

Том 89, Номер 2

ISSN 0320-9725

Февраль 2024



БИОХИМИЯ



СОДЕРЖАНИЕ

Том 89, № 2, 2024

Специальный выпуск, посвященный памяти академика В.П. Скулачёва

Приглашённый редактор Б.В. Черняк

От редакции. Проект Скулачёва

М.В. Скулачёв 213

Ретинопротекторный эффект SkQ1 – глазных капель Визомитин – связан с подавлением активности сигнальных путей p38MAPK и ERK1/2

Н.А. Муралёва, А.А. Жданкина, А.Ж. Фурсова, Н.Г. Колосова 217

Соотношение цитотоксического и антимикробного действия конъюгатов трифенилфосфония с различными производными хинона

П.А. Назаров, Л.А. Зиновкина, А.А. Брезгунова, К.Г. Лямзаев, А.В. Головин, М.В. Каракозова, Е.А. Котова, Е.Ю. Плотников, Р.А. Зиновкин, М.В. Скулачев, Ю.Н. Антоненко 228

Митоцентричность (обзор)

Д.Б. Зоров, П.А. Абрамичева, Н.В. Андрианова, В.А. Бабенко, Л.Д. Зорова, С.Д. Зоров, И.Б. Певзнер, В.А. Попков, Д.С. Семенович, Э.И. Якупова, Д.Н. Силачев, Е.Ю. Плотников, Г.Т. Сухих 241

Редокс-регулируемая гетеродимерная NADH:Циннамат редуктаза из *Vibrio ruber*

Ю.В. Берцова, М.В. Серебрякова, В.А. Анашкин, А.А. Байков, А.В. Богачев 261

Сафари с электронной пушкой: визуализация взаимодействий белков и мембран митохондрий в естественной среде

С.В. Нестеров, К.С. Плохих, Ю.М. Чесноков, Д.А. Мустафин, Т.Н. Голева, А.Г. Рогов, Р.Г. Васильев, Л.С. Ягужинский 279

Каркасные элементы или свободный гелеобразный межклеточный матрикс как обязательное условие для построения органных структур при регенерации (обзор)

В.Н. Манских 293

Возраст-зависимые изменения продукции митохондриальных активных форм кислорода в скелетной мышце человека

М.Ю. Высоких, М.А. Виговский, В.В. Филиппов, Я.Р. Бородай, М.В. Марей, О.А. Григорьева, Т.Ф. Вепхвадзе, Н.С. Курочкина, Л.А. Манухова, А.Ю. Ефименко, Д.В. Попов, В.П. Скулачёв 305

AgeMeta: количественная база данных изменений экспрессии генов в процессе старения млекопитающих

С.А. Тихонов, М.А. Батин, В.Н. Гладышев, С.Е. Дмитриев, А.Э. Тышковский 321

Причины долголетия Tetrapoda: защищенность важнее уровня метаболизма <i>Г.А. Шиловский, Т.С. Путькина, А.В. Марков</i>	331
Изучение смертности и старения человека с точки зрения теории надёжности (обзор) <i>Л.А. Гаврилов, Н.С. Гаврилова</i>	352
Два типа кривых дожития у различных линий прогерических мышей (мини-обзор) <i>С.С. Соколов, Ф.Ф. Северин</i>	369

ДИСКУССИЯ

Исчисление старения: анализ кривых выживания в норме и при патологии, колебание динамики смертности, характеристики распределения продолжительности жизни и показатели ее разброса <i>Г.А. Шиловский</i>	373
---	-----

CONTENTS

Vol. 89, Issue 2, 2024

In Memory of Vladimir P. Skulachev (Special Issue)

Guest Editor Boris V. Chernyak

- Preface to the Special Issue: The Skulachev Project
Maxim V. Skulachev 213
- Retinoprotective Effect SkQ1 – Visomitin Eye Drops – Is Associated with Suppression p38MAPK and ERK1/2 Signaling Pathways Activity
N. A. Muraleva, A. A. Zhdankina, A. Zh. Fursova, and N. G. Kolosova 217
- Relationship of Cytotoxic and Antimicrobial Effects of Triphenylphosphonium Conjugates with Various Quinone Derivatives
P. A. Nazarov, L. A. Zinovkina, A. A. Brezgunova, K. G. Lyamzaev, A. V. Golovin, M. V. Karakozova, E. A. Kotova, E. Yu. Plotnikov, R. A. Zinovkin, M. V. Skulachev, and Yu. N. Antonenko 228
- Mitocentricity (Review)
D. B. Zorov, P. A. Abramicheva, N. V. Andrianova, V. A. Babenko, L. D. Zorova, S. D. Zorov, I. B. Pevzner, V. A. Popkov, D. S. Semenovich, E. I. Yakupova, D. N. Silachev, E. Y. Plotnikov, and G. T. Sukhikh 241
- A Redox-Regulated, Heterodimeric NADH:Cinnamate Reductase in *Vibrio ruber*
Y. V. Bertsova, M. V. Serebryakova, V. A. Anashkin, A. A. Baykov, and A. V. Bogachev 261
- Safari with an Electron Gun: Visualization of Protein and Membrane Interactions in Mitochondria in the Natural Environment
S. V. Nesterov, K. S. Plokhikh, Yu. M. Chesnokov, D. A. Mustaphin, T. N. Goleva, A. G. Rogov, R. G. Vasilov, and L. S. Yaguzhinsky 279
- Framework Elements or Free Intercellular Gel-Like Matrix as a Necessary Condition for Building of Organ Structures during Regeneration (Review)
V. N. Manskikh 293
- Age-Dependent Changes in the Production of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Human Skeletal Muscle
M. Y. Vyssokikh, M. A. Vigovskiy, V. V. Philippov, Y. R. Boroday, M. V. Marey, O. A. Grigorieva, T. F. Vepkhvadze, N. S. Kurochkina, L. A. Manukhova, A. Yu. Efimenko, D. V. Popov, and V. P. Skulachev 305
- AgeMeta: Quantitative Gene Expression Database of Mammalian Aging
S. Tikhonov, M. Batin, V. N. Gladyshev, S. E. Dmitriev, and A. Tyshkovskiy 321

Evolution of Longevity in Tetrapoda: Safety Is More Important Than Metabolism Level <i>G. A. Shilovsky, T. S. Putyatina, and A. V. Markov</i>	331
Exploring Patterns of Human Mortality and Aging: a Reliability Theory Viewpoint (Review) <i>L. A. Gavrilov and N. S. Gavrilova</i>	352
Two Types of Survival Curves of Different Lines of Progeric Mice (Mini-Review) <i>S. S. Sokolov and F. F. Severin</i>	369

DISCUSSION

Calculation of Aging: Analysis of Survival Curves in Normal and in Pathology, Fluctuations in Mortality Dynamics, Characteristics of Life Span Distribution and Indicators of Its Variation <i>G. A. Shilovsky</i>	373
---	-----

ОТ РЕДАКЦИИ

Проект Скулачёва

DOI: 10.31857/S0320972524020015 EDN: XNGSGZ

«Самая большая опасность для большинства из нас заключается не в том, что мы ставим перед собой слишком высокую цель и не достигаем её, а в том, что мы ставим перед собой цель слишком низкую и достигаем её».

Микеланджело Буонарроти

Владимир Петрович Скулачёв. Я по-разному его называл, и дома, в семье, это, конечно, был папа. Даже ещё короче, потому что это, как правило, использовалось как обращение: «пап, есть новости по поводу SkQ, давай зайду – расскажу», «пап, мы с собакой идем гулять?», «пап, извини, сегодня никак не могу – совсем закрутился». С этим никаких проблем не было. А вот как надо было его называть за глаза, если речь идет не о чём-то личном, а о работе? Я всегда дергался, когда кто-то просил что-то передать «папе». Понтифику в Ватикан, что ли? Поэтому, как только мы начали работать вместе (что случилось далеко не сразу – только с 2005 года), довольно быстро выработалась формула упоминания академика: Владимир Петрович. Или, если коротко – ВП. Так вот, это будет текст о том, что было для ВП важнее всего в последние годы жизни – о Проекте.

В Проекте я был правой рукой ВП и, наверное, я один из немногих, кто видел и видит общую картину нашего предприятия. Это, повторюсь, был самый главный проект ВП, венец его карьеры учёного и организатора науки. Мы очень во многом не сходились с ним во мнениях, спорили насмерть по поводу того, как должен быть организован Проект и чем он должен заниматься. Будучи оба жуткими упрямыми, всегда пытались гнуть свою линию. Даже если мы договаривались до какого-то компромисса, потом все равно не оставляли попыток втихаря все-таки повернуть работу туда, куда каждый из нас считал правильным. Но я хочу официально заявить, что ВП всегда был главным, это был и остается его проект. ВП его придумал, он предложил организационную структуру и стратегию, он нашёл первые (и очень значительные) средства для финансирования работы, он вложил в проект все, что у него было: научное имя и репутацию, 100% своего времени и свою энергию, связи на всех уровнях, включая международную сеть своих учеников и всю свою семью: в проекте работали его жена, четверо сыновей и иногда подклю-

чалась дочь. Последние годы ВП уже поглядывал на подросших внуков и всё чаще заводил разговор о том, не ерундой ли они какой-то занимаются и не пора ли их подключить к семейному делу? Похоже, тут в нём просыпались гены его деда по отцовской линии, крестьянина и крепкого хозяина, у которого вся его тоже огромная семья наверняка всегда была при деле.

Для ВП всегда очень были важны люди. Он никогда не рассматривал своих сотрудников, подчиненных, партнеров как «функции». Есть такое модное направление в проектном менеджменте и вообще управлении, которое рассматривает человека просто как набор функций, важных для бизнеса. Считается, что в рутинных бизнесах люди легко заменимы: если кто-то ушёл, мы просто ищем на рынке соответствующий функционал, а сами его носители не столь важны. Такой подход был категорически неприемлем для ВП. Слыша что-то подобное, он взрывался и практически кричал, что вот когда мы будем «делать табуретки», тогда можно говорить в таких терминах, но пока что мы занимаемся наукой, и тут, извините, «кадры решают всё». Кстати, уверен, что если бы действительно выпускали табуретки, то и тут люди были бы для него важнее любых показателей.

ВП любил говорить, что нельзя работать больше чем с 12 сотрудниками (иногда он хитро посматривал на тебя и добавлял, что пару тысяч лет назад один выдающийся ребе взял себе 13-го ученика и с ним в итоге получилось как-то не очень...) При этом, конечно, Институт им. Белозерского гораздо больше, это сотни человек. Но мы же знаем, как ВП им управлял все эти годы? У него всегда были 1–2 любимые лаборатории, которые под его руководством занимались чем-то страшно ему интересным. Все остальные работали по своим грантам и проектам и функционировали по принципу «живи и давай жить другим», директор никогда не вмешивался в то, какую научную работу ведут другие отделы и научные группы. Конечно, обязанность

директора – обеспечить общее функционирование института, делать так, чтобы работали общие сервисы, защищать и продвигать институт во внешней среде. Решать всевозможные внутренние конфликты. Всё это ВП делал и очень успешно. Но в том, что касается самого главного – научной работы – все группы были вольны делать то, что считают нужным.

Я не знаю, как это было устроено в былинные советские времена, но с начала 90-х гг., когда я начал работать в Институте, у НИИ им. Белозерского никогда не было денег, бюджета на исследования. То есть нельзя было прийти на НТС, к руководству или в какой-то специальный орган и сказать: «Вот, смотрите, у меня классная идея, скажем, по механизму контроля качества мРНК в растениях, выделите-ка мне бюджет на аспиранта, технического сотрудника и на расходники для RNAseq, проект буду делать!» Меня страшно возмущала эта ситуация, я часто «предъявлял» ВП, что так быть не должно, в конце концов: мы самый мощный (в пересчёте на научного сотрудника) биологический институт в стране или нет? ВП смотрел на меня снисходительно, говорил, что полностью разделяет моё возмущение несправедливостью устройства этого мира вообще и финансирования науки в частности, а потом всегда замечал, что в Институте всё-таки пока не берут деньги с научных сотрудников за вход в лаборатории. Хотя в некоторых научных учреждениях такое бывало, когда не хватало денег на оплату коммунальных услуг. Я по-прежнему возмущён ситуацией, но может быть в ней есть и некоторое благословение, когда директор института не занимается распределением денег и управлением коллективом из сотен людей, а просто делает так, чтобы институт работал в целом. Тогда у него вполне может оставаться время на собственную науку, а она вполне может делаться командой из не более чем 12 человек. У ВП это отлично получалось.

Но дальше ВП придумал Проект. На пике исследований «широким фронтом» в 2006–2008 годах в Проекте одновременно участвовало больше 300 человек, и поэтому Проект с самого начала оказался очень серьёзным вызовом и с организационной точки зрения. В 2006 году, когда мы только начинали, мы обратились за консультациями к одному очень уважаемому и опытному специалисту, вице-президенту многомиллиардной американской биотехкорпорации. Ему страшно понравилась идея SkQ и наши первые результаты, но узнав о том, как у нас устроена работа и сколько человек в ней принимает участие, он сразу сказал: у вас ничего не получится. Я был очень удивлён:

«Как же? Смотрите, какая у нас изящная технология, вот первые результаты экспериментов очень неплохие, что может быть не так?» Он ответил: «Это всё отлично, но вы не сможете этим управлять».

Конечно, мы с самого начала уделяли специальное внимание проблемам управления, нам очень помогает специальная информационная система, придуманная и созданная моим братом Константином Скулачёвым. Но и я, и ВП уверены, что очень важная часть успеха нашего предприятия заключается в том, что мы работали с хорошими и умными людьми. И это всё упрощало. И даже когда что-то не получалось, ВП любил говорить: «Лучше с умным потерять, чем с дураком – найти».

Я думаю, что ВП очень хотел бы сказать спасибо тем людям, которые сделали вместе с ним наш Проект. Я уверен, что этот выпуск «Биохимии» прочтает большинство нынешних участников проекта, и тех, кто внёс в него вклад в предыдущие годы. Если в вашей лаборатории когда-то работали или работают сейчас с SkQ – спасибо вам огромное!

Почему Проект был так важен для ВП и для всех нас? На поверхности лежит, что в этом предприятии реализовалась мечта, наверное, большинства учёных: совместить свою родную фундаментальную науку с её реализацией на практике. Согласитесь, «товарищи учёные», что какие бы страшно интересные перипетии биологических механизмов мы ни изучали, какую бы новую функцию (да что там функцию, «бери выше», целый сигнальный каскад!) мы ни открыли у исследуемого нами белка, всё равно где-то глубоко внутри нас точит предательский вопрос: а оно кому-то будет хоть когда-то нужно? Даже если твоё открытие впишут в учебники, кроме ещё одного вопроса на экзамене на кандидатский минимум, оно ещё как-то будет использовано? Ох, не факт... И вот ВП увидел перед собой возможность использовать своё* открытие, «митохондриальное электричество», наверное, самое большое достижение его карьеры, для создания лекарства. Причём лекарство будет на основе «ионов Скулачёва» – липофильных проникающих катионов, с помощью которых открытие и было сделано. Да и что за лекарство! Не от каких-то там «заусенец» (хотя заусенцы, кстати, всех бы вполне устроили), а может быть и вообще от старости! Ему хватило мудрости увидеть эту возможность и смелости (ох, вот уж чего у него было в достатке) броситься вперёд и попытаться её ухватить. Но это ещё не всё. Оглядываясь назад, я думаю, что за всем этим стояла ещё одна глубокая мысль ВП, а когда у ВП есть глубокая мысль, к ней как минимум стоит прислушаться.

* ВП никогда не приписывал это открытие лично себе, он всегда признавал, что был членом команды с Ефимом Либерманом и всеми соавторами эпической статьи в *Nature* в 1969 году.

В разговорах с ВП я часто жалел, что сейчас наука устроена не так, как в 70-е годы. Количество денег (в процентном отношении от ВВП) уменьшилось, у учёных уже нет возможности просто ходить на работу и вариться внутри своего института, беря средства на исследования «из тумбочки» – из бюджета этого института. Деньги надо искать, бороться за гранты или заказы от кого-то, кому твои исследования почему-то интересны, и он готов за них заплатить. Вот у вас в 70-е была жизнь! И дальше я рисовал себе и ему картину НИИЧАВО из «Понедельник начинается в субботу», вопрошая в конце: когда, скажи мне, о многомудрый академик, у нас опять вот так всё будет устроено? На это он отвечал, что, скорее всего, никогда. По его мнению, увлечение наукой – это был такой странный «взбрык» человечества, которое вдруг решило выделить практически бесконтрольные деньги учёным. «Все настолько обалдели от мощи науки после того, как физики сделали Бомбу» (точная цитата ВП), что некоторое время решили насыпать учёным в кормушку столько денег, сколько те просят. Может, они еще чего изобретут, похлеще? По тем или иным причинам «лафа**» кончилась ближе к концу XX века. А у нас в стране – и того раньше, когда обанкротился СССР.

А как наука и разработки (R&D) должны финансироваться в веке XXI? Грантовая система – замечательная штука, но её недостатки всем известны, за что ВП очень её не любил, считая скорее способом выживания учёных, а не чем-то, что может двигать прогресс вперёд. Нужно что-то новое. Мне кажется, что в Проекте ВП увидел модель работы науки будущего и решил поставить очередной смелый эксперимент. Он ведь часто так делал: весенние выездные школы по биоэнергетике, Институт им. А.Н. Белозерского, биологический «колледж» для студентов небиологических факультетов, попытка возрождения гельфандовского семинара, тандем институт–факультет, первый частный биологический исследовательский институт, интегрированный в структуру МГУ. Это всё его эксперименты, но не биологические, а организационные. Какие-то оказались сверхудачными, какие-то – нет. Но все они были крайне полезны. Оглядываясь на то, как и почему был сделан Проект, теперь я вижу, что это был ещё один «острый опыт», придуманный и реализованный академиком.

Проект нельзя назвать чисто бизнес-предприятием. Денег мы особо никому не заработали, хотя нам удается уверенно стоять на ногах после окончания инвестиционного периода, вот уже 8 лет мы зарабатываем столько же, сколько мы тратим и при этом можем вести новые исследования.

С другой стороны, с самого начала Проект был сформирован именно как бизнес: компания, инвестиции, рынок.

Почему в последние десятилетия снизилось финансирование и науке категорически не хватает денег (если сравнивать с благословенными 70-ми)? В конце концов, потому что у общества снизился интерес к науке, говоря рыночным языком, привлекательность ее акций упала. Аналогия довольно грубая, но в ней есть существенная доля правды. Это в командно-административной системе ресурсы распределяются в зависимости от желаний «начальства». Хорошо это или плохо, но в современном мире такое распределение делается при помощи рынка, и, мне кажется, ВП прекрасно это осознал с началом нового века. Если тебе нужны ресурсы – иди за ними на рынок. У этого есть и минусы (ты всё делаешь на свой страх и риск), и плюсы (свобода + объем ресурсов, на самом деле, не ограничен). Но рынку надо что-то предложить. Это может быть какой-то продукт, точный аналог которого есть на рынке, это может быть улучшенный продукт и, наконец, это что-то совсем новое, которого вообще ещё нет – прорывной продукт. Излюбленная аналогия ВП – проект Христофора Колумба по открытию Америки. Это типичный инвестиционный проект (инвесторы – генуэзские купцы и испанский королевский двор) по открытию того, чего ещё нет – короткого пути в Индию. Путь, кстати, так и не нашли, но получилось еще лучше!

Проект с самого начала был направлен на создание того, чего нет – нового лекарства. А поскольку речь идёт о лекарстве от старения, то это создание того, чего нет в принципе. То есть о прорывной разработке, технологии, способной «перевернуть мир». Согласитесь, что было бы странно, если ВП замахнулся на что-то меньшее (см. его любимую цитату Микеланджело, вынесенную в эпиграф этой статьи)? Если вы поставили себе такую цель, то на пути к ней вам необходимо получить новые знания, открыть что-то, что ещё неизвестно человеку, а это и есть работа науки, а значит – учёных. Но в отличие от традиционной фундаментальной науки, это новое знание не является самоцелью. Цель – создание технологии, а генерация знаний на пути к этой цели – это всего лишь необходимый этап. Кажется, мысль несложная, но она, как это страшно любил ВП, ставит «с ног на голову» всю область высоких технологий. Какова традиционная картина Hi Tech'a, которую вам нарисуют в любой бизнес-школе? Где-то по своим университетам сидят яйцеголовые учёные, играют в науку и «генерят» новые знания, которые теоретически могут быть полезны.

** От арабского «алафа» – счастье, удача, неожиданная прибыль.

Иногда появляются редкие «звери», которые называются технологические предприниматели и которые немного в этих знаниях разбираются, внимательно «водят клювом» в этой копилке и – «бац», вдруг видят возможность практического применения какого-то внезапно обнаруженного знания в народном хозяйстве (есть у них такая специальная «чуйка», предпринимательская жилка). Дальше знание хватает предпринимателем, «допиливается» стандартными индустриальными методами и превращается в новую технологию. Все счастливы. Вот только работает это всё хуже и хуже и понятно почему. Получение нового знания всё усложняется, каждый следующий шаг стоит всё дороже и дороже, и если знания генерить вот таким, давайте это признаем, стохастическим способом, то наши шансы найти в «копилке» что-то, из чего можно слепить технологию, стремительно падают.

Другое дело, если знания производятся направленно, с прицелом на создание технологии. Причем я говорю не о прикладных исследованиях, а о фундаментальных разработках. Но от привычных нам работ по грантам их отличает цель: не просто открыть что-то новое (для хорошей статьи и отчета по гранту этого более чем достаточно), а заполнить недостающий пробел в формировании технологического решения, необходимого для создания будущего продукта. Того самого, которого ещё нет и на который нацелен твой проект.

Тут есть сложность, заключающаяся в том, что для действительно прорывного продукта, особенно в начале проекта, тяжело чётко обозначить, какие именно пробелы нам надо заполнить. Какой бы план вы ни нарисовали, любому здравомыслящему человеку понятно, что он не может быть исчерпывающим и будет постоянно меняться. Кстати, именно поэтому настоящие прорывные проекты практически невозможны в командно-административной системе. Ресурсы-то выделяются под чёткий план. А если он поменялся, то надо пересогласовывать всё на самом веру с самого начала. Главная же особенность рыночного финансирования – это полная свобода при заключении контракта. И дальше вы ограничены лишь тем, что написано в этом контракте. Если вы объяснили своему инвестору, что представленный план – это всего лишь наше видение на данный момент, и мы будем вынуждены его уточнять по ходу работы, и инвестор согласился с этим условием, и вы ударили по рукам – нет проблем, это ваше с ним дело. Но в каждой отдельной временной точке проекта

план есть, и у него есть шансы на успех – то есть на то, что инвестор заработает. Иначе это уже не проект, а чистая благотворительность.

Вот по этому принципу ВП предложил построить наш проект. С самого начала у меня были очень большие сомнения в том, что мы сможем кого-то убедить нам поверить. Всё-таки эта логика построения бизнеса довольно сложна. Как её объяснить инвестору? ВП был непреклонен: «Умный человек поймёт, что мы имеем в виду. А дураков нам не нужно!» И вообще, он считал, что это задача моей команды придумать, как реализовать эту стратегию привлечения финансирования. Оказалось, что всё возможно, и мы справились, инвесторы, которые согласились на эти условия, были найдены и не раз.

Правда, мы ещё придумали, как можно сделать проект немного более привлекательным: через создание и вывод на рынок «промежуточных продуктов». Стремясь перевернуть мир, победить старение и другие вредные программы в организме человека, мы неизбежно открываем «по дороге» что-то новое и вполне можем часть ресурсов направить на коммерциализацию этих знаний. Так появились наши капли «Визомитин», и, надеюсь, через несколько лет будет одобрен столь перспективный «Пластомитин» – форма SkQ1 системного действия, но не «лекарство от старости», а препарат от вполне конкретных аутоиммунных и/или метаболических заболеваний. Но для того, чтобы не потерять главную суть проекта, нам важно «не заиграться» в эти очень классные, но всё-таки промежуточные продукты, и двигаться к цели, поставленной перед нами Владимиром Петровичем. Достичь её будет трудно, и вообще далеко не факт, что получится, но все равно мы не должны разменивать эту цель на простые и понятные минутные задачи.

Так получилось, что Проект Скулачёва оказался масштабным экспериментом, который придумал ВП и который поручил всем нам, его команде, провести. Эксперимент очень сложный и долгий, но когда подобные мелочи останавливали великого академика? И если задача поставлена, то уход её постановщика вовсе не отменяет необходимости решить эту задачу. И мы будем пытаться её решить, потому что такова была воля ВП, а ещё потому, что бросить интересный опыт на полдороге – это непростительная глупость, как сказал бы Владимир Петрович Скулачёв.

М.В. Скулачёв

РЕТИНОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ SkQ1 – ГЛАЗНЫХ КАПЕЛЬ ВИЗОМИТИН – СВЯЗАН С ПОДАВЛЕНИЕМ АКТИВНОСТИ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ p38МАПК И ERK1/2

© 2024 Н.А. Муралёва^{1*}, А.А. Жданкина², А.Ж. Фурсова^{1,3,4}, Н.Г. Колосова¹

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН,
630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: Myraleva@bionet.nsc.ru

² Сибирский государственный медицинский университет, 634050 Томск, Россия

³ Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России,
630091 Новосибирск, Россия

⁴ Государственная новосибирская областная клиническая больница, 630087 Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 18.09.2023

После доработки 20.11.2023

Принята к публикации 22.11.2023

Глазные капли Визомитин – первый и пока единственный лекарственный препарат на основе SkQ1 – митохондриального антиоксиданта 10-(6'-пластохинонил) децилтрифенилфосфония, синтезированного в лабораториях МГУ под руководством академика В.П. Скулачёва. SkQ1 рассматривается как потенциальный инструмент борьбы с программой старения. Ранее мы показали, что он способен предупреждать и/или подавлять развитие всех проявлений преждевременного старения у крыс OXYS, в том числе – ретинопатии, аналогичной возрастной макулярной дегенерации (ВМД). В настоящей работе мы оценили эффект инстилляций Визомитина (с возраста 9 до 12 мес.) на прогрессию признаков ВМД и активность p38МАПК и ERK1/2 в сетчатке крыс OXYS. Контролем служили крысы Wistar и OXYS, получавшие плацебо (с идентичным Визомитину составом, за исключением SkQ1). Офтальмологический осмотр показал, что у крыс OXYS, получавших плацебо, ретинопатия прогрессировала, и по выраженности клинических проявлений они не отличались от интактных животных. Визомитин подавил прогрессию признаков ВМД у крыс OXYS и существенно улучшил структурно-функциональные параметры клеток ретинального пигментного эпителия и состояние микроциркуляции в хориоиде, что, можно полагать, способствовало сохранности фоторецепторов, ассоциативных и ганглионарных нейронов. Установлено, что активность p38МАПК и ERK1/2 в сетчатке 12-месячных крыс OXYS выше, чем у одновозрастных крыс Wistar, на что указывает повышенное содержание фосфорилированных форм p38МАПК и ERK1/2 и их белка-мишени tau (в положении T181 и S396). Визомитин снизил уровень фосфорилирования p38МАПК, ERK1/2 и tau, что свидетельствует о подавлении активности сигнальных каскадов МАПК. Таким образом, глазные капли Визомитин способны подавлять прогрессию ретинопатии у крыс OXYS, и их эффект связан со снижением активности сигнальных каскадов МАПК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: возрастная макулярная дегенерация, митохондриальный антиоксидант SkQ1, Визомитин, p38МАПК, ERK1/2, фосфорилирование, крысы OXYS.

DOI: 10.31857/S0320972524020024 EDN: XNFJGE

ВВЕДЕНИЕ

Глазные капли Визомитин – первый и пока единственный лекарственный препарат на

основе SkQ1 – митохондриального антиоксиданта 10-(6'-пластохинонил) децилтрифенилфосфония, синтезированного в лабораториях МГУ под руководством академика В.П. Скулачёва [1].

Принятые сокращения: ВМД – возрастная макулярная дегенерация; МАПК – митоген-активируемые протеинкиназы; РПЭ – ретинальный пигментный эпителий; Аβ – амилоид бета; ERK1/2 – внеклеточные сигнал-регулируемые протеинкиназы 1 и 2; mTOR – мишень рапамицина млекопитающих; PEDF – фактор пигментного эпителия; SkQ1 – 10-(6'-пластохинонил) децилтрифенилфосфоний; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов.

* Адресат для корреспонденции.

Его создание стало возможным благодаря исследованиям, которые были выполнены в самом начале работы над проектом «Ионы Скулачёва» на крысах OXYS – созданной в ИЦиГ СО РАН модели преждевременного старения. Преждевременное старение крыс OXYS проявляется ранним развитием комплекса гериатрических заболеваний, в том числе катаракты и ретинопатии, по клиническим, морфологическим и молекулярным признакам аналогичной возрастной макулярной дегенерации (ВМД) у людей [2, 3]. Несколько месяцев исследования оказалось достаточно, чтобы показать – приём SkQ1 с кормом способен подавлять развитие всего комплекса фенотипических проявлений преждевременного старения крыс OXYS, что в дальнейшем было подтверждено многочисленными исследованиями. При первом обсуждении результатов наших пилотных исследований на семинаре у В.П. Скулачёва самым впечатляющим эффектом SkQ1 была признана его способность подавлять развитие катаракты и ретинопатии. В ходе обсуждения А.М. Оловников высказал идею о перспективности создания глазных капель на основе этого митохондриального антиоксиданта. Уже в 2005 г. мы приступили к исследованиям способности SkQ1 влиять на развитие у крыс OXYS катаракты и признаков ВМД при его приёме не только с кормом, но и в форме глазных капель, результаты которых были опубликованы в 2008 г. [4]. Параллельно в рамках проекта «Ионы Скулачёва» началась работа по созданию лекарственной формы, её клиническим испытаниям, в результате чего в 2012 г. Минздравом РФ был зарегистрирован препарат Визомитин – кератопротектор для профилактики синдрома сухого глаза. В дальнейшем показания к его применению были дополнены профилактикой ранней катаракты [5]. Исследования, выполненные на крысах OXYS, позволяют надеяться, что в дальнейшем одним из показаний к применению Визомитина может стать ВМД – многофакторное нейродегенеративное заболевание сетчатки, которое становится основной причиной потери и снижения качества зрения у людей старше 60 лет в развитых странах [6]. Как показали наши исследования, развивающаяся у крыс OXYS ретинопатия аналогична сухой, или атрофической, форме ВМД у людей [3, 7]. Клинические проявления ретинопатии развиваются у крыс OXYS (100%) к возрасту ~3–4 мес. на фоне структурно-функциональных изменений клеток ретинального пигментного эпителия (РПЭ) и нарушения хориоидальной микроциркуляции, которые прогрессируют с возрастом и приводят к снижению толщины слоя фоторецепторов и наружного ядерного слоя – событиям, лежащим в основе потери зрения при ВМД [8, 9].

Рассматривая митохондриальный антиоксидант SkQ1 как инструмент борьбы с программой старения, В.П. Скулачёв связывал его эффекты, прежде всего, с антирадикальной активностью, способностью подавлять генерацию активных форм кислорода непосредственно в митохондриях [10]. Наши исследования показали, что преждевременное старение крыс OXYS связано с дисфункцией митохондрий, но при этом прямых ассоциаций с окислительным стрессом выявить не удалось. Тем не менее SkQ1 способен предупреждать и/или подавлять развитие всех проявлений преждевременного старения у крыс OXYS, в том числе – признаков ВМД [11]. Так, было показано, что его приём с кормом, начатый в возрасте 1,5 мес., предотвращает развитие клинических проявления ретинопатии у крыс OXYS вплоть до двухлетнего возраста и способен существенно подавлять их прогрессию у животных с уже выраженными признаками заболевания [4, 10]. Его ретинопротекторные эффекты связаны с нормализацией микроциркуляции в сосудах хориоидеи, ультраструктуры клеток РПЭ и фоторецепторов [12, 13], влиянием на экспрессию генов-регуляторов ангиогенеза – фактора роста пигментного эпителия (VEGF) и его антагониста – фактора пигментного эпителия (PEDF) [8], а также нормализацией в сетчатке крыс OXYS процессов аутофагии [14]. Проявлением характерного для ВМД нарушения протеостаза в сетчатке крыс OXYS становится накопление токсического амилоида бета (A β), которое существенно подавлялось на фоне приёма SkQ1 [15]. Закономерно, что в случае приёма с кормом SkQ1 действовал системно. Его эффекты были тесно связаны с предупреждением нарушений структурно-функциональных параметров митохондрий и/или их восстановлением [16, 17]. Примечательно, что длительный приём SkQ1 подавлял сигнальный путь mTOR (мишень рапамицина млекопитающих) [15], активация которого рассматривается как один из основных механизмов старения и развития, связанных с ним нейродегенеративных заболеваний [18].

Ранее мы показали, что манифестация и прогрессия признаков ВМД и болезни Альцгеймера у крыс OXYS происходят на фоне активации в сетчатке и мозге сигнальных путей митоген-активируемых протеинкиназ (МАПК) [19–23], а способность SkQ1 подавлять их развитие и прогрессию, в том числе накопление токсических агрегатов A β и гиперфосфорилированного тау-белка в мозге крыс OXYS, оказалась связанной со снижением активности сигнальных путей p38МАПК и ERK1/2 (внеклеточных сигнал-регулируемых протеинкиназ 1 и 2) [20, 21]. Изменениям активности МАПК в последние годы отводят важную роль в патогенезе нейродегенеративных заболеваний и рассматривают их как потенциальную мишень

для терапевтических воздействий [24]. В настоящем исследовании мы оценили связь способности SkQ1 – капель Визомитин – подавлять прогрессию признаков ВМД у крыс OXYS с его влиянием на активность p38МАРК и ERK1/2 в сетчатке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Работа выполнена на самцах крыс Wistar и OXYS, которых содержали в стандартных лабораторных условиях (22 ± 2 °C и 12-часовой цикл свет/темнота) в клетках ($57 \times 36 \times 20$ см) по пять животных с доступом к стандартному корму для грызунов (ПК-120-1; «Лабораторснаб», Россия) и воде *ad libitum*.

