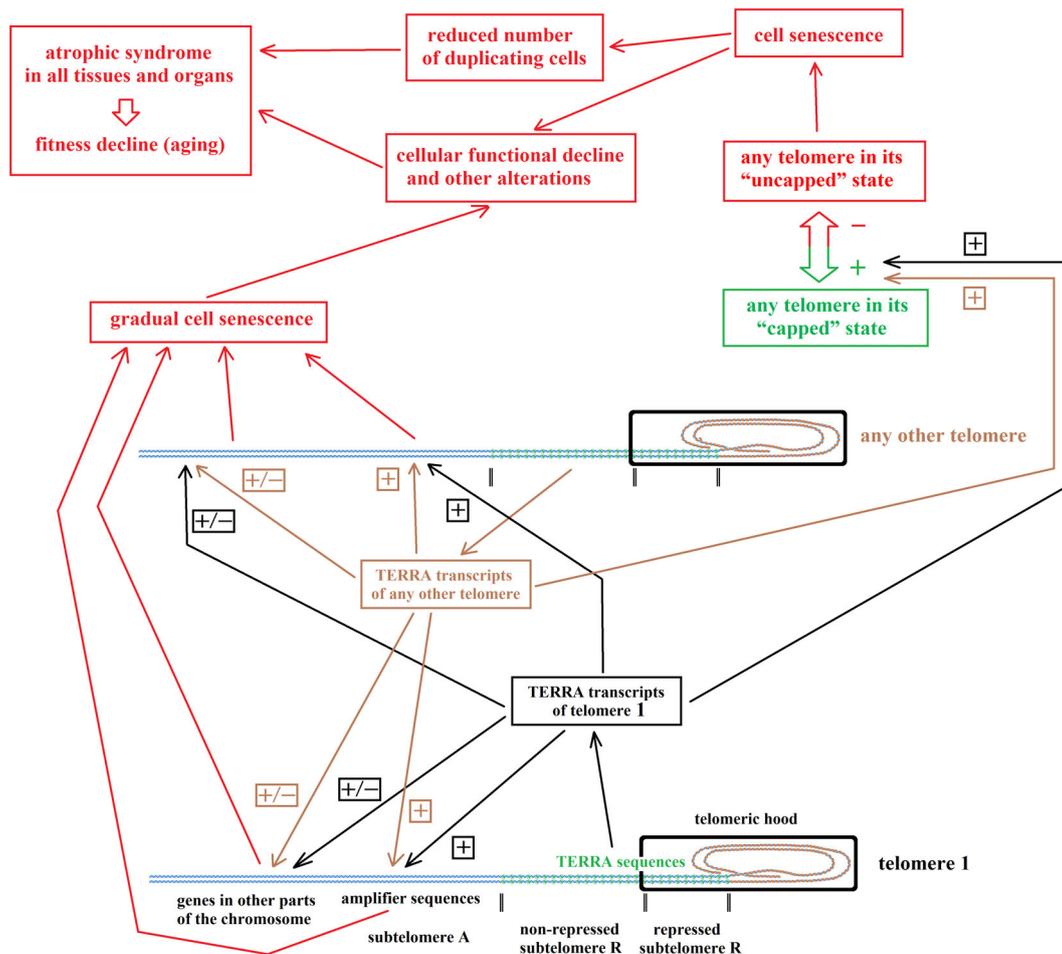


Рис. 1. Транскрипция последовательностей TERRA в субтеломере R приводит к появлению транскриптов TERRA, которые вызывают повышение или понижение уровня экспрессии других регуляторных последовательностей в субтеломере A или других участках, расположенных на той же самой хромосоме или на других хромосомах. Скольжение теломерного гетерохроматинового ээпа вызывает прогрессирующее подавление субтеломеры R. В то же время происходит укорочение теломеры. Снижение уровня транскрипции последовательностей TERRA определяет постепенное клеточное старение и увеличивающуюся вероятность клеточной сенесцентности. В тканях и органах это приводит к снижению средней функциональности клеток и числа делящихся клеток, вызывая ухудшение физического состояния всего организма, т.е. старение; [+] и [-] означают повышение и понижение экспрессии соответственно, в отношении других последовательностей или состояния теломеры; черным цветом показано действие последовательностей TERRA или транскриптов на другие последовательности на той же молекуле ДНК (обозначенной как теломера 1); коричневым цветом показано действие транскриптов TERRA на последовательности любой другой молекулы ДНК; красным цветом показано действие в контексте сложных механизмов, приводящих к ухудшению физического состояния организма; нетеломерная ДНК, теломерная ДНК и петля концевой участка теломеры на графике различаются по дизайну и цвету без каких-либо дополнительных уточнений

явление (например, [47]), приводящей к положению о том, что старение всего организма также зависит от клеточных эпигенетических модификаций. Тем не менее, несмотря на то что эта идея основана на хорошо документированных данных, это не обязательно означает, что эпигенетические изменения являются первичными и не имеют отношения к другим механизмам. Во-первых, следует отметить, что эпигенетические изменения ограничиваются специфическими участками ДНК. Метилирование ДНК: — затрагивает те участки ДНК, в последовательности которых часто встречается динуклео-

тид CpG (примерно 1 раз на 10 пар оснований (п.о.); эти участки были названы CpG-островками или CGIs), при том что эти структуры составляют только 2% от всей последовательности ДНК [31]. CpG-островки часто соответствуют сайтам инициации транскрипции генов [48]. Метилирование CpG-островков коррелирует с сайленсингом любых промоторов, присутствующих в них [49], в то время как их деметилирование приводит к восстановлению функционирования промотора [50];

— происходит в конкретных точках, которые настолько эволюционно консервативны, что

позволяют определить надежный индекс, который работает для всех млекопитающих [29];

– обратимо за счет трансформации зрелых соматических клеток в иПСК. При определении возраста на основе профиля метилирования ДНК (DNAm age) в ЭСК и в иПСК эти значения оказываются близки к нулевым [28];

– число предыдущих дупликаций клеток коррелирует со значениями метилирования ДНК [28].

Эти данные не соответствуют теории о случайных изменениях и означают, что существуют точные генетически предопределенные, регулируемые и эволюционно консервативные механизмы, опосредующие такие модификации. Как следствие, возрастные эпигенетические модификации не выступают в качестве основного фактора, определяющего старение, напротив, они могут быть фундаментальной частью более общего механизма, который определяет и регулирует процесс старения. Эта концепция была прямо заявлена в следующем виде: «Старение часто воспринимается как дегенеративный процесс, вызванный случайным накоплением повреждений клеток с течением времени. Несмотря на это, возраст может быть точно определен с помощью эпигенетических часов, основанных на профилях метилирования ДНК, полученных почти из любой ткани организма. Поскольку работа таких эпигенетических часов в различных тканях была продемонстрирована для нескольких биологических видов, трудно игнорировать высокую вероятность того, что в основе процесса старения лежит определенный общий механизм» [29].

Давайте оценим, насколько эпигенетические модификации совместимы с механизмами, предлагаемыми субтеломерно-теломерной теорией:

– «СрG-богатые островки ДНК, характерные для многих концов хромосом человека, способствуют транскрипции молекул TERRA» [18];

– «Уровень метилирования субтеломерной ДНК...понижается пропорционально укорочению теломеры у мышей *Terc^{-/-}*» [51];

– «У здоровых людей из контрольной группы, а также у больных саркоидозом было показано снижение доли длинных теломер (> 9,4 тыс. п.о.) и увеличение доли коротких теломер (< 4,4 тыс. п.о.) при старении, что сопровождалось относительным увеличением доли длинных теломер с гиперметилированием субтеломеры и коротких теломер с гипометилированием субтеломеры. Это дает основание полагать, что возрастное укорочение теломеры связано с гипометилированием её субтеломеры» [52];

– у мышей также показана связь между укорочением теломеры и метилированием субтеломерной ДНК [53]. «Кроме того, отсутствие функционирования основных эпигенетических регуляторов, таких как метилтрансферазы гистоновых белков и ДНК-метилтрансферазы, коррелирует с утратой контроля над длиной теломеры и ее укорочением до критических значений, что оказывает влияние на эпигенетический статус теломер и субтеломер» [53];

– в лейкоцитах человека «...более короткие теломеры ассоциированы с пониженным уровнем метилирования множественных сайтов цитозина, локализованных на расстоянии до 4 млн п.о. от теломеры...значительное концентрирование положительно ассоциированных метилированных сайтов CpG в субтеломерных локусах (до 4 млн п.о. вблизи теломеры) ($p < 0,01$)» [54]. Более короткие теломеры влияют на экспрессию генов, и с ними ассоциирован повышенный риск возникновения возрастных заболеваний [54].

Описанные выше результаты свидетельствуют о том, что происходит повышение или понижение экспрессии регуляторных последовательностей первого уровня (последовательности TERRA, чьими промоторами являются последовательности CpG) и регуляторных последовательностей второго уровня (расположенных вблизи теломер и других участков ДНК) с участием эпигенетических механизмов, таких как метилирование и деметилирование. При этом указанные данные не дают информации о том, как происходит повышение или понижение уровня экспрессии возможных регуляторных последовательностей третьего или высших уровней, даже если они действительно могут находиться под действием схожих эпигенетических механизмов. В дополнение к этим пробелам, которые обязательно должны быть охвачены соответствующими исследованиями, не существует также данных о том, что последовательности, контролируемые последовательностями TERRA через многоуровневые регуляторные механизмы, совпадают с теми, которые обсуждались выше, чей эпигенетический статус изменяется с возрастом.

Важным моментом может стать исследование сенесцентных клеток, в которых ожидается максимальная репрессия последовательностей TERRA.

В одной работе было показано, что в случае мезенхимальных стволовых клеток (МСК, MSCs – mesenchymal stem cells) клеточное старение ассоциировано с метилированием ДНК в специфических CpG-сайтах, а также с гистоновыми маркерами старения, такими как тримети-

лирование специфических мишеней [55], и что «экспансия [наращивание, размножение] МСК оказывает определенное влияние на профили метилирования ДНК»; «в 517 сайтах CpG было продемонстрировано дифференциальное метилирование при сравнении ранних и поздних пассажей»; «Было показано, что картина метилирования ДНК ассоциирована с определенными модификациями гистонов — в особенности с метилированием гистона H3» [55].

В стареющих МСК было продемонстрировано как гипометилирование, так и гиперметилирование: «В почти трети CpG-сайтов были выявлены возрастные изменения профиля метилирования ДНК, из которых при старении 60% сайтов становятся гипометилированными и 40% — гиперметилированными» [56].

Все эти данные, несмотря на существующие пробелы, которые необходимо заполнить, указывают на то, что метилирование ДНК и в целом возрастные эпигенетические модификации находятся в тесной корреляции с механизмами репрессии последовательностей TERRA и опосредованы работой системы, состоящей из субтеломеры, теломеры, теломерного кэпа, теломеразы, других регуляторных последовательностей и соответствующих регуляторных белков. Таким образом, представленные выше экспериментальные данные, касающиеся метилирования ДНК и других возрастных эпигенетических изменений, вероятно, подтверждают или, по крайней мере, соответствуют положениям субтеломерно-теломерной теории. Следовательно, правомерным было бы утверждение о том, что клеточное старение представляет собой эпигенетический феномен с дополнением, что этот феномен, вероятно, регулируется системой субтеломеры—теломеры.

СТАРЕНИЕ, ОКИСЛЕНИЕ И ВОСПАЛЕНИЕ

Многочисленные статьи подчеркивают корреляцию между старением и накоплением веществ, вызывающих окисление (свободные радикалы [57], активные формы кислорода и азота [58, 59]), или молекул, окисленных/поврежденных такими веществами (окисленные белки [60], поврежденные или укороченные теломеры [61]), или хроническим состоянием воспаления и изменения работы иммунной системы, получившим название инфламейджинг (inflammaging) [62].

Обнаружение этих корреляций дало начало различным теориям, в которых отмеченные выше вещества или их эффекты были рассмотрены в качестве основной причины старения (напри-

мер, окислительное влияние свободных радикалов и активных форм кислорода на весь организм [63, 64], митохондрии [65, 66] или ДНК [67, 68]; инфламейджинг и возрастные изменения иммунной системы [69, 70]).

Эти теории непрограммированного старения основываются на положении, что старение является последствием кумулятивного действия этих веществ и в неявном виде исключает идею о том, что оно возникает в результате действия других механизмов, а накопление указанных выше веществ и производимые ими эффекты являются вторичными.

Субтеломерно-теломерная теория старения подразумевает прямо противоположное: что механизмы, сосредоточенные в системе теломера—субтеломера—теломеразы, являются первопричиной всех перечисленных выше изменений.

Помимо других аргументов и эмпирических доказательств, направленных против теорий непрограммированного старения, которые обсуждались в работе [71] и не являются предметом обсуждения в настоящей статье, о том, что указанные выше изменения являются вторичными, а не первичными, мы имеем несколько важных свидетельств:

— перенос ядра из дифференцированной клетки в лишенный ядра неоплодотворенный ооцит приводит к образованию недифференцированной яйцеклетки, из которой можно получить новый индивид, который представляет собой клон донора дифференцированной клетки [72];

— слияние эмбриональных стволовых клеток человека с соматическими клетками (фибробласты человека) приводит к образованию гибридных тетраплоидных клеток с характеристиками эмбриональных стволовых клеток: «Анализ транскрипционной активности на уровне генома, активации репортерных генов, экспрессии специфических аллелей генов и метилирования ДНК показал, что соматический геном был репрограммирован в эмбриональное состояние» [73];

— трансформация (репрограммирование) фибробластов взрослого организма в иПСК путем действия четырех факторов (Oct3/4, c-Myc, Sox2 и Klf4) приводит к восстановлению способности к росту и экспрессии генов-маркеров эмбриональных стволовых клеток [74].

Эти явления указывают на то, что указанные выше изменения не являются неизбежным следствием функционирования биохимических механизмов или результатом случайного и необратимого накопления различных видов повреждений с акцентом на вызванные воздействием активных форм кислорода. Напротив, похоже, что они являются результатом четких, генети-

чески предопределенных и подверженных регуляции механизмов, которые могут быть обращены в результате соответствующих генетических манипуляций. Более того, баланс между окислительным и восстановительным потенциалом внутри клеток и тканей, по-видимому, тщательно регулируется и, в свою очередь, эмиссия окислительных агентов является частью сигнальной системы, действующей как эффектор как в клетках, так и в организме в целом, и отвечающей на внутренние или внешние регуляторные стимулы [75, 76]. Все эти утверждения полностью соответствуют положениям субтеломерно-теломерной теории.

ЗАЩИТА ТЕЛОМЕРЫ

Субтеломерно-теломерная теория утверждает, что защита теломеры, т.е. ограничение риска того, что незащищенная теломера может активировать процесс клеточного старения, зависит от системы субтеломеры—теломеры, в частности, от активности последовательностей TERRA:

– в эмбриональных стволовых клетках мыши снижение числа транскриптов TERRA коррелирует со снижением уровня защиты теломеры [20, 21]. Снижение уровня TERRA ассоциировано с «дефектами кэпирования теломеры. С помощью теломера-специфичных проб анализ ДНК в метафазных пластинках методом FISH продемонстрировал нарушение целостности теломеры спустя 24 ч нокдауна TERRA...» [20];

– транскрипты TERRA противодействуют белку ATRX (alpha thalassemia mental retardation X-related syndrome) и защищают теломеры. «У TERRA и ATRX сотни общих генов-мишеней, в этих локусах они работают как антагонисты: если TERRA активирует, то ATRX подавляет экспрессию соответствующего гена. В теломерах TERRA конкурирует с теломерной ДНК за связывание белка ATRX, подавляет скопление ATRX и обеспечивает стабильность теломеры» [20];

– снижение уровня транскрипции последовательностей TERRA с помощью различных методик инициирует активацию ответа на повреждение ДНК на участках теломер [77];

– делеция локуса 20q вызывает резкое снижение уровня TERRA и индуцирует усиленный ответ на повреждения ДНК. Этот факт был интерпретирован как «демонстрация важной роли TERRA в стабилизации теломер в любом организме» [78].

Таким образом, различные работы демонстрируют наличие корреляции между актив-

ностью экспрессии последовательностей TERRA и защитой теломеры, т.е. с ограничением вероятности активации программы клеточного старения. Тем не менее подробности того, как транскрипты TERRA обеспечивают такую защиту, объяснены лишь частично. И все же положение субтеломерно-теломерной теории о связи между укорочением теломеры, снижением уровня экспрессии TERRA и уровнем защиты теломеры в общих чертах было подтверждено экспериментальными данными.

ТЕЛОМЕРНЫЙ ГЕТЕРОХРОМАТИНОВЫЙ КЭП

Согласно субтеломерно-теломерной теории требуется, чтобы в период жизни клетки, который можно определить как «фаза перезагрузки (reset phase)» [79], в первой клетке живого организма (или даже в случае трансформации соматических клеток в иПСК) каждая теломера должна быть укрыта гетерохроматиновым кэпом, по размеру пропорциональным исходной длине теломеры. Эта длина различается от вида к виду, от хромосомы к хромосоме и даже между двумя плечами хромосомы («...значения длины теломеры внутри одной клетки различны, и конкретные плечи хромосомы обычно имеют или короткую, или длинную теломеру» [14]). В результате множества последующих дупликаций половой клетки и образующихся из нее клеток, когда происходит укорачивание теломеры до величины, определяемой уровнем репрессии активности теломеразы, кэп не адаптируется к новой длине теломеры, а вместо этого сохраняет свою длину и оказывает репрессирующее действие на субтеломерный участок.

Согласно теории, необходимо существование теломерного кэпа с определенным молекулярным составом, обуславливающим специфические молекулярные механизмы:

– в фазе перезагрузки – для адаптации длины кэпа относительно длины теломеры;

– при каждой дупликации клетки для воспроизводства кэпа определенного размера без учета сокращения длины теломеры;

– при укорочении теломеры при каждой дупликации для регуляции степени активации теломеразного комплекса, координирующей длину восстановления теломеры.

В основном эти фундаментальные вопросы субтеломерно-теломерной теории либо не имеют ответа, либо он неоднозначен. Тем не менее известны некоторые важные моменты:

– теломера покрыта несколькими копиями шелтеринового белкового комплекса с четко оп-

ределенными основными компонентам (белки TRF1, TRF2, RAP1, TIN2, TPP1 и POT1 [80, 81]), а также их расположением [80];

– гетерохроматиновый кэп может быть образован цепью шелтериновых комплексов, связанных друг с другом за счет биохимической связи между белком POT1 из одного комплекса и белков TRF1 и TIN2 из последующего комплекса, как показано на рис. 2;

– в случае, если кэп состоит из одной цепи шелтеринового комплекса и имеет фиксированный размер, который не изменяется при каждой дупликации даже при укорочении теломеры, то общее количество шелтериновых белков не должно изменяться, начиная от зародышевых клеток вплоть до клеток с укороченными теломерами. Напротив, если размер кэпа пропорционален длине теломеры, общее количество шелтериновых белков должно снижаться по мере укорочения теломеры. Было исследовано количество шелтериновых белков в клетках с теломерами различной длины и получены интересные результаты: «Чтобы определить число и стехиометрию белков шелтеринового комплекса в белковой фракции хроматина клеток человека мы использовали метод количественного иммуноблоттинга. Количество шелтериновых компонентов было сходным в первичных и трансформированных клетках и не коррелировало с длиной теломеры» [82]. Эти данные позднее были подтверждены и в других работах: «Определение уровня белков шелтерина показывает, что размер этого комплекса не изменяется соответственно длине теломеры» [82, 83]. В той же работе показано, что белок TZAP удаляет избыточные участки теломеры в случае «низкой концентрации шелтеринового комплекса», т.е. низкого соотношения количества шелтериновых комплексов к длине теломеры и, как подчеркивают авторы, это означает наличие постоянного числа шелтериновых комплексов [83]. Эти данные свидетельствуют в пользу контролирования определенной длины теломеры, как правило, ограниченной фиксированным размером кэпа.

Что касается теломерного кэпа, то эти данные, по-видимому, свидетельствуют в пользу субтеломерно-теломерной теории, однако они

ограничены и недостаточны. Тем не менее необходимо учитывать, что для любой альтернативной теории существует еще меньше доказательств и больше вопросов без ответа. Действительно, если не рассматривать механизм старения в контексте существования теломерных кэпов с фиксированной длиной, то нужен будет альтернативный механизм объяснения того, каким образом различия в длине теломер сохраняются после каждого деления клеток [15]. Необходимо будет также объяснить наследуемость длины теломеры от родителей (например, высокое ее сходство у монозиготных близнецов и отсутствие такового у dizиготных [15, 16]).

Вне контекста субтеломерно-теломерной теории для зародышевых клеток был бы необходим гипотетический регистр с записями обо всех длинах теломер. Более того:

i) в клетках с активной теломеразой для каждой теломеры должен существовать конкретный механизм компенсации ее длины, использующий информацию, содержащуюся в гипотетическом регистре для определения того, до какой степени необходимо удлинить теломеру, чтобы восстановить её первоначальную длину. Кроме того, в случае излишнего удлинения теломеры теломеразой другой механизм должен с использованием этой информации из регистра привести к удалению излишнего материала;

ii) в клетках со сниженной активностью теломеразы аналогичный механизм с использованием информации об исходной длине теломеры, содержащейся в гипотетическом регистре, должен способствовать частичному восстановлению исходной длины пропорционально степени активности теломеразы;

iii) должны существовать различные механизмы, которые будут сравнивать начальную длину с длиной, записанной в гипотетическом регистре с учетом позиционирования теломеры, и рассчитывать вероятность запуска процесса клеточного старения пропорционально укорочению теломеры относительно начальной длины.

При этом такой регистр кажется очень громоздким и сложным, и нет никаких доказательств его существования. Концепция этого регистра может быть заменена на концепцию, со-

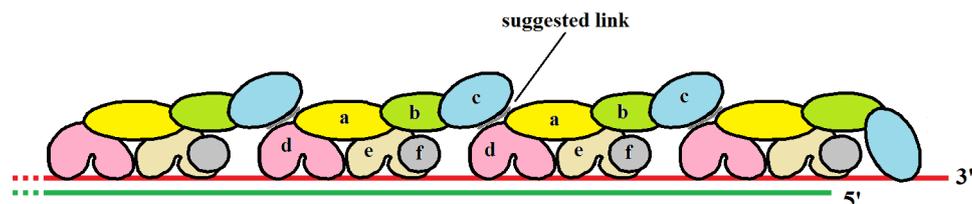


Рис. 2. Возможная структура цепи комплексов шелтерина. a–f – TIN2, TPP1, POT1, TRF1, TRF2 и RAP1 соответственно

гласно которой теломерные кэпы обладают определенной длиной в первой клетке организма, и их размер остается фиксированным при всех последующих дупликациях клеток. Таким образом, теломерные кэпы могут функционировать как «регистры», специфичные для каждой теломеры и опосредующие механизм реализации пунктов i), ii) и iii) (т.е. положения субтеломерно-теломерной теории). Таким образом, мы получаем достаточно реалистичную картину, хотя и с некоторыми неясными моментами, которые еще предстоит экспериментально прояснить.

Вкратце, гипотеза, предложенная субтеломерно-теломерной теорией касательно определённой длины теломерного кэпа, которая не меняется при дупликациях клеток, а также все явления, связанные с этой гипотезой, похоже, не имеют альтернативы, которая была бы достаточно правдоподобной и подтверждалась эмпирическими доказательствами.

Например, в качестве альтернативной или частично альтернативной гипотезы может быть предложена ситуация, когда сдвиг баланса между количеством белков шелтеринового комплекса и доступными теломерами или субтеломерными участками в случае чрезмерного укорочения теломеры может напрямую влиять на регуляцию дистальных участков генома, включая последовательности, расположенные далеко от концов хромосом [84], без усиления репрессии TERRA. Такие процессы могут быть основаны на связывании компонентов шелтеринового комплекса с последовательностями на неконцевых участках хромосом, имеющими меньшее сходство по сравнению с теломерами [85]. Такие участки могут включать интерстициальные теломерные повторы и элементы регуляции, также содержащие теломерные повторы и поэтому доступные для связывания, хотя с меньшим сходством, чем теломеры [86]. Такие взаимодействия должны обуславливать совместное функционирование системы субтеломеры–теломеры с другими глобальными регуляторами генома, побуждая их действовать согласованно на всем протяжении сложного процесса развития и особенно при регуляции процесса старения. Однако это предположение не объясняет схожее количество шелтериновых белков в первичных и трансформированных клетках, «не коррелирующее с длиной теломеры» [82].

ПРОГРЕССИРУЮЩЕЕ КЛЕТОЧНОЕ СТАРЕНИЕ

Согласно субтеломерно-теломерной теории, по мере укорочения теломеры происходит про-

грессирующее репрессирование субтеломер, т.е. репрессия последовательностей TERRA ассоциирована с последовательным изменением клеточных функций. Эти изменения, охарактеризованные как «прогрессирующее [постепенное] старение клеток» [71], нужно отличать от активации процесса клеточного старения в контексте «фундаментальной клеточной программы» [22], которая инициирует общие стереотипные изменения функций клеток [87], или своего рода прогрессирующее до высшей степени клеточное старение, ассоциированное с репликативным клеточным старением и устойчивостью к апоптозу.

И хотя всегда необходимо учитывать возможность того, что при изучении клеточных культур старение части клеток может симулировать состояние частичного старения всех клеток, тем не менее в поддержку этого предположения имеются некоторые свидетельства постепенного клеточного старения как состояния, отличающегося от классического клеточного старения:

– У дрожжей, одноклеточных организмов, в которых теломераза всегда активна, и поэтому теломеры обладают постоянной длиной [88], клетка делится на две, из которых первая клетка определяется как «мать», в которой к субтеломере добавляются специфические внехромосомные кольцевые рибосомные ДНК (ERCs – *extrachromosomal ribosomal DNA circles*), в то время как во второй клетке, определяемой как «дочь», эти внехромосомные элементы отсутствуют. Вследствие накопления ERCs клетки материнской линии с увеличением числа дупликаций демонстрируют наращивание функциональных изменений и подверженность клеточному старению, которое приводит к апоптозу дрожжевых клеток [89, 90]. Более того, в мутантных штаммах с неактивной теломеразой (мутанты *tlc1Δ*) укорочение теломер происходит при каждой дупликации и в клетках дочерней линии, в которых не происходит накопления ERCs; их транскриптом сходен с клетками материнской линии с равным количеством дупликаций [91]. Это явление в мутантных клетках может быть следствием соскальзывания теломерного кэпа на субтеломеру и ее последующего репрессирования, в то время как в клетках материнской линии дикого типа репрессия субтеломеры вызвана накоплением ERCs [10, 92]. У дрожжей ввиду того, что клеточное старение вызывает апоптоз и гибель индивида, угасание клеточных функций (постепенное старение клетки) нельзя спутать с клеточным старением/сенесцентностью.

– «По мере укорочения теломеры кэп скользит вниз по хромосоме (размер гетерохромати-

нового кэпа постоянен, и кэп просто сдвигается с укорачивающимся концом)... в результате происходит изменение транскрипции на участках хромосомы, непосредственно прилегающих к теломерному комплексу, что обычно приводит к сайленсингу транскрипции... Эти подвергшиеся сайленсингу гены могут в свою очередь модулировать другие, находящиеся на удалении гены (или комплекс генов). Существует несколько прямых доказательств такой модуляции в последовательностях субтеломеры... но в целом, в то время как экспериментальные данные свидетельствуют о существовании некоей неопределенной... но прямой причинно-следственной связи между укорочением теломеры и изменением профиля экспрессии генов, механизмы этой связи остаются неясными и спорными...» [10].

– Мезенхимальные стволовые клетки демонстрируют постоянные изменения профиля метилирования ДНК (гипометилирование или гиперметилирование) в процессе последовательных пассажей, которые могут быть использованы в качестве надежных маркеров количества пассажей клеточной культуры *in vitro* [93–95]; «Определение профиля экспрессии мРНК выявило последовательную картину изменений глобальной экспрессии генов в МСК при пассировании. Эти изменения не ограничены более поздними пассажами, они возникают постоянно с увеличением числа пассажей» [96].

– МСК демонстрируют некоторые «дефекты», ассоциированные с числом предшествующих дупликаций, которые могут быть устранены путем их репрограммирования в iPСК [97]. Затем из iPСК можно получить функциональные МСК, называемые индуцированными МСК (иМСК, iMSCs – induced MSCs), с незначительными эпигенетическими изменениями и повышенной выживаемостью клеток [98]. «В сравнении со взрослыми МСК и независимо от возраста донора или источника клеток, иМСК демонстрируют омоложенный профиль [97]. При этом метилирование ДНК, ассоциированное с возрастом, полностью «стирается», и в процессе культивирования *in vitro* иМСК вновь приобретают ассоциированную с клеточным старением картину метилирования ДНК» [56]. Цитированные выше работы свидетельствуют о том, что с помощью соответствующих манипуляций можно достигать переключения между различными клеточными состояниями с разной степенью клеточного старения. Это подтверждает, что клеточное старение: 1) не является следствием неизбежных и необратимых повреждений и представляет собой обратимое и изменяемое эпигенетическое состояние; 2) яв-

ляется постепенным процессом, по крайней мере, до того момента, когда запускается процесс перехода в необратимое состояние, именуемое клеточной сенесцентностью.

– При изучении феномена, определенного как эффект позиционирования теломер (TPE-OLD – telomere position effect over long distance), было подчеркнуто, что: «Наши результаты свидетельствуют о том, что экспрессия части субтеломерных генов зависит от длины теломеры и что значительные изменения экспрессии генов индуцируются укорочением теломеры задолго до того, как теломеры становятся скоростью-лимитирующим фактором для деления клетки, или короткие теломеры иницируют передачу сигнала, вызванную повреждением ДНК. Эти изменения включают как повышение, так и понижение уровня экспрессии генов [99]», хотя авторы статьи интерпретируют эти данные как результат невозможности формирования теломерных петель на относительно далеко расположенных участках хромосомы при укорочении теломеры.

УКОРОЧЕНИЕ ТЕЛОМЕРЫ И УГАСАНИЕ ЖИВОГО ОРГАНИЗМА

В контексте субтеломерно-теломерной теории (как и теломерной теории) возможно сделать следующие выводы:

– активно дублирующиеся клетки организма должны демонстрировать сходное укорочение длин теломер, связанное с ритмами дупликации, и в пожилом организме теломеры должны быть критично короткими;

– клетки тканей с более высокими скоростями дупликации должны демонстрировать критически укороченные теломеры и более выраженные признаки старения, в то время как для типов клеток с низкой скоростью дупликации укорочение теломеры и признаки клеточного старения должны быть намного более ограниченными;

– в долгоживущих клетках укорочение теломер будет нулевым, поэтому старение нельзя объяснить укорочением теломер.

Эти положения требуют некоторого обсуждения.

В обзоре, посвященном снижению длины теломеры с возрастом, исследуемой в образцах от новорожденных до долгожителей, было показано ежегодное сокращение длины теломер во многих типах клеток, кроме клеток с минимальным обновлением или вообще без него. При этом лишь в некоторых типах клеток снижение длины теломер можно было назвать кри-

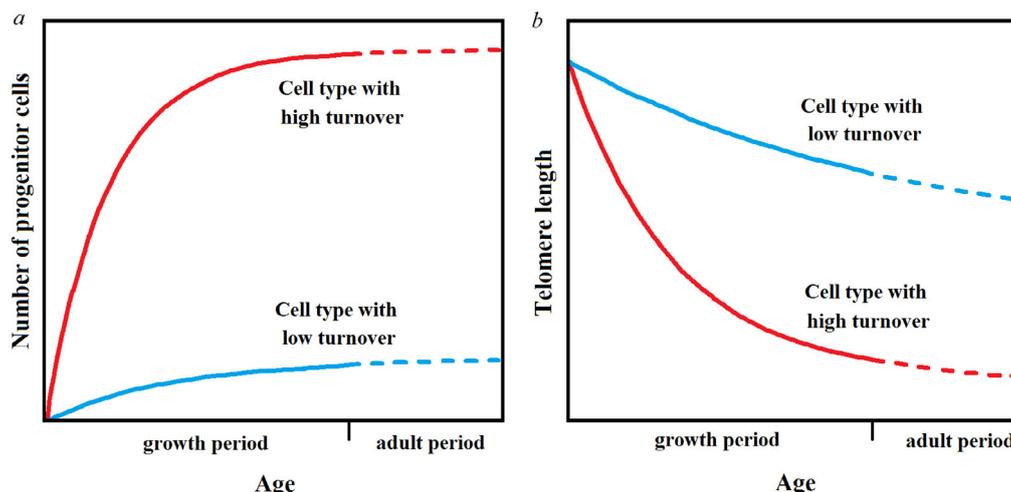


Рис. 3. *a* – Предшественники клеток с высокой скоростью обновления (например, гемопоэтические клетки) в период роста демонстрируют активную экспансию, в то время как предшественники клеток с медленным обновлением (например, клетки скелетных мышц) демонстрируют скромный прирост. *b* – В период роста укорочение теломер пропорционально величине экспансии, в то время как в последующие периоды жизни скорость укорочения теломер обоих типов клеток становится равной (на основе рис. 4 из работы [101])

тичным (например, в клетках печени скорость укорочения составила 120 п.о./год; длина теломеры $1,7 \pm 2,5$ тыс. п.о. у новорожденных и $8,7 \pm 1,4$ – у долгожителей) [100]. Кроме того, помимо клеток с незначительным снижением длины теломеры (кора головного мозга и сердечная мышца), годовая скорость укорочения теломер была значительно ниже и демонстрировала значения в диапазоне 20–60 п.о. в год [100]. Данные, объясняющие (приблизительную) однородность процесса старения всего организма, также отсутствуют. Более того, механизм старения долгоживущих клеток также требует объяснения.

При изучении четырех типов клеток/тканей с сильно различающимися скоростями обновления клеток (лейкоциты, скелетные мышцы, подкожный жир и кожа) выяснилось, что скорости укорочения теломер сходны друг с другом [101].

В той же работе было показано, что несмотря на то что длины теломер в различных органах плода человека сходны [102], длина теломеры в гемопоэтических стволовых клетках была короче, чем в клетках соматических тканей с низким уровнем обновления. Исходя из этого, авторы сделали вывод, что стволовые клетки-предшественники различных типов клеток в период роста пролиферируют соответственно ритмам клеточного обновления (например, активное размножение клеток с высокой скоростью обновления, таких как гемопоэтические, и значительно менее активное – у клеток с медленным обновлением, как в случае скелетных мышц). В фазе активного размножения длина теломер

снижалась как функция степени экспансии, в то время как на более поздних – укорочение теломер происходило с постоянной скоростью [101] (рис. 3).

Давайте теперь посмотрим, как эти данные могут объяснить старение организма в контексте субтеломерно-теломерной теории:

i) укорочение теломеры приводит к общему снижению функционирования клетки (постепенное клеточное старение). В частности, для МСК, помимо того, что их экспансия ограничена числом возможных дупликаций относительно числа предыдущих дупликаций, она также инициирует постепенные эпигенетические изменения [55];

ii) учитывая полную или частичную неактивность теломеразы в клетках-предшественниках, стволовых и соматических клетках, всегда есть вероятность их перехода в состояние клеточной сенесцентности, т.е. блокировке репликативной способности [11]. Этот процесс постепенно снижает потенциал клеток к обновлению, в частности, за счет снижения числа стволовых клеток-предшественников;

iii) в тканях/органах увеличивающееся число клеток, находящихся в состоянии клеточной сенесцентности, и их аномальный секреторный фенотип (SASP) снижают общее функциональное состояние. Действительно, избирательная элиминация сенесцентных клеток является разумным и реалистичным средством снижения некоторых проявлений процесса старения [1];

iv) в случае многолетних или не обновляющихся клеток и структур (включая большинство нейронов центральной нервной системы, фото-

рецепторные клетки сетчатки и волокна хрусталика глаза) влияние ассоциированных со старением явлений (обсуждались в предыдущих пунктах) на незаменимые обновляющиеся сателлитные или трофические клетки (глиоциты различных типов, пигментные клетки сетчатки, клетки эпителия хрусталика) определяет их старение [27].

Эти явления приводят к состоянию, определяемому как «атрофический синдром», что является полностью совместимым с субтеломерно-теломерной теорией и представляет собой результат старения организма [3, 103].

ВЫВОДЫ

«Проекты Human Genome и ENCODE показали, что белок-кодирующий потенциал генома млекопитающих чрезвычайно ограничен... Хотя лишь 2% генома приходится на кодирующую часть, в итоге транскрибируется более > 90% генома. Эта транскрипционная активность в основном приводит к образованию длинных некодирующих РНК (lncRNA – long noncoding RNAs), чьи функции по большей части остаются неизвестными» [20].

У сильно отличающихся друг от друга видов число белок-кодирующих генов тем не менее сходно. «Научное сообщество было удивлено тому, что количество генов человека равно количеству генов у довольно простого организма – нематоды» [104]. Таким образом, огромные различия между видами, предположительно, в большей мере зависят от не кодирующих белки последовательностей. Транскрипция большей части генома, которая не кодирует белки, в основном приводит к формированию регуляторных элементов для других участков генома, например, для других сегментов с регуляторными функциями и белок-кодирующих участков, и эта регуляция в основном опо-

средована эпигенетическими модификациями [104].

Следовательно, можно считать общим правилом, что клеточные функции как для одиночной клетки любого одноклеточного или многоклеточного организма, так и в целом для многоклеточных организмов, касающиеся развития и организации индивида, являются эпигенетическими явлениями.

Из этого следует, что если в основе процесса старения лежат конкретные механизмы, то они будут эпигенетическими, что согласуется с результатами экспериментальных исследований и положениями субтеломерно-теломерной теории.

Помимо этого общего соображения, субтеломерно-теломерная теория находит значительное число подтверждений, а факты, несовместимые с ее положениями, отсутствуют.

Следует подчеркнуть, что для любой теории в контексте парадигмы программированного или адаптивного старения, необходимо существование генетически детерминированных и регулируемых механизмов, которые определяют различные характеристики процесса старения. Механизмы, предложенные согласно субтеломерно-теломерной теории, по-видимому, удовлетворяют этой потребности и соответствуют имеющимся данным.

Напротив, для любой теории, принадлежащей к противоположной парадигме непрограммированного или неадаптированного старения, существование таких механизмов доказывает ее необоснованность при условии, что не будут найдены альтернативные объяснения с точки зрения эволюции.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. В работе не содержатся результаты каких-либо работ с участием людей или животных, выполненные кем-либо из авторов статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. 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.
3. Libertini, G., Corbi, G., Conti, V., Shubernetskaya, O., and Ferrara, N. (2021) Evolutionary Gerontology and geriatrics – why and how we age, *Advances in Studies of Aging and Health*, 2, Switzerland, Springer, doi: 10.1007/978-3-030-73774-0.
4. 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.
5. Libertini, G. (2012) Classification of phenoptotic phenomena, *Biochem (Moscow)*, **77**, 707-715, doi: 10.1134/S0006297912070024.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
 10. Fossel, M. B. (2004) *Cells, aging and Human Disease*, Oxford University Press, New York.
 11. Blackburn, E. H. (2000) Telomere states and cell fates, *Nature*, **408**, 53-56, doi: 10.1038/35040500.
 12. Pontèn, J., Stein, W. D., and Shall, S. (1983) A quantitative analysis of the aging of human glial cells in culture, *J. Cell Phys.*, **117**, 342-352, doi: 10.1002/jcp.1041170309.
 13. Jones, R. B., Whitney, R. G., and Smith, J. R. (1985) Intramitotic variation in proliferative potential: stochastic events in cellular aging, *Mech. Ageing Dev.*, **29**, 143-149, doi: 10.1016/0047-6374(85)90014-4.
 14. 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.
 15. Graakjaer, J., Bischoff, C., Korsholm, L., Holstebro, S., Vach, W., et al. (2003) The pattern of chromosome-specific variations in telomere length in humans is determined by inherited, telomere-near factors and is maintained throughout life, *Mech. Ageing Dev.*, **124**, 629-640, doi: 10.1016/s0047-6374(03)00081-2.
 16. 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.
 17. Brown, W. R., MacKinnon, P. J., Villasanté, A., Spurr, N., Buckle, V. J., and Dobson, M. J. (1990) Structure and polymorphism of human telomere-associated DNA, *Cell*, **63**, 119-132, doi: 10.1016/0092-8674(90)90293-n.
 18. Nergadze, S. G., Farnung, B. O., Wischniewski, H., Khoriauli, L., Vitelli, V., et al. (2009) CpG-island promoters drive transcription of human telomeres, *RNA*, **15**, 2186-2194, doi: 10.1261/rna.1748309.
 19. 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.
 20. 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.
 21. 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.
 22. 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.
 23. 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.
 24. 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.
 25. Wang, E. (1995) Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved, *Cancer Res.*, **55**, 2284-2292.
 26. Kirkland, J. L., and Tchkonina, T. (2017) Cellular senescence: a translational perspective, *EBioMedicine*, **21**, 21-28, doi: 10.1016/j.ebiom.2017.04.013.
 27. 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.
 28. Horvath, S. (2013) DNA methylation age of human tissues and cell types, *Gen. Biol.*, **14**, R115, doi: 10.1186/gb-2013-14-10-r115.
 29. Mammalian Methylation Consortium (2021) Universal DNA methylation age across mammalian tissues, bioRxiv, doi: 10.1101/2021.01.18.426733.
 30. 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.
 31. 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.
 32. 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.
 33. Thompson, R. F., Atzmon, G., Gheorghie, C., Liang, H. Q., Lowes, C., et al. (2010) Tissue-specific dysregulation of DNA methylation in aging, *Ageing Cell*, **9**, 506-518, doi: 10.1111/j.1474-9726.2010.00577.x.
 34. 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.
 35. 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.pgen.1002629.
 36. 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.
 37. Rakan, 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.
 38. 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.
 39. Hernandez, D. G., Nalls, M. A., Gibbs, J. R., Arepalli, S., van der Brug, M., et al. (2011) Distinct DNA methylation changes highly correlated with chronological age in the human brain, *Hum. Mol. Genet.*, **20**, 1164-1172, doi: 10.1093/hmg/ddq561.
 40. Koch, C. M., and Wagner, W. (2011) Epigenetic-aging-signature to determine age in different tissues, *Ageing (Albany NY)*, **10**, 1018-1027, doi: 10.18632/aging.100395.
 41. Bocklandt, S., Lin, W., Sehl, M. E., Sánchez, F. J., Sinsheimer, J. S., et al. (2011) Epigenetic predictor of age, *PLoS One*, **6**, e14821, doi: 10.1371/journal.pone.0014821.
 42. Booth, L. N., and Brunet, A. (2016) The aging epigenome, *Mol. Cell*, **62**, 728-744, doi: 10.1016/j.molcel.2016.05.013.
 43. Kane, A. E., and Sinclair, D. A. (2019) Epigenetic changes during aging and their reprogramming potential, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **54**, 61-83, doi: 10.1080/10409238.2019.1570075.
 44. 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.
 45. McCauley, B. S., and Dang, W. (2014) Histone methylation and aging: lessons learned from model systems, *Biochim. Biophys. Acta*, **1839**, 1454-1462, doi: 10.1016/j.bbagr.2014.05.008.
 46. Pal, S., and Tyler, J. K. (2016) Epigenetics and aging, *Sci. Adv.*, **2**, e1600584, doi: 10.1126/sciadv.1600584.

47. Ashapkin, V. V., Kutueva, L. I., and Vanyushin, B. F. (2017) Aging as an epigenetic phenomenon, *Curr. Genomics*, **18**, 385-407, doi: 10.2174/1389202918666170412112130.
48. Bird, A. (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory, *Genes Dev.*, **16**, 6-21, doi: 10.1101/gad.947102.
49. 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.
50. 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.
51. Benetti, R., Гарсна-Сao, 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.
52. 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.
53. Blasco, M. A. (2007) The epigenetic regulation of mammalian telomeres, *Nat. Rev. Genet.*, **8**, 299-309, doi: 10.1038/nrg2047.
54. 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.
55. 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.
56. 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.
57. Harman, D. (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry, *J. Gerontol.*, **11**, 298-300, doi: 10.1093/geronj/11.3.298.
58. Höhn, A., Weber, D., Jung, T., Ott, C., Hugo, M., et al. (2017) Happily (n)ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence, *Redox Biol.*, **11**, 482-501, doi: 10.1016/j.redox.2016.12.001.
59. Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., et al. (2018) Oxidative stress, aging, and diseases, *Clin. Interv. Aging*, **13**, 757-772, doi: 10.2147/CIA.S158513.
60. Reeg, S., and Grune, T. (2015) Protein oxidation in aging: does it play a role in aging progression? *Antioxid. Redox Signal.*, **23**, 239-255, doi: 10.1089/ars.2014.6062.
61. Barnes, R. P., Fouquerel, E., and Opresko, P. L. (2019) The impact of oxidative DNA damage and stress on telomere homeostasis, *Mech. Ageing Dev.*, **177**, 37-45, doi: 10.1016/j.mad.2018.03.013.
62. Zuo, L., Prather, E. R., Stetskiy, M., Garrison, D. E., Meade, J. R., et al. (2019) Inflammaging and oxidative stress in human diseases: from molecular mechanisms to novel treatments, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 4472, doi: 10.3390/ijms20184472.
63. 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.
64. Oliveira, B. F., Nogueira-Machado, J.-A., and Chaves, M. M. (2010) The role of oxidative stress in the aging process, *ScientificWorldJournal*, **10**, 1121-1128, doi: 10.1100/tsw.2010.94.
65. Sanz, A., and Stefanatos, R. K. (2008) The mitochondrial free radical theory of aging: a critical view, *Curr. Aging Sci.*, **1**, 10-21, doi: 10.2174/1874609810801010010.
66. Skulachev, V. P. (2009) New data on biochemical mechanism of programmed senescence of organisms and antioxidant defense of mitochondria, *Biochemistry (Moscow)*, **74**, 1400-1403, doi: 10.1134/s0006297909120165.
67. Bohr, V. A., and Anson, R. M. (1995) DNA damage, mutation and fine structure DNA repair in aging, *Mutat. Res.*, **338**, 25-34, doi: 10.1016/0921-8734(95)00008-t.
68. Weinert, B. T., and Timiras, P. S. (2003) Invited review: theories of aging, *J. Appl. Physiol.*, **95**, 1706-1716, doi: 10.1152/jappphysiol.00288.2003.
69. Franceschi, C., Bonafè, M., Valensin, S., Olivieri, F., De Luca, M., et al. (2000) Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence, *Ann. NY Acad. Sci.*, **908**, 244-254, doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06651.x.
70. Fülöp, T. (2017) Immunosenescence and inflammaging: an intricate connection, *Innov. Aging*, **1** (Suppl 1), 961, doi: 10.1093/geroni/igx004.3465.
71. Libertini, G. (2015) Non-programmed versus programmed aging paradigm, *Curr. Aging Sci.*, **8**, 56-68, doi: 10.2174/1874609808666150422111623.
72. Wilmot, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., and Campbell, K. H. (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells, *Nature*, **385**, 810-813, doi: 10.1038/385810a0.
73. 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.
74. 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.
75. D'Aurtriaux, B., and Toledano, M. B. (2007) ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 813-824, doi: 10.1038/nrm2256.
76. Schieber, M., and Chandel, N. S. (2014) ROS function in redox signaling and oxidative stress, *Curr. Biol.*, **24**, R453-462, doi: 10.1016/j.cub.2014.03.034.
77. 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.
78. 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.
79. Libertini, G., and Ferrara, N. (2016) Possible interventions to modify aging, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 1413-1428, doi: 10.1134/S0006297916120038.
80. Stewart, J. A., Chaiken, M. F., Wang, F., and Price, C. M. (2012) Maintaining the end: roles of telomere proteins in end-protection, telomere replication and length regulation, *Mutat. Res.*, **730**, 12-19, doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.08.011.
81. Jones, M., Bisht, K., Savage, S. A., Nandakumar, J., Keegan, C. E., and Maillard, I. (2016) The shelterin complex and hematopoiesis, *J. Clin. Invest.*, **126**, 1621-1629, doi: 10.1172/JCI184547.
82. 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.
83. Li, J. S. Z., Fusté, J. M., Simavorian, T., Bartocci, C., Tsai, J., et al. (2017) TZAP: A telomere-associated protein involved in telomere length control, *Science*, **355**, 638-641, doi: 10.1126/science.aah6752.
84. De Lange, T. (2005) Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres, *Genes Dev.*, **19**, 2100-2110, doi: 10.1101/gad.1346005.
85. Aksenova, A. Y., and Mirkin, S. M. (2019) At the beginning of the end and in the middle of the beginning: structure and maintenance of telomeric DNA repeats and interstitial telomeric sequences, *Genes*, **10**, 118, doi: 10.3390/genes10020118.
86. Simonet, T., Zaragosi, L.-E., Philippe, C., Lebrigand, K., Schouteden, C., et al. (2011) The human TTAGGG repeat

- factors 1 and 2 bind to a subset of interstitial telomeric sequences and satellite repeats, *Cell Res.*, **21**, 1028-1038, doi: 10.1038/cr.2011.40.
87. 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.
 88. 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.
 89. 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.
 90. 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.
 91. Lesur, I., and Campbell, J. L. (2004) The transcriptome of prematurely aging yeast cells is similar to that of telomerase-deficient cells, *MBC Online*, **15**, 1297-1312, doi: 10.1091/mbc.e03-10-0742.
 92. 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.
 93. 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.
 94. 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.
 95. 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.
 96. 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.
 97. 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.
 98. Hynes, K. (2013) Mesenchymal stem cells from iPSC cells facilitate periodontal regeneration, *J. Dent. Res.*, **92**, 833-839, doi: 10.1177/0022034513498258.
 99. 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.
 100. Takubo, K., Aida, J., Izumiya-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.
 101. 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.
 102. 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.
 103. Libertini, G. (2014) Programmed aging paradigm: how we get old, *Biochemistry (Moscow)*, **79**, 1004-1016, doi: 10.1134/S0006297914100034.
 104. 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.

IS EVIDENCE SUPPORTING THE SUBTELOMERE-TELOMERE THEORY OF AGING?

Review

Giacinto Libertini^{1,2*}, Olga Shubernetskaya³, Graziamaria Corbi^{4,5}, and Nicola Ferrara^{2,6}

¹ Member of the Italian Society for Evolutionary Biology (SIBE), 14100 Asti, Italy;
E-mail: giacinto.libertini@yahoo.com

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

³ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, 117997 Moscow, Russia

⁴ Department of Medicine and Health Sciences, University of Molise, 86100 Campobasso, Italy

⁵ Italian Society of Gerontology and Geriatrics (SIGG), 50129 Firenze, Italy

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

The telomere theory tries to explain cellular mechanisms of aging as mainly caused by telomere shortening at each duplication. The subtelomere–telomere theory overcomes various shortcomings of telomere theory by highlighting the essential role of subtelomeric DNA in aging mechanisms. The present work illustrates and deepens the correspondence between assumptions and implications of subtelomere–telomere theory and experimental results. In particular, it is investigated the evidence regarding the relationships between aging and (i) epigenetic modifications; (ii) oxidation and inflammation; (iii) telomere protection; (iv) telomeric heterochromatin hood; (v) gradual cell senescence; (vi) cell senescence; and (vii) organism decline with telomere shortening. The evidence appears broadly in accordance or at least compatible with the description and implications of the subtelomere–telomere theory. In short, phenomena of cellular aging, by which the senescence of the whole organism is determined in various ways, appear substantially dependent on epigenetic modifications regulated by the subtelomere–telomere–telomeric hood–telomerase system. These phenomena appear to be not random, inevitable, and irreversible but rather induced and regulated by genetically determined mechanisms, and modifiable and reversible by appropriate methods. All this supports the thesis that aging is a genetically programmed and regulated phenoptotic phenomenon and is against the opposite thesis of aging as caused by random and inevitable degenerative factors.

Keywords: aging, phenoptosis, telomere, subtelomere, epigenetic changes, gradual cell senescence, cell senescence, telomeric heterochromatin hood

УДК 577.71:576.385:575.113:612.67:575.1

АЛЬТРУИЗМ И ФЕНОПТОЗ КАК ПРОГРАММЫ, ПОДДЕРЖИВАЕМЫЕ ЭВОЛЮЦИЕЙ

© 2021 Г.А. Шиловский^{1,2,3*}, Т.С. Путятин², А.В. Марков^{2,4}

¹ НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 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 им. А.А. Харкевича РАН, 127051 Москва, Россия

⁴ Палеонтологический институт им. А.А. Борисяка РАН, 117997 Москва, Россия

Поступила в редакцию 30.07.2021

После доработки 17.09.2021

Принята в печать 17.09.2021

Феноптоз представляет собой возникшую в процессе эволюции запрограммированную гибель, принимающую иногда облик альтруистической программы. В частности, она, как предполагается, является оружием против распространения пандемий в прошлом и препятствием для борьбы с пандемией в настоящем (COVID). Однако в эволюционных масштабах детерминированная гибель связана не со случайными взаимоотношениями (например, бактерий с той или иной мутацией), а является продуктом высшей нервной деятельности или следствием установившейся иерархии в сообществе, достигая максимального выражения в эусоциальных сообществах перепончатокрылых и высокосоциальных сообществах млекопитающих. Краеугольным этапом перехода от простого объединения особей к эусоциальности является отказ от размножения, как высшая форма альтруизма – появление нерепродуктивных особей. В отличие от примитивных программ для одноклеточных, для высших многоклеточных характерно развитие феноптотических программ на основе поведения, особенно в случае ограничения продолжительности жизни, связанного с репродукцией. Таким образом, можно сказать, что развитие альтруизма в эволюции социальности приводит в крайнем проявлении к феноптозу. Разработка математических моделей возникновения альтруизма и запрограммированной гибели способствует пониманию механизмов, лежащих в основе этих явлений, проявления парадоксальных контрпродуктивных (вредоносных) программ. Теоретически эта модель может быть приложена не только к насекомым, но и к другим социальным животным, и даже к человеческому обществу. Адаптивная гибель – это форма крайнего альтруизма. Мы рассматриваем альтруизм и запрограммированную гибель как процессы, существующие в виде детерминированной цепочки некоторых реакций вне зависимости от её адаптивной ценности. Адаптивная же ценность (вне зависимости от степени «феноптотичности») характерна для организмов, демонстрирующих такой высокий уровень родства, социальной организации и физической ассоциации, что они обладают чертами особей более высокого порядка: образуют колонии одноклеточных с некоторыми особенностями многоклеточных животных или колонии многоклеточных животных с некоторыми надорганизменными особенностями.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: альтруизм, социум, феноптоз, пандемия, адаптивная гибель, старение, эволюция, совокупная приспособленность.

DOI: 10.31857/S0320972521120034

Как-то я спросил моего старого друга, знаменитого стиховеда М.Л. Гаспарова: «Михаил Леонович! Как бы Вы назвали запрограммированную смерть организма, если похожее явление применительно к отдельной клетке называется апоптоз?» – «Феноптоз!» – не задумываясь, ответил академик (Skulachev, V. P. (2012) *Biochemistry (Moscow)*, 77, 1608-3040)

ВВЕДЕНИЕ

Дискуссии о том, может ли биологическая эволюция закономерно приводить к развитию

контрпродуктивных (т.е. причиняющих вред индивидууму) программ, идут уже более 50 лет. Противники этой идеи утверждают (историю вопроса см., например, [1, 2]), что развитие под действием отбора, например программ старения и ограничения продолжительности жизни, невозможно, потому что особи, у которых они нарушатся (например, в результате случайных му-

Принятые сокращения: ПЖ – продолжительность жизни.

* Адресат для корреспонденции.

таций), получают репродуктивное преимущество и вытесняют носителей контрпродуктивных программ. Однако работа, в которой было показано, что мутация гена рецептора инсулина *daf-2/IGF-1* может более чем удвоить продолжительность жизни (ПЖ) нематоды *Caenorhabditis elegans* [3], возобновила дискуссию о возможных адаптивных преимуществах старения. Было высказано предположение, что аллель *daf-2* дикого типа «может быть поддержан отбором, если виды, представители которых имеют короткую ПЖ, процветают за счёт увеличения генетического разнообразия или уменьшения конкуренции между родителями и потомством» [3]. Предсказанные ещё Weismann [4] случаи адаптивности старения и программ гибели относительно недавно были подтверждены сначала на математических моделях [5], а затем и в работах группы D. Gems [6–8]. Это перевело дискуссию из ранга философских в ранг научного обсуждения возникновения контрпродуктивных программ в ходе эволюции.

Контрпродуктивными могут в определенных условиях становиться различные программы организма, изначально развивавшиеся как защитные. К ним относится воспаление, являющееся не столько болезнью, сколько реакцией организма на патологию в определенном участке. Однако при невозможности излечиться и переходе болезни в хроническую форму воспаление может приносить страдания, едва ли не большие, чем исходная болезнь, а также способствовать старению (inflammaging) [9]. Wang и Medzhitov [10] постулируют наличие взаимосвязи между терморегуляцией, метаболизмом и реакцией хозяина на инфекцию. По их мнению, иммунная система использует регуляцию температуры тела как стратегию регулирования скорости метаболизма, что, в свою очередь, способствует устойчивости к воспалительным повреждениям. Ещё более наглядными в этом отношении могут быть болевые синдромы. Изначально будучи, безусловно, полезными (сообщая о повреждениях и недопустимых параметрах внешней или внутренней среды (температуры и т.д.)), в хронических случаях они, например, заставляют человека терзаться только одной мыслью: как отключить эту полезнейшую в эволюционном плане систему. В настоящее время фармкомпаниями тратятся огромные средства на разработку противовоспалительных, противоаллергических и болеутоляющих средств.

Механизм возникновения патологии объяснили Ye и Medzhitov [11], представляя состояние гомеостаза как шарик внутри параболической «ямки» нормы. Когда какие-то факторы пытаются вывести систему из равновесия, то под

действием регулирующих сил гомеостаз будет «скатываться» обратно — как шарик под действием гравитации. Но слишком сильный разгон шарика (даже ради его стабилизации «на дне») приведёт к тому, что тот вывалится за пределы ямки, и система уже не сможет вернуться в нормальное состояние. Воспалительный ответ нужен для того, чтобы восстановить равновесие. Но при сильной патологии он только толкнёт систему дальше от нормы, что может привести её к стабилизации в состоянии хронической патологии.

Так, воспаление может развиваться в ответ на аллергены и яды, поражение тканей, стрессовые для организма условия (факторы окружающей среды, нездоровый образ жизни) и, конечно, инфекцию. Во всех этих случаях такая реакция эволюционно и физиологически оправдана: она защищает организм, избавляясь от вредных веществ, воздействий или «завоевателей», восстанавливает повреждения. Но при избыточно сильной реакции начинаются проблемы: из-за чрезмерной враждебности к незнакомым (пусть и безобидным) чужеродным веществам появляется аллергия, непримиримая борьба с инфекциями доводит до аутоиммунных реакций и даже сепсиса. Патология заживления тканей влечёт за собой фиброз и рак. Ещё большей «жесткостью» могут характеризоваться аллергические реакции, способные вызвать резкое ухудшение самочувствия, шок и даже летальный исход, тогда как исходный аллерген не несёт реальной угрозы жизнеспособности организма. Сбои защитной системы организма могут приводить к аутоиммунным заболеваниям, вызываемым, однако, в высшей степени запрограммированной иммунной реакцией. Так, в настоящее время известно, что иммунный ответ в организме стимулируется различными «сигналами опасности» (молекулами молекулярного паттерна, ассоциированного с повреждением (damage-associated molecular pattern molecules, DAMP, и pathogen-associated molecular patterns, PAMP). Такие молекулы разнообразны по структуре и могут иметь как белковую (эндогенные белки теплового шока, белки S100 или HMGB1), так и небелковую природу (мочевая кислота, сульфат гепарина, моно- и полисахариды). Такое же действие оказывает наличие ДНК где-либо, кроме ядра и митохондрий, а также наличие нуклеотидов (например, АТФ) и нуклеозидов (например, аденозина) в высокой концентрации вне клетки [12, 13].

Однако наиболее известными контрпродуктивными программами, которые могут возникать (и возникают) в ходе биологической эволюции, являются фенотоз и альтруизм.

Термин «феноптоз» в научной литературе впервые был предложен академиком В. П. Скулачевым в 1997 г. [14] (см. также [15–18]). По определению, из всех вышеперечисленных программ феноптоз является наиболее контрпродуктивной, так как результатом его является гибель.

Вопрос о запрограммированности медленного (хронического) феноптоза (старения) осложняется неоднозначностью термина «*программированное старение*» [19, 20], что может вызвать логическую путаницу [6]. В то же время вполне возможно устранить двусмысленность этого термина и избежать концептуальных ошибок.

В выражении «*запрограммированное старение*» слово «*старение*» нужно относить не ко всем возрастным изменениям (включая благоприятные изменения, связанные с созреванием), а конкретно к связанному с возрастом ухудшению состояния организма (или *биологическому старению*) [7]. При этом подразумевается существование программы как таковой, развившейся под действием отбора «с целью» повышения приспособленности.

Бывают случаи, когда программа клеточного цикла явно ухудшает приспособленность организма, например, программа, выполняемая в клетках злокачественных опухолей [7]. Blagosklonny [21] был предложен термин «квазипрограмма». В этом случае старение (подобно продолжению роста в процессе развития) будет обусловлено неадекватно высоким функционированием клеток. Теория гиперфункции квазипрограммированного старения объясняет воспаление и иммунное старение, гипервоспаление, гипертромбоз и цитокиновый шторм, связанные с возрастным увеличением уязвимости организма к COVID-19. Поэтому появилось разделение запрограммированного старения на адаптивное и неадаптивное (или запрограммированное и квазипрограммированное) старение. С другой стороны, например, для защиты от такой гибели в ходе эволюции млекопитающих неоднократно пропадал некроптоз; отсутствовали или содержали инактивирующие мутации (сдвиг рамки или преждевременные стоп-кодены) центральные компоненты некроптоза, такие как RIPK3 (receptor-interacting protein kinase 3) и MLKL (mixed lineage kinase domain-like protein), важные для этиологии и развития многих связанных с повышенным риском гибели заболеваний человека, таких как ишемическое повреждение и сепсис [22].

Увеличение разнообразия и сложности контрпродуктивных программ является следствием образования организованных коллективов (сообществ, стай) из *множества разрозненных* особей. Такие коллективы становятся способными

выполнять координированные, слаженные действия – подобно тому, как это постоянно делают клетки многоклеточного организма. Однако в многоклеточном организме слаженность поведения клеток обеспечивается специальными системами централизованного управления (например, нервной системой). В группе отдельных самостоятельных организмов таких централизованных систем управления обычно нет, поэтому согласованность действий обеспечивается иными способами, в том числе при помощи «чувства кворума» (*quorum sensing*). Ключевым сигналом, запускающим механизм превращения в коллектив, часто является скученность. Когда концентрация сигнальных молекул проходит определенный порог, «чувство кворума» изменяет глобальные паттерны экспрессии генов [23]. Например, бактерия *Vibrio fischeri* начинает светиться только по достижении определенного порога плотности [24]. В кишечнике человека различия в составе микробной популяции связаны с патологиями, включая воспалительные заболевания. В процессе, называемом зондированием кворума, бактерии общаются друг с другом с помощью внеклеточных сигнальных молекул, называемых аутоиндукторами [25, 26]. Предполагается, что бактерии общаются друг с другом и со своими хозяевами, и информация об этих взаимодействиях влияет на плотность популяции комменсальных бактерий, видовой состав и физиологию клетки-хозяина [25, 26].

Альтруизмом принято называть действия и стратегии поведения, индивидуально невыгодные, но выгодные для других особей в сообществах (в плане размножения и адаптации). В биологическом смысле альтруизмом является поведение, ведущее к повышению приспособленности (и, как следствие, репродуктивного успеха) других особей в ущерб своим собственным шансам на успешное размножение.

Целью данной работы является рассмотрение механизмов формирования и видоизменения в ходе эволюции такой контрпродуктивной программы, как альтруизм, степень проявления которой доходит до уровня феноптоза (т.е. особь может помочь другим даже ценой отказа от размножения и собственной гибели).

АЛЬТРУИЗМ

Альтруизм можно разделить на два явно различающихся типа. При первом особь становится альтруистом «пассивно», под воздействием окружения, не претерпевая для этого каких-либо внутренних изменений. Таковым воздействи-

ем могут быть изменения, возникшие в других особях (например, обманщиках), или когда в сообществах с ярко выраженной иерархией особей заставляют быть альтруистами. При втором типе особь становится альтруистом «активно» благодаря изменениям в собственном организме. На первый взгляд, возникновение альтруизма второго типа в эволюции, движущей силой которой является абсолютно эгоистичный естественный отбор, парадоксально.

Однако естественный отбор представляет собой автоматическое и непредвзятое взвешивание суммы выигрышей и проигрышей для всех копий аллеля в популяции — если выигрыши перевешивают, аллель распространяется. Таким образом, с точки зрения самого «аллеля альтруизма» в этом никакого альтруизма нет, а есть чистый эгоизм. Этот аллель заставляет своих носителей совершать акт альтруизма, жертвует несколькими своими копиями, чтобы тем самым дать преимущество другим своим же копиям. Движущей силой эволюции является естественный отбор случайных наследственных изменений [27]. Если организмы передают потомкам по наследству свои индивидуальные черты, если черты эти иногда случайным образом меняются и если, наконец, хотя бы некоторые из таких изменений повышают эффективность размножения, то такие объекты просто обязаны — и будут — сами собой, без всякого вмешательства становиться всё более совершенными с течением поколений. Под совершенством в данном случае понимается приспособленность, проявляющаяся как эффективность размножения [28].

Альтруистическое жертвование собственным размножением может быть частичным и полным. В случае последнего оно, по сути, является фенотозом (фенотозный альтруизм) с той разницей, что элиминируется не сама особь, а её потенциальные потомки.

Способы возникновения альтруизма. Пути возникновения альтруизма в эволюции многообразны. Например, он может возникать под действием так называемого родственного отбора (kin selection). Правило Гамильтона гласит, что «ген альтруизма» (а точнее аллель, способствующий альтруистическому поведению) будет поддержан отбором и распространится в популяции, вытесняя из генофонда конкурирующий «аллель отсутствия альтруизма», если $nrB > C$, где r — степень генетического родства «жертвователя» и «принимающего жертву»; B — репродуктивное преимущество, полученное адресатом альтруистического акта; C — репродуктивный ущерб, нанесённый «жертвователем» самому себе, n — число «принимающих жертву». Ес-

ли $nrB > C$, «аллель альтруизма» будет совершенно автоматически и неизбежно увеличивать свою частоту в генофонде популяции.