Воздействие. Крысы OXYS опытной группы ($n = 15$) с возраста 9 мес., в период активной прогрессии клинических проявлений ретинопатии, получали ежедневно инстилляцию по одной капле SkQ1 – глазных капель Визомитин («НИИ Митотехнологии МГУ», Россия). Контрольные крысы OXYS ($n = 15$) и крысы Wistar ($n = 15$) получали плацебо – препарат, идентичный по составу Визомитину, за исключением SkQ1.

Офтальмологические осмотры. В возрасте 9 и 12 мес. (до и после воздействия) состояние глазного дна животных исследовали с помощью прямого офтальмоскопа Beta («HEINE», Германия) на фоне расширения зрачков 1%-ным тропикамидом. Выраженность патологических изменений сетчатки оценивали, согласно общепринятой в клинической практике классификации, в соответствии с протоколом Age-Related Eye Disease Study (AREDS) (<http://eyephoto.opth.wisc.edu>): 0 баллов – изменения отсутствуют; 1 балл – 1-я неэкссудативная стадия заболевания, при которой появляются точечные кровоизлияния, отеки, друзы в заднем полюсе глаза, дефекты в РПЭ, перераспределение пигмента, атрофия хориокапиллярного слоя и РПЭ; 2 балла – 2-я экссудативная стадия – экссудативной отслойкой РПЭ, нейроэпителлия; 3 балла – 3-я стадия – экссудативно-геморрагическая отслойка пигментного и/или нейроэпителлия сетчатки, неоваскуляризация, рубцевание.

Гистологическое исследование. Заднюю стенку глаз фиксировали в растворе 12%-ного нейтрального формалина в течение 1 суток, как проводили ранее [2]. Далее два часа отмывали проточной водой, обезжировали, уплотняли и заливали в парафин по стандартной методике. Срезы задней стенки глаз толщиной 4–5 мкм готовили с помощью ротационного микротомы, окрашивали гематоксилином и эозином. Анализ проводили на микроскопе Carl Zeiss AxioStar plus («Carl Zeiss», Германия) с помощью программы Carl Zeiss AxioVision 8.0 при увеличении 10×100 . Подсчёт

удельной площади сосудов хориоидеи (открытых, со стазом, сладжем форменных элементов или тромбозом), удельной площади РПЭ, слоя фоторецепторов и наружного ядерного слоя, открытых интратретинальных сосудов в срезе сетчатки, а также средней площади цитоплазмы и ядра клеток РПЭ проводили на клетках каждой сетчатки (по 50 штук соответственно). Количество слоёв сетчатки и плотность клеток в наружном ядерном слое определяли при помощи окулярной сетки Автандилова в рамке на площади 900 мкм^2 . Анализ включал по 5 срезов каждой сетчатки при увеличении 10×100 . Подсчёт фоторецепторов с пикнозом ядра проводили на 1000 фоторецепторов, пикноморфных радиальных глиоцитов, нейронов внутреннего ядерного и ганглионарного слоёв – (по 200 клеток каждой сетчатки соответственно).

Анализ Вестерн-блот. Сетчатку крыс Wistar и OXYS, получавших инстилляцию плацебо, и получавших инстилляцию Визомитина крыс OXYS ($n = 5$) гомогенизировали с помощью лизирующего буфера RIPA с добавлением ингибиторов протеаз и фосфатаз («Sigma-Aldrich», США), как описано ранее [22, 23]. Концентрацию общего белка определяли с помощью бицинхониновой кислоты (BCA) («Thermo Fisher Scientific», США). Белки разделяли электрофорезом в 12%-ном полиакриламидном геле, переносили на нитроцеллюлозную мембрану («Bio-Rad», США) и блокировали 5%-ным бычьим сывороточным альбумином в фосфатно-солевом буфере (10 мМ; pH 7,4) в течение 1 ч. Далее мембрану инкубировали в течение ночи при 4 °C с первичными антителами к p38МАРК, phospho-p38МАРК (Thr180, Tyr182), ERK1/ERK2, phospho-ERK1/ERK2 (Thr202, Tyr204) (# 33-1300, # 36-8500, # 36-8800, # 13-6200 соответственно; разведение 1 : 1000; «Invitrogen», США), Tau, phospho-Tau (S396), phospho-Tau (T181) или GAPDH (ab80579, ab75679, ab109390, ab8245 соответственно; разведение 1 : 1000; «Abcam», США) и в течение 1 ч со вторичными анти-кроличьими и анти-мышинными антителами (ab6721, ab6808, «Abcam»; разведение 1 : 5000). Интенсивность свечения обнаруживали с помощью системы визуализации ChemiDoc MP («Bio-Rad») и оценивали с помощью программного обеспечения ImageJ (NIH, США).

Статистический анализ. Статистический анализ производили с помощью программного пакета Statistica 10.0 («Statsoft», США). Использовали факторный дисперсионный анализ (ANOVA) с *post hoc* сравнением групповых средних (Newman-Keul test). Данные представлены в виде медианы (q1–q3). Для оценки достоверности различий при сравнении средних величин использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Визомитин замедлил прогрессию клинических признаков ретинопатии. При предварительном офтальмологическом осмотре в возрасте 9 мес. опытная и контрольная группы крыс OXYS не различались по выраженности патологических изменений сетчатки ($p = 0,74$), которые были представлены первой стадией ретинопатии. В возрасте 9–12 мес. у крыс OXYS, получавших плацебо, патологические изменения активно прогрессировали и в 87% глаз они соответствовали второй, а в 13% – третьей, наиболее тяжёлой стадии ВМД. На фоне инстилляций Визомитина выраженность патологических изменений сетчатки была существенно ниже: в 90% глаз патологические изменения соответствовали первой и только в 10% – второй стадии ВМД. Средние значения выраженности патологических изменений составили $2,14 \pm 0,07$ и $1,33 \pm 0,09$ соответственно и были достоверными (согласно однофакторному анализу ANOVA, $F_{1,59} = 53,8$, $p < 0,0000$ и критерию Манна–Уитни – $p = 0,000003$). У крыс Wistar патологические изменения не были выявлены ни при первом, ни при повторном осмотре – инстилляцией плацебо не повлияли на состояние сетчатки.

Визомитин подавил патологические изменения в сетчатке крыс OXYS. При гистологическом исследовании во всех слоях сетчатки 12-месячных крыс OXYS, получавших плацебо, в отличие от крыс Wistar, были выявлены изменения, характерные для ВМД (рис. 1, таблица). Удельная площадь открытых сосудов хориоидеи у крыс OXYS была вдвое меньше ($p < 0,01$), а доля сосудов с признаками окклюзии (со стазом, сладжем или тромбозом) – вдвое больше ($p < 0,01$), чем у крыс Wistar (таблица). Со стороны интратретинальных сосудов сетчатки у OXYS также отмечались микроциркуляторные изменения в виде появления расширенных полнокровных сосудов со стазом и сладжем

форменных элементов, однако количественно достоверных изменений не выявлено. Средняя площадь клеток РПЭ в срезе сетчатки крыс OXYS была в 2 раза меньше, чем у крыс Wistar ($p < 0,01$), главным образом за счёт уплощения ядер и снижения объёма цитоплазмы, при этом выявлялись ядра с признаками пикноза (рис. 1, таблица).

Часть фоторецепторов в сетчатке крыс OXYS также подвергалась деструкции: процент пикнотично изменённых ядер был в 2 раза выше, чем у крыс Wistar ($p < 0,01$). Гибель клеток закономерно сопровождалась снижением в 1,7 раза количества рядов фоторецепторов ($p < 0,01$). Во внутреннем ядерном слое сетчатки крыс OXYS была повышена, по сравнению с крысами Wistar, доля ассоциативных нейронов с отёком цитоплазмы и сморщиванием ядра, а также пикноморфных гиперхромных радиальных глиоцитов (в 1,4 и в 1,84 раза соответственно, $p < 0,05$; рис. 2, а и б; таблица). В ганглионарном слое у крыс OXYS был повышен процент нейронов с очаговым, тотальным хроматолизом и нейронов с признаками пикноза в 1,4 ($p < 0,05$), 6,4 и 11,2 раза соответственно ($p < 0,01$; таблица).

Ежедневные инстилляций Визомитина в возрасте 9–12 мес. замедлили прогрессирование ретинопатии у крыс OXYS. На фоне его приёма существенно улучшалось состояние микроциркуляции в сосудах хориоидеи: удельная площадь сосудов с признаками окклюзии снизилась у крыс OXYS вдвое ($p < 0,01$), а площадь открытых сосудов возросла в 1,6 раза ($p < 0,05$) по сравнению с животными, получавшими плацебо. Анализ состояния РПЭ выявил активацию компенсаторно-приспособительных процессов, которая проявлялась у крыс OXYS увеличением средней площади ядер клеток РПЭ на 7,5% ($p < 0,01$), в результате чего отличия от крыс Wistar по этому параметру нивелировались (таблица).

Визомитин проявил выраженный нейропротекторный и глиопротекторный эффекты –

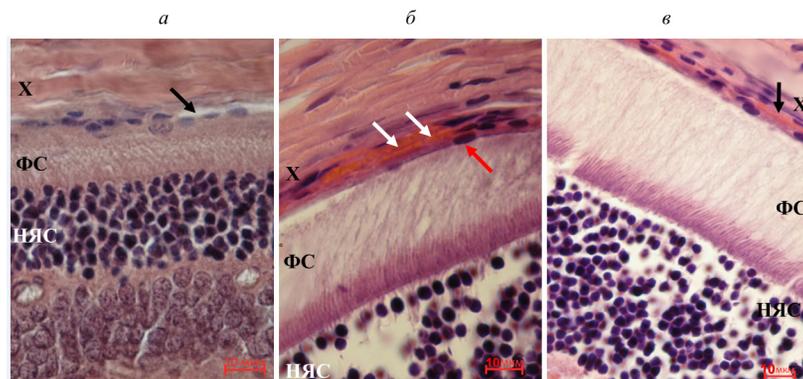


Рис. 1. Хориоретинальный комплекс крыс Wistar (а) и OXYS (б), получавших плацебо, и крысы OXYS, получавшей Визомитин (в) в возрасте 9–12 мес. X – хориоидея; FC – фоторецепторный слой; NYC – наружный ядерный слой. Чёрные стрелки – хориокапилляры с открытым просветом; белые стрелки – тромбированные хориокапилляры; красная стрелка – пикноз ядра РПЭ

Влияние Визомитина на морфометрические параметры сетчатки крыс OXYS

Параметры	Wistar	OXYS	OXYS + Визомитин
Удельная площадь открытых сосудов, %	19,50 ± 1,93	9,67 ± 1,06* <i>p</i> < 0,01	15,04 ± 1,43# <i>p</i> < 0,05
Удельная площадь сосудов со стазом или тромбозом, %	6,10 ± 0,44	11,36 ± 0,90* <i>p</i> < 0,01	5,71 ± 0,83# <i>p</i> < 0,01
Удельная площадь пигментного эпителия в срезе сетчатки, %	5,77 ± 0,41	2,64 ± 0,19* <i>p</i> < 0,01	2,47 ± 0,19* <i>p</i> < 0,01
Средняя площадь клетки РПЭ, мкм ²	247,49 ± 3,96	183,65 ± 2,82* <i>p</i> < 0,01	207,98 ± 3,52*# <i>p</i> < 0,01
Средняя площадь ядра клетки РПЭ, мкм ²	53,71 ± 0,82	48,11 ± 0,59* <i>p</i> < 0,01	51,72 ± 0,90# <i>p</i> < 0,01
Количество рядов фоторецепторов	11,0 ± 0,42	6,62 ± 0,35* <i>p</i> < 0,01	7,57 ± 0,29* <i>p</i> < 0,01
Пикноз ядер фоторецепторов, %	0,37 ± 0,09	0,72 ± 0,06* <i>p</i> < 0,01	0,57 ± 0,07
Пикноморфные ассоциативные нейроны, %	0,54 ± 0,06	0,75 ± 0,06* <i>p</i> < 0,05	0,48 ± 0,05# <i>p</i> < 0,01
Пикноморфные радиальные глиоциты, %	3,61 ± 0,78	6,67 ± 0,65* <i>p</i> < 0,01	3,40 ± 0,59# <i>p</i> < 0,01
Ганглионарные нейроны с очаговым хроматолизом, %	3,25 ± 0,31	4,41 ± 0,30* <i>p</i> < 0,05	4,54 ± 0,16* <i>p</i> < 0,01
Ганглионарные нейроны с тотальным хроматолизом, %	0,71 ± 0,19	4,53 ± 0,59* <i>p</i> < 0,01	0,85 ± 0,08#
Ганглионарные пикноморфные нейроны, %	0,28 ± 0,05	3,13 ± 0,38* <i>p</i> < 0,01	0,44 ± 0,05#
Удельная площадь интравитреальных сосудов, %	0,97 ± 0,10	1,13 ± 0,23	0,76 ± 0,13

Примечание. Данные представлены mean ± SEM. * – Достоверные различия между крысами OXYS и Wistar, получавшими препарат плацебо; # – статистически значимый эффект препарата. Различия считали статистически значимыми при *p* < 0,05. РПЭ – ретикулярный пигментный эпителий.

защитил нейроны и радиальные глиоциты сетчатки крыс OXYS от повреждения. В результате процент пикнотичных ядер фоторецепторов у получавших его крыс OXYS не превышал значения этого показателя у крыс Wistar, доля пикноморфных ассоциативных нейронов снизилась по сравнению с крысами OXYS, получавшими плацебо, на 36% (*p* < 0,01), а радиальных глиоцитов – на 51% (*p* < 0,01), достигнув характерных для крыс Wistar значений (рис. 2; таблица). В популяции ганглионарных нейронов доля клеток с признаками деструкции была сопоставима у крыс OXYS, получавших Визомитин, и у крыс Wistar, получавших плацебо (таблица).

Визомитин снизил уровень фосфорилирования p38МАПК и ERK1/2 в сетчатке крыс OXYS. В возрасте 12 мес. содержание белка p38МАПК и его фосфорилированной формы (p-p38МАПК) в сетчатке крыс OXYS, получавших плацебо, было выше, чем у крыс Wistar (*p* < 0,005 и *p* < 0,001 соответственно; рис. 3, а–в). Уровень фосфорилирования

p38МАПК (оценивали по отношению p-p38МАПК к p38МАПК) у крыс OXYS превышал значение у крыс Wistar (*p* < 0,017; рис. 3, г). Инстиляции Визомитина не повлияли на содержание p38МАПК, но снизили содержание p-p38МАПК на уровне тенденции (*p* = 0,054; рис. 3, б и в). Отношение p-p38МАПК к p38МАПК в этой группе было достоверно ниже, чем у крыс OXYS из группы плацебо (*p* < 0,050), но оставалось выше, чем у крыс Wistar (рис. 3, г).

Содержание ERK1/2 в сетчатке крыс OXYS, получавших плацебо, в возрасте 12 мес. не отличалось от крыс Wistar (рис. 3, д). Как и следовало ожидать, содержание фосфорилированной формы (p-ERK1/2) у крыс OXYS превышало значения у крыс Wistar (*p* < 0,005; рис. 3, е). В соответствии с этими данными, уровень фосфорилирования ERK1/2 у крыс OXYS, получавших плацебо, был выше, чем у крыс Wistar (*p* < 0,005; рис. 3, ж), что свидетельствует об активации сигнального пути ERK1/2 в сетчатке этих животных. Несмотря на то что инстиляции Визомитина не повлияли на содержание ERK1/2

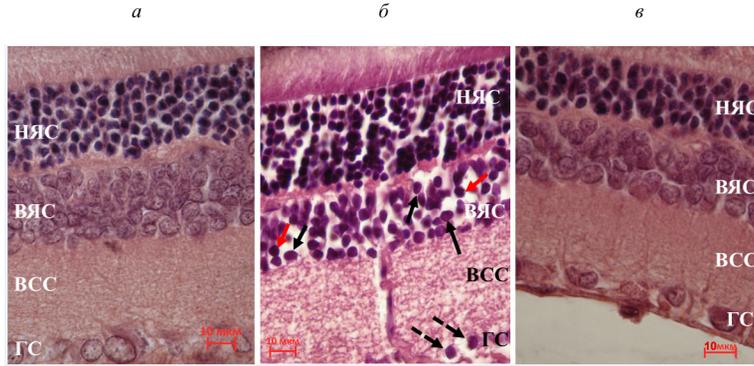


Рис. 2. Сетчатка крыс Wistar (а) и OXYS (б), получавших плацебо, и крысы OXYS, получавшей Визомитин (в). Чёрные стрелки – отёчные ассоциативные нейроны; красные стрелки – гиперхромные пикноморфные ассоциативные нейроны; пунктирные стрелки – пикноморфные ганглионарные нейроны. НЯС – наружный ядерный слой; ВЯС – внутренний ядерный слой; ВСС – внутренний сетчатый слой; ГС – ганглионарный слой. Окраска гематоксилином и эозином. Масштабная линейка – 10 мкм

в сетчатке крыс OXYS, они снизили на уровне тенденции содержание p-ERK1/2 ($p = 0,069$; рис. 3, д и е). Важно, что Визомитин достоверно снизил отношение p-ERK1/2 к ERK1/2 у крыс OXYS ($p < 0,040$; рис. 3, жс) до уровня крыс Wistar.

Влияние Визомитина на содержание тау, р-тауТ181 и р-тауS396 в сетчатке крыс OXYS. Для подтверждения ингибирующего влияния инстилляций Визомитана на активность p38МАПК и

ERK1/2 в сетчатке мы оценили уровень сайт-специфичного фосфорилирования их мишени тау-белка. Содержание общего тау в сетчатке крыс Wistar и OXYS, получавших плацебо, в возрасте 12 мес. не отличалось. и Визомитин не повлиял на его содержание в сетчатке крыс OXYS (рис. 4, а и б). Было выявлено повышенное содержание p-тауТ181 и p-тауS396 в сетчатке крыс OXYS относительно крыс Wistar ($p < 0,025$ и $p < 0,001$ соответственно).

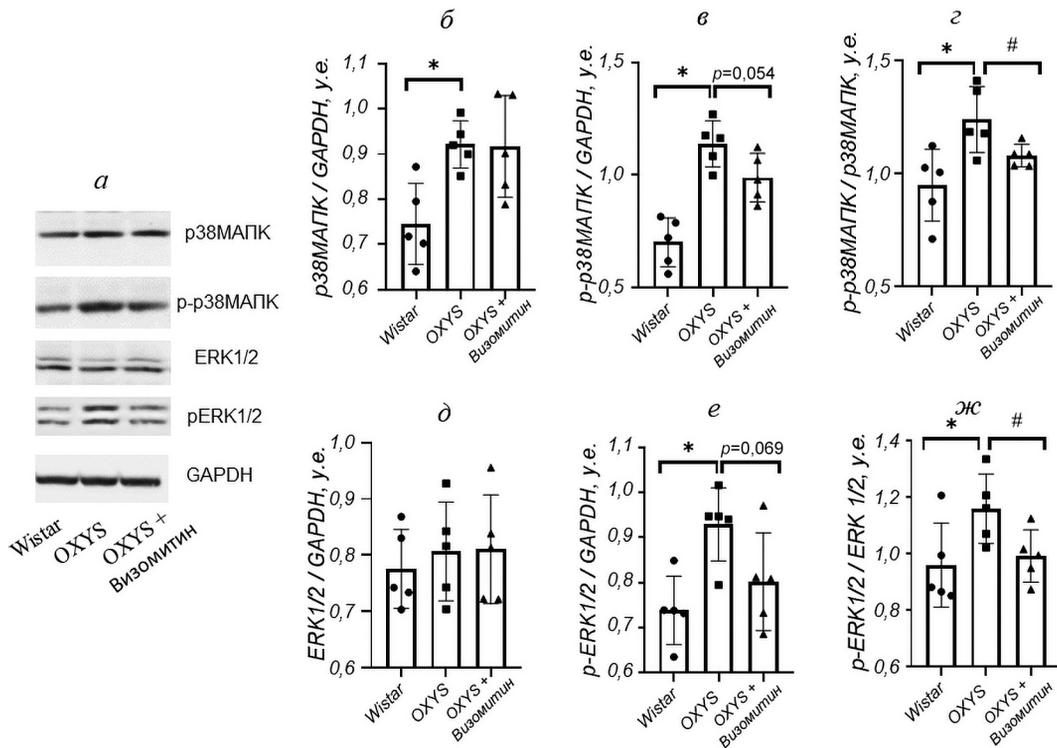


Рис. 3. Влияние инстилляций Визомитина на содержание p38МАПК, p-p38МАПК, ERK1/2 и p-ERK1/2 в сетчатке крыс OXYS. Репрезентативные изображения блотов (а), содержание p-38МАПК (б), p-p38МАПК (в), отношение p-p38МАПК к p38МАПК (г), ERK1/2 (д), p-ERK1/2 (е) и отношение p-ERK1/2 к ERK1/2 (жс) в сетчатке крыс Wistar и крыс OXYS, получавших плацебо или Визомитин. В качестве контроля использовали GAPDH. Данные представлены в виде медианы (q1–q3). * Достоверные различия между крысами OXYS и Wistar, получавшими плацебо; # статистически значимый эффект препарата. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$

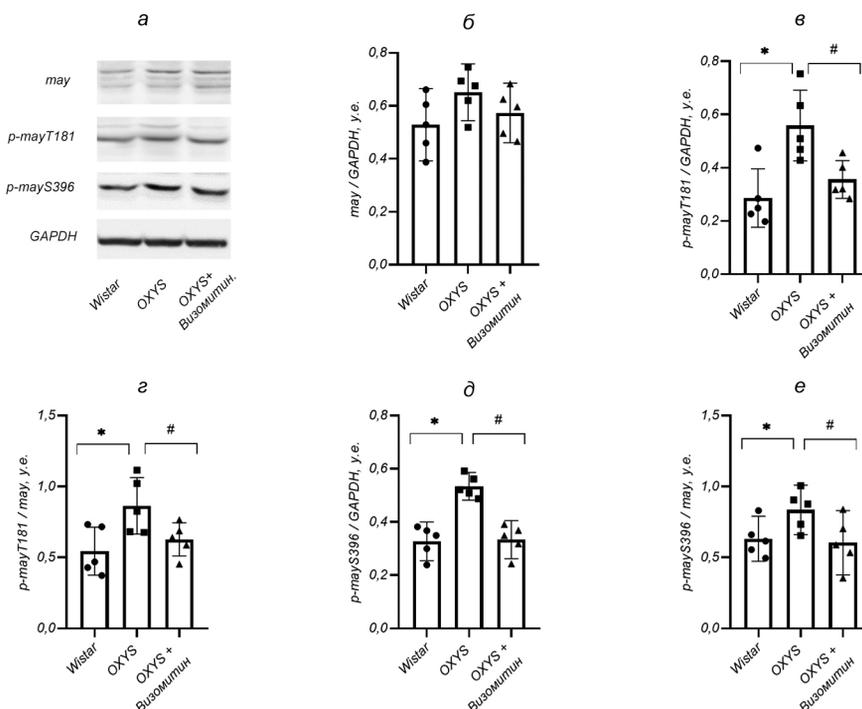


Рис. 4. Влияние Визомитина на содержание тау, р-тауТ181 и р-тауS396 в сетчатке крыс OXYS. Репрезентативные изображения блотов (а), содержание тау (б), р-тауТ181 (в), отношение р-тауТ181 к тау (г), р-тауS396 (д), отношение р-тауS396 к тау (е) в сетчатке крыс Wistar и крыс OXYS, получавших плацебо или Визомитин. В качестве контроля использовали GAPDH. Данные представлены в виде медианы (q1–q3). * Достоверные различия между крысами OXYS и Wistar, получавшими плацебо; # статистически значимый эффект препарата. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$

В группе крыс OXYS, получавших инстилляцию Визомитина, содержание р-тауТ181 и р-тауS396 было ниже, чем у контрольных крыс OXYS ($p < 0,017$ и $p < 0,001$ соответственно), так же, как и отношения р-тауТ181/тау и р-тауS396/тау ($p < 0,05$ и $p < 0,05$ соответственно; рис. 4, в и г).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее при исследовании эффективности инстилляций SkQ1 (250 нм водный раствор) мы показали, что и в этой лекарственной форме он способен не только предупреждать развитие и подавлять прогрессию признаков ВМД, но, как и в случае приёма с кормом, в определённой степени снижать выраженность патологических изменений в сетчатке крыс OXYS [4, 10, 25]. В настоящей работе мы впервые приводим результаты оценки влияния фармакологического препарата – глазных капель Визомитин – на развитие ретинопатии и активность МАПК в сетчатке крыс OXYS.

Как показали результаты офтальмологического осмотра, инстилляцией Визомитина, начатые в возрасте 9 мес., подавили прогрессию признаков ВМД у крыс OXYS: в возрасте 12 мес. выраженность патологических изменений сетчатки у получавших препарат животных была в 1,6 раза

менее выражена, чем у контрольных. Препарат существенно улучшил структурно-функциональные параметры РПЭ, фоторецепторов, нейронов и радиальной глии. Можно полагать, нейропротекторный эффект препарата связан с его способностью восстанавливать микроциркуляцию в сосудах хориоидеи – на фоне его приёма существенно снизилось количество сосудов с признаками нарушения кровотока.

Патогенез ВМД тесно связан с воспалением, окислительным стрессом и прогрессирующим нарушением протеостаза – процессами, в регуляции которых важная роль отводится МАПК-сигнальным каскадам, обеспечивающим передачу сигнала от клеточной мембраны к ядру [26]. Последовательное фосфорилирование нижестоящих киназ в конечном итоге вызывает фосфорилирование и активацию целевых белков и ядерных факторов транскрипции. Это событие служит индикатором как эффективности передачи сигнала, так и активности сигнального пути в целом. Подавление активности сигнальных путей МАПК рассматривается как перспективный подход к лечению ВМД, несмотря на то что информация об их состоянии при развитии ВМД остаётся крайне ограниченной и основана на данных, полученных в исследованиях на культурах клеток РПЭ [24].

Ранее мы показали, что манифестация и прогрессия признаков ВМД у крыс OXYS происходят на фоне активации сигнальных каскадов p38MAPK и ERK1/2 в сетчатке [22, 23]. Это подтвердило и настоящее исследование: в сетчатке 12-месячных крыс OXYS активность сигнальных каскадов p38MAPK и ERK1/2 была выше, чем у крыс Wistar. Инстилляцией Визомитина повлияли на активность p38MAPK и ERK1/2 в сетчатке крыс OXYS. При этом препарат снизил содержание p-p38MAPK и p-ERK1/2 только на уровне тенденции, тогда как соотношения фосфорилированных форм киназ к общему их содержанию было снижено достоверно.

Клетки сетчатки обладают уникальной морфологией, продолжительностью жизни и функциональной организацией, которые в значительной степени зависят от структурной и функциональной сохранности белков. Дисфункция митохондрий при развитии ВМД запускает нарушение протеостаза – накопление патологических агрегатов, которое выявляется в сетчатке пациентов с ВМД ещё до нарушения остроты зрения [27, 28]. Такие агрегаты, образованные липофусцином, токсическим Аβ и гиперфосфорилированным тау-белком, способны вызывать повреждение нейронов. Сигнальные пути MAPK участвуют в регуляции протеостаза через фосфорилирование белков-мишеней, включая тау. Ранее мы показали, что в возрасте 18 мес., когда нейродегенеративные изменения в сетчатке крыс OXYS ярко выражены, в ней существенно повышено содержание Аβ и фосфорилированного тау-белка за счёт его фосфорилирования по MAPK-зависимым сайтам [3, 23]. В настоящем исследовании мы показали, что фосфорилирование тау-белка в сетчатке крыс OXYS усилено уже в возрасте 12 мес., а инстилляцией Визомитина снизили его за счёт угнетения MAPK-зависимого фосфорилирования. Аналогичные результаты были получены при исследовании влияния на динамику накопления фосфорилированного тау и Аβ в мозге и сетчатке крыс OXYS после приёма SkQ1 с кормом [15, 21].

Накоплению патологических агрегатов способствует снижение с возрастом активности процессов аутофагии – клеточной системы контроля качества белков. Дисфункция аутофагии приводит к нарушению гомеостаза, накоплению повреждённых органелл и токсичных белков, которые способствуют нарушению функций митохондрий и окислительному стрессу [29]. Усиленное накопление липофусцина и Аβ в сетчатке на фоне нарушения процесса аутофагии характерно как для крыс OXYS с выраженными признаками ВМД [30, 31], так и для людей с поздней стадией этого заболевания [32]. Приём SkQ1 с кормом способствовал активации аутофагии в сетчатке крыс OXYS [14]. Имеющиеся в литературе данные

позволяют предположить наличие прямой связи между клеточными системами контроля качества, изменениями динамики митохондрий и сигнальными путями MAPK. Ранее мы показали, что механизмы нейропротекторного действия SkQ1 как при профилактическом приёме с кормом, начатом в молодом возрасте, так в случае его приёма крысами OXYS с выраженными нейродегенеративными изменениями связаны с восстановлением структурно-функциональных параметров митохондрий в мозге [33, 34].

Снижение активности сигнальных каскадов MAPK антиоксидантами было продемонстрировано ранее на различных моделях окислительного повреждения клеток РПЭ человека. Так, защитный эффект ресвератрола был связан с ингибированием активности ERK 1/2 в клетках РПЭ [35]. Экстракт черники увеличил уровень эндогенных антиоксидантных ферментов при одновременном снижении активных форм кислорода и ингибирования MAPK в модели окислительного повреждения *in vitro* [36]. Следует отметить, что приведённые выше эффекты антиоксидантов были связаны не только с частичным ингибированием MAPK, но и других сигнальных путей. Это обусловлено наличием связи передачи сигналов MAPK с такими сигнальными путями, как VEGF, mTOR, аутофагия и др. Известно, что p38MAPK и ERK1/2 способствуют увеличению экспрессии VEGF [37, 38], который является основным проангиогенным фактором, участвующим в патогенезе ВМД [39]. Глазные капли с SkQ1 (его водный раствор) снижали экспрессию VEGF в сетчатке крыс OXYS как на уровне мРНК, так и на уровне белка [25].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, мы показали, что глазные капли Визомитин способны подавлять прогрессию ретинопатии у крыс OXYS и могут быть в перспективе рекомендованы для применения в комплексной терапии ВМД у людей. Полученные нами ранее данные и результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что механизмы терапевтических эффектов SkQ1 – активного вещества капель Визомитин – многогранны и связаны с воздействием на редокс-зависимые сигнальные пути, в том числе – со снижением активности MAPK-сигнальных каскадов.

Вклад авторов. Н.А. Муралёва – концепция исследования, проведение экспериментов, обсуждение результатов исследования; А.Ж. Фурсова – офтальмологический осмотр животных; А.А. Жданкина – гистоморфометрический анализ препаратов сетчатки; А.Ж. Фурсова, А.А. Жданкина,

Н.А. Муралёва и Н.Г. Колосова – подготовка и редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 22-25-00224).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Работа выполнена на крысах линии OXYS и Wistar (контрольная линия) на базе Центра коллективного пользования «Виварий конвенциональных животных» Инсти-

тута цитологии и генетики СО РАН. Содержание животных (включая соответствующие помещения, квалифицированный персонал, необходимую документацию) и все эксперименты с животными проводили в соответствии с позицией по этике использования животных в исследованиях, выполняемых при поддержке Российского научного фонда, а также в соответствии с Директивой 2010/63/ЕС Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. и одобрены Комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН (№ 85/1 от 18.06.2021).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Skulachev V. P. (2007) A biochemical approach to the problem of aging: “megaproject” on membrane-penetrating ions. The first results and prospects, *Biochemistry (Moscow)*, **72**, 1385-1396, <https://doi.org/10.1134/s0006297907120139>.
2. Zhdankina, A. A., Fursova, A., Logvinov, S. V., and Kolosova, N. G. (2008) Clinical and morphological characteristics of chorioretinal degeneration in early aging OXYS rats, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **146**, 455-458, <https://doi.org/10.1007/s10517-009-0298-4>.
3. Kozhevnikova, O. S., Korbolina, E. E., Stefanova, N. A., Muraleva, N. A., Orlov, Y. L., and Kolosova, N. G. (2013) Association of AMD-like retinopathy development with an Alzheimer’s disease metabolic pathway in OXYS rats, *Biogerontology*, **14**, 753-762, <https://doi.org/10.1007/s10522-013-9439-2>.
4. Neroev, V. V., Archipova, M. M., Bakeeva, L. E., Fursova, A., Grigorian, E. N., Grishanova, A. Y., Iomdina, E. N., Ivashchenko, Z.h.N., Katargina, L. A., Khoroshilova-Maslova, I. P., Kilina, O. V., Kolosova, N. G., Kopenkin, E. P., Korshunov, S. S., Kovaleva, N. A., Novikova, Y. P., Philippov, P. P., Pilipenko, D. I., Robustova, O. V., Saprunova, V. B., and Skulachev, V. P. (2008) Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 4. Age-related eye disease. SkQ1 returns vision to blind animals, *Biochemistry (Moscow)*, **73**, 1317-1328, <https://doi.org/10.1134/s0006297908120043>.
5. Еричев В. П., Козлова И. В. Решикова В. С., Алексеев В. Н., Левко М. А., Замятнин А.А., Гудкова Е. Ю., Ковалёва Н. А., Выгодин В. А., Федоркин О. Н., Остапенко В., Сенин И. И., Савченко А. Ю., Попеко Н. А., Скулачѳв В. П., Скулачѳв М. В. (2016) Клиническое исследование эффективности и безопасности препарата Визомитин®, глазные капли, у пациентов с возрастной катарактой, *Национальный журнал Глаукома*, **15**, 61-69.
6. Wong, W. L., Su, X., Li, X., Cheung, C. M., Klein, R., Cheng, C. Y., and Wong, T. Y. (2014) Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis, *Lancet*, **2**, e106-e116, [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(13\)70145-1](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(13)70145-1).
7. Kolosova, N. G., Stefanova, N. A., Korbolina, E. E., Fursova, A. Zh., and Kozhevnikova, O. S. (2014) Senescence-accelerated OXYS rats: A genetic model of premature aging and age-related diseases, *Adv. Gerontol.*, **4**, 294-298, <https://doi.org/10.1134/S2079057014040146>.
8. Markovets, A. M., Saprunova, V. B., Zhdankina, A. A., Fursova, A. Zh., Bakeeva, L. E., and Kolosova, N. G. (2011) Alterations of retinal pigment epithelium cause AMD-like retinopathy in senescence-accelerated OXYS rats, *Aging*, **3**, 44-54, <https://doi.org/10.18632/aging.100243>.
9. Telegina, D. V., Kozhevnikova, O. S., Bayborodin, S. I., and Kolosova, N. G. (2017) Contributions of agerelated alterations of the retinal pigment epithelium and of glia to the AMD-like pathology in OXYS rats, *Sci. Rep.*, **7**, 41533, <https://doi.org/10.1038/srep41533>.
10. Skulachev, M. V., Antonenko, Y. N., Anisimov, V. N., Chernyak, B. V., Cherepanov, D. A., Chistyakov, V. A., Egorov, M. V., Kolosova, N. G., Korshunova, G. A., Lyamzaev, K. G., Plotnikov, E. Y., Roginsky, V. A., Savchenko, A. Y., Severina, I. I., Severin, F. F., Shkurat, T. P., Tashlitsky, V. N., Shidlovsky, K. M., Vyssokikh, M. Y., Zamyatnin, A. A., Jr, and Skulachev, V. P. (2011) Mitochondrial-targeted plastoquinone derivatives. Effect on senescence and acute age-related pathologies, *Curr. Drug Targets*, **12**, 800-826, <https://doi.org/10.2174/138945011795528859>.
11. Kolosova, N. G., Kozhevnikova, O. S., Muraleva, N. A., Rudnitskaya, E. A., Rummyantseva, Y. V., Stefanova, N. A., Telegina, D. V., Tyumentsev, M. A., and Fursova, A. Z. (2022) SkQ1 as a tool for controlling accelerated senescence program: experiments with OXYS rats, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 1552-1562, <https://doi.org/10.1134/S0006297922120124>.
12. Saprunova, V. B., Lelekova, M. A., Kolosova, N. G., and Bakeeva, L. E. (2012) SkQ1 slows development of age-dependent destructive processes in retina and vascular layer of eyes of Wistar and OXYS rats, *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 648-658, <https://doi.org/10.1134/S0006297912060120>.

13. Muraleva, N. A., Kozhevnikova, O. S., Zhdankina, A. A., Stefanova, N. A., Karamysheva, T. V., Fursova, A. Z., and Kolosova, N. G. (2014) The mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 restores α B-crystallin expression and protects against AMD-like retinopathy in OXYS rats, *Cell Cycle*, **13**, 3499-3505, <https://doi.org/10.4161/15384101.2014.958393>.
14. Telegina, D. V., Kozhevnikova, O. S., Fursova, A. Z., and Kolosova, N. G. (2020) Autophagy as a target for the retinoprotective effects of the mitochondria-targeted antioxidant SkQ1, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 1640-1649, <https://doi.org/10.1134/S0006297920120159>.
15. Muraleva, N. A., Kozhevnikova, O. S., Fursova, A. Z., and Kolosova, N. G. (2019) Suppression of AMD-like pathology by mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 is associated with a decrease in the accumulation of amyloid β and in mTOR activity, *Antioxidants*, **8**, 177, <https://doi.org/10.3390/antiox8060177>.
16. Tyumentsev, M. A., Stefanova, N. A., Kiseleva, E. V., and Kolosova, N. G. (2018) Mitochondria with morphology characteristic for Alzheimer's disease patients are found in the brain of OXYS rats, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 1083-1088, <https://doi.org/10.1134/S0006297918090109>.
17. Stefanova, N. A., Ershov, N. I., and Kolosova, N. G. (2019) Suppression of Alzheimer's disease-like pathology progression by mitochondria-targeted antioxidant SkQ1: a transcriptome profiling study, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2019**, 3984906, <https://doi.org/10.1155/2019/3984906>.
18. Switon, K., Kotulska, K., Janusz-Kaminska, A., Zmorzynska, J., and Jaworski, J. (2017) Molecular neurobiology of mTOR, *Neuroscience*, **341**, 112-153, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.11.017>.
19. Muraleva, N. A., Kolosova, N. G., and Stefanova, N. A. (2019) p38 MAPK-dependent α B-crystallin phosphorylation in Alzheimer's disease-like pathology in OXYS rats, *Exp. Gerontol.*, **119**, 45-52, <https://doi.org/10.1016/j.exger.2019.01.017>.
20. Muraleva, N. A., Stefanova, N. A., and Kolosova, N. G. (2020) SkQ1 suppresses the p38 MAPK signaling pathway involved in Alzheimer's disease like pathology in OXYS rats, *Antioxidants (Basel)*, **9**, 676, <https://doi.org/10.3390/antiox9080676>.
21. Muraleva, N. A., Kolosova, N. G., and Stefanova, N. A. (2021) MEK1/2-ERK pathway alterations as a therapeutic target in sporadic Alzheimer's disease: a study in senescence-accelerated OXYS rats, *Antioxidants (Basel)*, **10**, 1058, <https://doi.org/10.3390/antiox10071058>.
22. Muraleva, N. A. and Kolosova, N. G. (2023) P38 MAPK signaling in the retina: effects of aging and age-related macular degeneration, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 11586, <https://doi.org/10.3390/ijms241411586>.
23. Muraleva, N. A. and Kolosova, N. G. (2023) Alteration of the MEK1/2-ERK1/2 signaling pathway in the retina associated with age and development of AMD-like retinopathy, *Biochemistry (Moscow)*, **88**, 179-188, <https://doi.org/10.1134/S0006297923020025>.
24. Kyosseva, S. V. (2016) Targeting MAPK signaling in age-related macular degeneration, *Ophthalmol. Eye Dis.*, **8**, 23-30, <https://doi.org/10.4137/OED.S32200>.
25. Markovets, A. M., Fursova, A. Z., and Kolosova, N. G. (2011) Therapeutic action of the mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 on retinopathy in OXYS rats linked with improvement of VEGF and PEDF gene expression, *PLoS One*, **6**, e21682, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021682>.
26. Kyriakis, J. M., and Avruch, J. (2012) Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update, *Physiol. Rev.*, **92**, 689-737, <https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2011>.
27. Bhutto, I., and Lutty, G. (2012) Understanding age-related macular degeneration (AMD): relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex, *Mol. Aspects Med.*, **33**, 295-317, <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.04.005>.
28. Khandhadia, S., Cherry, J., and Lotery, A. J. (2012) Age-related macular degeneration, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **724**, 15-36, https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0653-2_2.
29. Blasiak, J., Pawlowska, E., Szczepanska, J., and Kaarniranta, K. (2019) Interplay between autophagy and the ubiquitin-proteasome system and its role in the pathogenesis of age-related macular degeneration, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 210, <https://doi.org/10.3390/ijms20010210>.
30. Kozhevnikova, O. S., Telegina, D. V., Devyatkin, V. A., and Kolosova, N. G. (2018) Involvement of the autophagic pathway in the progression of AMD-like retinopathy in senescence-accelerated OXYS rats, *Biogerontology*, **19**, 223-235, <https://doi.org/10.1007/s10522-018-9751-y>.
31. Kozhevnikova, O. S., Telegina, D. V., Tyumentsev, M. A., and Kolosova, N. G. (2019) Disruptions of autophagy in the rat retina with age during the development of age-related-macular-degeneration-like retinopathy, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 4804, <https://doi.org/10.3390/ijms20194804>.
32. Kaarniranta, K., Blasiak, J., Liton, P., Boulton, M., Klionsky, D. J., and Sinha, D. (2023) Autophagy in age-related macular degeneration, *Autophagy*, **19**, 388-400, <https://doi.org/10.1080/15548627.2022.2069437>.
33. Tyumentsev, M. A., Stefanova, N. A., Muraleva, N. A., Rummyantseva, Y. V., Kiseleva, E., Vavilin, V. A., and Kolosova, N. G. (2018) Mitochondrial dysfunction as a predictor and driver of Alzheimer's disease-like pathology in OXYS rats, *J. Alzheimer's Dis.*, **63**, 1075-1088, <https://doi.org/10.3233/JAD-180065>.

34. Kolosova, N. G., Tyumentsev, M. A., Muraleva, N. A., Kiseleva, E., Vitovtov, A. O., and Stefanova, N. A. (2017) Antioxidant SkQ1 alleviates signs of Alzheimer's disease-like pathology in old OXYS rats by reversing mitochondrial deterioration, *Curr. Alzheimer's Res.*, **14**, 1283-1292, <https://doi.org/10.2174/1567205014666170621111033>.
35. King, R. E., Kent, K. D., and Bomser, J. A. (2005) Resveratrol reduces oxidation and proliferation of human retinal pigment epithelial cells via extracellular signal-regulated kinase inhibition, *Chem. Biol. Interac.*, **151**, 143-149, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2004.11.003>.
36. Huang, W. Y., Wu, H., Li, D. J., Song, J. F., Xiao, Y. D., Liu, C. Q., Zhou, J. Z., and Sui, Z. Q. (2018) Protective effects of blueberry anthocyanins against H₂O₂-induced oxidative injuries in human retinal pigment epithelial cells, *J. Agric. Food Chem.*, **66**, 1638-1648, <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b06135>.
37. Milanini, J., Viñals, F., Pouysségur, J., and Pagès, G. (1998) p42/p44 MAP kinase module plays a key role in the transcriptional regulation of the vascular endothelial growth factor gene in fibroblasts, *J. Biol. Chem.*, **273**, 18165-18172, <https://doi.org/10.1074/jbc.273.29.18165>.
38. Pagès, G., Berra, E., Milanini, J., Levy, A. P., and Pouysségur, J. (2000) Stress-activated protein kinases (JNK and p38/HOG) are essential for vascular endothelial growth factor mRNA stability, *J. Biol. Chem.*, **275**, 26484-26491, <https://doi.org/10.1074/jbc.M002104200>.
39. Bhutto, I. A., McLeod, D. S., Hasegawa, T., Kim, S. Y., Merges, C., Tong, P., and Luttly, G. A. (2006) Pigment epithelium-derived factor (PEDF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in aged human choroid and eyes with age-related macular degeneration, *Exp. Eye Res.*, **82**, 99-110, <https://doi.org/10.1016/j.exer.2005.05.007>.

RETINOPROTECTIVE EFFECT SkQ1 – VISOMITIN EYE DROPS – IS ASSOCIATED WITH SUPPRESSION p38MAPK AND ERK1/2 SIGNALING PATHWAYS ACTIVITY

N. A. Muraleva^{1*}, A. A. Zhdankina², A. Zh. Fursova^{1,3,4}, and N. G. Kolosova¹

¹ Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia; e-mail: myraleva@bionet.nsc.ru

² Department of Histology, Embryology and Cytology, Siberian State Medical University, 634055 Tomsk, Russia

³ Department of Ophthalmology, Novosibirsk State Medical University, 630091 Novosibirsk, Russia

⁴ State Novosibirsk Regional Clinical Hospital, 630087 Novosibirsk, Russia

Visomitin eye drops are the first and so far the only drug based on SkQ1 – the mitochondrial antioxidant 10-(6'-plastoquinonyl) decyltriphenylphosphonium, synthesized in the laboratories of Moscow State University under the leadership of Academician V.P. Skulachev. SkQ1 is considered as a potential tool to combat the aging program. We have previously shown that it is able to prevent and/or suppress the development of all manifestations of accelerated senescence in OXYS rats, including retinopathy, similar to age-related macular degeneration (AMD). Here, we assessed the effect of Visomitin instillations (from the age of 9 to 12 months) on the progression of AMD-like pathology and p38MAPK and ERK1/2 activity in OXYS rat retina. Wistar and OXYS rats treated with placebo (with a composition identical to Visomitin with the exception of SkQ1) used as controls. Ophthalmological examination showed that in OXYS rats receiving placebo, retinopathy progressed and the severity of clinical manifestations did not differ from intact OXYS rats. Visomitin suppressed the progression of AMD-like pathology in OXYS rats and significantly improved the structural and functional parameters of retinal pigment epithelium cells and the state of microcirculation in the choroid, which, presumably, contributed to the preservation of photoreceptors, associative and ganglion neurons. It was found that the activity of p38MAPK and ERK1/2 in the retina of 12-month-old OXYS rats is higher than that of Wistar rats of the same age, as indicated by the increased content of phosphorylated forms of p38MAPK and ERK1/2 and their target protein tau (at position T181 and S396). Visomitin decreased the phosphorylation of p38MAPK, ERK1/2 and tau, indicating suppression of the activity of these MAPK signaling cascades. Thus, Visomitin eye drops are able to suppress the progression of AMD-like pathology in OXYS rats and their effect is associated with a decrease in the activity of MAPK signaling cascades.

Keywords: age-related macular degeneration, mitochondrial antioxidant SkQ1, Visomitin, p38MAPK, ERK1/2, phosphorylation, OXYS rats

СООТНОШЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО И АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ КОНЬЮГАТОВ ТРИФЕНИЛФОСФОНИЯ С РАЗЛИЧНЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ ХИНОНА

© 2024 П.А. Назаров^{1*}, Л.А. Зиновкина², А.А. Брезгунова^{1,2}, К.Г. Лямзаев^{1,3},
А.В. Головин², М.В. Каракозова¹, Е.А. Котова¹, Е.Ю. Плотников¹, Р.А. Зиновкин^{1,3},
М.В. Скулачев^{1,4}, Ю.Н. Антоненко¹

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

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва, Россия

³ ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России,
Российский геронтологический научно-клинический центр, 129226 Москва, Россия

⁴ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
НИИ Митоинженерии, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 04.12.2023

После доработки 30.01.2024

Принята к публикации 21.02.2024

Хиноновые производные трифенилфосфония зарекомендовали себя как эффективные геропротекторы и антиоксиданты, предотвращающие окисление компонентов клетки с участием активных свободных радикалов – пероксидных (RO²·), алкоксильных (RO·), алкильных (R·), а также активных форм кислорода (супероксид-анион, синглетный кислород). Наиболее изученными представителями являются производные пластохинона (SkQ1) и убихинона (MitoQ), которые, помимо антиоксидантных свойств, обладают также сильным антибактериальным действием. В настоящей работе мы исследовали антибактериальные свойства других хиноновых производных на основе децил-трифенилфосфония (SkQ3, SkQT и SkQThy). Нами показано, что, подобно SkQ1, эти соединения в микромолярных концентрациях подавляют рост различных грамположительных бактерий, тогда как в отношении грамотрицательных бактерий они не настолько эффективны, что обусловлено распознаванием производных трифенилфосфония основной помпой множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) грамотрицательных бактерий AcrAB-TolC. Обнаружена зависимость антибактериального действия SkQ1 от количества бактериальных клеток. Важно, что цитотоксическое действие SkQ1 на клетки млекопитающих наблюдается при значительно более высоких концентрациях, чем антибактериальное, что может объясняться: (1) наличием большого количества мембранных органелл, (2) более низким мембранным потенциалом, (3) пространственным разделением процессов генерации энергии и транспорта, (4) разницей в составе помп МЛУ. Различия в цитотоксическом действии у разных типов эукариотических клеток, возможно, связаны со степенью развитости мембранных органелл, энергетическим статусом клетки и уровнем экспрессии помп МЛУ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: антиоксиданты, SkQ1, помпы МЛУ, AcrAB-TolC, бактерии, культуры клеток млекопитающих, цитотоксичность, антибиотик, митохондрии.

DOI: 10.31857/S0320972524020033 EDN: XNDQBN

ВВЕДЕНИЕ

Бактерии и митохондрии имеют много общего, митохондрии – это клеточные электростанции, генерирующие клеточную энергию в форме

аденозинтрифосфата (АТФ). Митохондрии, как и бактериальные клетки, имеют отрицательный мембранный потенциал (–180 мВ) на внутренней мембране [1], поэтому положительно заряженные соединения накапливаются в митохондриальном матриксе и в бактериальных клетках против градиента их концентрации.

* Адресат для корреспонденции.

В 70-х гг. прошлого века группа Владимира Петровича Скулачева [2–4] предложила использовать производные трифенилфосфония (TRP) как нацеленные на митохондрии вещества, у которых TRP служит «локомотивом» для транспортировки в митохондрии. Два десятилетия спустя группа Майкла Мерфи [5–7] применила этот подход к доставке антиоксидантного фрагмента в митохондрии, что послужило толчком к созданию разнообразных молекул на основе производных трифенилфосфония [8], в том числе серии «ионов Скулачева» – митохондриально-направленных антиоксидантов (МНА), созданных в рамках «мегапроекта» по проникающим ионам для борьбы со старением [9].

МНА на основе производных хинона получили широкое распространение как в исследованиях роли митохондрий в различных физиологических процессах, так и в качестве терапевтических средств [10, 11]. Было показано, что, помимо антиоксидантного действия, эти соединения проявляют разобщающее действие на митохондриях, которое проявляется в стимуляции дыхания и падении мембранного потенциала митохондрий. Причем такое разобщающее действие не обязательно является токсичным для организма, поскольку было показано, что в случае патологий, связанных с окислительным стрессом, частичное разобщение митохондрий обладает защитным действием [12–15], что может быть связано с зависимостью генерации активных форм кислорода (АФК) от мембранного потенциала митохондрий [16]. Предполагаемый механизм разобщающего действия SkQ1 (10-(6'-пластохинонил) децил-трифенилфосфоний) на митохондриальной мембране основан на его способности взаимодействовать с эндогенными жирными кислотами и облегчать диффузию жирных кислот через мембрану за счет электростатического взаимодействия анионов жирных кислот и катионов SkQ1 [17]. Протонированные формы жирных кислот хорошо проникают через мембрану, что обеспечивает циклический трансмембранный перенос протонов, подобно работе обычных протонаторов, таких как 2,4-динитрофенол.

Несмотря на относительное сходство митохондрий и бактерий, долгое время считалось, что МНА, такие как SkQ1, лишены антибактериальных свойств [18], однако впоследствии было показано, что катионы алкил-трифенилфосфония (СпTRP) и SkQ1 оказывают сильное антибактериальное действие на грамположительные и грамотрица-

тельные бактерии [19–20]. Оказалось, что наблюдаемое отсутствие антибактериального действия связано с работой основной помпы множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) AcrAB-TolC у бактерии *Escherichia coli* [20, 21], единственной известной помпы МЛУ бактерий, способной откачивать SkQ1 [22].

Бактерицидное действие SkQ1 делает его перспективным для использования в клинической практике, в частности, для борьбы с инфекциями, вызванными грамположительными бактериями, например, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* или *Mycobacterium tuberculosis* [22–24].

Другие вещества на основе трифенилфосфония также обладали антибактериальным действием: например, сложный эфир флуоресцеина MitoFluo (10-[2-(3-гидрокси-6-оксо-ксантен-9-ил)бензоил] оксидецил-трифенилфосфоний) [25] или конъюгат хлорамфеникола и трифенилфосфония SAM-C10-TRP (N-[[[(1R,2R)-1,3-дигидрокси-1-(4-нитрофенил)пропан-2-ил]амино]-11-оксоундецил-трифенилфосфоний) [26]. При этом химерные молекулы сохраняли свойства своих компонентов. Так, например, молекула SAM-C10-TRP унаследовала от хлорамфеникола способность ингибирования синтеза белка на рибосомах, а от алкил-трифенилфосфония – способность снижать мембранный потенциал на бактериальной мембране. Конъюгаты на основе хинонов, подобные SkQ1 [20], могут проявлять как антиоксидантные, так и антибактериальные свойства, что делает их перспективными объектами исследований.

В настоящей работе была поставлена задача сравнить действие некоторых производных хинона на эукариотические и прокариотические клетки. Было показано, в частности, что почти все производные проявляют антибактериальное действие на грамположительные бактерии, тогда как грамотрицательные бактерии *E. coli* являются устойчивыми, что является результатом работы помпы МЛУ AcrAB-TolC. По своему токсическому действию на клетки млекопитающих такие производные хинонов, как SkQ3 (10-(6'-метилпластохинонил) децил-трифенилфосфоний), SkQT (смесь SkQT-para (10-(6-толукинонил) децил-трифенилфосфоний) и 10-(5-толукинонил) децил-трифенилфосфония) и SkQThy (10-(2-изопропил-5-метил-1,4-бензокинонил-6) децил-трифенилфосфоний), незначительно отличаются от SkQ1, при этом токсическое действие зависит от типа клеток, что может являться следствием разного уровня экспрессии помп МЛУ.

Принятые сокращения: КОЕ – колониеобразующие единицы; МИК – минимальная ингибирующая концентрация; МЛУ – множественная лекарственная устойчивость; МНА – митохондриально-направленные антиоксиданты; SkQs – используемые в работе «ионы Скулачева»; SkQ1 – 10-(6'-пластохинонил) децил-трифенилфосфоний; SkQ3 – 10-(6'-метилпластохинонил) децил-трифенилфосфоний; SkQThy – 10-(2-изопропил-5-метил-1,4-бензокинонил-6) децил-трифенилфосфоний; SkQT-para – 10-(6-толукинонил) децил-трифенилфосфоний; SkQT – смесь SkQT-para и 10-(5-толукинонил) децил-трифенилфосфония; TRP – трифенилфосфоний.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Проникающие катионы (рис. 1) были любезно предоставлены компанией НИИ Митоинженерии МГУ, а их синтез проводился согласно ранее опубликованным методикам [27, 28]. Все прочие реагенты, если не указано особо, – фирмы «Sigma-Aldrich», США.

Бактериальные штаммы. Стандартные лабораторные штаммы *Bacillus subtilis* subs. *subtilis* Cohn 1872, штамм BR151 (*trpC2 lys-3 metB10*) и *E. coli* Castellani and Chalmers 1919, штамм MG1655 (F- λ -*ilvG- rfb-50 rph-1*) были использованы в работе. *S. aureus* Rosenbach 1884 (№ 144) и *Mycobacterium smegmatis* Lehmann and Neumann 1899 (№ 377) были получены из коллекции микроорганизмов МГУ.

Делеционные штаммы ЕСК3026 (Δ *tolC*), ЕСК0456 (Δ *acrB*), ЕСК2465 (Δ *acrD*), ЕСК3253 (Δ *acrF*), ЕСК2071 (Δ *mdtB*), ЕСК3498 (Δ *mdtF*), ЕСК0870 (Δ *macB*), ЕСК2680 (Δ *emrB*) и ЕСК2363 (Δ *emrY*) были любезно предоставлены доктором Х. Ники (Национальный институт генетики, Япония) [29].

Культивирование микроорганизмов. Бактерии росли в среде LB в течение ночи при 30 или 37 °С на шейкере при 200 об./мин до достижения оптической плотности 1,5 при 600 нм. Измерение оптической плотности при 600 нм проводили на спектрофотометре «Ultrospec 1100 pro» («Amersham Biosciences», Великобритания).

Измерение минимальных ингибирующих концентраций. Минимальные ингибирующие концентрации измеряли методом двойных разведений, согласно протоколу [30], рекомендованному Институтом клинических и лабораторных стандартов (CLSI), в жидкой среде Миллера–Хинтона.

TolC – скрининг. Скрининг панели делеционных мутантов TolC-содержащих транспортеров проводили согласно ранее опубликованным работам [20, 21, 31] в среде LB в 96-луночных планшетах («Citotest», Китай). Предварительно выбранные концентрации используемых в работе «ионов Скулачева» (SkQs) (5, 30 и 50 мкМ) добавляли к каждому мутанту, оставляли расти в течение 21 ч при 37 °С, и затем измеряли оптическую плотность при 620 нм с использованием планшетного

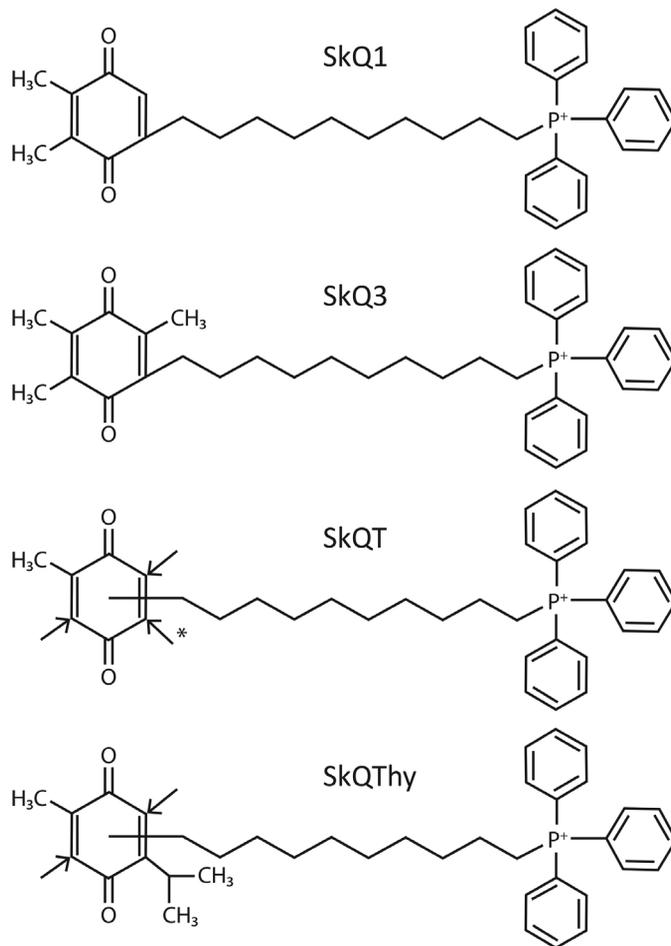


Рис. 1. Структурные формулы катионов используемых в работе «ионов Скулачева» (SkQs). Структуры со стрелками означают смесь изомеров, а стрелки указывают положение децил-трифенилфосфония. Звездочкой (*) указано положение децил-трифенилфосфония для соединения SkQT-para

спектрофотометра Multiskan FC («Thermo Fisher Scientific», США).

Изучение зависимости антибактериального действия от количества клеток. Различные объемы культуры *B. subtilis* добавляли в свежую среду LB, содержащую 1 мкМ SkQ1, и инкубировали 3 ч при 37 °С и 220 об./мин. Измерение оптической плотности при 600 нм проводили на спектрофотометре «Ultrospec 1100 pro».

Изучение влияния объема инкубируемой среды с SkQ1 на выживаемость. Ночную культуру бактерий *S. aureus* разводили до ~15 000 колониеобразующих единиц (КОЕ) на мл и инкубировали 3 ч при 37 °С и 220 об./мин в различных объемах физраствора с глюкозой (0,9% NaCl, 5 мМ D-глюкозы) с 1 мкМ SkQ1, после чего высаживали бактерии на LB-агар для определения КОЕ.

Изучение защитного эффекта мертвых клеток. Убитые клетки *S. aureus* получали прогреванием в течение 90 мин при 65 °С, потерю жизнеспособности бактерий подтверждали высевом на LB-агар. Смесь живых и мертвых клеток *S. aureus* в разных пропорциях инкубировали 3 ч при 37 °С и 220 об./мин с 0,25 мкМ SkQ1 в физрастворе с глюкозой, после чего определяли КОЕ для выживших бактерий.

Моделирование и докинг. Молекулярный докинг проводили с помощью программы QuickVina 2 [32] в составе программных модулей ODDT [33] для Python. Отсутствие информации о сайте связывания и размер белка лишают возможности эффективного сканирования сразу всего объема в одном эксперименте. Для решения этой задачи весь объем был разбит на 10 пересекающихся ячеек для докинга размером 40 × 40 × 40 Å с центром, который смещается на 15 Å с каждым шагом. Докинг был проведен с избыточным сканированием пространства с параметром exhaustiveness = 128 для двух состояний TolC: закрытом (PDB ID: 1ek9) и открытом (PDB ID: 2xmn). Независимые расчеты были сделаны по всем трем осям для полного покрытия объема TolC. Результаты докинга были визуализированы в программе PyMol [34].

Эксперименты с линиями клеток человека RKO и MRC5-SV40. Линии клеток карциномы толстой кишки человека RKO (ATCC CRL-2577) и фибробластов MRC5-SV40 (EACC Cat. No. 84100401) культивировали в модифицированной среде DMEM с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (FBS), стрептомицина (100 ЕД./мл) и пенициллина (100 ЕД./мл). Жизнеспособность клеток анализировали с использованием реагента CellTiter-Blue («Promega», США). Клетки высевали в 96-луночные планшеты по 10 000 клеток на лунку и культивировали в течение 24 ч при 37 °С. Клетки обрабатывали SkQ1 в течение 17 ч, затем добавляли Cell Titer-Blue (20 мкл на лунку), после чего клетки

инкубировали в течение 1 ч перед регистрацией флуоресценции (ex = 560 нм; em = 590 нм) с помощью флуориметра Fluoroskan Ascent Microplate Fluorometer («Thermo Fisher Scientific»).

Эксперименты с культурами клеток эпителия почечных канальцев. Первичные культуры клеток почечных канальцев получали из почек 5–7-дневных самцов крыс линии Wistar. Почки стерильно выделяли, разрезали на мелкие кусочки и инкубировали с 0,125% коллагеназой II типа («Gibco», «Thermo Fisher Scientific», США) в среде DMEM/F12 без бикарбоната при 37 °С в течение 15 мин.

После инкубации кусочки почек в растворе коллагеназы пипетировали в течение нескольких минут, и полученную суспензию центрифугировали в течение 5 мин при 400 g для осаждения фракции канальцев. Полученный осадок ресуспендировали в полной питательной среде, состоящей из DMEM/F-12 (1/1), содержащей 10% FBS, 2% аминокислот, 1% витаминов и 1% L-глутамин, и высевали в 96-луночный планшет. Клетки культивировали в инкубаторе в атмосфере 5% CO₂. Через 24 ч после посева клеток проводили смену культуральной среды для удаления клеточного дебриса. Через 24 ч добавляли SkQT, SkQ3 и SkQ1 в концентрации 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 и 32 мкМ и инкубировали клетки эпителия почечных канальцев с этими веществами в течение 24 ч в полной питательной среде. Контрольные клетки инкубировали в той же среде без добавления SkQT, SkQ3 и SkQ1. Жизнеспособность клеток была оценена с помощью стандартного МТТ-теста, для чего культуральную среду заменяли на DMEM/F-12 без бикарбоната с 5 мг/мл реагента МТТ и инкубировали в течение 1 ч. Затем среду удаляли и в каждую лунку добавляли по 50 мкл ДМСО. Поглощение формазана измеряли при 540 нм с использованием планшетного спектрофлуориметра Zenyth 3100 («Anthos Labtec», Австрия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Антибактериальное действие SkQs. Ранее было показано, что добавление микромолярных концентраций SkQ1 или C₁₂TPP к бактериям приводит к угнетению их роста и бактерицидному действию [20, 24]. В табл. 1 показаны измеренные нами минимальные ингибирующие концентрации (МИК) для трех грамположительных (*B. subtilis*, *S. aureus*, *M. smegmatis*) и одной грамотрицательной бактерии (*E. coli*). Для всех исследованных нами SkQs были получены сравнимые с SkQ1 значения МИК в отношении как грамположительных бактерий, так и грамотрицательной *E. coli*. Так же, как и в случае с SkQ1, все исследованные

Таблица 1. Минимальные ингибирующие концентрации (мкМ)

SkQs	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>E. coli</i>	$\Delta tolC$	$\Delta acrB$	Другие*
SkQ1	1	1	1	35	1	1	35
SkQ3	1	1	1	35	1	1	35
SkQT	2	2	2	35	2	2	35
SkQT-para	1	1	1	35	1	1	35
SkQThy	1	1	1	35	1	1	35

Примечание. Звездочкой (*) обозначены делеционные мутанты по другим белкам TolC-содержащих помп (*AcrD*, *AcrF*, *MdtB*, *MdtF*, *MacB*, *EmrB* и *EmrY*).

нами SkQs продемонстрировали антибактериальное действие только в отношении делеционных мутантов по генам *tolC* и *acrB*, тогда как в отношении других делеционных мутантов по генам *acrD*, *acrF*, *mdtB*, *mdtF*, *macB*, *emrB* и *emrY* антибактериальная активность была сравнима с активностью в отношении дикого типа *E. coli*. Значения МИК для всех делеционных мутантов (за исключением $\Delta tolC$ и $\Delta acrB$) были близки в отношении всех SkQs, указывая на то, что, как и в случае с SkQ1, все остальные SkQs также откачиваются только помпой МЛЮ AcrAB-TolC.

Докинг SkQ1 в TolC. Полученные нами данные говорят о важной роли помпы МЛЮ AcrAB-TolC в бактериальной резистентности для SkQ1 [20–22]. Нами была начата работа по моделированию процесса взаимодействия SkQ1 с данной помпой. На первом этапе были выполнены расчеты молекулярного докинга с компонентом помпы TolC. Результаты докинга (рис. 2) позволяют заключить,

что в целом на внутренней поверхности TolC в обоих состояниях (закрытом и открытом) нет явно выраженных карманов связывания для SkQ1, тем не менее интересная кластеризация состояний возникает на входе в помпу в закрытом состоянии, где фосфониевая группа взаимодействует с обильно представленными остатками Glu и Asp, ароматические кольца образуют стэкинг с тремя остатками тирозина, а Asp371 образует водородные связи с хиноном. К сожалению, оценочные функции для ранжирования в результатах докинга не позволяют даже примерно оценить аффинность такого связывания. Можно заключить, что самым специфическим местом связывания SkQ1 в TolC является вход в помпу в закрытом состоянии.