Известны и другие механизмы эволюции альтруизма, не связанные напрямую с близким родством между «жертвователями» и «принимающими жертву». Например, описан также парадокс Симпсона, при котором суммарная доля альтруистов в популяции растёт, даже если в каждой отдельной локальной группе альтруисты проигрывают в конкуренции эгоистам, и их доля снижается. Это явление экспериментально доказано на двух лабораторных штаммах генетически модифицированных кишечных палочек [29]. Суть заключается в том, что, если число основателей новой группы невелико, что бывает при дроблении популяции, среди них в силу простой случайности может оказаться повышенный процент альтруистов. Такая группа благодаря обилию альтруистов будет быстро наращивать свою численность, тогда как другие группы, в которых изначально было больше эгоистов, будут расти медленнее. В итоге парадокс Симпсона обеспечит рост «глобальной» доли альтруистов в популяции. В природе аналогом дробления (рассаживания по пробиркам) могут служить «бутылочные горлышки» — периоды сильного сокращения численности популяции с последующим её восстановлением. Это может происходить, например, при заселении новых субстратов очень небольшим числом микробов-«основателей».

Эгоистическая эволюция индивидуальных симбионтов внутри кооперативной системы невозможна при их генетической однородности, т.е. при отсутствии изменчивости, одного из важных компонентов дарвиновской эволюции.

Интересен механизм поддержания генетической однородности симбионтов у термитов подсемейства Macrotermitinae, которые создают грибную культуру, собирая в окрестностях гнезда споры грибов *Termitomyces*. Исходный посевной материал генетически весьма разнороден, однако грибы-обманщики в их огородах полностью отсутствуют [30]. В каждом термитнике выращивается только один штамм грибов. Оказалось, что у *Termitomyces* генетически идентичные мицелии помогают друг другу (но не другим мицелиям) производить конидии [30], что в итоге приводит к формированию монокультуры.

Если эволюции «не удалось» обеспечить идентичность кооператоров, хозяевам приходится бороться с эгоистами различными методами или полагаться на механизмы, обеспечивающие баланс численности эгоистов и честных кооператоров (парадокс Симпсона или балансирующий отбор).

Рассмотренные примеры позволяют предположить, что, если бы не проблема обманщиков, порождаемая отсутствием у эволюции дара предвидения и заботы о «благах вида» (а не гена), кооперация и альтруизм могли бы стать доминирующей формой взаимоотношений между организмами на нашей планете. Но эволюция слепа, и поэтому кооперация развивается только там, где то или иное стечение специфических обстоятельств помогает обуздать обманщиков или предотвратить их появление.

В итоге можно сказать, что естественный отбор при соблюдении определённых условий может обеспечивать развитие альтруизма даже тогда, когда в каждой отдельно взятой группе (сообществе) он благоприятствует эгоистам, а альтруистов обрекает на постепенное вымирание. Спектр условий, в которых может действовать парадокс Симпсона в чистом виде, довольно узок, и поэтому в природе его роль, вероятно, невелика.

Генетические основы альтруизма у человека. Говоря об эволюции альтруизма у приматов, особенно человека (обычной биологической эволюции, основанной на отборе генов), необходимо учитывать ещё социальную и культурную эволюцию, основанную на отборе идей или мемов (таких как морально-нравственные нормы, правила поведения в обществе и т.п.), а также межгрупповую конкуренцию [31, 32].

Исследования близнецовым методом показали, что склонность к добрым поступкам, доверчивости и благодарности имеет в том числе генетическую природу. Эти черты характера являются отчасти наследственными и как минимум на 10–20% заданы генетически [33]. Это означает, что биологическая эволюция альтруизма у человека ещё не закончена. В популяции сохранился полиморфизм по генам, определяющим большую или меньшую склонность к кооперативному поведению и взаимному доверию. По-видимому, в разных природных, социальных и экономических условиях естественный отбор благоприятствует то доверчивым кооператорам, то недоверчивым эгоистам, и переменчивость этих условий способствует сохранению разнообразия. Это может объясняться и частотно-зависимым «балансирующим» отбором. Чем больше кругом доверчивых альтруистов, тем выгоднее паразитировать на чужой доброте; но, если паразитов много, их стратегия оказывается уже не столь выгодной, да и общество начинает воспринимать их как реальную угрозу и вырабатывает меры для обуздания эгоизма. Выявляются и конкретные гены, влияющие на личность человека, в том числе на его моральные качества [34]. Так, у людей перна-

зальное введение окситоцина повышает склонность людей проявлять бескорыстный альтруизм [35]. Аналогичные свойства обнаружены также и у аллельных вариантов генов вазопрессинового рецептора (AVPR1a) и окситоцинового рецептора (OXTR) [36].

Альтруизм и социум. Некоторые авторы пишут, что по-настоящему бескорыстная забота о неродственниках в природе встречается редко [37]. В то же время у человека развит парохизм (предпочтение своих), при котором под своими не обязательно понимаются родственники. Действительно, если посмотреть отстранённо на человеческое общество, то видно, что многие бескорыстно помогают и поддерживают именно неродственников. Происходит это потому, что предпочтение отдаётся «родственникам по духу», т.е. единомышленникам. Зачастую это поддержка людей, обладающих просто понравившимися (но до первого предъявления новыми) взглядами. В богатых странах помогают зачастую деньгами, а в бедных — разносторонней поддержкой. В то же время людей, которые не нравятся, не поддерживают (даже если это родственники). Исключение тут — только самые ближайшие родственники, которым принято помогать в любом случае (сказанное справедливо в основном для западных индустриальных обществ, тогда как в традиционных обществах, как правило, гораздо сильнее развиты общественные институты, основанные на родстве [37]).

При реципрокном альтруизме индивиды ведут себя альтруистично в отношении друг друга, однако только в том случае, если ожидают ответного самопожертвования [38]. Он встречается у животных, достаточно разумных, чтобы выбирать надёжных партнёров, следить за их репутацией и наказывать обманщиков.

В модели «вложенного перетягивания каната» [39] каждый индивид эгоистически расходует часть «общественного пирога» на то, чтобы увеличить свою долю этого пирога. Эта потраченная на внутригрупповую конкуренцию часть называется «эгоистическим усилием» данного индивида. Доля, доставшаяся в итоге каждому индивиду, зависит от соотношения его собственного эгоистического усилия и суммы эгоистических усилий остальных членов группы. На тех же принципах строятся в модели и взаимоотношения между группами. Таким образом, получается вложенное, двухуровневое «перетягивание каната». Чем больше энергии тратят особи на внутригрупповую борьбу, тем меньше её остаётся для межгруппового «перетягивания» и тем меньше получается «общий пирог» группы. Исследование этой модели при помощи теории игр подтвердило, что внутригрупповая

кооперация (проявляющаяся в данном случае в снижении индивидуальных «эгоистических усилий») должна расти с ростом внутригруппового родства (что полностью соответствует теории родственного отбора). Но модель также показала, что кооперация может иметь место даже при очень низком уровне родства между членами группы. Для этого необходима острая конкуренция между группами.

Межгрупповая конкуренция — один из главных факторов, стимулирующих развитие кооперации и альтруизма у социальных организмов [39]. Ещё Дарвин выдвигал идею о связи эволюции альтруизма с межгрупповой конкуренцией [40]. Позже она была применена к социальным насекомым. Ничто так не сплачивает коллектив, как совместное противостояние другим коллективам; это надёжное средство «сплочения» населения в альтруистический «муравейник» [39].

Также при помощи математических моделей была обоснована идея, что альтруизм к членам «своей» группы у людей мог развиваться только в комплексе с парохизмом (враждебностью к чужакам) [41, 42]. Происходило это в ходе многочисленных межгрупповых конфликтов. По оценке Bowles [42], племена наших предков достаточно сильно враждовали между собой и обладали достаточно высокой степенью родства внутри группы, чтобы естественный отбор мог обеспечить развитие внутригруппового альтруизма. Bowles показал, что уровень развития альтруизма зависит от четырёх параметров: 1) от интенсивности межгрупповых конфликтов, которую можно оценить по уровню смертности в войнах; 2) от того, в какой степени повышение доли альтруистов (например воинов, готовых умереть ради своего племени) увеличивает вероятность победы в межгрупповом конфликте; 3) от того, насколько родство внутри группы превышает родство между враждующими группами; 4) от размера группы. Согласно его расчётам, у первобытных охотников-собирателей отбор должен был поддерживать внутригрупповой альтруизм на довольно высоком уровне, соответствующем снижению индивидуальной приспособленности альтруистов на 2–3%. Иными словами, «ген альтруизма» мог распространиться в популяции, даже если шансы выжить и оставить потомство у носителя такого гена на 2–3% ниже, чем у соплеменника-эгоиста. Bowles приводит два наглядных расчёта. Если изначальная частота встречаемости данного аллеля в популяции равна 90%, а репродуктивный успех носителей этого аллеля на 3% ниже, чем у носителей других аллелей, то уже через 150 поколений частота встречаемости «вредного» аллеля снизится

с 90% до 10%. Таким образом, с точки зрения естественного отбора снижение приспособленности на 3% является критичным. Если взглянуть на ту же величину (3%) с «военной» точки зрения, то для того, чтобы степень альтруизма оказалась равной 0,03, военная смертность среди альтруистов должна составлять свыше 20% (учитывая частоту и кровопролитность палеолитических войн), т.е. в случае серьёзного конфликта каждый пятый альтруист должен пожертвовать жизнью ради общей победы [42].

Следовательно, такие, казалось бы, противоположные свойства человека, как доброта и воинственность, возможно, развивались в едином комплексе [43]. Установлено, что среди детей 3–6 лет есть лишь около 5% бескорыстных альтруистов. При этом их доля растёт с возрастом, сдерживая развитие социального паразитизма [43]. Эти свойства детской психики являются продуктом как биологической (гены), так и культурной (воспитание) эволюции. Например, новый поведенческий признак может сначала передаваться из поколения в поколение посредством обучения и подражания (подобно тому, как это происходит у муравьёв и многих других животных), а затем постепенно закрепиться и в генах («эффект Болдуина») [44].

У социальных животных в ходе эволюции под действием отбора развиваются различные преобладающие формы социального и репродуктивного поведения. Например, грызуны могут жить небольшими или большими группами, вести себя более терпимо или агрессивно по отношению к сородичам (включая новорождённых) и формировать или не формировать связи с другими членами группы (включая половых партнёров). Любая из этих поведенческих адаптаций может повышать приспособленность к определённым условиям среды, но также может потребовать компромиссов, таких как совместное использование ресурсов, большие родительские инвестиции, повышенный риск стать жертвой хищника и т.д. [45]. Любые объединения — примитивные анонимные сообщества или высокоразвитые персонализированные, в котором *его члены знают друг друга на основе индивидуального опыта*, могут способствовать росту приспособленности и поддерживаться отбором. ПЖ социальных животных обычно выше, чем их одиночных сородичей. Вершиной эволюции социальности является эусоциальность. Под ней большинство современных авторов [46–49] понимают такие адаптации к совместному обитанию в одном гнезде взрослых особей, когда, во-первых, они представлены как минимум двумя генерациями, во-вторых, имеется кооперация в выполнении различных работ и,

в-третьих, репродуктивные функции распределены между ними (наличие каст). Эусоциальность распространена среди перепончатокрылых (муравьи, пчелиные, осы-веспиды и осы-сфециды) и термитов. В каждой из этих групп социальная жизнь возникла независимо. Сообщества этих насекомых являются персонализированными. Например, северные осы полисты (*Polistes fuscatus*) распознают друг друга благодаря рисунку на голове [50, 51].

Ранее предполагалось [52], что эусоциальность у насекомых может развиваться как парасоциальным (добровольное объединение особей в сообщество с последующим усложнением заботы о потомстве), так и субсоциальным (развитие и усложнение родительского поведения) путём. В действительности парасоциальный путь, по-видимому, не существует, поскольку, во-первых, не известен ни один вид, колонии которого заканчивают развитие, не переходя в обычные материнско-дочерние [53]. В то же время этапы развития эусоциальности субсоциальным путём показаны во всех группах пчёл и ос. Появление нерепродуктивной касты лишь в материнско-дочерних сообществах постулируется также гипотезой гаплодиплоидии. Согласно ей, у перепончатокрылых из-за гаплодиплоидной детерминации пола сёстры оказываются более близкими родственницами, чем мать и дочь, и поэтому индивидуальному насекомому, в соответствии с правилом Гамильтона, выгоднее заботиться о сёстрах, чем производить собственных дочерей. Кроме того, показано, что даже высокая степень генетического родства между рабочими в гнезде часто оказывается недостаточной для «разумного эгоизма», т.е. для добровольного отказа рабочих от откладки собственных яиц. По-видимому, он эффективней поддерживается там, где применяются жёсткие «полицейские» меры (например, уничтожение другими рабочими «незаконных» яиц) [53].

Способы поддержания (регуляции) альтруизма. Возникнув, альтруизм должен поддерживаться. Этому мешает наличие обманщиков. Для того чтобы выжить, видам с высокой долей альтруистов необходимо защищаться от нахлебников (эгоистов). Само присутствие эгоистов делает довольно высокой вероятность появления мутаций, обеспечивающих защиту от них. У социальных амёб *Dictyostelium* это приводит к эволюционной «гонке вооружений» между эгоистами и «честными» амёбами [54]. В результате опытов по генетике и селекции получили смесь амёб-мутантов, которые оказались надёжно защищены от эгоистов вследствие произошедшей защищающей мутации, однако не от любых эгоистов, а только от тех, с которыми им пришлось

конкурировать в эксперименте. Более того, эти амёбы-мутанты защищали от эгоистов не только себя, но и другие штаммы честных амёб, если их смешать. Эти эксперименты были повторены много раз, и каждый раз в том или ином штамме амёб-мутантов возникала устойчивость, причём мутировали разные гены, и механизмы устойчивости возникали разные. Некоторые устойчивые штаммы сами при этом стали эгоистами по отношению к «диким» амёбам, а другие остались честными [54].

У бактерий-миксококков единственная мутация в одном из генов-регуляторов, влияющих на поведение бактерий, превратила эгоистов в защищённых от обмана альтруистов [55].

У дрожжей возможность «мирного сосуществования» альтруистов (производителей «общественно-полезного продукта» — фермента инвертазы, расщепляющего сахарозу на глюкозу и фруктозу) с эгоистами (не производящими фермент, но потребляющими полученную чужими усилиями глюкозу) обеспечивается небольшим преимуществом, которое получают альтруисты в случае очень низкого содержания глюкозы в среде, а также особым нелинейным характером зависимости скорости размножения дрожжей от количества доступной пищи. Ведь 1% моносахаридов употребляется образующими их альтруистами самолично, без помещения их в «свободный доступ», что при достаточно низкой доле альтруистов в смешанной популяции приводит к тому, что выделять фермент оказывается выгоднее, чем не делать этого [56].

По всей видимости, эволюция социальных бактерий и простейших неоднократно начинала двигаться в сторону формирования многоклеточного организма. Однако эволюция так и не создала из социальных бактерий или простейших настоящие многоклеточные организмы (только плазмодии и плодовые тела). Одна из причин эволюционной бесперспективности многоклеточных организмов, образующихся из скоплений одноклеточных индивидуумов, состоит в том, что такие скопления создают идеальные условия для развития социального паразитизма. Любая мутация, позволяющая одноклеточному индивиду пользоваться преимуществами жизни в многоклеточном коллективе и ничего не давать взамен, имеет шанс распространиться, невзирая на её гибельность для коллектива.

Механизм поддержания альтруизма через улучшение репутации того, кто совершает альтруистический акт («непрямая реципрокность»), работает у людей через языковое общение — древнейшее средство распространения компрометирующих сведений о «неблагонадёжных»

членах социума, что способствует сплочению коллектива и наказанию эгоистов [57]. Интересно, что арабские дроздовые тимелии *Turdoides squamiceps* конкурируют за право совершить «добрый поступок» (посидеть над гнёздами, помочь ухаживать за птенцами, накормить товарища), поскольку это повышает социальный статус; иначе говоря, у этих птиц существует подобие человеческого института репутации [58].

Некоторые возможные механизмы формирования фенотоза. Фенотоз в широком смысле является запрограммированной гибелью, которая часто развивается как адаптивная (с выгодой для потомков) гибель [7, 59, 60]. Согласно последним данным [6–8], мы можем с уверенностью говорить о наличии адаптивной гибели у многих групп организмов, от одноклеточных до позвоночных. Вопрос о том, может ли фенотоз развиться в эволюции, если он не на благо сообществу, остаётся открытым. Адаптивная гибель увеличивает совокупную (инклюзивную) приспособленность, т.е. эффективность передачи копий генов индивида в следующие поколения, независимо от того, кто является носителем этих копий: собственные потомки индивида или потомки его родни [6].

Представители колониальных одноклеточных, дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, демонстрируют адаптивную гибель по типу «жертвоприношение биомассы» [6]. По мере того, как доступность питательных веществ в стареющих колониях дрожжей снижается, некоторые клетки в центре колонии подвергаются запрограммированной гибели [60–62].

Другой вариант адаптивной гибели, определённый Galimov и Gems [8] как жертвоприношение потребителя, подробно разбирается ими на примере ряда бактерий [63, 64]. Например, у *Mucosoccus xantus* особи умирают, чтобы прекратить потребление, тем самым увеличивая доступность питательных веществ для родственников [65]. В бактериальных пленках *Bacillus subtilis* часть клеток образуют споры, продолжая рост путём использования альтернативных метаболитов [66]. Спорующие клетки продуцируют токсины каннибализма, которые убивают их неспорующих родственников. Бактерии *Streptococcus pneumoniae* приобретают способность (компетенцию) поглощать экзогенную ДНК и производить бактериоцины, которые выборочно убивают некомпетентные клетки [64, 66, 67]. Механизм адаптивной гибели также изучен Galimov и Gems [8] у свободноживущих нематод *Caenorhabditis elegans* [6, 68]. Взрослые гермафродиты *C. elegans* производят сначала сперматозоиды, а затем ооциты. Результирующее ограничение количества сперматозо-

идов приводит к прекращению размножения уже через 2–3 дня после половой зрелости, потенциально способствуя эволюции адаптивной гибели [6]. Кроме того, у *C. elegans* наблюдается заметное возрастное снижение скорости потребления, увеличивающее доступность пищи для родственников [69]. Galimov и Gems [8] показали при помощи моделирования, что при высокой плодовитости более короткий репродуктивный период и ПЖ повышают приспособленность колонии, снижая бесполезное потребление пищи в популяции.

В целом адаптивная *гибель* легче развивается у организмов, подвергающихся репродуктивной *гибели*: раннее прекращение или замедление репродукции (по любым причинам) создаёт предпосылки для эволюции фенотоза [6, 70]. Один из известных примеров «альтруистической» поведенческой реакции, связанной с размножением, наблюдается у представителей отряда богомоловых (например, у *Miomantis caffra*), у которых самопожертвование самцов, возможно, в ряде случаев является наилучшей стратегией. В процессе естественного отбора преимущество получили те самцы, которые были готовы пожертвовать собой. Для оплодотворённой самки самец богомола является идеальной пищей, обеспечивая запас белка на период беременности и увеличивая шансы на продолжение рода. Оказалось, что в яйцах самок, съевших самцов, содержание питательных веществ в 3 раза выше, чем в случаях, когда партнёр оставался жив. Получается, что богомолы пожирают самцов ради будущего потомства, давая им необходимое количество белка. Тем не менее и такая поведенческая реакция не является абсолютно детерминированной и допускает вариации: в половине случаев, богомолам-самцам всё же удаётся избежать гибели [71].

А вот у некоторых пауков самцы действительно «хотят», чтобы их съели, и сами бросаются самке в челюсти. Это наблюдается у таких видов пауков (например, *Argiope bruennichi*), у которых мелких самцов гораздо больше, чем крупных самок, и поэтому у отдельного самца, даже если он уцелеет, шансы на повторное спаривание стремятся к нулю [72].

В тканях оптических желёз самок **калифорнийского двупятнистого осьминога** (*Ostoria bimaculoides*) в ходе репродуктивного цикла (во время ухода за кладкой) резко сокращается синтез нейропептидов, отвечающих за пищевое поведение, а также катехоламинов. Одновременно в оптической железе увеличивается синтез стероидов, участвующих в обмене холестерина и инсулина [48]. Эти результаты опровергают гипотезу «гормона самоуничтожения» и свиде-

тельствуют, что запрограммированная гибель самки осьминога связана с более сложным изменением её гормонального статуса [48] (т.е. фактически работы Больших биологических часов). Аналогичное явление отмечено и у млекопитающих. У самцов хищных сумчатых мышей *Antechinus* в брачный период наблюдается сильный гормональный дисбаланс, приводящий их к гибели по окончании брачного сезона [73].

Предполагается [5], что адаптивное старение (и адаптивная гибель) могут развиваться в колониальных вязких (недисперсных) популяциях при соблюдении двух условий: 1) высокая вязкость (низкая перемешиваемость), что гарантирует высокую вероятность наследования ресурсов, освобождённых смертью индивида, его детьми и родственниками; 2) достаточно раннее и быстрое снижение репродукции (как у *C. elegans*). Тихоокеанский лосось (*Oncorhynchus nerka*) известен своей способностью в большом количестве (от 73 до 98%) возвращаться к ручьям своего рождения. Более того, местные популяции лосося не являются панмиктическими, а существуют как метапопуляции с иерархической структурой [74]. Это означает, что тихоокеанские лососи, возвращающиеся на нерест в ручьи, имеют высокую степень родства, гарантируя, по-видимому, что выгоды от жертвоприношения родительской биомассы получают родственники. Аналогичная гибель описана после нереста у миног [75]. Адаптивная *гибель* — это форма крайнего альтруизма, которая в настоящее время, по-видимому, в значительной степени ограничена организмами, демонстрирующими такой высокий уровень родства, социальной организации и физической ассоциации, что они обладают чертами особей более высокого порядка: образуют колонии одноклеточных с некоторыми особенностями многоклеточных животных или колонии многоклеточных животных с некоторыми надорганизменными особенностями. Это часть более широкого явления, когда приспособленность на уровне колонии увеличивается за счёт потери приспособленности на индивидуальном уровне.

Ещё один способ возникновения фенотипа связан с ограничением гиперразвития мозга и поведенческими моделями у человека. В человеческом обществе биологическая эволюция повернулась к культурной спиной. В недавней обзорной статье [32] приведены рассуждения о том, как генно-культурная эволюция человека может не только ограничивать развитие мозга, но и способствовать контрпродуктивному процессу — поддерживать его деградацию (оглупление или снижение IQ). Происходит это тогда,

когда репродуктивный успех индивидов перестаёт зависеть от конкурентоспособности этих индивидов в борьбе за ресурсы (или когда на определённом этапе культурно-социального развития наиболее конкурентоспособными оказываются индивиды с не самыми развитыми когнитивными способностями). А если жизненный успех больше не конвертируется в репродуктивный, культурный драйв также больше не может работать (точнее, работает с отрицательным знаком: чем хуже, тем лучше) [32].

Влияние типов отбора на адаптивную гибель и старение. Существование адаптивной *гибели* в клональных популяциях можно объяснить родственным (направленным на сохранение признаков, благоприятствующих выживанию близких родичей) отбором, поскольку клональные колонии можно рассматривать как «сверхорганизмы». Как уже говорилось выше, согласно правилу Гамильтона, естественный отбор может способствовать альтруистическому поведению, когда $n r B > C$, где r — степень родства, B — выгода для реципиента, n — число реципиентов, а C — затраты для донора [76]. Здесь, поскольку родство $r = 1$, правило Гамильтона $n r B > C$ упрощается ($n B > C$), и его легче выполнять. Стоимость (C) *гибели* отдельного индивидуума перевешивается выгодой (B) для многих родственников. Как показано Travis [70] с использованием компьютерных моделей, это также может быть верным для пространственно структурированных популяций с высокой долей старых особей. Основным условием для работы родственного отбора в модели Travis является низкое расщепление как условие «наследования ресурсов» (передачи ресурсов от умерших особей их родственникам) [8]. Оно соблюдается в колониях бактерий, дрожжей и даже *C. elegans*. Аналогичные результаты представлены в работе Markov [5].

Адаптивная гибель легче развивается у организмов, подвергающихся *репродуктивной гибели* [6, 70]. Как и лосось, гермафродиты *C. elegans* демонстрируют репродуктивную гибель [6, 8]. Это может быть отражением коэволюции двух черт, что предсказывается правилом Гамильтона. После размножения у семеплодных (размножающихся только один раз в своей жизни) организмов их индивидуальная приспособленность становится пренебрежимо малой. Это означает, что адаптивная *гибель* влечёт за собой незначительное снижение индивидуальной приспособленности (C) или вообще не снижает её, а потенциальные преимущества для других особей (B) остаются. Аналогичные рассуждения недавно использовались для объяснения эволюции массового самоубийства клеток у *Escherichia*

coli [6, 77]. Таким образом, адаптивная *гибель* вероятна и у других организмов, которые не являются клональными и колониальными.

Большинство биологических популяций структурированы по классам (например, по полу, возрасту, касте), поэтому приспособленность социальной группы может измениться из-за реорганизации классов, что не имеет непосредственного отношения к генам и естественному отбору [8, 78–81].

Как уже говорилось, эволюционные выгоды от адаптивной *гибели* будут более выражены, если значительная часть популяции стара [82]. Стрессовые условия могут ускорять старение (одна из программ старения – индуцируемая митохондриальными активными формами кислорода (АФК)), снижая репродуктивную функцию, и тем самым увеличивать преимущества адаптивной *гибели* [83].

Вопросы старения также изучались с точки зрения многоуровневого отбора [5, 70, 84]. С популяционно-генетической точки зрения влияние снижения силы естественного отбора с возрастом особей на эволюцию старения было описано математически на идеализированных (т.е. рассредоточенных и пересекающихся) популяциях Райта–Фишера. При этом не учитывались социальные и экологические факторы, включая пространственную структуру, доступ к ресурсам или рассредоточенность [85, 86]. Lohr et al. [6] показали, как гибель организма в результате клеточного старения может эволюционировать в качестве адаптивного группового признака у видов, которые существуют в виде популяций с высоким коэффициентом родства (особенно популяций клонов) и низким уровнем расселения.

У каждого конкретного вида существует максимальное зарегистрированное значение видовой ПЖ. Поддерживается ли ограничение ПЖ отбором напрямую (т.е. является ли оно адаптацией) или это побочный результат отбора по другим признакам, повышающим приспособленность, остаётся спорным. Выявление мутаций, увеличивающих ПЖ, предполагает, что старение находится под генетическим контролем, но эволюционные движущие силы, ограничивающие ПЖ, не определены.

Lidsky и Andino [87] разработали модель, показывающую, что ограничение ПЖ полезно для борьбы с эпидемиями, обеспечивая возможное объяснение выбора заданного значения ПЖ видов и отсутствия бессмертных мутантов. Их гипотеза гласит, что такая регуляция ПЖ выбирается, в частности, для предотвращения и ограничения вспышек хронических инфекционных заболеваний. Популяции часто мигрируют, что-

бы колонизировать новую среду обитания, или просто сталкиваются с условиями, которые существенно снижают плотность популяции. Авторы изучили взаимосвязь между заданной ПЖ и нагрузкой патогенов в случае миграции популяций хозяев в новую среду, включая сокращение размера популяции или «бутылочное горлышко». Они, в частности, показали, что в популяциях с более короткой ПЖ инфицированные основатели умрут до того, как плотность населения достигнет уровня, позволяющего эффективную передачу патогенов. Соответственно, более короткая ПЖ ограничивает распространение инфекции и ускоряет элиминацию патогенов по сравнению с популяциями с более долгоживущими особями [87]. Ограничение ПЖ особенно полезно в контексте передачи зоонозов, когда патогены должны адаптироваться к новому хозяину. По нашему мнению, вспышки инфекций могут способствовать контролю эволюцией заданных значений ПЖ видов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Альтруизм во многих случаях даёт определённое преимущество в адаптации, о чём недвусмысленно свидетельствует разнообразие путей его возникновения (рисунок), подробно рассматриваемое в данной статье.

Существует по меньшей мере два глобальных направления возникновения альтруизма. При первом (вынужденном альтруизме) особь становится альтруистом, не претерпевая для этого каких-либо внутренних изменений под воздействием окружения, т.е. пассивно. Таковыми воздействиями могут быть изменения, возникшие у других особей (например, у обманщиков). При втором типе особь становится альтруистом благодаря изменениям в собственном поведении. Например, в социуме преимущественное право размножения получают высокоранговые особи, а более низкоранговые играют «альтруистичную» роль обслуживающего персонала. В большинстве высокоорганизованных сообществ альтруисты не появляются случайно, а назначаются. В предельном случае (эусоциальных сообществах) такое «неравенство» закреплено генетически. При этом у муравьёв видно становление такой «несправедливости» в ходе эволюции: у более примитивных есть «гамэргаты» (рабочие, способные к размножению), тогда как у более эволюционно продвинутых их нет [88]. Кроме того, ко второму типу относится альтруизм, возникающий вследствие действия группового отбора и парадокса Симпсона; адаптивная *гибель* (обычно острый фенотоз), как



Многообразие альтруистических программ. В верхней части рисунка приведены примеры альтруистического поведения, которое при своём развитии и усилении может привести [указано стрелкой] к гибели организма и/или отстранению его от размножения и возможности передать свои гены следующему поколению (т.е. фактически к феноптозу в том или ином его проявлении) (примеры указаны на рисунке). В нижней (с темным фоном) части рисунка, наоборот, приведены примеры феноптотических программ, которые, хотя и вызывают гибель животных, но также имеют альтруистическую компоненту (т.е. фактически приводят к альтруизму) [указано стрелкой], способствуя адаптации (например, за счёт прекращения распространения инфекции, улучшения условий существования популяции или улучшая выживание потомства)

форма крайнего альтруизма), также подробно рассматриваемая в данной статье.

Феноптоз как альтруистическая программа.

Возникновение феноптоза в эволюции лишь на первый взгляд выглядит парадоксально. Долголетие как таковое явно не является первоочередной эволюционной «задачей» для живых организмов. С эволюционной точки зрения, первоочередными являются проблемы адаптации к окружающей среде, связанные с нуждами выживания, обеспечения пищей и размножения. Регуляция поддержания гомеостаза и репарации представляет собой сложную сеть взаимозависимых реакций, а эффективность этих процессов ухудшается с возрастом. Оба известных вида феноптоза (хронический и острый) имеют адаптивное значение [89], но острый феноптоз связан прежде всего с (избыточной) реакцией на

резкое действие внешних факторов (например, инфекции). Тогда как хронический феноптоз связан с воздействием факторов внутренних, с оптимизацией ПЖ как видового признака (такого же как рост, размер, масса и т.д.).

Таким образом, мы видим огромное разнообразие видов детерминированной гибели в природе, особенно если она связана с процессом размножения. В то же время не всегда такая гибель альтруистична.

В условиях резких изменений в окружающей среде преимущество получают не виды, наиболее приспособленные к условиям, которых уже нет, а виды с наибольшей пластичностью фенотипических (в том числе поведенческих) признаков, виды способные к столь же резкому изменению, как и изменение среды обитания. Выше мы говорили, что именно это является главной характеристикой «контрпродуктивных» программ (способность к необычайно резкому ответу вне зависимости от своей вредоносности). Видимо, такое свойство всё же, скорее, помогает, нежели мешает его носителям в эволюционном масштабе времени. В частности, это свойство будет полезно для прохождения популяций через «бутылочные горлышки» — резкое уменьшение численности в результате природных катаклизмов или эпидемий. Даже для человека, славящегося своей приспособляемостью, таких «бутылочных горлышек» (когда численность популяции снижалась до нескольких десятков тысяч человек) известно как минимум три [90]. Воздействие инфекционных агентов (например, возбудителя малярии) вызывает широкий спектр генетического разнообразия, лежащего в основе варибельности восприимчивости к инфекционным заболеваниям и вызываемых ими осложнений [91]. Более того, адаптивная ценность признаков может меняться при изменении образа жизни. Так, способность к «сверхсильному» ответу, выгодная людям каменного века, видимо, относительно недавно стала менее адаптивной. Так, при переходе от образа жизни охотников-собирателей к земледелию иммунная система первых фермеров немного ослабла, чтобы не дать инфекциям вызвать цитокиновый шторм и убить тем самым заражённого [92].

Гибель от современной пандемии COVID-19 как феноптоз с альтруистическими целями. На заре человеческой эволюции, когда популяции людей были так же разрознены, как сейчас популяции других крупных животных, программная гибель помогала победить (не распространить на весь ареал) болезни. Происходило это благодаря быстрой смерти носителей (например, при сепсисе, а также в ходе Великих

эпидемий: чума, холера и т.д.). Особей убивала включающаяся внутри программа, а также исключение из общества (общество всячески сторонилось их). Свежим примером являются норки в Дании. Как только в небольшой популяции норки обнаружили COVID-19, предложили её уничтожить, что в эволюционном плане решает проблему. Оказалось, что, согласно данным по 23 масштабным пандемиям и эпидемиям, COVID-19 не нашлось места в десятке самых смертельных эпидемий (для этого число жертв должно достичь 38,5 млн человек, а для попадания в пятёрку – до 210 млн). Самым губительным заболеванием в истории человечества оказалась пандемия чумы, которая в 1347–1351 гг. унесла жизни 200 млн человек (~42% мирового населения того времени). Во время чумы 541–542 гг. число жертв достигло отметки 60 млн человек (28,5% мирового населения) [93, 94].

Самой смертоносной болезнью в наши дни остаётся СПИД. Заражение вирусом иммунодефицита человека с момента открытия заболевания в 1981 г. привело к смерти 30 млн человек. С начала 2000-х гг. в мире произошли вспышки тяжёлого острого респираторного синдрома, ближневосточного респираторного синдрома и вируса гриппа H1N1. Причиной большинства недавних пандемий является вирус, которым заразились люди от животного. Все коронавирусы – SARS, MERS и COVID-19 – передаются от летучих мышей [95].

В настоящее время серьёзным является вопрос, останется ли SARS-CoV-2 циркулировать в популяции людей или его возможно изжить вакцинацией и противоэпидемическими мерами. По оптимистическому прогнозу пандемия должна была закончиться в течение года после массового применения эффективных вакцин. Однако уже сейчас становится понятным, что по социальным причинам 75%-ная вакцинация населения, а уж тем более 90%-ная, выглядит практически нереализуемой. Ситуацию осложнили быстро появляющиеся мутантные штаммы.

Согласно Wenzel [96], вирусные вспышки являются естественной частью жизни, и, хотя существует неопределённость в отношении того, когда и насколько серьёзным будет вирус, со временем интенсивность заболеваемости неизбежно идёт на спад. Важной задачей, на наш взгляд, представляется изучение и поиски способов смягчения реакций гиперответа организма. Сам по себе гиперответ, способный привести к гибели особи, является мощным эволюционным приобретением, позволяющим адаптироваться к резкой смене условий существования. Это относится и к вспышкам потенциально ле-

тальных заболеваний. В сущности, одним из древнейших прообразов такой летальности является известный «quorum sensing», когда запуск того или иного процесса, существенно влияющего на судьбу популяции, непосилен для одной особи, но возможен, когда численность превышает определённое пороговое значение. При этом гибель части популяции, предотвращающая дальнейшее распространение инфекции, имеет, исходя из рассмотренных нами в этой статье материалов, альтруистичную природу. В ряде случаев и старение может иметь адаптивное значение. Иногда действие программ фенотипа является продолжением программ развития. Таково, например, действие ингибирующей Nrf2 киназы гликогенсинтазы GSK3 β , в том числе и через индукцию inflammaging [97, 98]. Наиболее перспективным представляется изучение антиоксидантных препаратов различной направленности, в частности, противодействующих цитокиновому шторму [99], как традиционных: растительных экстрактов [100] и активных компонентов сыворотки крови [101], так и, например, получаемых из насекомых [102]. Наиболее перспективными в настоящий момент являются главный антиоксидант организма, глутатион [103], а, кроме того, синтезированные искусственно антиоксиданты, наибольшую эффективность из которых показали соединения, направленные в митохондрии (SkQ-ионы). В недавней работе, применяя ионы Скулачёва (SkQ), удалось остановить гибель мышей, вызванную различными способами (введением бактериальных липополисахаридов, внутривенным введением митохондрией, а также холодовым или токсическим шоком [104]. Ещё одним важным направлением является выявление эффекторных молекул и маркёров фенотипа с помощью метаболомных исследований [105].

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-29-13037).

Благодарности. Авторы благодарят академика В.П. Скулачёва за оригинальную идею, а также за ценные советы и комментарии в процессе написания статьи. Авторы благодарят Е.Р. Галимова за ценные советы и комментарии в процессе написания данной статьи.

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. Austad, S. N. (1997) *Why We Age*, John Wiley and Sons, New York.
2. De Magalhães, J. P. (2012) Programmatic features of aging originating in development: aging mechanisms beyond molecular damage? *FASEB J.*, **26**, 4821-4826, doi: 10.1096/fj.12-210872.
3. Kenyon, C. (2005) The plasticity of aging: insights from long-lived mutants, *Cell*, **120**, 44960, doi: 10.1016/j.cell.2005.02.002.
4. Weismann, A. (1889) *Essays upon Heredity and Kindred Biological Problems*, Clarendon Press, Oxford.
5. Markov, A. (2012) Can kin selection facilitate the evolution of the genetic program of senescence? *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 733-741, doi: 10.1134/S0006297912070061.
6. Lohr, J., Galimov, E., and Gems, D. (2019) Does senescence promote fitness in *Caenorhabditis elegans* by causing death? *Ageing Res. Rev.*, **50**, 58-71, doi: 10.1016/j.arr.2019.01.008.
7. 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.
8. Galimov, E. R., and Gems, D. (2021) Death happy: adaptive ageing and its evolution by kin selection in organisms with colonial ecology, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **376**, 20190730, doi: 10.1098/rstb.2019.0730.
9. Zuo, L., Prather, E. R., Stetskiy, M., Garrison, D. E., Meade, J. R., et al. (2019) Inflammaging and oxidative stress in human diseases: from molecular mechanisms to novel treatments, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 4472, doi: 10.3390/ijms20184472.
10. Wang, A., and Medzhitov, R. (2019) Counting calories: the cost of inflammation, *Cell*, **177**, 223-224, doi: 10.1016/j.cell.2019.03.022.
11. Ye, J., and Medzhitov, R. (2019) Control strategies in systemic metabolism, *Nat. Metab.*, **1**, 947-957, doi: 10.1038/s42255-019-0118-8.
12. Zhu, Y., Deng, J., Nan, M. L., Zhang, J., Okeunle, A., et al. (2019) The interplay between pattern recognition receptors and autophagy in inflammation, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1209**, 79-108, doi: 10.1007/978-981-15-0606-2_6.
13. Zhou, Y., Tong, Z., Jiang, S., Zheng, W., Zhao, J., and Zhou, X. (2020) The roles of endoplasmic reticulum in NLRP3 inflammasome activation, *Cells*, **9**, 1219, doi: 10.3390/cells9051219.
14. 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.
15. 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.
16. 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**, 95109, doi: 10.2174/1874609808666150422122401.
17. 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.
18. Skulachev, V. P., Shilovsky, G. A., Putyatina, T. S., Popov, N. A., Markov, A. V., et al. (2020) Perspectives of *Homo sapiens* lifespan extension: focus on external or internal resources? *Aging (Albany NY)*, **12**, 55665584, doi: 10.18632/aging.102981.
19. Rose, M. (1991) *Evolutionary Biology of Aging*, Oxford University Press, Oxford.
20. Austad, S. N. (2004) Is aging programmed? *Aging Cell*, **3**, 249-251, doi: 10.1111/j.1474-9728.2004.00112.x.
21. Blagosklonny, M. V. (2020) From causes of aging to death from COVID-19, *Aging (Albany NY)*, **12**, 10004-10021, doi: 10.18632/aging.103493.
22. Agueda-Pinto, A., Alves, L. Q., Neves, F., McFadden, G., Jacobs, B. L., et al. (2021) Convergent loss of the necroptosis pathway in disparate mammalian lineages shapes viruses countermeasures, *Front. Immunol.*, **12**, 747737, doi: 10.3389/fimmu.2021.747737.
23. Yu, Z., Hu, Z., Xu, Q., Zhang, M., Yuan, N., et al. (2020) The LuxI/LuxR-type quorum sensing system regulates degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons via two mechanisms, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 5548, doi: 10.3390/ijms21155548.
24. Long, T., Tu, K. C., Wang, Y., Mehta, P., Ong, N. P., et al. (2009) Quantifying the integration of quorum-sensing signals with single-cell resolution, *PLoS Biol.*, **7**, e68, doi: 10.1371/journal.pbio.1000068.
25. Ismail, A. S., Valastyan, J. S., and Bassler, B. L. (2016) A host-produced autoinducer-2 mimic activates bacterial quorum sensing, *Cell Host Microbe*, **19**, 470-480, doi: 10.1016/j.chom.2016.02.020.
26. 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.
27. Darwin, C. (1859) *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or, The Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*, J. Murray, London.
28. 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.
29. Chuang, J. S., Rivoire, O., and Leibler, S. (2009) Simpson's paradox in a synthetic microbial system, *Science*, **323**, 272-275, doi: 10.1126/science.1166739.
30. Aanen, D. K., de Fine Licht, H. H., Debets, A. J., Kerstes, N. A., Hoekstra, R. F., and Boomsma, J. J. (2009) High symbiont relatedness stabilizes mutualistic cooperation in fungus-growing termites, *Science*, **326**, 1103-1106, doi: 10.1126/science.1173462.
31. Dawkins, R. (1976) *The Selfish Gene*, Oxford University Press, Oxford.
32. Markov, A. V., and Markov, M. A. (2020) Runaway brain-culture coevolution as a reason for larger brains: exploring the "cultural drive" hypothesis by computer modeling, *Ecol. Evol.*, **10**, 6059-6077, doi: 10.1002/ece3.6350.
33. Cesarini, D., Dawes, C. T., Fowler, J. H., Johannesson, M., Lichtenstein, P., and Wallace, B. (2008) Heritability of cooperative behavior in the trust game, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 3721-3726, doi: 10.1073/pnas.0710069105.
34. Зорина З. А., Полетаева И. И., Резникова Ж. И. (2002) *Основы этологии и генетики поведения*, Высшая школа, Москва.
35. Donaldson, Z. R., and Young, L. J. (2008) Oxytocin, vasopressin, and the neurogenetics of sociality, *Science*, **322**, 900-904, doi: 10.1126/science.1158668.
36. Israel, S., Lerer, E., Shalev, I., Uzefovsky, F., Riebold, M., et al. (2009) The oxytocin receptor (OXTR) contributes to

- prosocial fund allocations in the dictator game and the social value orientations task, *PLoS One*, **4**, e5535, doi: 10.1371/journal.pone.0005535.
37. Henrich, J. (2020) *The WEIRDest People in the World: How the West Became Psychologically Peculiar and Particularly Prosperous*, Farrar, Straus and Giroux, NY.
 38. Trivers, R. L. (1971) The evolution of reciprocal altruism, *Q. Rev. Biol.*, **46**, 35-37.
 39. Reeve, H. K., and Hölldobler, B. (2007) The emergence of a superorganism through intergroup competition, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 9736-9740, doi: 10.1073/pnas.0703466104.
 40. Darwin, C. (1871) *The Descent of Man and Selection in Relation to Sex*, John Murray, London, or Appleton, New York.
 41. Choi, J. K., and Bowles, S. (2007) The coevolution of parochial altruism and war, *Science*, **318**, 636-640, doi: 10.1126/science.1144237.
 42. Bowles, S. (2009) Did warfare among ancestral hunter-gatherers affect the evolution of human social behaviors? *Science*, **324**, 1293-1298, doi: 10.1126/science.1168112.
 43. Fehr, E., Bernhard, H., and Rockenbach, B. (2008) Egalitarianism in young children, *Nature*, **454**, 1079-1083, doi: 10.1038/nature07155.
 44. Dennett, D. (2003) The Baldwin effect, a crane, not a skyhook, in *Evolution and learning: The Baldwin Effect Reconsidered* (Weber, B. H., and Depew, D. J., eds) MIT Press, Cambridge, MA.
 45. Ashton, B. J., Kennedy, P., and Radford, A. N. (2020) Interactions with conspecific outsiders as drivers of cognitive evolution, *Nat. Commun.*, **11**, 4937, doi: 10.1038/s41467-020-18780-3.
 46. Maebe, K., Hart, A. F., Marshall, L., Vandamme, P., Vereecken, N. J., et al. (2021) Bumblebee resilience to climate change, through plastic and adaptive responses, *Glob. Chang. Biol.*, doi: 10.1111/gcb.15751.
 47. 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.
 48. 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.
 49. Bouchebti, S., and Arganda, S. (2020) Insect lifestyle and evolution of brain morphology, *Curr. Opin. Insect Sci.*, **42**, 90-96, doi: 10.1016/j.cois.2020.09.012.
 50. Yan, H., and Liebig, J. (2021) Genetic basis of chemical communication in eusocial insects, *Genes Dev.*, **35**, 470-482, doi: 10.1101/gad.346965.120.
 51. Sheehan, M. J., and Tibbetts, E. A. (2011) Specialized face learning is associated with individual recognition in paper wasps, *Science*, **334**, 1272-1275, doi: 10.1126/science.1211334.
 52. Wilson, E. O., and Hölldobler, B. (2005) Eusociality: origin and consequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 13367-13371, doi: 10.1073/pnas.0505858102.
 53. Wenseleers, T., and Ratnieks, F. L. (2006) Enforced altruism in insect societies, *Nature*, **444**, 50, doi: 10.1038/444050a.
 54. Khare, A., Santorelli, L. A., Strassmann, J. E., Queller, D. C., Kuspa, A., and Shaulsky, G. (2009) Cheater-resistance is not futile, *Nature*, **461**, 980-982, doi: 10.1038/nature08472.
 55. Fiegna, F., Yu, Y.-T. N., Kadam, S. V., and Velicer, G. J. (2006) Evolution of an obligate social cheater to a superior cooperator, *Nature*, **441**, 310-314, doi: 10.1038/nature04677.
 56. Gore, J., Youk, H., and van Oudenaarden, A. (2009) Snowdrift game dynamics and facultative cheating in yeast, *Nature*, **459**, 253-256, doi: 10.1038/nature07921.
 57. Dunbar, R. (1998) *Grooming, Gossip, and the Evolution of Language*, Harvard University Press, Cambridge, MA.
 58. Zahavi, A. (1990) Arabian babblers: the quest for social status in a cooperative breeder, in *Cooperative Breeding in Birds: Long-term Studies of Ecology and Behavior* (Stacey, P. B., and Koenig, W. D., eds) Cambridge University Press, Cambridge.
 59. Riehl, C., and Frederickson, M. E. (2016) Cheating and punishment in cooperative animal societies, *Philos. Trans R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **371**, 20150090, doi: 10.1098/rstb.2015.0090.
 60. Váchová, L., Čáp, M., and Palková, Z. (2012) Yeast colonies: a model for studies of aging, environmental adaptation, and longevity, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2012**, 601836.
 61. 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.
 62. Popp, P. F., and Mascher, T. (2019) Coordinated cell death in isogenic bacterial populations: sacrificing some for the benefit of many? *J. Mol. Biol.*, **431**, 4656-4669, doi: 10.1016/j.jmb.2019.04.024.
 63. Veening, J.-W., Smits, W. K., and Kuipers, O. P. (2008) Bistability, epigenetics, and bet-hedging in bacteria, *Annu. Rev. Microbiol.*, **62**, 193-210, doi: 10.1146/annurev.micro.62.081307.163002.
 64. Guiral, S., Mitchell, T. J., Martin, B., and Claverys, J.-P. (2005) Competence-programmed predation of noncompetent cells in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*: genetic requirements, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 8710-8715, doi: 10.1073/pnas.0500879102.
 65. Nariya, H., and Inouye, M. (2008) MazF, an mRNA interferase, mediates programmed cell death during multicellular *Myxococcus* development, *Cell*, **132**, 55-66.
 66. López, D., and Kolter, R. (2010) Extracellular signals that define distinct and coexisting cell fates in *Bacillus subtilis*, *FEMS Microbiol. Rev.*, **34**, 134-149, doi: 10.1111/j.1574-6976.2009.00199.x.
 67. Veening, J.-W., and Blokesch, M. (2017) Interbacterial predation as a strategy for DNA acquisition in naturally competent bacteria, *Nat. Rev. Microbiol.*, **15**, 621-629, doi: 10.1038/nrmicro.2017.66.
 68. Galimov, E., and Gems, D., (2020) Shorter life and reduced fecundity can increase colony fitness in virtual *C. elegans*, *Aging Cell*, **19**, e13141.
 69. Huang, C., Xiong, C., and Kornfeld, K. (2004) Measurements of age-related changes of physiological processes that predict lifespan of *Caenorhabditis elegans*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 8084-8089, doi: 10.1073/pnas.0400848101.
 70. Travis, J. M. J. (2004) The evolution of programmed death in a spatially structured population, *J. Gerontol.*, **59A**, 301-305, doi: 10.1093/gerona/59.4.b301.
 71. Burke, N. W., and Holwell, G. I. (2021) Male coercion and female injury in a sexually cannibalistic mantis, *Biol. Lett.*, **17**, 20200811, doi: 10.1098/rsbl.2020.0811.
 72. Welke, K. W., and Schneider, J. M. (2010) Males of the orb-web spider *Argiope bruennichi* sacrifice themselves to unrelated females, *Biol. Lett.*, **6**, 585-588, doi: 10.1098/rsbl.2010.0214.
 73. Tian, R., Han, K., Geng, Y., Yang, C., Shi, C., et al. (2021) A chromosome-level genome of *Antechinus flavipes* provides a reference for an Australian marsupial genus with male death after mating, *Mol. Ecol. Resour.*, doi: 10.1111/1755-0998.13501.

74. Dionne, M., Caron, F., Dodson, J. J., and Bernatchez, L. (2009) Comparative survey of withinriver genetic structure in Atlantic salmon; relevance for management and conservation, *Conservation Genetics*, **10**, 869-879, doi: 10.1007/s10592-008-9647-5.
75. Weaver, D. M., Coghlan, S. M., Zydlewski, J., Hogg, R. S., and Canton, M. (2015) Decomposition of sea lamprey *Petromyzon marinus* carcasses: temperature effects, nutrient dynamics, and implications for stream food webs, *Hydrobiologia*, **760**, 57-67, doi: 10.1007/s10750-015-2302-5.
76. Hamilton, W. D. (1964) The genetical evolution of social behavior, *J. Theor. Biol.*, **7**, 1-52.
77. Granato, E. T., and Foster, K. R. (2020) The evolution of mass cell suicide in bacterial warfare, *Curr. Biol.*, **30**, 2836-2843, doi: 10.1016/j.cub.2020.05.007.
78. Gardner, A., and Grafen, A. (2009) Capturing the superorganism: a formal theory of group adaptation, *J. Evol. Biol.*, **22**, 659-671, doi: 10.1111/j.1420-9101.2008.01681.x.
79. Gardner, A. (2015) The genetical theory of multilevel selection, *J. Evol. Biol.*, **28**, 305-319, doi: 10.1111/jeb.12566.
80. Kramer, J., and Meunier, J. (2016) Kin and multilevel selection in social evolution: a neverending controversy? *F1000Res*, **5**, 776, doi: 10.12688/f1000research.8018.1.
81. Markov, A. V., and Markov, M. A. (2021) Coevolution of the brain, culture, and lifespan: Insights from computer simulations, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 1739-1765, doi: 10.31857/S0320972521120010.
82. Zhao, X., and Promislow, D. (2019) *Senescence and Ageing* (Brüne, M., and Schiefenhövel, W., eds) The Oxford Handbook of Evolutionary Medicine, Oxford University Press, Oxford, UK.
83. Ogrodnik, M., Salmonowicz, H., and Gladyshev, V. N. (2019) Integrating cellular senescence with the concept of damage accumulation in aging: relevance for clearance of senescent cells, *Aging Cell*, **18**, e12841, doi: 10.1111/acel.12841.
84. Longo, V. D., Mitteldorf, J., and Skulachev, V. P. (2005) Programmed and altruistic ageing, *Nat. Rev. Genet.*, **6**, 866-872, doi: 10.1038/nrg1706.
85. Charlesworth, B. (1994) *Evolution in Age-Structured Populations*, Cambridge Univ. Press, Cambridge.
86. Hamilton, W. D. (1966) The moulding of senescence by natural selection, *J. Theor. Biol.*, **12**, 12-45.
87. 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.
88. Shilovsky, G. A., Putyatina, T. S., Ashapkin, V. V., Rozina, A. A., Lyubetsky, V. A., et al. (2018) Ants as object of gerontological research, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 1489-1503, doi: 10.1134/S0006297918120076.
89. Skulachev, V. P. (1998) Biochemical mechanisms of evolution and the role of oxygen, *Biochemistry (Moscow)*, **63**, 1335-1343.
90. Harpending, H. C., Batzer, M. A., Gurven, M., Jorde, L. B., Rogers, A. R., and Sherry, S. T. (1998) Genetic traces of ancient demography, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 1961-1967, doi: 10.1073/pnas.95.4.1961.
91. Weatherall, D. J., and Clegg, J. B. (2002) Genetic variability in response to infection: malaria and after, *Genes Immun.*, **3**, 331-337, doi: 10.1038/sj.gene.6363878.
92. Domínguez-Andrés, J., Kuijpers, Y., Bakker, O. B., Jaeger, M., Xu, C. J., et al. (2021) Evolution of cytokine production capacity in ancient and modern European populations, *Elife*, **10**, e64971, doi: 10.7554/eLife.64971.
93. Hoiby, N. (2021) Pandemics: past, present, future: that is like choosing between cholera and plague, *APMIS*, **129**, 352-371, doi: 10.1111/apm.13098.
94. Piret, J., and Boivin, G. (2021) Pandemics throughout history, *Front. Microbiol.*, **11**, 631736, doi: 10.3389/fmicb.2020.631736.
95. Weber, D. J., Rutala, W. A., Fischer, W. A., Kanamori, H., and Sickbert-Bennett, E. E. (2016) Emerging infectious diseases: focus on infection control issues for novel coronaviruses (severe acute respiratory syndrome-CoV and Middle East Respiratory Syndrome-CoV), hemorrhagic fever viruses (Lassa and Ebola), and highly pathogenic avian influenza viruses, A(H5N1) and A(H7N9), *Am. J. Infect. Control.*, **44** (5 Suppl.), 91-100, doi: 10.1016/j.ajic.2015.11.018.
96. Wenzel, R. P. (2020) After coronavirus disease (2019), *Clin. Infect. Dis.*, **71**, 1365-1366, doi: 10.1093/cid/ciaa455.
97. Shilovsky, G. A., Putyatina, T. S., Morgunova, G. V., Seliverstov, A. V., Ashapkin, V. V., et al. (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.
98. Souder, D. C., and Anderson, R. M. (2019) An expanding GSK3 network: implications for aging research, *Geroscience*, **41**, 369-382, doi: 10.1007/s11357-019-00085-z.
99. 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**, 833837, doi: 10.1134/s00062920070111.
100. Ferubko, E. V., Nikolaev, S. M., Dargaeva, T. D., and Rendyuk, T. D. (2020) Correction of toxic liver damage with a multicomponent herbal extract in an animal experiment, *Pharmacognosy J.*, **12**, 168-172, doi: 10.5530/pj.2020.12.25.
101. Nalobin, D. S., Krasnov, M. S., Alipkina, S. I., Syrchina, M. S., Yamskova, V. P., and Yamskov, I. A. (2016) Effect of bioregulators isolated from rat liver and blood serum on the state of murine liver in roller organotypic culture after ccl4-induced fibrosis, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **161**, 604-609, doi: 10.1007/s10517-016-3468-1.
102. Dontsov, A. E., Sakina, N. L., Yakovleva, M. A., Bastrakov, A. I., Bastrakova, I. G., et al. (2020) Ommochromes from the compound eyes of insects: physicochemical properties and antioxidant activity, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 668-678, doi: 10.1134/S0006297920060048.
103. Miskevich, D., Chaban, A., Dronina, M., Abramovich, I., Gottlieb, E., et al. (2021) Comprehensive analysis of 13C6 Glucose fate in the hypoxia-tolerant blind mole rat skin fibroblasts, *Metabolites*, **11**, 734, doi: 10.3390/metabo11110734.
104. Skulachev, V. P., Vyssokikh, M. Yu., Averina, O. A., Chernyak, B. V., Andreev-Andrievskiy, A. A., et al. (2021) Mitochondrially-targeted antioxidant SkQ1 as a tool against acute phenoptosis – programmed sudden death of the organism? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press.
105. Rosato, A., Tenori, L., Cascante, M., De Atauri Carulla, P. R., Martins Dos Santos, V. A. P., and Saccenti, E. (2018) From correlation to causation: analysis of metabolomics data using systems biology approaches, *Metabolomics*, **14**, 37, doi: 10.1007/s11306-018-1335-y.

**ALTRUISM AND PHENOPTOSIS AS PROGRAMS
SUPPORTED BY EVOLUTION****G. A. Shilovsky^{1,2,3*}, T. S. Putyatina², and A. V. Markov^{2,4}**

¹ *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 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*

⁴ *Borissiak Paleontological Institute, Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia*

Phenoptosis is a programmed death that has arisen in the process of evolution, sometimes taking the form of an altruistic program. In particular, it is also supposed to be a weapon against the spread of pandemics in the past and an obstacle to the fight against a pandemic in the present (COVID). However, on an evolutionary scale, deterministic death is not associated with random relationships (for example, bacteria with a particular mutation), but is a product of higher nervous activity, or a consequence of the established hierarchy in the community, reaching its maximum expression in eusocial communities of Hymenoptera and highly social communities of mammals. Unlike a simple association of individuals, eusociality is characterized by the appearance of non-reproductive individuals as the highest form of altruism. Unlike primitive programs for unicellular organisms, higher multicellular organisms are characterized by the development of the formation of phenoptotic programs based on behavior, especially in the case of limitation of life span associated with reproduction. Thus, we can say that the development of altruism in the evolution of sociality leads in extreme manifestation to phenoptosis. The development of mathematical models for the emergence of altruism and programmed death contributes to the understanding of the mechanisms underlying these phenomena, the manifestation of paradoxical counterproductive (malicious) programs. In theory, this model can be applied not only to insects, but also to other social animals, and even to human society. Adaptive death is an extreme form of altruism. We consider altruism and programmed death as processes programmed in a mechanistic and adaptive sense, respectively. Mechanistically, this is the existence of a program as a deterministic chain of certain reactions, regardless of its adaptive value. Adaptively (regardless of the degree of “phenoptoticity”) is characteristic of organisms that demonstrate such a high level of kinship, social organization and physical association that they possess the features of individuals of a higher order: they form colonies of unicellular organisms with some characteristics of multicellular animals or colonies of multicellular animals with some supraorganismic features.

Keywords: altruism, society, phenoptosis, pandemic, adaptive death, aging, evolution, cumulative fitness

УДК 57.032

ЗАПРОГРАММИРОВАННЫЕ РИСКИ СМЕРТИ У МУЖЧИН, БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ*

© 2021 А.Г. Малыгин

ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт биохимии им. А.Н. Баха,
119071 Москва, Россия; электронная почта: agmalygin@mail.ru

Поступила в редакцию 30.06.2021

После доработки 02.10.2021

Принята к публикации 19.10.2021

Изучена продолжительность жизни в популяции больных сахарным диабетом мужчин. Показано, что скорость их вымирания испытывает в онтогенезе значительные колебания. На кривых зависимости скорости вымирания от продолжительности жизни (дифференциальные кривые смертности) эти колебания имеют вид пиков. Положение пиков на оси продолжительности жизни в значительной степени воспроизводится в независимых подгруппах больных. Это в равной степени относится как к параллельным подгруппам, составленным из первой и второй половин списка больных, пронумерованных по дате смерти, так и к подгруппам из нечётных и чётных индивидов этого списка. Совпадения в положении пиков на дифференциальных кривых смертности у больных в независимых подгруппах указывают на закономерность увеличения смертности в определенных возрастах. Эта закономерность может быть объяснена программированием в онтогенезе чередования сроков повышенного риска смерти и разделяющих их периодов устойчивого развития. Как следствие, пики характеризуются двумя параметрами: закономерным – указывающим их положение на оси продолжительности жизни, и случайным – высотой, отражающей степень неблагоприятного воздействия на организм внешней среды и степень периодически возникающего очередного резкого снижения неспецифической резистентности организма.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: продолжительность жизни, диабет, дифференциальные кривые смертности, пики смертности, модель Гомперца.

DOI: 10.31857/S0320972521120046

ВВЕДЕНИЕ

Исходные кривые зависимости числа умерших индивидов от их продолжительности жизни (кривые смертности) в больших популяциях людей выглядят довольно гладкими линиями. Кроме того, сглаженность этих кривых принято увеличивать усреднением составляющих их экспериментальных точек. Незначительные отклонения сглаженных кривых от теоретических, построенных по известной модели Гомперца [1], рассматривались как случайные, и им не придавали значения. Представление о гладкой форме кривых смертности распространили и на другие виды млекопитающих. Однако тщательные исследования продолжительности жизни (ПЖ), проведённые на мышах в Институте биохимии им. А.Н. Баха РАН, показали, что форма кривых смертности, подвергнутых минимальным сглаживаниям, имеет чётко выраженный ступенчатый вид [2–4]. Численным дифференцированием этих кривых обнаруженные ступени были

Принятые сокращения: ПЖ – продолжительность жизни.

* Статья представлена главным редактором академиком В.П. Скулачёвым.

преобразованы в пики [5, 6]. Пики охарактеризованы двумя параметрами: месторасположением на оси ПЖ и высотой, пропорциональной скорости вымирания особей в точках расположения пиков. Оказалось, что положение пиков, выявляемых на дифференциальных кривых смертности не случайно, а в значительной степени воспроизводится как в параллельных подгруппах, составленных из первой и второй половин общего списка мышей, упорядоченного в соответствии со средними датами их рождения и смерти, так и в подгруппах из нечётных и чётных особей этого списка [5, 6]. Обнаружение этого факта позволило предположить, что подобная закономерность может проявляться и у других видов млекопитающих, включая людей. Утверждения относительно неадекватного отражения динамики смертности моделью Гомперца и подобными ей моделями [7] встречались в литературе и прежде [8–12]. Однако опубликованные этими авторами наблюдения не получили должного признания у коллег. Настоящее исследование направлено на детальное изучение формы дифференциальных кривых смертности больных диабетом мужчин с целью поиска воспроизводимых пиков вымирания людей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании использовали данные о ПЖ жизни 2851 больных сахарным диабетом 2-го типа мужчин, наблюдавшихся в лечебных учреждениях Московской области, фамилии которых начинались на буквы А–В, рождённых в период с 1912 по 1985 г. и умерших в период с 2004 по 2018 г. Данные включены в регистр сахарного диабета Московской области, являющийся частью Федерального регистра Российской Федерации. Все личные данные о пациентах были удалены.

Кривые смертности больных диабетом мужчин строили как зависимости числа умерших от ПЖ, выраженной в сутках. Для доказательства достоверности выводов, сделанных на основании изучения ПЖ, полученные значения ПЖ объединяли в независимые подгруппы. Такие подгруппы данных формировали двумя способами. Первый способ состоял в делении на две равные части значений ПЖ всех больных, выстроенных в ряд по возрастанию дат смерти. При втором способе подгруппы формировали из нечётных и чётных значений ПЖ того же ряда. Подгруппы в парах, полученных одним из способов, не содержат общих больных и являются независимыми. Напротив, половина больных в подгруппах, полученных разными способами, совпадает, и поэтому такие подгруппы не являются независимыми. Данные о ПЖ больных в подгруппах, полученных по первому способу, можно рассматривать как результаты опытов, проведённых в разное время. Данные о ПЖ больных в подгруппах, полученных по второму способу, можно толковать как результаты параллельных опытов, проведённых в одно и то же время. Далее исходная кривая смертности и кривые смертности подгрупп подвергали численному дифференцированию, как это описано в исследованиях закономерностей ПЖ у мышей [5–6].

Численное дифференцирование кривой смертности предполагает последовательное деление разности положений соседних точек кривой по вертикали на разность положений этих точек по горизонтали. Продолжительность жизни индивидов выражали целым числом суток. Совпадение ПЖ отдельных индивидов в сутках приводило при дифференцировании к делению на ноль и появлению бесконечных значений производной. Чтобы исключить совпадения значений ПЖ в сутках и тем самым избежать появления бесконечных значений, кривые смертности перед дифференцированием подвергали скользящему сглаживанию. Процедура скользящего сглаживания предполагает построение

кривых из средних арифметических значений точек интервала, включающего одинаковое число точек на кривой смертности. Если исходные значения количеств умерших индивидов к данному возрасту выражались целыми числами, то значения, полученные в результате усреднения, были дробными. Размер интервала определяли как максимальное число умерших за сутки индивидов, обнаруживаемое на исходной кривой смертности. При этом каждую очередную точку сглаженной кривой получали усреднением точек последующего интервала, полученного смещением предыдущего на одну точку вправо. В настоящем исследовании длина интервала усреднения для 2851 больных диабетом мужчин составляла семь точек. Усреднение по большему числу точек, чем это необходимо для исключения бесконечностей, не целесообразно, поскольку приводит к излишней потере и искажению исходных данных. Численное дифференцирование сглаженной кривой смертности осуществляли при помощи опции вычисления производной в компьютерной программе «Origin».

Очевидно, что реальная вершина пика, получающегося при дифференцировании кривой смертности, может занимать на оси ПЖ любое положение между ближайшими экспериментальными точками справа и слева от её видимого положения на кривой. Поэтому смещение вершины пика в этих границах можно назвать графической погрешностью, а пределы последней вычислять как среднее арифметическое между соседними точками на соответствующем участке кривых. Величину пределов этих погрешностей на оси ПЖ определяли как сумму шести интервалов между смежными точками (по три слева и справа от вершины пика), делённую на шесть. При этом смещения вершин пиков, не превышающие пределы графической погрешности в 2 раза, рассматривали как допустимые. Пики на разных кривых относили к тождественным, если расстояние между их вершинами по оси ПЖ не превышало сумму пределов допустимых погрешностей, характерных для каждого пика.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Пики исходной дифференциальной кривой в параллельных подгруппах иногда раздваиваются. Если расстояние между вершинами пиков не превосходило допустимые погрешности, то в качестве пика, соответствующего пику исходной кривой, выбирали пик с положением, ближайшим к пику исходной кривой, а дополнительный пик не учитывали. Пики, соответствующие

критерию допустимых погрешностей смещения, отмечены на графиках и в таблице одинаковыми номерами. Номера пиков, их положение на оси ПЖ в сутках, графические погрешности их смещения и высота представлены в таблице. Пики имеют сквозную нумерацию в порядке их размещения на оси ПЖ, единую для всех возрастных групп. Отсутствие данных о пиках в соответствующих клетках таблицы обозначены прочерками. Пики из разных подгрупп, отнесённые к тождественным, размещены в таблице на одной строке и обозначены одним номером.

Результаты исследований представлены графически в виде дифференциальных кривых смертности для трёх возрастных групп больных диабетом мужчин на трёх рисунках. Каждый из рисунков включает 6 графиков. На рис. 1 помещены кривые возрастной группы от 20 000 до 23 000 суток (55–63 лет). На рис. 2 помещены кривые возрастной группы от 23 000 до 26 000 суток (63–71 лет). На рис. 3 помещены кривые возрастной группы от 26 000 до 29 000 суток (71–79 лет). В свою очередь, каждая возрастная группа включает исходную дифференциальную кривую смертности всей группы (*a*) и четыре дифференциальные кривые смертности отдельных подгрупп. Две из которых (*b* и *в*), как отмечалось выше, имитируют независимые наблюдения ПЖ больных, проведённые в разное время, а две другие (*г* и *д*) – аналогичные наблюдения, проведённые за один и тот же период времени.