Антибактериальная активность зависит от количества клеток. Несмотря на то что SkQ1 может рассматриваться как антибактериальный агент или антибиотик, его свойства все же отличаются от традиционных антибиотиков.

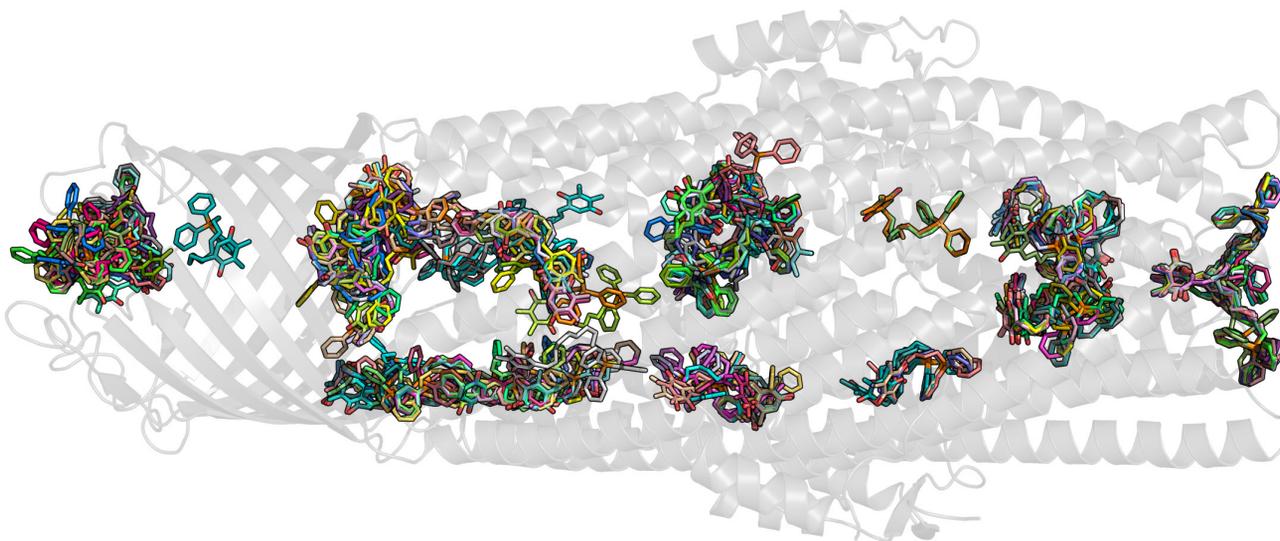


Рис. 2. Результаты моделирования докинга SkQ1 во внутреннюю полость TolC в закрытом состоянии. Серым представлена структура TolC с отображением элементов вторичной структуры. В виде отображения ковалентных связей разными цветами показаны позы SkQ1

Таблица 2. Повышение минимальной ингибирующей концентрации SkQ1 при добавлении экзогенных жирных кислот (мкМ)

Кислота	Формула	Жирная кислота, мкМ	МИК SkQ1, мкМ
Миристиновая кислота	$C_{14}H_{28}O_2$	0,5	2–4
Пальмитиновая кислота	$C_{16}H_{32}O_2$	0,5	2–4
Стеариновая кислота	$C_{18}H_{36}O_2$	0,5	2–4
Линолевая кислота	$C_{18}H_{32}O_2$	0,5	2–4
Без добавок		0	1

Примечание. Добавление жирных кислот не влияло на скорость роста популяции *B. subtilis*.

В отличие от других антибиотиков, активность SkQ1 зависит от количества клеток, что объясняется его липофильностью и протонофороподобными свойствами, позволяющими ему снижать мембранный потенциал бактерий. На рис. 3, а показаны кривые роста в течение 6 ч при добавлении разного количества клеток ночной культуры *B. subtilis* в среду с одинаковой концентрацией SkQ1. Полученные результаты свидетельствуют о том, что антибактериальное действие липофильного катиона SkQ1 снижается при увеличении количества клеток, а, следовательно, и мембран/липидов в них. Таким образом, несмотря на то что протонофороподобное действие SkQ1 опосредовано свободными жирными кислотами, добавление экзогенных жирных кислот может приводить не к усилению протонофорного действия, а к защитному действию вследствие конкуренции за SkQ1

мицелл жирных кислот с бактериальными клетками [35]. Ранее такой защитный механизм был описан для *S. aureus*, который был устойчив к даптомицину за счет снижения активности антибиотика посредством выделения во внешнюю среду мембранных фосфолипидов, в мицеллы которых он встраивается [36]. В случае добавления экзогенных жирных кислот мы наблюдали защитный эффект (табл. 2): МИК увеличивался в 2–4 раза, что дополнительно подтверждает зависимость антибактериального действия от количества мембран/липидов или мицелл. При этом необходимо отметить, что добавление экзогенных жирных кислот не оказывало негативного влияния на рост бактериальных клеток без добавления SkQ1.

Защитный эффект популяции мертвых клеток от действия SkQ1. Добавление убитых нагреванием бактерий к живым *S. aureus* предотвращало

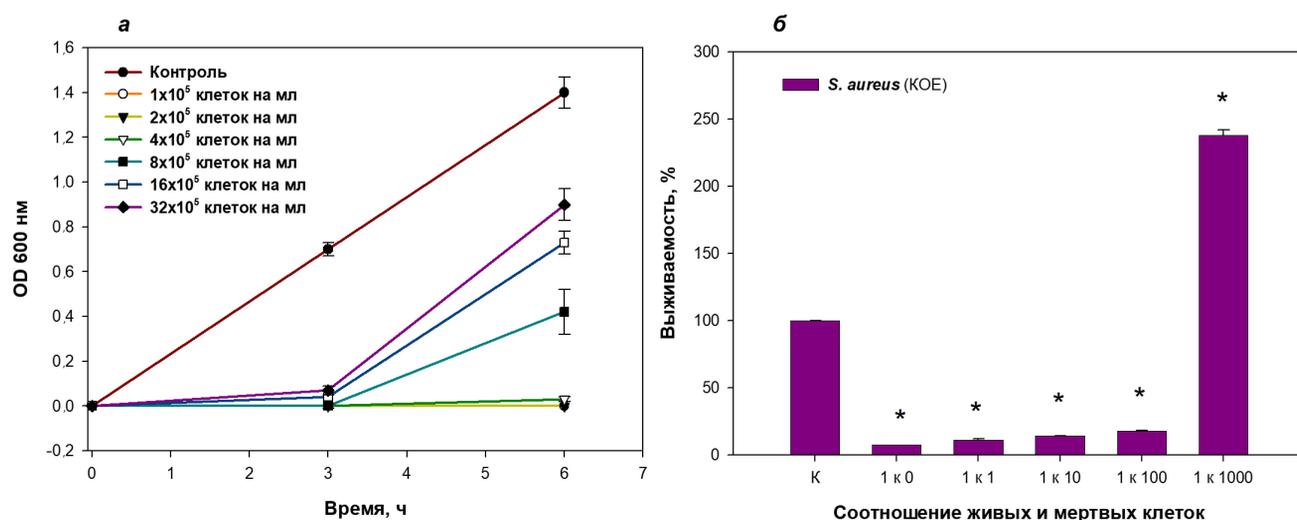


Рис 3. Антибактериальное действие зависит от числа клеток. а – Зависимость антибактериального действия 0,5 мкМ SkQ1 от количества клеток *B. subtilis*. б – Влияние мертвых клеток *S. aureus* на выживаемость бактерий под действием SkQ1. Бактерии в концентрации ~60 000 КОЕ на мл инкубировали 3 ч при 37 °С в физрастворе с глюкозой (0,9% NaCl, 5 мМ D-глюкозы, 1 мкМ SkQ1). Контрольные клетки (К) инкубировали без SkQ1. Приведены относительные результаты выживаемости бактерий (КОЕ) при инкубации с 0,5 мкМ SkQ1 в присутствии кратных количеств мертвых бактерий (1 к 1; 1 к 10; 1 к 100; 1 к 1000). Указано среднее значение ± SEM, n = 4. * p < 0,01 при сравнении с контролем (К) по непарному t-тесту Стьюдента

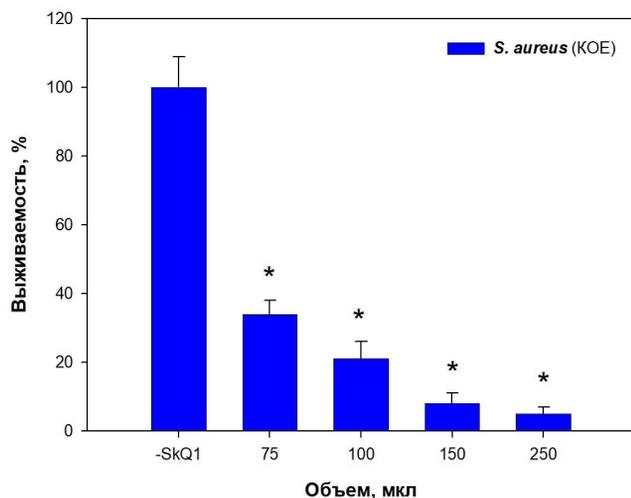


Рис. 4. Выживаемость *S. aureus* в различных объемах среды инкубации с 1 мкМ SkQ1. Бактерии в концентрации ~15 000 КОЕ на мл инкубировали 3 ч при 37 °С в различных объемах смеси (0,9% NaCl, 5 мМ Д-глюкозы, 1 мкМ SkQ1). Приведены результаты выживаемости бактерий (КОЕ). Указано среднее значение ± SEM, $n = 4$. * $p < 0,01$ при сравнении с контролем (-SkQ1) по непарному t -тесту Стьюдента

гибель живых *S. aureus* от SkQ1, причем чем больше присутствовало убитых бактерий, тем сильнее был выражен защитный эффект (рис. 3, б). Интересно, что при 1000-кратном избытке мертвых бактерий происходила даже стимуляция их роста относительно контроля примерно в 2 раза, что может объясняться не только сорбцией SkQ1 на мертвых клетках и предотвращением его токсического действия, но и наличием в среде инкубации метаболитов из мертвых клеток, используемых

живыми бактериями для роста и размножения (некротрофический рост) [37].

Объем среды инкубации влияет на выживаемость бактерий под действием SkQ1. При инкубации *S. aureus* с 1 мкМ SkQ1 было обнаружено, что увеличение объема среды инкубации приводит к значительному снижению выживаемости бактерий (рис. 4), что свидетельствует, по всей видимости, о способности бактерий аккумулировать SkQ1 из среды инкубации.

Действие SkQs на эукариотические клетки. Хотя, согласно теории [27], митохондрии эукариотических клеток должны накапливать на порядок больше SkQs, чем прокариотические клетки, эксперименты на различных культурах клеток показывают, что цитотоксическое действие наступает при более высоких концентрациях, чем у прокариотических клеток.

SkQT, SkQ3 и SkQ1 оказывали выраженное цитотоксическое действие на клетки первичной культуры почечных канальцев крыс лишь в концентрации 32 мкМ (рис. 5, а), которая более чем на 2 порядка превосходит МИК для грамположительных бактерий и сравнима с МИК для *E. coli*.

Клетки первичной культуры почечных канальцев, обработанные SkQT в концентрациях 0,125–16 мкМ, не показали снижения жизнеспособности по сравнению с контрольной группой. Более того, в концентрации 1 мкМ, которая является МИК для грамположительных бактерий, SkQT увеличивал выживаемость клеток. При инкубации с SkQ3 наблюдалась тенденция к увеличению жизнеспособности клеток вплоть до концентрации 2 мкМ. Однако в концентрации 4 мкМ и более SkQ3 уже приводил к некоторому снижению

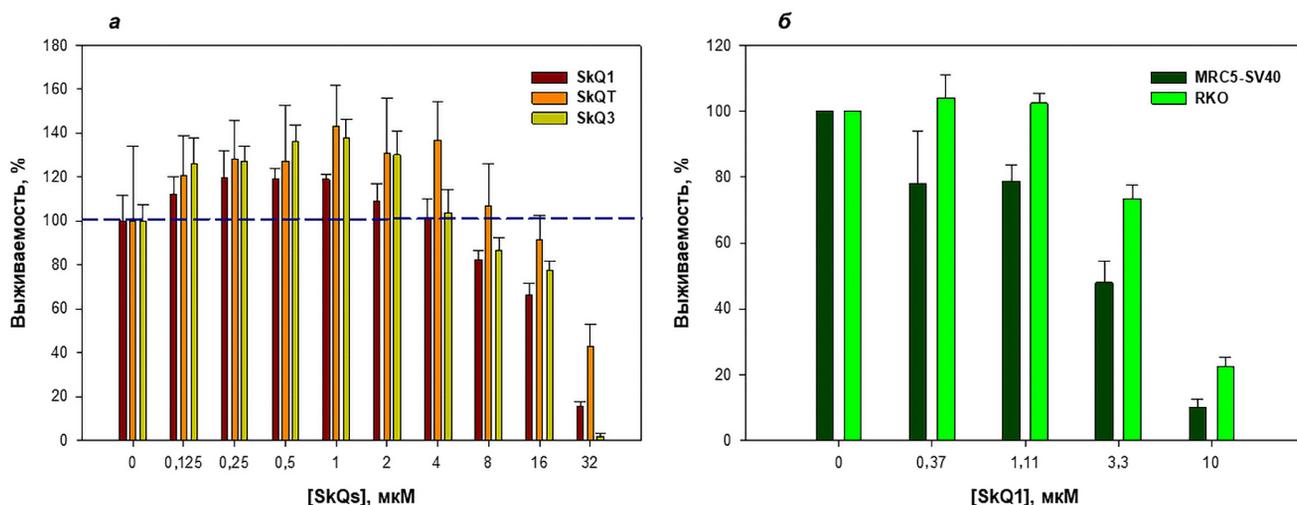


Рис. 5. Оценка жизнеспособности клеток млекопитающих при добавлении SkQs. а – Жизнеспособность клеток первичной культуры почечных канальцев крыс после добавления SkQs. Клетки инкубировали в течение 24 ч. Жизнеспособность клеток определяли с помощью МТТ-теста. б – Жизнеспособность клеток карциномы толстой кишки человека RKO и фибробластов MRC5-SV40 после добавления SkQ1. Клетки инкубировали в течение 17 ч. Жизнеспособность клеток определяли с помощью CellTiter-Blue Reagent («Promega», США)

жизнеспособности. SkQ1 в концентрации 0,125–4 мкМ не снижал жизнеспособность клеток первичной культуры почечных канальцев, а концентрации 0,5 и 1 мкМ улучшали выживаемость клеток. Увеличение концентрации выше 8 мкМ приводило к снижению жизнеспособности клеток. Таким образом, токсичность для клеток первичной культуры была сравнима с наблюдаемой нами ранее в отношении иммортализованных раковых клеток HeLa [20].

Совсем другая ситуация наблюдалась с клеточными линиями карциномы толстой кишки человека RKO и фибробластов MRC5-SV40 (рис. 5, б). Клетки легочных фибробластов человека MRC5-SV40 также не демонстрировали цитотоксичности при концентрации 1 мкМ SkQ1, однако уже к 10 мкМ наблюдалось значительное снижение жизнеспособности. Для клеток карциномы RKO уже концентрация 1 мкМ SkQ1 вызывала заметную цитотоксичность. При концентрации 10 мкМ выживаемость сохранялась на уровне лишь 10%. Таким образом, токсичность была значительно выше наблюдаемой нами ранее в отношении клеток HeLa [20], что говорит, по-видимому, о разнице в метаболизме и в экспрессии генов у этих иммортализованных клеток.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на существенный прогресс в изучении МНА, механизмы их действия на прокариотические и эукариотические клетки остаются не до конца изученными. Так же, как хорошо изученный МНА – SkQ1, другие хиноновые производные, такие как SkQT [38, 39], SkQThy [40, 41], SkQ3 [9, 42], обладали ярко выраженными антиоксидантными свойствами, однако ни для одного из них антибактериальное действие не было продемонстрировано экспериментально.

Все без исключения живые клеточные организмы имеют в своем составе помпы МЛУ, локализованные на клеточной мембране. У бактерий имеется 6 классов помп, которые подразделяются на две большие группы: АТФ-зависимые помпы и H^+/Na^+ градиент-зависимые помпы [43], поэтому было очень вероятно, что какая-то из них может распознать SkQs и начать их откачивать, тем самым повышая резистентность бактерий. Тем удивительней тот факт, что мы наблюдаем – все исследованные нами SkQs откачиваются единственной помпой, AcrAB-TolC.

Таким образом, если только помпа AcrAB-TolC может откачивать SkQs, то многие грамположительные бактерии будут чувствительны к SkQs, так как у них подобных помп просто не может быть (за исключением, возможно, Negativicutes).

В случае грамотрицательных бактерий, у которых существование подобной помпы возможно, резистентность будет зависеть от наличия помпы AcrAB-TolC или схожей помпы, структура которой близка к структуре помпы AcrAB-TolC из *E. coli* [22]. В случае эукариот, например дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, откачка SkQ1 происходит за счет работы как минимум нескольких АТФ-зависимых помп, включая Pdr5 [44].

При этом у эукариот основными помпами МЛУ являются АТФ-зависимые помпы, так как процесс генерации энергии разобщен с процессом транспорта веществ и происходит в митохондриях, а не на плазматической мембране. Таким образом, снижение мембранного потенциала за счет протонифороподобного цикла SkQ1 приводит к остановке работы H^+/Na^+ градиент-зависимых помп (таких, как AcrAB-TolC, например) у прокариот, но не приводит к остановке АТФ-зависимых помп у эукариот.

В отличие от прокариот, где есть достаточная ясность в механизме цитотоксического действия SkQ1 и защиты от него, в случае эукариот, такой ясности нет. Действительно, теоретически митохондрии эукариот должны закачивать на порядок больше SkQs, чем бактериальные клетки. Разность электрических потенциалов между внеклеточной средой и матриксом митохондрий у эукариот составляет примерно –240 мВ (~ –60 мВ на плазматической мембране и –180 мВ на внутренней мембране митохондрий), тогда как потенциал на бактериальной мембране всего –180 мВ. Поскольку на плазматической мембране эукариот имеется меньший электрический потенциал, чем на клеточной мембране бактерий, накопление SkQs в цитоплазме эукариотических клеток должно быть менее эффективно, чем в бактериальных клетках. Необходимо отметить, что работа помпы AcrAB-TolC грамотрицательных бактерий также всего лишь снижает скорость накопления SkQs на внутренней мембране бактерий, что дает шанс грамотрицательным бактериям увеличить биомассу и за счет клеточного деления уменьшить тем самым соотношение SkQs и мембранных фракций. Наши эксперименты по изучению зависимости антибактериального действия SkQ1 от количества клеток и наличия мертвых клеток являются подтверждением этого вывода.

Другим механизмом, защищающим эукариотические клетки от токсического действия SkQs, является наличие мембранных органелл (внутриклеточные вакуоли, аппарат Гольджи, эндоплазматический ретикулум, лизосомы, эндосомы и др.), в которых липофильные молекулы SkQs могут временно депонироваться, что также снижает скорость накопления SkQs уже на внутренней мембране митохондрий. Наши эксперименты по влиянию добавления экзогенных жирных кислот

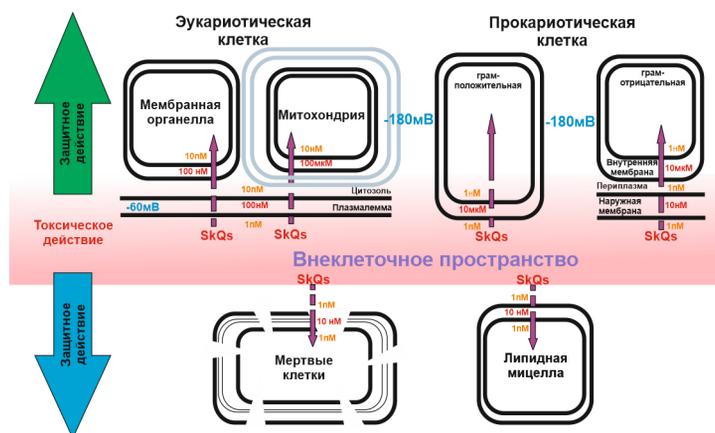


Рис. 6. Схема, иллюстрирующая накопление SkQs в эукариотических и прокариотических клетках, и защитный эффект мембранных внутриклеточных органелл, липидных/мембранных мицелл, мертвых клеток из-за депонирования SkQs в них и живых клеток за счет уменьшения соотношения SkQs/мембраны ([27], с изменениями)

на антибактериальное действие SkQ1 являются подтверждением этого вывода. На рис. 6 представлена схема распределения проникающего катиона SkQ вне и внутри клеток эукариот (слева) и прокариот (справа). Для определенности мы предполагаем на этой схеме, что вне клеток концентрация SkQ составляет 1 пМ, причем внешнее пространство представляет бесконечный источник соединения. Тогда в результате накопления по потенциалу в цитоплазме эукариотических клеток концентрация составляет 10 пМ, а внутри плазматической мембраны – ~100 нМ из-за высокого коэффициента распределения мембрана–вода. В случае прокариотических клеток концентрация в цитоплазме должна быть 1000 пМ = 1 нМ. При этом в матриксе митохондрий внутри эукариотических клеток должно накопиться ~10 нМ SkQ. При ограниченном источнике SkQ вне клеток, что должно быть в реальной ситуации, концентрация SkQ внутри митохондрий должна быть ниже 10 нМ из-за наличия в клетках других мембранных органелл, которые должны эффективно накапливать гидрофобный SkQ. Аналогично, мертвые клетки и липидные мицеллы вне клетки в реальной ситуации будут эффективно накапливать гидрофобный SkQ и также снижать концентрацию SkQ внутри живых клеток.

Значения $\Delta\psi$ на плазматической мембране и внутренней мембране митохондрий принимаются равными –60 и –180 мВ соответственно. Коэффициент распределения мембрана/вода для SkQ принимается равным 10 000 : 1 [27].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами результаты позволяют заключить, что антибактериальная активность SkQs зависит от количества липидных компонен-

тов мембран или мицелл (рис. 6). Это позволяет нам сформулировать несколько основных причин, определяющих повышенную резистентность эукариотических клеток, а именно: (1) наличие у эукариотических клеток большого количества мембранных органелл (эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи и др.), которые депонируют в себе некоторое количество SkQs; (2) разница в потенциале на клеточной мембране у прокариот (~180 мВ) и у эукариот (~60 мВ), что обуславливает не такое быстрое проникновение SkQs в эукариотическую клетку; (3) пространственное разделение у эукариот процессов генерации энергии (митохондрии) и транспорта (клеточная мембрана) в отличие от совмещения этих процессов на клеточной мембране прокариот; (4) разница в составе помп МЛУ на мембране эукариот (в основном АТФ-зависимые помпы) и прокариот (в основном H^+/Na^+ градиент-зависимые помпы). Совместно все эти основные четыре фактора и определяют ту повышенную устойчивость эукариотических клеток в сравнении с теоретически ожидаемой чувствительностью. Разница в чувствительности различных типов эукариотических клеток определяется, по-видимому: (1) степенью развитости мембранных органелл (системы эндосом, аппарата Гольджи и др.); (2) энергетическим статусом клеток [45]; (3) уровнем экспрессии помп МЛУ в них.

Вклад авторов. П.А. Назаров, Ю.Н. Антоненко, М.В. Скулачев, Р.А. Зиновкин, Е.Ю. Плотников – концепция и руководство работой; П.А. Назаров, Л.А. Зиновкина, А.А. Брезгунова, К.Г. Лямзаев, А.В. Головин – проведение экспериментов; П.А. Назаров, Ю.Н. Антоненко, М.В. Скулачев, Р.А. Зиновкин, Е.Ю. Плотников, М.В. Каракозова, А.В. Головин, К.Г. Лямзаев – обсуждение результатов исследования; П.А. Назаров, М.В. Скулачев, А.В. Головин, Е.А. Котова, Р.А. Зиновкин, Е.Ю. Плотников,

М.В. Каракозова, Ю.Н. Антоненко – написание текста; П.А. Назаров, Е.А. Котова, Е.Ю. Плотников, М.В. Каракозова – редактирование текста статьи.

Благодарности. Авторы выражают благодарность Н.В. Сумбатян за помощь в работе и плодотворное обсуждение результатов.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00099 (Назаров П.А.)). Эксперименты на клеточных линиях человека выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-14-00061 (Лямзаев К.Г.)). Молекулярный докинг выполнен при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Мозг, ког-

нитивные системы, искусственный интеллект» (Головин А.В.).

Конфликт интересов. Скулачев М.В. является директором компании «Митотех», разрабатывающей и коммерциализирующей лекарственные препараты на основе МНА класса SkQ. Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Протоколы работы с животными были одобрены Этическим комитетом по работе с животными НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова (Протокол № 3/19 от 18 марта 2019 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zorova, L. D., Popkov, V. A., Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Pevzner, I. B., Jankauskas, S. S., Babenko, V. A., Zorov, S. D., Balakireva, A. V., Juhaszova, M., Sollott, S. J., and Zorov, D. B. (2018) Mitochondrial membrane potential, *Anal. Biochem.*, **552**, 50-59, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.07.009>.
- Lieberman, E. A., Topaly, V. P., Tsofina, L. M., Jasaitis, A. A., and Skulachev, V. P. (1969) Mechanism of coupling of oxidative phosphorylation and the membrane potential of mitochondria, *Nature*, **222**, 1076-1078, <https://doi.org/10.1038/2221076a0>.
- Grinius, L. L., Jasaitis, A. A., Kadziauskas, Y. P., Lieberman, E. A., Skulachev, V. P., Topali, V. P., Tsofina, L. M., and Vladimirova, M. A. (1970) Conversion of biomembrane-produced energy into electric form. I. Submitochondrial particles, *Biochim. Biophys. Acta*, **216**, 1-12, [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(70\)90153-2](https://doi.org/10.1016/0005-2728(70)90153-2).
- Lieberman, E. A., and Skulachev, V. P. (1970) Conversion of biomembrane-produced energy into electric form. IV. General discussion, *Biochim. Biophys. Acta*, **216**, 30-42, [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(70\)90156-8](https://doi.org/10.1016/0005-2728(70)90156-8).
- Burns, R. J., Smith, R. A., and Murphy, M. P. (1995) Synthesis and characterization of thiobutyltriphenylphosphonium bromide, a novel thiol reagent targeted to the mitochondrial matrix, *Arch. Biochem. Biophys.*, **322**, 60-68, <https://doi.org/10.1006/abbi.1995>.
- Murphy, M. P. (1997) Selective targeting of bioactive compounds to mitochondria, *Trends Biotechnol.*, **15**, 326-330, [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(97\)01068-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(97)01068-8).
- Smith, R. A., Porteous, C. M., Coulter, C. V., and Murphy, M. P. (1999) Selective targeting of an antioxidant to mitochondria, *Eur. J. Biochem.*, **263**, 709-716, <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00543.x>.
- Zielonka, J., Joseph, J., Sikora, A., Hardy, M., Ouari, O., Vasquez-Vivar, J., Cheng, G., Lopez, M., and Kalyanaram, B. (2017) Mitochondria-targeted triphenylphosphonium-based compounds: syntheses, mechanisms of action, and therapeutic and diagnostic applications, *Chem. Rev.*, **117**, 10043-10120, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00042>.
- Skulachev, V. P. (2007) A biochemical approach to the problem of aging: “megaproject” on membrane-penetrating ions. The first results and prospects, *Biochemistry (Moscow)*, **72**, 1385-1396, <https://doi.org/10.1134/s0006297907120139>.
- Skulachev, V. P., Antonenko, Y. N., Cherepanov, D. A., Chernyak, B. V., Izyumov, D. S., Khailova, L. S., Klishin, S. S., Korshunova, G. A., Lyamzaev, K. G., Pletjushkina, O. Y., Roginsky, V. A., Rokitskaya, T. I., Severin, F. F., Severina, I. I., Simonyan, R. A., Skulachev, M. V., Sumbatyan, N. V., Sukhanova, E. I., Tashlitsky, V. N., Trendeleva, T. A., Vyssokikh, M. Y., and Zvyagilskaya, R. A. (2010) Prevention of cardiolipin oxidation and fatty acid cycling as two antioxidant mechanisms of cationic derivatives of plastoquinone (SkQs), *Biochim. Biophys. Acta*, **1797**, 878-889, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.03.015>.
- Murphy, M. P., and Smith, R. J. A. (2007) Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **47**, 629-656, <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.47.120505>.
- Cunha, F. M., Caldeira da Silva, C. C., Cerqueira, F. M., and Kowaltowski, A. J. (2011) Mild mitochondrial uncoupling as a therapeutic strategy, *Curr. Drug Targets*, **12**, 783-789, <https://doi.org/10.2174/138945011795528778>.
- Zorov, D. B., Andrianova, N. V., Babenko, V. A., Pevzner, I. B., Popkov, V. A., Zorov, S. D., Zorova, L. D., Plotnikov, E. Y., Sukhikh, G. T., and Silachev, D. N. (2021) Neuroprotective potential of mild uncoupling in mitochondria. Pros and cons, *Brain Sci.*, **11**, 1050, <https://doi.org/10.3390/brainsci11081050>.

14. Shabalina, I. G., and Nedergaard, J. (2011) Mitochondrial ('mild') uncoupling and ROS production: physiologically relevant or not? *Biochem Soc Trans.*, **39**, 1305-1309, <https://doi.org/10.1042/BST0391305>.
15. Starkov, A. A. (1997) "Mild" uncoupling of mitochondria, *Biosci. Rep.*, **17**, 273-279, <https://doi.org/10.1023/a:1027380527769>.
16. Korshunov, S. S., Skulachev, V. P., and Starkov, A. A. (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria, *FEBS Lett.*, **416**, 15-18, [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(97\)01159-9](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(97)01159-9).
17. Severin, F. F., Severina, I. I., Antonenko, Y. N., Rokitskaya, T. I., Cherepanov, D. A., Mokhova, E. N., Vyssokikh, M. Y., Pustovidko, A. V., Markova, O. V., Yaguzhinsky, L. S., Korshunova, G. A., Sumbatyan, N. V., Skulachev, M. V., and Skulachev, V. P. (2010) Penetrating cation/fatty acid anion pair as a mitochondria-targeted protonophore, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 663-668, <https://doi.org/10.1073/pnas.0910216107>.
18. Anisimov, V. N., Egorov, M. V., Krasilshchikova, M. S., Lyamzaev, K. G., Manskikh, V. N., Moshkin, M. P., Novikov, E. A., Popovich, I. G., Rogovin, K. A., Shabalina, I. G., Shekarova, O. N., Skulachev, M. V., Titova, T. V., Vygodin, V. A., Vyssokikh, M. Y., Yurova, M. N., Zabezhinsky, M. A., and Skulachev, V. P. (2011) Effects of the mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 on lifespan of rodents, *Aging*, **3**, 1110-1119.
19. Khailova, L. S., Nazarov, P. A., Sumbatyan, N. V., Korshunova, G. A., Rokitskaya, T. I., Dedukhova, V. I., Antonenko, Y. N., and Skulachev, V. P. (2015) Uncoupling and toxic action of alkyltriphenylphosphonium cations on mitochondria and the bacterium *Bacillus subtilis* as a function of alkyl chain length, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 1589-1597, <https://doi.org/10.1134/S000629791512007X>.
20. Nazarov, P. A., Osterman, I. A., Tokarchuk, A. V., Karakozova, M. V., Korshunova, G. A., Lyamzaev, K. G., Skulachev, M. V., Kotova, E. A., Skulachev, V. P., and Antonenko, Y. N. (2017) Mitochondria-targeted antioxidants as highly effective antibiotics, *Sci. Rep.*, **7**, 1394, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00802-8>.
21. Nazarov, P. A., Kotova, E. A., Skulachev, V. P., and Antonenko, Y. N. (2019) Genetic variability of the Acr-AB-TolC multidrug efflux pump underlies SkQ1 resistance in gram-negative bacteria, *Acta Naturae*, **11**, 93-98, <https://doi.org/10.32607/20758251-2019-11-4-93-98>.
22. Nazarov, P. A., Sorochkina, A. I., and Karakozova, M. V. (2020) New functional criterion for evaluation of homologous MDR pumps, *Front. Microbiol.*, **11**, 592283, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.592283>.
23. Churilov, M. N., Denisenko, Y. V., Batyushin, M. M., Bren, A. B., and Chistyakov, V. A. (2018) Prospects of SkQ1 (10-(6'-plastoquinoyl) decyltriphenylphosphonium) application for prevention of oral cavity diseases, *Rasayan J. Chem.*, **11**, 1594-1603.
24. Nazarov, P. A., Majorov, K. B., Apt, A. S., and Skulachev, M. V. (2023) Penetration of triphenylphosphonium derivatives through the cell envelope of bacteria of *Mycobacteriales* order, *Pharmaceuticals (Basel)*, **16**, 688, <https://doi.org/10.3390/ph16050688>.
25. Nazarov, P. A., Kirsanov, R. S., Denisov, S. S., Khailova, L. S., Karakozova, M. V., Lyamzaev, K. G., Korshunova, G. A., Lukyanov, K. A., Kotova, E. A., and Antonenko, Y. N. (2020) Fluorescein derivatives as antibacterial agents acting via membrane depolarization, *Biomolecules*, **10**, 309, <https://doi.org/10.3390/biom10020309>.
26. Pavlova, J. A., Khairullina, Z. Z., Tereshchenkov, A. G., Nazarov, P. A., Lukianov, D. A., Volynkina, I. A., Skvortsov, D. A., Makarov, G. I., Abad, E., Murayama, S. Y., Kajiwara, S., Paleskava, A., Konevega, A. L., Antonenko, Y. N., Lyakhovich, A., Osterman, I. A., Bogdanov, A. A., and Sumbatyan, N. V. (2021) Triphenylphosphonium analogs of chloramphenicol as dual-acting antimicrobial and antiproliferating agents, *Antibiotics (Basel)*, **10**, 489, <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050489>.
27. Antonenko, Y. N., Avetisyan, A. V., Bakeeva, L. E., Chernyak, B. V., Chertkov, V. A., Domnina, L. V., Ivanova, O. Y., Izyumov, D. S., Khailova, L. S., Klishin, S. S., Korshunova, G. A., Lyamzaev, K. G., Muntyan, M. S., Nepryakhina, O. K., Pashkovskaya, A. A., Pletjushkina, O. Y., Pustovidko, A. V., Roginsky, V. A., Rokitskaya, T. I., Ruuge, E. K., Saprunova, V. B., Severina, I. I., Simonyan, R. A., Skulachev, I. V., Skulachev, M. V., Sumbatyan, N. V., Sviryaeva, I. V., Tashlitsky, V. N., Vassiliev, J. M., Vyssokikh, M. Y., Yaguzhinsky, L. S., Zamyatnin, A. A. Jr., and Skulachev, V. P. (2008) Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 1. Cationic plastoquinone derivatives: synthesis and *in vitro* studies, *Biochemistry (Moscow)*, **73**, 1273-1287, <https://doi.org/10.1134/s0006297908120018>.
28. Korshunova, G. A., Shishkina, A. V., and Skulachev, M. V. (2017) Design, synthesis, and some aspects of the biological activity of mitochondria-targeted antioxidants, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 760-777, <https://doi.org/10.1134/S0006297917070021>.
29. Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., et al. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection, *Mol. Syst. Biol.*, **2**, 2006.0008, <https://doi.org/10.1038/msb4100050>.
30. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2012) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, 9th ed.; CLSI Document M07-A9, Approved Standard; CLSI: Wayne, PA, USA; Vol. 32, URL: https://clsi.org/media/1928/m07ed11_sample.pdf.