На рисунках видно, что скорость вымирания больных диабетом изменяется с возрастом неравномерно и представляет собой систему различающихся по высоте пиков. Для анализа положения на оси ПЖ исходной дифференциальной кривой смертности отбирали явно выраженные мажорные пики, высота которых, как правило, превосходила уровень фона не менее, чем в 1,5 раза. Поскольку предполагается, что пики параллельных кривых в подгруппах образуются в результате расщепления пиков исходной кривой произвольным образом, то на параллельных кривых учитывались не только мажорные, но и минорные пики, соответствовавшие по положению пронумерованным пикам исходной кривой. В том случае, когда парный пик отсутствовал на одной из независимых параллельных кривых, то есть по высоте не превышал фон, соответствующую ему клетку в таблице заполняли прочерком, а номер одиночного пика на другой кривой отмечали жирным шрифтом. Из таблицы видно, что в подгруппе из индивидов первой половины исходного ряда число скрытых пиков, не превышающих уровень фона, составляет 11 единиц (10,8%), в

подгруппе из индивидов второй половины ряда – 14 единиц (13,7%), в подгруппе из нечётных индивидов ряда – 13 единиц (12,8%) и в подгруппе из чётных индивидов ряда – 13 единиц (12,8%). Поскольку уровень фона характеризует гибель людей от внешних случайных причин, то процент незаполненных клеток в таблице отражает число пиков, запрограммированная смертность в которых не превышает смертность от этих причин.

Пики, расстояние между вершинами которых по горизонтали не превышало удвоенное усреднённое расстояние между соседними точками кривой на оси ПЖ, рассматривались как один пик. Сравнение графиков на рисунках и соответствующих данных о положении и высоте пиков в таблице показывает, что положение пиков с одинаковыми номерами в подавляющем числе случаев совпадает на оси ПЖ с точностью допустимой погрешности как у параллельных дифференциальных кривых подгрупп, так и между кривыми подгрупп и исходной дифференциальной кривой смертности. В то же время высоты соответствующих пиков на параллельных кривых различаются весьма значительно. При этом соответствующие пики на параллельных кривых, полученных одним из двух описанных выше способов, существенно различаясь по высоте, дополняют друг друга, в сумме составляя во многих случаях 70–80% от высоты соответствующих пиков на исходной дифференциальной кривой смертности. Эта корреляция также указывает на неслучайность размещения пиков на дифференциальной кривой смертности. Отсутствие полного соответствия сумм высот пиков на параллельных кривых высотам пиков на исходной кривой обусловлена тем, что размеры пиков определяются не только их высотой, но и шириной, которая при сложении не учитывалась.

Сравнивая соответствующие кривые для разных возрастных периодов на рис. 1, 2 и 3, можно заметить, что количество пиков смертности с возрастом несколько увеличивается, то есть количество состояний организма, связанным с повышенным риском смерти возрастает.

Из изложенного выше следует, что пики смертности больных диабетом, как и в случае с мышами [5, 6], могут быть охарактеризованы двумя параметрами: воспроизводимым, указывающим положение пика на оси ПЖ, и случайным – высотой пика, пропорциональной степени неблагоприятного воздействия внешних факторов на организм. Ввиду большого разброса пиков смертности по высоте воспроизводимость их положения на графиках недостаточно хорошо просматривается. Чтобы этот параметр

Номера пиков в ряду ПЖ, положения вершин пиков на оси ПЖ в сутках, число умерших в сутки и средние значения интервалов между семью точками на вершине пиков в сутках

№ пика в ряду ПЖ	Все больные (а)			Первая половина (б)			Вторая половина (в)			Нечётные (г)			Чётные (д)		
	положение пиков на оси ПЖ в сутках	высота пиков, число умерших в сутки	средний интервал между точками вершины пиков в сутках	положение пиков на оси ПЖ в сутках	высота пиков, число умерших в сутки	средний интервал между точками вершины пиков в сутках	положение пиков на оси ПЖ в сутках	высота пиков, число умерших в сутки	средний интервал между точками вершины пиков в сутках	положение пиков на оси ПЖ в сутках	высота пиков, число умерших в сутки	средний интервал между точками вершины пиков в сутках	положение пиков на оси ПЖ в сутках	высота пиков, число умерших в сутки	средний интервал между точками вершины пиков в сутках

Рис. 1

1	20103	0,22	5,2	20112	0,13	10,0	20137	0,07	16,5	20153	0,05	24,4	20108	0,17	7,8
2	20348	0,28	7,0	20298	0,11	13,0	20279	0,05	21,1	20320	0,08	16,0	20322	0,08	16,5
3	20451	0,14	8,5	20453	0,08	16,4	20410	0,05	22,2	—	—	—	20462	0,09	15
4	20615	0,18	6,9	20601	0,09	17,0	20610	0,07	18,1	20601	0,08	16,8	20593	0,06	19,1
5	20800	0,44	4,2	20790	0,08	16,6	20807	0,18	13,3	20794	0,13	12,7	20826	0,08	16,0
6	21037	0,26	4,8	21051	0,21	6,4	—	—	—	21031	0,08	13,3	21058	0,15	7,9
7	21095	0,35	3,7	21091	0,15	8,4	21096	0,11	10,0	21096	0,14	7,6	21081	0,13	10,2
8	21148	0,22	5,7	—	—	—	21163	0,13	8,5	21164	0,15	8,5	21144	0,06	16,4
9	21231	0,42	3,9	21215	0,05	19,1	21234	0,28	6,8	21231	0,18	8,4	21236	0,07	15,4
10	21331	0,20	6,0	21302	0,08	15,6	21345	0,10	11,7	21323	0,08	13,4	21348	0,11	10,6
11	21445	0,48	2,6	21442	0,22	6,0	21432	0,15	9,5	21447	0,23	6,8	21433	0,16	7,8
12	21671	0,22	5,0	21650	0,10	13,7	21672	0,11	11,2	21667	0,13	8,6	21667	0,08	18,4
13	21744	0,33	5,0	21735	0,19	8,0	—	—	—	21739	0,20	6,9	21752	0,07	13,5
14	21794	0,34	4,9	21792	0,08	10,2	21797	0,13	11,0	21812	0,13	8,8	21807	0,10	15,6
15	21834	0,26	5,3	21824	0,15	9,8	21858	0,06	14,9	21854	0,13	8,2	—	—	—
16	21905	0,34	5,2	21914	0,14	8,7	—	—	—	21900	0,17	6,8	—	—	—
17	22068	0,36	3,3	22063	0,14	8,0	22088	0,19	7,8	22075	0,15	9,0	22091	0,19	7,1
18	22153	0,29	4,2	22145	0,14	9,8	22188	0,12	10,7	22165	0,15	8,5	—	—	—
19	22312	0,58	2,3	22309	0,26	5,7	22324	0,18	7,5	22302	0,18	6,6	22321	0,27	7,5
20	22411	0,47	3,3	22441	0,09	15,0	22399	0,20	7,0	22407	0,28	6,0	—	—	—
21	22488	0,23	5,8	—	—	—	22507	0,12	10,1	22526	0,07	13,2	22507	0,12	10,3
22	22589	0,54	3,3	22581	0,18	9,0	22574	0,14	8,7	22576	0,11	10,7	22583	0,23	7,1
23	22669	0,41	3,9	—	—	—	22657	0,20	7,8	22658	0,23	6,8	22653	0,10	8,0
24	22717	0,28	4,5	22698	0,16	7,9	—	—	—	22693	0,14	8,0	22694	0,11	10,6
25	22759	0,33	4,8	22751	0,14	7,8	22756	0,08	14,1	22747	0,14	7,6	22726	0,10	12,7
26	22911	0,32	4,4	22886	0,16	9,2	22931	0,12	10,8	22898	0,14	8,6	22877	0,06	15,8
27	22971	0,30	3,8	22986	0,14	8,3	22982	0,14	10,3	—	—	—	22975	0,19	6,3

Рис. 2

28	23177	0,79	2,8	23190	0,22	8,8	23167	0,24	6,0	23189	0,15	9,3	23175	0,23	6,0
29	23211	0,38	3,8	—	—	—	23233	0,12	8,4	23230	0,10	10,2	23221	0,18	7,4
30	23283	0,44	3,4	23304	0,15	8,3	23282	0,14	8,0	23308	0,16	6,2	23301	0,11	9,4
31	23385	1,08	1,3	23401	0,23	6,6	23384	0,74	6,5	23388	0,39	3,3	23380	0,29	5,2
32	23485	0,35	3,5	23460	0,17	7,6	23491	0,23	9,4	23486	0,33	5,2	23473	0,10	9,9
33	23522	0,50	3,1	23539	0,27	5,4	23528	0,12	6,0	23543	0,08	13,2	23551	0,35	5,8

Продолжение таблицы

№ пика в ряду ПЖ	Все больные (а)			Первая половина (б)			Вторая половина (в)			Нечётные (г)			Чётные (д)		
	положение пиков на оси ПЖ в сутках	высота пиков, число умерших в сутки	средний интервал между точками вершины пиков в сутках	положение пиков на оси ПЖ в сутках	высота пиков, число умерших в сутки	средний интервал между точками вершины пиков в сутках	положение пиков на оси ПЖ в сутках	высота пиков, число умерших в сутки	средний интервал между точками вершины пиков в сутках	положение пиков на оси ПЖ в сутках	высота пиков, число умерших в сутки	средний интервал между точками вершины пиков в сутках	положение пиков на оси ПЖ в сутках	высота пиков, число умерших в сутки	средний интервал между точками вершины пиков в сутках
34	23627	0,27	4,5	—	—	—	23648	0,23	11,4	23637	0,08	11,7	23627	0,27	7,0
35	23689	0,34	7,0	23703	0,12	10,8	—	—	—	23667	0,23	9,5	—	—	—
36	23777	0,22	6,1	23774	0,07	12,8	23793	0,10	5,4	23779	0,13	9,8	—	—	—
37	23871	0,59	2,4	23870	0,14	9,0	23868	0,26	10,0	23867	0,12	9,4	23866	0,31	5,1
38	23931	0,22	5,0	—	—	—	23939	0,15	7,0	23909	0,12	11,0	—	—	—
39	23994	0,23	5,6	—	—	—	23983	0,14	10,0	23970	0,09	12,4	23979	0,13	9,7
40	24048	0,35	4,8	24051	0,09	12,3	24067	0,15	5,4	24030	0,12	10,8	24065	0,13	10,6
41	24159	0,44	4,8	24189	0,18	6,6	24159	0,33	7,0	24174	0,11	10,4	24167	0,30	4,6
42	24289	0,61	2,0	24290	0,29	5,3	24279	0,17	4,9	24283	0,16	7,5	24289	0,52	4,6
43	24340	0,83	2,0	24350	0,23	5,5	24345	0,38	10,0	24345	0,40	3,7	24345	0,19	7,1
44	24427	0,39	3,9	24410	0,17	6,5	24400	0,11	7,9	24420	0,12	10,1	24410	0,18	8,0
45	24527	0,38	3,9	24504	0,13	9,8	24521	0,14	4,5	—	—	—	24503	0,21	6,6
46	24560	0,45	3,2	24565	0,10	10,4	24561	0,34	4,7	24541	0,21	8,0	24546	0,13	8,0
47	24635	0,44	3,1	24605	0,13	10,3	24632	0,24	4,8	24645	0,15	7,6	24618	0,19	5,0
48	24700	0,58	2,3	24698	0,13	9,1	24702	0,29	9,5	24699	0,19	7,1	24708	0,25	6,3
49	24749	0,47	3,6	24743	0,18	6,9	24774	0,11	8,0	24757	0,09	9,8	24752	0,28	6,1
50	24815	0,29	4,1	24806	0,14	9,0	24837	0,14	4,0	24800	0,21	7,4	24790	0,10	11,5
51	24925	0,37	3,5	24938	0,16	7,9	24922	0,13	7,8	24889	0,17	6,2	24941	0,13	10,0
52	24979	0,48	2,3	24977	0,17	6,4	24989	0,34	6,4	24994	0,34	7,4	24993	0,14	8,3
53	25118	0,54	2,5	25114	0,19	8,3	25114	0,23	9,8	25091	0,16	3,6	25113	0,24	6,8
54	25158	0,44	3,1	25160	0,28	4,7	25169	0,10	8,2	25142	0,10	9,5	25166	0,29	4,6
55	25236	0,38	3,7	25213	0,17	6,3	25226	0,14	9,5	25241	0,22	7,0	—	—	—
56	25282	0,46	3,7	25274	0,14	7,8	25299	0,14	5,0	—	—	—	25289	0,22	6,2
57	25321	0,37	3,5	25337	0,20	7,2	—	—	—	25341	0,19	7,2	—	—	—
58	25456	0,70	2,0	25451	0,21	7,1	25464	0,36	4,5	25456	0,61	7,3	—	—	—
59	25514	0,43	3,6	—	—	—	25516	0,28	12,7	25499	0,28	7,3	25491	0,13	9,9
60	25571	0,43	3,2	25577	0,16	9,7	—	—	—	25563	0,18	3,8	25589	0,11	10,1
61	25642	0,31	4,4	25659	0,17	7,8	25673	0,12	9,5	—	—	—	25658	0,18	7,0
62	25706	0,41	3,1	25693	0,21	5,7	25698	0,13	8,6	25694	0,23	7,3	25697	0,16	7,8
63	25866	0,33	4,0	25857	0,11	9,8	25855	0,16	9,9	25835	0,14	9,6	25860	0,19	7,7
64	25952	0,43	4,3	25923	0,09	12,7	25939	0,21	6,8	25946	0,30	9,1	25947	0,08	12,0

Рис. 3

65	26127	0,42	3,7	26139	0,15	8,5	26117	0,11	10,7	26130	0,33	7,3	—	—	—
66	26206	0,44	4,1	26203	0,16	7,9	26174	0,09	12,1	—	—	—	26206	0,34	5,3
67	26297	0,53	3,0	26304	0,22	5,3	—	—	—	26309	0,15	9,4	26307	0,20	5,8
68	26340	0,41	2,9	26330	0,25	4,6	26318	0,12	11,0	—	—	—	26338	0,27	5,3

Окончание таблицы

№ пика в ряду ПЖ	Все больные (а)			Первая половина (б)			Вторая половина (в)			Нечётные (г)			Чётные (д)		
	положение пиков на оси ПЖ в сутках	высота пиков, число умерших в сутки	средний ин-тервал между точками вершины пиков в сутках	положение пиков на оси ПЖ в сутках	высота пиков, число умерших в сутки	средний ин-тервал между точками вершины пиков в сутках	положение пиков на оси ПЖ в сутках	высота пиков, число умерших в сутки	средний ин-тервал между точками вершины пиков в сутках	положение пиков на оси ПЖ в сутках	высота пиков, число умерших в сутки	средний ин-тервал между точками вершины пиков в сутках	положение пиков на оси ПЖ в сутках	высота пиков, число умерших в сутки	средний ин-тервал между точками вершины пиков в сутках
69	26442	0,36	3,6	26440	0,20	6,6	26428	0,12	12,4	26439	0,25	9,4	26410	0,13	10,0
70	26559	0,25	5,6	26560	0,11	10,8	—	—	—	26585	0,09	14,8	26586	0,09	7,5
71	26640	0,30	4,4	26653	0,13	9,8	26643	0,11	10,1	—	—	—	26631	0,19	8,6
72	26683	0,24	5,3	—	—	—	26672	0,10	10,1	26670	0,07	14,8	26687	0,15	5,1
73	26783	0,32	3,6	26793	0,27	4,8	26796	0,08	13,9	26759	0,12	10,0	26795	0,26	5,0
74	26813	0,46	3,8	26828	0,14	8,2	26850	0,08	15,7	26856	0,10	12,0	—	—	—
75	26962	0,26	4,3	26957	0,18	5,9	26972	0,07	16,5	—	—	—	26977	0,14	8,2
76	26995	0,48	3,1	26986	0,20	5,7	—	—	—	26986	0,23	8,0	27016	0,17	8,0
77	27070	0,35	4,0	27078	0,19	6,1	—	—	—	27083	0,16	8,7	27066	0,13	7,8
78	27106	0,36	3,6	—	—	—	27097	0,12	11,9	—	—	—	27090	0,16	7,1
79	27171	0,41	3,0	27160	0,20	5,7	27148	0,10	10,8	27173	0,17	6,6	27167	0,17	7,5
80	27208	0,38	3,7	27208	0,38	4,2	27206	0,08	13,7	27192	0,17	6,7	27194	0,16	9,5
81	27255	0,32	3,9	27265	0,22	6,5	—	—	—	27261	0,14	8,0	27234	0,14	7,3
82	27368	0,59	2,9	27368	0,48	3,7	27341	0,07	14,3	27367	0,28	5,4	27336	0,19	8,4
83	27432	0,67	3,2	27430	0,50	5,7	—	—	—	27447	0,11	10,9	27425	0,15	8,1
84	27496	0,32	4,5	27517	0,12	9,7	27495	0,11	12,3	27507	0,08	13,7	27491	0,16	7,4
85	27658	0,34	4,8	27653	0,18	8,7	27633	0,13	11,3	27670	0,11	10,3	27631	0,18	9,2
86	27736	0,30	3,6	27732	0,24	5,4	27740	0,06	16,0	27725	0,17	7,8	27754	0,14	6,6
87	27870	0,67	2,0	27866	0,25	6,6	27879	0,20	6,1	27876	0,36	5,2	27858	0,21	5,2
88	27937	0,79	1,6	27929	0,25	5,9	27940	0,45	4,8	27929	0,24	6,0	27942	0,41	5,3
89	28034	0,58	2,6	28037	0,22	6,2	28025	0,21	8,0	28015	0,19	8,9	28032	0,32	4,6
90	28096	0,47	2,9	—	—	—	28093	0,29	5,3	—	—	—	28096	0,47	8,0
91	28153	0,33	4,1	28145	0,08	12,6	28152	0,25	4,7	28133	0,18	7,8	28168	0,15	10,5
92	28255	0,44	3,0	28264	0,14	9,2	28260	0,19	6,4	28245	0,32	5,2	28254	0,08	7,4
93	28286	0,40	3,3	28298	0,10	9,4	28304	0,23	5,6	28288	0,19	8,0	28320	0,20	5,8
94	28410	0,49	3,2	28388	0,13	6,0	28402	0,30	5,6	28378	0,14	5,1	28406	0,30	5,4
95	28497	0,44	3,0	28486	0,19	5,8	28487	0,17	8,5	28480	0,18	7,3	28511	0,25	5,7
96	28577	0,29	3,9	28574	0,12	8,4	28598	0,14	7,7	28577	0,08	9,3	28577	0,25	5,9
97	28696	0,74	2,7	28687	0,14	9,0	28709	0,18	6,7	28695	0,12	9,8	28698	0,26	10,5
98	28748	0,33	4,1	28764	0,14	8,4	—	—	—	—	—	—	28746	0,16	7,5
99	28791	0,30	3,9	28800	0,17	6,7	28773	0,12	8,7	28798	0,19	5,8	—	—	—
100	28837	0,61	2,7	28828	0,21	4,5	28834	0,18	6,6	28829	0,38	4,7	28821	0,09	5,0
101	28923	0,39	3,4	28928	0,32	4,5	28934	0,11	9,6	—	—	—	28915	0,24	5,0
102	28955	0,68	2,0	28960	0,26	4,0	28971	0,14	9,0	28960	0,28	5,0	28963	0,15	7,0

Примечание. Пики из разных подгрупп, отнесённые к тождественным, размещены в таблице на одной строке и обозначены одним номером. Пики имеют сквозную нумерацию в порядке их размещения на оси ПЖ, единую для всех возрастных групп в таблице и на графиках. Отсутствие данных о пиках в отдельных клетках таблицы обозначено прочерками. Соответствующие им одиночные пики в независимых подгруппах индивидов обозначены жирным шрифтом.

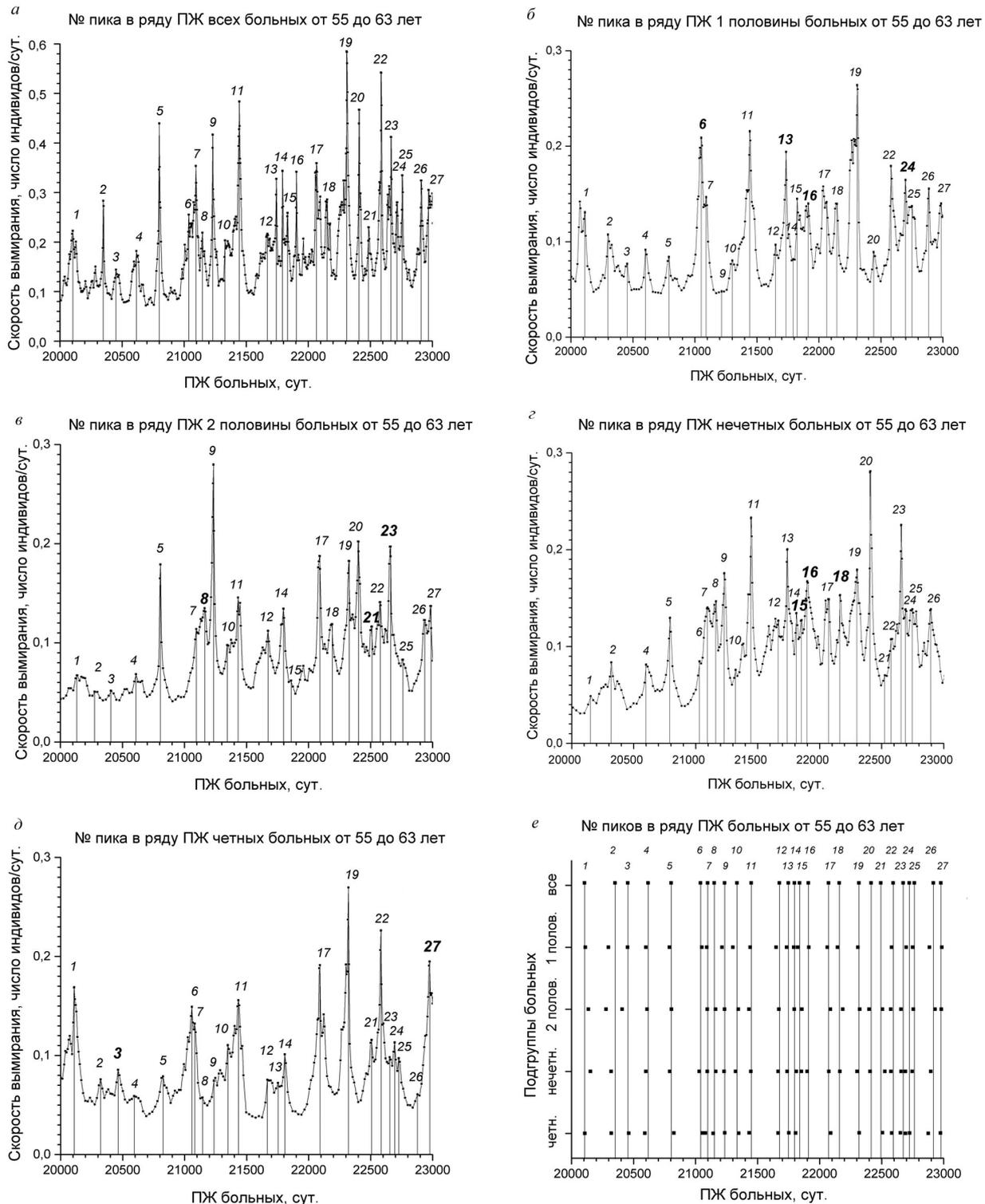


Рис. 1. Дифференциальные кривые смертности, отображающие скорости вымирания больных диабетом мужчин с ПЖ от 20 000 до 23 000 суток (55–63 лет). *а* – Исходная дифференциальная кривая смертности для всей изучаемой популяции больных; *б* и *в* – дифференциальные кривые смертности в подгруппах, полученных делением пополам ряда больных всей популяции, выстроенного по датам их смерти; *г* и *д* – дифференциальные кривые смертности подгрупп, состоящих из нечётных и чётных индивидов того же ряда; *е* – положения вершин всех пронумерованных пиков на исходной дифференциальной кривой смертности и на дифференциальных кривых смертности подгрупп первой и второй половин ряда больных всей популяции, выстроенного по датам их смерти, и на дифференциальных кривых смертности подгрупп, состоящих из нечётных и чётных индивидов того же ряда. Для обозначения пиков на графиках используется та же нумерация, что и в таблице

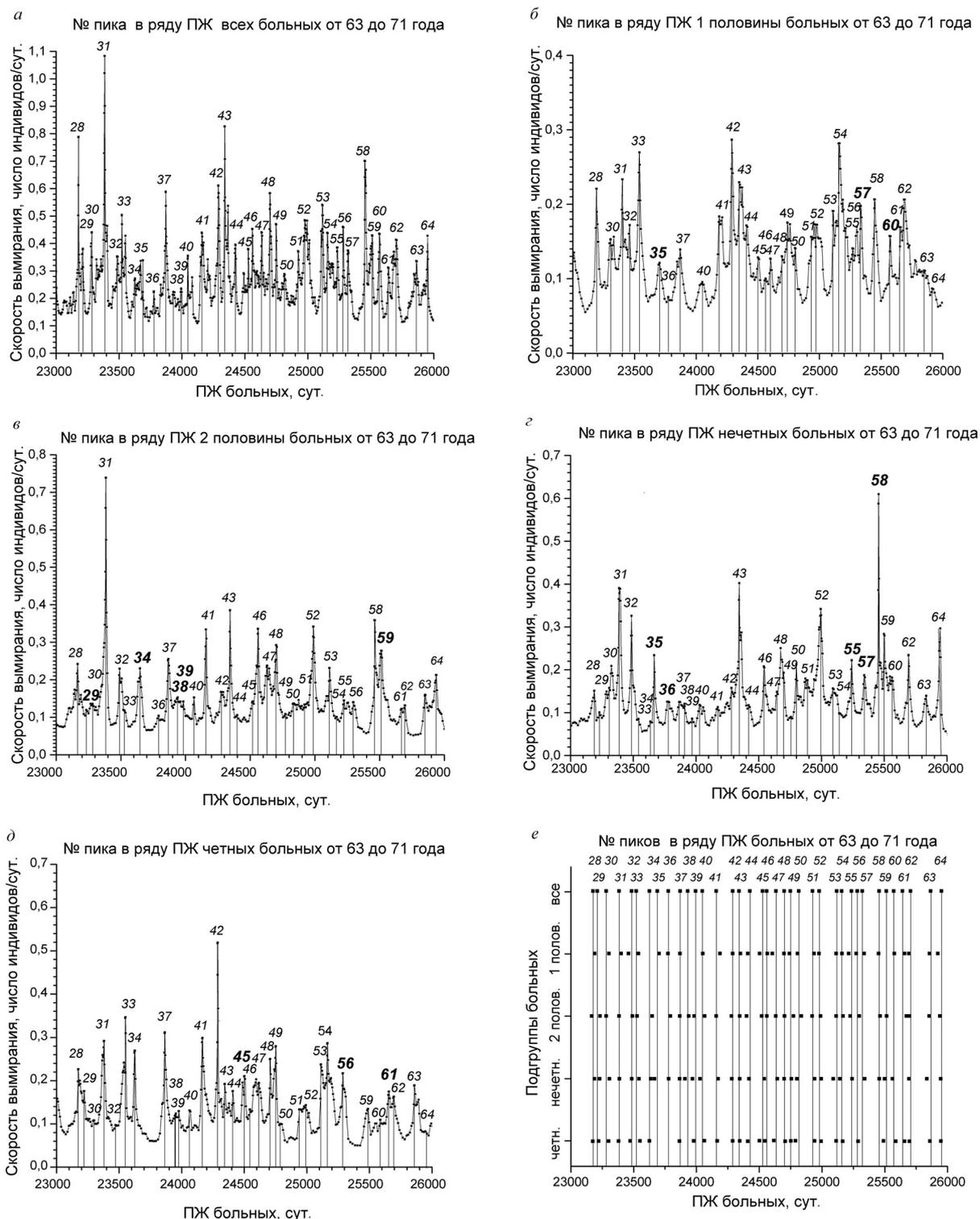


Рис. 2. Дифференциальные кривые смертности, отображающие скорости вымирания возрастной группы больных диабетом мужчин с ПЖ от 23 000 до 26 000 суток (63–71 лет). Далее смотрите текст подписи под рис. 1

сделать более наглядным, последним на каждом из трёх рисунков представлен график (e). Вдоль вертикальных линий графиков (e) точками отмечены положения всех пронумерованных пи-

ков на исходной дифференциальной кривой смертности (a), а также на аналогичных кривых первой и второй подгрупп, полученных делением пополам ряда больных всей популяции,

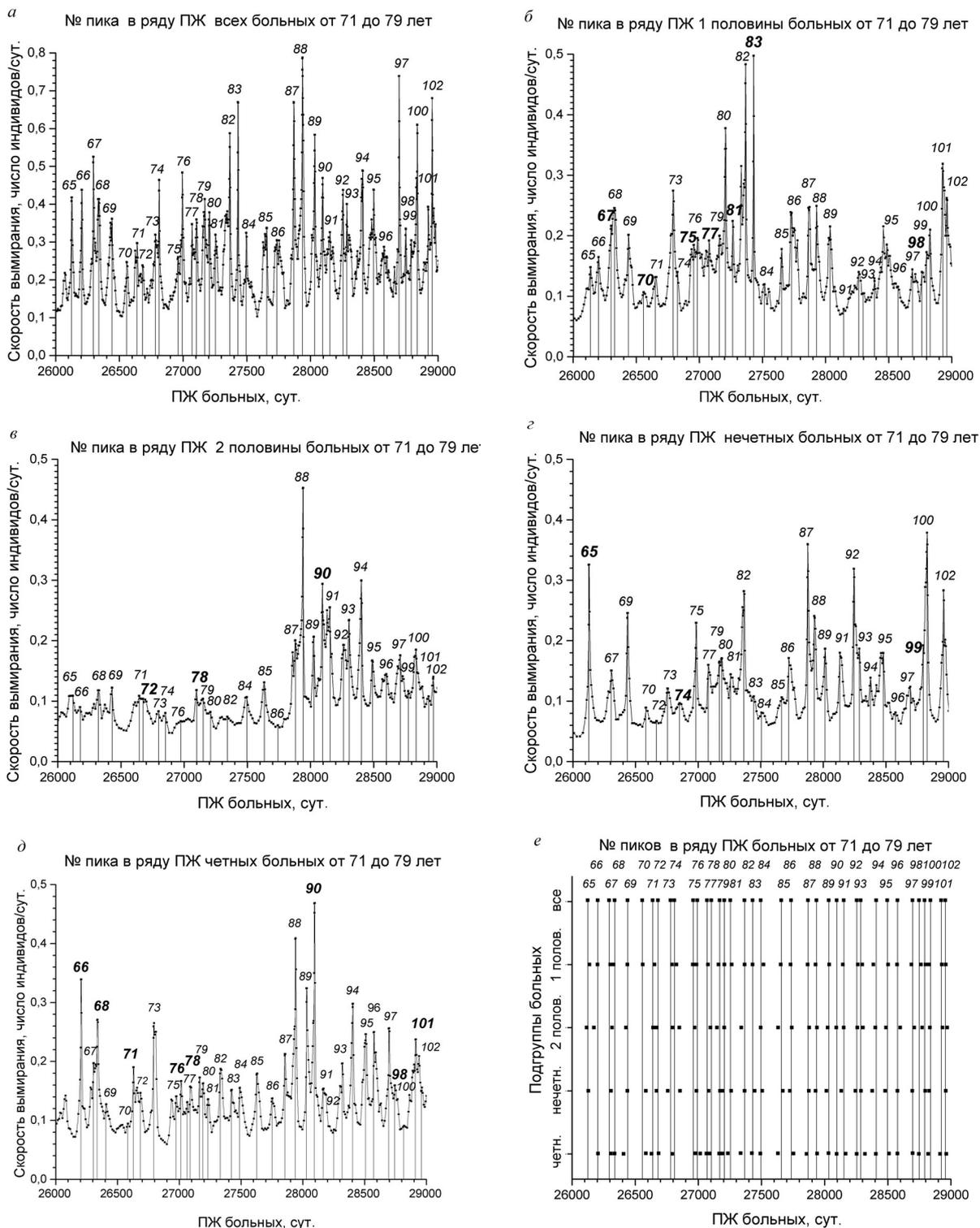


Рис. 3. Дифференциальные кривые смертности, отображающие скорости вымирания возрастной группы больных диабетом мужчин с ПЖ от 26 000 до 29 000 суток (71–79 лет). Далее смотрите текст подписи под рис. 1

выстроенного по датам их смерти (б и в), и подгрупп, состоящих из нечётных и чётных индивидов того же ряда (г и д). Данные о положении пиков на осях ПЖ графиков дифференциаль-

ных кривых взяты из таблицы. Из графиков (е) видно, что для всех трёх возрастных периодов (55–63, 63–71 и 71–79 лет) положение вершин пиков с одинаковыми номерами в исход-

ной кривой и в параллельных кривых на оси ПЖ практически совпадают. Наглядность этих графиков убеждает в том, что время проявления повышенных рисков смертности у больных диабетом генетически запрограммировано. Таким образом, эффект воспроизводимости колебаний рисков смерти от возраста в онтогенезе, ранее обнаруженный у мышей [2–6], распространяется и на больных диабетом мужчин.

Благодарности. Автор выражает благодарность сотрудникам Отделения терапевтиче-

ской эндокринологии ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского И.В. Мисниковой и Ю.А. Ковалевой за обсуждение статьи, способствовавшее её улучшению.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gompertz, B. (1825) On the nature of the function expressive of the law of human mortality and on a new mode of determining the value of life contingencies, *Phil. Trans. R. Soc.*, **115**, 513-583.
- Малыгин А. Г. (2012) Вариации продолжительности жизни мышей в процессе их роста и старения, *Доклады МОИП Секция геронтологии*, **50**, 56-65.
- Malygin, A. G. (2013) Graduated change of life expectancy in mice ontogenesis, *Russ. J. Dev. Biol.*, **44**, 48-55.
- Malygin, A. G. (2013) Age fluctuations in mortality of mice with mutation causing growth retardation, *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 1033-1042.
- Malygin, A. G. (2017) New data on programmed risks of death in normal mice and mutants with growth delay, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 834-843.
- Malygin, A. G. (2018) Reproducible peak clusters on differential mouse mortality curves and their relation to the Gompertz model, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 836-845.
- Makeham, W. M. (1860) On the law of mortality and the construction of annuity tables, *J. Inst. Actuaries*, **8**, 301-310.
- Мыльников С. В., Опарина Т. И., Бычковская И. Б. (2015) О дискретности кривых дожития. Сообщение 1. Отклонения от закона Гомперца у линии *Canton-S Drosophila melanogaster*, *Усп. геронтол.*, **28**, 624-628.
- Frank, S. A. (2004) A multistage theory of age-specific acceleration in human mortality, *BMS Biol.*, **2**, 16.
- Шапошникова В. И. (2008) Хронобиологические аспекты геронтологии, *Успехи геронтол.*, **21**, 14-26.
- Vaupel, W. V., Carey, J. R., Christensen, K., Johnson, T. E., Yashin, A. I., et al. (1998) Biodemographic trajectories of longevity, *Science*, **280**, 855-899.
- Vaupel, W. V. (2010) Biodemography of human ageing, *Nature*, **464**, 536-542.

PROGRAMMED RISKS OF DEATH IN MALE PATIENTES WITH DIABETES

A. G. Malygin

*Bach Institute of Biochemistry, FRC Biotechnologies of the Russian Academy of Sciences,
119071 Moscow, Russia; E-mail: agmalygin@mail.ru*

Lifespan in a population of patients is investigated by diabetes of men. It is shown, that speed of their dying tests significant fluctuations in an ontogenesis. On curves of dependence of speed of dying from (differential curve death) these fluctuations look like peaks. The position of peaks on an axis of lifespan is substantially replicated in independent subgroups of patients. It equally concerns as to the parallel subgroups made from first and second half of the list of patients, numbered by date of differential curve death, and to subgroups from odd and even individuals of this list. Concurrences in a position of peaks on differential curves of death rate at patients in independent subgroups specify law of augmentation of death rate at the certain age. This law can be explained by programming in an ontogenesis of alternating of terms of the increased risk of dying and the seasons of steady development dividing them. As consequence, peaks are characterized by two parameters: natural – indicating their position on an axis of lifespan and casual – the height reflecting a degree of unfavorable influence on an organism of an external environment and the degree of periodically occurring another sharp decrease in the nonspecific resistance of the body.

Keywords: lifespan, diabetes, differential curve death, peaks of death, Gompertz model

УДК 57.05;57.07

ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ДРЕВНЕЙ ДНК

Обзор

© 2021 К.В. Жур¹, В.А. Трифонов², Е.Б. Прохорчук^{1*}

¹ ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071 Москва, Россия;
электронная почта: prokhortchouk@gmail.com

² Институт истории материальной культуры РАН, 191186 Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 29.10.2021

После доработки 17.11.2021

Принята к публикации 17.11.2021

Развитие технологий высокопроизводительного полногеномного секвенирования и совершенствование методик пробоподготовки сделало возможным исследование ДНК из археологических образцов возрастом более миллиона лет. В процессе изучения древней ДНК (дДНК) учёными было сделано множество крупных открытий, касающихся миграций людей, замещений одних популяций другими, межвидовых скрещиваний кроманьонцев с неандертальцами и денисовцами, эволюции патогенов человека и др. Не менее революционным стало заявление о возможности исследовать эпигенетические модификации геномов древних людей, что позволило извлечь ранее недоступную информацию, в том числе об активности генов, позиционировании нуклеосом, метилировании ДНК. Анализируя статус метилирования определенных локусов в геноме, можно установить хронологический возраст человека на момент его смерти, реконструировать некоторые особенности фенотипа, как это было сделано для денисовца, и даже определить неблагоприятные факторы внешней среды, воздействию которых подвергался древний человек. Представленный обзор посвящён современным достижениям и перспективным направлениям изучения эпигенетических модификаций дДНК с анализом методических подходов, применяемых в данной области научных исследований.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: древняя ДНК, палеоэпигенетика, эпигенетические часы, редактирование эпигенома, ожирение.

DOI: 10.31857/S0320972521120058

ВВЕДЕНИЕ

Стремительное развитие высокопроизводительных методов полногеномного секвенирования способствовало заметному увеличению количества и качества информации, получаемой из образцов древней ДНК (дДНК). Совершенствование методов пробоподготовки позволило преодолеть множество сложностей, характерных для работы с археологическими образцами, связанных с низким качеством и количеством ДНК, а также с контаминацией генетическим материалом других организмов. Долгое время самым древним образцом, из которого были получены полногеномные данные, считали останки лошади из среднего плейстоцена возрастом 560–780 тысяч лет [1], в связи с чем предполагали, что в образцах старше одного миллиона лет

генетический материал не сохраняется. Пересмотрели теоретический предел сохранности ДНК после выхода статьи в журнале *Nature*, в которой были проанализированы полногеномные данные, полученные из останков мамонтов раннего и среднего плейстоцена [2]. В соответствии с данным молекулярного датирования (байесовские молекулярные часы) [3], возраст животного, найденного на реке Крестовка, составил 1,65 миллиона лет [2].

Сохранность генетического материала свыше миллиона лет открывает огромные перспективы для более детального изучения эволюции человека. Анализируя последовательности ДНК, возможно отслеживать миграции людей, выявлять замещение одних популяций другими, устанавливать факт межвидового скрещивания, исследовать предрасположенность к различным заболеваниям, предсказывать физические и некоторые психофизиологические особенности древнего человека [4]. Исследуя генетический материал из зубного налёта, можно изучать диету архаичных людей и их микробиом [5, 6], в

Принятые сокращения: дДНК – древняя ДНК; CpG-локус – сайт, где цитозин (C) находится рядом с гуанином (G) в последовательности ДНК.

* Адресат для корреспонденции.

свою очередь, анализ ДНК древних патогенов даёт возможность проследить происхождение и эволюцию возбудителей различных заболеваний, например, как это было показано для бактерий *Yersinia pestis*, возбудителя чумы [7].

За последнее десятилетие учёные значительно продвинулись в изучении дДНК, в том числе вымерших видов людей. Многих интересовал вопрос: как сильно отличался архаичный человек от современного, и что позволило последнему выжить и успешно размножиться. Первый черновой вариант генома неандертальца был опубликован в 2010 г. [8], а уже в 2012–2013 гг. были прочитаны полные геномы денисовского человека [9] и неандертальца [10] с качеством, не уступающим образцам современной ДНК (с 30- и 52-кратным покрытием соответственно). Сравнение последовательностей геномов ныне живущих людей с геномами денисовского человека и неандертальца выявило более 30 000 однонуклеотидных позиций, отделяющих современных людей от архаичных [10]. Тем не менее большинство из этих замен были нейтральными, 3117 приходились на регуляторные элементы, 32 предположительно влияли на сайты сплайсинга и только 96 замен приводили к аминокислотным заменам. Учёные пришли к выводу, что выявленными отличиями в последовательностях геномов современных людей и архаичных нельзя объяснить весь спектр их фенотипических и адаптационных различий, а полученные результаты свидетельствуют в пользу значительного влияния эпигенетических модификаций на эволюцию человека [11, 12].

ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ МОДИФИКАЦИЙ ДРЕВНЕЙ ДНК

Существуют разнообразные механизмы эпигенетической регуляции активности генов, включая метилирование ДНК, модификации гистонов и негистоновых белков хроматина, воздействие на экспрессию генов посредством малых некодирующих молекул РНК и другие зачастую взаимосвязанные процессы. В случае с дДНК исследователи в основном фокусируются на изучении метилирования ДНК и составлении карт позиционирования нуклеосом [13–15], что в первую очередь связано с технической возможностью реконструкции данного вида эпигенетических модификаций в археологических образцах.

Первые попытки изучения метилирования генома древних людей были предприняты ещё в 2010 г. группой С. Паабо; тогда учёные продемон-

стрировали, что ДНК неандертальца возрастом более 38 000 лет сохраняет картину метилирования [13]. Несколько позже, в 2014 г., была получена первая карта позиционирования нуклеосом для генома древнего человека [14]. Возможность установить, какие участки ДНК входят в состав нуклеосомного комплекса, а какие являются межнуклеосомными, т.е. открытыми, позволяет определить доступность генетического материала для взаимодействия с регуляторными белками, в том числе факторами, регулирующими транскрипцию, и, соответственно, предсказать экспрессию тех или иных генов у древних людей. В свою очередь, метилирование ДНК участвует в регуляции структуры хроматина, клеточной дифференцировки и многих других процессов, в том числе контролирует экспрессию генов на уровне транскрипции. Несмотря на то что метилирование генома и составление карты позиционирования нуклеосом не являются единственными механизмами эпигенетической регуляции, тем не менее изучение этих процессов даёт возможность извлечь из образцов дДНК ранее недоступную информацию об активности генов.

Основная сложность, возникающая при работе с дДНК – это существенная посмертная деградация генетического материала до фрагментов длиной в 25 пар нуклеотидов под действием эндогенных нуклеаз, а также в результате случайного гидролиза и окисления [16]. Наиболее частым гидролитическим повреждением дДНК является дезаминирование цитозина (С), т.е. отщепление аминогруппы от азотистого основания с образованием урацила (U). Дезаминированные цитозины в основном располагаются на концах фрагментов дДНК, что свидетельствует о наличии выступающих одноцепочечных концов, так как скорость дезаминирования цитозина в десятки раз выше в одноцепочечной, чем в двухцепочечной ДНК [17–19]. Особенность определения последовательности дДНК заключается в том, что при секвенировании методом синтеза на месте дезаминированных цитозинотиминных пар исследователь наблюдает тимин (Т). Это связано с тем, что в процессе приготовления библиотек проводится обогащение с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с применением полимеразы, которая способна продолжать синтез комплементарной цепи в присутствии урацила. Во время синтеза комплементарной цепи урацил распознаётся полимеразой как тимин, в результате чего достраивается комплементарное тимину основание – аденин (А). В итоге исходная пара оснований С/Г (где Г – гуанин) в результате дезаминирования цитозина превращается в пару U/G,

которая в процессе ПЦР преобразуется в Т/А в одной из дочерних молекул. Соответственно, при секвенировании библиотек фрагментов дДНК исследователь наблюдает замены С → Т на 5'-конце молекулы ДНК или G → A — на 3'-конце в зависимости от особенностей выбранного протокола пробоподготовки. Важно отметить, что частота таких замен коррелирует с возрастом образца [20] и используется в качестве критерия, подтверждающего, что ДНК принадлежит именно древнему организму (эндогенная ДНК), а не является результатом контаминации современным генетическим материалом. В целом анализ фрагментов митохондриальной ДНК, выделенной из образцов возрастом от 18 до 60 000 лет, продемонстрировал сильную положительную корреляцию между возрастом и частотой замены С на Т. В группе образцов возрастом 117 лет и младше частота замен С → Т не превышала 5%, в то время как для образцов возрастом 500 лет и старше частота замен составляла не менее 11%. В свою очередь, для образцов ДНК, выделенных из тканей неандертальцев, данный показатель обычно составляет не менее 20%, а зачастую достигает 40–50% [16, 20].

Посмертная деградация дДНК, а конкретно процесс дезаминирования цитозина, усложняет исследование дДНК, но в то же время даёт возможность изучать метилирование геномов древних людей. Группа С. Паабо в процессе приго-

товления библиотек дДНК для секвенирования обрабатывала дДНК смесью ферментов урацил-ДНК-гликозилазы и эндонуклеазы VIII, что позволяет вырезать урацил с образованием однонуклеотидного разрыва, оставляя неповреждённые части нетронутыми [13]. Такой способ значительно повышает точность секвенирования, а также даёт возможность определить были ли цитозин метилирован, так как в результате дезаминирования метилированного цитозина последний превращается в остаток тимина и, соответственно, не распознаётся смесью ферментов. Следовательно, участки генома, в которых цитозины были прижизненно метилированы, будут содержать больше чтений с тимином, по сравнению с неметилированными участками, а доля замен С → Т будет отражать степень метилирования дДНК.

Метод подготовки библиотек для секвенирования с обработкой ДНК смесью ферментов урацил-ДНК-гликозилазы и эндонуклеазы VIII представляет собой непрямой способ анализа метилирования генома и предполагает применение специальных вычислительных алгоритмов для реконструкции метилирования. Существует и ещё один непрямой способ оценки степени метилирования дДНК, основанный на использовании двух различных полимераз для исходной матрицы: Taq-полимеразы, не чувствительной к урацилу, и Pfu-полимеразы, которая в присутствии урацила обрывает синтез цепи [14]. В случае дезаминирования метилированных цитозинов образуется тимин, следовательно, обе полимеразы смогут продолжить синтез цепи, и в результате секвенирования исследователь в обеих реакциях будет наблюдать замену С → Т в последовательности ДНК (рис. 1). В свою очередь, дезаминирование неметилированных цитозинов создаёт «непроходимый» для Pfu-полимеразы урацил, и синтез цепи обрывается. Таким образом, на основании соотношения замен С → Т, выявляемых при секвенировании библиотек фрагментов ДНК, приготовленных с помощью Taq- и Pfu-полимераз, становится возможным восстановление профиля метилирования дДНК.

Непрямые способы анализа метилирования генома являются предпочтительными при работе с дДНК в отличие от прямых методов, таких как бисульфитная конверсия [21] или обогащение молекул ДНК, содержащих метилированные CpG, с помощью белков, содержащих метил-связывающие домены (methyl-CpG-binding domain, MBD) [22]. Например, для бисульфитной конверсии необходимо большое количество генетического материала, что уже делает этот подход не применимым для древних образцов, а обогащение с помощью белков, содержащих ме-

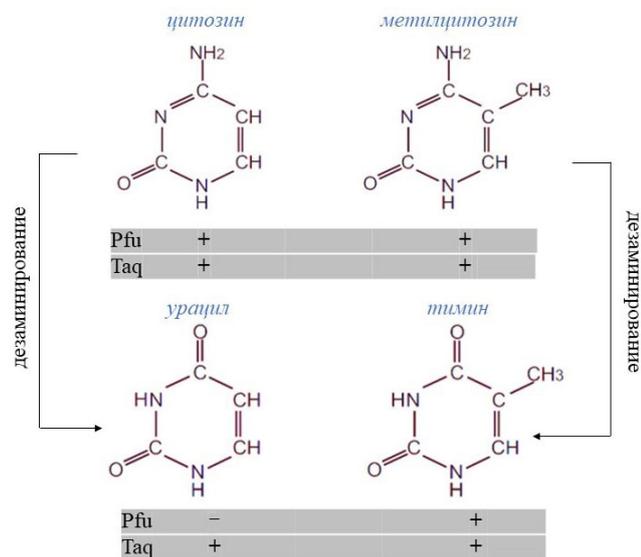


Рис. 1. Схематическое изображение метода оценки метилирования дДНК, основанного на использовании двух различных полимераз для исходной матрицы. Способность Pfu-полимеразы и Taq-полимеразы продолжать синтез цепи в присутствии различных типов нуклеотидов во время ПЦР-амплификации обозначена знаками «+» (способна) и «-» (неспособна)

тил-связывающие домены, может вносить существенный сдвиг в сторону анализа более длинных фрагментов ДНК, игнорируя короткие, действительно эндогенные, молекулы.

РЕКОНСТРУКЦИЯ ЭПИГЕНОМОВ АРХАИЧНЫХ ЛЮДЕЙ

В 2014 г. научная группа Д. Гохмана (David Gokhman) впервые опубликовала полные реконструированные карты метилирования ДНК неандертальца и денисовца [23]. Исследователи сравнили картины метилирования ДНК, выделенной из костной ткани древнего и современного человека, и выявили порядка 2000 дифференциально метилированных участков [23]. На тот момент особое внимание привлекли отличия в метилировании кластера генов *HOXD*, регулирующих развитие разных частей тела у многоклеточных животных. В промоторе гена *HOXD9* и в теле гена *HOXD10* костной ткани древнего человека было установлено гиперметилирование, в то время как у всех исследованных образцов костной ткани современных людей для этих участков характерно гипометилирование. Ранее, в исследовании на мышинных модельных системах, было показано, что изменения в экспрессии генов данного кластера приводят к морфологическим преобразованиям, напоминающим различия в строении конечностей неандертальца и современного человека [24]. Таким образом, эпигенетические модификации данного региона могут играть ключевую роль в эволюции конечностей современного человека, что в очередной раз свидетельствует о том, что при изучении микроэволюционных и макроэволюционных процессов необходимо учитывать как генетический, так и эпигенетический фактор.

В 2019 г. команда Д. Гохмана опубликовала работу, в которой представила новый подход в изучении функциональной роли дифференциально метилированных участков генома архаичных людей [25]. Предложенный способ позволял предсказывать фенотипические особенности древних людей, основываясь на допущении, что изменения, вызываемые сильным метилированием промотора, похожи на изменения, возникающие в результате мутаций в гене, которые либо существенно снижают уровень его экспрессии, либо полностью выключают ген. При разработке метода исследователи использовали базу данных «Онтология человеческого фенотипа» (The Human Phenotype Ontology, HPO) [26], где содержится информация о том, как мутации, нарушающие работу того или ино-

го гена, сказываются на фенотипе человека, в данном случае на строении скелета. Метод был предварительно проверен на видах с известной морфологией, таких как неандертальцы и шимпанзе. Точность определения расходящихся черт составила более 85%, что позволило применить данный подход для реконструкции фенотипа денисовца (девочки из Денисовой пещеры) [25]. На текущий момент не найдено полных скелетов или черепов архаичных людей данного вида, и восстановление их внешности на основании эпигенетических модификаций генома является единственно возможным способом. Исследователям удалось предсказать 56 отличий денисовцев от неандертальцев и/или современных людей. Денисовцы имели ряд общих черт с неандертальцами: удлинённое лицо, низкий лоб, выступающие челюсти, широкий таз и крупную грудную клетку, также были выявлены и уникальные особенности, например, более длинная зубная дуга и более выраженное латеральное расширение черепа [25]. Важно отметить, что полученные результаты не противостоят морфологии обнаруженных на сегодняшний день фрагментов скелета денисовцев.

Несмотря на впечатляющие результаты, полученные командой Д. Гохмана, у исследователей возник ряд трудностей, связанных с отсутствием полных референсных карт метилирования костной ткани современного человека, малым количеством образцов, необходимостью сравнивать данные метилирования, полученные с помощью различных технологий, а также с отсутствием таких данных для организмов, которые можно было бы использовать в качестве внешней группы (аутгруппы) при определении эволюционных взаимоотношений между исследуемыми популяциями людей разных видов [25].

Для преодоления перечисленных сложностей исследователи приняли решение дополнительно реконструировать профили метилирования ещё нескольких древних геномов, в том числе эпигеном древних людей современного анатомического облика, а также целенаправленно реконструировать полные карты метилирования в костной ткани современных людей и нескольких шимпанзе с применением различных технологий. Такой подход позволил максимально учесть факторы, которые могут влиять на результат поиска дифференциально метилированных регионов: технологию секвенирования, различия в покрытии генома и в степени дезаминирования, возраст и пол человека (например, некоторые регионы генома подвержены гиперметилированию только у мужчин), часть скелета (бедренная кость, височная кость черепа, фаланга пальца, зуб), из которой выде-

лялась ДНК, а также потенциальный шум, который возникает во время реконструкции карт метилирования.

В результате командой Д. Гохмана была создана уникальная платформа для изучения динамики метилирования ДНК в процессе эволюции человека, что позволило обнаружить дифференциально метилированные участки в 588 генах [25]. В том числе было установлено гиперметилирование в участках генов *SOX9*, *ACAN*, *COL2A1*, *NFIX* и *XYLT1*, связанных с анатомией лица и голосового тракта, характерное только для современных людей. Известно, что *SOX9*, *ACAN* и *COL2A1* представляют собой группу скоординированно функционирующих генов, взаимодействующих друг с другом и регулирующих рост и формирование скелета, включая каркас гортани и кости лица [27]. Предположительно гиперметилирование этих генов могло сыграть ключевую роль в формировании лица и голосового тракта современного человека [15].

Важно отметить, что в тканях, не относящихся к скелетным (мозг, кровь и др.), профиль метилирования данных генов практически не различается у шимпанзе и современного человека, что свидетельствует о том, что различия являются специфическими именно для скелетных тканей. Такой вывод позволяет сделать наличие профиля метилирования для шимпанзе, организма, выступающего в качестве внешней эволюционной группы. Если исследователю известен статус метилирования определенного региона у шимпанзе в костной и других тканях, то, имея эту информацию, становится возможным предсказать статус метилирования исследуемого локуса в тканях архаичных людей, не сохранившихся для исследования, в том числе в тканях мозга [28], в то время как в костной ткани уровень метилирования можно определить экспериментально.

На рис. 2 представлена схема предсказания статуса метилирования геномного локуса в тка-

нях мозга архаичных людей. Например, если исследуемый локус неметилирован в костной ткани шимпанзе и у неандертальского или денисовского человека (сценарий 1), но метилирован в костной ткани современного человека и тканях мозга современных людей и шимпанзе, то данная эпимутация (изменением метилирования ДНК без изменения последовательности) является специфичной для костной ткани, которая возникла у современных людей, изменив состояние локуса с неметилированного на метилированный. Следовательно, у архаичных видов людей этот локус в тканях мозга будет скорее всего метилирован. В том случае, если исследуемый локус неметилирован в костной ткани шимпанзе и у неандертальского или денисовского человека (сценарий 2), но метилирован в костной ткани современного человека, и при этом в тканях мозга современных людей локус метилирован, а в тканях мозга шимпанзе неметилирован, то данная эпимутация затронула все ткани, изменив статус локуса на метилированный. Такое изменение могло произойти, например, если эпигенетическое состояние локуса определяется до тканевой дифференцировки. В данном случае у архаичных видов людей этот локус в тканях мозга будет скорее всего неметилирован. Стоит также различать такие тканеспецифические эпимутации с эпимутациями, которые приводят к противоположному состоянию метилирования гена во всех органах и тканях у людей (современных и архаичных) и шимпанзе. Последние являются отражением генетических изменений в процессе эволюции от обезьяны к человеку.

Следует также отметить, что кроме генов, регулирующих рост и формирование скелета, дифференциально метилированные участки в геномах архаичных и современных людей выявлены в генах, ассоциированных с развитием нервной, мышечной, сердечно-сосудистой систем и другими важными процессами в организме, что несомненно требует дальнейшего детального изу-

Организм	Шимпанзе		Современный человек		Архаичный человек	
	костная ткань	мозг	костная ткань	мозг	костная ткань	мозг (предсказание)
Статус метилирования исследуемого локуса	сценарий 1	—	+	+	—	? (+)
	сценарий 2	—	—	+	+	? (-)



Рис. 2. Схема предсказания статуса метилирования исследуемого геномного локуса в тканях мозга архаичных людей. «+» – Метилированное состояние геномного локуса; «—» – неметилированное состояние геномного локуса

чения. Таким образом, исследование эпигенетических модификаций древних геномов открывает новые возможности для изучения микро- и макроэволюционных процессов живых организмов, а также предоставляет уникальную возможность реконструировать фенотипические признаки архаичных людей, в том числе тех, для которых ещё не обнаружено полных скелетов.

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ «ЧАСЫ» ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВОЗРАСТА ДРЕВНЕГО ЧЕЛОВЕКА

Ещё одним интересным направлением исследований является возможность определения хронологического возраста древнего человека на основе оценки статуса метилирования определенных CpG-локусов (сайтов, где цитозин (C) находится рядом с гуанином (G) в последовательности ДНК), степень метилирования которых изменяется по мере взросления и старения организма. Повышенный интерес к такому подходу связан с тем, что установление возраста древнего человека на момент его смерти как правило вызывает трудности, так как останки древних людей зачастую представлены в виде отдельных фрагментов скелета. Например, в случае денисовского человека были найдены всего несколько мелких костей и зубов [9, 29], что не позволяет достоверно определить возраст классическими подходами, изучая морфологию костей черепа или других частей скелета. Кроме того, традиционные методы основаны на визуальной, зачастую довольно субъективной, оценке морфологических особенностей скелета, что может приводить к ошибкам.

Практическая возможность определения возраста древнего человека на момент его смерти на основании данных метилирования ДНК была впервые показана на примере 4000-летнего палеоэскимоса, принадлежащего к культуре Saqqaq [14]. ДНК палеоэскимоса была выделена из стержня волос, хорошо сохранившихся в вечной мерзлоте, что позволило произвести широкомасштабное секвенирование образца с 20-кратным покрытием. Для определения возраста исследователи применили линейную модель Koch и Wagner 2011 года [30], описывающую связь возраста и статуса метилирования пяти CpG-локусов, из которых четыре, ассоциированные с генами *NPTX2* (cg12799895), *TRIM58* (cg07533148), *GRIA2* (cg25148589) и *KCNQ1DN* (cg01530101), подвергаются гиперметилированию с возрастом и один CpG-локус в гене *BIRC4BP* (cg23571857) по мере взросления организма претерпевает гипометилирование. Для

определения возраста палеоэскимоса исследователи использовали только два локуса (cg07533148 и cg01530101) из пяти, которые предварительно показали наибольшую информативность для ДНК, выделенной из волос современного человека, с различиями между прогнозируемым и реальным возрастом в пределах 1,7–12,4 года. Согласно статусу метилирования регионов вблизи данных локусов, возраст палеоэскимоса на момент смерти составил приблизительно 40 лет.

Основная цель разработчиков моделей для прогнозирования хронологического возраста состоит в том, чтобы научиться определять биологический возраст человека, который не всегда совпадает с хронологическим, что может отражать интенсивность процессов старения для каждого организма индивидуально. В свою очередь, более детальное изучение эпигенетических механизмов старения поможет разрабатывать стратегии по замедлению этого процесса и увеличению продолжительности и качества жизни. На сегодняшний момент разработано не менее 15 эпигенетических «часов» старения [31], в одних моделях для оценки возраста достаточно 3 CpG-локуса [32], в других – необходимо проанализировать несколько сотен [33, 34]. В свою очередь, каждая модель характеризуется определенной погрешностью и типом ткани, для которой прогнозирование работает наилучшим образом. Например, модель Horvath использует 353 CpG-локуса, работает с большим количеством тканей человека и имеет среднюю ошибку предсказания 3–5 лет [33], что является весьма неплохим показателем. Тем не менее подавляющее большинство имеющихся сегодня эпигенетических калькуляторов прогнозируют возраст по профилю метилирования ДНК, выделенной из цельной крови (наиболее доступного материала), что абсолютно неприменимо для образцов дДНК. Следовательно, разработка новых моделей или изучение возможности применения существующих моделей для прогнозирования хронологического возраста древнего человека по данным метилирования ДНК, выделенной из костной ткани, костей черепа и зубов, является актуальной задачей и требует дополнительных исследований в этом направлении.

ИССЛЕДОВАНИЕ НЕДОСТУПНЫХ РАННЕ АСПЕКТОВ ЖИЗНИ ДРЕВНИХ ЛЮДЕЙ

Отдельным перспективным направлением в палеоэпигенетике является изучение локусов генома, характеризующихся чувствительностью к условиям окружающей среды [35]. Такие локусы, выступая в качестве «посредников» между

внешней средой и ДНК, модифицируют свой паттерн метилирования в ответ на определенные воздействия, такие как изменения в питании, смена климатических условий, взаимодействие с химическими веществами и др. На сегодняшний день опубликовано большое количество работ, подтверждающих влияние различных внешних факторов на эпигенетические модификации генома, в том числе на эпигеном человека. Например, в исследовании под руководством Т. Пауса (T. Paus) было показано, что воздействие сигаретного дыма на плод во время внутриутробного развития изменяет статус метилирования целого ряда генов [36]. В работе М. Росарио (M. Rosario) с соавторами установлено, что у детей, рожденных от матерей с диабетом второго типа, выявляется более 4000 дифференциально метилированных регионов в геноме при сравнении с детьми, рожденными от женщин без данного заболевания [37]. Интересные данные были получены Б. Хейманс (B. Heijmans) в ходе исследования детей, выношенных в период массового голода, поразившего население Нидерландов под конец Второй мировой войны, известного как «Голодная зима 1944 года». Исследователями было показано, что в группе людей, подвергшихся воздействию голода на самых ранних этапах своего развития, наблюдается снижение уровня метилирования гена *IGF2* [38]. Данный ген представляет особый интерес, поскольку кодирует инсулиноподобный фактор роста 2 и играет важную роль в регуляции процессов роста и развития организма. Хорошо известно, что активность данного гена регулируется по механизму геномного импринтинга, в том числе посредством метилирования ДНК [39], соответственно, снижение уровня метилирования гена *IGF2* может приводить к изменению активности инсулиноподобного фактора роста 2, оказывая существенное влияние на процессы роста и развития организма, а также на развитие патологических состояний во взрослом возрасте [40, 41]. Таким образом, существует множество доказательств того, что воздействие неблагоприятных факторов на ранних стадиях внутриутробного развития может изменять эпигенетический статус определенных локусов генома и сохраняться на протяжении жизни человека, оказывая влияние на его здоровье.

Исследование локусов в геноме древнего человека, профиль метилирования которых ассоциирован с тем или иным воздействием внешней среды, может служить новым подходом в изучении условий проживания архаичных людей, их диеты, заболеваний, а также токсических веществ, действию которых они подвергались в первую очередь в наиболее чувствитель-

ный эмбриональный период развития. В связи с тем, что изменение в метилировании, возникшее на ранней стадии развития, ещё до дифференцировки, будет перенесено на все дочерние клетки организма, это позволяет изучать эпигенетические локусы, чувствительные к воздействиям внешней среды, в тканях, доступных для исследования в палеоэпигенетике (зубы, волосы и кости скелета) [35].

Особый интерес для учёных представляет изучение эпигенетических модификаций геномов древних людей для исследования механизмов таких заболеваний, как ожирение и ассоциированные с ним патологии. Различают моногенную тяжёлую форму ожирения с ранней манифестацией, вызванную мутацией в одном гене, и полигенную форму. При моногенной форме внешние факторы не оказывают существенного влияния на развитие заболевания. В то время как полигенная форма относится к мультифакторным гетерогенным заболеваниям и развивается в результате дисбаланса между потребляемой и расходуемой энергией, в основе которого лежат нарушения метаболизма, генетическая предрасположенность, нарушение поведенческих реакций и влияние внешних факторов. Полигенная форма ожирения является наиболее распространённой в современном обществе [42].

С развитием технологий секвенирования в ходе исследований методом полногеномного поиска ассоциаций (genome-wide association studies, GWAS) выявлено более 1000 локусов, ассоциированных с признаками ожирения, тем не менее совместно они могут объяснить только 8,4% вариативности индекса массы тела человека [43]. Большинство обнаруженных вариантов, выявленных в результате полногеномного анализа ассоциаций, по отдельности имеют слабую связь с ожирением и связанными с ним патологиями и зачастую расположены в некодирующей части генов или в межгенном пространстве [44–46].

В последние годы появляется всё больше работ, свидетельствующих о том, что ключевая роль в патогенезе ожирения может принадлежать эпигенетическим механизмам [47–50]. Широкое распространение ожирения за последние десятилетия в странах с низким и средним уровнем доходов, в первую очередь в районах с большим количеством ресторанов быстрого питания, может быть следствием изменений в профиле метилирования ДНК в результате малоподвижного современного образа жизни и несбалансированного питания. Тем не менее молекулярный механизм патогенеза ожирения до конца неясен, и непонятно: являются ли выявленные эпигенетические изменения причиной

развития заболевания или его следствием. Зачастую данные об уровне и спектре дифференциально метилированных генов противоречивы, а число таких работ ограничено.

Исследование дДНК может улучшить наше понимание эпигенетической составляющей молекулярной природы ожирения и ассоциированных с ним патологий. Отличный от современного образ жизни древних людей позволяет использовать их профиль метилирования генома в качестве эпигенетической «нормы». Предполагая, что древние люди современного типа в меньшей степени были подвержены таким неблагоприятным факторам, как малоподвижный образ жизни и высококалорийное питание с высокой долей жиров и простых углеводов, следует ожидать выявления различий в профиле метилирования геномов древних людей и ныне живущих. Логично предположить, что обнаруженная эпигенетическая вариабельность определённых участков генома может играть важную роль в развитии ожирения и ассоциированных с ним заболеваний. С этой точки зрения интересно сравнить профили метилирования современных людей и, например, людей бронзового века, живших порядка 5000 лет назад. Учитывая, что такой промежуток времени довольно короткий с точки зрения эволюции (приблизительно 200 поколений), можно предположить, что изменения в метилировании вследствие изменения самой нуклеотидной последовательности ДНК маловероятны. Следовательно, адаптация на малых временных масштабах возможна преимущественно за счёт эпигенетических изменений.

На сегодняшний момент исследования доступны способы проверки функциональной значимости выявленных различий в профиле метилирования современных и древних людей: например, на клеточных линиях путём моделирования статуса метилирования исследуемого локуса с помощью лентивирусных конструкций, экспрессирующих каталитически неактивный белок dCas9 слитый с каталитическим доменом TET1CD (вызывает таргетное деметилирование) или Dnmt3a (вызывает таргетное метилирование) [51, 52]. Такие конструкции позволяют изменять метилирование регионов генома, заранее заданных исследователем с помощью РНК-гидов, каждый из которых направит dCas9 к собственной мишени. В случае с ожирением моделирование статуса метилирования изучаемых локусов в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках с последующей направленной их дифференцировкой в адипогенном направлении позволит сравнить транскрипционные профили адипоцитов с модифицированным метилированием заданных локусов и без

него и выявить, какие гены изменяют свою активность, в том числе с учётом их функциональных связей между собой.

Работы такого рода довольно трудоёмкие, но в то же время могут способствовать получению новых сведений об эпигенетической составляющей молекулярной природы ожирения и связанных с ним болезней. В свою очередь, выявленные с использованием такого оригинального подхода эпигенетические локусы, ассоциированные с исследуемым заболеванием, могут быть использованы в качестве перспективных мишеней для поиска новых лекарственных препаратов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование последовательностей и эпигенетических модификаций геномов древних людей является довольно дорогим и трудозатратным направлением, требующим специальных условий для работы, большого объёма секвенирования, вычислительных мощностей и владения специфическими инструментами анализа данных. Тем не менее поддержание и развитие таких исследований является задачей государственной важности не только с точки зрения биологических наук, например, для изучения эволюции человека и его заболеваний, но и для истории и политологии. Зачастую это единственный метод, способный объективно и наглядно продемонстрировать и обосновать бездоказательность экстремистских теорий о превосходстве одних народов над другими. Ярким историческим примером служат идеи немецкого археолога Kossinna [53], которые позже были подхвачены нацистами, что привело к известным событиям и огромному числу жертв.

На сегодняшний день исследования дДНК перестали быть исключительно фундаментальными и приобрели очевидный прикладной аспект. Например, изучение ДНК древних людей способно улучшить наше понимание генетической и эпигенетической составляющей молекулярной природы различных заболеваний, в том числе таких как ожирение и ассоциированные с ним патологии. Исследование эволюции мозга архаичного и современного человека, а конкретно генетических и эпигенетических механизмов регуляции нервной системы, может пролить свет на механизмы патогенеза психических и нейродегенеративных заболеваний. Анализ ДНК патогенов древних людей даёт возможность изучать происхождение и эволюцию возбудителей заболеваний современных людей, что позволит оценить шансы появления ещё более

опасных патогенов и поможет избежать новых вспышек эпидемий в будущем.

Таким образом, палеогенетика и недавно выделившееся её направление, палеоэпигенетика, являются важными приоритетными направлениями для страны, требующими поддержки со стороны государства. До недавнего времени полногеномное секвенирование уникальных образцов из местных археологических памятников мирового значения в большинстве случаев проводилось в зарубежных лабораториях, что не способствовало развитию исследований дДНК в России и не позволяло местным археологам на равных участвовать в интерпретации полученных результатов. Полноценное становление и развитие данного направления предоставит возможность учёным самостоятельно проводить

исследования ценных археологических образцов, обнаруженных на территории страны, повысит конкурентоспособность российской науки на мировом уровне, а, следовательно, позволит на равных участвовать в интерпретации исторических событий прошлого.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России, грант № 13.1902.21.0023 (согл. № 075-10-2020-116).

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

- Orlando, L., Ginolhac, A., Zhang, G., Froese, D., Albrechtsen, A., et al. (2013) Recalibrating Equus evolution using the genome sequence of an early Middle Pleistocene horse, *Nature*, **499**, 74-78.
- Van der Valk, T., Pečnerová, P., Díez-Del-Molino, D., Bergström, A., Oppenheimer, J., et al. (2021) Million-year-old DNA sheds light on the genomic history of mammoths, *Nature*, **591**, 265-269.
- Reis, M., Donoghue, P., and Yang, Z. (2016) Bayesian molecular clock dating of species divergences in the genomics era, *Nat. Rev. Genet.*, **17**, 71-80.
- Krause, J., and Pääbo, S. (2016) Genetic time travel, *Genetics*, **203**, 9-12.
- Weyrich, L. S., Duchene, S., Soubrier, J., Arriola, L., Llamas, B., et al. (2017) Neanderthal behaviour, diet, and disease inferred from ancient DNA in dental calculus, *Nature*, **544**, 357-361.
- Jensen, T. Z. T., Niemann, J., Iversen, K. H., Fotakis, A. K., Gopalakrishnan, S., et al. (2019) A 5700 year-old human genome and oral microbiome from chewed birch pitch, *Nat. Commun.*, **10**, 5520.
- Rasmussen, S., Allentoft, M. E., Nielsen, K., Orlando, L., Sikora, M., et al. (2015) Early divergent strains of *Yersinia pestis* in Eurasia 5,000 years ago, *Cell*, **163**, 571-582.
- Green, R. E., Krause, J., Briggs, A. W., Maricic, T., Stenzel, U., et al. (2010) A draft sequence of the Neandertal genome, *Science*, **328**, 710-722.
- Meyer, M., Kircher, M., Gansauge, M.-T., Li, H., Racimo, F., et al. (2012) A high-coverage genome sequence from an archaic Denisovan individual, *Science*, **338**, 222-226.
- Prüfer, K., Racimo, F., Patterson, N., Jay, F., Sankararaman, S., et al. (2014) The complete genome sequence of a Neandertal from the Altai Mountains, *Nature*, **505**, 43-49.
- Jablonka, E. (2013) Epigenetic inheritance and plasticity: the responsive germline, *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, **111**, 99-107.
- Luo, X., Song, R., Moreno, D. F., Ryu, H.-Y., Hochstrasser, M., et al. (2020) Epigenetic mechanisms contribute to evolutionary adaptation of gene network activity under environmental selection, *Cell Rep.*, **33**, 108306.
- Briggs, A. W., Stenzel, U., Meyer, M., Krause, J., Kircher, M., et al. (2010) Removal of deaminated cytosines and detection of *in vivo* methylation in ancient DNA, *Nucleic Acids Res.*, **38**, e87.
- Pedersen, J. S., Valen, E., Velazquez, A. M. V., Parker, B. J., Rasmussen, M., et al. (2014) Genome-wide nucleosome map and cytosine methylation levels of an ancient human genome, *Genome Res.*, **24**, 454-466.
- Gokhman, D., Nissim-Rafinia, M., Agranat-Tamir, L., Housman, G., García-Pérez, R., et al. (2020) Differential DNA methylation of vocal and facial anatomy genes in modern humans, *Nat. Commun.*, **11**, 1189.
- Rohland, N., Glocke, I., Aximu-Petri, A., and Meyer, M. (2018) Extraction of highly degraded DNA from ancient bones, teeth and sediments for high-throughput sequencing, *Nat. Protoc.*, **13**, 2447-2461.
- Lindahl, T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA, *Nature*, **362**, 709-715.
- Kavli, B., Otterlei, M., Slupphaug, G., and Krokan, H. (2007) Uracil in DNA – general mutagen, but normal intermediate in acquired immunity, *DNA Repair*, **6**, 505-516.
- Srivastava, S., and Singh, N. (2011) The probability analysis of opening of DNA, *J. Chem. Phys.*, **134**, 115102.
- Sawyer, S., Krause, J., Guschanski, K., Savolainen, V., and Pääbo, S. (2012) Temporal patterns of nucleotide misincorporations and DNA fragmentation in ancient DNA, *PLoS One*, **7**, e34131.
- Llamas, B., Holland, M. L., Chen, K., Cropley, J. E., Cooper, A., et al. (2012) High-resolution analysis of cytosine methylation in ancient DNA, *PLoS One*, **7**, e30226.
- Seguin-Orlando, A., Gamba, C., Sarkissian, C. D., Ermini, L., Louvel, G., et al. (2015) Pros and cons of methylation-based enrichment methods for ancient DNA, *Sci. Rep.*, **5**, 11826.
- Gokhman, D., Lavi, E., Prüfer, K., Fraga, M. F., Riancho, J. A., et al. (2014) Reconstructing the DNA methylation maps of the Neandertal and the Denisovan, *Science*, **344**, 523-527.
- Zakany, J., and Duboule, D. (2007) The role of Hox genes during vertebrate limb development, *Curr. Opin. Gen. Dev.*, **17**, 359-366.
- Gokhman, D., Mishol, N., de Manuel, M., de Juan, D., Shuqrun, J., et al. (2019) Reconstructing Denisovan anatomy using DNA methylation maps, *Cell*, **179**, 180-192.e10.
- Köhler, S., Gargano, M., Matentzoglou, N., Carmody, L. C., Lewis-Smith, D., et al. (2021) The human phenotype ontology in 2021, *Nucleic Acids Res.*, **49**, D1207-D1217.
- Lee, Y.-H., and Saint-Jeannet, J.-P. (2011) Sox9 function in craniofacial development and disease, *Genesis*, **49**, 200-208.
- Gokhman, D., Meshorer, E., and Carmel, L. (2016) Epigenetics: it's getting old. Past meets future in paleoepigenetics, *Trends Ecol. Evol.*, **31**, 290-300.
- Reich, D., Green, R. E., Kircher, M., Krause, J., Patterson, N., et al. (2010) Genetic history of an archaic

- hominin group from Denisova Cave in Siberia, *Nature*, **468**, 1053-1060.
30. Koch, C. M., and Wagner, W. (2011) Epigenetic-aging-signature to determine age in different tissues, *Aging*, **3**, 1018-1027.
 31. Bergsma, T., and Rogaeva, E. (2020) DNA methylation clocks and their predictive capacity for aging phenotypes and healthspan, *Neurosci. Insights*, **15**, 2633105520942221.
 32. Bocklandt, S., Lin, W., Sehl, M. E., Sánchez, F. J., Sinsheimer, J. S., et al. (2011) Epigenetic predictor of age, *PLoS One*, **6**, e14821.
 33. Horvath, S. (2013) DNA methylation age of human tissues and cell types, *Genome Biol.*, **14**, R115.
 34. Zhang, Q., Vallerga, C. L., Walker, R. M., Lin, T., Henders, A. K., et al. (2019) Improved precision of epigenetic clock estimates across tissues and its implication for biological ageing, *Genome Med.*, **11**, 54.
 35. Gokhman, D., Malul, A., and Carmel, L. (2017) Inferring past environments from ancient epigenomes, *Mol. Biol. Evol.*, **34**, 2429-2438.
 36. Toledo-Rodriguez, M., Lotfipour, S., Leonard, G., Perron, M., Richer, L., et al. (2010) Maternal smoking during pregnancy is associated with epigenetic modifications of the brain-derived neurotrophic factor-6 exon in adolescent offspring, *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.*, **7**, 1350-1354.
 37. Rosario, M. C., Ossowski, V., Knowler, W. C., Bogardus, C., Baier, L. J., et al. (2014) Potential epigenetic dysregulation of genes associated with MODY and type 2 diabetes in humans exposed to a diabetic intrauterine environment: an analysis of genome-wide DNA methylation, *Metabolism*, **63**, 654-660.
 38. Heijmans, B. T., Tobi, E. W., Stein, A. D., Putter, H., Blauw, G. J., et al. (2008) Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 17046-17049.
 39. Smith, F. M., Garfield, A. S., and Ward, A. (2006) Regulation of growth and metabolism by imprinted genes, *Cytogenet. Genome Res.*, **113**, 279-291.
 40. Cui, H., Cruz-Correa, M., Giardiello, F. M., Hutcheon, D. F., Kafonek, D. R., et al. (2003) Loss of IGF2 imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk, *Science*, **299**, 1753-1755.
 41. Ravenel, J. D., Broman, K. W., Perlman, E. J., Niemitz, E. L., Jayawardena, T. M., et al. (2001) Loss of imprinting of insulin-like growth factor-II (IGF2) gene in distinguishing specific biologic subtypes of Wilms tumor, *J. Nat. Cancer Inst.*, **93**, 1698-1703.
 42. Loos, R. J. F., and Yeo, G. S. H. (2021) The genetics of obesity: from discovery to biology, *Nat. Rev. Genet.*, **23**, 1-14.
 43. Khera, A. V., Chaffin, M., Wade, K. H., Zahid, S., Brancale, J., et al. (2019) Polygenic prediction of weight and obesity trajectories from birth to adulthood, *Cell*, **177**, 587-596.e9. doi: 10.1016/j.cell.2019.03.028.
 44. Goodarzi, M. O. (2018) Genetics of obesity: what genetic association studies have taught us about the biology of obesity and its complications, *Lancet Diab. Endocrinol.*, **6**, 223-236.
 45. Müller, M. J., Geisler, C., Blundell, J., Dulloo, A., Schutz, Y., et al. (2018) The case of GWAS of obesity: does body weight control play by the rules? *Int. J. Obesity*, **42**, 1395-1405.
 46. Locke, A. E., Kahali, B., Berndt, S. I., Justice, A. E., Pers, T. H., et al. (2015) Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology, *Nature*, **518**, 197-206.
 47. Cheng, Z., Zheng, L., and Almeida, F. A. (2018) Epigenetic reprogramming in metabolic disorders: nutritional factors and beyond, *J. Nutr. Biochem.*, **54**, 1-10.
 48. Pietiläinen, K. H., Ismail, K., Järvinen, E., Heinonen, S., Tummers, M., et al. (2016) DNA methylation and gene expression patterns in adipose tissue differ significantly within young adult monozygotic BMI-discordant twin pairs, *Int. J. Obesity*, **40**, 654-661.
 49. Muniandy, M., Heinonen, S., Yki-Järvinen, H., Hakkarainen, A., Lundbom, J., et al. (2017) Gene expression profile of subcutaneous adipose tissue in BMI-discordant monozygotic twin pairs unravels molecular and clinical changes associated with sub-types of obesity, *Int. J. Obesity*, **41**, 1176-1184.
 50. Perflyev, A., Dahlman, I., Gillberg, L., Rosqvist, F., Iggman, D., et al. (2017) Impact of polyunsaturated and saturated fat overfeeding on the DNA-methylation pattern in human adipose tissue: a randomized controlled trial, *Am. J. Clin. Nutr.*, **105**, 991-1000.
 51. Morita, S., Noguchi, H., Horii, T., Nakabayashi, K., Kimura, M., et al. (2016) Targeted DNA demethylation *in vivo* using dCas9-peptide repeat and scFv-TET1 catalytic domain fusions, *Nat. Biotechnol.*, **34**, 1060-1065.
 52. Nuñez, J. K., Chen, J., Pommie, G. C., Cogan, J. Z., Replogle, J. M., et al. (2021) Genome-wide programmable transcriptional memory by CRISPR-based epigenome editing, *Cell*, **184**, 2503-2519.e17.
 53. Kossinna, G. (1919) *Das Weichselland, ein Uralter Heimatboden der Germanen*, Kafermann, Leipzig.

ACHIEVEMENTS AND PROSPECTS FOR EPIGENETIC STUDIES OF ANCIENT DNA

Review

K. V. Zhur¹, V. A. Trifonov², and E. B. Prokhortchouk^{1*}

¹ Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology", Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia; E-mail: prokhortchouk@gmail.com

² Institute for the History of Material Culture Russian Academy of Sciences, 191186 St.-Petersburg, Russia

The development of high-throughput whole-genome sequencing technology and improvement of sample preparation techniques make it possible to study ancient DNA (aDNA) from archaeological samples that are over a million years old. Study of aDNA sequences shed the light on a history of human migrations, clarified a chain of populations changes, interbreeding of Cro-Magnons with Neanderthals and Denisovans, evolution of human pathogens, etc. Equally important was the announcement of the possibility to study epigenetic modifications of ancient genomes, which allows receiving previously inaccessible information, including gene expression data, nucleosome positioning and DNA methylation. Cytosine methylation maps of Denisovan genome opens a road for chronological age prediction, phenotype reconstruction and even elucidating a list of unfavorable environmental factors that have influenced the ancient person. In this review we discuss actual progress in epigenetics of ancient DNA including methodological approaches and promising directions of the studies.

Keywords: ancient DNA, paleoepigenetics, epigenetic clock, epigenome editing, obesity

УДК 57.088;575;929;7.06

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ СВИДЕТЕЛЬСТВО АУТЕНТИЧНОСТИ ЛОКОНА ВОЛОС, ПРЕДСТАВЛЕННОГО КАК РЕЛИКВИЯ В МУЗЕЙНОМ ПОРТРЕТЕ ЦЕСАРЕВИЧА АЛЕКСЕЯ, СЫНА ПОСЛЕДНЕГО РОССИЙСКОГО ИМПЕРАТОРА

© 2021 Т.В. Андреева^{1,2}, А.Д. Манахов³, С.С. Кунижева¹, Е.И. Рогаев^{1,2,3,4*}

¹ Московский государственный университета имени М.В. Ломоносова,
Центр генетики и генетических технологий, биологический факультет,
кафедра генетики, 119991 Москва, Россия; электронная почта: rogaev@vigg.ru

² Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, отдел геномики и генетики человека,
лаборатория эволюционной геномики, 119991 Москва, Россия

³ Научно-технологический университет «Сириус», Научный Центр генетики и наук о жизни,
354340 Сочи, Краснодарский край, Россия

⁴ Медицинская школа Чан Массачусетского университета, департамент психиатрии, 01545 Шрусбери, США

Поступила в редакцию 11.11.2021

После доработки 11.11.2021

Принята к публикации 12.11.2021

Подлинность произведения искусства – это главный фактор, обуславливающий его ценность. Применение генетического подхода для определения подлинности и происхождения музейной реликвии представлено в данной работе. Были исследованы два волоска без волосяных луковиц из локона, вмонтированного в уникальный экспонат, хранящийся в Государственном историческом музее – акварельный портрет цесаревича Алексея Романова, сына последнего русского императора Николая II. С использованием методов масштабного параллельного секвенирования, а также с помощью мультиплексной ПЦР с последующим секвенированием продуктов методом Сэнгера был проведён анализ маркёров митохондриальной ДНК (мтДНК). Для сравнения использовали реконструированную нами ранее полную последовательность мтДНК цесаревича Алексея, унаследованную им по женской линии королевы Виктории [Rogaev et al. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 5258–5263]. Несмотря на очень низкое качество и малое количество ДНК, которое удалось выделить из уникальных исторических образцов, нами были определены информативные маркёры мтДНК в образцах из двух единичных волос без волосяных луковиц. Было показано, что гаплотип мтДНК исследованных волос соответствует гаплотипу мтДНК цесаревича Алексея, его сестры, а также матери, императрицы Александры Фёдоровны Романовой. Этот гаплотип является уникальным и отсутствует в существующих в настоящее время базах данных последовательностей мтДНК. Полученные результаты свидетельствуют о том, что локон волос, вмонтированный в портрет, имеет отношение к семье последнего российского императора Николая II. Представленная работа является первым примером успешного применения геномного метода для оценки ценности произведения искусств и показывает перспективность внедрения генетических технологий для оценки подлинности музейных экспонатов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: древняя ДНК, музейный экспонат, волос, мтДНК, ДНК-идентификация, масштабное параллельное секвенирование.

DOI: 10.31857/S032097252112006X

ВВЕДЕНИЕ

Идентификация человека по волосам – одна из важных задач, решаемых в криминалистике. Волосы часто являются единственным источником материала для анализа и при этом наиболее ограниченным с точки зрения количества и качества содержащейся в них ДНК [1, 2]. Результаты ранее проведённых исследований, во-первых, свидетельствуют о фрагментации ДНК в волосах по мере их роста и кератинизации эпителиальных клеток [3, 4]. Во-вторых, в связи с

малым размером самого волоса, количество клеток в образцах волос, которые могут содержать ДНК, ограничено, если они вообще присутствуют. Также ранее было показано, что содержание и качество ДНК уменьшается по мере удлинения волоса [5–8]. В связи с указанными особенностями волос традиционные методы анализа ядерной ДНК, используемые в криминалистике, например, основанные на STR-маркёрах, могут быть неэффективны при проведении генетического анализа на волосах без луковиц. Митохондриальная ДНК (мтДНК) содержится в клетках в большем числе копий, чем ядерная, и она менее подвержена деградации, благодаря

* Адресат для корреспонденции.

защите дополнительной мембраной [9]. Таким образом, мтДНК является более перспективным объектом при проведении генетических экспертиз [10]. Ранее было показано, что для исследования мтДНК в волосах без волосяных луковок могут быть использованы как участки гипервариабельных регионов мтДНК, так и полная митохондриальная ДНК [11–13].

В Государственном историческом музее хранится уникальная реликвия — акварельный портрет цесаревича Алексея Романова, написанный русским художником-эмигрантом В.К. Гулевичем, с вмонтированной в него капсулой, содержащей локон волос, предположительно принадлежавший цесаревичу Алексею Романову, сыну последнего российского императора Николая II (рис. 1). Загадка происхождения реликвии остаётся нерешённой, также неизвестно, действительно ли прядь волос принадлежала сыну последнего российского императора. В данной работе мы показали, что единичные волоски из исторических и музейных экспонатов возрастом более 100 лет могут быть использованы для выделения ДНК, а анализ редких генетических вариантов митохондриальной ДНК позволяет проводить успешную ДНК-идентификацию по материнской линии для таких образцов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Уникальная реликвия — акварельный портрет русского художника-эмигранта В.К. Гулевича с вмонтированным в него локоном волос был передан Историческому музею после Второй мировой войны из Музея памяти императора Николая II, основанного в Белграде в 1936 г. белыми эмигрантами. Портрет попал в музей Белграда в 1940 г. вместе с документами, вывезенными в 1920 г. из России во Францию следователем по особо важным делам Омского окружного суда Н.А. Соколовым, расследовавшим казнь царской семьи в Екатеринбурге. После его смерти документы и некоторые вещественные доказательства поступили в Музей памяти императора в Белграде, откуда по окончании Великой Отечественной войны портрет с вмонтированным в него локоном волос был передан в Россию, в Государственный исторический музей. Обстоятельства, при которых была срезана эта прядь волос, а также возможная принадлежность цесаревичу Алексею давно вызывают вопросы у историков и сотрудников музея. Возможно, локон был сохранён кем-то, кто находился в ссылке с царской семьёй, и позже был передан следователю Н.А. Соколову.

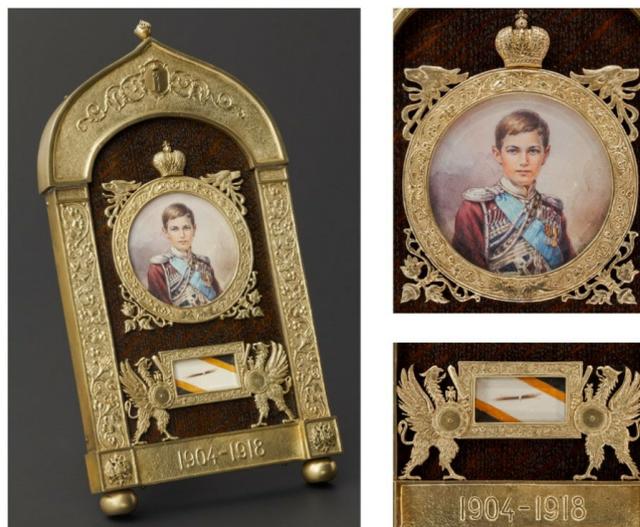


Рис. 1. Портрет цесаревича Алексея художника В.К. Гулевича с вмонтированным в него локоном волос. Портрет хранится в Государственном историческом музее (Москва, Россия)

Несколько волосков были изъяты нами из данной реликвии в Государственном историческом музее и помещены в две отдельные пробирки, обозначенные S1 и S2. Все дальнейшие операции с образцами проводили в специальной лаборатории, оборудованной для работы с древней ДНК. Мы адаптировали методологию работы с древней ДНК с некоторыми модификациями для анализа очень малого количества материала — старых образцов волос без луковок. По одному волоску из каждой пробирки (рис. 2) были взяты для выделения ДНК с использованием спин-колонок производства «Qiagen», Германия. Выделение ДНК из отдельного волоса из каждой пробирки проводили в независимых экспериментах в разные дни. Для контроля возможного загрязнения в каждом эксперименте выделения ДНК использовали отрицательные контроли выделения.

Сначала отдельные волоски, помещённые в пробирки (1,5 или 2 мл), промывали 0,5%-ным додецилсульфатом натрия и дважды стерильной водой без нуклеаз («Ambion», США). Далее выделяли ДНК с использованием набора реагентов QIAmp DNA Investigator kit («Qiagen») в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем набора для выделения ДНК из волос без волосяных луковок. Лизис образцов проводили при 56 °С 2 ч (для волоска S1) или 1 ч (для волоска S2). Выделенную ДНК элюировали в 35 мкл буфера АТЕ («Qiagen»).

В связи с очень малым ожидаемым количеством ДНК мы не проводили оценку её концентрации, а напрямую использовали для приго-

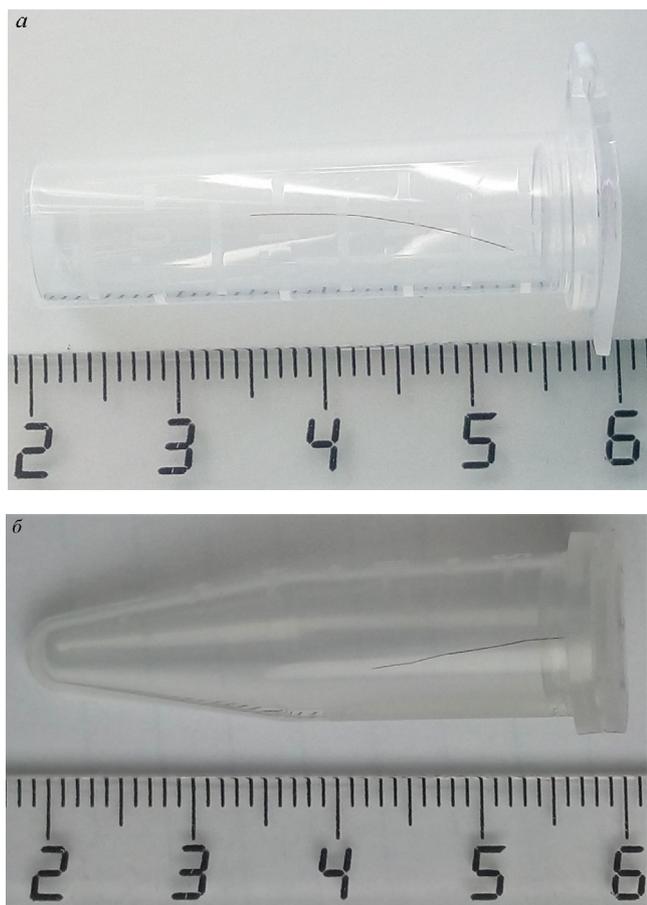


Рис. 2. Образцы волос, использованные для выделения ДНК: S1 (а) и S2 (б)

товления геномной библиотеки или ПЦР-амплификации.

Для приготовления геномной библиотеки мы адаптировали протокол, основанный на одноцепочечной ДНК [14]. При этом 8 мкл образца ДНК S2 предварительно репарировали с использованием смеси ферментов PreCR MIX («NEB», США). Готовую геномную библиотеку секвени-

ровали первоначально на приборе FGx ForenSeq («Illumina», США) и потом, для получения большего объема информации, — на приборе HiSeq2000/2500 («Illumina»). Из полученных в результате секвенирования коротких прочтений с помощью программы AdapterRemoval v2 [15] были удалены последовательности низкого качества и адаптерные последовательности. Короткие прочтения длиной более 25 п.н. были картированы на референсный геном человека (сборка hg38) и на референсную последовательность мтДНК человека (rCRS, NC_012920.1) с помощью пакета программ BWA [16] с параметрами, рекомендуемыми для анализа древней ДНК «-l 1024», «-n 0.01» и «-o 2» [17]. MapDamage2 использовали для оценки уровня замен С → Т, характерных для древней ДНК, на концах фрагментов ДНК [18].

Для прямого секвенирования участков мтДНК проводили мультиплексную амплификацию, как было описано ранее [19]. В связи с малым количеством материала и потенциальными проблемами, обусловленными малым количеством матрицы, все эксперименты проводили в нескольких повторностях.

Нами были подобраны олигонуклеотидные праймеры для амплификации коротких фрагментов ДНК, содержащих редкие варианты (частота аллеля < 0,05), выявленные нами ранее в мтДНК цесаревича Алексея Романова (табл. 1). В связи с малым количеством ДНК, выделенной из волосков, проводили два раунда ПЦР-амплификации [19]. На первом этапе в мультиплексной ПЦР амплифицировали 3 или 4 фрагмента мтДНК для волос S1 и S2 соответственно. Мультиплексная реакционная смесь объемом 40 мкл включала 20 мкл 2× QIAGEN Multiplex PCR Master Mix («Qiagen») и 2–5 мкл ДНК. В первом раунде проводили 25 циклов амплификации. Затем 1 мкл полученных продуктов мультиплексной ПЦР использовали для второго раунда ПЦР с индивидуальными

Таблица 1. Последовательности праймеров для анализа редких вариантов в последовательности мтДНК цесаревича Алексея

Координаты мтДНК (NC_012920.1)	Аллель цесаревича Алексея [19]	Частота аллеля	Последовательность прямого, обратного праймера	Размер ПЦР-продукта (п.н.)
524	524.1C 524.2A	0,035	attattttcccctcccactcc, tgtctttggggtttggttg	120
4137	T	0,0001	gagttggtcgtagcggaaatcg, tcctaggaacaacatgatgacgca	131
16111	T	0,054*	accatcaacaaccgctatg, agggggtttgatgtgatt	120
16357	C	0,0033	aaacctaccacccttaca, gtcaaggaccctatctg	118

Примечание. * Вариант 16 111T был включён в анализ в связи с крайне низкой частотой встречаемости в европейских популяциях (частота аллеля T – 0,003).

ми парами праймеров для каждого локуса (табл. 1). 30 Циклов амплификации проводили с использованием системы PicoMaxx High Fidelity PCR System («Agilent Technology», США) в объёме 20 мкл. Полученные таким образом ПЦР-фрагменты секвенировали с использованием набора реагентов BigDye Terminator v3.1 («Applied Biosystems», США) на приборе 3730xl DNA Analyzer («Applied Biosystems»). Секвенирование проводили для каждого продукта ПЦР с использованием как прямого, так и обратного праймеров. Два независимых мультиплексных эксперимента были поставлены для ДНК из волоса S1, и 3 повтора были сделаны для ДНК из волоса S2, в каждом эксперименте использовали отрицательные контроли процедур выделения ДНК и амплификации.

Для определения частот встречаемости исследуемых вариантов мтДНК мы использовали базы данных митохондриальных последовательностей EMPOP (<http://empop.online/>) и Mitomap (<http://mitomap.org/MITOMAP>). Отношение правдоподобия (LR) рассчитывали, используя односторонний доверительный интервал, по стандартной формуле $LR = x/y$, где x – вероятность того, что исследуемый и сравниваемый гаплотипы принадлежат к одной и той же материнской линии, а y – вероятность того, что исследуемый образец принадлежит неродственному (или случайно родственному) индивиду из базы данных. В данном случае x всегда принимается за 1, а y – односторонний 95%-ный доверительный интервал [20].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полногеномное секвенирование. Экстракт ДНК S2 использовали для приготовления геномной библиотеки по протоколу, основанному на использовании одноцепочечных фрагментов ДНК [14]. Подготовленная библиотека была просеквенирована на платформе Illumina, в общей сложности было получено 97 млн «сырых» прочтений. Большая часть прочтений, прошедших через процедуру удаления адаптерных последовательностей и фильтрацию по качеству, оказались очень короткими. Только 6 млн прочтений (~6% от исходного набора данных), с длиной фрагментов ДНК более 25 п.н. (табл. 2, рис. 3), были использованы для последующего анализа. Фрагменты, картированные на референсную последовательность мтДНК (rCRS), содержали на концах специфичные для древней ДНК замены $C \rightarrow T$ (рис. 4).

Всего лишь 259 коротких прочтений были картированы на референсную последователь-

ность мтДНК человека, что недостаточно для её полного покрытия и реконструкции. Тем не менее нам удалось провести анализ полученных данных на предмет присутствия в них маркёров мтДНК, которые ранее были выявлены в мтДНК цесаревича Алексея [19]. Мы обнаружили 5 таких маркёрных позиций мтДНК, каждая из которых была покрыта по меньшей мере одним прочтением, содержащим замену, характерную для мтДНК цесаревича Алексея, включая позиции, содержащие редкие генетические варианты (16 111 и 16 357, табл. 3).

Секвенирование по методу Сэнгера. Используя образцы ДНК, выделенные из обоих волос S1 и S2, нам удалось амплифицировать участки мтДНК, содержащие редкие аллельные варианты, присутствующие в ранее опубликованных митохондриальных последовательностях цесаревича Алексея Романова [19]. Ни в одном из отрицательных контролей специфических фрагментов выявлено не было (рис. 5).

В результате секвенирования методом Сэнгера трёх индивидуальных ПЦР-продуктов для образца S1 и четырёх – для образца S2 были реконструированы последовательности соответствующих фрагментов мтДНК. Для обоих волос во всех исследуемых позициях были выявлены генетические варианты, совпадающие с вариантами мтДНК цесаревича Алексея (рис. 6).

Статистический анализ. Расчёт отношения правдоподобия (LR) проводили по методу Holland и Parsons [20] с использованием частот встречаемости гаплотипов мтДНК, реконструированных в результате секвенирования, в базах данных EMPOP и MITOMAP (табл. 4). Результаты оценки правдоподобия показывают, что вероятность того, что исследованные образцы волос принадлежат цесаревичу Алексею или родственникам Александры Фёдоровны Романовой по материнской линии королевы Виктории, чьи мтДНК идентичны, не менее чем в $4,3 \times 10^3$ – $5,3 \times 10^4$ раз (в зависимости от числа индивидов, представленных в базе данных) выше вероятности, что изученные образцы волос принадлежат случайному неродственному индивиду.

Необходимость исследования произведений искусства обусловлена не только их эстетичес-

Таблица 2. Результаты секвенирования библиотеки, приготовленной из ДНК образца S2, на платформе Illumina

Всего прочтений	Прочтений, прошедших фильтрацию	Картировано на геном человека (hg38)	Картировано на мтДНК человека (rCRS)
97 300 168	6 174 682	943 795 (15,28%)	259

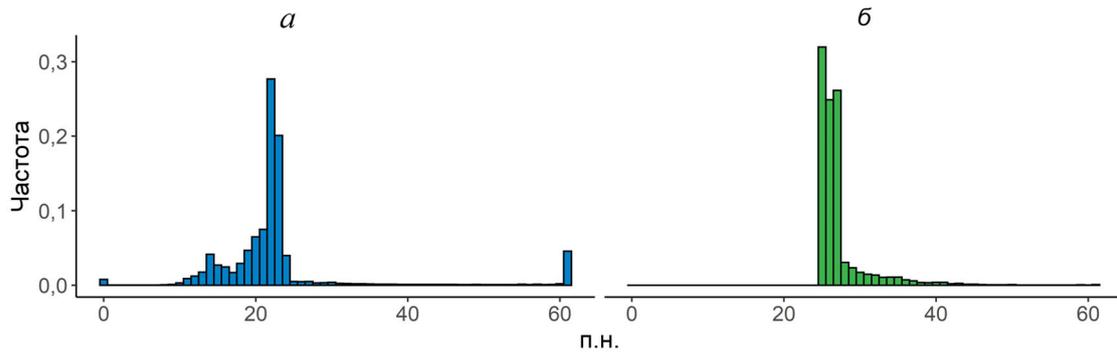


Рис. 3. Распределение длин прочтений после фильтрации по качеству и удаления адаптерных последовательностей программой AdapterRemoval (а) и прочтений, длиной более 25 п.н., картированных на мтДНК человека (б)

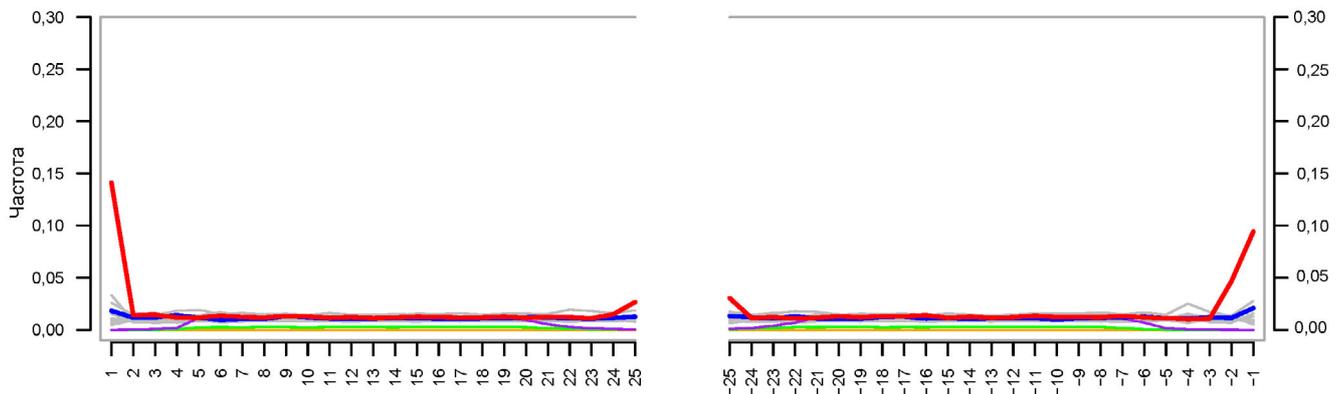


Рис. 4. Профиль нуклеотидных замен, полученный с использованием программы mapDamage2 [18] для прочтений образца S2, картированных на мтДНК человека. По оси X указана нуклеотидная позиция в прочтении. Наблюдается повышение уровня замен С → Т (красный) к концам фрагментов, специфичное для древней ДНК и обусловленное постмортальными модификациями ДНК, что подтверждает подлинность древней ДНК, полученной из стержня волоса

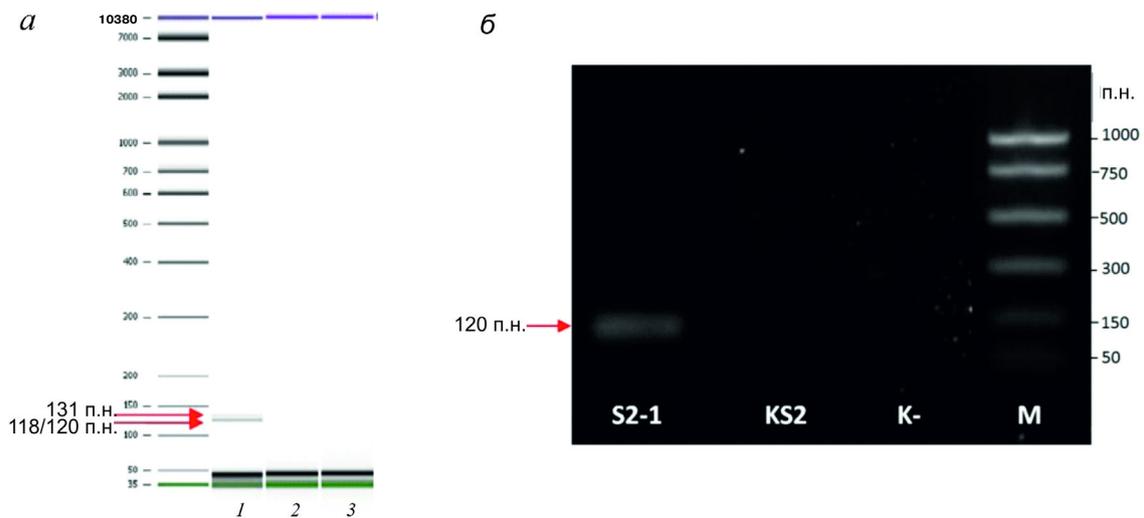


Рис. 5. Ампликоны, полученные в результате мультиплексной ПЦР (а) и вторичной амплификации с индивидуальными парами праймеров для позиции 524 мтДНК (б). 1 – Образец S2; 2 – отрицательный контроль выделения ДНК; 3 – отрицательный контроль мультиплексной ПЦР; KS2 – отрицательный контроль вторичной ПЦР с индивидуальными праймерами, проведённой на отрицательном контроле выделения ДНК; К– – отрицательный контроль ПЦР с индивидуальными праймерами; М – маркёр размера ДНК

Таблица 3. Характерные для материнской линии цесаревича Алексея варианты мтДНК, выявленные при секвенировании образца S2

Позиция мтДНК	Референсный аллель	Аллель, обнаруженный в S2	Число прочтений, содержащих альтернативный аллель	Частота по базе GnomAD
750	A	G	1	0.98
1438	A	G	1	0.96
16111	C	T	4	0.054
16357	T	C	1	0.003
16519	T	C	3	0.66

кой значимостью, но и историческими аспектами их создания и происхождения. В данной работе мы адаптировали и применили методы анализа древней ДНК для проверки подлинности ценного музейного экспоната – пряди волос, смонтированной в акварельный портрет цеса-

евича Алексея Романова – сына последнего российского императора Николая II.

В результате проведённого исследования волос без луковиц из исторического произведения искусства нами был выявлен высокий уровень фрагментации содержащейся в них ДНК (преобладающая длина фрагментов ДНК составляет менее 25 п.н.), что затрудняет проведение генетического анализа [5–8]. Однако мы показали, что несмотря на крайне малое количество высококодированной ДНК, выделенной из единичных исторических старых волос, она всё же может быть успешно использована для генетического анализа как с применением классических методов (ПЦР и секвенирование по Сэнгеру), так и с помощью новых методов масштабного параллельного секвенирования.

Анализ мтДНК показал, что гаплотип, выявленный в образцах волос, совпадает с ранее опубликованным гаплотипом мтДНК цесаревича Алексея, его сестры Марии и их матери – императрицы Александры Фёдоровны [19] (табл. 5). Мы не обнаружили этот гаплотип ни в одной из

Таблица 4. Частоты встречаемости выявленного гаплотипа и отношения правдоподобия (LR) по базам данных EMPOP и MITOMAP

База данных (число последовательностей в базе)	Число совпадений	Оценочная частота гаплотипа [#]	Частота гаплотипа, 95%-ный доверительный интервал	LR	LR, 95%-ный доверительный интервал
EMPOP ¹ (4289)	0	0,00023	0,00070	4,3×10 ³	1,4×10 ³
EMPOP ² (38361)	0	0,00003	0,00008	3,8×10 ⁴	1,3×10 ⁴
MITOMAP ³ (52633)	0 (3*)	0,00002	0,00006	5,3×10 ⁴	1,8×10 ⁴

¹ База EMPOP, полные последовательности мтДНК.

² База EMPOP, контрольный регион мтДНК (16024–576).

³ База MITOMAP, полные последовательности мтДНК.

* Последовательности мтДНК Императрицы Александры Фёдоровны (FJ656214.1), цесаревича Алексея (FJ656216.1) и Великой Княжны Марии (FJ656217.1) были включены ранее в базу MITOMAP [19].

[#] Рассчитана по [20].

Таблица 5. Варианты мтДНК, выявленные в образцах волос, смонтированных в портрет царевича Алексея, и у представителей женской линии королевы Виктории

Позиция мтДНК	Референсный вариант	Прядь волос	Алексей (N146)*	Мария (N147)*	Александра Фёдоровна (N7)*	Родственники королевы Виктории по материнской линии*
524,1	–	C	C	C	C	C
524,2	–	A	A	A	A	A
750	A	G	G	G	G	G
1438	A	G	G	G	G	G
16111	C	T	T	T	T	T
16357	T	C	C	C	C	C
16519	T	C	C	C	C	C

* Данные из [19].

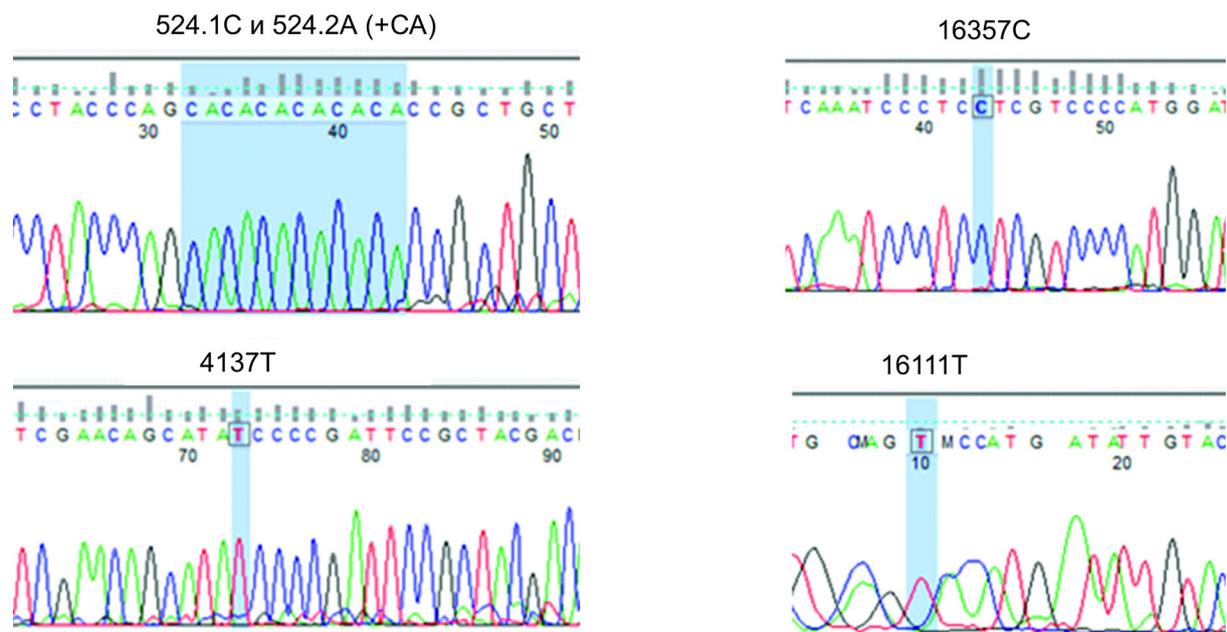


Рис. 6. Электрофореграмма секвенирования методом Сэнгера фрагментов мтДНК волоса S2. Синими рамками отмечены позиции с редкими генетическими вариантами, ранее выявленными в мтДНК цесаревича Алексея

проанализированных баз данных, за исключением гаплотипов у трёх индивидов, опубликованных нами ранее, которые представлены в базе данных MITOMAP, и принадлежащих императрице Александре Фёдоровне (FJ656214.1), цесаревичу Алексею (FJ656216.1) и великой княжне Марии (FJ656217.1) [19]. Таким образом, полученные нами данные показывают принадлежность локона волос, смонтированного в портрет цесаревича Алексея, прямому родственнику королевы Виктории и Александры Фёдоровны Романовой (внучка королевы Виктории и мать царевича Алексея) по женской линии. Это подтверждает гипотезу о происхождении данной реликвии от цесаревича Алексея.

Финансирование. Данная работа была частично поддержана проектом Минобрнауки России, системный номер 075-10-2020-116 (грант № 13.1902.21.0023) (разработка методов геномного секвенирования и анализа древней ДНК).

Благодарности. Авторы выражают благодарность сотрудникам Государственного Исторического Музея Евгению Лукьянову и Алексею Константиновичу Левыкину за предоставление материалов, фотографий портрета и оказанную в ходе проведения исследования поддержку.

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

- Pfeiffer, H., Hühne, J., Ortmann, C., Waterkamp, K., Brinkmann, B. (1999) Mitochondrial DNA typing from human axillary, pubic and head hair shafts – success rates and sequence comparisons, *Int. J. Legal Med.*, **112**, 287-290, doi: 10.1007/s004140050251.
- Graham, E. A. M. (2007) DNA reviews: ancient DNA, *Forensic Sci. Med. Pathol.*, **3**, 221-225.
- Brandhagen, M. D., Loreille, O., and Irwin, J. A. (2018) Fragmented nuclear DNA is the predominant genetic material in human hair shafts, *Genes (Basel)*, **9**, 640, doi: 10.3390/genes9120640.
- Bengtsson, C. F., Olsen, M. E., Brandt, L. Ø., Bertelsen, M. F., Willerslev, E., et al. (2012) DNA from keratinous tissue. Part I: Hair and nail, *Ann. Anat.*, **194**, 17-25, doi: 10.1016/j.aanat.2011.03.013.
- Linch, C. A., Whiting, D. A., and Holland, M. M. (2001) Human Hair histogenesis for the mitochondrial DNA forensic scientist, *J. Forensic Sci.*, **46**, 15056J, doi: 10.1520/jfs15056j.
- Almeida, M., Betancor, E., Fregel, R., Suárez, N. M., and Pestano, J. (2011) Efficient DNA extraction from hair shafts, *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.*, **3**, E319-E320, doi: 10.1016/j.fsigss.2011.09.022.
- Müller, K., Klein, R., Miltner, E., and Wiegand, P. (2007) Improved STR typing of telogen hair root and hair shaft DNA, *Electrophoresis*, **28**, 2835-2842, doi: 10.1002/elps.200600669.

8. Desmyter, S., Bodner, M., Huber, G., Dognaux, S., Berger, C., et al. (2016) Hairy matters: MtDNA quantity and sequence variation along and among human head hairs, *Forensic Sci. Int. Genet.*, **25**, 1-9, doi: 10.1016/j.fsigen.2016.07.012.
9. Budowle, B., Allard, M. W., Wilson, M. R., and Chakraborty, R. (2003) Forensics and mitochondrial DNA: applications, debates, and foundations, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, **4**, 119-141.
10. Allen, M., Engström, A.-S., Meyers, S., Handt, O., Saldeen, T., (1998) Mitochondrial DNA sequencing of shed hairs and saliva on robbery caps: sensitivity and matching probabilities, *J. Forensic Sci.*, **43**, 16169J, doi: 10.1520/jfs16169j.
11. Irwin, J. A., Saunier, J. L., Strouss, K. M., Sturk, K. A., Diegoli, T. M., (2007) Development and expansion of high-quality control region databases to improve forensic mtDNA evidence interpretation, *Forensic Sci. Int. Genet.*, **1**, 154-157, doi: 10.1016/j.fsigen.2007.01.019.
12. Just, R. S., Scheible, M. K., Fast, S. A., Sturk-Andreaggi, K., Röck, A. W., et al. (2015) Full mtGenome reference data: development and characterization of 588 forensic-quality haplotypes representing three U. S. populations, *Forensic Sci. Int. Genet.*, **14**, 141-155, doi: 10.1016/j.fsigen.2014.09.021.
13. McElhoe, J. A., Holland, M. M., Makova, K. D., Su, M. S. W., Paul, I. M., (2014) Development and assessment of an optimized next-generation DNA sequencing approach for the mtgenome using the Illumina MiSeq, *Forensic Sci. Int. Genet.*, **13**, 20-29, doi: 10.1016/j.fsigen.2014.05.007.
14. Gansauge, M.-T., Gerber, T., Glocke, I., Korlevic, P., Lippik, L., (2017) Single-stranded DNA library preparation from highly degraded DNA using T4 DNA ligase, *Nucleic Acids Res.*, **45**, e79, doi: 10.1093/nar/gkx033.
15. Schubert, M., Lindgreen, S., and Orlando, L. (2016) AdapterRemoval v2: rapid adapter trimming, identification, and read merging, *BMC Res. Notes*, **9**, 88, doi: 10.1186/s13104-016-1900-2.
16. Li, H., and Durbin, R. (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform, *Bioinformatics*, **25**, 1754-1760, doi: 10.1093/bioinformatics/btp324.
17. Schubert, M., Ginolhac, A., Lindgreen, S., Thompson, J. F., Al-Rasheid, K. A. S., et al. (2012) Improving ancient DNA read mapping against modern reference genomes, *BMC Genomics*, **13**, 178, doi: 10.1186/1471-2164-13-178.
18. Jónsson, H., Ginolhac, A., Schubert, M., Johnson, P. L. F., and Orlando, L. (2013) mapDamage2.0: fast approximate Bayesian estimates of ancient DNA damage parameters, *Bioinformatics*, **29**, 1682-1684, doi: 10.1093/bioinformatics/btt193.
19. Rogaev, E. I., Grigorenko, A. P., Moliaka, Y. K., Faskhutdinova, G., Goltsov, A., et al. (2009) Genomic identification in the historical case of the Nicholas II royal family, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 5258-5263, doi: 10.1073/pnas.0811190106.
20. Holland, M. M., and Parsons, T. J. (1999) Mitochondrial DNA sequence analysis – validation and use for forensic casework, *Forensic Sci. Rev.*, **11**, 21-50.

GENETIC EVIDENCE OF AUTHENTICITY OF A HAIR SHAFT RELIC FROM THE PORTRAIT OF TSESAREVICH ALEXEI, SON OF THE LAST RUSSIAN EMPEROR

T. V. Andreeva^{1,2}, A. D. Manakhov³, S. S. Kunizheva¹, and E. I. Rogaev^{1,2,3,4*}

¹ *Centre for Genetics and Genetic Technologies, Department of Genetics, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119192 Moscow, Russia; E-mail: rogaev@vigg.ru*

² *Department of Genomics and Human Genetics, Laboratory of Evolutionary Genomics, Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, 119333 Moscow, Russia*

³ *Center for Genetics and Life Science, Sirius University of Science and Technology, 354340 Sochi, Russia*

⁴ *Department of Psychiatry, UMass Chan Medical School, 222 Maple Ave, Reed-Rose-Gordon Building, Shrewsbury, MA 01545, USA*

To determine the value of a piece of art, authenticity of the artwork must be verified. We demonstrate here a genetic approach to determine origin of a historic relic in the museum piece. We tested two hair shafts of unknown origin framed into a watercolor portrait of Tsesarevich Alexei Romanov, son of the last Russian Tzar Nicholas II, which is a unique item kept in the State Historical Museum. Genetic identification of the hair shafts was performed by analysis of mitochondrial DNA (mtDNA) markers using both massive parallel genomic sequencing and multiplex targeted PCR, followed by Sanger sequencing. In previous works, we reconstructed the complete mtDNA sequence inherited to Alexei Romanov through the Queen Victoria lineage [Rogaev et al. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 5258-5263]. DNA extracts were obtained from the two thin hair shafts and used for comparative genetic analysis. Despite the very low quantity and quality of the DNA templates retrieved from the historical single hair shaft specimen, informative mtDNA sequences were determined. The mtDNA haplotype in the hair shafts corresponds to the mtDNA haplotype of Tsarevich Alexei, his sisters, and his mother, Empress Alexandra Feodorovna. This haplotype remains unique in the currently available mtDNA databases. Our results reveal that the hair relic from the portrait is associated with the family of the last Russian Emperor Nicholas II. The study is an example of primary application of the genetic methodology for verification of the value of museum artwork items.

Keywords: ancient DNA, museum item, hair shaft DNA, mtDNA, human identification, NGS

УДК 573

НЕСОСТОЯВШЕЕСЯ ИНТЕРВЬЮ С СИДНЕЕМ БРЕННЕРОМ: ПРЕВРАЩЕНИЕ ДАННЫХ В ЗНАНИЕ, БИОИНФОРМАТИКА, BIG DATA И ... «IS WATER H₂O?»

© 2021 Л.Г. Кондратьева^{1,2*}, М.В. Патрушев¹, Е.Д. Свердлов^{1*}

¹ НИЦ Курчатовский институт, 123182 Москва, Россия;
электронная почта: liakondratyeva@yandex.ru, edsverd@gmail.com

² ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 Москва, Россия

Поступила в редакцию 10.11.2021

После доработки 10.11.2021

Принята к публикации 10.11.2021

Обзор представляет собой попытку объяснить некоторые непростые проблемы, связанные с попытками разобраться в механизмах функционирования организмов, в частности, с использованием коллекций Big Data (больших данных). Форма обзора – воображаемое интервью с одной из наиболее ярких фигур эпохи возникновения молекулярной генетики и биологии, уникальным учёным и философом науки Нобелевским лауреатом Сиднеем Бреннером, открывшим для науки замечательный объект исследования – прозрачного 1000-клеточного червя *Caenorhabditis elegans* и многое другое. Его размышления и выводы относительно неизбежного «конфликта» между быстрорастущими массивами данных (Big Data), получаемых с помощью современных технологий секвенирования, и принципиальными ограничениями («запретами»), возникающими потому, что сложные взаимодействующие системы (организмы) вследствие взаимодействий порождают непредсказуемые «возникающие» свойства, абсолютно актуальны для понимания нерешаемых проблем таких современных тенденций, как «системная биология». Помимо принципиальных ограничений, сами по себе Big Data страдают от серьёзных дефектов, среди которых наиболее явными являются скрытые ошибки и принципиально низкая воспроизводимость. Отдельно следует отметить ещё один, возможно, принципиальный барьер – неполноту данных (количество данных $n \neq \text{all}$). Эту проблему демонстрируют два небольших наиболее изученных организма, *Escherichia coli* (1600 генов, то есть 34,6% из 4623 уникальных генов не имеют экспериментальных доказательств функционирования) и *C. elegans* с белками, идентифицированными примерно для 50% генов. Другой яркий пример – «искусственная» бактерия, JCVI-syn3.0, с минимальным набором генов в геноме. Из её 473 генов биологическая функция не приписана 149 (31,5%). Бреннер указывает, что преобразование данных в знания представляет собой серьёзную проблему для будущих биологических исследований. Для этой цели биологии срочно нужна теоретическая база для её унификации. При этом правильным уровнем исследований он считает клетку и предлагает проект CELLMAP, как системы для организации биологической информации. Как абсолютно честный учёный, он говорит: «Если бы я знал [как это делать], я бы делал это, а не писал о проблеме. Понять, как это делать – остаётся главной проблемой биологических наук».

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: биоинформатика, Big Data, геном, системная биология, интервью, Сидней Бреннер.

DOI: 10.31857/S0320972521120071

ВВЕДЕНИЕ. КРАТКАЯ БИОГРАФИЯ СИДНЕЯ БРЕННЕРА

Сидней Бреннер родился в Южной Африке в 1927 г. Его отец был сапожником, евреем-иммигрантом из Литвы; его мать эмигрировала из Латвии. Сидней научился читать с помощью старых газет, и в возрасте 14 лет отправился в Университет в Йоханнесбурге, чтобы изучать медицину [1]. С самого начала ему удавалось совмещать формальную программу обучения с работой в лаборатории. Он увлёкся методами окрашивания биологической ткани и наблюде-

нием за её детальной структурой под микроскопом. Он мог окрашивать и проводить диссекцию тканей для визуализации хромосом. Сидней узнал о концепциях теории информации и зарождающейся области информатики. В частности, его очень поразила концепция фон Неймана. В период учёбы он был вовлечён в левую политику, читал Ленина и Троцкого и приобрёл острое понимание социального контекста науки. Это увлечение продолжалось до конца жизни.

В 1952 г. Бреннер получил стипендию на факультете физической химии Оксфорда. Весной 1953 г. группа оксфордских исследователей, включая Бреннера, была приглашена в Кембридж, чтобы увидеть модель двойной спирали

* Адресат для корреспонденции.

Джима Уотсона и Френсиса Крика. В 1956 г. Крик пригласил Бреннера в Кембриджский университет в Великобританию. В Кембридже Бреннер провёл значительную часть своей жизни, тесно сотрудничая с Криком. В начале 1960-х гг., работая с бактериями и бактериофагами, Крик и Бреннер интерпретировали многие важные функции генов. С конца 1950-х гг. и до конца 1970-х гг. Бреннер и Крик занимали одну комнату, сохраняя эту привычку, несмотря на серию переездов возникшей Лаборатории молекулярной биологии (ЛМБ). В процессе этих передвижений ЛМБ постепенно приобретала её нынешнюю форму, становясь Лабораторией № 1 в молекулярной биологии.

Со временем Бреннер стал одним из ведущих биологов 20 и 21 веков. Он был блестящим экспериментатором и одним из самых умных и дальновидных учёных за последние 70 лет. Он постоянно искал следующий большой вопрос. Удивительно, но он поднялся на волнах открытия трёх ключевых моментов биологии 20-го века: подъём молекулярной генетики, поворот к пониманию генетических основ развития и разработка проектов генома.

Бреннер теоретически доказал в середине 1950-х гг., что генетический код «не перекрывается» — каждый нуклеотид является частью только одного триплета (три нуклеотида определяют каждую аминокислоту в белке), а последующие «триплетные кодоны» читаются по порядку. В 1961 г. Бреннер и Крик доказали это экспериментально [2].

В том же году Бреннер вместе с Франсуа Жакобом и Мэтью Мезельсоном (все из поколения научных гигантов, которые формулировали гипотезы и умели их обосновывать экспериментально) опубликовали экспериментальное подтверждение существования информационной РНК, которая переносит информацию от ДНК к белкам [3].

Наступила эпоха центральной догмы молекулярной биологии: генетическая информация передаётся от нуклеиновых кислот к белку, но не в обратном направлении. Правило было сформулировано Френсисом Криком в 1957 г. и опубликовано в 1958 г. [4]. В течение следующих двух лет с помощью Крика Бреннер установил, как завершается синтез белков, кодируемых последовательностями ДНК.

Революционный момент в научной карьере Бреннера наступил, когда вместе с Криком он решил, что интересная часть молекулярной биологии позади. (Заметьте, это произошло в период начала расцвета молекулярной биологии и генетики, который эти два индивидуума в значительной степени выковали!) Когда тысячи ис-

следователей со всего мира начали заниматься молекулярной биологией, Крик и Бреннер начали готовиться к следующему этапу: пытаться с использованием нового молекулярного понимания решить серию биологических проблем, каждая из которых будет основываться на использовании конкретного биологического организма. Таким образом, наметился переход на следующий уровень исследований — молекулярные основы функционирования организма. В 1963 г. Сидней Бреннер писал руководителю ЛМБ, Максу Перуцу: «Сейчас широко известно, что почти все “классические” проблемы молекулярной биологии либо решены, либо будут решены в ближайшее десятилетие... Из-за этого я давно чувствовал, что будущее молекулярной биологии лежит в распространении исследований на другие области биологии, особенно на развитие и нервную систему» [5–7].

Они составили список из четырёх видов, каждый из которых позволял исследовать важную биологическую проблему: фаг лямбда (проект L), мышь (проект M), нематода (проект N) и кишечная палочка (проект K). В то же время и по тем же причинам Сеймур Бензер (Seymour Benzer, 1921–2007) решил изучить нейрогенетику дрозофилы, а Крик в конечном итоге обратился к изучению механизмов сознания. Сидней был в авангарде этого шага: его первоначальная цель состояла в том, чтобы использовать стратегии молекулярной генетики, разработанные на прокариотах. Но в отличие от многих его современников, которые остановились на хорошо зарекомендовавших себя модельных системах, таких как *Drosophila*, Сидней отправился на поиски многоклеточного организма, которого можно было бы поддерживать и размножать на чашках с агаром так же эффективно, как это делалось для изучения бактерий и фагов [1].

Принцип Бритвы Оккама гласит: «Не следует привлекать новые сущности без крайней на то необходимости». Бреннер использовал этот принцип, по-видимому, рефлекторно, врождённо.

После нескольких лет изучения различных видов к 1963 г. Бреннер решил изучать прозрачного червя *Caenorhabditis elegans* для решения новой важной проблемы молекулярной биологии (на самом деле, это была не молекулярная биология, а биология организма): генетика и биохимия механизмов контроля клеточного развития [8, 9]. Это была смена парадигм, которая описывалась философом науки Куном [10]. Кун разделял развитие науки на различные периоды: 1) нормальная наука, согласие между учёными, накапливается новое знание; 2) кри-

зисный период, рождаются новые проблемы, которые не находят адекватные решения; 3) период научной революции, когда существующий набор парадигм отбрасывается в пользу других. Появляются новые идеи, новые технологии, которые позволяют отвергнуть отжившие части научной структуры и сделать ещё один шаг к истине. При этом сторонники старой парадигмы оказывают ожесточённое сопротивление апологетам новой. В случае Бреннера — это была счастливая революция без борьбы и сильного сопротивления. Это стало возможным благодаря высокому авторитету, который Бреннер приобрёл благодаря всем своим предыдущим успехам. И, конечно же, благодаря поддержке таких гигантов, как Френсис Крик [11]. Вот оценка самого Бреннера: «Некоторые люди думали, что наш подход слишком “биологический” и уведёт нас от молекулярной биологии, но в любом случае нас попросили сделать официальное предложение, и в октябре 1963 г. соответствующий документ был представлен Совету» [12].

В годы, когда Бреннер работал над проектом нематоды в Кембридже, была особая атмосфера. В любое время дня и ночи там можно было найти Сидней в генетической лаборатории у компьютера или у электронного микроскопа [9].

Не зря Бреннера называли мятежным лидером золотого века молекулярной биологии (Mischievous steward of molecular biology's golden age) [11]. Он всегда старался найти более рациональное объяснение имеющимся фактам. Иногда в шуточной форме. Так и для смены парадигм он нашёл своё (почти) объяснение: «Часто новая волна встречает сильное сопротивление, но, как указывал Макс Планк, она побеждает, потому что оппоненты стареют и умирают. Процесс затем повторяется. Радикалы становятся либералами. Либералы становятся консерваторами, консерваторы реакционерами, и реакционеры исчезают» [13].

Иногда его оценки были слишком резкими. Например, такая история: «Однажды меня представили сэру Сиднею Бреннеру, как человека, занимающегося “биоинформатикой”. Доктор Бреннер от души рассмеялся и сказал: “Биоинформатика? Последнее прибежище негодяев (The last refuge of scoundrels)”. Я указал, что работаю над предсказанием структуры белков, и он ответил: “О, это другое. НАМНОГО ЛУЧШЕ”. Это было большим облегчением для меня» [14]. Наверное, автор ошибся и перепутал scoundrel и SPANDREL. Первое действительно означает негодяй, мерзавец, тогда как второе (НАМНОГО ЛУЧШЕ): это неизбежные и бесполезные пространства в архитектуре сложных сооружений. У Бреннера есть широко известная

глава «Refuge of spandrels» в книге «Loose Ends and False starts» [15], и её заглавие, скорее всего, должно быть переведено как прибежище бесполезных, но неизбежных. Хотя это всё равно несправедливо по отношению к биоинформатике. Но мы обсудим это в воображаемом интервью.

Решение Бреннера исследовать организм повлекло за собой изменение методологической базы, в частности использование электронной микроскопии для идентификации клеток в червях и применение компьютеров для обработки данных. Это изменило подходы к науке. Из истории исследований *C. elegans* под эгидой Бреннера [16] видно, что Бреннер (сам) начал их примерно в 1966 г. Первая статья по генетике и ряду мутантов *C. elegans*, написанная исключительно Бреннером, появилась только в 1974 г. [17]. Восемь лет он работал без единой публикации. Сегодня невозможно представить, чтобы эффективность учёного оценивали не по количеству опубликованных им статей.

Сидней Бреннер сделал *C. elegans* центром внимания биологов [6, 18].