31. Eshboev, F., Karakozova, M., Abdurakhmanov, J., Bobakulov, K., Dolimov, K., Abdurashidov, A., Baymirzaev, A., Makhnyov, A., Terenteva, E., Sasmakov, S., Piyakina, G., Egamberdieva, D., Nazarov, P. A., and Azimova, S. (2023) Antimicrobial and cytotoxic activities of the secondary metabolites of endophytic fungi isolated from the medicinal plant *Hyssopus officinalis*, *Antibiotics (Basel)*, **12**, 1201, <https://doi.org/10.3390/antibiotics12071201>.
32. Alhossary, A., Handoko, S.D., Mu, Y., and Kwoh, C.K. (2015) Fast, accurate, and reliable molecular docking with QuickVina 2, *Bioinformatics*, **31**, 2214-2216, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv082>.
33. Wójcikowski, M., Zielenkiewicz, P., and Siedlecki, P. (2015) Open Drug Discovery Toolkit (ODDT): a new open-source player in the drug discovery field, *J. Cheminform.*, **7**:26, <https://doi.org/10.1186/s13321-015-0078-2>.
34. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC, URL: <https://pymol.org/2/>.
35. Nazarov, P. A. (2018) Alternatives to antibiotics: phage lytic enzymes and phage therapy, *Bull. Russ. State Med. Univ.*, **1**, 5-15 doi: 10.24075/brsmu.2018.002.
36. Pader, V., Hakim, S., Painter, K. L., Wigneshweraraj, S., Clarke, T. B., and Edwards, A. M. (2016) *Staphylococcus aureus* inactivates daptomycin by releasing membrane phospholipids, *Nat. Microbiol.*, **2**, 16194, <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.194>.
37. Temmerman, R., Vervaeren, H., Nosedá, B., Boon, N., and Verstraete, W. (2006) Necrotrophic growth of *Legionella pneumophila*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 4323-4328, <https://doi.org/10.1128/AEM.00070-06>.
38. Genrikhs, E. E., Stelmashook, E. V., Popova, O. V., Kapay, N. A., Korshunova, G. A., Sumbatyan, N. V., Skrebitsky, V. G., Skulachev, V. P., and Isaev, N. K. (2015) Mitochondria-targeted antioxidant SkQT1 decreases trauma-induced neurological deficit in rat and prevents amyloid- β -induced impairment of long-term potentiation in rat hippocampal slices, *J. Drug Target*, **23**, 347-352, <https://doi.org/10.3109/1061186X.2014.997736>.
39. Rogov, A. G., Goleva, T. N., Trendeleva, T. A., Ovchenkova, A. P., Aliverdieva, D. A., and Zvyagil'skaya, R. A. (2018) New data on effects of SkQ1 and SkQT1 on rat liver mitochondria and yeast cells, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 552-561, <https://doi.org/10.1134/S0006297918050085>.
40. Goleva, T. N., Rogov, A. G., Korshunova, G. A., Trendeleva, T. A., Mamaev, D. V., Aliverdieva, D. A., and Zvyagil'skaya, R. A. (2019) SkQThy, a novel and promising mitochondria-targeted antioxidant, *Mitochondrion*, **49**, 206-216, <https://doi.org/10.1016/j.mito.2019.09.001>.
41. Epremyan, K. K., Rogov, A.G., Goleva, T. N., Lavrushkina, S. V., Zinovkin, R. A., and Zvyagil'skaya, R. A. (2023) Altered mitochondrial morphology and Bioenergetics in a new yeast model expressing A β 42, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 900, <https://doi.org/10.3390/ijms24020900>.
42. Ereemeev, S. A., Motovilov, K. A., Volkov, E. M., and Yaguzhinsky, L. S. (2011) SkQ3: The new member of the class of membranotropic uncouplers, *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A*, **5**, 310-315, <https://doi.org/10.1134/S1990747811050047>.
43. Nazarov, P. A. (2022) MDR pumps as crossroads of resistance: antibiotics and bacteriophages, *Antibiotics (Basel)*, **11**, 734, <https://doi.org/10.3390/antibiotics11060734>.
44. Knorre, D. A., Markova, O. V., Smirnova, E. A., Karavaeva, I. E., Sokolov, S. S., and Severin, F. F. (2014) Dodecyltriphosphonium inhibits multiple drug resistance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **450**, 1481-1484, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.07.017>.
45. Nazarov, P. A., Khurulnova, S. A., Kessenikh, A. G., Novoyatlova, U. S., Kuznetsova, S. B., Bazhenov, S. V., Sorochkina, A. I., Karakozova, M. V., and Manukhov, I. V. (2023) Observation of cytotoxicity of phosphonium derivatives is explained: metabolism inhibition and adhesion alteration, *Antibiotics (Basel)*, **12**, 720, <https://doi.org/10.3390/antibiotics12040720>.

RELATIONSHIP OF CYTOTOXIC AND ANTIMICROBIAL EFFECTS OF TRIPHENYLPHOSPHONIUM CONJUGATES WITH VARIOUS QUINONE DERIVATIVES

P. A. Nazarov^{1*}, L. A. Zinovkina², A. A. Brezgunova^{1,2}, K. G. Lyamzaev^{1,3}, A. V. Golovin²,
M. V. Karakozova¹, E. A. Kotova¹, E. Yu. Plotnikov¹, R. A. Zinovkin^{1,3},
M. V. Skulachev^{1,4}, and Yu. N. Antonenko¹

¹ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; e-mail: nazarovpa@gmail.com

² Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

³ *Russian Gerontological Research and Clinical Center,
Federal State Autonomous Educational Institution of Russian National Research Medical University
named after N. I. Pirogov Ministry of Health of Russia, 129226 Moscow, Russia*

⁴ *Research Institute of Mitoengineering, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

Quinone derivatives of triphenylphosphonium have proven themselves to be effective geroprotectors and antioxidants that prevent the oxidation of cell components with the participation of active free radicals – peroxide (RO₂·), alkoxy (RO·), alkyl (R·), as well as reactive oxygen species (superoxide anion, singlet oxygen). The most studied representatives are derivatives of plastoquinone (SkQ1) and ubiquinone (MitoQ), which in addition to antioxidant properties also had a strong antibacterial effect. Other quinone derivatives based on decyltriphenylphosphonium (SkQ3, SkQT, and SkQThy) have been less studied and their antibacterial activity remains undiscovered. In this work, we investigated the antibacterial properties of quinone derivatives based on decyltriphenylphosphonium. We have shown that, as in the case of SkQ1, they are effective against various gram-positive bacteria, while they are not so effective against gram-negative bacteria. This is associated with their recognition by the main multidrug resistance pump of gram-negative bacteria AcrAB-TolC. Moreover, in the case of SkQ1 itself, there is a dependence of its action on the number of bacterial cells and the molar amount of the antibiotic itself, which distinguishes it from conventional antibiotics. At the same time, the cytotoxic effect on mammalian cells is observed in higher concentrations, which suggests the presence of a protective effect caused by the separation of the process of energy generation and transport on the cell membrane. Another possible explanation could be the different composition of multidrug-resistant (MDR) pumps. The difference in cytotoxic effects on mammalian cells may be due to different expression profiles of MDR pumps in different cell types.

Keywords: antioxidants, SkQ1, MDR pumps, AcrAB-TolC, mammalian cell cultures bacteria, cytotoxicity, antibiotic, mitochondria

МИТОЦЕНТРИЧНОСТЬ

Обзор

© 2024 Д.Б. Зоров^{1,2*}, П.А. Абрамичева¹, Н.В. Андрианова¹, В.А. Бабенко^{1,2},
Л.Д. Зорова^{1,2}, С.Д. Зоров^{1,3}, И.Б. Певзнер^{1,2}, В.А. Попков^{1,2}, Д.С. Семенович^{1,2},
Э.И. Якупова¹, Д.Н. Силачев^{1,2}, Е.Ю. Плотников^{1,2}, Г.Т. Сухих²

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

² Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии
и перинатологии им. академика В.И. Кулакова Минздрава России, 117997 Москва, Россия

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

Поступила в редакцию 29.12.2023

После доработки 19.01.2024

Принята к публикации 21.01.2024

Интерес к митохондриям в мире постоянно растет, о чем свидетельствует научная статистика, причем изучение функционирования этих органелл становится преобладающим над изучением других клеточных структур. В этом аналитическом обзоре митохондрии условно поставлены в некоторый клеточный центр, который отвечает как за производство энергии, так и за другие неэнергетические функции, без которых невозможно существование не только самой эукариотической клетки, но и всего организма. Принимая во внимание высокую полифункциональность митохондрий, такая принципиально новая схема организации функционирования клетки, включающая управление митохондриями процессами, определяющими выживание и гибель клетки, может оказаться оправданной. Учитывая то, что этот выпуск посвящен памяти В.П. Скулачева, которого можно назвать митоцентриком вследствие истории его научной деятельности, почти целиком направленной на изучение митохондрий, в данной работе рассматриваются те аспекты функционирования митохондрий, которые прямо или опосредованно были в фокусе внимания этого выдающегося ученого. Мы перечисляем все возможные из известных митохондриальных функций, включающие в себя генерацию мембранного потенциала, синтез Fe-S-кластеров, стероидных гормонов, гема, жирных кислот и CO₂. Особое внимание обращено на участие митохондрий в образовании и транспорте воды как мощного биохимического клеточного и митохондриального регулятора. Подвержена значительному анализу история исследований активных форм кислорода, которые генерируют митохондрии. В разделе «Митохондрии в центре смерти» особый акцент сделан на анализе того, какую роль и каким образом митохондрии могут играть и определять программу гибели организма (феноптоз) и вкладе, который внес в эти исследования В.П. Скулачев.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: митохондрии, клетка, организм, феноптоз, гибель, мембранный потенциал, вода, набухание, разобщение, CO₂, стероиды, гем, жирные кислоты, активные формы кислорода.

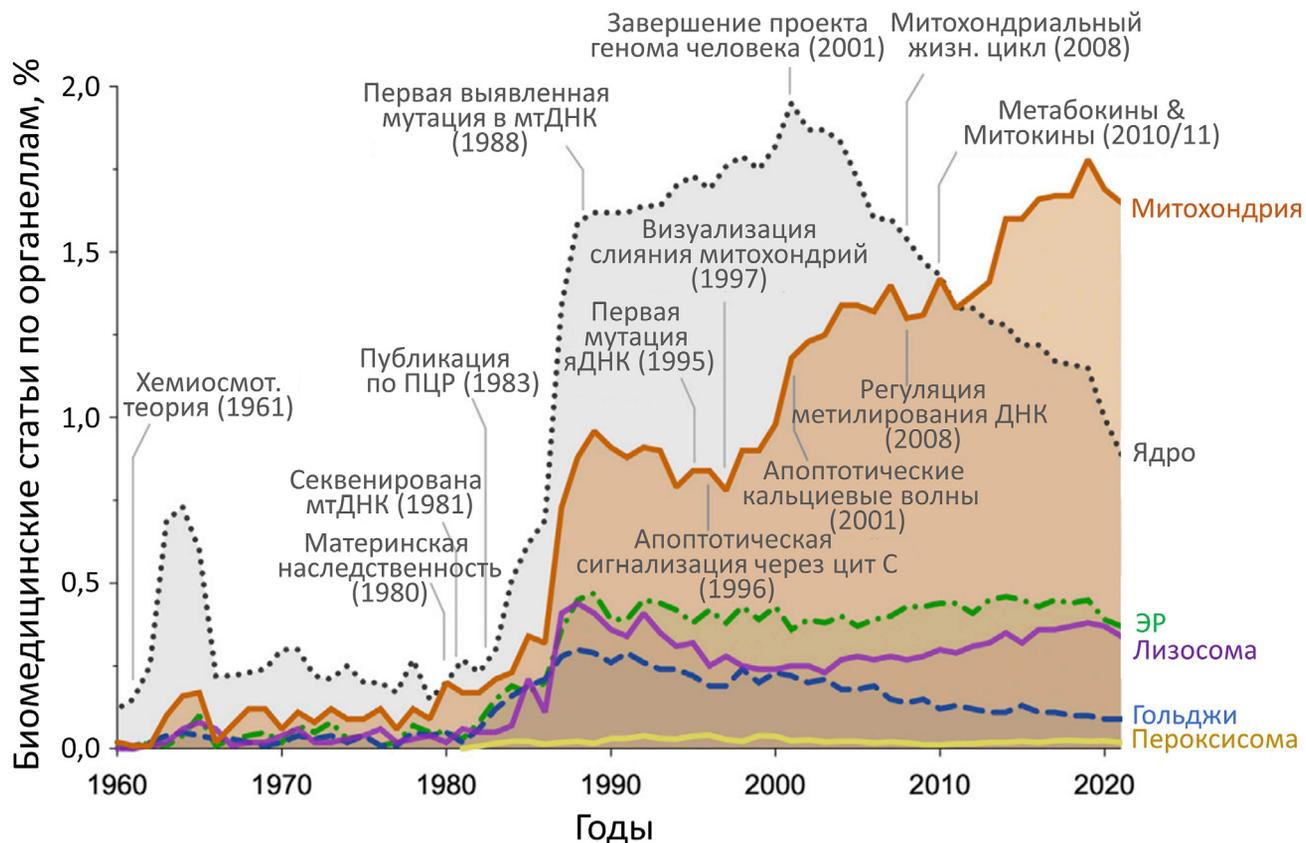
DOI: 10.31857/S0320972524020045 EDN: XNDAMJ

ВВЕДЕНИЕ

Этот выпуск посвящен памяти Владимира Петровича Скулачева, который даже после смерти был оценен как биохимик № 1 в России ([https://research.com/scientists-rankings/biology-and-](https://research.com/scientists-rankings/biology-and-biochemistry/ru)

[biochemistry/ru](https://research.com/scientists-rankings/biology-and-biochemistry/ru)). Он был биохимиком не только по образованию, но и по стилю и реализации мышления. Фундаментальное понимание хода биохимических процессов в живой клетке поставило Скулачева в ряд самых значимых научных персон в мире. Этот человек определил в центр своего научного существования изучение митохондрий. Именно поэтому наша работа получила название

* Адресат для корреспонденции.



Распределение статей медико-биологического профиля, посвященных структуре и функции различных органелл. Отметим два резких подъема публикаций, касающихся митохондрий, в 1988 и 1996 гг. после выхода в свет статей по первым идентифицированным мутациям в митохондриальной ДНК и участию в программируемой клеточной гибели соответственно. Отметим также спад числа публикаций, посвященных изучению клеточного ядра, после завершения проекта по геному человека (из обзора Picard и Shirihai [2] с разрешения)

«Митоцентричность», которое аргументированно оправдывает деяния великого ученого, посвятившего свою жизнь исследованию этой уникальной структуры.

Если начать разбирать в деталях все возможные метаболические пути, в которых митохондрии принимают участие, то размещение их в некоторый центр биологического действия выглядит оправданным [1]. Учитывая великое множество опубликованных работ, касающихся деятельности митохондрий, мы ограничиваем наше рассмотрение их ролью в двух полярных состояниях – жизни и смерти. Поэтому данную работу мы разделили на две части, одна из которых будет называться «Митохондрии в центре жизни», а другая – «Митохондрии в центре смерти», конечно же, имея в виду, что в последнем случае речь пойдет о роли митохондрий в подготовке и осуществлении терминации биологической системы, в то время как в первой части, наиболее широко раскрытой, рассматривается роль митохондрий в обеспечении жизнедеятельности этой системы. Такая схема соответствовала научным воззрениям В.П. Скулачева, и мы рассмотрим некоторые их аспекты.

Надо отметить, что постановка митохондрий в центр биологических действий носит и объективный характер, который, в частности, обусловлен тем, что из всех клеточных органелл научный интерес к ним не падает, а, скорее, возрастает, при этом интерес к изучению других органелл, во-первых, остается существенно более низким, а, во-вторых, либо почти не меняется с годами, либо показывает негативную тенденцию, как в случае исследований ядра (рисунок). На этом рисунке видно, что в 2022 г. почти в 2% всех публикаций биомедицинского плана исследовалась митохондриальная деятельность.

Можно лишь предполагать, что такой интерес вызван демонстрацией полифункциональности данной органеллы [3]. Надо отметить, что на протяжении почти всего XX века митохондрии рассматривались почти исключительно как производители энергии, и в имеющихся на то время учебниках приводилась только их биоэнергетическая функция. Перечисление и суммирование всех возможных (в частности, альтернативных биоэнергетическим) функций митохондрий было в значительной степени революционным.

В плане эволюции научного взгляда на роль митохондрий в клетке произошел переход от представления о монофункциональности этой органеллы к ее полифункциональности. Более того, все меньше в современной литературе рассматриваются энергетические аспекты митохондриальной деятельности, выводя на первый план структурно-функциональную организацию митохондрий. Надо отметить, что и в работах В.П. Скулачева, часть из которых мы обсудим позже, во времени произошел переход от рассмотрения чисто биоэнергетических аспектов митохондриальной деятельности к рассмотрению альтернативных митохондриальных функций, имеющих биомедицинское значение.

Становится понятным, что, скорее всего, митохондриальная полифункциональность объясняется происхождением митохондрий. По общему признанию, митохондрии берут начало от неких граммотрицательных бактерий, которые по определению должны быть полифункциональны, что определяет самодостаточность, необходимую для выживания во внешней среде, характеризующейся значительным химическим и физическим разнообразием и непостоянством.

Перенос бактерий в некий эукариотический прототип, внутренняя среда которого характеризуется относительно гарантированным однообразием состава и условий, сопровождался утратой ряда присущих бактериям функций. В частности, произошла потеря жгутика, необходимого для перемещения, и был приобретен ряд нехарактерных для бактерии свойств (например, обретение термогенной функции). Митохондрии в процессе эволюции приобрели транслокатор адениновых нуклеотидов (АНТ), существование которого в бактериях было бы не просто бессмысленным, а фатальным, ибо весь синтезируемый в клетке АТФ уходил бы в безразмерное пространство. Если справедлива точка зрения бактериального происхождения митохондрий, то становится понятным некоторый кажущийся антагонизм митохондрий и остальных элементов клетки, о чем пойдет речь в дальнейшем.

МИТОХОНДРИИ В ЦЕНТРЕ ЖИЗНИ

Рассмотрим основные, зачастую уникальные, присущие лишь митохондриям витальные функции, при этом мы не будем останавливаться на тех аспектах, которые широко обсуждаются на научном поле. Тут же отметим, что биоэнергетическая функция митохондрий не относится к уникальным внутриклеточным функциям, ибо существует анаэробное, немитохондриальное производство энергии.

Генерация трансмембранного потенциала ионов водорода. Работа некоторых трансмембранных ферментов может сопровождаться асимметрическим разделением заряда, что, например, происходит при работе находящейся в плазматической мембране Na,K-ATPазы , осуществляющей в норме обмен 3Na^+ на 2K^+ [4], или уже упомянутого АНТ, катализирующего обмен внутримитохондриального ATP^4- на немитохондриальный ADP^{3-} [5]. Тот же принцип генерации асимметрии зарядов применим и к протонным помпам митохондрий, создающим трансмембранный потенциал ионов водорода, составной частью которого является электрический потенциал на внутренней мембране митохондрий (минус внутри). Мы неоднократно указывали на крайнюю важность мембранного потенциала митохондрий, явно не ограниченную лишь обеспечением за счет него синтеза АТФ в АТФ-синтазном комплексе [6]. Не будет лишним еще раз отметить, что даже в критических условиях, когда генерация мембранного потенциала за счет работы протонных помп исключена (например, в условиях гипоксии), митохондрия использует для его создания либо обращенную АТФ-синтазную систему (митохондриальную АТФазу в составе комплекса V) [7], либо сопряженную активацию фумаратредуктазного пути [8, 9]. Обеспечение поддержки мембранного потенциала в неблагоприятных для окислительного фосфорилирования условиях, т.е. в условиях неоптимальной энергетики, внешне кажется неоправданным, непонятным и условно эгоистичным. Однако мы предполагаем, что определяющую роль играет необходимость сохранения высокого качества митохондрий, контроль за которым требует мембранного потенциала, при помощи которого происходит отбор малофункциональных митохондрий [10]. Критерием этого высокого качества является высокий мембранный потенциал митохондрий.

Обязательное требование мембранного потенциала для транспорта в митохондрии белков [11], а они в основной своей части синтезируются вне митохондрий, также может по крайней мере частично объяснить требование необходимости наличия мембранного потенциала для общего существования как самой митохондрии, так и клетки. Показательно, что гомеостаз митохондриального мембранного потенциала – пререквизит здорового существования митохондрии и клетки-хозяина, и те митохондрии, которые не отвечают этому требованию, подлежат утилизации в процессе митофагии [10].

Мембранный потенциал является движущей силой транспорта катионов, в частности ионов кальция, играющих крайне важную роль в регуляции метаболизма митохондрии и клетки [6]. Именно в основном за счет накопления

в митохондриях Ca^{2+} через электрогенный Ca^{2+} -унипортер митохондрии рассматриваются как внутриклеточный буфер ионов кальция, наравне с эндоплазматическим ретикулумом [12, 13].

Количественное определение мембранного потенциала в митохондриях требует проведения разного рода контролей, при этом наиболее широко применяемым подходом является использование проникающих катионов, которые давно получили название «Скулачев-ионы», отдавая должное изобретателю этого подхода [14, 15]. В подразделе, посвященном генерации активных форм кислорода (АФК) в митохондриях, мы будем говорить о роли гомеостаза мембранного потенциала в поддержании гомеостаза АФК, как одном из самых значимых открытий В.П. Скулачева.

Синтез железосерных кластеров. Железосерные соединения являются обязательным компонентом биологической системы [16]. Возможно, они являются самыми древними прямыми предшественниками жизни – по крайней мере так утверждает Wächtershäuser [17, 18], выдвинувший гипотезу о том, что ранняя жизнь сформировалась на поверхности минералов, содержащих сульфид железа.

Железосерные кластеры являются универсальными белковыми простетическими группами с разными стехиометрическими соотношениями атомов железа и серы и выполняют множество функций в биологических системах. Чаще всего они участвуют в многообразных редокс-реакциях, при этом известно их участие в электронном транспорте, биогенезе рибосом, репликации и репарации ДНК, транскрипции, трансляции и ряде других процессов [1]. Предполагается, что сборка Fe-S-кластера была существенной причиной возникновения митохондрии как эндосимбионта [19, 20], поскольку синтез кластеров Fe-S необходим для выживания эукариотических клеток [21–23].

Синтез стероидных гормонов. Митохондрии обеспечивают синтез одних из самых мощных клеточных регуляторов, а именно стероидных гормонов, за счет расщепления боковой цепи холестерина, происходящего с участием одной из изоформ цитохрома P450 (P450_{ssc}). Этот процесс имеет место в стероидогенных клетках надпочечников, гонад, плаценте и мозге [24]. Важную роль в этом процессе играет так называемый «периферический» бензодиазепиновый рецептор (в современной классификации – обогащенный триптофаном сенсорный белок (tryptophan-rich-sensory protein, TSPO)), находящийся во внешней митохондриальной мембране, который гомологичен белку CrtK, являющемуся кислородным сенсором в клетках бактерий *Rhodobacter* [25, 26].

Генерация CO_2 . Углекислый газ (CO_2) образуется в матриксе митохондрий в цикле Кребса

из изоцитрата и α -кетоглутарата, образуя в воде угольную кислоту, диссоциирующую с образованием протона и карбонатного аниона. Надо отдавать отчет, что чем выше активность цикла Кребса (и, соответственно, выше скорость дыхания), тем больше образуется CO_2 и тем больше вероятность закисления матрикса митохондрий (подробнее см. в работе Zorov et al. [27]). Кроме того, что карбонат играет очень важную роль в гомеостазе клеточного pH, он несет важные сигнальные функции [27–33].

Синтез гема. Одним из самых важных компонентов редокс-реакций является гем, входящий в состав гематопорфиринов, который синтезируется в матриксе митохондрий с обеспечением промежуточных реакций в цитозоле [34–36].

Стартовым субстратом каскада синтеза гема является сукцинил-КоА, а конечным продуктом – протопорфирин IX, в состав которого фермент феррохелатаза вводит ионы железа, завершая синтез железопроизводных гема, частными представителями которых являются цитохромы и гемо- и миоглобин. Учитывая высокое валовое содержание железопроизводных гема у высших животных, они являются важным резервуаром кислорода и железа в организме.

Синтез и утилизация жирных кислот. В своих работах В.П. Скулачев уделял значительное внимание взаимоотношению митохондрий и длинноцепочечных жирных кислот. Надо всегда иметь в виду при любом рассмотрении генеральных медицинских вопросов, например, связанных с проблемой ожирения, что как синтез, так и β -окисление жирных кислот протекают в митохондриях [37]. Необходимо также понимать, что синтез жирных кислот стартует с ацетил-КоА, при этом синтез конкурирует с неэнзиматическим процессом ацетилирования биологических компонентов, в результате чего синтез жирных кислот в какой-то мере препятствует накоплению ацетил-КоА и, соответственно, гиперацилированию. То же самое касается и процесса окисления жирных кислот, активность которого может серьезно влиять на уровень ацетил- и других жирных производных КоА и косвенно и прямо влиять на процесс ацилирования, способствуя энзиматической и неэнзиматической модификации биологических структур.

В своих многочисленных исследованиях В.П. Скулачев указывал, что уровень жирных кислот в клетке в значительной мере будет определять эффективность митохондриальной энергопродукции, учитывая тот факт, что жирные кислоты являются разобщителями окислительно-го фосфорилирования [38–41].

Образование и перераспределение воды. В этом подразделе мы хотим достаточно подробно коснуться вопроса, который в научной среде

ставится крайне редко, а именно вопроса образования воды в клетке как одной из важных регуляторных митохондриальных функций. Хотя обычно о митохондриальной деятельности в большинстве случаев судят по уровню потребления кислорода, мы хотим обратить внимание на то, что митохондрии потребляют основную часть поглощенного клетками кислорода, в основном сопряженного с образованием воды и двуокиси углерода, и это есть крайне важная митохондриальная функция.

Поверхностно кажется, что необходимость поддержания гомеостаза воды не является очень важной проблемой, однако это не так, ибо отеки органов (прежде всего, легких или мозга) в конечном плане – первопричина гибели организма, хотя и отеки не являются прямым следствием дисфункции митохондрий. Поэтому мы рассмотрим некоторые аспекты образования и перераспределения воды в клетке.

Вся потребляемая пища в результате ее утилизации организмом превращается в воду и углекислый газ (позже, при рассмотрении функционирования митохондрий в процессе детоксикации, мы обсудим судьбу азотистых соединений, что дополнит весь набор продуктов, образующихся в результате утилизации пищи). Итак, основным продуктом окисления восстановленных эквивалентов в результате функционирования дыхательной цепи является вода, которая образуется в активном центре цитохромоксидазы, обращенном в межмембранное пространство (т.е. в сторону цитозоля) [42]. Однако надо признать, что расчет образования воды исключительно за счет потребляемого кислорода не очень корректен, поскольку часть потребляемого кислорода, хотя бы временно, используется для образования окисленных липидов, белков и нуклеиновых кислот, что особенно важно в условиях окислительного стресса.

Генерация воды из 2H^+ , образующихся в результате работы протонных насосов, и атома кислорода, получившего два электрона от цитохромоксидазы, является реакцией первого порядка по кислороду. Поэтому, уровень последнего будет определять поток воды, образующейся в митохондриях. Это означает, что чем выше скорость дыхания (сопряженного или несопряженного с синтезом АТФ), тем выше продукция воды, а при разобщенном дыхании скорость образования воды будет значительно выше, чем в сопряженной системе. Это также означает, что разобщение окислительного фосфорилирования приведет к достаточно сильной генерации воды в митохондрии, вызывающей необходимость ее устранения из митохондрии, а потом и клетки, чтобы предотвратить отек митохондрии и клетки. С другой стороны, надо осознать, что в условиях гипоксии (физической или химической, вызванной ингиби-

торами компонентов дыхательной цепи, в первую очередь цитохромоксидазы, например, монооксидами углерода или азота) скорость образования воды в митохондриях за счет окисления будет ниже, чем при нормоксии.

В то же время отметим, что химическая реакция синтеза АТФ из АДФ и P_i также сопряжена с образованием воды, и оно будет тем выше, чем выше скорость синтеза АТФ, который происходит в активном центре АТФ-синтазы, обращенном в сторону матрикса митохондрий. Таким образом, нетрудно заметить, что в митохондриях в зависимости от внутренних потребностей и факторов внешней среды происходят процессы образования и использования воды, связанные с энергетикой, которые требуют поддержания некоторого оптимального водного гомеостаза для решения конкретных задач энергетики, в конечном счете выражающихся в проблеме поддержания соотношения доставки и расходов (supply-demand problem) [43–46]. Учитывая, что основные энергетические процессы происходят во внутренней мембране и матриксе митохондрий, становится ясно, что степень увлажнения матрикса имеет решающее значение и является одним из ключевых факторов регуляции энергетики митохондрий. Заметим, что энергозависимые структурные переходы в митохондриях, сопровождающиеся изменением их объема, были предметом исследований Скулачева в 70-х гг. прошлого века [47, 48].

При сопоставлении электронно-микроскопических данных с таковыми, полученными при анализе светорассеяния суспензии изолированных митохондрий, были предложены альтернативные возможности либо высыхания матрикса (так называемая конденсация, наблюдаемая как в состоянии 3 по Чансу, так и на первой стадии разобщения) [48, 49–53], либо его резкое обводнение. Последнее (ранее мы это состояние назвали митохондриальным отеком) именуется высокоамплитудным набуханием [54] и обычно является индикатором наступления точки невозврата в результате индукции неспецифической проницаемости с последующим высвобождением из митохондрий проапоптотических факторов, приближающих гибель клеток [55, 56]. Именно в диапазоне между этими полярными состояниями в клетке происходят структурные перестройки в митохондриях, сопряженные либо с мобилизацией, либо с угнетением энергетического обмена.

История изучения транспорта воды в митохондриях многолетняя, но ее нельзя признать успешной. Эта тематика была предметом изучения классиков биоэнергетики, в том числе Lehninger [57], Green et al. [58] и Hackenbrock [49, 59]. Неудача во многом была вызвана тем, что митохондрии были признаны несовершенными осмометрами [60, 61],

и описанные факты распределения воды в митохондриях не укладывались в законы распределения в соответствии с осмотическими и онкотическими силами.

По расчетам Srere [62], митохондриальная вода может существовать в квазикристаллической фазе и, учитывая очень высокую концентрацию ионов, малых и крупных белковых молекул и нуклеиновых кислот в цитозоле или матриксе митохондрий, в принципе каждую молекулу, в частности макромолекулу, можно рассматривать как краудер с последующим применением принципа молекулярного краудинга к состоянию воды вокруг этих белков и на расстоянии [63]. Расчеты показывают достаточно большой вклад недоступной воды в ее общую концентрацию, что значительно затрудняет определение доступной, т.е. метаболически активной воды, поскольку рассмотрение всей воды как объемной фазы не оправдано. Как отметил Garlid [61], продемонстрировавший распределение незаряженных веществ по двум фазам воды в митохондриальном матриксе, одна из этих фаз была осмотически неактивна и имела более или менее постоянный объем, определяемый гидратацией, а другая была осмотически активна, и ее можно назвать объемной водой. Осмотически неактивный отсек отличается от объемной воды своими растворяющими свойствами, так что некоторые растворенные вещества исключаются, а некоторые – предпочтительно растворяются.