В 1974 г. Сидней и его сотрудник Джон Салстон (John Sulston, 1942–2018 гг. [19]) подсчитали, что геном *C. elegans* примерно в 20 раз больше, чем геном *E. coli*, и начали думать об установлении последовательности этого генома. Работа по секвенированию полного генома, как и вообще все работы по секвенированию полных геномов, были революционизированы появлением методов клонирования ДНК и разработкой Сэнгером и Максамом с Гилбертом методов быстрого секвенирования ДНК. Полная последовательность генома *C. elegans* была опубликована в 1998 г., это была первая полногеномная последовательность многоклеточного организма [20]. Эта 97-мегабазная геномная последовательность содержит более 19 000 генов.

Бреннер понимал, что возможность сравнивать последовательности генома разных организмов открыла бы целую большую область сравнительной геномики, которая привела бы к более глубокому пониманию того, как эволюционные механизмы приводят к видовому разнообразию. Но для секвенирования многих геномов необходимы более быстрые и экономичные методы массового секвенирования, чем те, которые использовались для проектов *C. elegans* и генома человека. И в 1994 г. он предложил технологию для массового параллельного секвенирования, в которой использовались полинуклеотиды, связанные с иммобилизованными микрогранулами (microbeads) [21, 22]. Хотя эта технология не вошла в практику, она стала мощным двигателем в быстроразвивающейся обла-

ти и в конечном итоге вылилась в одну из доминирующих технологией секвенирования фирмы «Illumina».

Здесь хотелось бы упомянуть, что уже в конце 1980-х гг. в Институте молекулярной биологии АН СССР под руководством академика Андрея Мирзабекова активно шли работы по разработке нового метода секвенирования ДНК на микрочипах с использованием близкой идеологии секвенирования, основанного на гибридизации коротких олигонуклеотидов, иммобилизованных на оригинальной российской матрице. Приоритетная российская публикация появилась в печати в журнале «*DNA Sequence*» [23]. Также можно упомянуть, что стратегию быстрого секвенирования ДНК на основе специфического химического расщепления, которая длительно использовалась в методе Максама–Гилберта, была предложена нами в 70-х гг. [24–26].

В области сравнительной геномики Бреннер предложил использовать геном рыбы фугу, *Fugu rubripes*, который содержал в 8 раз меньше ДНК, чем у человека, при примерно таком же количестве генов [27]. Полная последовательность была опубликована в 2002 г. [28].

Бреннер также принимал активное участие в организации науки и формировании направлений её практического применения. В 1975 г. вместе с Полом Бергом и другими он организовал знаменитую встречу в Асиломаре, Калифорния, нацеленную на формирование способов использования новых технологий геномной инженерии. Его популярные колонки в *Current Biology* (названные «Свободные концы», а затем «Ложные начала», *Loose Ends and False Starts*, собранные в книгу [29]) в середине 1990-х гг. пользовались большим успехом в научной среде.

Почти 10 лет он был директором известной Лаборатории молекулярной биологии. В 1986 г. он перешёл в новый отдел молекулярной генетики Совета медицинских исследований (MRC), где начал исследования в области эволюционной геномики. В начале 1990-х гг. Бреннер также координировал участие Великобритании в зарождающемся проекте «Геном человека».

В последний период своей жизни Бреннер путешествовал по миру. В этот период он был впечатлён динамизмом Сингапура, где он помог создать центр биомедицинских исследований «Биополис» и стал важной фигурой в Агентстве по науке, технологиям и исследованиям. Он также помог реструктурировать молекулярную биологию в Японии. Именно в Сингапуре он провёл свои последние годы, не имея возможности путешествовать по состоянию здоровья.

Даже на этом этапе он каждое утро ходил в лабораторию, обсуждал последние результаты своих молодых коллег, вносил предложения по их экспериментам и работал над своим последним неопубликованным проектом: понимание структуры генома.

Бреннер породил поколение выдающихся учёных, в том числе 5 лауреатов Нобелевской премии. В значительной степени молекулярная биология перешла на новый уровень... [11, 30].

Что очень важно, в отличие от громадного большинства современников Сидней не попал в ловушку мнения большинства и заглядывал в будущее человечества: «Я думаю, что наиболее важные успехи будут достигнуты в понимании биологии наиболее интересного вида — *Homo sapiens*. Я думаю, что благодаря этому пониманию мы сможем оценить различия между развитыми и разработанными сложными системами. Это если мы вообще выживем... Конечно, даже если произойдёт крупная катастрофа, некоторые из нас выживут. Тогда природа возьмёт верх, и биологическая эволюция начнётся снова, поскольку культурная эволюция потерпит неудачу. Я с уверенностью предсказываю, что будет выбор в пользу маленьких людей с телом, достаточным для поддержки необходимого количества умственных способностей. ...Наши преемники будут поражены количеством обсуждаемого сегодня научного мусора, если у них хватит терпения пролистать электронные архивы устаревших журналов» [31].

Сегодня предсказания Бреннера вот-вот осуществляются. Мы на грани катастрофы [32]: климатической, биосферной и демографической. Учёные бьют тревогу. Правительства практически бездействуют. Народ веселится. Титаник тонет, а оркестр играет бодрые песни.

НЕСОСТОЯВШЕЕСЯ ИНТЕРВЬЮ С СИДНЕЕМ БРЕННЕРОМ

*A big computer, a complex algorithm,
and a long time does not equal science.*

Robert Gentleman

Поиск истины в условиях предвзятости публикаций

Евгений Свердлов (Е.С.). Существует обычный (и сильный) bias (предвзятость) в публикациях. Др. Бреннер, я в последние годы очень интересуюсь проблемами, связанными с потенциалом науки в расшифровке механизмов функционирования сложных живых систем. Понятно, что большие надежды в этой расшифровке возлагают на компьютерные технологии и, в част-

ности, на биоинформатику. Мы живём в период всеобщих восторгов по поводу биоинформатики (определение см. в Частях 1 и 2 Приложения), и существует обычный (и сильный) bias в публикациях (см. Часть 3 Приложения), который, в частности, выражается в предвзятости ревьюеров и редакторов журналов, которые предпочитают публиковать позитивные оценки теорий, вписывающихся в рамки существующих парадигм, и отвергают всё, что в них не вписывается.

Сидней Бреннер (С.Б., перебивает). Сегодня Бог никогда не получит грант на исследования. Да, я об этом много писал и говорил в своих выступлениях [29]: манускрипты, поданные на публикацию, теперь подвергаются микроскопическому исследованию, но, к сожалению, не их научное содержание. То, что ищется, это с кем ты пишешь статьи, и где они опубликованы. Сегодня Бог никогда не получит грант на исследования. Один член редколлегии будет отрицать это на том основании, что работа была сделана очень давно; второй подтвердит это, отмечая, что это никогда не было воспроизведено. Отказ будет подхвачен третьим членом, указавшим, кроме всего прочего, что работа была опубликована в нерецензируемом журнале.

Прежде чем развивать псевдонауку анализа цитирования, мы должны напоминать себе, что самым главным является научное содержание статьи, и ничто не заменит её знание или чтение. Мы должны также признать, что цитирование часто даёт нам больше информации о социологии науки, чем о самой науке. В быстро развивающихся областях продолжительность жизни средней статьи очень мала, возможно, всего несколько месяцев, прежде чем она полностью исчезает, и о ней больше никогда не будет упоминаний. Мне говорили, что по физике только несколько статей с возрастом более 25 лет все ещё цитируются. Это должно быть очень приятно иметь работу в этом классе, но ещё лучше быть автором работы, которая так хорошо известна, что не требует литературного цитирования. Если при написании теперь процитируют Уотсона и Крика (1953 г.), то это, вероятно, будет рассматриваться как шутка [29].

Самое тревожное развитие состоит в том, что рейтинг цитирования, кажется, принят очень серьёзно. Все мы знаем, что наиболее цитируемые статьи — это те, которые содержат широко используемый рецепт или метод [29].

Е.С. Миражи цитируемости. Др. Бреннер, на минуточку вклинюсь. Я хорошо понимаю Ваше возмущение. В 2006 г. я написал на эту тему статью: «Миражи цитируемости. Библиометрическая оценка значимости научных публикаций отдельных исследователей» [33]. В этой статье,

которую, кстати, высоко оценил «отец библиометрии» Евгений Гарфилд, я высказал мнение, что любые библиометрические данные, в том числе цитируемость отдельных статей в качестве независимой меры оценки научной значимости работ учёного, не могут служить критерием эффективности исследований или ценности публикаций. Потом я много раз возвращался к этой проблеме, но тщетно.

С.Б. Не все согласились бы с критериями выбора [статей для публикации]. Авторы бесит бесцеремонность, с которой редакторы и рецензенты относятся к их великим произведениям; редакторы жалуются на огромное количество скучных и повторяющихся манускриптов, которые они получают; и рецензенты жалуются на мусор, на чтение которого им приходится тратить своё драгоценное время. Когда понимаешь, что довольно часто это одни и те же люди, тогда очевидно, что у нас серьёзная проблема.

Все в биологии знают, что необходимо разделить то, что считается важными новостями, и то, что является достойным (но не слишком новым или значительным) дополнением к архиву. Некоторые журналы считают, что это их право и обязанность решать, что доносить до своих аудиторий, оставив большую часть исследований для «более технических журналов». Из-за этой общепризнанной политики журналы имеют высокую видимость, подкреплённую желанием каждого появиться на их страницах. Хотя многие согласны с такой политикой, не все — и особенно те, кто не избран, — согласились бы с критериями выбора.

Это таит в себе опасность того, что все избранные образуют клубы, а те, кто отброшены, сформируют свой клуб, из которого, конечно, они смогут исключить других. Это легко повторить, поэтому количество журналов будет продолжать расти, пока существуют группы, которые чувствует себя исключёнными. Опубликовать свои работы в нужных журналах стало почти так же сложно, как и выполнить само исследование.

Основная проблема, с которой мы сталкиваемся, — что делать с бесконечно растущим архивом полученных научных результатов в массивных томах журналов. Читать статью становится испытанием на физическую силу.

Один из моих самых циничных друзей сказал, что единственный способ быть абсолютно справедливым в принятии решений по заявкам на гранты, — это создать экспертную комиссию, которая совершенно невежественна и не заинтересована, таким образом, гарантируя, что любые предубеждения, которые могут возникнуть из знания предмета, полностью исключены.

Е.С. Есть возможность прибегнуть к помощи блогов. Они показывают резкое изменение отношения к биоинформатике в 2010 г. Спасибо, Доктор Бреннер. Я, с Вашего позволения, продолжу относительно предубеждённости редакторов и рецензентов. В последнее время появилась возможность прибегнуть к помощи блогов, где учёные могут позволить себе высказать своё мнение без опасения быть неопубликованным. Эта идея проникла в научное сообщество (см., например [34, 35]).

Ведение блогов стало широко распространённым социальным явлением. В настоящее время блоги признаны средством беспрецедентной силы для распространения информации. Научное сообщество подхватило эти методы, и в настоящее время существует более 1200 блогов, посвящённых учёным и их беседам [34].

Издатели начали ценить потенциал блогов по более интерактивному взаимодействию со своими читателями, по продвижению обсуждения содержания своих журналов. У многих крупных журналов теперь есть собственные блоги [34]. Я тоже попытался воспользоваться этой возможностью и посмотрел блог Дерекка (Derek Lowe – a science writer), дающий оценки биоинформатике в разные годы.

18 июня 2010 г. в его блоге [36] перед читателями был поставлен вопрос: «Что биоинформатика когда-либо сделала для нас (What Has Bioinformatics Ever Done For Us)?» Приведу несколько типичных ответов на этот вопрос.

1) Биоинформатика является основой современной биологии – представьте, насколько бесполезной была бы любая последовательность ДНК (особенно целая) без инструментов для их исследования. ... Находка, что «бактерии» распались на две древние расходящиеся клады (Eubacteria и Archea), произошла исключительно на основе сравнения последовательностей. И открытие того, что Archea действительно больше похожа на эукариот в большинстве своих механизмов ... произошло исключительно благодаря просмотру последовательностей.

2) Очевидный ответ – это BLAST и последующие выводы о сходстве последовательностей.

3) Ни один из противовирусных препаратов, одобренных за последнее десятилетие, не появился бы на рынке без биоинформатики для анализа данных о мутациях резистентности.

В целом практически все ответы весьма позитивно оценивают биоинформатику.

В 2013 г. Дерек опубликовал скетч «Farewell to Bioinformatics» [37], где он привёл высказывание одного из авторов и комментировал его: «Вот разгневанный взгляд, который я не обяза-

тельно поддерживаю, но я также не могу сказать, что он полностью ошибочен».

Этот автор написал: «Биоинформатика – это попытка сделать молекулярную биологию актуальной. Все молекулярные биологи, лишённые навыков, превышающих навыки лаборанта, зывали к математикам и программистам, чтобы они волшебным образом извлекли науку из их горы дерьмовых результатов».

И вот программисты спустились и построили гигантские базы данных, в которых можно было быстро искать огромное количество дерьмовых результатов. Они написали алгоритмы, чтобы систематизировать дерьмовые результаты в виде деревьев и построить из них красивые графики, а молекулярные биологи старательно избегали сообщать программистам фактическое качество результатов. Когда для всех участников стало очевидно, что какой-то массив результатов, например данные, полученные с помощью микрочипов, бесполезен, последовала волна разговоров о том, что “эти данные не совсем количественные, но мы можем сделать качественные выводы”, после чего последовал поспешный переход на новую технику, бесполезность которой ещё не была доказана.

И базы данных росли, и все аннотировали свои данные путём поиска в базах данных, а затем отправляли их обратно в базы данных. Кажется, никто не указал, что это делает вашу базу данных отражением вашей базы данных, а не реальности. Вытащите какую-нибудь аннотацию из GenBank сегодня, и не так уж маловероятно, что она полностью неверна».

Далее следовали более 60 комментариев в целом согласных с этой точкой зрения.

Что же изменилось с 2010 г.? Рисунок показывает скорость роста сиквенсовой информации по годам, и можно видеть, что 2010 г. в какой-то степени переломный: примерно с этого времени начинается взрывной рост информации о последовательностях нуклеиновых кислот и белков. Это связано с новыми технологиями секвенирования (next-generation sequencing, NGS) [38, 39]. Общее количество данных о последовательностях удваивается примерно каждые 7 месяцев. Необработанные показания секвенирования, используемые в большинстве опубликованных исследований, архивируются либо в Архиве данных секвенирования (Sequence Read Archive, SRA), который поддерживается Национальным центром биотехнологической информации Национального института здравоохранения США (NIH/NCBI), либо в одном из его международных партнёров. В настоящее время SRA содержит более 3,6 петабайт (ПБ) данных и, по прогнозам, вырастет до 43 ПБ к 2023 г. В частности,

там есть последовательности геномов растений и животных и ~250 000 индивидуальных геномов человека, которые секвенированы или находятся в стадии разработки. Объём хранилища становится всё дороже в обслуживании, а данные труднее масштабировать. В настоящее время мировая производственная мощность по секвенированию, вероятно, превышает 35 петабаз (petabases) в год [40]. Если рост продолжится с теми же темпами, то к 2025 г. эта цифра приблизится к одной зеттабазе (zettabase) последовательностей в год. В общей сложности к 2025 г. будет расшифровано не менее 2,5 млн последовательностей геномов растений и животных. Таким образом, проблемы перед вычислительными мощностями невероятно возрастут (Computational challenges will thus incredibly increase [40]).

21 октября 2016 г. всё тот же Дерек опубликовал блог: «Ограничения Big Data» [42].

Из введения Дерек: «Данные помогут вам только постольку, поскольку они ведут к большему пониманию. Усилия по работе с Big Data помогут, но они не сразу откроют руководство к действию».

Эта статья в блоге привлекла 40 комментариев, некоторые из которых заслуживают внимания, потому что исследователи, написавшие комментарии, работают с биологическими и биомедицинскими базами данных, содержащими соответствующие Big Data. Ниже я привожу несколько типичных комментариев.

1) Большие данные = большой шум, слабый сигнал. «Получение большого количества неверных данных не помогает».

2) Со всеми деньгами, временем, презентациями, публикациями и общей суетой, затраченными для секвенирования ДНК больших раков, узнали ли мы что-нибудь действенное? И можно утверждать, что мы никогда не узнаем, потому что рак по определению имеет сотни зависимых мутаций. ...Big Data, небольшие данные, любые данные – все это бесполезно, если вы не измеряете что-то реальное и повторяемое.

3) Какой смысл подгонять всё больше и больше переменных ко всё большему количеству данных, чтобы проверить всё больше и больше потенциальных корреляций, когда половина данных всё равно не может быть воспроизведена? (Е.С. см. мою статью [43].)

4) Раньше я работал с большими данными и обнаружил, что это в основном GIGO (Garbage In, Garbage Out, мусор на входе, мусор на выходе). Хуже того, «мусор» – это, по сути, шум, который заглушает любые полезные данные.

Sic transit gloria mundi. Биоинформатика вступила в сферу Big Data. И это оказалось выше уровня её компетенции.

Е.С. «Big Data» и проблема полноты данных. n (количество данных) = all (все)? Др. Бреннер, я читал, что однажды Вы сказали, что хотели бы построить Грифона [14], мифологическое существо с головой, крыльями и когтями орла и те-



Рост общемировой производительности секвенирования ДНК. Значения после 2020 г. (пунктирные линии) представляют собой прогноз по трём различным сценариям (изменено из [40, 41])

лом льва, поскольку, только построив такой организм, Вы могли бы утверждать, что понимаете до малейших деталей, как работает развитие организма. Вы и искали в конце 1960-х гг. подходящий организм для изучения развития, содержащий относительно мало клеток, так чтобы можно было получить исчерпывающие данные: $n = all$. И нашли *C. elegans*. Меньше 1000 клеток. Но позже, если позволите, я вернусь к этой проблеме, потому что, как я понимаю, даже в этом случае полноты данных достичь не удалось.

Что касается «Big Data», то, несмотря на широкое использование термина, согласованного или единого определения «больших данных» не было и нет. И здесь в полный рост возникает проблема полноты данных, т.е. насколько n (количество данных) = all (все)? Многие авторы обсуждали двусмысленность, связанную с термином «Big Data». В глобальном интернет-словаре IGI можно найти 217 его определений [44]. Среди них 16 содержат утверждения, что эти данные превышают возможности обычно используемого оборудования и программного обеспечения. Более того, иногда авторы прямо указывают, что данные становятся большими данными, когда их объём, разнообразие и скорость превышают возможности архитектуры и алгоритма нашей системы (см., например [45, 46]). Некоторые авторы считают, что можно определить Big Data, как полную коллекцию данных, которая содержит все данные, существующие в исследуемой области, и может быть описана просто как $n = all$. Полнота является важным аспектом крупномасштабных биологических исследований [47].

Однако, кажется, сложно (если возможно) даже дать определение полноты. Достижение $n = all$ для многих биологических данных может быть недостижимой или нереальной целью. Вопрос в том, есть ли момент, когда сбор данных «достаточно хорош», даже если он не является исчерпывающим.

В общем, доступные знания обычно фрагментарны, разрознены и разбросаны по многочисленным базам данных и бесчисленным информативным статьям. Не менее важно преобразовать полученные знания в полезную информацию. Однако реализовать это по-прежнему сложно [34]. Big Data не могут установить причинно-следственную связь [47].

В заключение: пока информация полная и стоит задача её систематизировать, биоинформатика находится на своём уровне компетенции. Но она не может дать положительный достоверный результат при анализе неполных или ошибочных или неполных и ошибочных данных. Произошёл классический переход от коли-

чества к качеству. Но крайне редко можно найти критическую статью, призывающую к точной оценке творческого потенциала биоинформатики больших данных.

Обычно там, где новые технологии обещают «большие успехи», как и в случае с большими данными, серьезные проблемы остаются или возникают [48]. Настоящая полезность больших данных может заключаться в их сочетании с классическими методами, основанными на гипотезах. При использовании обоих может повыситься клиническая эффективность и уменьшиться эффект «Garbage in» и, как следствие, «Garbage out», Gigo.

С.Б. Попытки получить концептуальные знания из огромных коллекций Big Data. Компьютеры могут извлекать биологическое значение непосредственно из последовательностей ДНК?

Биоинформатика имеет своё место. Её основная деятельность была полезной в том, что большие массивы данных теперь можно легко использовать для исследований. Однако идея о том, что данные последовательности могут добавить дополнительную информацию к той, которую дадут нам знания о функциях, неуместна. Для этого мы должны сделать больше, чем перегруппировать то, что известно; и нужна теория, которую мы можем проверить. Предмет, который будет развиваться, следует назвать «Теоретической Биологией», но так как это название имеет плохую репутацию, мы назовём это «Компьютационной биологией». Последовательность станет инструментом исследования, как от неё ожидали, а не самоцелью. Вероятно, что проекты генома для *C. elegans* и *Drosophila* окажут такое же влияние на эти области исследований в основном из-за большого числа исследователей, которые могут немедленно использовать этот продукт [29].

С геномами позвоночных мы обнаруживаем, что на первый план выходит новая идея. Грубо говоря, сторонники этого явления пришли к выводу, что компьютеры могут извлекать биологическое значение непосредственно из последовательностей ДНК. Этот подход породил два новых направления деятельности. Одно — биоинформатика, которая просто претенциозно пытается произвести впечатление, что имеет большее значение или заслуги, чем имеет на самом деле; другое — функциональная геномика — нелепа. Последнее использует первое, чтобы попытаться найти функцию из последовательности генов. Я не думаю, что есть какие-нибудь факультеты университета, посвящённые этим предметам, но, безусловно, растёт число компаний, занятых одной или двумя этими проблемами [29].

Я начал свою Нобелевскую лекцию первыми словами из моей статьи по нематоде в 1974 г. «The genetics of *Caenorhabditis elegans*» [17]: «Как гены могут определять сложные структуры, обнаруженные у высших организмов, — главная нерешённая проблема биологии».

Выступая в 2008 г. на симпозиуме в Индии, я сказал [49]: «Существует кризис во всех науках в наши дни. Мы тонем в море данных, и всё-таки мы томимся от жажды. Сегодня наука вознаграждает только тех, кто коллекционирует и распределяет данные... Данные являются замечательными мышления».

«Самое время остановиться и спросить самих себя: что мы ожидаем найти в конце этой громадной головоломки омиков» (omic brainbow) [50].

С.Б. Превращение данных в знание — большая проблема. «Превращение данных в знание представляет собой большую проблему для будущих биологических исследований. Новая наука, системная биология, заявляет, что она способна решить эту проблему, но я утверждаю, что этот подход потерпит неудачу» [51].

Идея, если её можно так назвать, состоит в том, чтобы взять миллионы точек данных и пропустить их через некую компьютерную программу, и посмотреть, какие ассоциации могут быть обнаружены. Некоторые даже намекнули на анализ данных Фурье, но, что наиболее несправедливо, один из миссионеров новой области заявил, что это освободит нас от «оков биологических исследований, в которых доминируют гипотезы». Проще говоря, вам не нужно больше думать, чтобы проводить исследования. Неужели мы действительно собираемся вступить в фазу упадка биологии, в которой учёные не смогут увидеть, в чём заключаются проблемы, или, если они это сделают, не смогут сформулировать вопросы, на которые можно было бы ответить либо путём наблюдения и измерения, либо путём вмешательства и эксперимента [29]?

Биология отличается от физики тем, что организмы появились путём естественного отбора, а не как решения математических уравнений. Много лет назад я слышал, как великий теоретический физик, Юджин Вигнер, выступал с докладом про нефизические или «чудесные» свойства биологической системы. Он утверждал, что невозможно получить достаточное количество уравнений для определения квантовых состояний и что что-то ещё должно было быть вовлечённым — возможно, сознание.

Я указал, что если я возьму профессора Вигнера и разложу его на ансамбль элементарных частиц, шансы на то, что они снова соберутся в одного и того же профессора Вигнера с акцентом, будут равны нулю и действительно требуют чуда.

Но профессор Вигнер и другие биологические организмы не производятся путём конденсации в пакете элементарных частиц, а «формируются» некоторыми очень особенными процессами, которые, конечно, происходят в соответствии с законами физики, но не могут быть напрямую выведены из них.

Проблема с физикой состоит в том, что её самые глубокие заявления совершенно непонятны почти всем, кроме самых глубоких физиков, и, хотя заявления вполне могут быть абсолютно правдивыми, все они довольно бесполезны, если моя цель — понять *E. coli*.

Бесполезно сожалеть о кончине золотого века молекулярной генетики, когда многое было достигнуто путём объединения мысли с несколькими хорошо подобранными экспериментами с простыми вирусными и бактериальными системами. Также бесполезно осуждать нынешний подход биологии «низкие затраты, высокая производительность, отсутствие результатов», который доминирует на страницах наших остро конкурирующих научных журналов. Мы должны с распростёртыми объятиями приветствовать всё, что могут предложить нам современные технологии, но мы должны научиться использовать их по-новому. Биологии срочно нужна теоретическая база для её унификации, и только теория позволит нам преобразовать данные в знания [51].

С.Б. Геном должен лежать в основе любой теории, которую мы строим. Но нет простого способа картировать организм на его геном. «Геном должен лежать в основе любой теории, которую мы строим, но так как преобразование информации в геноме в конечный живой организм включает в себя множество сложных процессов, опосредованных молекулами, запрограммированными в геноме, всё это нужно будет изучить довольно подробно, прежде чем мы сможем читать и понимать геномы. Нет простого способа “картировать” организмы на их геномы, если они достигли определённого уровня сложности. Таким образом, хотя последовательность геномов является центральной, она представляет собой уровень абстракции, который является слишком загадочным, чтобы использоваться как таковой для организации данных и построения теоретических моделей. Предложения основывать всё на последовательности генома, аннотируя его дополнительными данными (Прямая задача. — *E.C.*), будут приводить только к увеличению его непонятности» [51].

Е.С. Сложные системы. Возникающие в сложных системах свойства непредсказуемы. Is water H₂O? В этой связи я хотел бы ещё раз подчеркнуть то, что уже давно присутствует в нашей бе-

седе, но не получило чёткого определения. Это то, что называется «сложной системой». Сложная система — многокомпонентная система, состоящая из взаимодействующих субъединиц, результатом взаимодействия которых являются так называемые возникающие (emergent) свойства, присущие целой системе и не предсказуемые на основании свойств исходных субъединиц.

В своё время я нашёл в Интернете замечательный и наглядный пример сложной системы. Заметка называлась: «Is water H₂O?» Ответ на заданный в заголовке вопрос кажется очевидным: «Конечно». На самом деле H₂O — это только структура молекул, из которых состоит вода. Но формула мало говорит нам о свойствах воды, например таких, как температура кипения и замерзания, поверхностное натяжение, свойства льда и др. Это очень простой и поучительный пример. Он полностью относится к биологии. Из структур молекул их функции прямо не следуют. В результате взаимодействий молекул в веществе, образуемом ими, появляются новые непредсказуемые свойства — возникающие свойства, по-английски — emergent properties. Три взаимодействующих атома — это уже достаточно сложная система, чтобы стать непредсказуемой для нас. А представьте себе мозг!

Любая живая система или даже её отдельный модуль — это система сложная. Такие системы характеризуются большим числом гетерогенных компонентов, будь то гены, белки или клетки. Эти компоненты взаимодействуют мириадами способов во временном (от микросекунд до лет) и пространственном (от нанометров до метров) режимах. Полное понимание этих систем требует, чтобы большая часть этих взаимодействий была экспериментально или компьютерно изучена. Это очень трудно [52].

Такие разные области, как нейробиология и биология рака, не поддаются лёгким предсказаниям относительно неминуемых практических приложений. Улучшенные технологии наблюдения и тестирования биологических систем привели только к дальнейшим уровням сложности, с которой нужно работать... Мы очень далеки от понимания клеточной биологии, геномов или мозгов и от превращения этого понимания в практически полезное знание [53]!

С.Б. Френсис Крик в раю. Сам Бог не знает, как работают сложные системы. Я делил офис с Френсисом Криком 20 лет в Кембридже. Одно время его интересовала эмбриология, и он потратил много времени, думая о имагинальных дисках дрозофилы. Однажды он бросил книгу, которую он читал, на свой стол с раздражённым криком: «Бог знает, как эти воображаемые дис-

ки работают». В мгновение ока я увидел историю о прибытии Френсиса на небеса, и апостол Пётр приветствует его словами: «О, Доктор Крик, вы, должно быть, устали после долгого путешествия. Садитесь, есть выпить, и расслабьтесь». «Нет», — говорит Френсис: «Я должен увидеть этого парня, Бога. Я должен задать ему вопрос». После некоторых уговоров ангел соглашается привести Френсиса к Богу. Они пересекают среднюю часть неба и подходят к сараю с крышей из гофрированного железа. А в задней части сидит человек в комбинезоне с большим гаечным ключом в заднем кармане. «Бог», — говорит ангел: «Это доктор Крик; Доктор Крик, — это Бог». «Я очень рад познакомиться с вами», — говорит Френсис: «Я должен задать Вам один вопрос. Как имагинальные диски работают?» «Хорошо», — отвечает Бог: «Мы взяли немного этого материала, и мы добавили к нему кое-что и..., на самом деле, мы не знаем, но я могу сказать вам, что мы строили эту муху, которая летает здесь в течение 200 млн лет, и жалоб нам не поступало» [54].... Бог никогда не патентовал эволюцию. Он держал это, как производственный секрет [54].

С.Б. Биологические науки должны уделять внимание деталям. Биологические науки должны уделять внимание деталям, потому что живые организмы являются продуктами эволюционировавших геномов и не могут быть представлены в виде решений дифференциальных уравнений. Будет важно найти *все* факторы транскрипции и *все* последовательности, с которыми они связываются, и мы не должны рассматривать первый случай как революционную новость, а последующие случаи — как повторяющиеся [54].

Хорошие теории молекулярных или клеточных сетей потребуют знания *всех* взаимодействий [54].

Е.С. Даже наиболее изученные простые живые организмы далеки от $n = all$. Это относится также к широко обсуждаемым сейчас так называемым ген-регуляторным сетям (ГРС, см. последние обзоры [55–57]). ГРС представляет собой систему молекулярных взаимодействий, в которой внутренние сигналы (например, в процессе эмбрионального развития) или сигналы из окружающей среды преобразуются в дифференциальную экспрессию генов, иными словами, в экспрессию, различающуюся для разных клеток или для одних и тех же клеток, но в разное время. Регуляция транскрипции опосредована комбинаторными взаимодействиями между *цис*-регуляторными элементами ДНК и *транс*-действующими факторами транскрипции и является, по-видимому, самым важным механиз-

мом контроля экспрессии генов. Необходимость полноты данных для создания ГРС обуславливал ещё один из пионеров этого подхода, Эрик Дэвидсон [58].

Но даже в самых простых системах мы не можем достичь этой полноты.

Первая геномная последовательность *E. coli* была определена более 20 лет назад. Однако молекулярные и физиологические функции для 1600 (около 35%) из 4623 генов остаются неизвестными [59].

Более того, у Вашей любимой и наиболее изученной *C. elegans* 23% генов, кодирующих белки, остаются функционально неясными [47].

И ещё хуже: недавно Вентер и его коллеги синтезировали геном *Mycoplasma genitalium*, названный JCVI-syn3.0. Из 473 генов в сокращённом наборе 149 генам (31,5%) никакая конкретная биологическая функция не может быть приписана. Вопрос в том, что делают эти гены и почему они необходимы. Это «известные неизвестные» [60, 61].

Поистине, мир легче создать, чем понять. По-видимому, n никогда не будет = all.

С.Б. Сложность биологических систем возникает в эволюции в результате приобретений и модификаций. Нам нужно поместить всё в эволюционные рамки просто потому, что сложность биологических систем возникает в результате приобретений и модификаций, а не в результате повторного изобретения. Свойства многих компонентов в наших клетках, будь то мРНК или белки, будут обусловлены не только процессами отбора на определённые активности и уровни, потому что они дают позитивный эффект, но также и теми, которые не вызывают негативных последствий для организма и могут принимать любое значение. Это условие «безразличия» почти наверняка будет присутствовать, потому что это дешёвое решение проблемы регулирования сложных систем. Таким образом, 20% или двукратное увеличение, или даже само присутствие белка может быть очень значительным или совершенно не относящимся к делу в зависимости от того, соответствует ли он условию «безразличия». Только эксперимент может решить, что происходило [62, 63].

В 1990 г. я заметил, что биохимия и коммунизм, казалось, исчезли в этом году (оригинальные высказывания Сиднея Бреннера на английском языке приведены в Части 4 Приложения). Большинство людей думали, что я это сказал с ликованием, но, на самом деле, — с сожалением, по крайней мере для биохимии. Есть ещё одна тема, которая исчезла несколько десятилетий назад, которую нам тоже нужно изобретать заново — физиология. Классическая физиология

интересовалась функциями организмов. Я часто слышу, как говорят, что то, что нам сейчас нужно — это интегративная (системная) биология; что у нас очень хорошо получается выяснить, как работают простые системы с небольшим количеством компонентов, но мы очень плохо складываем детали многокомпонентных систем вместе. Что касается последнего, я считаю, что нам понадобятся две вещи. В конце концов, клетка выполняет интеграцию функций всех своих компонентов, так что клетки могли бы выявить, что такое интегрированное поведение.

Итак, первое требование будет разработать теоретическую модель (framework), в которую можно встроить все подробные знания, которые мы накопили, чтобы позволить нам вычислять результаты сложных взаимодействий и начать понимать динамику системы. Во-вторых, возможность проводить параллельные измерения поведения многих компонентов во время выполнения клеткой интегрированного действия с целью проверки, верна ли теория. Есть ли другие подходы? Если бы я знал это, я бы делал это, а не писал о проблеме [29].

На самом деле, оргия добычи фактов, в которой все в настоящее время участвуют, накопила огромный долг. Это долг создания теории, и некоторые из нас скоро будут иметь захватывающее время, оплачивая его обратно — надеюсь, с интересом.

С.Б. Правильный уровень абстракции — это клетка. CELLMAP. Правильный уровень абстракции — это клетка. Клетка является фундаментальной единицей структуры, функции и организации живых систем. Это ключевая особенность того, что я назвал CELLMAP и что является основой для биологической информационной системы, которая позволит нам не только обрабатывать огромное количество данных, но и генерировать и проверять гипотезы. CELLMAP представляет собой карту молекул в клетках и карту клеток в организме. Для микробов клетка также является организмом. Все мы начали своё существование как одна клетка, которая умножалась, производя больше клеток. Эти клетки далее дифференцировались во многие разные типы клеток, образуя ткани и органы, ответственные за наши физиологические функции. При выборе уровня клетки мы избегаем вопроса о том, должны ли наши анализы быть сверху вниз (top-down) или снизу вверх (bottom-up); вместо этого наш подход является средним, потому что, с точки зрения клетки, мы можем смотреть вниз на молекулы, которые составляют её, и смотреть вверх на организм, который её содержит. Кроме того, мы можем принять единую концептуальную архитектуру

для всех уровней, рассматривая организм, как сеть взаимодействующих клеток так же, как мы рассматриваем клетку в виде сети взаимодействующих молекул [51].

**ПОЛУСЕРЬЕЗНОЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ.
ГЕНЕТИКА ГЕНИАЛЬНОСТИ УДАЧИ.
ВОСПРОИЗВОДИМОЕ И УНИКАЛЬНОЕ**

Е.С. Др. Бреннер, в заключение позвольте задать такой специфический вопрос: «Вы очень рано научились читать, причём росли, как можно понять, в семье не очень интеллектуальной. Это очень напоминает биографии по крайней мере некоторых гениальных людей, Гаусса (Иоганн Карл Гаусс (1777–1855)), например. Он также родился и рос в семье далёкой от образования и считается одним из величайших математиков всех времен, «королём математики». Кстати, иностранный почётный член Петербургской АН. Так же, как и Вы, он сам научился и в 3 года уже умел читать и писать. Как и Вы, в 15 лет поступил в колледж. Есть по крайней мере несколько подобных примеров. Есть ли гены гениальности? Удачи?»

В России есть прочно устоявшийся термин «фартовый» (удачливый). Во время Отечественной войны — это, например люди, которые прошли всю войну, не получив ни одного ранения, при этом не отсиживались в тылу. С удачливыми командирами солдаты охотно шли в разведку, будучи уверенными, что вернуться живыми с этим командиром более вероятно, чем с другим. Можно привести много других примеров: есть люди, которые открывали древние клады и т.д.

С.Б. Не буду говорить о гениальности. Но несколько лет назад я обнаружил, что в каждой семье есть дядя Фрэнк. Он тот, кто выкуривал 60 сигарет и выпивал 2 бутылки водки каждый

день своей жизни с четырёхлетнего возраста, у него было 6 жён и бесчисленное количество подруг, и он участвовал в гонках на Феррари.

К сожалению, он погиб в результате несчастного случая во время альпинизма в возрасте 92 лет в Гималаях. Я тщетно пытался заинтересовать учёных и политиков запуском проекта «Геном дяди Фрэнка», чтобы мы могли заполучить все эти хорошие гены [29].

Мне сказали, что дяди Фрэнки в этом мире единственные, кто удачлив; но я не считаю это удовлетворительным ответом. Генетика удачи кажется мне хорошей темой, намного лучше, чем генетика алкоголизма или гомосексуализма.

Е.С. Спасибо, Доктор Бреннер. Я, в связи с уникальностью, вспомнил слова Вольфганга Паули (Wolfgang Pauli), одного из основателей квантовой физики: «Учёный-естествоиспытатель интересуется определёнными явлениями, ...он должен ограничиваться воспроизводимым... Я не утверждаю, что воспроизводимое, само по себе, более важно, чем уникальное. Но я утверждаю, что уникальное выше исследования научным методом».

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, выделенного Курчатовскому геномному центру (грант № 075-15-2019-1659).

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>) том 86, вып. 12, 2021.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- White, J., and Bretscher, M. S. (2020) *Sydney Brenner. 13 January 1927–5 April 2019*, The Royal Society Publishing, doi: 10.1098/rsbm.2020.0022.
- Crick, F. H., Barnett, L., Brenner, S., and Watts-Tobin, R. J. (1961) General nature of the genetic code for proteins, *Nature*, **192**, 1227-1232, doi: 10.1038/1921227a0.
- Brenner, S., Jacob, F., and Meselson, M. (1961) An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis, *Nature*, **190**, 576-581, doi: 10.1038/190576a0.
- Crick, F. H. C. (1957) Nucleic acids, *Sci. Am.*, **197**, 188-203.
- CSHL Archives repository. Preserving and promoting the history of molecular biology. Letter from Sydney Brenner to Max Perutz, URL: <http://libgallery.cshl.edu/items/show/64089>.
- Sydney Brenner moves *C. elegans* into the limelight, *Worm History*, URL: <https://www.hobertlab.org/how-the-worm-got-started/>.
- Brenner, S. (1963) A letter to Max Perutz, 5, June, URL: <http://nemaplex.ucdavis.edu/General/Biographies/SBrenner.htm>.
- Kenyon, C. (2019) Sydney Brenner (1927-2019), *Science*, **364**, 638, doi: 10.1126/Science.Aax8563.
- Grens, K. (2019) *Sydney Brenner, mRNA Discoverer, Dies*, TheScientist, URL: <https://www.the-scientist.com/news-opinion/sydney-brenner--mrna-discoverer--dies-65708.8>.
- Kuhn, T. S. (1962) *The Structure of Scientific Revolutions*: University of Chicago Press, Original Edition.
- Friedberg, E. (2019) Sydney Brenner (1927-2019), *Nature*, **568**, 459-460.

12. From the *C. elegans* server: Sydney Brenner, January 1, 2020, URL: <http://nemaplex.ucdavis.edu/General/Biographies/SBrenner.htm>.
13. Brenner, S. (2012) The revolution in the life sciences, *Science*, **338**, 1427-1428.
14. Dunbrack, R. L. (2003) A scoundrel's refuge, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **10**, 590-590, doi: 10.1038/nsb0803-590.
15. Brenner, S. (1998) Refuge of spandrels, *Curr. Biol.*, **8**, R669.
16. Ankeny, R. A. (2001) The natural history of *Caenorhabditis elegans* research, *Nat. Rev. Genet.*, **2**, 474-479.
17. Brenner, S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*, *Genetics*, **77**, 71-94.
18. Brenner, S. (2009) In the beginning was the worm, *Genetics*, **182**, 413-415, doi: 10.1534/genetics.109.104976.
19. Sulston, J. (2002) A conversation with John Sulston, *Yale J. Biol. Med.*, **75**, 299-306.
20. *C. elegans* Sequencing Consortium (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology, *Science*, **282**, 2012-2018, doi: 10.1126/science.282.5396.2012.
21. Brenner, S. (1997) *Massively Parallel Sequencing of Sorted Polynucleotides*, Google Patents.
22. Brenner, S., Johnson, M., Bridgham, J., Golda, G., Lloyd, D. H., et al. (2000) Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays, *Nat. Biotechnol.*, **18**, 630-634, doi: 10.1038/76469.
23. Khrapko, K., Lysov, Y. P., Khorlin, A., Ivanov, I., Yerшов, G., et al. (1991) A method for DNA sequencing by hybridization with oligonucleotide matrix, *DNA Sequence*, **1**, 375-388.
24. Sverdlov, E., Monastyrskaya, G., Chestukhin, A., and Budowsky, E. (1973) The primary structure of oligonucleotides. Partial apurination as a method to determine the positions of purine and pyrimidine residues, *FEBS Lett.*, **33**, 15-17.
25. Sverdlov, E., Monastyrskaya, G., Budowsky, E., and Grachev, M. (1972) A novel approach to structural analysis of oligonucleotides, *FEBS Lett.*, **28**, 231-235.
26. Müller-Hill, B. (1996) *The Lac Operon: A Short History of a Genetic Paradigm*, Berlin, New York, Walter de Gruyter, doi: 10.1515/9783110879476.
27. Brenner, S., Elgar, G., Sanford, R., Macrae, A., Venkatesh, B., et al. (1993) Characterization of the pufferfish (*Fugu*) genome as a compact model vertebrate genome, *Nature*, **366**, 265-268.
28. Aparicio, S., Chapman, J., Stupka, E., Putnam, N., Chia, J. M., et al. (2002) Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*, *Science*, **297**, 1301-1310, doi: 10.1126/science.1072104.
29. Brenner, S. (2019) *Loose Ends... False Starts*, World Scientific.
30. Cobb, M. (2019) Sydney Brenner (1927-2019), *Dev. Cell*, **49**, 493-495.
31. Brenner, S. (2006) Sydney Brenner forecasts the future, *NewScientist*, 15 November 2006, URL: <https://www.newscientist.com/article/mg19225780-079-sydney-brenner-forecasts-the-future>.
32. Buzdin, A. V., Patrushev, M. V., and Sverdlov, E. D. (2021) Will plant genome editing play a decisive role in "Quantum-Leap" improvements in crop yield to feed an increasing global human population? *Plants*, **10**, 1667.
33. Свeрдлов, Е. (2006) Миражи цитируемости. Библиометрическая оценка значимости научных публикаций отдельных исследователей, *Вестник Российской академии наук*, **76**, 1073-1085.
34. Attwood, T. K., Kell, D. B., McDermott, P., Marsh, J., Pettifer, S. R., et al. (2009) Calling International Rescue: knowledge lost in literature and data landslide! *Biochem. J.*, **424**, 317-333, doi: 10.1042/BJ20091474.
35. Batts, S. A., Anthis, N. J., and Smith, T. C. (2008) Advancing science through conversations: bridging the gap between blogs and the academy, *PLoS Biol.*, **6**, e240, doi: 10.1371/journal.pbio.0060240.
36. Lowe, D. (2010) What has bioinformatics ever done for us? *Science*, URL: <https://www.science.org/content/blog-post/has-bioinformatics-ever-done-us>.
37. Lowe, D. (2013) Farewell to bioinformatics, *Science*, URL: https://blogs.sciencemag.org/pipeline/archives/2013/01/30/farewell_to_bioinformatics.
38. Maljkovic Berry, I., Melendrez, M. C., Bishop-Lilly, K. A., Rutvisuttinunt, W., Pollett, S., et al. (2020) Next Generation sequencing and bioinformatics methodologies for infectious disease research and public health: approaches, applications, and considerations for development of laboratory capacity, *J. Infect. Dis.*, **221**, S292-S307, doi: 10.1093/infdis/jiz286.
39. Sakr, S., and Zomaya, A. Y. (2019) *Encyclopedia of Big Data Technologies*, Springer International Publishing, doi: 10.1007/978-3-319-77525-8.
40. Stephens, Z. D., Lee, S. Y., Faghri, F., Campbell, R. H., Zhai, C., et al. (2015) Big Data: astronomical or genomics? *PLoS Biol.*, **13**, e1002195, doi: 10.1371/journal.pbio.1002195.
41. Improving our understanding of genome structure and function is central to biology and medicine, URL: <https://www.tugraz.at/tu-graz/services/news-stories/planet-research/einzelansicht/article/cracking-the-code-within-us-bioinformatics-of-the-human-genome/>.
42. Lowe, D. (2016) *The Limits of Big Data*, URL: <https://blogs.sciencemag.org/pipeline/archives/2016/10/21/the-limits-of-big-data>.
43. Alekseenko, I. V., Pleshkan, V. V., Monastyrskaya, G. S., Kuzmich, A. I., Snezhkov, E. V., et al. (2016) Fundamentally low reproducibility in molecular genetic cancer research, *Genetika*, **52**, 745-760.
44. IGI-Global. *What is Big Data*, URL: <https://www.igi-global.com/dictionary/data-knowledge-and-intelligence/39008>.
45. Moseley, E. T., Hsu, D. J., Stone, D. J., and Celi, L. A. (2014) Beyond open big data: addressing unreliable research, *J. Med. Int. Res.*, **16**, e259, doi: 10.2196/jmir.3871.
46. Ware, A., Janvale, G., Shaikh, F., and Harke, S. (2017) HADOOP: Solution for Big Data challenges in bioinformatics and its prospective in India, *IOSR J. Comp. Eng.*, 51-54.
47. Hutter, H., and Moerman, D. (2015) Big Data in *Caenorhabditis elegans*: quo vadis? *Mol. Biol. Cell*, **26**, 3909-3914, doi: 10.1091/mbc.E15-05-0312.
48. Hulsen, T., Jamuar, S. S., Moody, A. R., Karnes, J. H., Varga, O., et al. (2019) From Big Data to precision medicine, *Front. Med. (Lausanne)*, **6**, 34, doi: 10.3389/fmed.2019.00034.
49. Brenner, S. (2008) *Data Is a "Substitute for Thinking"*, URL: <http://www.genomeweb.com/blog/data-substitute-thinking>.
50. Brenner, S., and Sejnowski, T. J. (2011) Understanding the human brain, *Science*, **334**, 567, doi: 10.1126/science.1215674.
51. Brenner, S. (2010) Sequences and consequences, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.*, **365**, 207-212, doi: 10.1098/rstb.2009.0221.
52. Koch, C. (2012) Systems biology. Modular biological complexity, *Science*, **337**, 531-532, doi: 10.1126/science.1218616.
53. Greek, R., and Hansen, L. A. (2013) Questions regarding the predictive value of one evolved complex adaptive system for a second: exemplified by the SOD1 mouse, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **113**, 231-253, doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2013.06.002.

54. Brenner, S. (1995) Loose ends, *Curr. Biol.*, **5**, 1328.
55. Ewe, C. K., Cleuren, Y. N. T., and Rothman, J. H. (2020) Evolution and developmental system drift in the endoderm gene regulatory network of *Caenorhabditis* and other nematodes, *Front. Cell. Dev. Biol.*, **8**, 170, doi: 10.3389/fcell.2020.00170.
56. Halfon, M. S. (2017) Perspectives on gene regulatory network evolution, *Trends Genet.*, **33**, 436-447, doi: 10.1016/j.tig.2017.04.005.
57. Lavin, D. P., and Tiwari, V. K. (2020) Unresolved complexity in the gene regulatory network underlying EMT, *Front. Oncol.*, **10**, 554, doi: 10.3389/fonc.2020.00554.
58. Peter, I. S., and Davidson, E. H. (2009) Modularity and design principles in the sea urchin embryo gene regulatory network, *FEBS Lett.*, **583**, 3948-3958, doi: 10.1016/j.febslet.2009.11.060.
59. Ghatak, S., King, Z. A., Sastry, A., and Palsson, B. O. (2019) The *y*-ome defines the 35% of *Escherichia coli* genes that lack experimental evidence of function, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 2446-2454, doi: 10.1093/nar/gkz030.
60. Hutchison, C. A., 3rd, Chuang, R. Y., Noskov, V. N., Assad-Garcia, N., Deerinck, T. J., et al. (2016) Design and synthesis of a minimal bacterial genome, *Science*, **351**, aad6253, doi: 10.1126/science.aad6253.
61. Coyle, M., Hu, J., and Gartner, Z. (2016) Mysteries in a minimal genome, *ACS Cent. Sci.*, **2**, 274-277, doi: 10.1021/acscentsci.6b00110.
62. Moran, L. (2008) *In the Words of Sydney Brenner*, Sandwalk: Strolling with a skeptical biochemist, URL: <https://sandwalk.blogspot.com/2008/09/in-words-of-sydney-brenner.html>.
63. Brenner, S. (2000) Biochemistry strikes back, *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 584.

NON-HAPPENED INTERVIEW WITH SYDNEY BRENNER: TRANSFORMING DATA INTO KNOWLEDGE, BIOINFORMATICS, BIG DATA, AND ... “IS WATER H₂O?”

L. G. Kondratyeva^{1,2*}, M. V. Patrushev¹, and E. D. Sverdlov^{1*}

¹ National Research Center Kurchatov Institute, 123182 Moscow, Russia;
E-mail: liakondratyeva@yandex.ru, edsverd@gmail.com

² Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia

The review is an attempt to explain some of the challenges associated with the efforts to understand the mechanisms of organisms functioning, in particular, using Big Data collections. This review is a fictional interview with one of the brightest figures of the golden era of modern molecular genetics and biology, a unique scientist and a philosopher, the Nobel prize winner Sydney Brenner, who among other things introduced a remarkable organism – a transparent roundworm *C. elegans*. His reflections and conclusions regarding the inevitable “conflict” between rapidly growing data sets (Big Data) accumulated with use of the next generation sequencing technologies, and fundamental “taboos” arising due to complex interactions in organisms generating unpredictable “emerging” properties explain unsolvable problems faced by such modern trends as “systems biology”. On the other hand, Big Data itself suffers from serious shortcomings such as hidden errors and fundamentally low reproducibility. Another possibly insurmountable barrier facing Big Data is data incompleteness ($n \neq \text{all}$). An example is two small best-studied organisms, *E. coli* (1600 genes, that is, 34.6% of 4623 unique genes have unknown functions) and *C. elegans*, with proteins identified for only about 50% of genes. Another striking example is an “artificial” bacterium, JCVI-syn3.0, with a minimal set of genes in its genome. Out of its 473 genes, biological function could not be assigned to 149 (31.5%). Brenner points out that converting data into knowledge is a major challenge for future biological research and that biology urgently needs a strong theoretical basis. He considers the cell to be the correct level of research and proposes the CELLMAP project as a system for organizing biological information. As a completely honest scientist, he says: If I knew [how to do it], I would do it, and not write about the problem. Understanding how to do this transformation remains the main problem of the biological sciences.

Keywords: bioinformatics, Big Data, genome, system biology, interview, Sydney Brenner

УДК 577.152.193;616.379-008.64

РОЛЬ СИСТЕМЫ ВРОЖДЁННОГО ИММУНИТЕТА И ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В РАЗВИТИИ САХАРНОГО ДИАБЕТА 1-ТИПА. ПЕРОКСИРЕДОКСИН 6 КАК НОВЫЙ АНТИДИАБЕТИЧЕСКИЙ ПРЕПАРАТ

Обзор

© 2021 Е.Г. Новосёлова*, О.В. Глушкова, М.О. Хренов,
С.М. Лунин, Т.В. Новосёлова, С.Б. Парфенюк

Институт биофизики клетки РАН, 142290 Пущино, Московская обл., Россия;
электронная почта: elenapov_06@mail.ru

Поступила в редакцию 04.08.2021

После доработки 20.10.2021

Принята к публикации 03.11.2021

В обзоре обсуждаются сведения о развитии сахарного диабета 1-типа (Д1Т) как системного аутоиммунного и воспалительного заболевания. Основное внимание уделено роли системы врождённого иммунитета, включая активацию некоторых сигнальных каскадов, цитокиновый ответ и активность Toll-подобных рецепторов в развитии Д1Т. Нарушение функций врождённого иммунитета является причиной атаки Т-лимфоцитов на бета-клетки поджелудочной железы собственного организма и приводит к гибели этих, продуцирующих инсулин, клеток. Недостаток инсулина вызывает гипергликемию и необходимость пожизненных инъекций инсулина пациентам с Д1Т, что тем не менее не исключает повреждения многих органов и тканей, учитывая особенную уязвимость кровеносных сосудов в условиях гипергликемии. В обзоре обсуждается роль окислительного стресса как фактора, играющего основную роль в повреждении сосудистой системы и ткани поджелудочной железы при развитии Д1Т. С учётом особой уязвимости панкреатических бета-клеток к действию активных форм кислорода (АФК) обсуждается возможность использования антиоксидантов для снижения уровня патологических последствий развития Д1Т. Обсуждаются новые сведения об антидиабетической активности экзогенного фермента-антиоксиданта, пероксиредоксина 6, способного проникать в клетки, стимулировать продукцию инсулина в бета-клетках, снижать уровень АФК, а также снижать активацию некоторых сигнальных каскадов, продукцию цитокинов и экспрессию Toll-подобных рецепторов в бета-клетках и в иммунных клетках в условиях Д1Т.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пероксиредоксин 6, гипергликемия, цитокины, бета-клетки RIN-m5F, продукция инсулина, сигнальные каскады NF-κB и JNK.

DOI: 10.31857/S0320972521120083

ВВЕДЕНИЕ. СТРУКТУРА ОБЗОРА

Обзор посвящён анализу имеющихся сведений о закономерностях развития сахарного диабета 1-го типа (Д1Т), который относится к тяжёлым социально-значимым заболеваниям с ежегодно увеличивающимся числом пациентов в мире. Известно, что осложнения, связанные с Д1Т, являются одной из причин повышения за-

болеваемости во всем мире, что негативно влияет на качество жизни людей с Д1Т, увеличивая инвалидность и смертность. В частности, осложнения Д1Т классифицируются как микрососудистые (например, ретинопатия, нефропатия и невропатия) или макрососудистые (например, сердечно-сосудистые заболевания, нарушения мозгового кровообращения и заболевания периферических сосудов).

Сахарный диабет 1-го типа является аутоиммунным заболеванием, которое возникает из-за деструкции инсулин-продуцирующих панкреатических бета-клеток, которые атакуются аутореактивными клонами Т-лимфоцитов. Недостаток инсулина ведёт к гипергликемии, которая вызывает, несмотря на ежедневные инъекции инсулина, многие осложнения, главным образом на уровне сосудов ряда органов. Число ис-

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; Д1Т и Д2Т – диабет 1- и 2-типа; GPx – глутатионпероксидаза; IL – интерлейкин; JNK – c-Jun N-терминальная киназа; NF-κB – ядерный фактор κB; Prdx 6 – пероксиредоксин 6; PRR – паттерн-распознающие рецепторы; RIN-m5F – линия клеток инсулиномы крыс; STZ – стрептозотоцин; TLR – Toll-подобные рецепторы; TNF-α – фактор некроза опухолей.

* Адресат для корреспонденции.

точников научной литературы, посвящённой исследованию закономерностей возникновения, развития и новых подходов к лечению Д1Т, составляет более 100 тысяч (не считая чисто медицинских работ), что означает серьёзное внимание исследователей к изучению закономерностей и последствий этого тяжёлого заболевания.

Учитывая многофакторность Д1Т и большое число работ, посвящённых его изучению, настоящий обзор структурирован таким образом, чтобы акцентировать внимание на ключевых механизмах развития Д1Т и обсудить современные подходы, предпринимаемые для снижения негативных последствий этого заболевания. В первом разделе «Диабет 1-типа как аутоиммунное состояние» анализируются различные аспекты развития Д1Т, сравниваются разные модели диабета у животных, разработанные для изучения закономерностей возникновения и развития Д1Т, обсуждаются условия аутоиммунной «атаки» Т-лимфоцитов на бета-клетки поджелудочной железы собственного организма. На основании этого анализа делается вывод о том, что аутоиммунная реакция возникает из-за дефектов функционирования системы врождённого иммунитета. Следующий раздел обзора «Система врождённого иммунитета и диабет 1-типа» посвящён анализу активности некоторых сигнальных каскадов (NF-κB и JNK), роли цитокинов, а также участию Toll-подобных рецепторов (Toll-like receptors, TLR) в ответах против собственных антигенов при диабете 1-типа. Следует отметить, что в результате аутоиммунной реакции, сопровождающей развитие Д1Т, повреждаются бета-клетки поджелудочной железы, что является основным признаком развития сахарного диабета 1-типа. Раздел «Апоптоз бета-клеток поджелудочной железы и диабет 1-типа» содержит анализ роли апоптоза панкреатических бета-клеток как одного из стартовых событий в развитии Д1Т. Делается заключение, что одним из ключевых инструментов для развития диабета 1-типа является окислительный стресс. Раздел «Окислительный стресс и диабет 1-типа» содержит анализ современных источников литературы с доказательствами окислительного стресса при развитии Д1Т. Анализ сведений из мировой литературы показал, что всё больше данных свидетельствуют о том, что образование АФК играет центральную роль как в повреждении сосудистой системы, так и ткани поджелудочной железы при развитии Д1Т. Следующий раздел обзора посвящён анализу подходов использования антиоксидантов для снижения патологических последствий Д1Т. Наконец, в разделе «Защитные эффекты пероксиредоксина 6 в разных моделях диабета 1-типа» обсуждаются

новые данные об антидиабетических эффектах пероксиредоксина 6 (Prdx6) как малоизученного фермента-антиоксиданта, перспективного при разработке новых препаратов для профилактики и лечения сахарного диабета 1-типа.

ДИАБЕТ 1-ТИПА КАК АУТОИММУННОЕ СОСТОЯНИЕ

Сахарный диабет 1-типа называют инсулинозависимым диабетом, в отличие от диабета 2-типа (Д2Т). Хотя на Д1Т приходится не более 5–10% всех случаев сахарного диабета, это заболевание относится к разряду очень тяжёлых патологий и развивается в основном у детей и лиц юного возраста. У больных Д1Т масштабные изменения наступают быстро, что сопровождается резким ухудшением состояния здоровья. Редко сахарный диабет 1-типа развивается у взрослых людей после сорока лет, у них болезнь протекает скрыто.

Сахарный диабет 1-го типа является аутоиммунным заболеванием, которое возникает из-за разрушения инсулин-продуцирующих бета-клеток поджелудочной железы в результате атаки на них аутореактивных клонов цитотоксических Т-лимфоцитов. Клинически это заболевание проявляется в том случае, когда гибнет большинство инсулин-продуцирующих панкреатических бета-клеток через механизм активации аутореактивных Т-клеток. Массовая гибель продуцирующих инсулин бета-клеток, которую вызывают мигрирующие в поджелудочную железу собственные цитотоксические Т-лимфоциты, приводит к накоплению глюкозы в крови, что вызывает необходимость регулярного пожизненного применения инсулина больными с Д1Т. Даже при компенсаторном введении инсулина диабет первого типа вызывает ряд серьёзных поражений многих систем и органов, включая сердечно-сосудистую систему [1], почки [2], глаза [3] и др. Известно, что при диабете особенно сильно повреждаются кровеносные сосуды, поэтому среди больных Д1Т смертность от инсультов и инфарктов в 3 раза выше, чем у других категорий населения. Эпидемиологические исследования сахарного диабета регулярно проводятся Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) и Международной федерацией диабета (International Diabetes Federation, IDF). В 1998 г. исследователи предсказывали, что число заболевших диабетом 1-го и 2-го типа увеличится с 135 млн в 1995 г. до 300 млн – к 2025 г. [4]. В конце 2019 г. опубликованы данные исследований IDF, согласно которым в 2019 г. в мире 453 млн человек болели сахарным Д1Т и Д2Т, а

по прогнозам, к 2045 г. эта цифра вырастет до 700 млн человек. Действительно, все исследователи отмечают тенденцию ежегодного прироста случаев диагностированного диабета. При этом следует иметь в виду, что не все заболевания диабетом диагностируются. Например, в ходе исследования россиян в 2013–2015 гг., проведённого ФГБУ ЭНЦ (Эндокринологический научный центр МЗ РФ), выяснилось, что 50% больных диабетом не знали о своём заболевании (исследовали 26 000 человек в возрасте от 20 до 79 лет из 63 регионов России).

В настоящее время в мировой практике самым распространённым методом лечения аутоиммунного сахарного диабета является заместительная инсулинотерапия. Тем не менее в мире проводятся исследования, направленные на поиск других подходов, способных уменьшить степень разрушения бета-клеток поджелудочной железы или даже стимулировать их дифференцировку. Кроме метода трансплантации островков Лангерганса, который способен возмещать потерю массы бета-клеток [5], ведётся поиск и других, неинвазивных методов, направленных на стимуляцию неогенеза этих инсулин-продуцирующих клеток. Следует отметить, что для этой цели используются вещества растительного происхождения, которые обладают антиоксидантной активностью, например, свертизин (swertisin) [6].

В настоящее время в большинстве работ, посвящённых исследованию патогенеза сахарного диабета 1-го типа, основное внимание направлено на изучение панкреатических бета-клеток, которые являются мишенями аутоиммунной атаки. Между тем первопричиной заболевания, как правило, становятся нарушения в иммунной системе, которые приводят к возникновению клонов Т-лимфоцитов, атакующих панкреатические бета-клетки собственного организма. В течение последующих воспалительных реакций провоспалительные цитокины, включая IL-1 β , TNF- α и интерферон- γ (IFN- γ), высвобождаются в окружение бета-клеток активированными макрофагами и Т-клетками, вызывая дисфункцию и гибель инсулин-продуцирующих клеток [7]. Обычно провоспалительный ответ защищает организм млекопитающих от чужеродных патогенов, он направлен на сохранение целостности тканей и клеточных систем. С другой стороны, «дефектный» провоспалительный ответ может вызвать обратный эффект, индуцируя риск возникновения аутоиммунных патологий, к которым относится и Д1Т [8, 9].

Поскольку исследование патогенеза диабета у человека имеет большой ряд ограничений, разработаны модели диабета у животных, которые являются удобными инструментами для

изучения молекулярно-клеточных механизмов, участвующих в развитии этой патологии [10]. Диабет обычно вызывается у грызунов с использованием химических агентов: стрептозотоцина (streptozotocin, STZ) или аллоксана (alloxan) [11, 12], которые разрушают панкреатические бета-клетки, продуцирующие инсулин, и таким образом вызывают развитие диабета 1-го типа. Самой известной животной моделью Д1Т являются мыши линии NOD (Non Obese Diabetes mice). Использование NOD-мышей обеспечило значительный прогресс в понимании Д1Т у человека, потому что эта модель «истинного» диабета открыла перспективы для изучения кинетики и инициации диабета. У этих мышей диабет развивается спонтанно, при этом генетические и патологические последствия аналогичны таковым у человека [13]. Известно, что Д1Т у человека часто является наследственным, что связано с изменёнными генами, обеспечивающими восприимчивость к Д1Т [14]. Генетический локус *HLA*, который определяет селекцию Т-лимфоцитов в тимусе, наиболее вероятно, связан с развитием Д1Т [15]. Существуют и другие гены, которые в меньшей степени могут ассоциироваться с развитием Д1Т [16]. Тем не менее во многих странах число диагностируемых случаев Д1Т нарастает с большой скоростью, которую нельзя объяснить только генетической предрасположенностью — это свидетельствует о важности внешних факторов [17]. Действительно, исследования однояйцевых близнецов с наследственным «семейным» Д1Т показали, что только примерно половина из них заболевает диабетом [18], что указывает на роль неблагоприятных факторов окружающей среды для риска развития Д1Т [19].

Механизм развития Д1Т у человека остаётся во многом неясным. Можно выделить по крайней мере 3 очевидных стадии возникновения Д1Т: активация аутореактивных клонов Т-лимфоцитов, направленных на разрушение бета-клеток поджелудочной железы, провоспалительный ответ организма и, наконец, нарушение иммунной регуляции аутоиммунных ответов. Следует отметить, что каждая из этих составляющих развития Д1Т изучена в разной степени, но очевидно, что именно возникновение иммунного дисбаланса является определяющим в патофизиологии этого заболевания.

СИСТЕМА ВРОЖДЁННОГО ИММУНИТЕТА И ДИАБЕТ 1-ТИПА

Система врождённого иммунитета представляет собой первую линию защиты от патогенов

и чужеродных молекул. В эту систему входит неизменный набор распознающих молекул, которые способны узнавать определённые молекулярные паттерны чужеродных агентов, попадающих в организм, причём распознаваемые паттерны могут быть растворимыми, связанными с мембранами или цитозольными [20]. Система врождённого иммунитета включает множество клеточных популяций: макрофаги, дендритные клетки, естественные киллеры и нейтрофилы, причём каждая из этих групп клеток несёт свою функцию в формирование иммунного ответа, при этом важная роль врождённого иммунитета при развитии Д1Т не вызывает сомнений [21]. Развитие аутоиммунного диабета 1-типа включает провоспалительный ответ, одним из важных участников которого является ядерный фактор κB (NF- κB). Действительно, ранее была проведена оценка роли конститутивной активации NF- κB и были обсуждены стратегии предотвращения продолжительной активации пути NF- κB при Д1Т у человека [22].

Семейство NF- κB состоит из ДНК-связывающих белковых факторов, которые необходимы для транскрипции большинства провоспалительных молекул, включая молекулы адгезии, ферменты, цитокины и хемокины. Исследования, проведённые на различных клеточных и животных экспериментальных системах, позволяют предположить, что активация NF- κB в иммунных клетках и в панкреатических бета-клетках является ключевым событием для старта развития Д1Т [23]. По этой причине очевидной целью кажется применение усилий по снижению чрезмерной активации этого ключевого сигнального каскада для снижения последствий развития Д1Т. Действительно, семейство NF- κB состоит из группы индуцибельных транскрипционных факторов, которые регулируют иммунные и воспалительные реакции и защищают клетки от апоптоза в ответ на клеточный стресс. Следует добавить, что *c-Jun* N-терминальная киназа (JNK) также участвует в патогенезе диабета, особенно для модели Д1Т, вызванного STZ [24, 25], при этом ингибиторы JNK, включая ингибиторы поли(АДФ-рибозы), способны снижать патологические последствия Д1Т [26]. Интересно, что антиангиогенный эффект блокатора кальциевых каналов, тетрандрина, на кровеносные сосуды у крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом также был связан с понижением уровней TNF- α и NF- κB [27].

Система врождённого иммунитета отвечает на чужеродные агенты и эндогенные патогены с помощью группы рецепторов, известных как паттерн-распознающие рецепторы (pattern recognition receptors, PRR). Эти рецепторы могут

быть обнаружены во внутриклеточных органеллах, могут секретироваться через систему циркуляции крови и локализоваться на поверхности клеток [28].

Среди PRR особое место занимают Toll-подобные рецепторы, которые могут распознавать широкий набор патогенов. Установлено, что TLR являются эволюционно сохранным классом PRR, стимуляция которых непременно приводит к активации иммунной системы [29]. Связываясь с лигандом и активируясь, TLR индуцируют каскад провоспалительных ответов, что вызывает, прежде всего, усиленную продукцию цитокинов и хемокинов [30, 31]. На основании исследований, проведённых с использованием моделей Д1Т, было сделано предположение, что семейство TLR играет важную роль в иницировании аутоиммунного процесса, приводящего к разрушению островков Лангерганса поджелудочной железы [32].

Однако роль системы врождённого иммунитета и, в частности, TLR в развитии сахарного диабета 1-типа у человека пока остаётся малоизученной. Некоторые авторы предполагали, что аутоактивные процессы против собственных антигенов при Д1Т могут объясняться неоправданно сильным адаптивным иммунным ответом при участии TLR [33].

Было показано, что стимуляция или ингибирование TLR в моноцитах периферической крови (РВМС) пациентов со вновь диагностируемым Д1Т изменяет соотношение дендритных клеток и моноцитов, при этом наблюдается значительное изменение цитокинового профиля [34]. О важной роли сигнальных путей, регулируемых TLR4, в развитии сердечных аномалий, связанных с жировой инфильтрацией сердечной мышцы, свидетельствовали данные по исследованию NOD-мышей, дефицитных по *TLR4* [35].

Ранее было показано участие TLR2 и TLR4 в развитии Д1Т и у человека. Так, результаты исследования пациентов с диагностированным Д1Т показали увеличение экспрессии TLR2 и TLR4 в моноцитах крови этих людей [36]. Между тем имеются сведения о том, что разные члены семейства TLR играют неодинаковую роль в развитии диабета 1-типа. Так, при использовании NOD-мышей было установлено, что TLR3 не участвует в механизме аутоиммунного ответа, тогда как у мышей, дефицитных по *TLR9*, была значительно снижена заболеваемость диабетом [37]. Таким образом, участие системы врождённого иммунитета с учётом роли TLR в настоящее время не вызывает сомнений, что, по мнению многих исследователей, может быть основанием для разработки новых стратегий для ле-

чения и/или предотвращения сахарного диабета 1-типа [38].

АПОПТОЗ БЕТА-КЛЕТОК ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ДИАБЕТ 1-ТИПА

Важная роль врождённого иммунитета, связанная с патогенезом Д1Т, была подтверждена результатами исследования апоптоза бета-клеток поджелудочной железы при диабете. Известно, что апоптоз инсулин-продуцирующих клеток поджелудочной железы является последним этапом развития Д1Т, приводит к критическому уменьшению массы бета-клеток и клиническому проявлению Д1Т [39, 40]. На момент постановки диагноза Д1Т островки Лангерганса инфильтрированы иммунными клетками (инсулит) [41], и в этот момент около 70–80% общей массы бета-клеток уже потеряно, поэтому так важно раннее прогнозирование и предотвращение развития диабета. Некоторые исследования показали, что индукция инсулита может быть вызвана также неспецифической вирусной инфекцией [42, 43].

В начале 2000-х гг. было опубликовано несколько работ, посвящённых сравнению динамики развития апоптоза бета-клеток с появлением аутоиммунитета у молодых NOD-мышей, которые являются классической моделью Д1Т. Было установлено, что в возрасте 2–3 недели у NOD-мышей наблюдается пик развития поджелудочной железы, и это совпадает с появлением диабетогенных Т-клеток, особенно в лимфатических узлах поджелудочной железы мышей. При этом авторы показали, что одновременно с этими событиями у новорождённых NOD-мышей происходит увеличение уровня апоптоза бета-клеток [44, 45]. Известно, что обычно апоптозные клетки быстро утилизируются макрофагами, однако при нарушении этого процесса клетки могут подвергаться вторичному некрозу, что может вызывать негативные последствия. Такие события могут возникать у NOD-мышей, клетки которых имеют дефекты в фагоцитарной способности [46]. Эти данные показали, что в некоторых случаях физиологический апоптоз может фактически инициировать возникновение аутоиммунитета. Таким образом, можно сделать парадоксальное заключение о том, что ускорение апоптоза бета-клеток у животных с Д1Т является триггером для возникновения аутоиммунитета, направленного на бета-клетку.

С другой стороны, было показано, что поздние апоптотические бета-клетки со вторичным некрозом вызывали воспалительные реакции в

макрофагах через сигнальный путь TLR2. Поздние апоптотические клетки также индуцировали TLR2-зависимое созревание дендритных клеток, а затем активацию аутореактивных Т-клеток [47]. У мышей с нокаутом *TLR2* было обнаружено дефектное праймирование диабетогенных Т-клеток апоптозными бета-клетками в лимфатических узлах поджелудочной железы. Кроме того, недостаточность TLR2 усиливала защиту от диабета 1-типа в моделях Д1Т у животных [48]. Эти данные свидетельствуют о том, что апоптоз панкреатических бета-клеток является одним из стартовых событий в развитии Д1Т.

Активное изучение патогенеза Д1Т в течение последних десятилетий позволило выявить гетерогенность этого заболевания как в отношении клинического фенотипа, так и в ответе на терапию для предотвращения или рецидива диабета. Эта неоднородность не только ограничивает усилия по точному прогнозированию клинической картины, но также отражается в отсутствии прогнозируемых ответов на иммуномодулирующую терапию [49]. Таким образом, существует потребность в надёжных биомаркерах неблагоприятия бета-клеток, которые могли бы обеспечить понимание патофизиологических различий в течение заболевания, улучшить прогнозирование заболевания и успешность применения иммуномодулирующих технологий [50].

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС И ДИАБЕТ 1-ТИПА

Известно, что гипергликемия приводит не только к продукции АФК, но также снижает эффективность эндогенной антиоксидантной системы защиты при сахарном диабете [51]. Антиоксидантные механизмы защиты включают в себя как ферментативные, так и не ферментативные системы. Имеются весомые доказательства окислительного стресса при сахарном диабете 1-го и 2-го типов [52–54]. При этом повышение продукции активных форм кислорода или азота увеличивает расходование эндогенных ферментов-антиоксидантов (супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы (GPx) и каталазы) и снижает концентрацию некоторых низкомолекулярных антиоксидантов, например витамина D [55].

Воспаление – важный компонент патогенеза Д1Т, который гистологически охарактеризован наличием инфильтрирующих лейкоцитов и циркулирующих антиостровковых антител. Исследования с использованием эксперименталь-

ных моделей Д1Т доказывают, что окислительный стресс может инициировать или ускорить воспалительный процесс через активацию сосудистых эндотелиальных клеток, способствуя экспрессии множества провоспалительных цитокинов и хемокинов. Интересно, что всё больше доклинических данных свидетельствуют о том, что образование АФК играет центральную роль как в повреждении сосудистой системы, так и ткани поджелудочной железы [51].

Особенно значительный повреждающий эффект окислительного стресса, нарушающего баланс между свободными формами кислорода и антиоксидантной системой, был отмечен в отношении сердечной мышцы. Действительно, кардиологические патологии наряду с другими часто отягощают течение инсулин-зависимого Д1Т. Гипергликемия, вызывая выработку и накопление АФК, вызывает сократительную дисфункцию сердечной мышцы при диабете [56]. При этом накопление АФК вызывает каскад патофизиологических событий, в том числе нарушение кальциевого гомеостаза, увеличение окислительного стресса, дисфункцию митохондрий и других факторов, вызывающих диабетическую кардиомиопатию [57]. В условиях диабета хроническая гипергликемия постепенно подавляет активность бета-клеток и усиливает инсулинорезистентность. Этот процесс, типичный для Д2Т, называется «токсичностью глюкозы». В таких условиях провоцируется окислительный стресс и активируется путь JNK, который участвует в дисфункции бета-клеток поджелудочной железы и резистентности к инсулину [58].

РОЛЬ АНТИОКСИДАНТОВ ДЛЯ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ ПОСЛЕДСТВИЙ ДИАБЕТА

Окислительный стресс, который возникает при развитии Д1Т, рассматривается как один из главных патофизиологических факторов сахарного диабета [59]. Считается, что для предотвращения повреждения клеток, вызванного АФК, антиоксиданты действуют по одному из трёх механизмов: они могут уменьшить образование АФК, утилизировать их или препятствовать патологическим изменениям, вызванным АФК. Особенно подробно были исследованы кардиопатологические последствия сахарного диабета 1-го типа. Было доказано существование тесной связи между ослаблением передачи сигналов инсулина и изменением функции сердца через подавление механизма эндогенной антиоксидантной защиты [56, 60, 61]. Положение усугубляет-

ся тем, что гипергликемия при сахарном диабете также снижает уровень эндогенной антиоксидантной системы защиты, включающей ферменты-антиоксиданты и низкомолекулярные соединения, обладающие антиоксидантной активностью [62].

В мировой литературе имеются сведения о применении антиоксидантов, в основном низкомолекулярных природных и синтетических веществ, для лечения различных патологий, сопряжённых с сахарным диабетом [63, 64]. Клинические испытания, изучающие влияние витаминов-антиоксидантов на прогрессирование осложнений сахарного диабета, к сожалению, чаще всего дают отрицательные или неубедительные результаты [65]. По этой причине целью исследователей является поиск новых соединений, обладающих антиоксидантной активностью, которые способны нейтрализовать окислительный стресс, связанный с развитием Д1Т. При этом есть все основания полагать, что ферменты-антиоксиданты могут быть более эффективными по своей способности нейтрализовать АФК по сравнению с низкомолекулярными антиоксидантами. Действительно, было показано, что ингибирование АФК с использованием имитатора супероксиддисмутазы задерживает развитие экспериментального диабета [66]. Другие авторы, изучая влияние антиоксиданта, эбселена (пероральный миметик глутатионпероксидазы), на изменение уровня инсулина в крови молодых крыс по мере их взросления, показали, что к 14-й неделе приема эбселена количество инсулина у животных с Д2Т, получающих антиоксидант, достоверно возрастало [67].

ЗАЩИТНЫЕ ЭФФЕКТЫ ПЕРОКСИРЕДОКСИНА 6 В РАЗНЫХ МОДЕЛЯХ ДИАБЕТА 1-ТИПА

Исследования по использованию фермента пероксиредоксина 6, обладающего пероксидазной и фосфолипазной активностями, показали, что экзогенный рекомбинантный Prdx6 проявляет терапевтический эффект при различных патологиях, связанных с окислительным стрессом, например, при механических и термических травмах кожи, химических ожогах дыхательных путей, гипоксии-реперфузии кишечника [68–70]. Более того, среди пероксиредоксинов млекопитающих (Prdx1–6) особый интерес представляет именно Prdx6, который способен восстанавливать самый широкий спектр пероксидов, включая гидропероксиды фосфолипидов [71, 72]. Кроме пероксидазной активности,

Prdx6 обладает Ca^{2+} -независимой активностью фосфолипазы A2 (aiPLA2), которая обычно проявляется только в кислых условиях (в лизосомах и ламеллярных тельцах при pH 4–5) и играет важную роль в метаболизме фосфолипидов и во внутриклеточной/межклеточной передаче сигналов [73].

Нокаут гена *PRDX6* приводил к повышению чувствительности животных к окислительному стрессу. В частности, было показано, что животные с нокаутом *PRDX6* (*PRDX6*^{-/-}) чувствительны к гипероксии (в атмосфере 100% кислорода). Примечательно, что у таких животных наблюдалось окислительное повреждение лёгких и уменьшение продолжительности жизни [74]. Сравнение мышей с нокаутом гена, кодирующего глутатионпероксидазу 1 (*GPX1*^{-/-}), и мышей с нокаутом *PRDX6* (*PRDX6*^{-/-}) показало, что Prdx6 является основным ферментом для элиминации гидропероксидов фосфолипидов в лёгких [75].

Таким образом, Prdx6 является важным ферментом-антиоксидантом, участвующим в регуляции окислительно-восстановительного гомеостаза клеток.

Мы предположили, что Prdx6 может быть эффективным в качестве агента, подавляющего уровень окислительного стресса при сахарном диабете 1-типа. Действительно, в сравнении с другими тканями млекопитающих в бета-клетках поджелудочной железы содержатся более низкие уровни ферментов-антиоксидантов, таких как супероксиддисмутаза, каталаза и GPx, что делает эти клетки более уязвимыми к повреждающему действию АФК [76, 77]. Ещё более 30 лет назад было показано, что активность GPx и резистентность к пероксиду примерно в 20 раз выше в печени и почках, чем в поджелудочной железе [78]. Таким образом, изучая защитные эффекты Prdx6 при Д1Т, сопровождающемся разрушением бета-клеток, следует обратить внимание на конститутивную уязвимость клеток поджелудочной железы к повреждающим воздействиям. Естественно, что в условиях пониженной активности эндогенных ферментов-антиоксидантов возрастает интерес к использованию новых белков, таких как Prdx6, обладающих антиоксидантной активностью и, возможно, способных защитить бета-клетки поджелудочной железы при развитии диабета первого типа.

Были проведены системные исследования участия Prdx6 в защите от последствий Д1Т в условиях *in vivo* и *in vitro*. Используя аллоксановую модель тяжёлой формы диабета у мышей, мы показали, что внутривенное введение рекомбинантного Prdx6 предотвращает гипергликемию, снижает смертность мышей, восстанавливает цитокиновый профиль плазмы и снижает дест-

рукцию бета-клеток в островках Лангерганса поджелудочной железы мышей [79]. Кроме того, в условиях *in vitro* Prdx6 защищает бета-клетки RIN-m5F, культивированные с TNF- α и IL-1 β , уменьшая продукцию АФК и гибель клеток через апоптоз. Исследование механизма защитной активности фермента показало, что Prdx6 предотвращает активацию сигнальных каскадов NF- κ B и JNK в бета-клетках RIN-m5F, культивируемых с цитокинами [80].

Поскольку патологический эффект гипергликемии опосредуется в значительной степени через образование АФК, кажется резонным, что Prdx6 способен в значительной степени редуцировать окислительный стресс у мышей с Д1Т. Действительно, прямые эксперименты по влиянию Prdx6 на уровень АФК в клетках RIN-m5F в присутствии повышенного содержания глюкозы доказали значительное снижение АФК при добавлении Prdx6 в среду культивирования панкреатических бета-клеток [80]. Интересно, что в соответствии с этими результатами ранее было обнаружено, что у пациентов с Д2Т именно колебания уровня глюкозы коррелировали с запуском окислительного стресса в большей степени, чем хроническая устойчивая гипергликемия [81].

Более того, мы показали значительный стимулирующий эффект Prdx6 на инсулин-продуцирующую активность бета-клеток поджелудочной железы. Интересно, что стимулирующая активность Prdx6 была обнаружена как при культивировании бета-клеток RIN-m5F в нормальных условиях, так и в неблагоприятных условиях, вызывающих гибель клеток. Действительно, и в присутствии провоспалительных цитокинов, и в условиях гипергликемии добавление Prdx6 в среду культивирования резко увеличивало сниженную инсулин-продуцирующую активность клеток RIN-m5F [80]. Полагаем, что сам факт инсулин-стимулирующего влияния Prdx6 в отношении панкреатических бета-клеток заслуживает повышенного внимания в плане использования этого белка-антиоксиданта для профилактики диабета у лиц, предрасположенных к этому заболеванию.

Наши исследования с использованием индуцированной стрептозотоцином модели Д1Т у мышей также показали защитный эффект Prdx6 [82]. Благодаря клиническому применению STZ в качестве химиотерапевтического средства известно больше подробностей о механизмах его действия [83]. Из-за своей структуры, похожей на глюкозу, он проникает в бета-клетки таким же образом, как глюкоза и аллоксан, при этом в отличие от аллоксана стрептозотин относительно стабилен [84]. Известно,

что наиболее важным механизмом гибели бета-клеток, вызванным STZ, является не окислительный стресс, а алкилирование ДНК [22, 85].

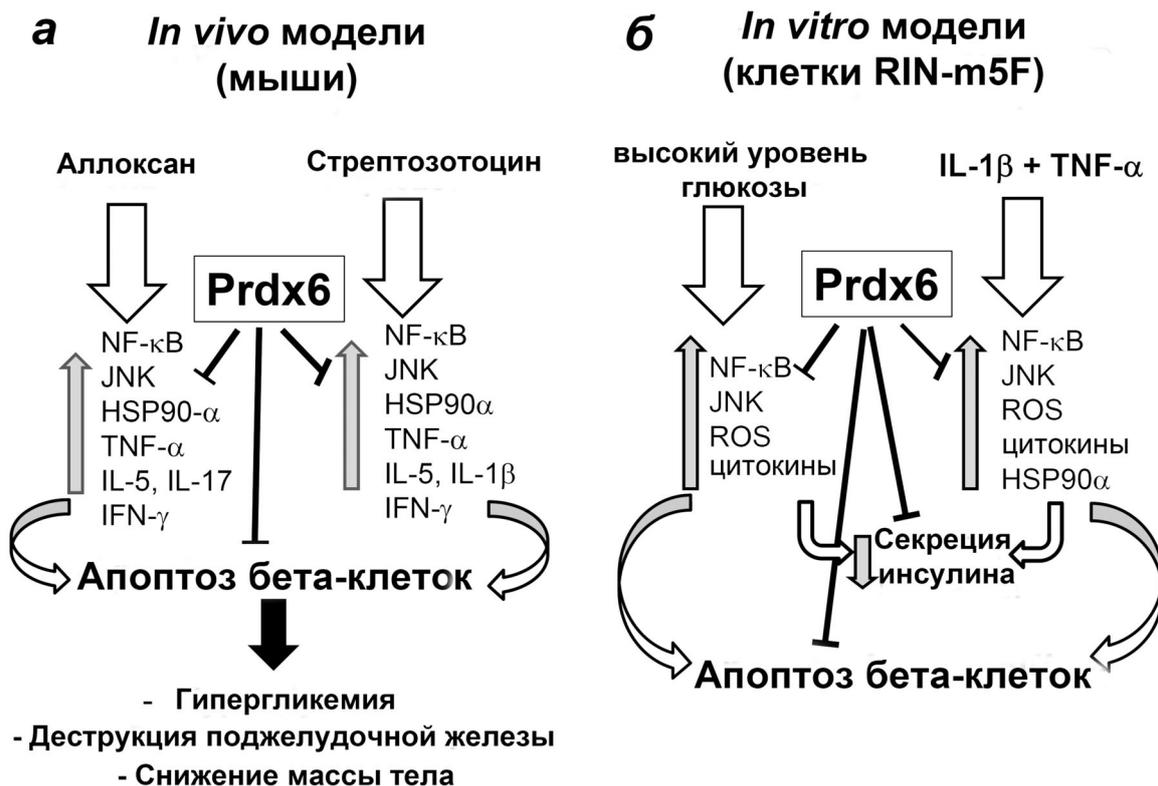
Несмотря на то что образование АФК при использовании STZ-индуцированного диабета не играет центральной роли, результаты доказывают несомненную защитную эффективность Prdx6. Так, Prdx6 защищает от гибели бета-клетки поджелудочной железы, снижает гипергликемию, нормализует уровень TNF- α в плазме, активность каскада NF- κ B и уровень Hsp90 в клетках у мышей с Д1Т, индуцированным STZ [82]. Возможно, эффективность Prdx6 можно объяснить не только антиоксидантными свойствами, но и его фосфолипазной активностью. Кроме того, ранее мы доказали участие NF- κ B, а именно RelA/p65, в защите бета-клеток поджелудочной железы у мышей с аллоксан-индуцированным диабетом после введения животным ингибитора активности NF- κ B (IKK Inhibitor XII) [86]. В другой работе было продемонстрировано, что нокдаун *PRDX6* увеличивает восприимчивость бета-клеток RIN-m5F к повреждающему воздействию провоспалительных цитокинов и к окислительному стрессу [87]. Ранее было установлено, что среди пероксиредоксинов, экспрессирующихся в клетках RIN-m5F, только уровень Prdx6 модулируется провоспалительными цитокинами, а подавление активности Prdx6 зависит от кальпаина, протеасомных систем и передачи сигналов JNK [88]. Более того, связь между Prdx6 и NF- κ B, который является одним из наиболее заметных редокс-зависимых провоспалительных регуляторов, ранее наблюдалась в гипоксических клетках гиппокампа мышей [89]. Кроме того, было показано, что экспрессия Prdx6 обратно коррелирует с активацией NF- κ B во время заражения *Clonorchis sinensis* [90]. Доказанный защитный эффект Prdx6 в условиях Д1Т и с использованием бета-клеток RIN-m5F поднимает вопрос о возможности проникновения эндогенного фермента внутрь клетки. Для выяснения этого вопроса был получен рекомбинантный Prdx6, меченный флуоресцеин-5-изотиоцианатом (FITC). Культивирование эмбриональных фибробластов 3T3 с Prdx6-FITC показало, что в нормальных условиях белок связывается с поверхностью клеток 3T3, а также способен проникать внутрь клеток, при этом количество белка, проникающего в клетку, возрастало при увеличении времени культивирования и концентрации добавленного комплекса Prdx6-FITC [91]. Таким образом, рекомбинантный Prdx6 может проникать в клетки и оказывать непосредственное влияние на антиоксидантный статус клеток. Механизм проникновения Prdx6 в клетки требует дальней-

ших детальных исследований, однако, наиболее вероятно, что проникновение Prdx6 в клетки осуществляется благодаря его фосфолипазной активности.

Ранее была установлена важность для развития Д1Т ещё одного сигнального каскада – c-Jun N-терминальной киназы, который активируется в условиях клеточного стресса и участвует в различных типах клеточной гибели. Было показано, что введение мышам стрептозотоцина вызывает резкую активацию JNK, что также считается очень важным фактором гибели бета-клеток при Д1Т [24]. Кроме того, было показано, что JNK также участвует в развитии диабета 1-го и 2-го типов [23]. Именно в STZ-индуцированной модели Д1Т повышение активности JNK-каскада является решающим фактором в гибели бета-клеток [24]. Используя бета-клетки RIN-m5F, мы показали, что Prdx6 предотвращал активацию не только каскада NF- κ B, но и активацию JNK в бета-клетках, культивируемых с провоспалительными цитокинами; кроме того, Prdx6 значительно снижал апоптоз этих клеток [80].

Известно, что в клеточном ответе на диабет 1-типа участвуют белки теплового шока, например белок Hsp90 α . Можно предположить, что Hsp90 α является одним из маркёров Д1Т. Действительно, в условиях *in vitro* в бета-клетках RIN-m5F [92], а также в иммунных клетках мышей с STZ-индуцированным Д1Т наблюдали резкое повышение экспрессии белка Hsp90 α [82], при этом Prdx6 полностью нормализовал уровни Hsp90 α в иммунных и бета-клетках. Важно отметить, что уровень этого белка незначительно повышался в условиях предиабета, но именно при развитии диабета наблюдали пик продукции Hsp90 α [86].

Известно, что субстратами для Hsp90 являются сигнальные белки, некоторые из которых активно продуцируются при Д1Т, как было показано нами ранее [93]. Исследования роли отдельных T-клеточных популяций для формирования аутоиммунного воспаления, свойственного для Д1Т, позволили выявить особую функцию Treg-лимфоцитов, которые в кооперации с белками теплового шока регулируют противовоспалительную активность в условиях хронического воспаления [94, 95]. В нашей предыдущей работе сравнивали изменения иммунного статуса у мышей с аллоксан-индуцированным диабетом на двух стадиях его развития – при предиабете и развитием диабете. Доказали, что для предиабета характерно снижение активности Th2 и Treg-популяций T-клеток, но не Th1-лимфоцитов. Напротив, при развитии диабета наблюдали снижение активностей Th1- и Treg-, но не Th2-лимфо-



Пероксиредоксин 6 (Prdx 6) снижает иммунный дисбаланс организма и апоптоз панкреатических бета-клеток при сахарном диабете 1-типа, а также вызывает стимуляцию секреции инсулина в бета-клетках RIN-m5F. Показаны основные мишени сигнальной системы, подвергнутые воздействию Prdx 6 в условиях Д1Т (по результатам работ [79, 80, 82, 86, 92, 93]). *а* – Диабет 1-типа, индуцированный у мышей BALB/c введением аллоксана или стрептозотоцина; *б* – бета-клетки RIN-m5F, культивированные с добавлением глюкозы или провоспалительных цитокинов (IL-1β и TNF-α)

цитов [86]. С учётом этих сведений можно сделать предположение о том, что вся сложная конфигурация вовлечённости белков теплового шока в реализацию аутоиммунных процессов при Д1Т находится в прямой зависимости от периода развития и степени тяжести этого хронического воспалительного процесса.

Интересно, что группа авторов из Италии с использованием мышей, нокаутных по *PRDX6*, доказала, что этот ген участвует в патогенезе Д2Т, который был индуцирован как сниженной глюкозозависимой секрецией инсулина, так и повышенной инсулинорезистентностью [96, 97]. Полагаем, что эти результаты можно объяснить способностью Prdx6 стимулировать продукцию инсулина в панкреатических бета-клетках [80], что, очевидно, должно влиять на степень инсулинорезистентности, характерной для Д2Т.

В заключение следует отметить, что использование рекомбинантного белка Prdx6 для разных моделей диабета первого типа *in vivo* и *in vitro* вызывает очевидный антидиабетический эффект. Механизм защитного действия Prdx6 включает снижение уровня аутоиммунного от-

вета через подавление активности сигнальных каскадов NF-κB и JNK, уменьшение продукции провоспалительных цитокинов и стрессовых белков, редукцию образования АФК, снижение апоптоза бета-клеток и восстановление секреции инсулина в панкреатических бета-клетках. На уровне организма введение Prdx6 приводит к снижению концентрации глюкозы в крови животных с Д1Т, уменьшает смертность при тяжёлой форме диабета 1-типа и снижает степень деструкции островков Лангерганса поджелудочной железы. Эти закономерности представлены на рисунке. Полагаем, что требуются дальнейшие исследования антидиабетической активности Prdx6 – перспективного препарата при разработке новых лекарств для лечения и профилактики сахарного диабета 1-типа.

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. Cokkinos, D. V., and Pantos, C. (2011) Type 1 diabetes impairs compensatory response after myocardial infarction; role of tissue hypothyroidism and effects of thyroid hormone administration, *Bull. Acad. Natl. Med.*, **195**, 151-164.
2. Perlman, A. S., Chevalier, J. M., Wilkinson, P., Liu, H., Parker, T., et al. (2015) Serum inflammatory and immune mediators are elevated in early stage diabetic nephropathy, *Ann. Clin. Lab. Sci.*, **45**, 256-263.
3. Wang, S., Du, S., Wu, Q., Hu, J., and Li, T. (2015) Decorin prevents retinal pigment epithelial barrier breakdown under diabetic conditions by suppressing p38 MAPK activation, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **56**, 2971-2979, doi: 10.1167/jovs.14-15874.
4. King, H., Aubert, R. E., and Herman, W. H. (1998) Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections, *Diabetes Care*, **21**, 1414-1431, doi: 10.2337/diacare.21.9.1414.
5. Shapiro, A. M., Lakey, J. R., Ryan, E. A., Korbitt, G. S., Toth, E., et al. (2000) Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using glucocorticoid-free immunosuppressive regimen, *N. Engl. J. Med.*, **343**, 230-238, doi: 10.1056/NEJM200007273430401.
6. Dadheech, N., Srivastava, A., Paranjape, N., Gupta, S., Dave, A., et al. (2015) Swertisin an anti-diabetic compound facilitate islet neogenesis from pancreatic stem/progenitor cells via p-38 MAP Kinase-SMAD pathway: an *in vitro* and *in vivo* study, *PLoS One*, **10**, e0128244, doi: 10.1371/journal.pone.0128244.
7. Eizirik, D. L., and Mandrup-Poulsen, T. (2001) A choice of death – the signal transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis, *Diabetologia*, **44**, 2115-2133, doi: 10.1007/s001250100021.
8. Cone, J. B. (2001) Inflammation, *Am. J. Surg.*, **182**, 558-562, doi: 10.1016/s0002-9610(01)00822-4.
9. Eizirik, D. L., Colli, M. L., and Ortis, F. (2009) The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes, *Nat. Rev. Endocrinol.*, **5**, 219-226, doi: 10.1038/nrendo.2009.21.
10. Kleinert, M., Clemmensen, C., Hofmann, S. M., Moore, M. C., Renner, S., et al. (2018) Animal models of obesity and diabetes mellitus, *Nat. Rev. Endocrinol.*, **14**, 140-162, doi: 10.1038/nrendo.2017.161.
11. Furman, B. L. (2015) Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats, *Curr. Protoc. Pharmacol.*, **70**, 5.47.1-5.47.20, doi: 10.1002/0471141755.ph0547s70.
12. Diab, R. A., Fares, M., Abedi-Valugerdi, M., Kumagai-Braesch, M., Holgersson, J., et al. (2015) Immunotoxicological effects of streptozotocin and alloxan: *in vitro* and *in vivo* studies, *Immunol. Lett.*, **163**, 193-198, doi: 10.1016/j.imlet.2014.12.006.
13. Pearson, J. A., Wong, F. S., and Wen, L. (2016) The importance of the Non Obese Diabetic (NOD) mouse model in autoimmune diabetes, *J. Autoimmun.*, **66**, 76-88, doi: 10.1016/j.jaut.2015.08.019.
14. Bergholdt, R., Nerup, J., and Pociot, F. (2005) Fine mapping of a region on chromosome 21q21.11-q22.3 showing linkage to type 1 diabetes, *J. Med. Genet.*, **42**, 17-25, doi: 10.1136/jmg.2004.022004.
15. Steck, A. K., and Rewers, M. J. (2011) Genetics of type 1 diabetes, *Clin. Chem.*, **57**, 176-185, doi: 10.1373/clinchem.2010.148221.
16. Barret, J. C., Clayton, D. G., Concannon, P., Akolkar, B., Cooper, J. D., et al. (2009) Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes, *Nat. Genet.*, **41**, 703-707, doi: 10.1038/ng.381.
17. Imkamp, A. K., and Gulliford, M. C. (2011) Trends in type 1 diabetes incidence in the UK in 0- to 14-year-olds and in 15- to 34-year-olds, 1991-2008, *Diabet. Med.*, **28**, 811-814, doi: 10.1111/j.1464-5491.2011.03288.x.
18. Adams, D. D., Adams, Y. J., Knight, J. G., McCall, J., White, P., et al. (1984) A solution to the genetic and environmental puzzles of insulin-dependent diabetes mellitus, *Lancet*, **323**, 420-424, doi: 10.1016/s0140-6736(84)91753-7.
19. Rewers, M., and Ludvigsson, J. (2016) Type 1 diabetes. Environmental risk factors for type 1 diabetes, *Lancet*, **387**, 2340-2348, doi: 10.1016/S0140-6736(16)30507-4.
20. Pietropaolo, M., Surhigh, J. M., Nelson, P. W., and Eisenbarth, G. S. (2008) Primer: immunity and autoimmunity, *Diabetes*, **57**, 2872-2882, doi: 10.2337/db07-1691.
21. Zipris, D. (2008) Innate immunity and its role in type 1 diabetes, *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.*, **15**, 326-331, doi: 10.1097/MED.0b013e3283073a46.
22. Delaney, C. A., Dunger, A., Di Matteo, M., Cunningham, J. M., Green, M. H., et al. (1995) Comparison of inhibition of glucose-stimulated insulin secretion in rat islets of Langerhans by streptozotocin and methyl and ethyl nitrosoureas and methanesulphonates. Lack of correlation with nitric oxide-releasing or O6-alkylating ability, *Biochem. Pharmacol.*, **50**, 2015-2020, doi: 10.1016/0006-2952(95)02102-7.
23. Jaeschke, A., Rincón, M., Doran, B., Reilly, J., Neuberg, D., et al. (2005) Disruption of the Jnk2 (Mapk9) gene reduces destructive insulinitis and diabetes in a mouse model of type I diabetes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 6931-6935, doi: 10.1073/pnas.0502143102.
24. Cheon, H., Cho, J. M., Kim, S., Baek, S. H., Lee, M. K., et al. (2010) Role of JNK activation in pancreatic beta-cell death by streptozotocin, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **321**, 131-137, doi: 10.1016/j.mce.2010.02.016.
25. Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006) Pathogen recognition and innate immunity, *Cell*, **124**, 783-801, doi: 10.1016/j.cell.2006.02.015.
26. Takeda, K., Kaisho, T., and Akira, S. (2003) Toll-like receptors, *Annu. Rev. Immunol.*, **21**, 335-376, doi: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141126.
27. Medzhitov, R., and Janeway, Jr. C. A. (1997) Innate immunity: impact on the adaptive immune response, *Curr. Opin. Immunol.*, **9**, 4-9, doi: 10.1016/s0952-7915(97)80152-5.
28. De Nardo, D. (2015) Toll-like receptors: activation, signalling and transcriptional modulation, *Cytokine*, **74**, 181-189, doi: 10.1016/j.cyto.2015.02.025.
29. Lien, E., and Zipris, D. (2009) The role of toll-like receptor pathways in the mechanism of type 1 diabetes, *Curr. Mol. Med.*, **9**, 52-68, doi: 10.2174/156652409787314453.
30. Morran, M. P., Omenn, G. S., and Pietropaolo, M. (2008) Immunology and genetics of type 1 diabetes, *Mt. Sinai. J. Med.*, **75**, 314-327, doi: 10.1002/msj.20052.
31. Meyers, A. J., Shah, R. R., Gottlieb, P. A., and Zipris, D. (2010) Altered Toll-like receptor signaling pathways in human type 1 diabetes, *J. Mol. Med. (Berl)*, **88**, 1221-1231, doi: 10.1007/s00109-010-0666-6.
32. Dong, B., Qi, D., Yang, L., Huang, Y., Xiao, X., et al. (2012) TLR4 regulates cardiac lipid accumulation and diabetic heart disease in the nonobese diabetic mouse model of type 1 diabetes, *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, **303**, H732-742, doi: 10.1152/ajpheart.00948.2011.
33. Xie, Z., Huang, G., Wang, Z., Luo, S., Zheng, P., and Zhou, Z. (2018) Epigenetic regulation of Toll-like receptors and its roles in type 1 diabetes, *J. Mol. Med. (Berl)*, **96**, 741-751, doi: 10.1007/s00109-018-1660-7.
34. Devaraj, S., Dasu, M. R., Rockwood, J., Winter, W., Griffen, S. C., et al. (2008) Increased toll-like receptor

- (TLR) 2 and TLR4 expression in monocytes from patients with type 1 diabetes: further evidence of a proinflammatory state, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **93**, 578-583, doi: 10.1210/jc.2007-2185.
35. Wong, F. S., Hu, C., Zhang, L., Du, W., Alexopoulou, L., et al. (2008) The role of Toll-like receptors 3 and 9 in the development of autoimmune diabetes in NOD mice, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1150**, 146-148, doi: 10.1196/annals.1447.039.
 36. Tai, N., Wong, F. S., and Wen, L. (2016) The role of the innate immune system in destruction of pancreatic beta cells in NOD mice and humans with type 1 diabetes, *J. Autoimmun.*, **71**, 26-34, doi: 10.1016/j.jaut.2016.03.006.
 37. Kim, Y. H., Kim, S., Kim, K. A., Yagita, H., Kayagaki, N., et al. (1999) Apoptosis of pancreatic beta-cells detected in accelerated diabetes of NOD mice: no role of Fas-Fas ligand interaction in autoimmune diabetes, *Eur. J. Immunol.*, **29**, 455-465, doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199902)29:02<455::AID-IMMU455>3.0.CO;2-A.
 38. O'Brien, B. A., Harmon, B. V., Cameron, D. P., and Allan, D. J. (1997) Apoptosis is the mode of beta-cell death responsible for the development of IDDM in the non-NLRP3 obese diabetic (NOD) mouse, *Diabetes*, **46**, 750-757, doi: 10.2337/diab.46.5.750.
 39. Gepts, W. (1965) Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus, *Diabetes*, **14**, 619-633, doi: 10.2337/diab.14.10.619.
 40. Drescher, K. M., and Tracy, S. (2008) The CVB and Etiology of Type 1 Diabetes, in *Group B Coxsackieviruses. Current Topics in Microbiology and Immunology* (Tracy, S., Oberste, M. S., and Drescher, K. M., eds.) Vol 323, Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 259-274, doi: 10.1007/978-3-540-75546-3_12.
 41. Hosokawa, Y., Hanafusa, T., and Imagawa, A. (2019) Pathogenesis of fulminant type 1 diabetes: Genes, viruses and the immune mechanism, and usefulness of patient-derived induced pluripotent stem cells for future research, *J. Diabetes. Invest.*, **10**, 1158-1164, doi: 10.1111/jdi.13091.
 42. Trudeau, J. D., Dutz, J. P., Arany, E., Hill, D. J., Fieldus, W. E., et al. (2000) Neonatal beta-cell apoptosis: a trigger for autoimmune diabetes? *Diabetes*, **49**, 1-7, doi: 10.2337/diabetes.49.1.1.
 43. Turley, S., Poirot, L., Hattori, M., Benois, C., and Mathis, D. (2003) Physiological beta cell death triggers priming of self-reactive T cells by dendritic cells in a type-1 diabetes model, *J. Exp. Med.*, **198**, 1527-1537, doi: 10.1084/jem.20030966.
 44. O'Brien, B. A., Huang, Y., Geng, X., Dutz, J. P., and Finegood, D. T. (2002) Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages from NOD mice is reduced, *Diabetes*, **51**, 2481-2488, doi: 10.2337/diabetes.51.8.2481.
 45. Kim, H. S., Han, M. S., Chung, K. W., Kim, S., Kim, E., et al. (2007) Toll-like receptor 2 senses beta-cell death and contributes to the initiation of autoimmune diabetes, *Immunity*, **27**, 321-333, doi: 10.1016/j.immuni.2007.06.010.
 46. Lee, M. S., Kim, D. H., Lee, J. C., Kim, S., and Kim, H. S. (2011) Role of TLR2 in the pathogenesis of autoimmune diabetes and its therapeutic implication, *Diabetes Metab. Res. Rev.*, **27**, 797-801, doi: 10.1002/dmrr.1231.
 47. Sims, E. K., Evans-Molina, C., Tersey, S. A., Eizirik, D. L., and Mirmira, R. G. (2018) Biomarkers of islet beta cell stress and death in type 1 diabetes, *Diabetologia*, **61**, 2259-2265, doi: 10.1007/s00125-018-4712-1.
 48. Mirmira, R. G., Sims, E. K., Syed, F., and Evans-Molina, C. (2016) Biomarkers of β -cell stress and death in type 1 diabetes, *Curr. Diab. Rep.*, **16**, 95, doi: 10.1007/s11892-016-0783-x.
 49. Brownlee, M. (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications, *Nature*, **414**, 813-820, doi: 10.1038/414813a.
 50. Lankin, V. Z., and Tikhaze, A. K. (2017) Role of oxidative stress in the genesis of atherosclerosis and diabetes mellitus: a personal look back on 50 years of research, *Curr. Aging. Sci.*, **10**, 18-25, doi: 10.2174/1874609809666160926142640.
 51. Miranda-Díaz, A. G., Pazarín-Villaseñor, L., Yanowsky-Escatell, F. G., and Andrade-Sierra, J. (2016) Oxidative stress in diabetic nephropathy with early chronic kidney disease, *J. Diabetes Res.*, **2016**, 7047238, doi: 10.1155/2016/7047238.
 52. Maise, K. (2015) New insights for oxidative stress and diabetes mellitus, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2015**, 875961, doi: 10.1155/2015/875961.
 53. Savastio, S., Cadario, F., Genoni, G., Bellomo, G., Bagnati, M., et al. (2016) Vitamin D deficiency and glycemic status in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus, *PLoS One*, **11**, e0162554, doi: 10.1371/journal.pone.0162554.
 54. Ceriello, A. (2003) New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a "causal" antioxidant therapy, *Diabetes Care*, **26**, 1589-1596, doi: 10.2337/diacare.26.5.1589.
 55. Boudina, S., and Abel, E. D. (2007) Diabetic cardiomyopathy revisited, *Circulation*, **115**, 3213-3223, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.679597.
 56. Kaneto, H., Matsuoka, T. A., Katakami, N., Kawamori, D., Miyatsuka, T., et al. (2007) Oxidative stress and the JNK pathway are involved in the development of type 1 and type 2 diabetes, *Curr. Mol. Med.*, **7**, 674-686, doi: 10.2174/156652407782564408.
 57. Brownlee, M. (1995) Advanced protein glycosylation in diabetes and aging, *Annu. Rev. Med.*, **46**, 223-234, doi: 10.1146/annurev.med.46.1.223.
 58. Dallak, M. M., Mikhailidis, D. P., Haidara, M. A., Bin-Jalilah, I. M., Tork, O. M., et al. (2008) Oxidative stress as a common mediator for apoptosis induced-cardiac damage in diabetic rats, *Open Cardiovasc. Med. J.*, **2**, 70-78, doi: 10.2174/1874192400802010070.
 59. Johansen, J. S., Harris, A. K., Rychly, D. J., and Ergul, A. (2005) Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice, *Cardiovasc. Diabetol.*, **4**, 5-11, doi: 10.1186/1475-2840-4-5.
 60. Forstermann, U. (2008) Oxidative stress in vascular disease: causes, defence mechanisms and potential therapies, *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.*, **5**, 338-349, doi: 10.1038/ncpcardio1211.
 61. Karunakaran, U., and Park, K. G. (2013) A systematic review of oxidative stress and safety of antioxidants in diabetes: focus on islets and their defense, *Diabetes Metab. J.*, **37**, 106-112, doi: 10.4093/dmj.2013.37.2.106.
 62. Wojnar, W., Zych, M., and Kaczmarczyk-Sedlak, I. (2018) Antioxidative effect of flavonoid naringenin in the lenses of type 1 diabetic rats, *Biomed. Pharmacother.*, **108**, 974-984, doi: 10.1016/j.biopha.2018.09.092.
 63. Czerwińska, M. E., Gasińska, E., Leśniak, A., Krawczyk, P., Kiss, A. K., et al. (2018) Inhibitory effect of Ligustrum vulgare leaf extract on the development of neuropathic pain in a streptozotocin-induced rat model of diabetes, *Phytomedicine*, **49**, 75-82, doi: 10.1016/j.phymed.2018.06.006.
 64. Rochette, L., Zeller, M., Cottin, Y., and Vergely, C. (2014) Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1840**, 2709-2729, doi: 10.1016/j.bbagen.2014.05.017.
 65. Thakur, P., Kumar, A., and Kumar, A. (2018) Targeting oxidative stress through antioxidants in diabetes mellitus, *J. Drug. Target.*, **26**, 766-776, doi: 10.1080/1061186X.2017.1419478.
 66. Piganelli, J. D., Flores, S. C., Cruz, C., Koepp, J., Batinic-Haberle, I., Crapo, J., et al. (2002) A metallopor-

- phyrin-based superoxide dismutase mimic inhibits adoptive transfer of autoimmune diabetes by a diabetogenic T-cell clone, *Diabetes*, **51**, 347-355, doi: 10.2337/diabetes.51.2.347.
67. Mahadevan, J., Parazzoli, S., Oseid, E., Hertz, A. V., Bernlohr, D. A., et al. (2013) Ebselen treatment prevents islet apoptosis, maintains intranuclear Pdx1 and MafA levels, and preserves β -cell mass and function in ZDF rats, *Diabetes*, **62**, 3582-3588, doi: 10.2337/db13_0357.
 68. Gordeeva, A. E., Sharapov, M. G., Tikhonova, I. V., Chemeris, N. K., Fesenko, E. E., et al. (2017) Vascular pathology of ischemia/reperfusion injury of rat small intestine, *Cells Tissues Organs*, **203**, 353-364, doi: 10.1159/000455830.
 69. Sharapov, M. G., Goncharov, R. G., Gordeeva, A. E., Novoselov, V. I., Antonova, O. A., et al. (2016) Enzymatic antioxidant system of endotheliocytes, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **471**, 410-412, doi: 10.1134/S1607672916060090.
 70. Karaduleva, E. V., Mubarakshina, E. K., Sharapov, M. G., Volkova, A. E., Pimenov, O. Y., et al. (2016) Cardioprotective effect of modified peroxiredoxins in retrograde perfusion of isolated rat heart under conditions of oxidative stress, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **160**, 639-642, doi: 10.1007/s10517-016-3237-1.
 71. Fisher, A. B., Vasquez-Medina, J. P., Dodia, C., Sorokina, E. M., Tao, J.-Q., et al. (2018) Peroxiredoxin 6 phospholipid hydroperoxidase activity in the repair of peroxidized cell membranes, *Redox Biol.*, **14**, 41-46, doi: 10.1016/j.redox.2017.08.008.
 72. Fisher, A. B. (2017) Peroxiredoxin 6 in the repair of peroxidized cell membranes and cell signaling, *Arch. Biochem. Biophys.*, **617**, 68-83, doi: 10.1016/j.abb.2016.12.003.
 73. Wang, Y., Feinstein, S. I., Manevich, Y., Ho, Y.-S., and Fisher, A. B. (2004) Lung injury and mortality with hyperoxia are increased in peroxiredoxin 6 gene-targeted mice, *Free Radic. Biol. Med.*, **37**, 1736-1743, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.09.006.
 74. Liu, G., Feinstein, S. I., Wang, Y., Dodia, C., Fisher, D., et al. (2010) Comparison of glutathione peroxidase 1 and peroxiredoxin 6 in protection against oxidative stress in the mouse lung, *Free Radic. Biol. Med.*, **49**, 1172-1181, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.07.002.
 75. Kaneto, H., Kajimoto, Y., Miyagawa, J., Matsuoka, T., Fujitani, Y., et al. (1999) Beneficial effects of antioxidants in diabetes – possible protection of pancreatic beta-cells against glucose toxicity, *Diabetes*, **48**, 2398-2406, doi: 10.2337/diabetes.48.12.2398.
 76. Lei, X. G., and Vatamaniuk, M. Z. (2011) Two tales of antioxidant enzymes on β cells and diabetes, *Antioxid. Redox. Signal.*, **14**, 489-503, doi: 10.1089/ars.2010.3416.
 77. Miki, A., Ricordi, C., Sakuma, Y., Yamamoto, T., Misawa, R., et al. (2018) Divergent antioxidant capacity of human islet cell subsets: a potential cause of beta-cell vulnerability in diabetes and islet transplantation, *PLoS One*, **13**, e0196570, doi: 10.1371/journal.pone.0196570.
 78. Malaisse, W. J., Malaisse-Lagae, F., Sener, A., and Pipeleers, D. G. (1982) Determinants of the selective toxicity of alloxan to the pancreatic B cell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 927-930, doi: 10.1073/pnas.79.3.927.
 79. Novoselova, E. G., Glushkova, O. V., Lunin, S. M., Khrenov, M. O., Parfenyuk, S. B., et al. (2020) Peroxiredoxin 6 attenuates alloxan-induced type 1 diabetes mellitus in mice and cytokine-induced cytotoxicity in RIN-m5F beta cells, *J. Diabetes Res.*, **2020**, 7523892, doi: 10.1155/2020/7523892.
 80. Novoselova, E. G., Glushkova, O. V., Parfenyuk, S. B., Khrenov, M. O., Lunin, S. M., et al. (2019) Protective effect of peroxiredoxin 6 against toxic effects of glucose and cytokines in pancreatic RIN-m5F β -cells, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 637-643, doi: 10.1134/S0006297919060063.
 81. Monnier, L., Mas, E., Ginnet, C., Michel, F., Villon, L., et al. (2006) Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes, *JAMA*, **295**, 1681-1687, doi: 10.1001/jama.295.14.1681.
 82. Novoselova, E. G., Glushkova, O. V., Lunin, S. M., Khrenov, M. O., Parfenyuk, S. B., et al. (2021) Thymulin and peroxiredoxin 6 have protective effects against streptozotocin induced type 1 diabetes in mice, *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, **35**, 1-10, doi: 10.1177/20587384211005645.
 83. Radenković, M., Stojanović, M., and Prostran, M. (2016) Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: the current state of the art, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **78**, 13-31, doi: 10.1016/j.vascn.2015.11.004.
 84. Lenzen, S. (2008) The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes, *Diabetologia*, **51**, 216-226, doi: 10.1007/s00125-007-0886-7.
 85. Elsner, M., Guldbakke, B., Tiedge, M., Munday, R., and Lenzen, S. (2000) Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin, *Diabetologia*, **43**, 1528-1533, doi: 10.1007/s00125005156.
 86. Novoselova, E. G., Glushkova, O. V., Lunin, S. M., Khrenov, M. O., Novoselova, T. V., et al. (2016) Signaling, stress response and apoptosis in pre-diabetes and diabetes: restoring immune balance in mice with alloxan-induced type 1 diabetes mellitus, *Int. Immunopharmacol.*, **31**, 24-31, doi: 10.1016/j.intimp.2015.11.007.
 87. Katunuma, N., Matsui, A., Le, Q. T., Utsumi, K., Salvesen, G., et al. (2001) Novel procaspase-3 activating cascade mediated by lysoapoptases and its biological significances in apoptosis, *Adv. Enzyme Regul.*, **41**, 237-250, doi: 10.1016/S0065-2571(00)00018-2.
 88. Paula, F. M., Ferreira, S. M., Boschero, A. C., and Souza, K. L. (2013) Modulation of the peroxiredoxin system by cytokines in insulin-producing RINm5F cells: down-regulation of PRDX6 increases susceptibility of beta cells to oxidative stress, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **374**, 56-64, doi: 10.1016/j.mce.2013.04.009.
 89. Chhunchha, B., Fatma, N., Kubo, E., Rai, P., Singh, S. P., et al. (2013) Curcumin abates hypoxia-induced oxidative stress based-ER stress-mediated cell death in mouse hippocampal cells (HT22) by controlling Prdx6 and NF-kappaB regulation, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **304**, 636-655, doi: 10.1152/ajpcell.00345.2012.
 90. Pak, J. H., Son, W. C., Seo, S. B., Hong, S. J., Sohn, W. M., et al. (2016) Peroxiredoxin 6 expression is inversely correlated with nuclear factor-kappaB activation during *Clonorchis sinensis* infestation, *Free Radic. Biol. Med.*, **99**, 273-285, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.08.016.
 91. Sharapov, M. G., Glushkova, O. V., Parfenyuk, S. B., Gudkov, S. V., Lunin, S. M., et al. (2021) The role of TLR4/ NF- κ B signaling in the radioprotective effects of exogenous Prdx6, *Arch. Biochem. Biophys.*, **702**, 108830, doi: 10.1016/j.abb.2021.108830.
 92. Novoselova, E. G., Glushkova, O. V., Khrenov, M. O., Parfenyuk, S. B., Lunin, S. M., et al. (2020) Participation of Hsp70 and Hsp90 α heat shock proteins in stress response in the course of type 1 diabetes mellitus, *Dokl. Biol. Sci.*, **493**, 124-127, doi: 10.1134/S0012496620040079.
 93. Novoselova, E. G., Khrenov, M. O., Parfenyuk, S. B., Novoselova, T. V., Lunin, S. M., et al. (2014) The NF- κ B, IRF3, and SAPK/JNK signaling cascades of animal immune cells and their role in the progress of type 1 diabetes mellitus, *Dokl. Biol. Sci.*, **457**, 255-257, doi: 10.1134/S0012496614040073.
 94. Wieten, L., Broere, F., van der Zee, R., Koerkamp, E. K., Wagenaar, J., et al. (2007) Cell stress induced HSP

- are targets of regulatory T cells: a role for HSP inducing compounds as anti-inflammatory immuno-modulators, *FEBS Lett.*, **581**, 3716-3722, doi: 10.1016/j.febslet.2007.04.082.
95. Van Eden, W., Wick, G., Albani, S., and Cohen, I. (2007) Stress, heat shock proteins, and autoimmunity: how immune responses to heat shock proteins are to be used for the control of chronic inflammatory diseases, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1113**, 217-237, doi: 10.1196/annals.1391.020.
96. Pacifici, F., Arriga, R., Sorice, G. P., Capuani, B., Scioli, M. G., et al. (2014) Peroxiredoxin 6, a novel player in the pathogenesis of diabetes, *Diabetes*, **63**, 3210-3220, doi: 10.2337/db14-0144.
97. Arriga, A., Pacifici, F., Capuani, B., Coppola, A., Orlandi, A., et al. (2019) Peroxiredoxin 6 is a key antioxidant enzyme in modulating the link between glycemic and lipogenic metabolism, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2019**, 9685607, doi: 10.1155/2019/9685607.

THE ROLE OF INNATE IMMUNITY AND OXIDATIVE STRESS IN THE DEVELOPMENT OF TYPE 1 DIABETES MELLITUS. PEROXIREDOXIN 6 AS A NEW ANTI-DIABETIC AGENT

Review

**E. G. Novoselova*, O. V. Glushkova, M. O. Khrenov,
S. M. Lunin, T. V. Novoselova, and S. B. Parfenuyk**

*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino,
Moscow Region, Russia; E-mail: elenanov_06@mail.ru*

The review discusses information on the development of type 1 diabetes mellitus (T1D) as a systemic autoimmune and inflammatory disease. The review focuses on the role of the innate immune system, including the activation of some signaling cascades, cytokine response, and the activity of Toll-like receptors in the development of T1D. Dysfunction of innate immunity is the cause of the attack of T-lymphocytes on the own pancreatic beta cells and leads to the death of pancreatic beta cells that produce insulin. Lack of insulin causes hyperglycemia and the need for life-long injections of insulin in patients with T1D, which, nevertheless, does not exclude damage to many organs and tissues, given the particular vulnerability of blood vessels in conditions of hyperglycemia. The review discusses the role of oxidative stress as a factor that plays a major role in damage to the vascular system and pancreatic tissue during the development of T1D. Taking into account the special vulnerability of pancreatic beta cells to the action of ROS, the possibility of using antioxidants to reduce the level of pathological consequences of the development of T1D is discussed. New information on the anti-diabetic activity of the exogenous antioxidant enzyme peroxiredoxin 6, which is capable of penetrating cells, activating insulin production in beta cells, reducing ROS levels, as well as decreasing the activation of some signaling cascades, the production of pro-inflammatory cytokines, and the expression of Toll-like receptors in beta cells and in immune cells under T1D development is discussed.

Keywords: peroxiredoxin 6, hyperglycemia, cytokines, RIN-m5F beta cells, insulin production, NF- κ B and JNK signaling cascades

УДК 577.355; 577.115.3

ДЕЙСТВИЕ НИЗКИХ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ТЕМПЕРАТУР НА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЙ АППАРАТ МИКРОВОДОРОСЛИ *Lobosphaera incisa* IPPAS C-2047

© 2021 В.В. Птушенко^{1,2*}, Г.Н. Бондаренко³, Е.Н. Виноградова^{4,5}, Е.С. Глаголева⁴,
О.В. Карпова⁴, О.С. Птушенко⁴, А.Е. Соловченко⁴, Б.В. Трубицин⁶,
О.Б. Чивкунова⁴, К.А. Шибзухова⁴, П.Н. Щербаков⁴

¹ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет 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 Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, физический факультет, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 25.09.2021

После доработки 04.11.2021

Принята к публикации 10.11.2021

Фотосинтезирующие организмы обладают рядом механизмов для предотвращения фотоокислительных реакций, инициированных в фотосинтетическом аппарате (ФСА) избыточным освещением. Причиной развития фотоокислительных реакций может служить не только увеличение интенсивности освещения, но и другие стрессовые воздействия, в частности, действие низких положительных температур. В настоящей работе мы исследовали индукцию фотозащитных механизмов у инкубируемой при пониженной освещённости (50 мкмоль фотонов \times м⁻² \times с⁻¹) зеленой почвенной микроводоросли *Lobosphaera incisa* IPPAS C-2047 после воздействия температуры 0 °С в течение 4 сут. Мы наблюдали снижение фотохимической активности фотосистемы II (ФСII) и эффективности фотосинтетического транспорта электронов на фоне существенного увеличения теплового рассеяния в фотосинтетической антенне поглощённой световой энергии. При этом большинство параметров, отражающих акклимацию ФСА к избыточному освещению (содержание хлорофилла и каротиноидов, доля пигментов виолаксантинового цикла в общем пуле каротиноидов и уровень их деэпоксидации, соотношение содержания фотосинтетических антенн и комплексов ФСII и фотосистемы I (ФСI)), практически не изменилось. Изменений в содержании основных ненасыщенных жирных кислот, кроме арахидоновой, также выявлено не было; концентрация последней возросла на 40%, что может способствовать активации виолаксантиндеэпоксидазы. Уровень экспрессии защитного белка LhcSR повышался в 4–7 раз по сравнению с его уровнем непосредственно перед началом низкотемпературной акклимации клеток. Предварительная инкубация клеток при +5 °С оказывала положительный эффект на показатели фотохимической активности ФСА при последующем действии температуры 0 °С. Полученные данные показывают, что акклимация *L. incisa* IPPAS C-2047 в течение 4 сут. к низкой положительной температуре на фоне низкой плотности светового потока приводит к формированию адаптивной реакции ФСА, отчасти характерной для условий светового стресса. Основным механизмом защиты ФСА в этих условиях является белок (LhcSR)-зависимое тушение возбуждения в фотосинтетической антенне.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: световой стресс, низкотемпературная акклимация, десатурация жирных кислот, арахидоновая кислота, тепловая диссипация энергии света, LhcSR, микроводоросли.

DOI: 10.31857/S0320972521120095

ВВЕДЕНИЕ

Фотосинтезирующие организмы характеризуются наличием эффективной системы погло-

щения энергии света для осуществления энергоакцепторных биохимических реакций [1–4], однако поглощение избыточной энергии света может инициировать фотоокислительные реак-

Принятые сокращения: АК – арахидоновая кислота; Ант – антераксантин; ВДЭ – виолаксантиндеэпоксидаза; ВЛЗ – пигменты виолаксантинового цикла (Вио, Ант, Зеа); Вио – виолаксантин; ЖК – жирные кислоты; Зеа – зеаксантин; Кар – каротиноиды; Лют – лютеин; НЖК – ненасыщенные жирные кислоты; НФТ – нефотохимическое тушение; СБМ – сухая биомасса; ФСII (ФСI) – фотосистема II (I); ФСА – фотосинтетический аппарат; Хл – хлорофилл; DE – коэффициент деэпоксидации.

* Адресат для корреспонденции.

ции в фотосинтетическом аппарате (ФСА), приводящие к повреждению организма [5]. Для предотвращения их развития фототрофы выработали ряд защитных механизмов. Важнейшим механизмом защиты ФСА от светового стресса является тушение возбужденных форм хлорофилла с рассеянием энергии в виде тепла. Этот процесс сопровождается легко детектируемым снижением интенсивности флуоресценции хлорофилла, поэтому его часто называют также нефотохимическим тушением флуоресценции (НФТ). Ключевыми детерминантами НФТ являются состав и содержание пигментов, в первую очередь, дезэпоксицианированных форм ксантофиллов (зеаксантина, Зеа, и лютеина, Лют [6, 7]), а также содержание фотопротекторного белка LhcSR, родственного белкам светособирающей антенны. Этот белок присутствует преимущественно у низших растений [8, 9]. У сосудистых растений он замещается своим функциональным аналогом – белком PsbS, являющимся компонентом фотосистемы II (ФСII), а у представителей промежуточных групп (из которых наиболее изученным является мох *Physcomitrella patens*) функционируют оба белка [10]. Показано, что содержание универсальных для растительного мира каротиноидов Лют, Зеа и Ант [11, 12], а также нескольких характерных для водорослей дополнительных дезэпоксицианированных ксантофиллов [13] коррелирует с индукцией НФТ, в то время как эпоксицианированный ксантофилл виолаксантин либо не участвует в НФТ [14], либо ингибирует его индукцию [15]. Получены доказательства непосредственного участия зеаксантина в НФТ как необходимого фотохимического компонента [16], хотя в некоторых работах высказываются сомнения в необходимости зеаксантина для индукции НФТ [17]. LhcSR может связывать зеаксантин и осуществлять как зеаксантин-зависимое, так и зеаксантин-независимое НФТ в фотосинтетической антенне [18]. Нарушение экспрессии LhcSR в результате мутагенеза приводит к заметному снижению НФТ и жизнеспособности клеток при интенсивном освещении [8].

НФТ служит механизмом «быстрого реагирования» ФСА на световой стресс. На более длительных промежутках времени в процесс акклимации организма к избыточному освещению включаются и другие механизмы. К ним относятся изменения в соотношении пигмент-белковых комплексов обеих фотосистем (ФС I и ФС II) и фотосинтетических антенных (светособирающих) комплексов (ССК), а также изменения общего содержания компонентов ФСА в клетке [19, 20]. Каротиноиды, в дополнение к упомянутой выше роли их дезэпоксицианированных

кислородсодержащих форм в обеспечении НФТ, способны дезактивировать активные формы кислорода, возникающие в ФСА в условиях избыточного освещения [21, 22]. Поэтому для растений характерно увеличение содержания каротиноидов по отношению к хлорофиллу при длительной акклимации к интенсивному свету [23–27].

Индукция механизмов защиты от избыточного освещения возникает не только в условиях высокой инсоляции. В неблагоприятных условиях, снижающих интенсивность протекания метаболических процессов в организме, ФСА не в состоянии полностью утилизировать поглощаемую световую энергию, что также может привести к фотоокислительному повреждению клетки и организма [5]. К таким неблагоприятным условиям относится понижение температуры окружающей среды, вызывающее снижение текучести мембран клеток, подавляющее фотосинтетический метаболизм, и вовлечение продуктов ассимиляции в процессы роста и морфогенеза растения. В результате развивается световой стресс и ответ ФСА на него. При действии низких температур на фоне интенсивного освещения у растений отмечали накопление зеаксантина [28, 29]. Наряду с индукцией общих фотопротекторных реакций в ФСА, направленных на снижение возбуждения хлорофилла [30], происходит также специфическая акклимация организма к низкой температуре, в первую очередь, снижение вязкости мембраны за счёт десатурации жирных кислот (ЖК) мембранных липидов [31, 32]. До сих пор не до конца ясно, какова роль общих фотопротекторных и специфических для условий низкой температуры реакций фототрофного организма на условия светового стресса, спровоцированного понижением температуры. Очевидно, это зависит от вида самого организма (видоспецифичность), а также от интенсивности и продолжительности воздействия стрессовых факторов.

Удобной моделью для исследования этого вопроса может служить факультативная психрофильная микроводоросль *Lobosphaera incisa* IPPAS C-2047. Штамм был изолирован из почв Дальнего Востока России. Климат региона характеризуется существенными сезонными изменениями интенсивности инсоляции, температуры, формированием снежного покрова. Микроводоросли данного таксона были отмечены также на заснеженных горных склонах [33]. Учитывая характеристики мест распространения этой водоросли, можно ожидать высокую физиологическую пластичность их клеток, способность адаптироваться к резким изменениям условий обитания и формировать специфичес-

кие механизмы защиты ФСА от стрессовых воздействий.

Существенную роль в этих механизмах, согласно исследованиям последних лет, играют синтез и накопление полиненасыщенных ЖК, а также каротиноидных пигментов виолаксантинового цикла [34]. Более того, эти две компоненты (специфическая и неспецифическая) ответа на стресс, по-видимому, оказываются функционально связанными друг с другом. Ранее один из авторов этой работы высказал предположение, что образование и накопление одной из полиненасыщенных ЖК – арахидоновой кислоты (АК) – не только приводит к понижению вязкости мембраны, но и способствует повышению активности мембранного фермента виолаксантиндеэпоксидазы (ВДЭ) за счёт создания подходящего липидного микроокружения [34]. В свою очередь, ВДЭ обеспечивает относительно быстрое (в минутной шкале времени) образование антераксантина и зеаксантина, участвующих в НФТ, из предшественника виолаксантина. Однако пока остаётся неясным, является ли решающим фактором активация синтеза АК в клетке в ответ на понижение температуры или же достаточно её постоянного присутствия в клетке. Неясно также, за какие характерные времена происходит индукция НФТ и других фотопротекторных механизмов и какие из перечисленных выше механизмов играют наиболее существенную роль при акклимации микроводорослей к низкой температуре в течение нескольких суток.

В настоящей работе была поставлена цель выяснить, какую роль играют перечисленные выше механизмы защиты ФСА в акклимации микроводоросли *L. incisa* IPPAS C-2047 к низкой температуре за времена порядка нескольких суток. Для этого необходимо было решить следующие задачи: 1) охарактеризовать активацию НФТ и изменения активности ФСА микроводоросли *L. incisa* IPPAS C-2047 в результате акклимации к низкой температуре; 2) определить изменения пигментного состава и соотношения содержания пигмент-белковых комплексов ФСА, которые влияют на активность НФТ; 3) оценить изменение активности защитного белка LhcSR, ответственного за индукцию НФТ; 4) выяснить характерные изменения содержания ненасыщенных ЖК (НЖК) в клетках *L. incisa* IPPAS C-2047 при действии низкой температуры. Время наблюдения, 4 сут., было выбрано малым по сравнению с характерной длительностью экспоненциальной фазы роста культуры, но достаточным для индукции всех рассмотренных механизмов акклимации. Полученные результаты позволяют утверждать, что в наших условиях основным защитным механиз-

мом служит белок (LhcSR)-зависимое НФТ, а среди НЖК наиболее существенно возрастает содержание АК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Условия культивирования микроводорослей и отбор проб. В качестве модельного объекта была выбрана *Lobosphaera incisa* IPPAS C-2047 – почвенная зелёная микроводоросль из класса Trebouxiophyceae (Chlorophyta). Суспензионную культуру микроводорослей объёмом 600 мл выращивали в фотобиореакторе в 0,7-литровой стеклянной колонне (внутренний диаметр 45 мм) при температуре 25–26 °С, постоянном барботировании среды отфильтрованным атмосферным воздухом 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 4 сут., после чего снова проводили отбор проб. Одновременно отбирали пробы из контрольной культуры, не подвергавшейся воздействию низкой температуры.

Для другой части экспериментов культуру сначала охлаждали до 5 °С и инкубировали при 5 °С в течение 4 сут., затем охлаждали до 0 °С и инкубировали при 0 °С ещё 4 сут., после чего проводили отбор проб. Пробы для биохимического анализа подвергали центрифугированию для осаждения клеток, полученный осадок замораживали при –80 °С и использовали затем для измерений (кроме измерений фотохимической активности ФСА). Для термостатирования культуры использовали охлаждающую циркуляционную баню-термостат SC100/A10 («Thermo Fisher Scientific», США), сопряжённую с культивационной колонной с помощью тонкого (не мешающего освещению культуры) змеевика, погружённого в суспензионную культуру.