Объемные перестройки, происходящие в митохондриях при изменении физиологической нагрузки, меняют характер молекулярного краудинга, в частности для хорошо разработанной модели изменения конформации нуклеиновой кислоты в зависимости от ряда факторов внешней среды, к которым относятся изменение характера водородных связей, стэкинг-взаимодействие оснований, изменение конформационной энтропии, изменение концентрации окружающих противоионов и степени гидратации [63]. В целом, все эти принципы могут быть применены к молекулярному краудингу белковых молекул [62–66]. Это необходимо учитывать не только для оценки доступной воды, определяющей структуру и функцию белков в природной среде с высокой концентрацией макромолекул, которая может сильно зависеть от разбавления, но и для интерпретации данных в условиях изучения поведения изолированных митохондрий *in vitro* при обычном использовании разбавленных растворов в качестве инкубационной среды. Сообщалось, что митохондриальный матрикс содержит 0,272 мкл/мг воды (из общего количества – 0,555 мкл/мг), которая не реагирует на осмотические силы, а это означает, что почти половина воды в матриксе связана и осмотически неактивна [67].

Данные релаксации ЯМР для 20%-ного раствора белка дали три различных значения: 10^{-12} , 10^{-9} и 10^{-3} , которые были объяснены существованием трех типов воды (тип I – вода в объемной фазе; тип II – связанная вода; тип III – не возвращающаяся связанная вода) [68], и эти значения можно применить к оценкам состояния воды в биологических образцах. В то время как 20% белка содержат около 90% воды I типа, 10% воды II типа и около 0,1% воды III типа, 50%-ный раствор белка (что близко к содержанию белка в митохондриальном матриксе) содержит 15–30% связанной воды (тип II). Для двух типов связанной воды характерна упорядоченность (структуризация) в зависимости от расстояния до межфазы, в отличие от объемной воды, которая не упорядочена и в которой протекают преимущественно метаболические процессы [68, 69]. Все эти расчеты и предположения демонстрируют важность даже небольших изменений объема, тесно связанных с процентом метаболически активной воды, способной перемещаться в митохондриях и клетке, в отличие от «аномальной» (используя терминологию Garlid [61]), т.е. осмотически неактивной, связанной воды.

Вещества, вызывающие умеренное набухание митохондрий (Ное694, Diazoxide, DUDLE и др.) приводили к увеличению объема митохондрий кардиомиоцитов всего на несколько процентов (до 5%), а скорость дыхания этих клеток возрастала на 1/3 [70]. Если принять во внимание данные Srere [71], что объем воды в митохондриальном матриксе составляет менее половины общего объема матрикса (остальную часть занимают белки), в котором неизвестна доля метаболической воды, то даже если предположить, что весь пул представляет собой метаболическую воду, объем матрикса в этом случае увеличивается кратно этим экспериментально полученным несколькими процентами, что эквивалентно весьма значительному изменению объема матрикса. Если это так, то в результате такого малого изменения объема матрикса митохондрий активность цикла Кребса, одного из основных элементов биоэнергетики митохондрий, может резко измениться [72–74]. Это говорит о наличии нелинейных взаимоотношений между степенью генерации и поступления воды в митохондрию и изменениями энергопродукции.

Целый ряд физических и связанных с ними биохимических факторов специфически меняются при изменении объема матрикса и окружающих мембран. Мы можем назвать лишь некоторые из них.

1. Изменения в компартиментализации матриксных белков, приводящие к образованию и распаду суперкомплексов [67, 75–79].

2. Концентрация или разбавление метаболитов, кофакторов и ингибиторов эндогенных ферментов [80, 81].

3. Изменение кривизны липидов, расположенных в изгибах митохондриальных крист, которое приводит к изменению олигомеризации мембранных белков и их кинетических констант [67, 80–83].

4. Изменения активности протеинкиназ [84].

Однако следует отметить, что большинство расчетов параметров воды в митохондриях относятся к изолированным митохондриям, конфигурация которых (сильно расширенное межмембранное пространство и сжатый матрикс) отличается от конфигурации митохондрий *in situ* (расширенный матрикс и узкое внутрикристное и межмембранное пространство), из-за чего расчеты изменений объема митохондриального матрикса очень трудно осуществить.

Неспособность провести различие между резервуарами воды в клетке и митохондриях, в то время как эти резервуары по-разному участвуют в транспорте и катализе, и, с другой стороны, несоответствие конфигураций митохондрий в условиях *in vitro* и *in situ* стало предметом глубокого разочарования и привело к замедлению некоторых исследований в этой области. Учитывая описанную выше большую сложность интерпретации механизмов изменения объема митохондрий и связанного с этим метаболизма, возник ряд предположений об активном транспорте воды в митохондриальный матрикс, поддерживаемом определенными сократительными белками, находящимися внутри или прикрепленных снаружи митохондрий [85, 86]. Например, Lehninger [57], изучая механизмы набухания и сокращения митохондрий, выявил в митохондриях недиалируемый термолабильный фактор (фактор сокращения, С-фактор), который высвобождается из митохондрий, инкубированных в среде с восстановленным глутатионом (также он высвобождается при обработке митохондрий ультразвуком). Добавление этого фактора к суспензии набухших митохондрий в присутствии восстановленного глутатиона и АТФ вызывало их сокращение. Однако были веские аргументы в пользу исключения такой возможности, основанные на том, что энергии, необходимой для откачки воды из матрикса, потребуется гораздо больше, чем может быть получено в процессе метаболизма [87]. Были предложены альтернативные механизмы, в частности, сочетающие иммобилизацию растворенных веществ в матриксе и участие внутреннего гидростатического давления для компенсации влияния осмотического давления [87]. Другие потенциальные элементы, участвующие в нарушении осмотических законов перераспределения воды в матриксе, были названы структурными элементами матрикса, которые позволяют организовать достаточно жесткий внутримитохондриальный скелет, не допускающий резких изменений объема без их разрушения.

Это подтверждается многими примерами локального, а не глобального набухания матрикса (что опять же подкрепляет утверждение, что митохондрия не представляет собой идеальный осмометр) [88], а также ранними данными о наличии некоторых элементов интрамитохондриального скелета, полученными в электронно-микроскопических экспериментах [89]. Приведенное выше довольно пространное обсуждение движения воды между митохондриальным матриксом и цитозолем не дает ответа на вопрос: по какому маршруту вода поступает в митохондрию и выходит из нее, и если их много, то какие из маршрутов обеспечивают основное движение воды.

Недавно был описан новый тип митохондриальной биоэнергетики, в результате которого, благодаря преобладанию ионов калия в цитозоле над ионами водорода, синтез АТФ митохондриальной АТФ-синтазой может быть обеспечен путем переноса ионов калия в комплексе АТФ-синтазы из цитозоля в матрикс [90, 91]. Сопряженный с работой АТФ-синтазного комплекса, перенос осмотически активного иона калия теоретически также может быть сопряжен с переносом воды в матрикс митохондрий. Сделано предположение, что таким образом молекулы воды могут транспортироваться в матрикс, внося определенный вклад в общее содержание воды в митохондриальном матриксе. Есть по крайней мере два обстоятельства, подтверждающие этот постулат. Во-первых, рентгеноструктурный анализ АТФ-синтазного комплекса выявил молекулы воды в с-субъединице АТФ-синтазы, которые могут участвовать в транспорте как протонов, так и ионов калия [92, 93], и, во-вторых, были описаны общие механизмы совместного транспорта ионов и воды по малым каналам [94–98]. Оценка влияния каждого компонента, способного переносить воду в митохондрию и наружу, будет непосредственно связана с выявлением механизма адаптации к энергетическим нагрузкам биологической системы, чтобы обеспечить баланс между энергообеспечением и энергетическими потребностями.

Генерация активных форм кислорода. Можно согласиться, что одним из самых крупных достижений Скулачева было открытие совместно с Е.А. Либерманом так называемых «Скулачев-ионов» [14], однако сам он был ярким апологетом роли АФК в жизнедеятельности биологических систем и ставил эту часть науки для себя на первое место.

Первая работа на эту тему была опубликована Скулачевым в 1995 г. в российском журнале «Молекулярная биология» [99], и в ней предполагалось, что нефосфорилирующее окисление гарантирует малую вероятность образования АФК в митохондриях. Идея была внешне очень проста – при движении электрона по дыхательной цепи (или по

любой другой цепи, даже не сопряженной с конечным потреблением кислорода (цитохромоксидазой), чем быстрее бежит электрон, тем меньше вероятность того, что на полпути до конечного потребителя этот электрон получит молекулу свободного кислорода, в конечном счете образуя анион супероксида. Понятно, что в узких местах, где реально наличие достаточно высоких уровней стационарного восстановления промежуточных компонентов цепи переноса электронов, эта вероятность резко возрастает, из чего следует рекомендация минимизировать наличие «узких» мест, чтобы не допустить нежелательную утечку электронов на кислород. Эти узкие места в терминологии одного из отцов-основателей мировой биоэнергетики Chance [100] были названы «точками перекреста», и, если у соседних компонентов цепи переноса один восстановлен, а другой – окислен, это означает, что коммуникация между компонентами затруднена, и эта пара переносчиков отражает лимитирующую стадию в цепи переноса электронов. В итоге именно в этих точках перекреста были локализованы три локуса контроля фосфорилирования ADP, определяющие механизм дыхательного контроля. При его отсутствии (в случае разобщения окислительного фосфорилирования) со стороны синтеза АТФ узкие места в дыхательной цепи исчезают, и генерация АФК в этих узких местах становится минимальной.

Позже эта идея была генерализована и стала основным руководством для работ Скулачева, проповедующих необходимость борьбы с избыточной генерацией АФК [101]. Надо отметить, что в самом начале она была достаточно экстремальной и трактовала как патогенную любую генерацию АФК, кроме той, которая участвует в антипатогенной защите, образуемой NADPH-оксидазой и принимающей участие в фагоцитозе [102]. Митохондрии были объявлены «самым грязным местом в клетке», которое надо очистить от АФК, вызывающих окислительные изменения, включая возрастные повреждения [103]. Впоследствии наступательный тон был смягчен на основании понимания того, что АФК, кроме патогенной роли, играют и важную сигнальную роль [104].

Одними из самых первых фундаментальных работ, представивших смысл и опасность генерации АФК в живой системе, были статьи, опубликованные в 40–50-х гг. прошлого столетия [105, 106]. Уже тогда были сформулированы принципы работы антиоксидантов с предложением их практического использования для защиты от окислительного повреждения. В 1956 г. Harman [107] выдвигает гипотезу о главенствующей роли АФК в процессе старения, которая звучит как свободнорадикальная (иногда используется неправильное определение: митохондриальная) теория старения. Эта теория

стала составной частью более глобальной сетевой теории старения, в соответствии с которой косвенно старение контролируется сетью клеточных и молекулярных защитных механизмов, включая различные антистрессовые реакции [108] с более поздним развитием и выделением воспалительной теории старения [109–113]. Свободнорадикальная и воспалительная теории старения переключаются на почве роли митохондрий в старении: в первой митохондрии считаются основным местом организации окислительного стресса, а согласно второй, митохондрии являются ключевым местом организации воспалительного начала [114, 115].

Саморегуляция производства АФК и энергетического обмена. Митохондрии были объявлены генераторами и внутренними регуляторами уровня АФК в клетке [116]. Что касается генерации АФК, то часто можно услышать, что митохондрии являются основным генератором АФК в клетке. Однако это не так, и, хотя митохондрии и являются мощным производителем АФК, они не являются главными их генераторами. Это заблуждение было развеяно группой Chance [117] с полным описанием вклада всех клеточных компонентов в генерацию АФК, среди которых пероксисомы занимают верхнюю строчку списка.

Надо отметить, что самой цитируемой работой В.П. Скулачева было установление нелинейной связи между величиной мембранного потенциала и генерацией АФК в митохондриях [118]. Это заставило Скулачева прийти к выводу о необходимости мягкого разобщения окислительного фосфорилирования для предотвращения гиперполяризации митохондрий, чреватой нежелательной гиперпродукцией АФК [15, 39, 40, 119–121].

Детоксикация. Обычно функцию детоксикации, реализуемую в митохондриях, ограничивают синтезом мочевины, как процесса устранения из биологической системы продуктов распада азотистых соединений. Две начальные стадии цикла мочевины (также называемого как орнитинный цикл) протекают в матриксе митохондрий, и завершается цикл реакциями, протекающими в цитоплазме. Основным источником азотистых оснований является продукт дезаминирования, аммиак, который в конечном виде преобразуется в выводящуюся из организма мочевину, в значительной мере служащую индикатором степени нормального почечного функционирования. Однако можно рассматривать процесс детоксикации более широко, включая в список удаления нежелательных агентов биологически активные вещества, которые должны выполнять свою функцию в определенном интервале малых концентраций, не допуская их превышений. Любое превышение концентрации активных веществ может быть чревато ситуациями, приводящими

к возникновению патологий. В качестве простого примера можно рассмотреть молекулы внеклеточного глутамата, играющего в мозге роль нейромедиатора, но лишь в допустимо низких концентрациях. Превышение этих концентраций *вне* клеток токсично (эксайтотоксично) для нейронов, приводя к их гибели с характерной ассоциацией с неспецифической проницаемостью митохондрий [122]. Отметим, что уровень глутамата в значительной степени регулируется митохондриями, а именно их кетоглутаратдегидрогеназой [123], т.е. продукция глутамата происходит *внутри* клеток.

Кстати, применить принцип детоксикации можно к упомянутой выше регуляции митохондриями уровня жирных кислот в клетке, которые, с одной стороны, могут быть разобщителями окислительного фосфорилирования, а с другой – субстратами окисления.

Есть точка зрения, что митохондрии возникли с появлением на земле кислорода, обладающего достаточно серьезной и плохо регулируемой окислительной способностью, в результате которой клеточные компоненты могли быть окислены, что является нежелательным. Логически рассуждая, для ограничения такого нежелательного процесса достаточно понижения внутриклеточной концентрации кислорода, а митохондрии как раз и могли выполнять эту функцию. Таким образом, митохондриальная окислительная деятельность может быть рассмотрена как частный случай процесса детоксикации, и по отношению к кислороду митохондрии могут быть рассмотрены как тонкие регуляторы его концентрации в соответствии со сродством к кислороду митохондриальной цитохромоксидазы. То же самое можно отнести и к АФК, уровень которых в клетке регулируется митохондриальной деятельностью, тонко осуществляя равновесие между необходимым производством АФК и их устранением, в частности, за счет каталазы [124], митохондриальной супероксиддисмутазы [125] или пероксидаз [126–128]. Кроме ферментативных систем, регулирующих уровни внутримитохондриальных и внутриклеточных АФК, в клетке существует целый набор низкомолекулярных соединений, гасящих высокую окислительную способность АФК, которые также можно отнести к системе детоксикации. Эта часть будет кратко обсуждена в следующем подразделе, касающемся редокс-буфера в клеточной системе.

Создание внутриклеточного редокс-буфера.

Гомеостаз редокс-потенциала в клетке является одной из основ ее здорового существования, и при его нарушении, приводящем к временному или хроническому окислительному или восстановительному стрессу, возникает целый ряд патологических ситуаций. Известно, что практически все сосудистые патологии сердца, мозга и почек,

сопряженные с ишемическим воздействием, являются результатом того, что клеточные ресурсы редокс-буфера не справляются с окислительным вызовом, что приводит к окислению витальных компонентов клетки, требующему либо внутренней репарации, либо внешнего вмешательства [15, 129–131].

Как мы обсуждали выше, в клетке и в митохондриях сосредоточены большие мощности по уничтожению избыточных уровней АФК. Они включают в себя, во-первых, ферменты (супероксиддисмутазы, каталаза, пероксидазы, ферредоксин и пр.), которые призваны бороться с АФК, правда, не допуская не менее опасную ситуацию недостаточности АФК, которые являются обязательным компонентом клеточного метаболизма. Во-вторых, это малые молекулы, объединенные термином антиоксиданты, химия которых обеспечивает гашение высокой окислительной способности АФК. В литературе была дана количественная оценка [132], но она касалась валовой антиоксидантной активности без конкретного выделения вклада частных компонентов.

По-видимому, самый большой вклад в антиоксидантную активность вносят сами белки, несущие группы, способные окисляться, например их сульфидрильные группы, способные при окислении образовывать S–S-переход. Конечно же очень нежелательным является этот процесс в жизненно необходимых белковых ферментах, учитывая то, что такие переходы неминуемо будут влиять на энзиматическую активность. Видимо, эволюционным решением было создание белков, не несущих очевидных каталитических функций, но за счет массовости принимающих на себя окислительную угрозу. Скорее всего, это и является основной функцией массовых белков, таких как альбумины или структурные белки. Аналогичную роль играют и производные белков, пептиды. По общему признанию, GSH является самым важным представителем таких пептидов, превращаясь при окислении в димер GSSG. Хотя синтез глутатиона происходит в цитоплазме, в клетке он в основном содержится в митохондриях, куда транспортируется, создавая основу митохондриального и клеточного редокс-буфера.

В митохондриях, кроме глутатиона, антиоксидантную роль может играть цитохром c, сосредоточенный в межмембранном пространстве [133] в связанном с цитохромоксидазой состоянии и в составе контактных сайтов [134, 135]. Кроме выявленной пероксидазной функции цитохрома c [136], вследствие высокой его концентрации в межмембранном пространстве массовый выход этого белка из митохондрий при пермеабиллизации внешней мембраны обеспечивает внутриклеточную концентрацию, достаточную,

чтобы считать значительным его вклад в прямую аннигиляцию АФК в клетке [137, 138]. Недавно нами была предложена гипотеза о том, что протяженные митохондриальные системы обеспечивают более или менее равномерное распределение редокс-потенциала в клетке [139]. Отметим, что на протяжении целого ряда лет в фокусе В.П. Скулачева было развитие собственной концепции о функционировании протяженных митохондриальных систем как внутриклеточных электрических кабелей [140–143].

Завершая этот раздел, в котором описаны основные жизненно необходимые функции митохондрий, хочется отметить многомерность той части функционирования митохондрий, которая обеспечивает здоровое существование клетки, из чего следует вывод о необходимости гомеостаза этих витальных функций. Мы не рассматривали участие митохондрий в процессах клеточной пролиферации, дифференцировки, термогенезе, равно как и уклонились от рассмотрения важной роли митохондриального генома, считая, что эти аспекты достаточно широко рассматривались другими исследователями, но не входили в круг исследований В.П. Скулачева и его ближайшего окружения.

МИТОХОНДРИИ В ЦЕНТРЕ СМЕРТИ

Гибель биологической системы подразумевает многоуровневость такой спецификации, затрагивающей уничтожение биологических макромолекул (микрофагия), клеточных структур (макрофагия), клеток (все типы клеточной гибели [144]) и организмов (феноптоз). Каждый механизм в этих разделах требует расширенного анализа, что не позволительно в рамках этого краткого обзора. Учитывая целевую направленность этой работы на круг интересов и работ В.П. Скулачева, мы ограничимся рассмотрением участия митохондрий в клеточной гибели и программируемой гибели организма.

Митохондриальная и клеточная гибель.

По своему названию (в переводе с греческого $\mu\acute{\iota}\tau\omicron\varsigma$ – нить и $\chi\omicron\nu\delta\rho\acute{\iota}\omicron\nu$ – зерно), митохондрии издавна рассматривались как очень лабильные структуры, существующие в виде протяженных нитей и мелких округлых структур, причем этот процесс естественно вызывал вопросы – а для чего происходит постоянная генерация мелких структур, отщепляющихся от материнского дерева? Наверное, сейчас этому уже можно найти объяснение. С большой вероятностью постоянно функционирующая цепь переноса электронов в митохондриях может сопровождаться утечкой электронов на различные нецелевые компоненты и приводить к нежелательному окислению этих компонентов. Эти окислитель-

ные повреждения могут быть репарированы или не подлежать репарации, и в последнем случае начинает развиваться сценарий удаления этих поврежденных компонентов. Кроме окисленных компонентов, нежелательными в митохондриях становятся неправильно свернутые и модифицированные другими неокислительными началами белки и другие биологические структуры, которые по невыясненному механизму начинают сегрегироваться в пределах одной митохондрии [145, 146]. Этот процесс внутримитохондриального отщепления на «правильные» и «неправильные» части завершается разделением их мембраной (септой) с последующим отделением поврежденного фрагмента и его утилизацией в машинерии митофагии. В обычных условиях количество отпочковавшихся малых фрагментов не слишком велико, но в условиях окислительного вызова *весь* митохондриом рассыпается на фрагменты [147, 148], среди которых может сохраняться лишь часть, не подлежащая уничтожению, которая в случае устранения окислительного начала начинает служить основой построения нового неиспорченного митохондриома за счет слияния с другими, мало поврежденными фрагментами. Описанная картина несколько спекулятивна, но у нее достаточно аргументов, подкрепленных разными данными. Во всей этой схеме обязательным для здоровой клетки является устранение (гибель) митохондрии, которое получило название «митоптоз». Очень важным требованием для инициации гибели митохондрий является окислительный стресс, который, как было обнаружено, может сопровождать процесс индукции в митохондриях неспецифической проницаемости. Это, в самом начале непонятное по своему принципу, явление характеризовалось индукцией во внутренней митохондриальной мембране мегаканала, который не только делает невозможным существование на ней мембранного потенциала и ионных градиентов, но и приводит к описанному выше высокоамплитудному набуханию митохондрий [149–158]. Последнее сопровождается пермеабиллизацией наружной митохондриальной мембраны или за счет вызванного набуханием ее разрыва [159], и/или за счет организации пор, образованных гетеромеризацией белка Вах [160]. Позже появилось предположение, что индукция неспецифической проницаемости митохондрий представляет собой стадию программируемой деструкции этой органеллы [161], а еще позже это явление приписали стадии достижения точки невозврата, предшествующей программируемой гибели клетки, в частности, развивающейся по механизму некроза [162]. Митохондрия является критическим элементом, определяющим собственную судьбу и судьбу клетки. Общепризнанное рассмотрение митохондрии как элемента, ответ-

ственного за принятие решения: быть или не быть клеточной системе, ставит митохондрию в центр смертельного каскада. Для запуска этого каскада митохондрия выпускает из себя ряд молекул (цитохром с, индуцирующий апоптоз фактор (AIF), про-каспаза IX и др.), которые сами по себе в отдельности, находясь внутри митохондрии, не являются смертельными, но после взаимодействия с компонентами цитоплазмы образуют комплекс [163], который является смертельным приговором для клетки. Это означает, что митохондрии по формальным признакам несут резервуары клеточных ядов, неминуемо вызывающих гибель клетки при поступлении в митохондрию соответствующих сигналов. Учитывая огромный массив великолепных обзоров на эту тему, мы ограничиваем наше обсуждение лишь вышесказанным.

Гибель организма (феноптоз). В специальных выпусках журнала «Биохимия», посвященных явлению феноптоза, и других изданиях мы неоднократно писали о ключевой роли митохондрий в этом вопросе [164–167]. Проблема феноптоза, как программируемого механизма гибели многоклеточного организма, на протяжении последней пары десятилетий была в центре внимания В.П. Скулачева, который в фокус внимания этой проблемы вводил митохондрии и генерируемые ими АФК. Примеров феноптической гибели великое множество, и с ними можно ознакомиться в работах Skulachev [168–171]. Предполагается, что феноптоз был выработан в ходе эволюции для отбраковки ненужных организмов – больных или состарившихся, т.е. всех тех, которые не могут выдержать конкуренцию со здоровыми и молодыми организмами. Выделяют два типа феноптоза. Один, вызванный стрессом, острый или быстрый феноптоз, подразумевает быстрое ухудшение состояния организма, подверженного острому стрессу. Другой тип, обусловленный возрастом, мягкий или медленный феноптоз, характеризуется медленным ухудшением состояния, заканчивающегося гибелью организма из-за наличия хронического стресса. Из этого вытекает, что старение и ассоциированные со старением болезни являются выражением феноптоза. Сам Скулачев считал, что одним из наиболее ярких доказательств участия митохондрий в программируемой гибели организма были эксперименты на модели острого феноптоза, в которых животные, получив практически смертельный приговор в результате ишемизации единственной почки животного, выживали после введения митохондриально-направленных катионных агентов [172]. Факт, что не все введенные вещества этой группы устраняли почечную недостаточность, от которой вроде бы следовало ожидать фатальный исход, но при этом все они спасали от гибели, говорил о сложной организации

инициации смертельного каскада, возможно, удаленного от таргетного органа. Это опять же свидетельствовало о том, что именно митохондрии определяют общее отравление организма и спасение последнего состоит в лечении митохондрий. Конечно же, были и другие экспериментальные доказательства правоты участия митохондрий в гибели организма [173].

Родоначальником теории программируемой смерти принято считать Weismann [173]. Однако есть точка зрения, что основные идеи программируемой смерти индивидуумов были высказаны раньше Альфредом Расселом Уоллесом в его работе «Contributions to the Theory of Natural Selection», опубликованной в 1870 г., т.е. задолго до открытия митохондрий. Мы можем смело идти назад и предположить, что идеи того, что смерть запрограммирована, были высказаны даже великим русским поэтом А.С. Пушкиным, который в 1828 г. писал:

Дар напрасный, дар случайный,
Жизнь, зачем ты мне дана?
Иль зачем судьбою тайной
Ты на казнь осуждена?

A random and a wasted gift
Is given life, I wonder why
By some and enigmatic shift
It always is condemned to die.

(перевод Д.Б. Зорова)

Гениальный поэт, которому на момент написания этих строк не было даже 30 лет, задался вопросом, почему жизнь осуждена на гибель, т.е. почему она неизбежна. Великому российскому ученому В.П. Скулачеву пришло понимание высокой степени организации смертельного процесса. Оно позволило ему предположить основу этого загадочного процесса, который ученый хотел остановить, отменить и тем самым запретить программу гибели организма, используя знания роли митохондрий в организации жизненных и смертельных процессов.

Вклад авторов. П.А. Абрамичева, Н.В. Андрианова, В.А. Бабенко, Л.Д. Зорова, С.Д. Зоров, И.Б. Певзнер, В.А. Попков, Д.С. Семенович, Э.И. Якупова, Д.Н. Силачев, Е.Ю. Плотников, Г.Т. Сухих, Д.Б. Зоров – общее обсуждение концепции, идеологии и планов построения работы; Д.Б. Зоров – написание рукописи; Л.Д. Зорова, С.Д. Зоров – редактирование и техническое оформление рукописи.

Финансирование. Поддержано государственным заданием Министерства здравоохранения РФ (№ 124013000594-1).

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. Zorov, D. B., Isaev, N. K., Plotnikov, E. Yu., Zorova, L. D., Stelmashook, E. V., Vasileva, A. K., Arkhangelskaya, A. A., and Khrjapenkova, T. G. (2007) The mitochondrion as Janus bifrons, *Biochemistry (Moscow)*, **72**, 1115-1126, <https://doi.org/10.1134/S0006297907100094>.
2. Picard, M., and Shirihai, O. S. (2022) Mitochondrial signal transduction, *Cell Metab.*, **34**, 1620-1653, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2022.10.008>.
3. Zorov, D. B., Krasnikov, B. F., Kuzminova, A. E., Vysokikh, M. Yu., and Zorova, L. D. (1997) Mitochondria Revisited. Alternative functions of mitochondria, *Biosci. Rep.*, **17**, 507-520, <https://doi.org/10.1023/A:1027304122259>.
4. Skou, J. C. (1998) The identification of the sodium pump, *Biosci. Rep.*, **18**, 155-169, <https://doi.org/10.1023/A:1020196612909>.
5. Klingenberg, M. (2008) The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, **1778**, 1978-2021, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.04.011>.
6. Zorova, L. D., Popkov, V. A., Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Pevzner, I. B., Jankauskas, S. S., Babenko, V. A., Zorov, S. D., Balakireva, A. V., Juhaszova, M., Sollott, S. J., and Zorov, D. B. (2018) Mitochondrial membrane potential, *Anal. Biochem.*, **552**, 50-59, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.07.009>.
7. Di Lisa, F., Blank, P. S., Colonna, R., Gambassi, G., Silverman, H. S., Stern, M. D., and Hansford, R. G. (1995) Mitochondrial membrane potential in single living adult rat cardiac myocytes exposed to anoxia or metabolic inhibition, *J. Physiol.*, **486 (Pt 1)**, 1-13, <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1995.sp020786>.
8. Weinberg, J. M., Venkatachalam, M. A., Roeser, N. F., and Nissim, I. (2000) Mitochondrial dysfunction during hypoxia/reoxygenation and its correction by anaerobic metabolism of citric acid cycle intermediates, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 2826-2831, <https://doi.org/10.1073/pnas.97.6.2826>.
9. Takahashi, E., and Sato, M. (2014) Anaerobic respiration sustains mitochondrial membrane potential in a prolyl hydroxylase pathway-activated cancer cell line in a hypoxic microenvironment, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **306**, C334-C342, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00255.2013>.
10. Jin, S. M., Lazarou, M., Wang, C., Kane, L. A., Narendra, D. P., and Youle, R. J. (2010) Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL, *J. Cell Biol.*, **191**, 933-942, <https://doi.org/10.1083/jcb.201008084>.
11. Mokranjac, D., and Neupert, W. (2008) Energetics of protein translocation into mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta Bioener.*, **1777**, 758-762, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.04.009>.
12. Gunter, T. E., and Pfeiffer, D. R. (1990) Mechanisms by which mitochondria transport calcium, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **258**, C755-C786, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1990.258.5.C755>.
13. Cortassa, S., Juhaszova, M., Aon, M. A., Zorov, D. B., and Sollott, S. J. (2021) Mitochondrial Ca²⁺, redox environment and ROS emission in heart failure: two sides of the same coin? *J. Mol. Cell Cardiol.*, **151**, 113-125, <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2020.11.013>.
14. Liberman, E. A., Topaly, V. P., Tsofina, L. M., Jasaitis, A. A., and Skulachev, V. P. (1969) Mechanism of coupling of oxidative phosphorylation and the membrane potential of mitochondria, *Nature*, **222**, 1076-1078, <https://doi.org/10.1038/2221076a0>.
15. Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Chupyrkina, A. A., Danshina, M. I., Jankauskas, S. S., Morosanova, M. A., Stelmashook, E. V., Vasileva, A. K., Goryacheva, E. S., Pirogov, Y. A., Isaev, N. K., and Zorov, D. B. (2010) New-generation Skulachev ions exhibiting nephroprotective and neuroprotective properties, *Biochemistry (Moscow)*, **75**, 145-150, <https://doi.org/10.1134/S0006297910020045>.
16. Johnson, D. C., Dean, D. R., Smith, A. D., and Johnson, M. K. (2005) Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters, *Annu. Rev. Biochem.*, **74**, 247-281, <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133518>.
17. Wächtershäuser, G. (1988) Before enzymes and templates: theory of surface metabolism, *Microbiol. Rev.*, **52**, 452-484, <https://doi.org/10.1128/MMBR.52.4.452-484.1988>.
18. Wächtershäuser, G. (1990) Evolution of the first metabolic cycles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 200-204, <https://doi.org/10.1073/pnas.87.1.200>.
19. Tsaousis, A. D. (2019) On the origin of iron/sulfur cluster biosynthesis in eukaryotes, *Front. Microbiol.*, **10**, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02478>.
20. Lill, R., Diekert, K., Kaut, A., Lange, H., Pelzer, W., Prohl, C., and Kispal, G. (1999) The essential role of mitochondria in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins, *Biol. Chem.*, **380**, <https://doi.org/10.1515/BC.1999.147>.