Измерение фотохимической активности фотосинтетического аппарата и теплового рассеяния энергии света в фотосинтетической антенне. Указанные измерения выполняли непосредственно после отбора проб с помощью ЛР-теста [35] на импульсно-модулированном хлорофилл-флуориметре Fluor Pen FP 100 («Photon Systems Instruments», Чехия). Суспензию помещали в кварцевую кювету и адаптировали к темноте в течение 5 мин при 0 или 25 °С (для опытных и

контрольных образцов соответственно), после чего проводили измерение. Фотохимическую активность ФСА оценивали с помощью параметров F_v/F_m и ET_0/RC , характеризующих максимальную квантовую эффективность разделения зарядов в ФСII и интенсивность транспорта электронов в расчёте на один реакционный центр ФСII соответственно. Интенсивность теплового рассеяния энергии света в фотосинтетической антенне в расчёте на один реакционный центр оценивали с помощью параметра DI_0/RC [35].

Измерение сухой биомассы (СБМ). В ходе культивирования гравиметрически выполняли измерение СБМ. Клеточную суспензию (2–3 мл) осаждали на стекловолоконных фильтрах GF/F диаметром 25 мм («Whatman», США), предварительно высушенных в микроволновой печи до постоянной массы. Фильтры с осаждёнными клетками повторно высушивались. СБМ клеток в образце определяли как разность массы фильтра до и после осаждения клеток.

Измерение содержания хлорофилла и каротиноидов, анализ профиля жирных кислот. Состав жирных кислот суммарных липидов анализировали методом газовой хроматографии и масс-спектрометрии с использованием газового хроматографа Agilent 7890A («Agilent Technologies», США), оснащенного капиллярной колонкой HP5MS UI, соединенной с масс-селективным детектором Agilent 5970 («Agilent Technologies»). Экстракцию липидов проводили согласно методу Фолча [36]. Осажденную клеточную суспензию гомогенизировали в смеси хлороформ : метанол (2 : 1) с предварительным охлаждением в жидком азоте. Внутренний стандарт – 50 мкг маргариновой кислоты («Sigma», США) – добавляли в экстракты перед трансметилированием. Трансметилирование жирных кислот липидов проводили путем инкубации с 2%-ной серной кислотой в метаноле [37]. Метилловые эфиры жирных кислот экстрагировали гексаном. Относительное содержание жирных кислот определяли в весовых процентах (вес. %) от суммарного содержания в пробе.

Содержание пигментов (хлорофиллы *a* и *b*, суммарные каротиноиды) определяли в хлороформном экстракте спектрофотометрически. Регистрацию спектров поглощения экстрактов пигментов проводили в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см на спектрофотометре Agilent Cary 300 UV-Vis («Agilent Technologies»). Концентрацию хлорофиллов и каротиноидов рассчитывали по уравнениям согласно работе [38].

Анализ состава каротиноидов методом ВЭЖХ. Замороженный осадок клеточной суспензион-

ной культуры растирали в ацетоне, осаждали центрифугированием. Супернатант, содержащий экстракт хлорофиллов и каротиноидов из клеток микроводорослей, инкубировали в течение 30 мин при 0 °С и непрерывном перемешивании с хроматографическим сорбентом Ambersep 900 («Merck», Германия) для омыления хлорофилла [39]. Обработанный таким образом экстракт анализировали с помощью хроматографа Smartline («Knauer», Германия) с каротиноидной колонкой YMC30, идентификацию осуществляли на основе хроматографических стандартов («CaroteNature», Швейцария). Определяли содержание каждого каротиноида по отношению к общему содержанию каротиноидов, в том числе суммарное содержание пигментов виолаксантинового цикла (ВАЗ):

$$BAZ = \text{Вио} + \text{Ант} + \text{Зеа}. \quad (1)$$

Коэффициент дезоксидации пула ВАЗ рассчитывали по формуле:

$$DE = (3\text{еа} + 0,5 \times \text{Ант}) / (3\text{еа} + \text{Ант} + \text{Вио}). \quad (2)$$

Измерение содержания ФСI. Осадок клеточной суспензионной культуры ресуспендировали в дистиллированной воде, помещали суспензию в пластиковую (TFE) трубку и регистрировали спектр электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) с помощью спектрометра ЭПР 3-сантиметрового диапазона Varian-E4 («Varian», США) в темноте и при освещении интенсивным (1500 мкмоль фотонов \times $m^{-2} \times s^{-1}$) белым светом, который позволял полностью окислить реакционные центры ФСI. Измеряли светозависимый сигнал ЭПР с g-фактором 2,0023 и шириной около 0,9 мТл, известный в литературе как сигнал ЭПР1, который соответствует окисленному первичному донору ФСI, $P700^+$ [40]. Оценивали содержание ФСI в суспензии на основании величины сигнала ЭПР1 при освещении. Для определения абсолютной концентрации ФСI определяли двойной интеграл сигнала ЭПР1 и сравнивали его с двойным интегралом спектра спиновой зонда TEMPOamine, записанного при тех же настройках резонатора ЭПР-спектрометра.

Выделение РНК и количественная ПЦР в реальном времени. Суммарная РНК была выделена из клеток с помощью набора GeneJet Plant RNA purification («Thermo Fisher Scientific») или RNeasy Mini («Qiagen», Германия). Замороженный осадок клеточной суспензионной культуры (~ 100 мг) растирали в жидком азоте либо измельчали в гомогенизаторе Fastprep-24 5g («MP Biomedicals», США) со скоростью 6 м/с в тече-

ние 40 с в лизирующем буфере с гранулами типа А («MP Biomedicals»). Клеточный лизат осветляли центрифугированием (10 000 g, 10 мин) и далее осуществляли процедуру выделения РНК в соответствии с протоколом производителя. Синтез одноцепочечной кДНК проводили с использованием набора для обратной транскрипции Maxima 1-st strand cDNA («Thermo Fisher Scientific») или MMLV RT с обратной транскриптазой Mint («Евроген», Россия) в соответствии с протоколом производителя. Для синтеза кДНК использовали 250 нг РНК каждого из образцов. Полученную кДНК хранили при -20°C .

Подбор праймеров был выполнен с использованием программного обеспечения RealTime PCR Tool («Integrated DNA Technologies», США), доступного по ссылке <https://eu.idtdna.com/scitools/Applications/RealTimePCR/>, с параметрами по умолчанию в контигах собранного *de novo* генома *L. incisa* IPPAS C-2047, предположительно содержащих целевые гены. Присутствие целевых генов было установлено на основании выравнивания контигов из собранного *de novo* генома *L. incisa* IPPAS C-2047 с целевыми генами близкородственных водорослей (BLAST NCBI).

ПЦР в реальном времени (qPCR) проводили с использованием амплификатора QuantStudio 7 Flex («Applied Biosystems», США) или Agilent AriaMx Real-time PCR System («Agilent Technologies») и набора для qPCR QuantiTect SYBR Green («Qiagen») или qPCRMix-HS SYBR («Евроген») в соответствии с рекомендациями производителя. Для анализа результатов использовали онлайн-приложение «Thermo Fisher Scientific» для приборов серии «QuantStudio». Содержание специфических транскриптов рассчитывали относительно уровня актина и убиквитинлигазы (эндогенный контроль) в той же культуре до начала низкотемпературной акклимации.

Статистическая обработка данных. Все эксперименты выполнены с трёхкратной биологической повторностью. ЛП-тест и ПЦР в реальном времени выполнены с трёхкратной, остальные измерения – с двукратной аналитической повторностью. Все результаты представляют среднее значение (M) \pm стандартное отклонение (SD). Усреднение проводили сначала по аналитическим, затем по биологическим повторностям. SD оценивали по разбросу биологических повторностей, т.к. он существенно превосходил разброс между аналитическими. Достоверность отличия изменений измеряемых параметров от единицы оценивали на основе доверительных интервалов для математического

ожидания нормальной выборки с уровнем доверия $p = 95\%$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В ходе работы была выполнена оценка показателей активности ФСА (фотохимическая активность ФСII, эффективность фотосинтетического транспорта электронов и теплового рассеяния поглощённой световой энергии), а также характеристик ФСА, связанных с акклимацией к избыточному освещению (содержание разных форм хлорофилла и каротиноидов, в том числе уровень дезоксидации пула ксантофиллов, а также уровень экспрессии гена *LhcSR*). Также был выполнен анализ содержания НЖК в клетке. Измерения были выполнены непосредственно перед и через 4 сут. после начала непрерывной акклимации к 0°C ; далее везде приведено изменение каждого показателя в результате акклимации по отношению к состоянию до акклимации.

Время, в течение которого культуру клеток подвергали воздействию низкой температуры, было выбрано достаточно большим, чтобы дать возможность проявиться всем исследуемым в работе механизмам акклимации. Тем не менее оно является меньшим, чем характерная длительность экспоненциальной фазы роста суспензионной культуры клеток *L. incisa* IPPAS C-2047 для минимизации влияния роста культуры на измеряемые параметры. Изменение СБМ контрольной суспензии за время наблюдения составляло $(30 \pm 12)\%$. В то же время рост опытной суспензии был существенно замедлен, или даже происходила незначительная потеря биомассы, и в среднем за время наблюдения изменений СБМ не наблюдалось, значения прироста СБМ составляли $(0 \pm 20)\%$.

Кроме того, были получены культуры клеток *L. incisa* IPPAS C-2047, охлаждённые до 0°C не сразу, а предварительно инкубированные при температуре $+5^{\circ}\text{C}$ в течение 4 сут. В этом случае для описания изменений состояния ФСА в результате акклимации к 0°C также использовали отношение каждого показателя в конце акклимации к его значению непосредственно перед началом охлаждения.

Характеристики культуры перед охлаждением приведены в таблице.

Активность фотосинтетического аппарата. К концу 4-х сут. инкубации суспензии при температуре 0°C наблюдалось снижение фотохимической потенциальной активности ФСII, F_v/F_m , приблизительно в 2 раза по сравнению с исходной активностью (рис. 1). При этом квантовый выход фотоиндуцированного транспор-

Характеристики суспензионной культуры *L. incisa* IPPAS C-2047 перед началом охлаждения

СБМ (мг/мл)	$0,61 \pm 0,38$
F_v/F_m	$0,50 \pm 0,05$
DI_0/RC	$2,9 \pm 0,7$
ET_0/RC	$0,82 \pm 0,24$
НЖК (% от суммарных ЖК)	
18 : 1	17 ± 2
18 : 2	21 ± 5
18 : 3	11 ± 5
20 : 4	11 ± 4
Хл и Кар	
Хл/СБМ	$0,018 \pm 0,006$
Кар/Хл	$0,53 \pm 0,05$
Лют/Кар	50 ± 11
ВАЗ/Кар	38 ± 10
DE	21 ± 11

Примечание. Приведены средние значения \pm стандартное отклонение ($n = 6-8$).

та электронов, ET_0/RC , падал ещё более значительно. Эти изменения сопровождались возрастанием теплового рассеяния поглощённой энергии света в фотосинтетической антенне, DI_0/RC , в 4 раза. Необходимо подчеркнуть, что все эти характеристики были измерены на клетках, адаптированных к темноте. Иными словами, они не связаны с динамической, индуцируемой светом активацией теплового рассеяния световой энергии, а представляют собой постоянный (длительно релаксирующий) компонент защиты ФСА, сформировавшийся в ходе акклимации к низкой температуре. При этом в контрольной суспензии, постоянно инкубируемой при температуре $25^\circ C$, значения F_v/F_m , ET_0/RC и DI_0/RC оставались практически неизменными в течение того же времени (рис. 2).

Состав пигментов и содержание пигмент-белковых комплексов фотосинтетического аппарата. Большинство параметров, отражающих акклимацию ФСА к избыточному освещению, остались практически неизменными. Так, общее содержание хлорофилла в клетках в расчёте на единицу сухого веса, Chl/DW , через 4 сут. инку-

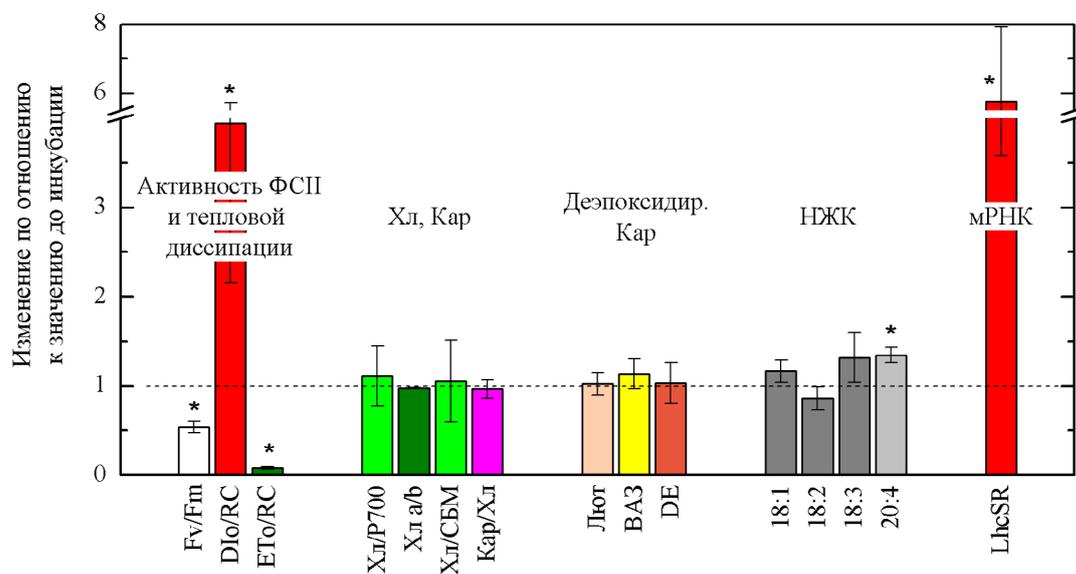


Рис. 1. Изменение показателей теплового рассеяния энергии света в фотосинтетической антенне (DI_0/RC) и фотохимической активности ФСП (F_v/F_m и ET_0/RC), содержания и состава хлорофилла, каротиноидов и ненасыщенных жирных кислот (НЖК), а также активности экспрессии LhcSR в клетках *L. incisa* IPPAS C-2047 в результате акклимации к температуре $0^\circ C$ (значение каждого параметра перед началом низкотемпературной акклимации принято за единицу). $X_{л}/P700$ и $X_{л}/СБМ$ – суммарное содержание хлорофилла (Хл) *a* и *b* в расчёте на содержание реакционных центров ФСИ (P700) или на сухую биомассу соответственно; Кар/Хл – содержание каротиноидов в расчёте на суммарное содержание Хл; $X_{л} a/b$ – соотношение содержания Хл *a* и *b*; Лют и ВАЗ – доля лютеина и пигментов виолаксантинового цикла среди всех каротиноидов соответственно. DE – коэффициент дезоксидации пула ВАЗ. 18 : *x* и 20 : 4 – доля соответствующих НЖК среди всего пула ЖК клетки. Горизонтальной пунктирной линией отмечен уровень, соответствующий отсутствию изменений. Приведены средние значения \pm стандартное отклонение ($n = 3$). Звёздочки над столбцами указывают, что изменение соответствующего показателя в ходе акклимации клеток к низкой температуре достоверно отличается от единицы с уровнем доверия $p = 95\%$

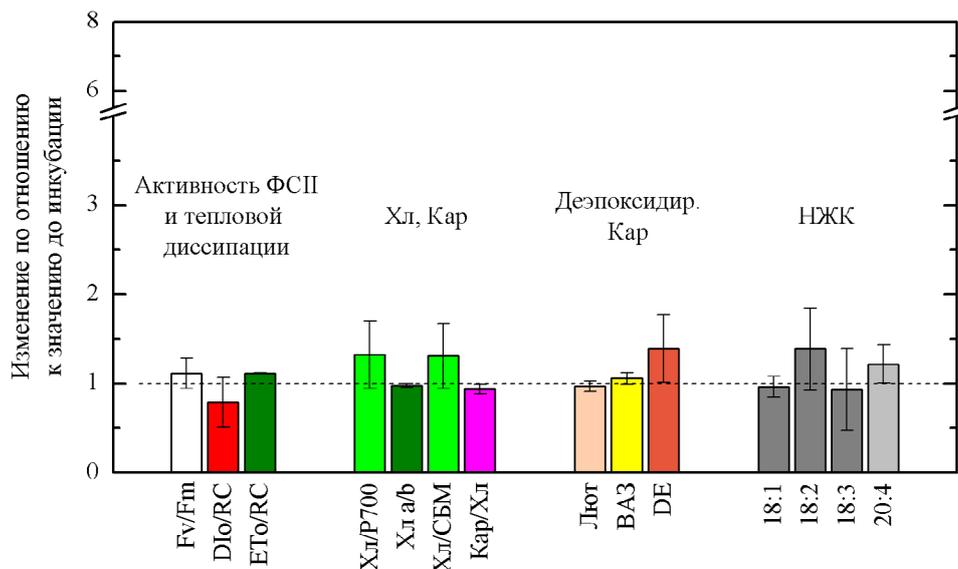


Рис. 2. Изменение показателей теплового рассеяния энергии света в фотосинтетической антенне и фотохимической активности ФСII, содержания и состава хлорофилла, каротиноидов и НЖК, а также активности экспрессии LhcSR в клетках *L. incisa* IPPAS C-2047 на 4-е сут. инкубации при нормальной температуре (25 °C) по сравнению с их значениями перед началом инкубации. Обозначения – как на рис. 1. Горизонтальной пунктирной линией отмечен уровень, соответствующий отсутствию изменений. Приведены средние значения \pm стандартное отклонение ($n = 3$)

бации при низкой температуре оставалось на том же уровне, что и до начала низкотемпературной акклимации (рис. 1). Также не изменилось соотношение содержания хлорофилла *a* и *b*, Chl *a/b*, которое характеризует соотношение фотосинтетических антенн (преимущественно комплексов внешней антенны ФСII, ЛНСII) и комплексов ФСII и ФСI. Поскольку комплексы ЛНСII содержат значительно большую долю хлорофилла *b*, чем все остальные фотосинтетические пигмент-белковые комплексы [41], то вышеуказанное соотношение комплексов, как правило, служит маркером адаптации фотосинтезирующего организма к интенсивности освещения [42, 43]. Измерения содержания комплексов ФСI, сделанные на основе сигнала ЭПР полностью окисленного первичного донора ФСI, P700, также не показали достоверных изменений содержания ФСI по отношению к общему содержанию хлорофилла, Chl/P700. Таким образом, как общее содержание ФСА в клетках *L. incisa* IPPAS C-2047, так и соотношение ключевых фотосинтетических комплексов ФСI, ФСII и ЛНСII оказалось нечувствительным к низкотемпературной акклимации выбранной нами продолжительности.

Неизменным оставалось и общее содержание каротиноидов в расчёте на хлорофилл (Car/Chl), изменение (как правило, рост) которого часто рассматривают в качестве одной из наиболее заметных реакций ФСА на условия

светового стресса [23, 44, 45]. Хроматографический анализ состава каротиноидов показал, что он также оказался нечувствительным к рассматриваемым нами стрессовым условиям. Так, ни содержание пигментов виолаксантинового пула (включающего виолаксантин, антераксантин и зеаксантин, VAZ), ни доля деэпоксицированных форм ксантофиллов среди пула VAZ, выражаемая коэффициентом деэпоксицидации, DE, не проявляла достоверных изменений. Ещё одной фотопротекторной деэпоксицированной формой ксантофиллов, хотя и неспособной к быстрой конверсии в/из эпоксицированных предшественников, считают Лют [12]; однако изменений содержания Лют мы также не наблюдали.

В контрольной суспензии мы также не наблюдали достоверных изменений содержания и состава фотосинтетических пигментов, хотя можно заметить некоторую тенденцию к изменениям содержания хлорофилла и коэффициента деэпоксицидации, что может быть обусловлено акклимацией к изменяющимся условиям роста из-за накопления биомассы и увеличения оптической плотности среды (рис. 2). Заметим, что, в отличие от контрольной суспензии, рост опытной суспензии практически отсутствует и не осложняет картину акклимации культуры к низкой температуре.

Экспрессия гена фотопротекторного белка LhcSR. Согласно общепринятому на нынешний

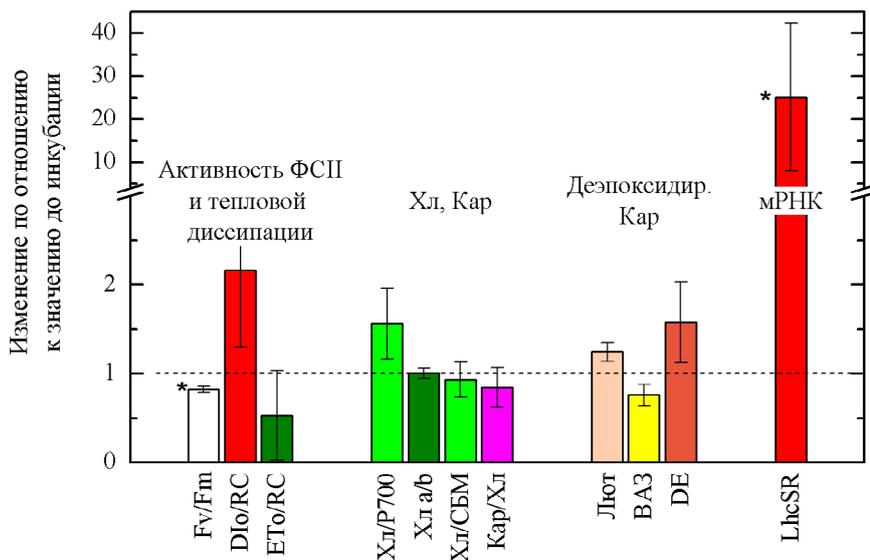


Рис. 3. Изменение показателей теплового рассеяния энергии света в фотосинтетической антенне и фотохимической активности ФСII, содержания и состава хлорофилла, каротиноидов и НЖК, а также активности экспрессии LhcSR в клетках *L. incisa* IPPAS C-2047 на 4-е сут. инкубации при низкой температуре (0 °С) после предварительной акклимации к 5 °С (опытная суспензия) по сравнению с их значениями перед началом инкубации при пониженной температуре. Обозначения – как на рис. 1. Горизонтальной пунктирной линией отмечен уровень, соответствующий отсутствию изменений. Приведены средние значения \pm стандартное отклонение ($n = 3$). Звёздочки над столбцами указывают, что изменение соответствующего показателя в ходе акклимации клеток к низкой температуре достоверно отличается от единицы с уровнем доверия $p = 95\%$

момент представлению, для низших растений ключевым компонентом защиты ФСА от избыточного освещения является LhcSR, вызывающий индукцию НФТ и принадлежащий к семейству хлорофилл-связывающих белков, подобных белкам антенны. Мы наблюдали существенный рост уровня экспрессии гена LhcSR в ходе низкотемпературной акклимации культуры клеток *L. incisa* IPPAS C-2047 (рис. 1), что свидетельствует в пользу накопления белка LhcSR в ФСА.

Изменение содержания ненасыщенных жирных кислот. Основную долю пула ЖК (до 60–70% в сумме), входящих в состав липидов *L. incisa*, составляют НЖК: олеиновая (18 : 1), линолевая (18 : 2), α - и γ -линоленовые кислоты (18 : 3), АК (20 : 4). Относительное (по отношению ко всему пулу ЖК) содержание АК в клетках заметно возросло (на 40%) в результате низкотемпературной акклимации, в то время как для других перечисленных ЖК достоверных изменений их относительного содержания в клетке не наблюдали.

Характеристики ФСА клеток *L. incisa* IPPAS C-2047, предварительно акклимированных к 5 °С. В результате акклимации клеток к температуре 0 °С после их предварительной инкубации при 5 °С также наблюдалось снижение F_v/F_m и ET_0/RC , однако не столь драматическое (рис. 3).

Тепловое рассеяние световой энергии в фотосинтетической антенне, DI_0/RC , хотя и возросло, но тоже не столь значительно, как в случае быстрого охлаждения клеток до 0 °С. При этом, однако, наблюдалось возрастание коэффициента дезоксидации, DE, и более значительный рост уровня экспрессии гена LhcSR.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Фотоавтотрофная клетка обладает рядом механизмов, позволяющих ей снизить повреждающее действие избыточного освещения. В зависимости от условий (интенсивности стрессовых факторов, времени их действия и т.п.) разные механизмы могут включаться в общую защитную реакцию организма. У психротолерантной микроводоросли *L. incisa* IPPAS C-2047, исследуемой в настоящей работе, реакция ФСА на понижение температуры включала накопление АК и повышение уровня экспрессии гена LhcSR (которое, как можно предполагать, отражает рост содержания фотопротекторного белка LhcSR в хлоропластах *L. incisa*), но практически не затрагивала состав пигментов и пигмент-белковых комплексов ФСА. Наблюдаемые нами изменения характерны для ответа клетки на стрессовые воздействия, независимо от приро-

ды стрессового фактора, причём накопление АК характерно для *L. incisa*, а синтез LhcSR — для большинства изученных к настоящему времени зелёных водорослей (включая *Chlorophyta* и *Streptophyta*) и многих других таксономических групп водорослей [46]. LhcSR является одним из ключевых участников индукции НФТ у низших растений в ответ на стрессовые воздействия, причём его высокая активность достигается за счёт накопления белка путём значительного повышения активности транскрипции его гена [8]. LhcSR-зависимый ответ на стресс в ходе эволюции наземных растений был замещён PsbS-зависимым НФТ [9, 47].

Синтез АК происходит через реакцию десатурации её предшественника, дигомо- γ -линоленовой кислоты (20 : 3). Эта реакция активируется понижением температуры и лежит в русле общей реакции организма на низкую температуру — десатурации ЖК [48, 49]. Однако в *L. incisa* АК является компонентом не только структурных, но и запасных липидов, и накопление АК в *L. incisa* происходит в ответ на разнообразные стрессовые воздействия, препятствующие делению клеток и эффективному использованию световой энергии в ФСА [34]. В результате накопление АК и других запасных ЖК способствует разгрузке фотосинтетической цепи электронного транспорта на её акцепторной стороне и тем самым активирует фотохимическое тушение возбуждённого хлорофилла в фотосинтетической антенне (т.е. тушение за счёт активации фотохимической реакции разделения зарядов в реакционном центре ФСII). Следует отметить, что ранее было высказано предположение о том, что наряду с этим неспецифическим влиянием на устойчивость ФСА в условиях стресса АК в качестве структурного компонента тилакоидной мембраны способствует также повышению активности мембранного фермента виолаксантиндеэпоксидазы (ВДЭ) за счёт создания подходящего липидного микроокружения [34]. В свою очередь, ВДЭ обеспечивает относительно быстрое (в минутной шкале времени) образование каротиноида зеаксантина, одного из ключевых участников НФТ — универсального механизма защиты от избыточного освещения у оксигенных фототрофных организмов. Несмотря на то что мы не наблюдали заметного роста содержания зеаксантина в результате низкотемпературной акклимации, можно предположить, что «превентивное» повышение активности ВДЭ играет роль в быстром накоплении зеаксантина при более длительной акклимации к низкой температуре и (или) происходящих на фоне её всплесках интенсивности освещения.

Большинство реакций ФСА, участвующих в акклимации фотосинтетического организма к условиям светового стресса, не наблюдалось при низкотемпературной акклимации *L. incisa* IPPAS C-2047. Так, ни общее содержание ФСА (в расчёте на вес СБМ), ни соотношение разных пигмент-белковых комплексов ФСА (в том числе соотношение антенных комплексов и реакционных центров ФСII и ФСI, которое, как правило, является наиболее заметной реакцией фотосинтетической клетки на изменение доступности световой энергии) не претерпевали достоверных изменений. Можно предположить, что это связано с относительно низкой интенсивностью освещения ($50 \text{ мкмоль фотонов} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$), при которой происходила инкубация культуры клеток *L. incisa* в наших экспериментах. Свет такой интенсивности в благоприятных условиях не является стрессовым фактором и не вызывает повреждений ФСА или активации заметного НФТ [50]. Однако при охлаждении культуры клеток мы, несомненно, наблюдали световой стресс, о чём говорит как снижение фотохимической активности ФСII и квантового выхода фотоиндуцированного транспорта электронов (рис. 1, F_v/E_m и ET_0/RC), так и значительный рост теплового рассеяния поглощённой энергии света в фотосинтетической антенне (DI_0/RC). С другой стороны, данные условия действительно могут быть относительно «мягкими» для клеток водоросли, и использование лишь одного LhcSR-зависимого механизма акклимации ФСА (одновременно с характерной для низкой температуры десатурацией ЖК) может оказаться наиболее «экономным» способом приспособления клетки к стрессовым условиям. В самом деле, синтез LhcSR, хотя и менее эффективен по сравнению с эволюционно более поздним PsbS-зависимым НФТ, может обойтись гораздо «дешевле» для клетки, чем редукция всего ФСА или каких-то его компонентов (например, фотосинтетической антенны) с их последующим ресинтезом после прекращения действия стрессоров.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Инкубация микроводоросли *L. incisa* IPPAS C-2047 при низкой температуре ($0 \text{ }^\circ\text{C}$) приводит к существенному замедлению роста культуры. При неизменной интенсивности света это неизбежно должно сопровождаться снижением скорости расходования продуктов световых реакций фотосинтеза, перевосстановлением кофакторов фотосинтетической цепи переноса электронов, возрастанием времени жизни возбуждённых состояний хлорофилла в фотосинтетичес-

кой антенне. Такие изменения в ФСА характерны для светового стресса, т.е. реакции ФСА на избыточное освещение. Несмотря на относительно низкую интенсивность освещения ($50 \text{ мкмоль фотонов} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$) при инкубации культуры микроводоросли в наших экспериментах, она проявляла некоторые характерные черты светового стресса при воздействии низкой температуры: снижение активности ФСII, рост НФТ, повышение уровня экспрессии гена LhcSR. Кроме того, происходило накопление АК, характерное для *L. incisa* при воздействии стрессовых факторов различной природы. В то же время при акклимации *L. incisa* IPPAS C-2047 к низкой температуре не наблюдалось заметных изменений в составе пигментов и пигмент-белковых комплексов ФСА, которые можно было бы ожидать в ответ на изменения интенсивности света при неизменной температуре.

Можно предположить наличие следующей стратегии ответа клетки на воздействие низкой ($0 \text{ }^\circ\text{C}$) температуры на фоне освещения низкой интенсивности. Изменение состава пигмент-белковых комплексов ФСА (в частности, редукция антенных комплексов ЛНСII) потребовало бы деградации значительной части белков ФСА при стрессе и их ресинтеза при последующей нормализации условий. Вместо этого более предпочтительным путём для клетки может быть сохранение основной массы белков ФСА в расчёте на их эффективное использование после нормализации условий, а обеспечение защиты ФСА — преимущественно за счёт синтеза лишь одного компонента ФСА, защитного белка (LhcSR), снижающего содержание возбуждённых состояний хлорофилла в фотосинтетической антенне. Такая стратегия может быть результативной в случае: i) высокой эффективности LhcSR-зависимого НФТ, не требующего «помощи» со стороны других механизмов, и ii) относительно непродолжительного воздействия стрессовых условий.

В связи с этим можно предположить возрастание роли других защитных механизмов в ходе более длительной акклимации культуры клеток *L. incisa* к низкой температуре. С другой стороны, высокая эффективность LhcSR-зависимого НФТ, позволяющая *L. incisa* хотя бы при относительно мягких стрессовых условиях обходиться без других, более «дорогостоящих» для клетки мер, может являться одной из тех адаптаций, которые обуславливают её толерантность к низкой температуре. Эти предположения отчасти подтверждаются нашими данными по индукции защитных механизмов у клеток, которые перед инкубацией при температуре $0 \text{ }^\circ\text{C}$ предварительно были акклимированы к $5 \text{ }^\circ\text{C}$ и у которых начинают проявляться и другие механизмы акклимации ФСА к низкой температуре.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-04-00509).

Благодарности. Спектрофотометрические измерения были выполнены с использованием оборудования ЦКП «Фенотипирование фототрофных организмов» МГУ имени М.В. Ломоносова. Авторы благодарны В.А. Макарову и К.В. Скулачеву за помощь в техническом обеспечении работы, М.Д. Логачевой и Р.А. Зиновкину 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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Osborne, B. A., and Raven, J. A. (1986) Light absorption by plants and its implications for photosynthesis, *Biol. Rev.*, **61**, 1-60.
- Croce, R., and Van Amerongen, H. (2014) Natural strategies for photosynthetic light harvesting, *Nat. Chem. Biol.*, **10**, 492-501.
- Walla, P. J., Holleboom, C.-P., and Fleming, G. R. (2014) Electronic carotenoid-chlorophyll interactions regulating photosynthetic light harvesting of higher plants and green algae, *Non-Photochemical Quenching and Energy Dissipation in Plants, Algae and Cyanobacteria*, Springer, p. 229-243.
- Amarnath, K., Bennett, D. I. G., Schneider, A. R., and Fleming, G. R. (2016) Multiscale model of light harvesting by photosystem II in plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 1156-1161.
- 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.
- Demmig-Adams, B. (1990) Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin, *Biochim. Biophys. Acta*, **1020**, 1-24.
- 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.
- Peers, G., Truong, T. B., Ostendorf, E., Busch, A., Elrad, D., et al. (2009) An ancient light-harvesting protein is critical for the regulation of algal photosynthesis, *Nature*, **462**, 518-521.

9. 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.
10. Verhoeven, A. (2014) Sustained energy dissipation in winter evergreens, *New Phytologist*, **201**, 57-65.
11. Jahns, P., and Holzwarth, A. R. (2012) The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 182-193.
12. García-Plazaola, J. I., Matsubara, S., and Osmond, C. B. (2007) The lutein epoxide cycle in higher plants: its relationships to other xanthophyll cycles and possible functions, *Funct. Plant Biol.*, **34**, 759-773.
13. Lohr, M., and Wilhelm, C. (1999) Algae displaying the diadinoxanthin cycle also possess the violaxanthin cycle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 8784-8789.
14. Gilmore, A. M. (1997) Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves, *Physiol. Plant.*, **99**, 197-209.
15. Kaňa, R., Kotabová, E., Kopečná, J., Trsková, E., Belgio, E., et al. (2016) Violaxanthin inhibits nonphotochemical quenching in light-harvesting antenna of *Chromera velia*, *FEBS Lett.*, **590**, 1076-1085.
16. Holt, N. E., Zigmantas, D., Valkunas, L., Li, X.-P., Niyogi, K. K., et al. (2005) Carotenoid cation formation and the regulation of photosynthetic light harvesting, *Science*, **307**, 433-436.
17. Johnson, M. P., and Ruban, A. V. (2011) Restoration of rapidly reversible photoprotective energy dissipation in the absence of PsbS protein by enhanced ΔpH, *J. Biol. Chem.*, **286**, 19973-19981.
18. Pinnola, A., Staleva-Musto, H., Capaldi, S., Ballottari, M., Bassi, R., et al. (2016) Electron transfer between carotenoid and chlorophyll contributes to quenching in the LHCSR1 protein from *Physcomitrella patens*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1857**, 1870-1878.
19. Bonente, G., Pippa, S., Castellano, S., Bassi, R., and Ballottari, M. (2012) Acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to different growth irradiances, *J. Biol. Chem.*, **287**, 5833-5847.
20. Kouřil, R., Wientjes, E., Bultema, J. B., Croce, R., and Boekema, E. J. (2013) High-light vs. low-light: Effect of light acclimation on photosystem II composition and organization in *Arabidopsis thaliana*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1827**, 411-419, doi: 10.1016/j.bbabi.2012.12.003.
21. Jørgensen, K., and Skibsted, L. H. (1993) Carotenoid scavenging of radicals, *Zeitschr. Lebensmittel Untersuchung Forschung*, **196**, 423-429.
22. Telfer, A., Dhimi, S., Bishop, S. M., Phillips, D., and Barber, J. (1994) Beta-carotene quenches singlet oxygen formed by isolated photosystem II reaction centers, *Biochemistry*, **33**, 14469-14474.
23. Lichtenthaler, H. K., Babani, F., Navrátil, M., and Buschmann, C. (2013) Chlorophyll fluorescence kinetics, photosynthetic activity, and pigment composition of blue-shade and half-shade leaves as compared to sun and shade leaves of different trees, *Photosynth. Res.*, **117**, 355-366.
24. Demmig-Adams, B., and Adams, W. W. I. (1996) Chlorophyll and carotenoid composition in leaves of *Euonymus kiauutschovicus* acclimated to different degrees of light stress in the field, *Funct. Plant Biol.*, **23**, 649-659.
25. Aburai, N., Sumida, D., and Abe, K. (2015) Effect of light level and salinity on the composition and accumulation of free and ester-type carotenoids in the aerial microalga *Scenedesmus* sp. (Chlorophyceae), *Algal Res.*, **8**, 30-36.
26. Solovchenko, A., Solovchenko, O., Khozin-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Pal, D., et al. (2013) Probing the effects of high-light stress on pigment and lipid metabolism in nitrogen-starving microalgae by measuring chlorophyll fluorescence transients: studies with a Δ5 desaturase mutant of *Parietochloris incisa* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae), *Algal Res.*, **2**, 175-182.
27. Solovchenko, A., Khozin-Goldberg, I., Recht, L., and Boussiba, S. (2011) Stress-induced changes in optical properties, pigment and fatty acid content of *Nannochloropsis* sp.: implications for non-destructive assay of total fatty acids, *Marine Biotechnol.*, **13**, 527-535.
28. Zarter, C. R., Adams, W. W., Ebbert, V., Cuthbertson, D. J., Adamska, I., et al. (2006) Winter down-regulation of intrinsic photosynthetic capacity coupled with up-regulation of Elip-like proteins and persistent energy dissipation in a subalpine forest, *New Phytologist*, **172**, 272-282.
29. Zarter, C., Adams, W. W., Ebbert, V., Adamska, I., Jansson, S., et al. (2006) Winter acclimation of PsbS and related proteins in the evergreen *Arctostaphylos uva-ursi* as influenced by altitude and light environment, *Plant Cell Environ.*, **29**, 869-878.
30. Huang, W., Zhang, S.-B., and Cao, K.-F. (2010) The different effects of chilling stress under moderate light intensity on photosystem II compared with photosystem I and subsequent recovery in tropical tree species, *Photosynth. Res.*, **103**, 175-182.
31. Theocharis, A., Clément, C., and Barka, E. A. (2012) Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures, *Planta*, **235**, 1091-1105.
32. Los, D. A., Mironov, K. S., and Allakhverdiev, S. I. (2013) Regulatory role of membrane fluidity in gene expression and physiological functions, *Photosynth. Res.*, **116**, 489-509.
33. Watanabe, S., Hirabayashi, S., Boussiba, S., Cohen, Z., Vonshak, A., et al. (1996) *Parietochloris incisa* comb. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), *Phycol. Res.*, **44**, 107-108.
34. Zorin, B., Pal-Nath, D., Lukyanov, A., Smolskaya, S., Kolusheva, S., et al. (2017) Arachidonic acid is important for efficient use of light by the microalga *Lobosphaera incisa* under chilling stress, *Biochim. Biophys. Acta*, **1862**, 853-868, doi: 10.1016/j.bbali.2017.04.008.
35. Strasser, R. J., Tsimilli-Michael, M., and Srivastava, A. (2004) Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient, *Chlorophyll Fluorescence*, Springer, p. 321-362.
36. Folch, J., Lees, M., and Stanley, G. H. S. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues, *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509.
37. Kates, M. (1986) *Techniques of Lipidology; Isolation, Analysis and Identification of Lipids*, 2nd Edn., Elsevier, Amsterdam.
38. Wellburn, A. R. (1994) The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution, *J. Plant Physiol.*, **144**, 307-313.
39. Larsen, E., and Christensen, L. P. (2005) Simple saponification method for the quantitative determination of carotenoids in green vegetables, *J. Agricul. Food Chem.*, **53**, 6598-6602.
40. Weaver, E. C. (1968) EPR studies of free radicals in photosynthetic systems, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **19**, 283-294.
41. Caffarri, S., Tibiletti, T., Jennings, R. C., and Santabarbara, S. (2014) A comparison between plant photosystem I and photosystem II architecture and functioning, *Curr. Prot. Pept. Sci.*, **15**, 296-331.
42. Givnish, T. J. (1988) Adaptation to sun and shade: a whole-plant perspective, *Austr. J. Plant Physiol.*, **15**, 63-92.
43. Beneragama, C. K., and Goto, K. (2010) Chlorophyll a: b ratio increases under low-light in "shade-tolerant" *Euglena gracilis*, *Tropic. Agricult. Res.*, **22**, 12-25.
44. Virtanen, O., Khorobrykh, S., and Tyystjärvi, E. (2021) Acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to extremely strong light, *Photosynth. Res.*, **147**, 91-106.
45. Eismann, A. I., Reis, R. P., da Silva, A. F., and Cavalcanti, D. N. (2020) *Ulva* spp. carotenoids: Responses to environmental conditions, *Algal Res.*, **48**, 101916.

46. Giovagnetti, V., and Ruban, A. V. (2018) The evolution of the photoprotective antenna proteins in oxygenic photosynthetic eukaryotes, *Biochem. Soc. Trans.*, **46**, 1263-1277.
47. Gerotto, C., and Morosinotto, T. (2013) Evolution of photoprotection mechanisms upon land colonization: evidence of PSBS-dependent NPQ in late Streptophyte algae, *Physiol. Plant.*, **149**, 583-598.
48. Sakamoto, T., and Murata, N. (2002) Regulation of the desaturation of fatty acids and its role in tolerance to cold and salt stress, *Curr. Opin. Microbiol.*, **5**, 206-210.
49. Guschina, I. A., and Harwood, J. L. (2006) Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae, *Progr. Lipid Res.*, **45**, 160-186.
50. Richardson, K., Beardall, J., and Raven, J. A. (1983) Adaptation of unicellular algae to irradiance: an analysis of strategies, *New Phytol.*, **93**, 157-191.

THE EFFECT OF CHILLING ON THE PHOTOSYNTHETIC APPARATUS OF MICROALGA *Lobosphaera incisa* IPPAS C-2047

V. V. Ptushenko^{1,2*}, G. N. Bondarenko³, E. N. Vinogradova^{4,5}, E. S. Glagoleva⁴,
O. V. Karpova⁴, O. S. Ptushenko⁴, A. E. Solovchenko⁴, B.V. Trubitsin⁶,
O. B. Chivkunova⁴, K. A. Shibzukhova⁴, and P. N. Shcherbakov⁴

¹ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia; e-mail: ptush@belozersky.msu.ru

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 Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

Photosynthetic organisms have developed a set of mechanisms aimed at preventing photo-oxidative reactions in the photosynthetic apparatus (PSA) initiated by excessively absorbed light energy. Along with high irradiance, other stressors, e.g., chilling temperatures can lead to the formation of the excess light energy and hence to photo-oxidative stress. The induction of photoprotective mechanisms in response to chilling (0 °C) at a low irradiance (50 μmol PAR photons × m⁻² × s⁻¹) in the microalga *Lobosphaera incisa* IPPAS C-2047 cells was studied. After 4 days of incubation at a low temperature, *L. incisa* IPPAS C-2047 revealed a notable decrease in the photochemical activity of photosystem II (PSII) and in the efficiency of photosynthetic electron transport as well as a significant increase in the thermal dissipation of the absorbed light energy in the photosynthetic antenna. In contrast, most of the conventional markers of the PSA acclimation to excess light energy, including the total chlorophyll and carotenoid content, violaxanthin cycle pigments content and their deepoxidation, as well as the photosynthetic antennas, PSII and photosystem I (PSI) complexes ratio remained practically unchanged. The content of the major unsaturated fatty acids also remained almost unchanged, except for arachidonic acid (increased by 40%) recently assumed to activate the violaxanthin-deepoxidase by adjusting its lipid microenvironment. Significant changes were observed in the protective protein LhcSR gene expression (4-7-fold increase was observed). Pre-conditioning at 5 °C prior to subsequent acclimation to 0 °C had a positive effect on the PSA photochemical activity. The obtained data show that mid-term (4 days last) acclimation of *L. incisa* IPPAS C-2047 to a positive low temperature at low irradiance leads to PSA response partly typical for high light response. At the same time, the main photoprotective PSA mechanism activated under these conditions is the protein (LhcSR)-dependent quenching of excitation in the photosynthetic antenna.

Keywords: high light stress, low-temperature acclimation, fatty acids desaturation, arachidonic acid, thermal dissipation of light energy, LhcSR, microalgae

БИОЭНЕРГЕТИКА ФИБРОЗА

Обзор

© 2021 Э.И. Якупова^{1,2}, Д.Б. Зоров^{1,3*}, Е.Ю. Плотников^{1,3*}

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

² Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290 Пущино, Московская обл., Россия

³ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии
и перинатологии имени академика В.И. Кулакова, 117997 Москва, Россия

Поступила в редакцию 22.10.2021

После доработки 16.11.2021

Принята к публикации 16.11.2021

Известно, что развитие фиброза сопровождается многими заболеваниями, являясь как причиной, так и следствием повреждения органов и тканей. Замещение функциональной ткани фиброзным рубцом может приводить к нарушению функционирования органов, что часто угрожает жизни больного. Разработка эффективных способов ограничения развития или лечения фиброза требует понимания всех аспектов его патогенеза в различных органах: от эпителиально-мезенхимальной трансформации до экспансии фибробластов. Причинами фиброза могут быть травма, ишемические повреждения, воспаление и многие другие состояния, характеризующиеся повторяющимися циклами повреждения и восстановления ткани. Энергетический метаболизм является основой жизнедеятельности всех клеток организма, и именно его нарушения связаны с развитием многих заболеваний, поэтому, как неоднократно было показано, воздействие на него может быть основой терапии таких патологических процессов, как ишемия/реперфузия, эпилепсия, диабет, рак и неврологические расстройства. Развитие фиброза также связано с перестройками биоэнергетики клетки. В данной работе мы проанализировали, какие изменения энергетического метаболизма наблюдаются при развитии фиброза, и оценили возможность влияния на энергетический метаболизм в качестве подхода антифиброзной терапии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фиброз, фибробласты, энергетический метаболизм, гликолиз, дыхание, коллаген.

DOI: 10.31857/S0320972521120101

ВВЕДЕНИЕ

Замещение функциональной ткани фиброзным рубцом сопровождается множеством заболеваний, являясь как причиной, так и следствием повреждения органов и тканей [1–4]. Процесс развития фиброза, так называемый фиброгенез, обычно состоит из двух стадий. В большинстве случаев фиброза первая стадия инициируется разрушением паренхиматозных и стромальных клеток органа, при котором гибель клеток вызывается различными повреждающими агентами и механизмами [3, 4]. При этом запускаются

реакции репарации и ангиогенеза для восстановления трёхмерной структуры и клеточного состава ткани. На первой стадии развивается иммунный ответ и острое воспаление, что характеризуется активацией резидентных макрофагов, нейтрофилов и дендритных клеток [5, 6]. Продукция этими клетками в очаге повреждения цитокинов и хемокинов приводит к локальной активации фибробластов, превращающихся в миофибробласты, обладающие способностью участвовать в образовании внеклеточного матрикса (ВКМ) и дополнительно увеличивать продукцию провоспалительных цитокинов, хемокинов и ангиогенных факторов. Отличительной чертой этих клеток является высокая экспрессия α -актина гладких мышц (α -SMA). В активированные миофибробласты могут превращаться и другие популяции клеток под воздействием трансформирующего фактора роста β (TGF- β), уровень которого увеличивается при развитии фиброза [7]. К таким клеткам относятся: резидентные фибробласты ткани,

Принятые сокращения: ВКМ – внеклеточный матрикс; ИЛФ – идиопатический легочный фиброз; КД – кетогенная диета; ОЖК – окисление жирных кислот; ОКП – ограничение калорийности питания; ATF4 – активирующий фактор транскрипции 4; 3-BrPA – 3-бромпируват; PHGDH – фосфоглицератдегидрогеназа; PPAR – рецептор, активируемый пролифератором пероксисом; TGF- β – трансформирующий фактор роста β .

* Адресат для корреспонденции.

циркулирующие фиброциты костного мозга, различные субпопуляции эпителиальных и эндотелиальных клеток (которые приобретают фенотип миофибробластов в процессе, называемом эпителиально-мезенхимальным переходом), а также другие мезенхимальные клетки, такие как перициты и резидентные мезенхимальные клетки [8].

Активированные миофибробласты в норме инициируют заживление ран и репарацию других повреждений структуры ткани, секретировав компоненты ВКМ (коллаген I/III, фибронектин и ламинин). Параллельно в клетках синтезируются белки семейства матриксных металлопротеаз (ММП), которые контролируют уровень секреции компонентов ВКМ для предотвращения чрезмерного его образования [9, 10]. При сохранении повреждающего стимула стойкое воспаление может усугубить гибель клеток органа, и продукты этой гибели, а также массивное высвобождение цитокинов провоцируют следующую стадию фиброгенеза. При этом сами миофибробласты выделяют аутокринные факторы для поддержания активации с неконтролируемой секрецией и образованием ВКМ в ткани, что в конечном итоге приводит к образованию рубцов и дисфункции органа [3, 4].

Известно, что воздействия, влияющие на энергетический обмен организма и контролируемые переключение доминирующих путей энергообеспечения клетки, обладают защитным эффектом при развитии патологических процессов, обеспечивая их замедление или обращение вспять. К таким воздействиям относятся низкоуглеводная и кетогенная диета (КД), ограничение калорийности питания (ОКП), а также фармакологические миметики таких алиментарных интервенций. Эти воздействия уже сейчас рассматриваются как перспективные терапевтические подходы при ишемии/реперфузии органов [11, 12], эпилепсии [13], диабете [14], онкологических заболеваниях [15, 16], острых и хронических воспалительных процессах [17] и нейродегенеративных заболеваниях [18]. Отметим, что некоторые из данных патологий так или иначе связаны с развитием фиброза, являясь либо основой патогенеза заболевания, либо следствием повреждения ткани в острой фазе болезни. Несомненно, уменьшение повреждения органа во время патологии должно приводить к уменьшению развития последующего фиброза, и в этом смысле данные воздействия можно рассматривать как противомембранозные. Однако намного важнее оценить возможность влияния на энергетический метаболизм с целью уменьшения рубцовой трансформации ткани уже после повреждения.

Ниже будут рассмотрены особенности энергетического метаболизма в различных клетках при активации профибротических изменений, а также возможные пути воздействия на биоэнергетику для уменьшения развития фиброза в органах при различных заболеваниях.

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ МЕТАБОЛИЗМ ПРИ ФИБРОЗЕ

В норме клеточный анаболизм (синтез биомолекул) и катаболизм (распад биомолекул) взаимно сбалансированы и находятся под строгим контролем различных систем, в том числе и биоэнергетики. Развитие фиброза можно отнести к сдвигу равновесия в соединительнотканых клетках в сторону анаболизма, поскольку основная роль в развитии фиброза принадлежит гиперпродукции белковых молекул ВКМ миофибробластами. Для обеспечения в миофибробластах повышенных пролиферации и синтеза белка при фиброзе необходимы серьезные метаболические изменения. Показано, что увеличение содержания коллагена в фибробластах сопровождается увеличением экспрессии генов, отвечающих за контроль гликолиза, и подавлением генов, ответственных за окисление жирных кислот (ОЖК) [19]. Активация фибробластов увеличивает уровень ключевых гликолитических ферментов, таких как гексокиназа 2 и лактатдегидрогеназа (ЛДГ) [20], которые, как считается, сопровождают увеличение пролиферации клеток [20] и синтез коллагена [21]. В результате усиления гликолитического пути образуется больше пирувата, который превращается в ацетил-КоА в митохондриальном матриксе [20] и поступает в цикл лимонной кислоты, что может увеличивать уровень таких метаболитов как сукцинат, который, по ряду свидетельств, как раз способствует фиброзу [22].

Наоборот, катаболический фенотип фибробластов и деградация ВКМ ассоциированы с повышенной активностью путей окисления жирных кислот [19, 23]. Показано, что внутриклеточное ОЖК подавляется при тубулоинтерстициальном фиброзе у мышей и людей, а его восстановление защищает от фиброза [24]. При понижении окисления жирных кислот во время фиброзного повреждения почек активируется гликолиз, что, как описано выше, и могло являться причиной усиленного прогрессирования фиброза [25].

Важно отметить, что была продемонстрирована не просто корреляция определенного типа энергетического метаболизма с анаболической/катаболической активностью фиброблас-

тов, а прямая причинно-следственная связь между этими процессами. Так, воздействие на сигнальные пути PPAR, активирующее окисление жирных кислот, приводило к снижению синтеза ВКМ, интернализации внеклеточных молекул коллагена и их лизосомальной деградации. Аналогичным эффектом обладало ингибирование гликолиза в фибробластах, приводя к снижению транскрипции гена коллагена даже в условиях нормальной (не усиленной) активности путей ОЖК. Поскольку эффективность гликолиза как источника АТФ невысока, он может иметь большую, по сравнению с окислительным фосфорилированием, значимость для маловаскуляризованных и потенциально гипоксичных тканей, таких как соединительная ткань и фиброзный рубец. Однако, помимо обеспечения механизма генерирования энергии, гликолиз производит побочные продукты, которые регулируют фиброз, например лактат. Снижение внеклеточного рН вследствие транспорта молочной кислоты из клетки монокарбоксилатным транспортёром способствует дифференцировке фибробластов за счёт активации TGF- β , поскольку кислый рН индуцирует переход так называемого латентного внеклеточного TGF- β в активную форму [26], кроме того, сам лактат может служить дополнительным источником энергии для этих клеток [26, 27].

Вторым важным для фиброза продуктом гликолиза является 3-фосфоглицериновая кислота. Поскольку именно коллаген является одним из главных составляющих ВКМ, считается, что усиление гликолитического пути энергетического обмена может способствовать выработке ВКМ именно через обеспечение синтеза коллагена. Предполагается, что это связано с тем, что треть аминокислотного состава коллагена представлена глицином, который частично вырабатывается из продуктов метаболизма глюкозы [28]. Так, один из путей синтеза глицина в организме проходит через серин, который, в свою очередь, производится из 3-фосфоглицериновой кислоты, образующейся в гликолизе. Хотя считается, что данный путь синтеза глицина не может покрыть всю потребность организма в коллагене [29], известно, что профибротический ростовой фактор TGF- β индуцирует экспрессию *de novo* ферментов пути синтеза серина и глицина, таких как фосфоглицератдегидрогеназа (PHGDH), фосфосерин аминотрансфераза 1 (PSAT1), фосфосеринфосфатаза (PSPH) и серингидроксиметилтрансфераза 2 (SHMT2) [21, 28, 30]. Было показано, что TGF- β также увеличивает продукцию активирующего фактора транскрипции 4 (ATF4), главного регулятора транскрипции компонентов метаболизма ами-

нокислот [30]. Этот фактор может обеспечивать связь сигнализации, активируемой TGF- β , и метаболизма клетки, поскольку продукция ATF4 способствует транскрипции генов, кодирующих ферменты пути биосинтеза серина и глицина, а также транспортёра глюкозы 1 (GLUT1). Другой активируемый TGF- β путь связан с транскрипционным фактором Smad3 и регуляцией комплекса mTORC1 [30], который является известным сенсором метаболического статуса клетки (реагируя на недостаток питательных веществ и энергетических субстратов), обеспечивая ещё один механизм метаболической регуляции функций миофибробластов при фиброзе [30].

Также известно, что обработка культивируемых фибробластов TGF- β приводит к повышенной экспрессии гликолитического фермента 6-фосфофрукто-2-киназы/фруктозо-2,6-бисфосфатазы 3 [31], а подавление гликолиза с помощью ингибитора фосфофруктокиназы, 3-(3-Пиридинил)-1-(4-пиридинил)-2-пропен-1-он (ЗРО), препятствовало повышению синтеза белков ВКМ [32]. Аналогично, ингибитор PHGDH (NCT-503) снижает индуцированный TGF- β синтез белка коллагена [28]. Использование ещё одного ингибитора гликолиза, 3-бромпирувата (3-BrPA), также приводило к уменьшению индуцированной TGF- β продукции коллагена в клеточной линии фибробластов почки NRK-49F *in vitro* [32]. При этом с помощью молекулярного докинга было доказано, что 3-BrPA взаимодействует прежде всего с ферментами аэробного гликолиза, снижая их активность, поэтому показанные антифибротические эффекты можно однозначно связать именно с этим механизмом.

Наконец, ещё одним следствием усиления гликолиза является потенциальное изменение экспрессии ряда генов. Этот процесс обеспечивается через ацетилирование гистонов, основным источником ацетильной группы для которого является ацетил-КоА, образующийся из пирувата [33]. Теоретически усиление гликолиза могло бы приводить к повышению количества образующегося пирувата, а значит оно потенциально способно увеличивать ацетилирование различных белков. Однако было показано, что при развитии хронического фиброза происходит инактивация пируватдегидрогеназного комплекса (ПДК) в митохондриях [34], вызывая соответствующее снижение синтеза ацетил-КоА. В результате TGF- β вызывает в фибробластах выраженное сокращение запасов ацетил-КоА, что ведёт к снижению ацетилирования лизина гистонов, а также многих ещё не идентифицированных белков в фибробластах

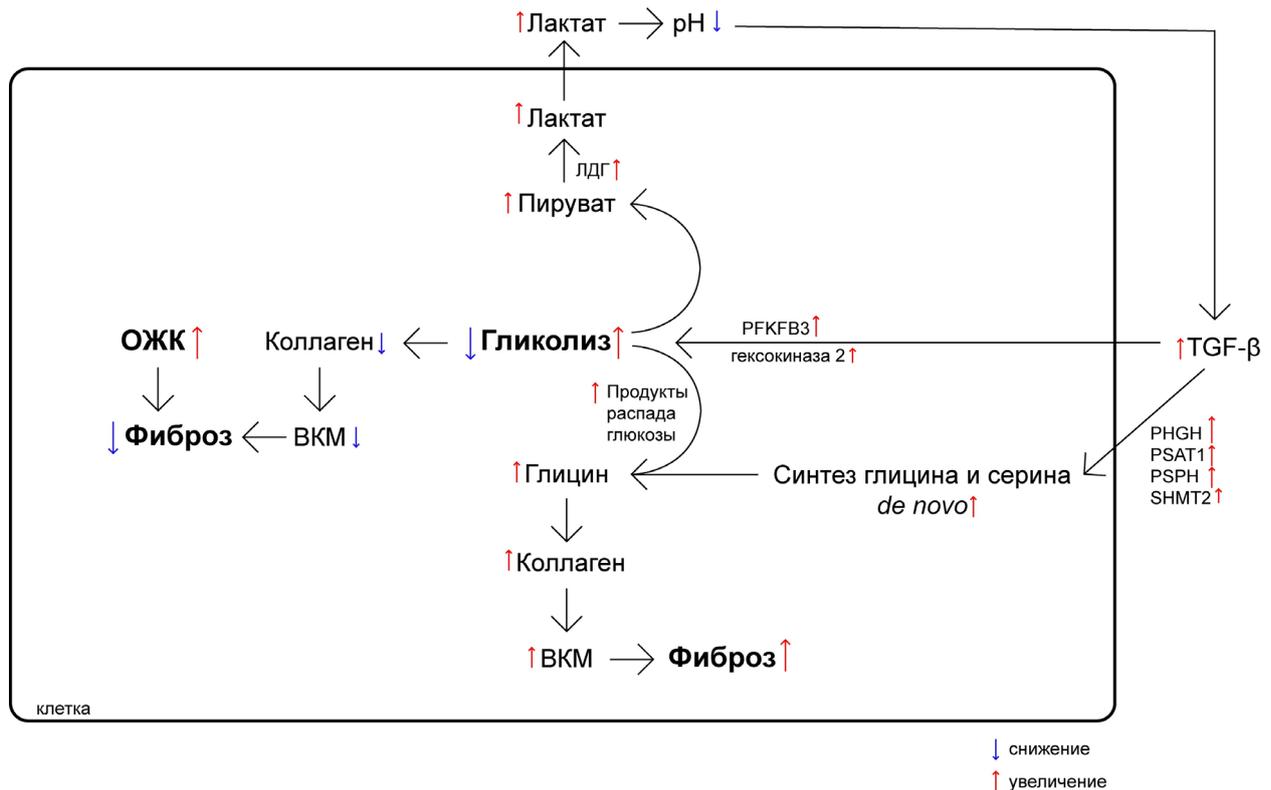


Рис. 1. Сдвиг в сторону того или иного пути энергетического метаболизма влияет на развитие фиброза. При повышении ОЖК фиброз уменьшается, как и при понижении активности гликолиза, за счёт уменьшения продукции коллагена и ВКМ в целом. Активация гликолиза увеличивает развитие фиброза за счёт поставки продуктов распада глюкозы в систему синтеза глицина, а далее синтеза коллагена/ВКМ. TGF- β увеличивает активность ферментов синтеза глицина и серина *de novo*. Поставка пирувата гликолизом и увеличение активности ЛДГ повышает содержание лактата, что понижает рН, и, как следствие, индуцирует TGF- β , который вызывает повышение экспрессии ряда ферментов

почек крыс [34]. Таким образом, регуляторное ацетилирование обеспечивает связь между изменениями клеточного метаболизма и эпигенетической регуляцией транскрипции и функций белков [35].

Обобщённая схема влияния энергетики клетки на развитие фиброза представлена на рис. 1.

Важно отметить, что параллельно со сдвигом метаболизма в сторону гликолиза при фиброзе происходит активация метаболизма глутамин (деградации его до глутамата в процессе глутаминолиза), причём эти изменения напрямую связаны с действием на фибробласты TGF- β . Показано *in vitro*, что метаболизм глутамин усиливается при воздействии TGF- β на фибробласт-подобные клетки лёгких [36–38] и кожи [39]. Роль усиления глутаминолиза до конца неясна. С одной стороны, предполагается что это может быть альтернативный путь обеспечения энергией, поскольку гликолиз не может полностью удовлетворить потребности в синтезе АТФ. Усиление глутаминолиза характерно для многих активно пролиферирующих клеток,

в том числе опухолевых [40]. С другой стороны, как и в случае гликолиза, не менее важным может быть обеспечение за счёт глутаминолиза синтеза коллагена, поскольку пролин, составляющий вместе с глицином до 57% аминокислот коллагена, напрямую продуцируется из глутамата [41].

МЕТАБОЛИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ НА ФИБРОЗ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЯХ

Хотя исследования *in vitro* являются простой и часто используемой моделью для изучения фиброза (табл. 1), ряд исследователей отмечает некоторые ограничения работы на клеточных культурах: 1) культуры клеток не воспроизводят полностью патофизиологию тканевого фиброза *in vivo*, что было подтверждено при сравнении профилей экспрессии генов [42]; 2) монослойные клеточные культуры не дают представления о трёхмерном фиброзном микроокружении [43]; 3) миофибробласты из идиопатического лёгоч-

Таблица 1. Моделирование фиброза *in vitro*

Клеточная линия/модель	Способ активации фиброза	Ключевые результаты работы	Ссылки
Фибробласты лёгких плода человека (IMR-90 клетки)	инкубация клеток в присутствии TGF-β	обработка клеток TGF-β стимулирует аэробный гликолиз; TGF-β-индуцированное метаболическое перепрограммирование является зависимым от митоген-активируемой протеинкиназы p38	[47]
Первичная культура фибробластов, выделенная из фиброзных почек (3 дня после односторонней обструкции мочеточника) (UUOF) и нормальных почек (NRKF) самцов крыс Sprague-Dawley	инкубация клеток в присутствии TGF-β	TGF-β подавляет биосинтез ацетил-КоА посредством регуляции комплекса пируватдегидрогеназы (ПДК)	[34]
Первичные звездчатые клетки печени	инкубация клеток в присутствии TGF-β	ингибирование ацетил-КоА карбоксилазы снижает активацию TGF-β-стимулированных первичных звездчатых клеток печени; такое ингибирование препятствовало метаболическому переключателю, необходимому для индукции гликолиза и окислительного фосфорилирования во время активации; показано, что клетки нуждаются в липогенезе <i>de novo</i> для активации	[48]
Выделенные фибробласты из нормальной кожи и кожи из келоидных рубцов	образцы пациентов с келоидным рубцом	келоидные фибробласты продемонстрировали сдвиг своего метаболического фенотипа с окислительного фосфорилирования на аэробный гликолиз; анализ генов и белков показал, что экспрессия гликолитических ферментов повышена в келоидных фибробластах по сравнению с нормальными фибробластами; кроме того, наблюдался более высокий приток глюкозы и продукция лактата в келоидных фибробластах, а их пролиферация подавлялась дозозависимым и зависящим от времени образом после ингибирования гликолиза 2-дезоксиглюкозой	[49]
Линия фибробластов легких человека MRC-5; миофибробласты лёгких пациентов с идиопатическим легочным фиброзом (ИЛФ)	инкубация клеток в присутствии TGF-β	дифференцировка миофибробластов лёгких сопровождается усилением гликолитического пути энергетического обмена; повышенная экспрессия гликолитического фермента 6-фосфофрукто-2-киназы/фруктозо-2,6-бисфосфатазы 3 (PFKFB3) связана с усилением гликолиза, который наблюдался при обработке клеток фибробластов TGF-β; эти изменения коррелировали со степенью дифференцировки фибробластов в миофибробласты; ингибирование PFKFB3 способствует обратной дифференцировке миофибробластов от пациентов с ИЛФ	[31]
Изолированные мезенхимальные клетки, выделенные из подушек лап мышей C3H или B6; культура первичных фибробластов кожи человека	три вида воздействия: гипоксия (2% O ₂), присутствие TGF-β или тромбоцитарного фактора роста BB (PDGF BB)	все три способа активации фибробластов были связаны с подавлением генов передачи сигналов рецептора, активируемого пролифератором пероксисом (PPAR), и с активацией генов гликолиза, тогда как PPAR является индуктором пути ОЖК; генетическое перепрограммирование клеток (с помощью CRISPR-Cas9) для подавления ОЖК вызывало повышение внеклеточных уровней фибронектина, коллагена-1 и PAII; подавление гликолиза, наоборот, снижает уровень белков ВКМ	[19]
Культура первичных фибробластов лёгких человека	инкубация клеток в присутствии TGF-β	TGF-β индуцирует экспрессию гликолитических генов и увеличивает гликолитический поток; TGF-β индуцирует экспрессию ферментов пути синтеза <i>de novo</i> серина и глицина, что необходимо для продукции коллагена	[21]
Нормальные фибробласты лёгких человека (Lonza); фибробласты NIH-3T3	инкубация клеток в присутствии TGF-β	обработка фибробластов ингибитором PHGDH (NCT-503) снижает индуцированный TGF-β синтез коллагена	[28]

Клеточная линия/модель	Способ активации фиброза	Ключевые результаты работы	Ссылки
Культура первичных фибробластов человека; клеточная линия рHLF, экспрессирующая доминантно-негативную мутантную форму белка 4E-ВР1	инкубация клеток в присутствии TGF-β	TGF-β увеличивает продукцию активирующего фактора транскрипции 4 (ATF4), главного регулятора транскрипции метаболизма аминокислот; ATF4 усиливает транскрипцию генов, кодирующих ферменты пути биосинтеза серина и глицина <i>de novo</i> , и транспортёра глюкозы 1 (GLUT1); индуцированная TGF-β продукция ATF4 зависела от кооперации между канонической передачей сигналов TGF-β через Smad3 и активацией комплекса mTORC1 и его нижележащей мишени, эукариотического фактора инициации трансляции 4E-связывающего белка 1 (4E-ВР1)	[30]

ного фиброза (ИЛФ) представляют собой очень гетерогенную популяцию, что не учитывается в моделях *in vitro* [44–46].

Поэтому несмотря на положительные эффекты подавления гликолиза, полученные на клеточных моделях фиброза, такие подходы должны быть проверены *in vivo*. Таких работ пока очень мало (табл. 2), и их результаты не поз-

воляют дать однозначный ответ об антифиброзной эффективности подавления гликолиза.

Уже упоминавшийся 3-ВrРА оказался довольно эффективным при экспериментальном фиброзе у животных. Его использование в качестве ингибитора гликолиза при внутрибрюшинном введении мышам с унилатеральной обструкцией мочеточников существенно подав-

Таблица 2. Моделирование фиброза *in vivo*

Модель	Способ активации фиброза	Ключевые результаты работы	Ссылки
Фиброз кожи, индуцируемый гамма-облучением задней конечности мышей С3Н/HeJ или мышей В6.129S1-Cd36tm1Mfe/J; фиброз кожи человека после лучевой терапии (первичные фибробласты)	у мышей после облучения и людей, больных раком и получавших лучевую терапию, наблюдаются признаки фиброза кожи	транскриптомный анализ показал, что во время гипоксии наиболее значимо подавляются гены белков, участвующих в окислительном фосфорилировании, ОЖК и цикле трикарбоновых кислот; в фибробластах пациентов с фиброзом кожи наблюдалось значительное усиление процессов гликолиза, включая усиление транспорта глюкозы и подавление глюконеогенеза	[19]
Индуцированный лёгочный фиброз у мышей С57BL/6	мышам интратрахеально вводили блеомицин или TGF-β	ингибирование гликолиза с помощью ЗРО (ингибитор PFKFB3) приводило к снижению лёгочного фиброза у мышей с индукцией фиброза; отмечалось увеличение лактата в лёгких	[31]
Ткани лёгких, полученные от пациентов с ИЛФ при трансплантации лёгких	ИЛФ	экспрессия ферментов пути синтеза серина <i>de novo</i> активируется во время фиброза <i>in vivo</i>	[21]
Индуцированный лёгочный фиброз у мышей С57BL/6	интратрахеально вводили раствор блеомицина	у мышей, получавших ингибитор фосфоглицератдегидрогеназы (PHGDH), через 7 дней после интратрахеального введения блеомицина наблюдалось ослабление фиброза лёгких	[28]
Четыре модели неалкогольного стеатогепатита мышей и крыс	модели фиброза печени грызунов, вызвали диетой или гепатотоксином, диэтилнитрозамином	ингибирование ацетил-КоА <i>in vivo</i> значительно снижает фиброз в четырех моделях неалкогольного стеатогепатита	[48]



Рис. 2. Схематическое изображение влияния баланса биоэнергетических путей на фиброз

ляло фиброзное повреждение почек и выработку интерстициального коллагена, причём этот эффект был дозозависимым [32].

Хотя в ряде работ было показано, что ингибирование ферментов может использоваться для противомышечной терапии (табл. 2), этот подход также не лишён недостатков [50]: 1) делеция гена *Phgdh* у мышей вызывает эмбриональную летальность из-за множественных дефектов развития, особенно в центральной нервной системе [51]; 2) низкомолекулярный ингибитор PHGDH, NCT-503, нуждается в тестировании на биодоступность, в том числе на проникновение через гематоэнцефалический барьер, если планируется его применение по предотвращению фиброза в головном мозге; 3) необходимы исследования, оценивающие долгосрочные эффекты ингибирования PHGDH и других ферментов гликолиза [50], поскольку фиброз развивается в течение длительного времени, а значит и применение таких веществ должно быть довольно продолжительным; 4) хотя ингибирование PHGDH может оказаться полезным для уменьшения накопления коллагена во время фиброгенеза за счёт снижения доступности глицина, оно также может приводить к снижению уровня глутатиона, необходимого для поддержания окислительно-восстановительного гомеостаза в тканях, что актуально, в частности, для лёгких [52], характеризующихся, с одной стороны, высоким содержанием коллагена и высокой вероятностью развития фиброза [53], а с другой – высокой вероятностью окислительного стресса из-за повышенного парциального давления кислорода в ткани.

Исследования показывают, что ингибирование дифференцировки в миофибробласты возможно путём обеднения среды глутамином, так же, как и ингибирование глутаминазы в покоящихся звёздчатых клетках печени [54].

В контексте метаболических модуляций фиброза можно отметить, что одним из способов повлиять на энергетический метаболизм организма являются манипуляции характера питания (алиментарные подходы), наиболее известными и изученными из которых являются КД и ОКП. ОКП, как известно, облегчает патологические процессы [12, 17, 55, 56], в частности,

возрастные заболевания [55, 56], к которым относится острое и хроническое повреждение почек [12]. Во время ОКП активируются многочисленные сигнальные пути, включая те, которые влияют на рост, метаболизм, аутофагию, реакцию на окислительные вызовы, стресс, регенерацию и воспаление [57]. Благоприятные эффекты КД также описаны [11, 12–16, 18], но есть исследования, в которых предупреждается, что мы должны с осторожностью использовать КД, например, потому что она может увеличить сердечный фиброз [58]. Было показано, что в сердечной ткани пациентов с фибрилляцией предсердий выявляется повышение содержания бета-оксибутирата, кетогенных аминокислот и глицина [59]. В исследовании, имитирующем КД у крыс посредством введения экзогенного β-оксибутирата, было продемонстрировано снижение биогенеза митохондрий и усиление сердечного фиброза [58]. Как ОКП, так и КД влияют на процесс развития фиброза, а влияют ли они на уже сформировавшийся фиброз, до сих пор неизвестно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, несмотря на ограниченное количество экспериментальных данных, современные представления сводятся к идее, что гликолитический путь энергетического метаболизма может быть критической точкой регуляции синтеза коллагена и развития фиброза при различных патологиях. Было показано, что ингибирование некоторых ферментов гликолиза приводит к уменьшению фиброза как в клеточных моделях, так и у животных. Кроме того, важным является соотношение различных путей энергообеспечения клетки (рис. 2), поскольку показано, что, например, подавление пути ОЖК приводит к повышению синтеза белков ВКМ даже при неизменной активности гликолиза.

На сегодняшний день подход, связанный с влиянием на энергетический обмен для уменьшения эффектов фиброза, представляется перспективной стратегией, однако имеет свои ограничения, что требует более глубокого экспериментального анализа.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-75-30009).

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

- Plotnikov, E. Y., Brezgunova, A. A., Pevzner, I. B., Zorova, L. D., Manskikh, V. N., et al. (2018) Mechanisms of LPS-induced acute kidney injury in neonatal and adult rats, *Antioxidants*, **7**, 105, doi: 10.3390/antiox7080105.
- Popkov, V. A., Andrianova, N. V., Manskikh, V. N., Silachev, D. N., Pevzner, I. B., et al. (2018) Pregnancy protects the kidney from acute ischemic injury, *Sci. Rep.*, **8**, 14534, doi: 10.1038/s41598-018-32801-8.
- Henderson, N. C., Rieder, F., and Wynn, T. A. (2020) Fibrosis: from mechanisms to medicines, *Nature*, **587**, 555-566, doi: 10.1038/s41586-020-2938-9.
- Weiskirchen, R., Weiskirchen, S., and Tacke, F. (2019) Organ and tissue fibrosis: molecular signals, cellular mechanisms and translational implications, *Mol. Aspects Med.*, **65**, 2-15, doi: 10.1016/j.mam.2018.06.003.
- Martin, P., and Leibovich, S. J. (2005) Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly, *Trends Cell Biol.*, **15**, 599-607, doi: 10.1016/j.tcb.2005.09.002.
- Wynn, T. A., and Ramalingam, T. R. (2012) Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease, *Nat. Med.*, **18**, 1028-1040, doi: 10.1038/nm.2807.
- Zeisberg, M., and Kalluri, R. (2013) Cellular mechanisms of tissue fibrosis. I. Common and organ-specific mechanisms associated with tissue fibrosis, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **304**, 216-225, doi: 10.1152/ajpcell.00328.2012.
- Di Carlo, S. E., and Peduto, L. (2018) The perivascular origin of pathological fibroblasts, *J. Clin. Invest.*, **128**, 54-63, doi: 10.1172/JCI93558.
- Giannandrea, M., and Parks, W. C. (2014) Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis, *Disease Models Mechanisms*, **7**, 193-203, doi: 10.1242/dmm.012062.
- Yue, L., Shi, Y., Su, X., Ouyang, L., Wang, G., et al. (2021) Matrix metalloproteinases inhibitors in idiopathic pulmonary fibrosis: medicinal chemistry perspectives, *Eur. J. Med. Chem.*, **224**, 113714, doi: 10.1016/j.ejmech.2021.113714.
- Lin, J., Huang, Z., Liu, J., Huang, Z., Liu, Y., et al. (2020) Neuroprotective effect of ketone metabolism on inhibiting inflammatory response by regulating macrophage polarization after acute cervical spinal cord injury in rats, *Front. Neurosci.*, **14**, 583611, doi: 10.3389/fnins.2020.583611.
- Andrianova, N. V., Zorova, L. D., Pevzner, I. D., Popkov, V. A., Chernikov, V. P., et al. (2020) Resemblance and differences in dietary restriction nephroprotective mechanisms in young and old rats, *Aging (Albany. NY)*, **12**, 18693-18715, doi: 10.18632/aging.103960.
- Neal, E. G., Chaffe, H., Schwartz, R. H., Lawson, M. S., Edwards, N., et al. (2008) The ketogenic diet for the treatment of childhood epilepsy: a randomised controlled trial, *Lancet Neurol.*, **7**, 500-506, doi: 10.1016/S1474-4422(08)70092-9.
- Nielsen, J. V., and Joensson, E. A. (2008) Low-carbohydrate diet in type 2 diabetes: stable improvement of body-weight and glycemic control during 44 months follow-up, *Nutr. Metab.*, **5**, 14, doi: 10.1186/1743-7075-5-14.
- Allen, B. G., Bhatia, S. K., Buatti, J. M., Brandt, K. E., Lindholm, K. E., et al. (2013) Ketogenic diets enhance oxidative stress and radio-chemo-therapy responses in lung cancer xenografts, *Clin. Cancer Res.*, **19**, 3905-3913, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0287.
- Otto, C., Kaemmerer, U., Illert, B., Muehling, B., Pfetzer, N., et al. (2008) Growth of human gastric cancer cells in nude mice is delayed by a ketogenic diet supplemented with omega-3 fatty acids and medium-chain triglycerides, *BMC Cancer*, **8**, 122, doi: 10.1186/1471-2407-8-122.
- González, O. A., Tobia, C., Ebersole, J. L., and Novak, M. J. (2012) Caloric restriction and chronic inflammatory diseases, *Oral Diseases*, **18**, 16-31, doi: 10.1111/j.1601-0825.2011.01830.x.
- Stafstrom, C. E., and Rho, J. M. (2012) The ketogenic diet as a treatment paradigm for diverse neurological disorders, *Front. Pharmacol.*, **3**, 59, doi: 10.3389/fphar.2012.00059.
- Zhao, X., Psarianos, P., Ghorraie, L. S., Yip, K., Goldstein, D., et al. (2019) Metabolic regulation of dermal fibroblasts contributes to skin extracellular matrix homeostasis and fibrosis, *Nat. Metab.*, **1**, 147-157, doi: 10.1038/s42255-018-0008-5.
- Liu, G., and Summer, R. (2019) Cellular metabolism in lung health and disease, *Annu. Rev. Physiol.*, **81**, 403-428, doi: 10.1146/annurev-physiol-020518-114640.
- Nigdelioglu, R., Hamanaka, R. B., Meliton, A. Y., O'Leary, E., Wittet, L. J., et al. (2016) Transforming Growth Factor (TGF)- β promotes *de novo* serine synthesis for collagen production, *J. Biol. Chem.*, **291**, 27239-27251, doi: 10.1074/jbc.M116.756247.
- Park, S. Y., Le, C. T., Sung, K. Y., Choi, D. H., and Cho, E. H. (2018) Succinate induces hepatic fibrogenesis by promoting activation, proliferation, and migration, and inhibiting apoptosis of hepatic stellate cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **496**, 673-678, doi: 10.1016/j.bbrc.2018.01.106.
- Rabinowitz, J. D., and Mutlu, G. M. (2019) A metabolic strategy to reverse fibrosis? *Nat. Metab.*, **1**, 12-13, doi: 10.1038/s42255-018-0013-8.
- Kang, H. M., Ahn, S.H., Choi, P., Ko, Yi-An, Han, S. H., et al. (2015) Defective fatty acid oxidation in renal tubular epithelial cells has a key role in kidney fibrosis development, *Nat. Med.*, **21**, 37-46, doi: 10.1038/nm.3762.
- Wei, Q., Su, J., Dong, G., Zhang, M., Huo, Y., et al. (2019) Glycolysis inhibitors suppress renal interstitial fibrosis via divergent effects on fibroblasts and tubular cells, *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.*, **316**, F1162-F1172, doi: 10.1152/ajprenal.00422.2018.
- Kottmann R. M., Kulkarni, A. A., Smolnycki, K. A., Lyda, E., et al. (2012) Lactic acid is elevated in idiopathic pulmonary fibrosis and induces myofibroblast differentiation via pH-dependent activation of transforming growth factor- β , *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **186**, 740-751, doi: 10.1164/rccm.201201-0084OC.
- Faubert, B., Kulkarni, A. A., Smolnycki, K. A., Lyda, E., Dahanayake, T., et al. (2017) Lactate Metabolism in human lung tumors, *Cell*, **171**, 358-371.e9, doi: 10.1016/j.cell.2017.09.019.
- Hamanaka, R. B., Nigdelioglu, R., Meliton, A. Y., Tian, Y., Witt, L. J., et al. (2018) Inhibition of phosphoglycerate dehydrogenase attenuates bleomycin-induced

- pulmonary fibrosis, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **58**, 585-593, doi: 10.1165/rcmb.2017-0186OC.
29. Meléndez-Hevia, E., De Paz-Lugo, P., Cornish-Bowden, A., and Cárdenas, M. L. (2009) A weak link in metabolism: the metabolic capacity for glycine biosynthesis does not satisfy the need for collagen synthesis, *J. Biosci.*, **34**, 853-872, doi: 10.1007/s12038-009-0100-9.
 30. Selvarajah, B., Azuelos, I., Platé, M., Guillotin, D., Fortyet, E. J., et al. (2019) mTORC1 amplifies the ATF4-dependent de novo serine-glycine pathway to supply glycine during TGF-1-induced collagen biosynthesis, *Sci. Signal.*, **12**, eaav3048, doi: 10.1126/scisignal.aav3048.
 31. Xie, N., Tan, Z., Banerjee, S., Cui, H., Ge, J., et al. (2015) Glycolytic reprogramming in myofibroblast differentiation and lung fibrosis, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **192**, 1462-1474, doi: 10.1164/rccm.201504-0780OC.
 32. Yu, H., Zhu, J., Chang, L., Liang, C., Li, X., et al. (2021) 3-Bromopyruvate decreased kidney fibrosis and fibroblast activation by suppressing aerobic glycolysis in unilateral ureteral obstruction mice model, *Life Sci.*, **272**, 119206, doi: 10.1016/j.lfs.2021.119206.
 33. Kori, Y., Sidoli, S., Yuan, Z. F., Lund, P. J., Zhao, X., et al. (2017) Proteome-wide acetylation dynamics in human cells, *Sci. Rep.*, **7**, 10296, doi: 10.1038/s41598-017-09918-3.
 34. Smith, E. R., and Hewitson, T. D. (2020) TGF-beta1 is a regulator of the pyruvate dehydrogenase complex in fibroblasts, *Sci. Rep.*, **10**, 17914, doi: 10.1038/s41598-020-74919-8.
 35. Hewitson, T. D., and Smith, E. R. (2021) A metabolic reprogramming of glycolysis and glutamine metabolism is a requisite for renal fibrogenesis – why and how? *Front. Physiol.*, **12**, 645857, doi: 10.3389/fphys.2021.645857.
 36. Bernard, K., Logsdon, N. J., Benavides, G. A., Sanders, Y., Zhang, J., et al. (2018) Glutaminolysis is required for transforming growth factor-β1-induced myofibroblast differentiation and activation, *J. Biol. Chem.*, **293**, 1218-1228, doi: 10.1074/jbc.RA117.000444.
 37. Ge, J., Cui, H., Xie, Na, Banerjee, S., Guo, S., et al. (2018) Glutaminolysis promotes collagen translation and stability via α-ketoglutarate-mediated mTOR activation and proline hydroxylation, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **58**, 378-390, doi: 10.1165/rcmb.2017-0238OC.
 38. Hamanaka, R. B., O'Leary, E. M., Witt, L. J., Tian, Y., Gökalp, G. A., et al. (2019) Glutamine metabolism is required for collagen protein synthesis in lung fibroblasts, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **61**, 597-606, doi: 10.1165/rcmb.2019-0008OC.
 39. Henderson, J., Duffy, L., Stratton, R., Ford, D., O'Reilly, S. (2020) Metabolic reprogramming of glycolysis and glutamine metabolism are key events in myofibroblast transition in systemic sclerosis pathogenesis, *J. Cell Mol. Med.*, **24**, 14026-14038, doi: 10.1111/jcmm.16013.
 40. Fernandez-de-Cossio-Diaz, J., and Vazquez, A. (2017) Limits of aerobic metabolism in cancer cells, *Sci. Rep.*, **7**, 13488, doi: 10.1038/s41598-017-14071-y.
 41. Li, P., and Wu, G. (2018) Roles of dietary glycine, proline, and hydroxyproline in collagen synthesis and animal growth, *Amino Acids*, **50**, 29-38, doi: 10.1007/s00726-017-2490-6.
 42. Minicis, S., Seki, E., Uchinami, H., Kluwe, J., Zhang, Y., et al. (2007) Gene expression profiles during hepatic stellate cell activation in culture and *in vivo*, *Gastroenterology*, **132**, 1937-1946, doi: 10.1053/j.gastro.2007.02.033.
 43. Sacchi, M., Bansal, R., and Rouwkema, J. (2020) Bioengineered 3D models to recapitulate tissue fibrosis, *Trends Biotechnol.*, **38**, 623-636, doi: 10.1016/j.tibtech.2019.12.010.
 44. Akamatsu, T., Arai, Y., Kosugi, I., Kawasaki, H., Meguro, S., et al. (2013) Direct isolation of myofibroblasts and fibroblasts from bleomycin-injured lungs reveals their functional similarities and differences, *Fibrogenes Tissue Repair*, **6**, 15, doi: 10.1186/1755-1536-6-15.
 45. Wynn, T. A. (2011) Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis, *J. Exp. Med.*, **208**, 1339-1350, doi: 10.1084/jem.20110551.
 46. Kis, K., Liu, X., and Hagoood, J. S. (2011) Myofibroblast differentiation and survival in fibrotic disease, *Expert Rev. Mol. Med.*, **13**, e27, doi: 10.1017/s1462399411001967.
 47. Bernard, K., Logsdon, N. J., Ravi, S., Xie, Na, Persons, B. P., et al. (2015) Metabolic reprogramming is required for myofibroblast contractility and differentiation, *J. Biol. Chem.*, **290**, 25427-25438, doi: 10.1074/jbc.M115.646984.
 48. Bates, J., Vijayakumar, A., Ghoshal, S., Marchand, B., Yi, S., et al. (2020) Acetyl-CoA carboxylase inhibition disrupts metabolic reprogramming during hepatic stellate cell activation, *J. Hepatol.*, **73**, 896-905, doi: 10.1016/j.jhep.2020.04.037.
 49. Li, Q., Qin, Z., Nie, F., Bi, H., Zhao, R., et al. (2018) Metabolic reprogramming in keloid fibroblasts: aerobic glycolysis and a novel therapeutic strategy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **496**, 641-647, doi: 10.1016/j.bbrc.2018.01.068.
 50. Bernard, K. (2018) Collagen biosynthesis in pulmonary fibrosis: unraveling the metabolic web, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **58**, 545-546, doi: 10.1165/rcmb.2017-0350ED.
 51. Yoshida, K., Furuya, S., Osuka, S., Mitoma, J., Shinoda, Y., et al. (2004) Targeted disruption of the mouse 3-phosphoglycerate dehydrogenase gene causes severe neurodevelopmental defects and results in embryonic lethality, *J. Biol. Chem.*, **279**, 3573-3577, doi: 10.1074/jbc.C300507200.
 52. Hecker, L., Logsdon, N. J., Kurundkar, D., Kurundkar, A., Bernard, K., et al. (2014) Reversal of persistent fibrosis in aging by targeting Nox4-Nrf2 redox imbalance, *Sci. Transl. Med.*, **6**, 231ra47, doi: 10.1126/scitranslmed.3008182.
 53. Tsukui, T., Sun, K.-H., Wetter, J. B., Wilson-Kanamori, J. R., Hazelwood, L. A., et al. (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.
 54. Du, K., Hyun, J., Premont, R. T., Choi, S. S., Michelotti, G. A., et al. (2018) Hedgehog-YAP signaling pathway regulates glutaminolysis to control activation of hepatic stellate cells, *Gastroenterology*, **154**, 1465-1479.e1413, doi: 10.1053/j.gastro.2017.12.022.
 55. Robertson, L. T., and Mitchell, J. R. (2013) Benefits of short-term dietary restriction in mammals, *Exp. Gerontol.*, **48**, 1043-1048, doi: 10.1016/j.exger.2013.01.009.
 56. Spingler, S. R., (2010) Caloric restriction: from soup to nuts, *Ageing Res. Rev.*, **9**, 324-353, doi: 10.1016/j.arr.2009.10.003.
 57. López-Lluch, G., and Navas, P. (2016) Calorie restriction as an intervention in ageing, *J. Physiol.*, **594**, 2043-2060, doi: 10.1113/JP270543.
 58. Ribarič, S. (2012) Diet and aging, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2012**, 741468, doi: 10.1155/2012/741468.
 59. Xu, S., Tao, H., Cao, W., Cao, Li, Lin, Y., et al. (2021) Ketogenic diets inhibit mitochondrial biogenesis and induce cardiac fibrosis, *Signal Transduct. Target. Ther.*, **6**, 54, doi: 10.1038/s41392-020-00411-4.

BIOENERGETICS OF THE FIBROSIS**Review****E. I. Yakupova^{1,2}, D. B. Zorov^{1,3*}, and E. Y. Plotnikov^{1,3*}**

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

² *Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia*

³ *Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, 117997 Moscow, Russia*

It is known that the development of fibrosis is associated with many diseases, being both a cause and effect of damage to organs and tissues. Replacement of functional tissue with a scar can lead to organ dysfunction, which is often a life-threatening condition. The development of effective approaches for the prevention or treatment of fibrosis requires an in-depth understanding of all aspects of its pathogenesis, from epithelial-mesenchymal transformation to fibroblast proliferation. Fibrosis can be induced by trauma, ischemic injury, inflammation, and many other conditions accompanied by repeated cycles of tissue damage and repair. Energetic metabolism is the basis of the functioning of all cells in the organism and its impairment can be the target for the therapy of such pathological processes as ischemia/reperfusion, epilepsy, diabetes, cancer, and neurological disorders. The emergence of fibrosis is also associated with the features of the cell bioenergetics, and in our study, we tried to analyze what changes in the energetic metabolism are observed during fibrosis development and evaluate the possibility of affecting energetic metabolism as an anti-fibrotic approach.

Keywords: fibrosis, fibroblasts, energy metabolism, glycolysis, respiration, collagen

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, биоорганической химии, микробиологии, иммунологии, физиологии, нейробиологии, биомедицинских наук и др.), направленные на понимание молекулярных и клеточных основ биологических процессов. Тематика журнала также охватывает новые экспериментальные методики в области биохимии, теоретические достижения, имеющие значение для биохимии, 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.

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 3–4 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 <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya> и <https://biochemistrymoscow.com>, а также на порталах издательств Pleiades <http://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. В свободном доступе также находятся две-три лучшие полнотекстовые статьи каждого выпуска, а также в полном объеме тематические выпуски журнала, посвященные наиболее актуальным проблемам биохимии. Кроме того, в рубрике «Papers in Press» размещаются до выхода в свет принятые к публикации рукописи, получившие высшие оценки при рецензировании.

1.6. Импакт-фактор Biochemistry (Moscow) в 2018 г. составил 1.978, импакт-фактор РИНЦ для

«Биохимии» – 2.435. По данным Scopus журнал находится во 2-й квартили (Q2) среди журналов биохимического и 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). В этом случае в статье необходимо указать тип лицензии Creative Commons. Всю информацию о публикации статьи в свободном доступе можно найти на сайте издательства: <http://pleiades.online/ru/authors/openaccess/>.

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 или ozrina@bio.chem.msu.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; номера строк также следует 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 желательно 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 информация о потенциальных конфликтах интересов; 4) авторы оз-

накопились 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 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.

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 7.

При использовании нестандартных сокращений должен быть добавлен раздел *Принятые сокращения*.

Текст статьи следует разбить на разделы: 1) Введение, 2) Методы исследования, 3) Результаты исследования, 4) Обсуждение результатов (объединенный раздел «Результаты и их обсуждение» допускается в тех случаях, когда обсуждение невелико по объему), 5) Список литературы; 6) 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) 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.

2) 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. Приветствуется описание роли каждого из авторов публикации.

3) В разделе «Конфликт интересов» авторы заявляют о наличии или отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере. Данный раздел является обязательным.

4) 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 утвержденных 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».

5) 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 100 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 квад-

ратных 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, csdb.glycoscience.ru/bacterial).

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. Sloan-Dennison, S., and Schultz, Z.D. (2018) Label-free plasmonic nanostar probes to illuminate *in vitro* membrane receptor recognition, *Chem. Sci.*, **10**, 1807-1815, doi: 10.1039/c8sc05035j.

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. Аджихина И.С.), Медицина, Москва, с. 332-347.

7. Гандельман О.А. (1992) *Кинетика и механизм биолюминесцентного 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)*, **11**, 1228-1237, doi: 10.1134/S00062979-13110035.

Для авторов, использующих систему EndNote, редакция предоставляет стиль, который поддерживает форматирование цитат в тексте и список литературы. Стилиевой файл можно найти на сайтах журнала <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>

и <https://biochemistrymoscow.com> в разделах для авторов.

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 и Symbol, 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 Symbol) в соответствии со стиливым оформлением журнала.

Стиль оформления текстового материала должен быть простым: **без запрограммированных заголовков, вставок, шаблонов, ссылок на литературные источники (гиперссылок)**; 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».

3.3.3. 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, так как такие файлы дают низкое качество при печати и имеют неоправданно большой размер.

Общие требования к подготовке графиков, диаграмм и формул:

– **график** должен содержать обозначения координатных осей (измеряемый параметр и единица измерения), а также кривых и других деталей. Надписи по осям выполняются вдоль осей шрифтом Arial с заглавной буквы, единица измерения отделяется запятой, а не скобками (например, Объем элюента, мл). Линии внутри рисунка следует пронумеровать (цифры выполняются *курсивом* – 1, 2 и т.д.), и в подрисуночной подписи (не на рисунке) дать пояснения к каждой линии. Экспериментальные точки предпочтительно представлять заштрихованными и незаштрихованными кружками, квадратами, треугольниками, ромбами. Отдельные кривые могут различаться также сплошным или штриховым изображением. Все линии должны быть изображены четко с толщиной линий (обычно 3 пункта), позволяющей уменьшить рисунок до конечного размера в журнале. Координатные оси в большинстве случаев необходимо отображать черными (не серыми) линиями. Фон графика или диаграммы должен быть белым, без линий координатной сетки (за исключением случаев, когда иной цвет фона или наличие сетки необходимы для правильного восприятия);

– на **диаграммах** и **фотографиях** отдельные элементы (столбцы, дорожки геля и пр.) следует пронумеровать *курсивными* арабскими цифрами (1, 2 и т.д.) и в подрисуночной подписи (не на рисунке) дать пояснения к каждой цифре. Если помимо арабских требуется введение римских цифр (I, II, III и т.д.), эти цифры должны быть прямого начертания.

– если рисунок состоит из нескольких частей (диаграмм, графиков, схем, структур белков, фотографий, в т.ч. электрофореграмм), их нужно обозначить строчными *курсивными* буквами (a, б, в и т.д.) гарнитурой Times, размером большим, чем основной текст, и поместить эти буквы в верхних левых углах соответствующих частей. В подрисуночной подписи следует дать пояснение к каждой части рисунка;

– для написания **химических формул** в тексте используется программа ChemWindows;

– длинные и сложные **математические формулы** следует представлять в виде рисунков без подписей в одном из допустимых форматов (pdf, tiff или jpg). Каждую формулу нужно дать отдельным файлом, название которого соответствует номеру формулы; при подготовке данных файлов следует руководствоваться правилами подготовки графических материалов. Функцией «Редактор уравнений» надо пользоваться **только для развернутых уравнений** (как нумерованных, так и встречающихся в тексте), но не для небольших выражений (обозначений), вкрапленных в текст, например, ΔG , $T\Delta S$, K_m . (Для таких небольших выражений должны использоваться основные функции программы Word, как и для всего остального текста статьи.) Для выражений, в которых требуется «кернинг» (нижний и верхний индексы, расположенные один под другим), надо использовать только надстрочные и подстрочные знаки (например, NH_3^+), а «кернинг» будет выполнен макетчиком. Эти требования обусловлены тем, что издательская программа неправильно воспринимает данные, полученные с помощью функции «Редактор уравнений»;

– в ширину формула не должна превышать 8,5 см (ширина колонки журнала). Более длинные формулы должны быть разбиты автором на несколько строк. Формулы должны быть набраны шрифтами Times New Roman и Symbol. В случае если формулы предоставляются в виде пикселизированных (растровых) изображений, они должны быть представлены в черно-белом режиме (Line-art, Black-and-White, Bitmap) в формате tiff или jpg. Такие изображения должны обладать **высоким реальным разрешением** (пикселизация не должна быть грубой). Особое внимание следует уделять качеству графической передачи надписей, цифр и мелких элементов пикселизированного изображения. Пикселизированные (растровые) изображения не стоит вставлять в документ Word или переводить в формат PDF, так как это зачастую ухудшает их качество;

– **аминокислотные, нуклеотидные и пр. последовательности** часто изображаются в форме, требующей строго вертикального расположения компонентов. Поэтому во избежание ошибок и необходимости проверять большие количества сложной информации авторы должны представлять в редакцию материалы такого рода в виде, пригодном для репродукции.

Обращаем внимание на общие условия публикации иллюстраций:

– надписи и обозначения на рисунках могут меняться в русской и английской версиях при

переводе, поэтому для фотографий и рисунков, где надписи наложены на сложный, неоднотонный фон, желательно предоставить второй вариант без текста и всех обозначений, для остальных иллюстраций – располагать надписи на иллюстрации так, чтобы они не соприкасались с другими ее частями. Авторы также могут сами подготовить версии рисунков с английскими надписями;

– рисунок должен иметь заголовок и информативную подрисуночную подпись, делающую его смысл понятным без обращения к тексту – указываются условия, специфические для данного эксперимента; ссылки на основной текст допускаются только чтобы избежать повторений и неясностей;

– цветные иллюстрации публикуются **бесплатно для авторов** в том случае, если они будут размещены **только в электронной версии статьи**, а в печатной версии журнала они будут в черно-белом исполнении. При этом авторы должны иметь в виду, что в печатной версии с черно-белыми рисунками сохраняются подрисуночные подписи из цветной электронной версии, поэтому следует избегать указаний на цвет в подрисуночных подписях. Авторам необходимо подбирать цвета таким образом, чтобы при черно-белой печати не утратилась информативность. Цветные линии графиков желательно размечать обозначениями, цифрами или спецсимволами, или делать различающиеся типы линий для каждого цвета. Цветные области на иллюстрациях желательно размечать различающимися обозначениями или спецсимволами, а не одинаковыми символами разных цветов. Если цветное разделение областей находится примерно в одном цветовом тоне, то желательно провести тонкую линию границы между ними. При большом количестве цветных областей в схожих цветовых тонах желательно дополнительно обозначить области символами или штриховкой. Все надписи и обозначения желательно делать не цветными, а черными или белыми, в зависимости от подложки;

– если электронная версия статьи содержит несколько цветных рисунков, в печатной версии возможна платная публикация всех этих рисунков в цвете, либо бесплатная публикация всех этих рисунков в черно-белом исполнении. Публикация в печатной версии только части цветных рисунков в цветном исполнении невозможна;

– подготовленные рисунки желательно распечатать, чтобы убедиться, что они хорошо выглядят в напечатанном виде: все элементы рисунка должны быть хорошо видны на распечатке, фон должен быть чистым, надписи и цифры

должны легко читаться. Зачастую бывает достаточно сложно оценить качество рисунка только по тому, как он выглядит на экране компьютера.

— подписи к рисункам следует сгруппировать в последовательном порядке и оформить как отдельный раздел в конце рукописи;

— если авторы используют в своей рукописи иллюстрации или таблицы из других публикаций (в том числе своих собственных), то им необходимо запросить у Издателей этих публикаций разрешение на перепечатку или использование материалов.

Несоблюдение правил подготовки графического материала приводит к необходимости переработки рисунков авторами и задержке публикации рукописи.

3.3.5. Дополнительные материалы к статьям.

Для более полного описания исследования к статье могут прилагаться дополнительные материалы (аудио- и видеофайлы, презентации, дополнительные таблицы, рисунки и пр.) при условии, что автор является правообладателем прилагаемых материалов, и автором ранее не были переданы авторские права на их использование иным (кроме издателя) лицам, либо автор имеет письменное разрешение правообладателя на их использование в целях опубликования и распространения в журнале. Дополнительные материалы публикуются только в электронной версии журнала на сайте: <http://link.springer.com>, а также на сайте журнала: <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>. При наличии дополнительных материалов в тексте необходимо разместить ссылку на Приложение к статье.

3.3.6. Все физические величины рекомендуются приводить в международной системе СИ.

3.3.7. Физико-химические символы в тексте, структурные формулы органических соединений и математические формулы должны быть набраны на компьютере. В буквенных обозначениях отношений единиц в качестве знака деления следует применять косую черту, например, моль/с (моль в секунду). В более сложных выражениях одновременно с косой чертой применяют скобки, чтобы избежать двусмысленности: $a/(bc)$, но не $a/b/c$ или a/bc ; $(a/b)c$, но не $a/b \cdot c$. Отношения можно также представить в виде произведения символов единиц, возведенных в степень (положительную и отрицательную), например, моль \cdot с⁻¹. Не допускаются выражения типа мА/гель, мкмоль/мин·мг белка и т.п. В таких случаях следует писать: мА на 1 столбик геля, мкмоль/мин на 1 мг белка и т.п.

3.3.8. При подготовке статьи необходимо учесть правила использования символов, сокращений, условных обозначений и пр., рекомендованные Комиссией по биохимической номенклатуре Международного союза биохимии и молекулярной биологии (<https://iubmb.org>). Сокращенные обозначения, приведенные в настоящих правилах, можно применять без специальной расшифровки (определения). Символы и сокращения, не указанные в приведенном списке, подлежат определению на первой странице, подстрочно, под заголовком «Принятые сокращения».

Следует помнить, что сокращения создают помехи для читателя, поэтому их применение должно быть сведено к минимуму. Ясность и недвусмысленность важнее краткости. С другой стороны, применение сокращений названий веществ и других терминов в ряде случаев представляется оправданным, в особенности в уравнениях, таблицах, на рисунках.

Названия простых веществ можно заменить их формулами, например, NaCl вместо «хлорид натрия», CH₃COOH или AcOH вместо «уксусная кислота». При составлении сокращенных обозначений веществ следует широко пользоваться стандартными химическими символами (C, H, O, P, S, Na, Cl и т.д.), тривиальными названиями (фолат и т.п.) и их символами (Me – метил, Pr – пропил, Ac – ацетил и т.д.).

Для обозначения аминокислотных остатков в полипептидах и белках рекомендуется использовать одно- или трехбуквенные символы:

Аланин	Ala	A
Аргинин	Arg	R
Аспарагин	Asn	N
Аспарагиновая кислота	Asp	D
Аспарагиновая кислота или аспарагин	Asx	B
Валин	Val	V
Гистидин	His	H
Глицин	Gly	G
Глутамин	Gln	Q
Глутаминовая кислота	Glu	E
Глутаминовая кислота или глутамин	Glx	Z
Изолейцин	Ile	I
Лейцин	Leu	L
Лизин	Lys	K
Метионин	Met	M
Пролин	Pro	P
Серин	Ser	S
Тирозин	Tyr	Y
Треонин	Thr	T
Триптофан	Trp	W
Фенилаланин	Phe	F
Цистеин	Cys	C

Макромолекулы, построенные из повторяющихся единиц, могут быть обозначены с помощью приставки «поли» или подстрочного индекса *n*. Например, полилизин можно обозначить как поли(Lys) или (Lys)_{*n*}; полимер, построенный из чередующихся остатков аланина и лизина, — поли(Ala–Lys) или (Ala–Lys)_{*n*}; аналогичный полимер со случайным распределением остатков аланина и лизина — поли(Ala, Lys) или (Ala, Lys)_{*n*}. Индекс *n* можно заменить числом — средним, например, (Lys)₁₀, или с указанием пределов, например, (Lys)_{8–12}.

При трехбуквенном обозначении аминокислотных остатков белков следует использовать прямые буквы, из которых первая — заглавная, а остальные — строчные. Аминокислотные остатки с номером в последовательности следует приводить в виде Asn223.

Согласно правилам генетической номенклатуры для написания **генов** используют в основном трехбуквенное обозначение латинскими буквами, написанными **курсивом** (*Italic*) (кроме дрожозилы и некоторых других организмов). Соответствующие продукты (белки) обозначают заглавными буквами прямого начертания. У **прокариот** нормальные гены обозначают строчными буквами со знаком «плюс» в верхнем индексе (например, *proA*⁺); мутантные гены — также строчными буквами с номером мутации (например, *proA22*). У **эукариот** нормальные гены обозначают заглавными буквами (например, *LEU2*), мутантные — строчными буквами с номером мутации, если необходимо (например, *leu2–3*).

При описании в статье новой последовательности гена **необходимо предварительное депонирование ее в базе данных GenBank** или другой публично доступной базе данных.

Символы, используемые для моносахаридов:

Арабиноза	Ara
2-Дезоксирибоза	dRib
Галактоза	Gal
Глюкоза	Glc
Ксилоза	Xyl
Манноза	Man
Рибоза	Rib
Фруктоза	Fru
Фукоза	Fuc
Глюкозамин, N-ацетилглюкозамин	GlcN, GalNAc
Галактозамин, N-ацетилгалактозамин	GalN, GlcNAc
Нейраминавая, N-ацетилнейраминавая кислота	Neu, NeuAc

Если необходимо указать — фураноза или пираноза, — следует написать курсивом буквы *f* или *p* после символа моносахарида, например, Rib*f* — рибофураноза.

Для нуклеозидов, нуклеотидов и полинуклеотидов используются следующие символы:

Аденозин	A
Гуанозин	G
Инозин	I
Ксантозин	X
Рибозилтимин	T
Уридин	U
Аденозин-5'-моно-, ди- и трифосфаты	AMP, ADP, ATP
Гуанозин-5'-моно-, ди- и трифосфаты	GMP, GDP, GTP
Оротидин-5'-моно-, ди- и трифосфаты	OMP, ODP, OTP
Риботимидин-5'-моно-, ди- и трифосфаты	гTMP, гTDP, гTTP
Уридин-5'-моно-, ди- и трифосфаты	UMP, UDP, UTP
Цитидин-5'-моно-, ди- и трифосфаты	CMP, CDP, CTP

Соответствующие дезоксирибонуклеотиды обозначаются добавлением латинской строчной буквы d перед трехбуквенным символом, например, dATP, dGTP и т.д.

Обозначение изомеров AMP: 2'-AMP, 3'-AMP, 5'-AMP, 3' : 5'-AMP (аденозин-3' : 5'-монофосфат, сAMP).

Ниже приведены символы, используемые для нуклеиновых кислот:

Дезоксирибонуклеиновая кислота	ДНК
Комплементарная ДНК	кДНК
Митохондриальная ДНК	мтДНК
Рибонуклеиновая кислота	РНК
Митохондриальная РНК	мтРНК
Матричная (информационная) РНК	мРНК
Рибосомная РНК	рРНК
Транспортная РНК	тРНК
тРНК с указанием акцепторной специфичности	тРНК ^{Ala} , тРНК ^{Glu} и т.д.
Изоакцепторная РНК	тРНК ₁ , тРНК ₂ и т.д.
Аминоацилпроизводные тРНК	AlatРНК, GlutРНК и т.д.

Полифосфоинозитиды и продукты их гидролиза рекомендуется обозначать следующими символами:

Фосфатидил	Ptd
Инозитид	Ins
Фосфат	P

Для названия ферментов допускаются сокращения (с пояснением в сноске «Принятые сокращения») типа Г6ФДГ (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа); нет возражений против замены названия субстрата, входящего в тривиальное наименование фермента, стандартной аббревиатурой, например, АТРаза, Glu-декарбоксилаза и т.п. Прочие сокращения, не требующие специальной расшифровки:

БСА	бычий сывороточный альбумин
ДЭАЭ-целлюлоза	диэтиламиноэтилцеллюлоза
КМ-целлюлоза	О-карбоксиметилцеллюлоза
ПААГ	полиакриламидный гель
ТХУ	трихлоруксусная кислота
ЭГТА	этиленгликоль-бис-(аминоэтилэфир)тетраацетат
ЭДТА	этилендиаминтетраацетат
СоА, СоASH	коэнзим А
Ацил-СоА	ацилкоэнзим А
Ds-Na	додецилсульфат натрия
FAD, FADH ₂	флавинадениндинуклеотид и его восстановленная форма
FMN, FMNH ₂	рибофлавин-5'-фосфат и его восстановленная форма
GSH, GSSG	глутатион и его окисленная форма
G-белок	гуаниннуклеотидсвязывающий регуляторный белок
IgG	иммуноглобулин G
NAD, NAD ⁺ , NADH	никотинамидадениндинуклеотид, его окисленная и восстановленная формы
NADP, NADP ⁺ , NADPH	никотинамидадениндинуклеотидфосфат, его окисленная и восстановленная формы
P _i	неорганический фосфат
PP _i	неорганический пиродифосфат
РОРОР	1,4-бис-(5-фенилоксазол-2)-бензол
PPO	2,5-дифенилоксазол
Q, QH ₂	убихинон, убихинол

Термины, обозначающие групповые понятия (жирные кислоты, белок, вирус и т.п.), а также краткие термины (фолат, фуран и т.п.) **не сокращаются. Не следует сокращать** понятия типа «красные кровяные клетки», «внеклеточная жидкость», а также названия тканевых препаратов, буферов, суспензионных сред.

Стандартные экспериментальные физико-химические методы и связанные с ними термины могут быть обозначены в тексте общепринятыми аббревиатурами из заглавных букв русского алфавита: ДОВ – дисперсия оптического вращения, КД – круговой дихроизм, ГЖХ – га-

зожидкостная хроматография, ЖХВД – жидкостная хроматография высокого давления, ИК- и УФ-спектроскопия – инфракрасная и ультрафиолетовая спектроскопия, ТСХ – тонкослойная хроматография, ЭПР – электронный парамагнитный резонанс, ЭСР – электронный спиновый резонанс, ЯМР – ядерный магнитный резонанс, Ds-Na-ПААГ-электрофорез – электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия.

Также не требуют специальной расшифровки общепринятые сокращения ПЦР (полимеразная цепная реакция) и ИФА (иммуноферментный анализ).

3.3.9. Номенклатура веществ, меченных изотопами. Символ изотопа помещается в квадратных скобках перед названием соединений (без пробела): [¹⁴C]мочевина, [α -¹⁴C]лейцин, L-[метил-¹⁴C]метионин. Если соединение содержит больше одного атома изотопа, и позиция этих атомов не указывается, то число атомов изотопа обозначается подстрочным индексом справа от символа: [¹⁴C₂]гликолевая кислота. Символом U обозначается равномерное распределение метки: запись [U-¹⁴C]глюкоза означает, что изотоп ¹⁴C распределен равномерно между всеми шестью положениями. Символ G указывает, что все позиции содержат изотоп, но его распределение между позициями необязательно равномерно: [G-¹⁴C]глюкоза. В последнем случае достаточно писать: [¹⁴C]глюкоза.

Приставка, указывающая изотоп, ставится перед той частью названия вещества, к которой она относится: йод[¹⁴C]уксусная кислота, 1-амино-[¹⁴C]метилциклопентанол (H₂N¹⁴CH₂C₅H₈OH), фруктозо-1,5-[1-³²P]дифосфат. Термины типа [¹³¹I]-меченный альбумин не следует сокращать до [¹³¹I]альбумин, поскольку нативный альбумин не содержит йода; приемлемо обозначение [¹³¹I]йодальбумин.

Если вещество содержит изотопы нескольких элементов, их символы располагаются в алфавитном порядке: [3-¹⁴C, 2,3-D¹⁵N]серин. Дейтерий можно обозначать символами ²H или D, тритий – ³H или T.

Положение изотопа в соединении следует обозначать арабскими цифрами, греческими буквами или приставками, которые помещаются внутри квадратных скобок перед символом изотопа и отделяются от него дефисом: [1-³H]этанол, L-[α -¹⁴C]лейцин, [карбокси-¹⁴C]лейцин, [3,4-¹⁴C,³⁵S]метионин, L-[метил-¹⁴C]метионин.

Те же правила применяются и в том случае, если соединения обозначены стандартными символами: [α -³²P]АТР, [³²P]СМР (не СМ³²P!). Однако радиоактивные неорганические фосфат и

пирофосфат можно обозначить $^{32}\text{P}_i$ и $^{32}\text{PP}_i$ соответственно.

Изотопы в простых молекулах, написанных формулами, обозначаются без квадратных скобок: $^{14}\text{CO}_2$, H_2^{18}O , D_2O , $\text{H}_2^{35}\text{SO}_4$, $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ (но [^{32}P]фосфат). Квадратные скобки не ставятся, когда символ изотопа присоединяется к словам, не являющимся названием определенного соединения, а также к словам, обозначающим групповые названия соединений: ^{131}I -меченный, ^3H -лиганды, ^{14}C -стероиды, ^{14}C -аминокислоты.

При описании результатов экспериментов с использованием изотопов радиоактивность следует, если возможно, выражать в абсолютных величинах — кюри (Ки) или беккерелях (Бк), или распадах/мин (DPM), или имп/мин (CPM).

3.3.10. Ниже приведены рекомендации по оформлению конкретных разделов, принятые в международной биохимической литературе (см. *Biochem. J.*, **289**, 1–15 (1993)).

Животные, растения, микроорганизмы. Для всех экспериментальных животных, кроме обычных лабораторных, следует указывать полные родовое и видовое названия; то же относится и к растениям. Необходимо указать разновидности, штаммы и, если возможно, источник материала. В сообщениях о влиянии изменений в питании приводится состав питательных смесей.

Названия микроорганизмов в резюме и при первом упоминании в тексте должны быть приведены **полностью**, с указанием родового и видового названий и **напечатаны курсивом (*Italic*)**; далее по тексту родовое название обозначается одной заглавной (первой) буквой, а видовое печатается полностью. Необходимо указать номер в коллекции, из которой получены микроорганизмы, или номер штамма (прямым начертанием). Если обсуждаются два рода с одинаковой первой буквой, можно использовать сокращения типа *Strep.* и *Staph.*; если в тексте речь идет о семействах (например, эубактерии, молочнокислые бактерии) или о роде в целом (например, стафилококковые), то соответствующие названия печатаются обычным шрифтом.

Центрифугирование. Если условия центрифугирования имеют решающее значение, то следует сообщить необходимые сведения, позволяющие воспроизвести эксперимент: описание центрифужного ротора, количественный состав суспензионной среды, температуру процесса, время работы ротора с постоянной скоростью (исключая время на разгон и торможение), скорость центрифугирования в единицах g , приведенную к усредненному радиусу вращения столбика жидкости. Например, «центрифугирование проводилось в течение 15 мин при 2°C и $10\,000\,g$ ($r_{\text{cp}}\,8\text{ см}$)».

При центрифугировании в градиенте плотности нужно указать тип использованной центрифуги и ротора, температуру, состав градиента. Результаты лучше всего представлять в виде зависимости от расстояния до центра ротора, а не от номера фракции; в таком случае не обязательно указывать верхнюю и нижнюю части градиента. Если используются номера фракций, то верх и низ градиента должны быть отмечены.

Ультрацентрифугирование описывается следующими символами и единицами: коэффициент седиментации (не константа) — s ; коэффициент седиментации при нулевых концентрациях в воде при 20°C — $s_{20,\text{B}}^0$; единицы Сведберга — (10^{-13} с) — S ; удельный объем частицы — v ; коэффициент диффузии — D , коэффициент диффузии в воде при 20°C — $D_{20,\text{B}}^0$. Нужно указывать температуру, при которой проводились седиментация и диффузия.

Хроматография. Фотографии и рисунки бумажных и тонкослойных хроматограмм публикуются только тогда, когда несут информацию, которую сложно описать в тексте. Скорость движения вещества относительно фронта растворителя в бумажной или тонкослойной хроматографиях описывается величиной R_f . Соотношение смеси растворителей лучше всего описывать так: бутан-1-ол : CH_3COOH : H_2O (4 : 4 : 1, по объему).

Диаграммы элюирования для колоночной хроматографии должны быть представлены так, чтобы объем элюента возрастал слева направо. Единицы концентрации и объема должны быть указаны. Следует также приводить размеры колонки и, если возможно, ее свободный объем (V_0). Максимум пика элюции характеризуется величиной V_e (объем элюции) или, лучше, коэффициентом распределения (α или K_D). Калибровочные кривые для колонок (зависимость распределения молекулярных масс от V_e или K_D) не представляются.

Электрофорез. Фотографии электрофоретического разделения в гелях публикуются, если содержат важную информацию. В тексте должны быть оговорены состав среды, pH, температура, электрофоретические подвижности (m), рабочее напряжение. Для обозначения изоэлектрических точек используется символ pI .

Ферменты. В вопросах номенклатуры ферментов авторам следует придерживаться рекомендаций последнего издания «Enzyme Nomenclature» (Acad. Press, San Diego, New York, 1992) с учетом дополнений (<http://www.enzyme-database.org/news.php>). Упоминание фермента необходимо сопровождать его номенклатурным номером. В каждой статье следует оговаривать единицы количества ферментов, что может быть сделано в терминах скорости реакции, катализируемой в

определенных условиях. Единица СИ для скорости составляет 1 моль превращенного субстрата (или 1 моль образующегося продукта) в 1 секунду. Это значение скорости соответствует единице количества фермента, называемой katal (символ — kat). За единицу активности фермента также можно принять его количество, обеспечивающее иную скорость реакции, например, 1 мкмоль субстрата в 1 мин.

При определении концентрации белков часто используют стандартные белковые растворы (например, БСА); в таких случаях следует указать тип белка, его источник и, если возможно, влажность.

Константы скорости прямых и обратных реакций в многостадийном ферментативном процессе следует обозначать k_{+n} и k_{-n} соответственно. Константа Михаэлиса (K_m) определяется как концентрация субстрата ($[S]$), при которой $v = V/2$, где $V(V_{max})$ — скорость реакции в условиях насыщения фермента субстратом, v — скорость образования продукта или расходования субстрата. Если в реакции участвуют два субстрата — А и В, то $K_m^A = [A]$ при $v = V/2$ и $[B]$, стремящейся к бесконечности; значение $[A]$ при $v = V/2$ и конечной концентрации В, которая должна быть указана, следует называть кажущейся константой Михаэлиса для А ($K_m^{A \text{ каж}}$). В ферментативной кинетике используются также понятия: K_s — константа диссоциации фермент-субстратного комплекса, K_i — константа диссоциации фермент-ингибиторного комплекса, $[I]_{50}$ — концентрация ингибитора, вызывающая полумаксимальное торможение реакции, h — коэффициент Хилла — параметр уравнения Хилла, используемого для описания негиперболических зависимостей v от концентрации субстрата или модификатора (см. также рекомендации по символам и терминологии в ферментативной кинетике в «Arch. Biochem. Biophys.» за 1983 г. (224, 732–740)).

Количество вещества, молекулярная масса и дальтон, молярная концентрация. В Международной системе единиц СИ за единицу количества вещества (n) принят моль — количество вещества, содержащее столько же структурных единиц (молекул, атомов, ионов, электронов или др.), сколько атомов углерода содержит 0,012 кг углерода¹² (постоянная Авогадро $N_A = 6,02 \cdot 10^{23}$ 1/моль показывает число структурных единиц в 1 моле любого вещества). Молярная масса (M) — масса 1 моля вещества (m/n), имеет размерность г/моль или кг/моль. Ясно, что масса вещества (m , г), количество вещества (n , моль) и молярная масса (M , г/моль) — понятия разные и между ними существует простое соотношение: $m = nM$. Для обозначения массы биохимических

объектов преимущественно используют величины относительной молекулярной массы (M_r , прежнее наименование — «молекулярный вес») — отношение массы молекулы вещества к 1/12 массы атома углерода¹², следовательно, величина безразмерная, и молекулярной массы — массы одной молекулы вещества, выраженной в дальтонах (Да — дальтон — 1/12 массы атома углерода¹² или M/N_A). Таким образом, про некий белок можно сказать, что он имеет относительную молекулярную массу 50 000 ($M_r = 50\,000$) или молекулярную массу 50 000 Да (лучше 50 кДа). Некорректно выражать M_r в дальтонах, по всей статье следует использовать либо M_r , либо молекулярную массу (кДа).

При описании растворов следует давать **молярную концентрацию** (М, мМ, мкМ и т.д.), показывающую, сколько молей вещества содержится в 1 л раствора, но не **нормальную** концентрацию (н.). Концентрацию указывают в десятичной системе (0,25 М HCl). Использование процентных выражений концентрации следует уточнять дополнением: m/m или m/V или V/V , например, 5%-ный раствор (m/V) означает 5 г на 100 мл. Для растворов солей, выраженных в процентах, следует указывать, были ли использованы кристаллогидраты или безводные соли.

Нуклеотидная последовательность. Авторам следует помнить, что последовательность нуклеотидов должна быть определена в обеих цепях ДНК. Для публикации обычно достаточно четкого описания таких определений и наличия полной последовательности.

Степени в таблицах и на рисунках. Часто авторы, желая избежать чисел с большим количеством знаков, в заголовках таблиц или на рисунках используют степени; в таких случаях необходима большая аккуратность. Здесь лучше пояснить примерами: 1) концентрацию 0,00015 М можно записать $15 \cdot 10^{-5}$ М, лучше степень заменить соответствующей приставкой — 0,15 мМ или 150 мкМ; если же речь идет о выражении данной концентрации в таблице или на рисунке, то под заголовком «Концентрация, мМ» следует писать 0,15 или под заголовком «Концентрация, мкМ» — 150, или, если заголовок «Концентрация $\times 10^5$, М», то 15 (но не 15 под заголовком «Концентрация, М $\times 10^5$!»); 2) если значение некоего k равно 0,002, то следует писать 2 под заголовком « $10^3 k$ »; если указано 2 под заголовком « $10^{-3} k$ », то это означает, что k равно 2000; 3) сложные количественные выражения записываются аналогично: выражение $1/[S] = 200 \text{ М}^{-1}$ будет выглядеть как 2 под заголовком « $10^{-2}/[S]$, мМ⁻¹» или как 0,2 под заголовком « $1/[S]$, мМ⁻¹». Удобно пользоваться квадратными скобками для обозначения концентрации.

Ниже приведены десятичные приставки к единицам измерения и соответствующие символы, которыми рекомендуется пользоваться.

Степень	Приставка	Символ
10^{12}	тера	T
10^9	гига	G
10^6	мега	M
10^3	кило	k
10^2	гекто	г*
10	дека	да*
10^{-1}	деци	д*
10^{-2}	санти	с*
10^{-3}	милли	м
10^{-6}	микро	мк
10^{-9}	нано	н
10^{-12}	пико	п
10^{-15}	фемто	ф
10^{-18}	атто	а

* По возможности избегать (за исключением см).

Комбинация приставки и символа единиц измерения считается одним символом и может возводиться в степень без скобок, например, мМ^{-1} и см^2 .

Буферные растворы следует так описывать, чтобы читатель мог воспроизвести условия эксперимента. Полезно бывает дать в разделе «Методы исследования» или при первом упоминании полный состав буферного раствора, например: 0,09 М CH_3COONa /0,01 М CH_3COOH , рН 5,6 (это означает, что буферная смесь приготовлена из данных компонентов в указанных концентрациях). Далее по тексту можно коротко указать: 0,1 М натрий-ацетатный буфер, рН 5,6 — суммарную концентрацию всех входящих в раствор ионизированных веществ. Если буфер содержит два и более видов ионизированных веществ, например, пиридин и CH_3COOH , то следует указать концентрацию каждого компонента.

Некоторые буферы широко известны по тривиальным названиям, образованным первыми буквами их химических названий, и не нуждаются в расшифровке:

Aces	2-[(2-Амино-2-оксоэтил)амино]этансульфоновая кислота
Ada	[(Карбоимилметил)амино]диуксусная кислота
Bes	2-[Бис-(2-гидроксиэтил)амино]этансульфоновая кислота
Bicine	N,N-Бис-(2-гидроксиэтил)глицин
Bistris	2-[Бис-(2-гидроксиэтил)амино]-2-(гидрокси-метил)пропан-1,3-диол
Hepes	4-(2-Гидроксиэтил)-1-пиперазин-этансульфоновая кислота

Hepes	4-(2-Гидроксиэтил)-1-пиперазин-пропан-сульфоновая кислота
Mes	4-Морфолин-этансульфоновая кислота
Mops	4-Морфолин-пропансульфоновая кислота
Pipes	1,4-Пиперазин-диэтансульфоновая кислота
Taps	3-[(2-Гидрокси-1,1-бис-(гидрокси-метил)-этил)амино]-1-пропансульфоновая кислота
Tes	2-[(2-Гидрокси-1,1-бис-(гидрокси-метил)-этил)амино]-1-этансульфоновая кислота
Tricine	N-[2-Гидрокси-1,1-бис-(гидрокси-метил)-этил]глицин
Tris	2-Амино-2-гидрокси-метилпропан-1,3-диол

Для инкубационных сред типа раствора Кребса—Рингера, среды Игла, среды Веймоуса следует дать ссылку на литературный источник либо указать их состав.

Спектры и данные спектроскопии. Полные спектры печатаются только в тех случаях, если они содержат новую или важную информацию. Спектры поглощения в УФ- и видимой областях, флуоресценции, кругового дихроизма и дисперсии оптического вращения должны иметь шкалу длин волн (в нм или мкм). По возможности при описании поглощения, оптического вращения или кругового дихроизма нужно пользоваться терминами молярности. Как указывалось выше, аббревиатуры методов ДОВ, КД, ЭПР, ЭСР, ЯМР являются общепринятыми и не требуют расшифровки.

Видимая и УФ-абсорбционная спектроскопия. Величина $\lg(I_0/I)$ характеризует оптическую плотность раствора; если рассеянием и отражением можно пренебречь, то эта величина практически характеризует поглощение. Если рассеяние учитывается, например, при количественной оценке клеточной плотности в культуре, следует употреблять более общий термин — пропускание (T). В других случаях используется термин «поглощение» (абсорбция, A), но не «экстинкция» или «оптическая плотность». Принятые символы: A — поглощение ($\lg(I/I_0)$), a — удельный коэффициент поглощения (л/г на 1 см), иногда используют $A_{\text{см}}^{1\%}$; ε — молярный коэффициент поглощения (численно равен поглощению 1 М раствора в кювете с длиной оптического пути 1 см), можно использовать единицы л/моль на 1 см или $\text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, но не $\text{см}^2 \cdot \text{моль}^{-1}$. Длины волн (нм), при которых проводилось измерение, приводят без указания единиц: A_{280} . Знак равенства не пишется между ε или A и численной величиной.

ИК-Спектры приводятся в процентах трансмиссии (T) как функция длины волны (в мкм) или частоты (в см^{-1}).

Оптическое вращение описывается величиной удельного вращения $[\alpha]_{\lambda}^t$, численно равной вращению (в градусах) в растворе с concentra-

цией 1 г/мл при длине оптического пути 1 дм (10 см), длине волны λ и температуре t . Необходимо указывать концентрацию раствора (г/100 мл) и растворитель, например, $[\alpha]_{420}^{27,5^\circ}$ (2 г на 100 мл метанола). Можно представлять данные в молярном выражении (молярное вращение): $[M] = [\alpha] \cdot M_r$ и $[m] = [\alpha] \cdot M_r/100$.

В случае биополимеров приводят дисперсию оптического вращения за счет усредненного остатка ($[m]_{m.l.w.}$); размерность $[m]$ — град \cdot см²/дмоль.

Дисперсия оптического вращения характеризуется как изменение $[\alpha]$ или $[m]$ в зависимости от длины волны или частоты.

Круговой дихроизм описывается величиной молярного адсорбционного коэффициента ($\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$, где ε_L и ε_R — коэффициенты поглощения света, поляризованного по кругу влево и вправо) или молярной эллиптичностью $[\theta]_M$. Для биополимеров часто используют молярные концентрации в расчете на усредненный остаток (M_r). Единицы молярного адсорбционного коэффициента — л/моль на 1 см или М⁻¹ · см⁻¹, единицы молярной эллиптичности те же, что для оптического вращения $[m]$ в расчете на усредненный остаток; соотношение между $\Delta\varepsilon$ и $[\theta]_M$ выражается уравнением $[\theta]_M = 3300 \cdot \Delta\varepsilon$.

Флуоресцентная спектроскопия. При описании спектров возбуждения и излучения флуоресценции (F) следует указывать, является ли спектр относительным, нормализованным или скорректированным (указать способ коррекции). Данные поляризации флуоресценции и спектры описываются величиной степени поляризации P или анизотропии A , обе величины безразмерные.

Статистическая обработка результатов. Данные значительного числа независимых экспериментов должны быть представлены так, чтобы можно было оценить их воспроизводимость и значимость. Если целью работы являлось определение количественных или статистических характеристик популяции, то существенная информация обычно выражается следующим образом: 1) число независимых экспериментов (повторные измерения на одном животном или результаты, полученные из целого ряда тканей, и т.д. дают только одну независимую оценку); 2) среднее значение; 3) стандартное отклонение; коэффициент вариации стандартной ошибки в оценке среднего значения. Следует ясно указать, использовались ли стандартное отклонение или стандартная ошибка. Удобной формой включения этих данных в таблицу является, например, такая: $263 \pm 2,5$ (10), где цифра в скобках указывает число значений, использовавшихся для подсчета среднего.

Если утверждается значимость результатов, то следует провести тест на определение значи-

мости и оценить вероятность. Если не указано другое, подразумевается, что используется статистика для нормального распределения.

Громоздкие данные, которые трудно или невозможно привести в печатном варианте журнала (такие как большие таблицы идентифицированных белков в протеомных исследованиях), рекомендуется давать в виде приложений, которые будут доступны читателю только на интернет-сайте журнала. Текст статьи должен содержать ссылки на такие приложения.

4. Порядок работы с рукописями (рецензирование, редакционная подготовка, корректура)

4.1. Поступившей в редакцию правильно оформленной рукописи присваивается регистрационный номер и фиксируется дата поступления, о чем редакция информирует авторов по электронной почте. **Рукописи, оформленные не по правилам, возвращаются авторам без рассмотрения.**

4.2. Рецензирование. При подаче рукописи авторы могут указать двух потенциальных рецензентов (ФИО, адрес электронной почты) из числа специалистов в данной области исследований, а также тех, чье участие в рецензировании нежелательно.

Все рукописи рассматривает Ответственный ученый секретарь (Executive Editor-in-Chief) и направляет Ответственному Редактору по соответствующей конкретной области исследований; он, в свою очередь, указывает двух-трех специалистов для рецензирования рукописи. Список Ответственных Редакторов и членов редколлегии размещен на сайте журнала, а также на сайтах Biochemistry (Moscow) на порталах Pleiades и Springer.

На основании экспертных заключений редколлегия определяет дальнейшую судьбу рукописи и в спорных случаях привлекает дополнительных рецензентов. По решению редколлегии рукопись может быть принята к публикации в представленном виде, отправлена авторам на доработку или отклонена. Основанием для отклонения рукописи являются недостаточно высокие оценки при рецензировании вследствие несоответствия профилю или уровню публикаций журнала.

Рукопись, получившая высшую оценку двух независимых рецензентов, печатается со специальной пометкой «Ускоренная публикация» (срок публикации — 3–4 месяца).

В случае необходимости рукопись направляется авторам на доработку по замечаниям ре-

цензентов и редакторов, после чего она повторно рецензируется, и редколлегия вновь решает вопрос о приемлемости рукописи для публикации. В начале публикуемой статьи приводятся даты первоначального поступления рукописи в редакцию, поступления после окончательной доработки и принятия к публикации.

Переработанная рукопись должна быть возвращена в редакцию в течение трех месяцев после получения авторами отзывов; в противном случае рукопись рассматривается как вновь поступившая — ей присваивается новый регистрационный номер и ставится новая дата поступления в редакцию.

В журнале принято «одностороннее слепое рецензирование» (single blind review), т.е. авторам недоступны имена рецензентов, и редакция строго соблюдает конфиденциальность рецензентов. Все редакционные письма авторам идут за подписью Ответственного ученого секретаря журнала.

4.3. С 2003 г. редакция приступила к практике предварительной публикации рукописей (*Papers in Press*) на сайте *Biochemistry (Moscow)* (<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>) до выхода в свет статьи. На сайте размещаются экспериментальные статьи на английском языке, получившие высшие оценки при рецензировании и принятые к публикации.

4.4. На всех стадиях работы с рукописями, а также для общения с авторами, редакторами и рецензентами редакция использует электронно-почтовую связь, поэтому авторы должны быть очень внимательны к указанному в рукописи

адресу электронной почты и должны своевременно сообщать о произошедших изменениях.

4.5. Через месяц после сдачи очередного выпуска журнала в печать редакция рассылает авторам по электронной почте корректуру статьи в виде PDF-файла и инструкцию по работе с ней.

На стадии корректуры не допускаются замены текста, рисунков или таблиц. Если все же это необходимо, то вопрос решается редколлегией; в крайнем случае, статья переносится в другой номер.

5. Англоязычный вариант журнала

5.1. Каждый выпуск журнала готовится одновременно на русском и английском языках.

Перевод статей осуществляет группа высококвалифицированных переводчиков-биохимиков. В ходе работы у переводчиков часто возникает необходимость связаться с авторами и устранить неточности в русском тексте статьи. Согласованные с авторами исправления вносятся и в русский, и в английский тексты на стадии корректуры.

Авторы, достаточно хорошо владеющие профессиональным английским языком, представляют в редакцию свой **аутентичный** перевод статьи.

5.2. Переводы редактируются английской редакцией журнала, и подготовленный текст направляется авторам для корректировки.

5.3. После выхода журнала в свет редакция рассылает авторам оттиски русского и английского вариантов статей в виде PDF-файлов.