21. Braymer, J. J., and Lill, R. (2017) Iron-sulfur cluster biogenesis and trafficking in mitochondria, *J. Biol. Chem.*, **292**, 12754-12763, <https://doi.org/10.1074/jbc.R117.787101>.
22. Rouault, T. A., and Maio, N. (2017) Biogenesis and functions of mammalian iron-sulfur proteins in the regulation of iron homeostasis and pivotal metabolic pathways, *J. Biol. Chem.*, **292**, 12744-12753, <https://doi.org/10.1074/jbc.R117.789537>.
23. Peña-Díaz, P., and Lukeš, J. (2018) Fe-S cluster assembly in the supergroup Excavata, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **23**, 521-541, <https://doi.org/10.1007/s00775-018-1556-6>.
24. Miller, W. L. (2013) Steroid hormone synthesis in mitochondria, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **379**, 62-73, <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.04.014>.
25. Yeliseev, A. A., and Kaplan, S. (1995) A sensory transducer homologous to the mammalian peripheral-type benzodiazepine receptor regulates photosynthetic membrane complex formation in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1, *J. Biol. Chem.*, **270**, 21167-21175, <https://doi.org/10.1074/jbc.270.36.21167>.
26. Baker, M. E., and Fanestil, D. D. (1991) Mammalian peripheral-type benzodiazepine receptor is homologous to CrtK protein of *Rhodobacter capsulatus*, a photosynthetic bacterium, *Cell*, **65**, 721-722, [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90379-D](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90379-D).
27. Zorov, D. B., Andrianova, N. V., Babenko, V. A., Bakeeva, L. E., Zorov, S. D., Zorova, L. D., Pevsner, I. B., Popkov, V. A., Plotnikov, E. Yu., and Silachev, D. N. (2020) Nonphosphorylating oxidation in mitochondria and related processes, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 1570-1577, <https://doi.org/10.1134/S0006297920120093>.
28. Acin-Perez, R., Salazar, E., Kamenetsky, M., Buck, J., Levin, L. R., and Manfredi, G. (2009) Cyclic AMP produced inside mitochondria regulates oxidative phosphorylation, *Cell Metab.*, **9**, 265-276, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.01.012>.
29. Zeylemaker, W. P., Klaasse, A. D. M., Slater, E. C., and Veeger, C. (1970) Studies on succinate dehydrogenase. VI. Inhibition by monocarboxylic acids, *Biochim. Biophys. Acta Enzymol.*, **198**, 415-422, [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(70\)90120-8](https://doi.org/10.1016/0005-2744(70)90120-8).
30. Kasho, V. N., and Boyer, P. D. (1984) Relationships of inosine triphosphate and bicarbonate effects on F1 ATPase to the binding change mechanism, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **16**, 407-419, <https://doi.org/10.1007/BF00743235>.
31. Roveri, O. A., and Calcaterra, N. B. (1985) Steady-state kinetics of F₁-ATPase, *FEBS Lett.*, **192**, 123-127, [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(85\)80056-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(85)80056-9).
32. Lodeyro, A. F., Calcaterra, N. B., and Roveri, O. A. (2001) Inhibition of steady-state mitochondrial ATP synthesis by bicarbonate, an activating anion of ATP hydrolysis, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1506**, 236-243, [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(01\)00221-3](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(01)00221-3).
33. Khailova, L. S., Vygodina, T. V., Lomakina, G. Y., Kotova, E. A., and Antonenko, Y. N. (2020) Bicarbonate suppresses mitochondrial membrane depolarization induced by conventional uncouplers, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **530**, 29-34, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.06.131>.
34. Poňka, P., and Neuwirt, J. (1974) Haem synthesis and iron uptake by reticulocytes, *Br. J. Haematol.*, **28**, 1-5, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1974.tb06634.x>.
35. Kikuchi, G., and Hayashi, N. (1981) Regulation by heme of synthesis and intracellular translocation of δ -aminolevulinic acid synthase in the liver, *Mol. Cell Biochem.*, **37**, 27-41, <https://doi.org/10.1007/BF02355885>.
36. Azzi, A. (1984) Mitochondria: the utilization of oxygen for cell life, *Experientia*, **40**, 901-906, <https://doi.org/10.1007/BF01946437>.
37. Mead, J. F. (1963) Lipid metabolism, *Annu. Rev. Biochem.*, **32**, 241-268, <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.32.070163.001325>.
38. Severin, F. F., Severina, I. I., Antonenko, Y. N., Rokitskaya, T. I., Cherepanov, D. A., Mokhova, E. N., Vyssokikh, M. Yu., Pustovidko, A. V., Markova, O. V., Yaguzhinsky, L. S., et al. (2010) Penetrating cation/fatty acid anion pair as a mitochondria-targeted protonophore, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 663-668, <https://doi.org/10.1073/pnas.0910216107>.
39. Andreyev, A. Yu., Bondareva, T. O., Dedukhova, V. I., Mokhova, E. N., Skulachev, V. P., Tsofina, L. M., Volkov, N. I., and Vygodina, T. V. (1989) The ATP/ADP-antiporter is involved in the uncoupling effect of fatty acids on mitochondria, *Eur. J. Biochem.*, **182**, 585-592, <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1989.tb14867.x>.
40. Skulachev, V.P. (1998) Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1363**, 100-124, [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(97\)00091-1](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(97)00091-1).
41. Zorov, D. B. (1996) Mitochondrial damage as a source of diseases and aging: a strategy of how to fight these, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1275**, 10-15, [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(96\)00042-4](https://doi.org/10.1016/0005-2728(96)00042-4).
42. Schmidt, B., McCracken, J., and Ferguson-Miller, S. (2003) A discrete water exit pathway in the membrane protein cytochrome c oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 15539-15542, <https://doi.org/10.1073/pnas.2633243100>.
43. Buckberg, G. D., Fixler, D. E., Archie, J. P., and Hoffman, J. I. E. (1972) Experimental subendocardial ischemia in dogs with normal coronary arteries, *Circ. Res.*, **30**, 67-81, <https://doi.org/10.1161/01.RES.30.1.67>.

44. Hoffman, J. I. E., and Buckberg, G. D. (1978) The myocardial supply:demand ratio – a critical review, *Am. J. Cardiol.*, **41**, 327-332, [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(78\)90174-1](https://doi.org/10.1016/0002-9149(78)90174-1).
45. Newsholme, E. A., and Leech, A. R. (1983) *Biochemistry for the Medical Sciences*, Wiley, p. 952.
46. Yaniv, Y., Juhaszova, M., Nuss, H. B., Wang, S., Zorov, D. B., Lakatta, E. G., and Sollott, S. J. (2010) Matching ATP supply and demand in mammalian heart, *Ann. N Y Acad. Sci.*, **1188**, 133-142, <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05093.x>.
47. Bakeeva, L. E., Grinius, L. L., Jasaitis, A. A., Kuliene, V. V., Levitsky, D. O., Liberman, E. A., Severina, I. I., and Skulachev, V. P. (1970) Conversion of biomembrane-produced energy into electric form. II. Intact mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta*, **216**, 13-21, [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(70\)90154-4](https://doi.org/10.1016/0005-2728(70)90154-4).
48. Bakeeva, L. E., Chentsov, Y. S., Jasaitis, A. A., and Skulachev, V. P. (1972) The effect of oncotic pressure on heart muscle mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta*, **275**, 319-332, [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(72\)90213-7](https://doi.org/10.1016/0005-2728(72)90213-7).
49. Hackenbrock, C. R. (1966) Ultrastructural bases for metabolically-linked mechanical activity in mitochondria, *J. Cell. Biol.*, **30**, 269-297, <https://doi.org/10.1083/jcb.30.2.269>.
50. Harris, R. A., Penniston, J. T., Asai, J., and Green, D. E. (1986) The conformational basis of energy conservation in membrane systems. II. Correlation between conformational change and functional states, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **59**, 830-837, <https://doi.org/10.1073/pnas.59.3.830>.
51. Wrigglesworth, J. M., and Packer, L. (1968) Optical rotary dispersion and circular dichroism studies on mitochondria: correlation of ultrastructure and metabolic state with molecular conformational changes, *Arch. Biochem. Biophys.*, **128**, 790-801, [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90087-8](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90087-8).
52. Beavis, A. D., Brannan, R. D., and Garlid, K. D. (1985) Swelling and contraction of the mitochondrial matrix. I. A structural interpretation of the relationship between light scattering and matrix volume, *J. Biol. Chem.*, **260**, 13424-13433.
53. Allmann, D. W., Munroe, J., Wakabayashi, T., and Green, D. E. (1970) Studies on the transition of the cristal membrane from the orthodox to the aggregated configuration. III. Loss of coupling ability of adrenal cortex mitochondria in the orthodox configuration, *J. Bioenerg.*, **1**, 331-353, <https://doi.org/10.1007/BF01654572>.
54. Packer, L. (1963) Size and shape transformations correlated with oxidative phosphorylation in mitochondria, *J. Cell. Biol.*, **18**, 487-494, <https://doi.org/10.1083/jcb.18.3.487>.
55. Petit, P. X., Zamzami, N., Vayssière, J. L., Mignotte, B., Kroemer, G., and Castedo, M. (1997) Implication of mitochondria in apoptosis, *Mol. Cell. Biochem.*, **174**, 185-188.
56. Petit, P. X., Goubern, M., Dirolez, P., Susin, S.A., Zamzami, N., and Kroemer, G. (1998) Disruption of the outer mitochondrial membrane as a result of large amplitude swelling: the impact of irreversible permeability transition, *FEBS Lett.*, **426**, 111-116, [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00318-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00318-4).
57. Lehninger, A. L. (1962) Water uptake and extrusion by mitochondria in relation to oxidative phosphorylation, *Physiol. Rev.*, **42**, 467-517, <https://doi.org/10.1152/physrev.1962.42.3.467>.
58. Green, D. E., Asai, J., Harris, R. A., and Penniston, J. T. (1968) Conformational basis of energy transformations in membrane systems, *Arch. Biochem. Biophys.*, **125**, 684-705, [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90626-7](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90626-7).
59. Hackenbrock, C. R. (1968) Chemical and physical fixation of isolated mitochondria in low-energy and high-energy states, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **61**, 598-605, <https://doi.org/10.1073/pnas.61.2.598>.
60. Garlid, K. D. (1976) Aqueous phase structure in cells and organelles, in *Proceedings of the Cell-Associated Water*, Boston, Massachusetts, pp. 293-362.
61. Garlid, K. D. (1999) The state of water in biological systems, *Int. Rev. Cytol.*, **192**, 281-302.
62. Srere, P. A. (1981) Protein crystals as a model for mitochondrial matrix proteins, *Trends Biochem. Sci.*, **6**, 4-7, [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(81\)90003-7](https://doi.org/10.1016/0968-0004(81)90003-7).
63. Fulton, A. B. (1982) How crowded is the cytoplasm? *Cell*, **30**, 345-347, [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90231-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90231-8).
64. Takahashi, S., and Sugimoto, N. (2020) Stability prediction of canonical and non-canonical structures of nucleic acids in various molecular environments and cells, *Chem. Soc. Rev.*, **49**, 8439-8468, <https://doi.org/10.1039/D0CS00594K>.
65. Minton, A. P. (1983) The effect of volume occupancy upon the thermodynamic activity of proteins: some biochemical consequences, *Mol. Cell. Biochem.*, **55**, 119-140, <https://doi.org/10.1007/BF00673707>.
66. Minton, A. P. (1990) Holobiochemistry: the effect of local environment upon the equilibria and rates of biochemical reactions, *Int. J. Biochem.*, **22**, 1063-1067, [https://doi.org/10.1016/0020-711X\(90\)90102-9](https://doi.org/10.1016/0020-711X(90)90102-9).
67. Bentzel, C. J., and Solomon, A. K. (1967) Osmotic properties of mitochondria, *J. Gen. Physiol.*, **50**, 1547-1563, <https://doi.org/10.1085/jgp.50.6.1547>.
68. Cooke, R., and Kuntz, I. D. (1974) The properties of water in biological systems, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, **3**, 95-126, <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.03.060174.000523>.
69. Drost-Hansen, W. (1969) Structure of water near solid unterfaces, *Ind. Eng. Chem.*, **61**, 10-47, <https://doi.org/10.1021/ie50719a005>.

70. Juhaszova, M., Zorov, D. B., Kim, S. H., Pepe, S., Fu, Q., Fishbein, K. W., Ziman, B. D., Wang, S., Ytrehus, K., Antos, C. L., Olson, E. N., and Sollott, S. J. (2004) Glycogen synthase kinase-3 β mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore, *J. Clin. Invest.*, **113**, 1535-1549, <https://doi.org/10.1172/JCI19906>.
71. Srere, P. A. (1980) The infrastructure of the mitochondrial matrix, *Trends Biochem. Sci.*, **5**, 120-121, [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(80\)90051-1](https://doi.org/10.1016/0968-0004(80)90051-1).
72. Matlib, M. A., and Srere, P. A. (1976) Oxidative properties of swollen rat liver mitochondria, *Arch. Biochem. Biophys.*, **174**, 705-712, [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(76\)90401-X](https://doi.org/10.1016/0003-9861(76)90401-X).
73. Srere, P. A. (1982) The structure of the mitochondrial inner membrane-matrix compartment, *Trends Biochem. Sci.*, **7**, 375-378, [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(82\)90119-0](https://doi.org/10.1016/0968-0004(82)90119-0).
74. Srere, P. A., Mattiasson, B., and Mosbach, K. (1973) An immobilized three-enzyme system: a model for microenvironmental compartmentation in mitochondria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 2534-2538, <https://doi.org/10.1073/pnas.70.9.2534>.
75. Letts, J. A., Fiedorczuk, K., and Sazanov, L. A. (2016) The architecture of respiratory supercomplexes, *Nature*, **537**, 644-648, <https://doi.org/10.1038/nature19774>.
76. Guo, R., Zong, S., Wu, M., Gu, J., and Yang, M. (2017) Architecture of human mitochondrial respiratory megacomplex I2III2IV2, *Cell*, **170**, 1247-1257.e12, <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2017.07.050>.
77. Gu, J., Wu, M., Guo, R., Yan, K., Lei, J., Gao, N., and Yang, M. (2016) The architecture of the mammalian respirasome, *Nature*, **537**, 639-643, <https://doi.org/10.1038/nature19359>.
78. Ing, G., Hartley, A. M., Pinotsis, N., and Maréchal, A. (2022) Cryo-EM structure of a monomeric yeast *S. cerevisiae* complex IV isolated with maltosides: implications in supercomplex formation, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1863**, 148591, <https://doi.org/10.1016/J.BBABIO.2022.148591>.
79. Vercellino, I., and Sazanov, L. A. (2022) The assembly, regulation and function of the mitochondrial respiratory chain, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **23**, 141-161, <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00415-0>.
80. Bhatia, V. K., Hatzakis, N. S., and Stamou, D. (2010) A unifying mechanism accounts for sensing of membrane curvature by BAR domains, amphipathic helices and membrane-anchored proteins, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **21**, 381-390, <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.12.004>.
81. Madsen, K. L., Bhatia, V. K., Gether, U., and Stamou, D. (2010) BAR domains, amphipathic helices and membrane-anchored proteins use the same mechanism to sense membrane curvature, *FEBS Lett.*, **584**, 1848-1855, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.01.053>.
82. Drin, G., and Antonny, B. (2010) Amphipathic helices and membrane curvature, *FEBS Lett.*, **584**, 1840-1847, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.022>.
83. Ikon, N., and Ryan, R. O. (2017) Cardiolipin and mitochondrial cristae organization, *Biochim. Biophys. Acta Biomembranes*, **1859**, 1156-1163, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.03.013>.
84. Blum, T. B., Hahn, A., Meier, T., Davies, K. M., and Kühlbrandt, W. (2019) Dimers of mitochondrial ATP synthase induce membrane curvature and self-assemble into rows, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 4250-4255, <https://doi.org/10.1073/pnas.1816556116>.
85. Ohnishi, T. (1962) Extraction of actin- and myosin-like proteins from erythrocyte membrane, *J. Biochem.*, **52**, 307-308, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a127620>.
86. Neifakh, S. A., and Kazakova, T. B. (1963) Actomyosin-like protein in mitochondria of the mouse liver, *Nature*, **197**, 1106-1107, <https://doi.org/10.1038/1971106a0>.
87. Bartley, W., Dean, B., and Ferdinand, W. (1969) Maintenance of mitochondrial volume and the effects of phosphate and ATP in producing swelling and shrinking, *J. Theor. Biol.*, **24**, 192-202, [https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(69\)80045-7](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(69)80045-7).
88. Zorov, D., Vorobjev, I., Popkov, V., Babenko, V., Zorova, L., Pevzner, I., Silachev, D., Zorov, S., Andrianova, N., and Plotnikov, E. (2019) Lessons from the discovery of mitochondrial fragmentation (fission): a review and update, *Cells*, **8**, 175, <https://doi.org/10.3390/cells8020175>.
89. Pihl, E., and Bahr, G. (1970) Matrix structure of critical-point dried mitochondria, *Exp. Cell. Res.*, **63**, 391-403, [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(70\)90228-4](https://doi.org/10.1016/0014-4827(70)90228-4).
90. Juhaszova, M., Kobrinsky, E., Zorov, D. B., Nuss, H. B., Yaniv, Y., Fishbein, K. W., de Cabo, R., Montoliu, L., Gabelli, S. B., Aon, M. A., Cortassa, S., and Sollott, S. J. (2022) ATP synthase K⁺- and H⁺-fluxes drive ATP synthesis and enable mitochondrial K⁺-“uniporter” function: I. Characterization of ion fluxes, *Function*, **3**, zqab065, <https://doi.org/10.1093/function/zqab065>.
91. Juhaszova, M., Kobrinsky, E., Zorov, D. B., Nuss, H. B., Yaniv, Y., Fishbein, K. W., de Cabo, R., Montoliu, L., Gabelli, S. B., Aon, M. A., Cortassa, S., and Sollott, S. J. (2022) ATP synthase K⁺- and H⁺-fluxes drive ATP synthesis and enable mitochondrial K⁺-“uniporter” function: II. Ion and ATP synthase flux regulation, *Function*, **3**, zqac001, <https://doi.org/10.1093/function/zqac001>.

92. Sobti, M., Walshe, J. L., Wu, D., Ishmukhametov, R., Zeng, Y. C., Robinson, C. V., Berry, R. M., and Stewart, A. G. (2020) Cryo-EM structures provide insight into how *E. coli* F₁F₀ ATP synthase accommodates symmetry mismatch, *Nat. Commun.*, **11**, 2615, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16387-2>.
93. Lai, Y., Zhang, Y., Zhou, S., Xu, J., Du, Z., Feng, Z., Yu, L., Zhao, Z., Wang, W., Tang, Y., Yang, X., Guddat, L. W., Liu, F., Gao, Y., Rao, Z., and Gong, H. (2023) Structure of the human ATP synthase, *Mol. Cell*, **83**, 2137-2147.e4, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.04.029>.
94. Pfeffermann, J., and Pohl, P. (2023) Tutorial for stopped-flow water flux measurements: why a report about “ultra-fast water permeation through nanochannels with a densely fluorinated interior surface” is flawed, *Biomolecules*, **13**, 431, <https://doi.org/10.3390/biom13030431>.
95. Boytsov, D., Brescia, S., Chaves, G., Koepler, S., Hanneschlaeger, C., Siligan, C., Goessweiner-Mohr, N., Musset, B., and Pohl, P. (2023) Trapped pore waters in the open proton channel Hv1, *Small*, **19**, <https://doi.org/10.1002/sml.202205968>.
96. Pfeffermann, J., Goessweiner-Mohr, N., and Pohl, P. (2021) The energetic barrier to single-file water flow through narrow channels, *Biophys. Rev.*, **13**, 913-923, <https://doi.org/10.1007/s12551-021-00875-w>.
97. Zeuthen, T., and MacAulay, N. (2012) Transport of water against its concentration gradient: fact or fiction? *Wiley Interdiscip. Rev. Membr. Transp. Signal.*, **1**, 373-381, <https://doi.org/10.1002/wmts.54>.
98. Loo, D. D. F., Hirayama, B. A., Meinild, A., Chandy, G., Zeuthen, T., and Wright, E. M. (1999) Passive water and ion transport by cotransporters, *J. Physiol.*, **518**, 195-202, <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.0195r.x>.
99. Скулачев В. П. (1995) Нефосфорилирующее дыхание как механизм, предотвращающий образование активных форм кислорода. *Мол. Биол.*, **29**, 1199-1209.
100. Chance, B. (1965) The respiratory chain as a model for metabolic control in multi-enzyme systems, in *Control of Energy Metabolism*, Academic Press, pp. 9-12.
101. Skulachev, V. P. (1996) Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants, *Q. Rev. Biophys.*, **29**, 169-202, <https://doi.org/10.1017/S0033583500005795.07>.
102. Edwards, S. W. (1996) The O₂⁻ generating NADPH oxidase of phagocytes: structure and methods of detection, *Meth-ods*, **9**, 563-577, <https://doi.org/10.1006/meth.1996.0064>.
103. Skulachev, V. P. (2005) How to clean the dirtiest place in the cell: cationic antioxidants as intramitochondrial ROS scavengers, *IUBMB Life*, **57**, 305-310, <https://doi.org/10.1080/15216540500092161>.
104. Dröge, W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function, *Physiol. Rev.*, **82**, 47-95, <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>.
105. Michaelis, L. (1946) Fundamentals of oxidation and respiration, *Am. Sci.*, **34**, 573-596.
106. Gerschman, R., Gilbert, D. L., Nye, S. W., Dwyer, P., and Fenn, W. O. (1954) Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common, *Science*, **119**, 623-626, <https://doi.org/10.1126/science.119.3097.623>.
107. Harman, D. (1995) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry, *J. Gerontol.*, **11**, 298-300, <https://doi.org/10.1093/geronj/11.3.298>.
108. Franceschi, C. (1989) Cell proliferation, cell death and aging, *Aging Clin. Exp. Res.*, **1**, 3-15, <https://doi.org/10.1007/BF03233871>.
109. Franceschi, C., Bonafe, M., Valensisi, S., Oliveri, F., De Luca, M., Ottaviani, E., and De Benedictis, G. (2000) Inflamm-aging: an evolutionary perspective on immunosenescence, *Ann. N Y Acad. Sci.*, **908**, 244-254, <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06651.x>.
110. Franceschi, C., Garagnani, P., Vitale, G., Capri, M., and Salvioli, S. (2017) Inflammaging and ‘Garb-Aging’, *Trends Endocrinol. Metab.*, **28**, 199-212, <https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.09.005>.
111. Ferrucci, L., and Fabbri, E. (2018) Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty, *Nat. Rev. Cardiol.*, **15**, 505-522, <https://doi.org/10.1038/s41569-018-0064-2>.
112. Zhang, Q., Raouf, M., Chen, Y., Sumi, Y., Sursal, T., Junger, W., Brohi, K., Itagaki, K., and Hauser, C. J. (2010) Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury, *Nature*, **464**, 104-107, <https://doi.org/10.1038/nature08780>.
113. Pinti, M., Cevenini, E., Nasi, M., De Biasi, S., Salvioli, S., Monti, D., Benatti, S., Gibellini, L., Cotichini, R., Stazi, M. A., Trenti, T., Franceschi, C., and Cossarizza, A. (2014) Circulating mitochondrial DNA increases with age and is a familiar trait: implications for “inflamm-aging”, *Eur. J Immunol.*, **44**, 1552-1562, <https://doi.org/10.1002/eji.201343921>.
114. Shimada, K., Crother, T.R., Karlin, J., Dagvadorj, J., Chiba, N., Chen, S., Ramanujan, V. K., Wolf, A. J., Vergnes, L., Ojcius, D. M., et al. (2012) Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis, *Immunity*, **36**, 401-414, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.01.009>.
115. Iyer, S. S., He, Q., Janczy, J. R., Elliott, E. I., Zhong, Z., Olivier, A. K., Sadler, J. J., Knepper-Adrian, V., Han, R., Qiao, L., Eisenbarth, S. C., Nauseef, W. M., Cassel, S. L., and Sutterwala, F. S. (2013) Mitochondrial cardiolipin is required for Nlrp3 inflammasome activation, *Immunity*, **39**, 311-323, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.001>.

116. Zorov, D. B., Bannikova, S. Y., Belousov, V. V., Vyssokikh, M. Y., Zorova, L. D., Isaev, N. K., Krasnikov, B. F., and Plotnikov, E. Y. (2005) Reactive oxygen and nitrogen species: friends or foes? *Biochemistry (Moscow)*, **70**, 215-221, <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0103-6>.
117. Boveris, A., Oshino, N., and Chance, B. (1972) The cellular production of hydrogen peroxide, *Biochem. J.*, **128**, 617-630, <https://doi.org/10.1042/bj1280617>.
118. Korshunov, S. S., Skulachev, V. P., and Starkov, A. A. (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria, *FEBS Lett.*, **416**, 15-18, [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01159-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01159-9).
119. Vyssokikh, M. Y., Holtze, S., Averina, O. A., Lyamzaev, K. G., Panteleeva, A. A., Marey, M. V., Zinovkin, R. A., Severin, F. F., Skulachev, M. V., Fasel, N., Hildebrandt, T. B., and Skulachev, V. P. (2020) Mild depolarization of the inner mitochondrial membrane is a crucial component of an anti-aging program, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 6491-6501, <https://doi.org/10.1073/pnas.1916414117>.
120. Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Jankauskas, S. S., Rokitskaya, T. I., Chupyrkina, A. A., Pevzner, I. B., Zorova, L. D., Isaev, N. K., Antonenko, Y. N., Skulachev, V. P., and Zorov, D. B. (2012) Mild uncoupling of respiration and phosphorylation as a mechanism providing nephro- and neuroprotective effects of penetrating cations of the SkQ family, *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 1029-1037, <https://doi.org/10.1134/S0006297912090106>.
121. Skulachev, V. P. (1991) Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation, *FEBS Lett.*, **294**, 158-162, [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)80658-P](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)80658-P).
122. Isaev, N. K., Zorov, D. B., Stelmashook, E. V., Uzbekov, R. E., Kozhemyakin, M. B., and Victorov, I. V. (1996) Neurotoxic Glutamate treatment of cultured cerebellar granule cells induces Ca²⁺-dependent collapse of mitochondrial membrane potential and ultrastructural alterations of mitochondria, *FEBS Lett.*, **392**, 143-147, [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00804-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00804-6).
123. Weidinger, A., Milivojev, N., Hosmann, A., Duvigneau, J. C., Szabo, C., Törö, G., Rauter, L., Vaglio-Garro, A., Mkrtchyan, G. V., Trofimova, L., et al. (2023) Oxoglutarate dehydrogenase complex controls glutamate-mediated neuronal death, *Redox Biol.*, **62**, 102669, <https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102669>.
124. Li, X., and May, J. M. (2002) Catalase-dependent measurement of H₂O₂ in intact mitochondria, *Mitochondrion*, **1**, 447-453, [https://doi.org/10.1016/S1567-7249\(02\)00010-7](https://doi.org/10.1016/S1567-7249(02)00010-7).
125. Palma, F. R., He, C., Danes, J. M., Paviani, V., Coelho, D. R., Gantner, B. N., and Bonini, M. G. (2020) Mitochondrial superoxide dismutase: what the established, the intriguing, and the novel reveal about a key cellular redox switch, *Antioxid. Redox Signal.*, **32**, 701-714, <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7962>.
126. Kang, S. W., Chae, H. Z., Seo, M. S., Kim, K., Baines, I. C., and Rhee, S. G. (1998) Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor- α , *J. Biol. Chem.*, **273**, 6297-6302, <https://doi.org/10.1074/JBC.273.11.6297>.
127. Arnér, E. S. J., and Holmgren, A. (2000) Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase, *Eur. J Biochem.*, **267**, 6102-6109, <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01701.x>.
128. Sohal, R. S., and Brunk, U. T. (1992) Mitochondrial production of pro-oxidants and cellular senescence, *Mutat. Res.*, **275**, 295-304, [https://doi.org/10.1016/0921-8734\(92\)90033-L](https://doi.org/10.1016/0921-8734(92)90033-L).
129. Zorov, D. B., Juhaszova, M., and Sollott, S. J. (2014) Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release, *Physiol. Rev.*, **94**, 909-950, <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2013>.
130. Silachev, D. N., Plotnikov, E. Y., Pevzner, I. B., Zorova, L. D., Babenko, V. A., Zorov, S. D., Popkov, V. A., Jankauskas, S. S., Zinchenko, V. P., Sukhikh, G. T., and Zorov, D. B. (2014) The mitochondrion as a key regulator of ischaemic tolerance and injury, *Heart Lung Circ.*, **23**, 897-904, <https://doi.org/10.1016/j.hlc.2014.05.022>.
131. Zorov, D. B., Isaev, N. K., Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Zorova, L. D., Pevzner, I. B., Morosanov, M. A., Jankauskas, S. S., Zorov, S. D., and Babenko, V. A. (2013) Perspectives of mitochondrial medicine, *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 979-990, <https://doi.org/10.1134/S0006297913090034>.
132. Miller, J. W., Selhub, J., and Joseph, J. A. (1996) Oxidative damage caused by free radicals produced during catecholamine autoxidation: protective effects of O-methylation and melatonin, *Free Radic. Biol. Med.*, **21**, 241-249, [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(96\)00033-0](https://doi.org/10.1016/0891-5849(96)00033-0).
133. Seiter, C. H. A., Margalit, R., and Perreault, R. A. (1979) The cytochrome c binding site on cytochrome c oxidase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **86**, 473-477, [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(79\)91738-8](https://doi.org/10.1016/0006-291X(79)91738-8).
134. Vyssokikh, M., Zorova, L., Zorov, D., Heimlich, G., Jürgensmeier, J., Schreiner, D., and Brdiczka, D. (2004) The intra-mitochondrial cytochrome c distribution varies correlated to the formation of a complex between VDAC and the adenine nucleotide translocase: this affects Bax-dependent cytochrome c release, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res.*, **1644**, 27-36, <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2003.10.007>.
135. Vyssokikh, M. Y., Zorova, L., Zorov, D., Heimlich, G., Jürgensmeier, J. J., and Brdiczka, D. (2002) Bax releases cytochrome c preferentially from a complex between porin and adenine nucleotide translocator. Hexokinase activity suppresses this effect, *Mol. Biol. Rep.*, **29**, 93-96, <https://doi.org/10.1023/a:1020383108620>.

136. Kagan, V. E., Bayır, H. A., Belikova, N. A., Kapralov, O., Tyurina, Y. Y., Tyurin, V. A., Jiang, J., Stoyanovsky, D. A., Wipf, P., Kochanek, P. M., Greenberger, J. S., Pitt, B., Shvedova, A. A., and Borisenko, G. (2009) Cytochrome *c*/cardiolipin relations in mitochondria: a kiss of death, *Free Radic. Biol. Med.*, **46**, 1439-1453, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.03.004>.
137. Pereverzev, M. O., Vygodina, T. V., Konstantinov, A. A., and Skulachev, V. P. (2003) Cytochrome *c*, an ideal antioxidant, *Biochem. Soc. Trans.*, **31**, 1312-1315, <https://doi.org/10.1042/bst0311312>.
138. Skulachev, V. P. (1998) Cytochrome *c* in the apoptotic and antioxidant cascades, *FEBS Lett.*, **423**, 275-280, [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00061-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00061-1).
139. Abramicheva, P. A., Andrianova, N. V., Babenko, V. A., Zorova, L. D., Zorov, S. D., Pevzner, I. B., Popkov, V. A., Semenovich, D. S., Yakupova, E. I., Silachev, D. N., Plotnikov, E. Y., Sukhikh, G. T., and Zorov, D. B. (2023) Mitochondrial network: electric cable and more, *Biochemistry (Moscow)*, **88**, 1596-1607, <https://doi.org/10.1134/S0006297923100140>.
140. Skulachev, V. P. (1971) Energy transformations in the respiratory chain, *Curr. Top. Bioenergetics*, **4**, 127-190, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-152504-0.50010-1>.
141. Bakeeva, L. E., Chentsov, Y. S., and Skulachev, V. P. (1978) Mitochondrial framework (reticulum mitochondriale) in rat diaphragm muscle, *Biochim. Biophys. Acta*, **501**, 349-369, [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(78\)90104-4](https://doi.org/10.1016/0005-2728(78)90104-4).
142. Драчев В. А., Зоров Д. Б. (1986) Митохондрия как электрический кабель. Экспериментальная проверка гипотезы, *Докл. Акад. Наук СССР*, **287**, 1237-1238.
143. Amchenkova, A. A., Bakeeva, L. E., Chentsov, Y. S., Skulachev, V. P., and Zorov, D. B. (1988) Coupling membranes as energy-transmitting cables. I. Filamentous mitochondria in fibroblasts and mitochondrial clusters in cardiomyocytes, *J. Cell. Biol.*, **107**, 481-495, <https://doi.org/10.1083/jcb.107.2.481.148>.
144. Vitale, I., Pietrocola, F., Guilbaud, E., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostini, M., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., et al. (2023) Apoptotic cell death in disease – current understanding of the NCCD 2023, *Cell Death Differ.*, **30**, 1097-1154, <https://doi.org/10.1038/s41418-023-01153-w>.
145. Zorov, D. B., Popkov, V. A., Zorova, L. D., Vorobjev, I. A., Pevzner, I. B., Silachev, D. N., Zorov, S. D., Jankauskas, S. S., Babenko, V. A., and Plotnikov, E. Y. (2017) Mitochondrial aging: is there a mitochondrial clock? *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **72**, 1171-1179, <https://doi.org/10.1093/gerona/glw184>.
146. Twig, G., Elorza, A., Molina, A. J. A., Mohamed, H., Wikstrom, J. D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S. E., Katz, S., Las, G., et al. (2008) Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy, *EMBO J.*, **27**, 433-446, <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601963>.
147. Vorobjev, I. A., and Zorov, D. B. (1983) Diazepam inhibits cell respiration and induces fragmentation of mitochondrial reticulum, *FEBS Lett.*, **163**, 311-314, [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(83\)80842-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(83)80842-4).
148. Plotnikov, E. Y., Vasileva, A. K., Arkhangelskaya, A. A., Pevzner, I. B., Skulachev, V. P., and Zorov, D. B. (2008) Interrelations of mitochondrial fragmentation and cell death under ischemia/reoxygenation and UV-irradiation: protective effects of SkQ1, lithium ions and insulin, *FEBS Lett.*, **582**, 3117-3124, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.08.002>.
149. Hunter, D. R., Haworth, R. A. (1979) The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria, *Arch. Biochem. Biophys.*, **195**, 453-459, [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(79\)90371-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(79)90371-0).
150. Haworth, R. A., and Hunter, D. R. (1979) The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria, *Arch. Biochem. Biophys.*, **195**, 460-467, [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(79\)90372-2](https://doi.org/10.1016/0003-9861(79)90372-2).
151. Hunter, D. R., and Haworth, R. A. (1979) The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria, *Arch. Biochem. Biophys.*, **195**, 468-477, [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(79\)90373-4](https://doi.org/10.1016/0003-9861(79)90373-4).
152. Novgorodov, S. A., Gudz, T. I., Kushnareva, Y. E., Zorov, D. B., and Kudrjashov, Y. B. (1990) Effect of cyclosporine A and oligomycin on non-specific permeability of the inner mitochondrial membrane, *FEBS Lett.*, **270**, 108-110, [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)81245-j](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)81245-j).
153. Novgorodov, S. A., Gudz, T. I., Kushnareva, Y. E., Zorov, D. B., and Kudrjashov, Y. B. (1990) Effect of ADP/ATP antiporter conformational state on the suppression of the nonspecific permeability of the inner mitochondrial membrane by cyclosporine A, *FEBS Lett.*, **277**, 123-126, [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80824-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80824-3).
154. Kinnally, K. W., Zorov, D., Antonenko, Y., and Perini, S. (1991) Calcium modulation of mitochondrial inner membrane channel activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **176**, 1183-1188, [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(91\)90410-9](https://doi.org/10.1016/0006-291x(91)90410-9).
155. Szabó, I., and Zoratti, M. (1992) The mitochondrial megachannel is the permeability transition pore, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **24**, 111-117, <https://doi.org/10.1007/BF00769537>.
156. Zoratti, M., and Szabó, I. (1995) The mitochondrial permeability transition, *Biochim. Biophys. Acta*, **1241**, 139-176, [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(95\)00003-a](https://doi.org/10.1016/0304-4157(95)00003-a).
157. Krasnikov, B. F., Zorov, D. B., Antonenko, Y. N., Zaspá, A. A., Kulikov, I. V., Kristal, B. S., Cooper, A. J., and Brown, A. M. (2005) Comparative kinetic analysis reveals that inducer-specific ion release precedes the mitochondrial permeability transition, *Biochim. Biophys. Acta*, **1708**, 375-392, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2005.05.009>.

158. Zorov, D. B., Juhaszova, M., Yaniv, Y., Nuss, H. B., Wang, S., and Sollott, S. J. (2009) Regulation and pharmacology of the mitochondrial permeability transition pore, *Cardiovasc. Res.*, **83**, 213-225, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp151>.
159. Skulachev, V. P. (1996) Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell, *FEBS Lett.*, **397**, 7-10, [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00989-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00989-1).
160. Kluck, R. M., Esposti, M. D., Perkins, G., Renken, C., Kuwana, T., Bossy-Wetzel, E., Goldberg, M., Allen, T., Barber, M. J., Green, D. R., and Newmeyer, D. D. (1999) The pro-apoptotic proteins, Bid and Bax, cause a limited permeabilization of the mitochondrial outer membrane that is enhanced by cytosol, *J. Cell Biol.*, **147**, 809-822, <https://doi.org/10.1083/jcb.147.4.809>.
161. Zorov, D. B., Kinnally, K. W., and Tedeschi, H. (1992) Voltage activation of heart inner mitochondrial membrane channels, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **24**, 119-124, <https://doi.org/10.1007/BF00769538>.
162. Lemasters, J. J. (1999) Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **276**, G1-G6, <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1999.276.1.G1>.
163. Riedl, S. J., and Salvesen, G. S. (2007) The apoptosome: signalling platform of cell death, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 405-413, <https://doi.org/10.1038/nrm2153>.
164. Zorov, D. B., Plotnikov, E. Y., Jankauskas, S. S., Isaev, N. K., Silachev, D. N., Zorova, L. D., Pevzner, I. B., Pulkova, N. V., Zorov, S. D., and Morosanova, M. A. (2012) The phenoptosis problem: what is causing the death of an organism? Lessons from acute kidney injury, *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 742-753, <https://doi.org/10.1134/S0006297912070073>.
165. Plotnikov, E. Y., Morosanova, M. A., Pevzner, I. B., Zorova, L. D., Manskikh, V. N., Pulkova, N. V., Galkina, S. I., Skulachev, V. P., and Zorov, D. B. (2013) Protective effect of mitochondria-targeted antioxidants in an acute bacterial infection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, <https://doi.org/10.1073/pnas.1307096110>.
166. Zorov, D. B., Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Zorova, L. D., Pevzner, I. B., Zorov, S. D., Babenko, V. A., Jankauskas, S. S., Popkov, V. A., and Savina, P. S. (2014) Microbiota and mitobiota. Putting an equal sign between mitochondria and bacteria, *Biochemistry (Moscow)*, **79**, 1017-1031, <https://doi.org/10.1134/S0006297914100046>.
167. Popkov, V. A., Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Zorova, L. D., Pevzner, I. B., Jankauskas, S. S., Zorov, S. D., Andrianova, N. V., Babenko, V. A., and Zorov, D. B. (2017) Bacterial therapy and mitochondrial therapy, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 1549-1556, <https://doi.org/10.1134/S0006297917120148>.
168. Skulachev, V. P. (2012) What is "phenoptosis" and how to fight it? *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 689-706, <https://doi.org/10.1134/S0006297912070012>.
169. Skulachev, V. P. (2002) Programmed death phenomena: from organelle to organism, *Ann. N Y Acad. Sci.*, **959**, 214-237, <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb02095.x>.
170. Skulachev, V. P. (1999) Phenoptosis: programmed death of an organism, *Biochemistry (Moscow)*, **64**, 1418-1426.
171. Skulachev, V. P., Vyssokikh, M. Yu., Chernyak, B. V., Averina, O. A., Andreev-Andrievskiy, A. A., Zinovkin, R. A., Lyamzaev, K. G., Marey, M. V., Egorov, M. V., Frolova, O. J., Zorov, D. B., Skulachev, M. V., and Sadovnichii, V. A. (2023) Mitochondrion-targeted antioxidant SkQ1 prevents rapid animal death caused by highly diverse shocks, *Sci. Rep.*, **13**, 4326, <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31281-9>.
172. Bakeeva, L. E., Barskov, I. V., Egorov, M. V., Isaev, N. K., Kapelko, V. I., Kazachenko, A. V., Kirpatovskiy, V. I., Kozlovskiy, S. V., Lakomkin, V. L., Levina, S. B., et al. (2008) Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 2. Treatment of some ROS- and age-related diseases (heart arrhythmia, heart infarctions, kidney ischemia, and stroke), *Biochemistry (Moscow)*, **73**, 1288-1299, <https://doi.org/10.1134/S000629790812002X>.
173. Skulachev, M. V., N. Antonenko, Y. N., Anisimov, V. V., Chernyak, B. A., Cherepanov, D. A., Chistyakov, V. V., Egorov, M. G., Kolosova, N. A., Korshunova, G. G., Lyamzaev, K., et al. (2011) Mitochondrial-targeted plastoquinone derivatives. Effect on senescence and acute age-related pathologies, *Curr. Drug. Targets*, **12**, 800-826, <https://doi.org/10.2174/138945011795528859>.
174. Weismann, A. (1882) *About the Duration of Life* [in German], Fischer, Jena.

MITOCENTRICITY

Review

D. B. Zorov^{1,2*}, P. A. Abramicheva¹, N. V. Andrianova¹, V. A. Babenko^{1,2}, L. D. Zorova^{1,2}, S. D. Zorov^{1,3}, I. B. Pevzner^{1,2}, V. A. Popkov^{1,2}, D. S. Semenovich^{1,2}, E. I. Yakupova¹, D. N. Silachev^{1,2}, E. Y. Plotnikov^{1,2}, and G. T. Sukhikh²

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

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

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

Worldwide, interest in mitochondria is constantly growing, as evidenced by scientific statistics, and studies of the functioning of these organelles are becoming more prevalent than studies of other cellular structures. In this analytical review, mitochondria are conditionally placed in a certain cellular center, which is responsible for both energy production and other non-energetic functions, without which the existence of not only the eukaryotic cell itself, but also the entire organism is impossible. Taking into account the high multifunctionality of mitochondria, such a fundamentally new scheme of cell functioning organization, including mitochondrial management of processes that determine cell survival and death, may be justified. Considering that this issue is dedicated to the memory of V. P. Skulachev, who can be called mitocentric, due to the history of his scientific activity almost entirely aimed at studying mitochondria, this work examines those aspects of mitochondrial functioning that were directly or indirectly the focus of attention of this outstanding scientist. We list all possible known mitochondrial functions, including membrane potential generation, synthesis of Fe-S clusters, steroid hormones, heme, fatty acids, and CO₂. Special attention is paid to the participation of mitochondria in the formation and transport of water, as a powerful biochemical cellular and mitochondrial regulator. The history of research on reactive oxygen species that generate mitochondria is subject to significant analysis. In the section "Mitochondria in the Center of Death", special emphasis is placed on the analysis of what role and how mitochondria can play and determine the program of death of an organism (phenoptosis) and the contribution made to these studies by V. P. Skulachev.

Keywords: mitochondria, cell, organism, phenoptosis, death, membrane potential, water, swelling, uncoupling, CO₂, steroids, heme, fatty acids, reactive oxygen species

РЕДОКС-РЕГУЛИРУЕМАЯ ГЕТЕРОДИМЕРНАЯ NADH:ЦИННАМАТ РЕДУКТАЗА ИЗ *Vibrio ruber*

© 2024 Ю.В. Берцова, М.В. Серебрякова, В.А. Анашкин,
А.А. Байков, А.В. Богачев*

НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119234 Москва; электронная почта: bogachev@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 24.06.2023

После доработки 09.10.2023

Принята к публикации 10.10.2023

Гены редуктаз несопряженных карбоновых кислот широко распределены среди геномов анаэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов. Однако субстратная специфичность экспериментально определена лишь для небольшого количества этих белков. В ходе данной работы мы наработали в клетках *Escherichia coli* гетеродимерный белок факультативно-анаэробной морской бактерии *Vibrio ruber* (GenBank Sjn56019 и Sjn56021; аннотированные как NADPH азоредуктаза и уроканатредуктаза соответственно) путем его копродукции с флавин трансферазой из *Vibrio cholerae*. Полученный белок (названный Crd) состоит из *sjn56021*-кодируемой субъединицы CrdV (домены *NADH:flavin*, *FAD binding 2* и *FMN bind*) и из дополнительной субъединицы CrdA (Sjn56019, единственный домен *NADH:flavin*), которые взаимодействуют посредством своих доменов *NADH:flavin* (предсказание AlphaFold2). Показано, что каждый домен Crd содержит флавиновую простетическую группу (в сумме три FMN и один FAD), одна из FMN-групп присоединяется к CrdV ковалентно за счет активности флавин трансферазы. В анаэробных условиях Crd способен восстанавливать циннамат, *n*-кумарат, кофеат и ферулат, используя NADH или метилвиологен в качестве доноров электронов. Белок также умеренно активен по отношению к акрилату, но практически не способен к восстановлению фумарата и уроканата. Различные (гидрокси)циннаматы индуцируют синтез Crd в клетках *V. ruber* как в анаэробных, так и в аэробных условиях выращивания. При старте Crd-катализируемой реакции добавкой NADH наблюдается временной лаг в несколько минут, что указывает на редокс-регуляцию ферментативной активности. Показано, что окисленная форма Crd неактивна, что, по-видимому, предотвращает продукцию ферментом активных форм кислорода в аэробных условиях. Полученные данные позволяют описать Crd как регулируемую NADH-зависимую циннамат редуктазу, по-видимому, защищающую *V. ruber* от токсического действия (гидрокси)циннаматов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: активные формы кислорода, анаэробное дыхание, коричная кислота, кофейная кислота, регуляция ферментативной активности, ризосфера, *Vibrio*.

DOI: 10.31857/S0320972524020053 EDN: XNCWTX

ВВЕДЕНИЕ

NADH:2-еноат редуктазы (EC 1.3.1.31), способные восстанавливать α,β -ненасыщенные карбоновые кислоты (например, фумаровую, коричную или акриловую кислоты), широко распространены среди анаэробных или факультативно-анаэробных

микроорганизмов [1–4]. Все известные на сегодняшний день 2-еноат редуктазы состоят из одного полипептида и могут быть разделены на две негомологичные группы на основании их доменной архитектуры. Трехдоменные редуктазы всегда содержат в своем составе домен *FAD binding 2* (Pfam ID: PF00890), осуществляющий связывание

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; aCrd – нефлавилированный белок Crd, содержащий только нековалентно связанные флавины; DCPiP – 2,6-дихлорфенолиндофенол; fCrd – флавилированный белок Crd; *FMN – ковалентно связанный остаток FMN; MS – масс-спектрометрия; MV – метилвиологен, *m/z* – отношение массы к заряду.

* Адресат для корреспонденции.

и восстановление карбоновой кислоты и содержащий нековалентно связанный FAD в качестве протетической группы. Окисление NADH производится в *OYE-like* (PF00724) или в *FAD binding 6* (PF00970) домене, несущем в своем составе нековалентно связанный FMN или FAD соответственно [2, 3]. Третий домен (чаще всего – домен *FMN bind*; PF04205) осуществляет перенос электронов между описанными выше доменами посредством FMN, ковалентно связанного с белком фосфоэфирной связью [4–6].

Многие бактерии класса *Clostridia* содержат двухдоменную 2-еноат редуктазу [1, 7], построенную из доменов *OYE-like* и *Pyr redox 2* (PF07992). Редуктазы этой группы содержат кластер [4Fe-4S] и нековалентно связанные FAD и FMN в соотношении 1/1/1 в качестве кофакторов [8, 9]. В сахаролитических клостридиях двухдоменные 2-еноат редуктазы восстанавливают широкий спектр несопряженных карбоновых кислот, тогда как эти ферменты из протеолитических клостридий высоко специфичны по отношению к коричной кислоте и ее производным [10, 11]. Для всех известных 2-еноат редуктаз не описано возможности регуляции их ферментативной активности.

Геном морской факультативно-анаэробной бактерии *Vibrio ruber* [12] кодирует полипептид, состоящий из 806 а.о., аннотированный как урканатредуктаза в GenBank (SJM56021) и в UniProt (A0A1R4LHH9). Этот полипептид, названный нами на основании его субстратной специфичности (смотри далее) как CrdB, содержит описанные выше домены *FAD binding 2* и *FMN bind* (рис. 1, а). Пять аминокислотных остатков домена *FAD binding 2* в CrdB, предположительно, отвечающих за связывание карбоновой кислоты, идентичны или сходны с таковыми акрилатредуктазы из *Vibrio harveyi* [4, 13, 14] (рис. 1, б). Исходя из этого, можно предположить, что CrdB также является акрилатредуктазой. Домен *FMN bind* CrdB, так же как и сходные домены в других 2-еноат редуктазах, содержит в своем составе мотив DALSGAS₂₅₇, используемый флавином трансферазой для ковалентного присоединения FMN к остатку серина [15]. Интересно отметить, что в непосредственной близости от *crdB* на хромосоме *V. ruber* расположен ген *apbE* (рис. 1, в) для флавином трансферазы (GenBank ID: SJN56016), катализирующей присоединение FMN к белкам посредством фосфоэфирной связи.

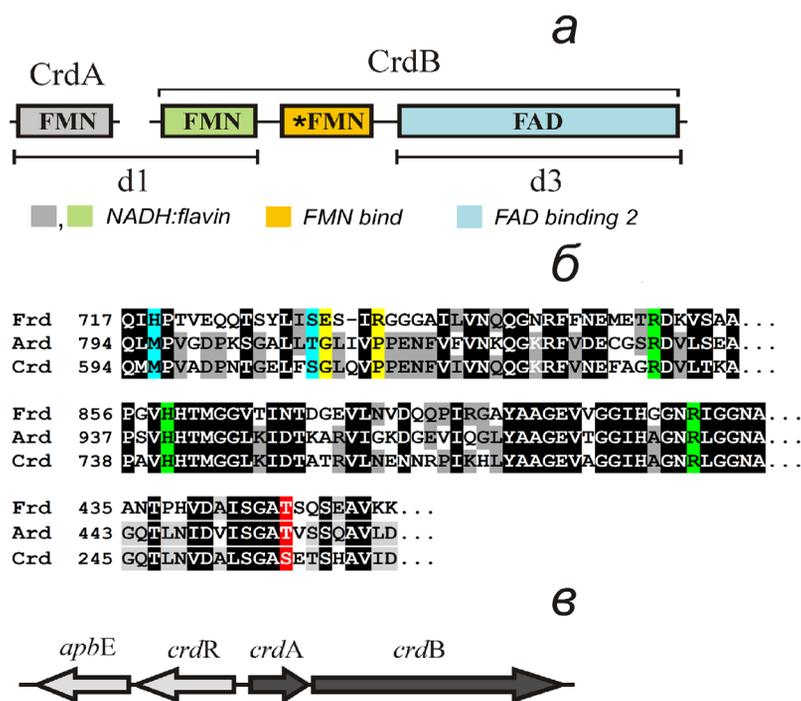


Рис. 1. Биоинформатическое описание Crd из *Vibrio ruber*. а – Доменная архитектура полипептидов CrdA и CrdB. Домены *NADH:flavin*, *FMN bind* и *FAD binding 2* (остатки CrdB 1–180, 190–275 и 280–800 соответственно) показаны различными цветами. Названия доменов приведены в соответствии с базой данных Pfam. Предполагаемые редокс-активные протетические группы указаны внутри боксов. Полученные в ходе работы укороченные фрагменты белка Crd обозначены как d1 и d3. б – Выравнивание аминокислотных последовательностей фумаратредуктазы из *Klebsiella pneumoniae* (Frd, UniProt: B5XRB0), акрилатредуктазы из *Vibrio harveyi* (Ard, P0DW92) и белка CrdB из *V. ruber* (SJM56021) с помощью программы Clustal Omega [42]. Три приведенные части выравнивания содержат позиции аминокислотных остатков, вовлеченных в связывание C1- и C4-карбоксилатов фумарата в Frd (выделены синим и зеленым цветом соответственно), в формирование протон-переносающего пути к фумарату в Frd (выделены желтым) и в ковалентное связывание FMN во всех показанных белках (выделены красным). в – Расположение *crd*-ассоциированных генов на хромосоме *V. ruber*. *apbE* – ген предполагаемой FAD:белок FMN трансферазы; *crdR* – ген предполагаемого регулятора транскрипции

Перечисленные характеристики CrdB позволяют классифицировать этот белок как трехдоменную 2-еноат редуктазу, по-видимому, вовлеченную в восстановление акриловой кислоты.

Однако CrdB, в отличие от других известных трехдоменных NADH:2-еноат редуктаз, вместо NADH-окисляющего домена *OYE-like* или *FAD binding 6* содержит альтернативный домен *NADH:flavin* (PF03358) (рис. 1, а). Также в *crd*-опероне *V. ruber* перед геном *crdB* находится ген *crdA* (рис. 1, в), кодирующий белок (SjN56019), гомологичный *N*-концевой части CrdB (51% идентичности, 65% схожести первичных структур) и состоящий только из домена *NADH:flavin*. Так как домены *NADH:flavin* способны к димеризации [16], существует интересная возможность функционирования Crd в качестве CrdA/CrdB гетеродимера.

Из-за невозможности однозначного теоретического предсказания ферментативной активности и субстратной специфичности NADH:2-еноат редуктаз в ходе данной работы мы продуцировали белок Crd из *V. ruber* в клетках *Escherichia coli* и охарактеризовали выделенный фермент. Полученные данные позволяют описать его в качестве регулируемой NADH-зависимой редуктазы коричневой кислоты и ее различных производных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные штаммы и условия выращивания. Культура *V. ruber* DSM 16370 была получена из коллекции микроорганизмов и клеточных культур института Лейбница (DSMZ). Клетки выращивали аэробно или анаэробно при 28 °C в среде, содержащей (в расчете на литр) 20 г NaCl, 0,75 г KCl, 1,2 г MgSO₄ × 7(H₂O), 0,5 г NH₄Cl, 0,5 ммоль Na₂HPO₄, 2 г сахарозы, 0,5 г дрожжевого экстракта и 50 ммоль Tris-HCl (pH 8,0). При необходимости в среду роста добавляли 2–10 мМ акрилата, циннамата, *n*-кумарата, кофеата или ферулата. Для измерения MV:циннамат редуктазной активности осветленный клеточный лизат получали, как описано ранее [17]. Клетки *E. coli* растили при 37 °C в среде LB. Где указано, в среду LB добавляли хлорамфеникол (20 мкг/мл) и/или ампициллин (100 мкг/мл).

Конструирование экспрессионных векторов. Экспрессионный вектор для полноразмерного белка CrdAB с *C*-концевым 6×His-тагом у CrdB был получен за счет амплификации оперона *crd* с геномной ДНК *V. ruber* при использовании высокоточной полимеразы Tersus («Евроген», Россия) и праймеров *V_ruber_DIR/V_ruber_REV* (последовательности праймеров указаны в таблице S1 в Приложении). Полученный фрагмент (3276 п.н.) клонировали в вектор pBAD-TOPO («Invitrogen», США) с получении

ем плазмиды pTB_CRD4. Эту плазмиду трансформировали в клетки *E. coli*/pΔhis3 [18] или BL21.

Экспрессионный вектор для фрагмента d1 (полноразмерный CrdA и а.о. 1–184 CrdB) получали за счет ПЦР-амплификации соответствующего фрагмента ДНК *crd*-оперона с помощью полимеразы Tersus и праймеров *V_ruber_DIR/VR_P1R* (последовательности праймеров указаны в таблице S1 в Приложении), используя геномную ДНК *V. ruber* в качестве матрицы. Полученный фрагмент (1401 п.н.) клонировали в вектор pBAD-TOPO с получением плазмиды pTB_d1CRD17. Для получения экспрессионного вектора для продукции фрагмента d3 (281–806 а.о. CrdB) соответствующий фрагмент *crdB* (1688 п.н.) амплифицировали с помощью ПЦР, используя пару праймеров *VR_3P2_NdeD/Xho_rhod_rev* (последовательности праймеров указаны в таблице S1 в Приложении) и плазмиду pTB_CRD4 в качестве матрицы. Амплифицированный фрагмент клонировали в вектор pSCodon («Delphi Genetics», Бельгия) с использованием сайтов *NdeI/XhoI* и получением плазмиды pSC_d3CRD2. Плазмиды pTB_d1CRD17 и pSC_d3CRD2 вводили в клетки *E. coli* BL21 с помощью трансформации.

Получение белка Crd. Разные формы 6×His-меченного белка Crd, содержащего или не содержащего ковалентно связанный FMN (fCrd и aCrd соответственно), а также d1- и d3-фрагменты Crd нарабатывали в клетках *E. coli* BL21 или *E. coli*/pΔhis3 и выделяли с помощью металл-аффинной хроматографии, как описано ранее [5]. Определенные с помощью обработки додецилсульфатом натрия (ДСН) [4] коэффициенты экстинкции ε_{450nm} для fCrd, aCrd, d1- и d3-фрагментов составляли 42, 31, 22 и 11 мМ⁻¹·см⁻¹ соответственно.

Анализ флавиновых простетических групп. Нековалентно связанные флавины экстрагировали из Crd с помощью трифторуксусной кислоты (ТФУ) и разделяли с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [5]. Полиакриламидный гель-электрофорез в присутствии ДСН (ДСН-ПААГЭ) проводили, используя 12,5%-ный (w/v) полиакриламидный гель [19]. Гели окрашивали с помощью раствора PageBlue™ («Fermentas», Литва). Присутствие ковалентно связанного флавина (*FMN) определяли, сканируя неокрашенные гели с помощью лазерного сканера Typhoon™ FLA 9500 («GE Healthcare», США) при возбуждении светом с длиной волны 473 нм и детекции эмиссии, согласно протоколу SYBR Green II, в соответствии с рекомендациями производителя.

Для масс-спектроскопических измерений использовали вырезанные полоски геля (~2 мм³). Эти полоски вырезали из белковых полос окрашенного геля, дважды инкубировали по 20 мин в 100 мкл 40% (v/v) ацетонитрила, содержащего 20 мМ NH₄HCO₃ (pH 7,5), обезвоживали в 200 мкл

100%-ного ацетонитрила и регидратировали в 5 мкл раствора, содержащего 15 мкг/мл трипсина («Promega», США) в 20 мМ NH_4HCO_3 (pH 7,5). Трипсинолиз проводили при 37 °C в течение 1 ч. Полученные пептиды экстрагировали 5 мкл 30%-ного ацетонитрила, содержащего 0,5% ТФУ. Аликвоты полученного экстракта (1 мкл) смешивали с 0,5 мкл раствора 2,5-дигидроксибензойной кислоты (40 мг/мл) в 30%-ном ацетонитриле, содержащем 0,5% ТФУ. Масс-спектрометрию (MS) проводили на масс-спектрометре UltrafleXtreme MALDI-TOF-TOF («Bruker Daltonik», Германия). Спектры фрагментации получали в LIFT-моду, точность определения дочерних ионов составляла менее 1 Да. Масс-спектры обрабатывали с использованием программы FlexAnalysis 3.2 («Bruker Daltonik»). Идентификацию белков проводили MS + MS/MS-поиском с использованием программы Mascot версии 2.3.02 («Matrix Science», США) в базе данных NCBI с возможностью однократного пропуска разрезания трипсином, окисления метионина, пропионирования цистеина и флавилирования треонина или серина.

Ферментативные активности. NADH- и метилвиологен (MV)-зависимые ферментативные активности препаратов Crd определяли при 25 °C спектрофотометрически по окислению NADH или MV при 340 или 606 нм соответственно, используя спектрофотометр Hitachi-557 («Hitachi», Япония) [3]. Среда измерения содержала 1 мМ MV, 0,03–1 мМ акцептора электронов и 100 мМ Tris-HCl (pH 8,0) или 120 мкМ NADH, 0,05–1 мМ акцептора электронов, 10 мМ глюкозу, 5 ед./мл глюкозооксидазы, 5 ед./мл каталазы и 100 мМ Mes-KOH (pH 6,5) в полностью заполненной и герметически закрытой кювете объемом 3,2 мл. Перед проведением измерений MV восстанавливали дитионитом до достижения поглощения $\sim 1,5$ при 606 нм, что соответствует концентрации восстановленного MV, равной ~ 100 мкМ. Если не указано иначе, Crd инкубировали с NADH или MV в течение 5 мин до старта реакции добавкой акцептора электронов. NADH-зависимые реакции также измеряли в аэробных условиях при отсутствии глюкозооксидазы и каталазы. Активности Crd рассчитывали, используя экспериментально подтвержденные соотношения NADH:акцептор и MV:акцептор, равные 1/1 и 2/1 соответственно.

При измерении FMN $_2$:циннамат редуктазной активности среда измерения содержала 100 мкМ FMN, 1 мМ циннамата и 100 мМ Tris-HCl (pH 8,0). Перед запуском реакции FMN восстанавливали дитионитом до уменьшения поглощения при 450 нм до $\sim 0,3$, что соответствовало концентрации восстановленного FMN, равной ~ 70 мкМ. Окисление FMN $_2$ определяли спектрофотометрически по поглощению света при 450 нм.

Фенилпропионатдегидрогеназную активность определяли, измеряя восстановление 2,6-дихлорфенолиндифенола (DCPIP, $\epsilon_{600} = 22 \text{ мМ}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$) при 600 нм [20]. Среда измерения содержала 2 мМ Tris-фенилпропионата, 2 мМ феназинметасульфата, 25 мкМ DCPIP и 100 мМ Mes-KOH (pH 6,5).

Параметры уравнения Михаэлиса–Ментен для MV-зависимого восстановления акрилата определяли по начальным скоростям окисления MV при 0,03–10 мМ концентрациях акрилата в присутствии 40 нМ Crd. Для других акцепторов электронов скорости определяли из интегральной кинетики их восстановления при 606 нм до полного исчерпания акцептора. Скорости рассчитывали для 100 временных точек интегральной кинетики при ее дифференцировании ($-d[\text{MV}]/dt$) с использованием пакета MATLAB («The MathWorks, Inc.», США). Концентрацию акцептора электрона в каждый момент времени рассчитывали из A_{606} , используя соотношение MV:акцептор, равное 2/1, и предполагая, что конечное значение A_{606} соответствует 100%-ному восстановлению акцептора электронов. Фитирование уравнения Михаэлиса–Ментен проводили с помощью нелинейной регрессии.

Определение продукта реакции восстановления циннамата. Восстановление циннамата проводили в 3,2 мл среды, содержащей 100 мкМ циннамата, 10 мМ дитионита натрия, 50 мкМ MV и 100 мМ Tris-HCl (pH 8,0). Реакцию запускали добавкой 0,5 мкМ Crd и останавливали через 30 мин добавкой 5% (v/v) HClO_4 . В контрольном эксперименте добавляли HClO_4 до внесения Crd. После остановки реакции преципитат белка удаляли центрифугированием, а субстрат и продукт реакции экстрагировали диэтиловым эфиром ($2 \times 1,5$ мл). Эфир из полученного экстракта удаляли выпариванием под потоком воздуха, а остаток растворяли в 1 мл 25 мМ фосфата калия (pH 6,5) (среда А). Полученные пробы разделяли ВЭЖХ на колонке ProntoSil-120-5-C18 AQ («Econova», Россия), используя хроматограф Milichrom A-02 («Econova»). Колонку преуравновешивали средой А и промывали линейным градиентом метанола (0–10%) в среде А при скорости потока 0,2 мл/мин. Выход субстрата и продукта детектировали по УФ-поглощению при 210 и 258 нм.

Количественная полимеразная цепная реакция (рвПЦР). Экстракцию РНК из клеток *V. ruber* и синтез кДНК проводили, как описано ранее [17]. РвПЦР проводили с использованием набора qPCRMix-HS SYBR («Евроген»), полученной кДНК в качестве матрицы и праймеров VR_69U19/VR_273L20 для *crdB*. Для нормализации использовали 16S рРНК (пара праймеров 16s FW/16s RV). Для калибровки рвПЦР применяли серию разведенной геномной ДНК из *V. ruber*, содержащей гены

для CrdB и 16S rRNA в соотношении 1/8. Последовательности праймеров указаны в таблице S1 в Приложении. В работе использовали праймеры производства «Синтол», Россия.

Биоинформатика. Трехмерная структура апоформы Crd была предсказана по аминокислотным последовательностям CrdA и CrdB с помощью программы AlphaFold2 (версия 2.2.0) [21] посредством интерфейса ColabFold [22]. В полученной структуре 96,7% аминокислотных остатков имели благоприятные двугранные углы, согласно диаграмме Рамачандрана.

Размещение лигандов (флавинов, NADH и циннамата) в полученной структуре Crd проводили с помощью программы AutoDock Vina [23] в следующей последовательности: *FMN, FAD, FMN_B, FMN_A, NADH, циннамат. Для докинга выделяли участки структуры от 12 × 12 × 12 до 30 × 30 × 30 Å³ на основе известных трехмерных структур гомологичных белков. Полученная 3D-структура Crd, содержащая одну молекулу FAD и три молекулы FMN, была уравновешена с использованием молекулярной динамики (МД) в течение 150 нс с помощью программного пакета AMBER 22 [24] (<http://ambermd.org/>).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение и характеристика белка Crd из *V. ruber*. Оперон CrdAB был амплифицирован с геномной ДНК *V. ruber* и клонирован в экспрессионный вектор, добавляющий 6×His-таг к С-концу белка CrdB. Домен *FMN bind* CrdB содержит последовательность DALSGAS₂₅₇, сходную с мотивом флавилирования Dxx(s/t)gA(T/S), узнаваемым флавин трансферазой для ковалентного присоединения FMN к выделенному остатку треонина или серина [15]. Для проверки возможности флавилирования продуктов *crd*-оперона экспрессию этих генов проводили в клетках *E. coli* как в присутствии, так и при отсутствии дополнительной плазмиды pDhis3 [18], кодирующей флавин трансферазу ArpE, способную осуществлять флавилирование различных *FMN bind*-содержащих белков [15]. Рекомбинантные белки fCrd и aCrd, наработанные в присутствии и при отсутствии ArpE соответственно, были выделены с помощью металл-аффинной хроматографии. Полученные препараты обладали интенсивным желтым цветом, а их оптические спектры (рис. 2, а) указывали на то, что они содержат флавины в качестве простетических групп.

ДСН-ПААГЭ обоих препаратов Crd выявлял присутствие одной мажорной и трех-четырёх минорных белковых полос (рис. 2, б; левая панель). Полосы 1 и 3 были идентифицированы с помощью

MALDI-MS-анализа как CrdB (79% покрытие аминокислотной последовательности) и CrdA (95% покрытие аминокислотной последовательности) из *V. ruber* соответственно. Полоса 2 представляла собой пептидил-пролил *cis-trans* изомеразу SlyD из *E. coli*, обладающую собственной аффинностью к Ni-агарозе и являющуюся часто обнаруживаемой примесью при выделении 6×His-меченных белков из *E. coli* [25]. Полоса 1 fCrd обладала выраженной флуоресценцией при иллюминации светом с длиной волны 473 нм (рис. 2, б; правая панель), что указывает на присутствие в ней ковалентно связанного флавина. В то же время при использовании этого метода в aCrd ковалентно связанных флавинов не обнаруживалось. Таким образом, полученные данные указывают на ArpE-зависимое флавилирование CrdB.

Место ковалентного прикрепления флавина к CrdB было определено с помощью MALDI-MS- и MS/MS-анализа триптических пептидов. Пептид I₂₄₂IEGQTLNVDALSGASETSHAVIDGVAK₂₆₉, содержащий мотив флавилирования (мотив указан подчеркиванием, а модифицируемый остаток – жирным шрифтом), должен демонстрировать моноизотопную MH⁺ массу 2795,3 в немодифицированной форме или 3233,5 – в флавилированной форме. Оба эти предсказанные сигнала наблюдались на масс-спектре триптических пептидов fCrdB. Присутствие немодифицированной формы можно объяснить либо неполной модификацией Crd в клетках *E. coli*, либо частичной утратой ковалентно связанного флавина в ходе ДСН-ПААГЭ и последующего протеолиза. С помощью Mascot-поиска других кандидатов на роль флавилированных пептидов в полученном масс-спектре не обнаруживалось.

MS/MS-анализ пептида с отношением массы к заряду (*m/z*), равным 3233,5 (рис. S1 в Приложении), показал, что основные сигналы в спектре фрагментации (*m/z* = 2794 и *m/z* = 2776) соответствуют процессу отщепления FMN в полной или в дегидратированной форме соответственно, в зависимости от разрыва одной из ковалентных связей (С–О или О–Р), соединяющих остаток FMN с остатком серина. Большая интенсивность сигнала с *m/z* = 2776 указывает на то, что разрыв по связи С–О происходил с большей вероятностью, что должно было приводить к дегидратации остатка серина [26]. В полученном масс-спектре также наблюдались менее интенсивные, но достоверные пики фрагментации, стартующие с фрагмента с *m/z* = 2776, что соответствует серии у-ионов, полученных с помощью двойных разрывов (рис. S1 в Приложении; красные буквы). В этой серии разница масс в позиции Ser257 (69 Да) соответствовала дегидратированному серину. Эти данные позволяют заключить, что fCrdB, полученный в ArpE-содержащих

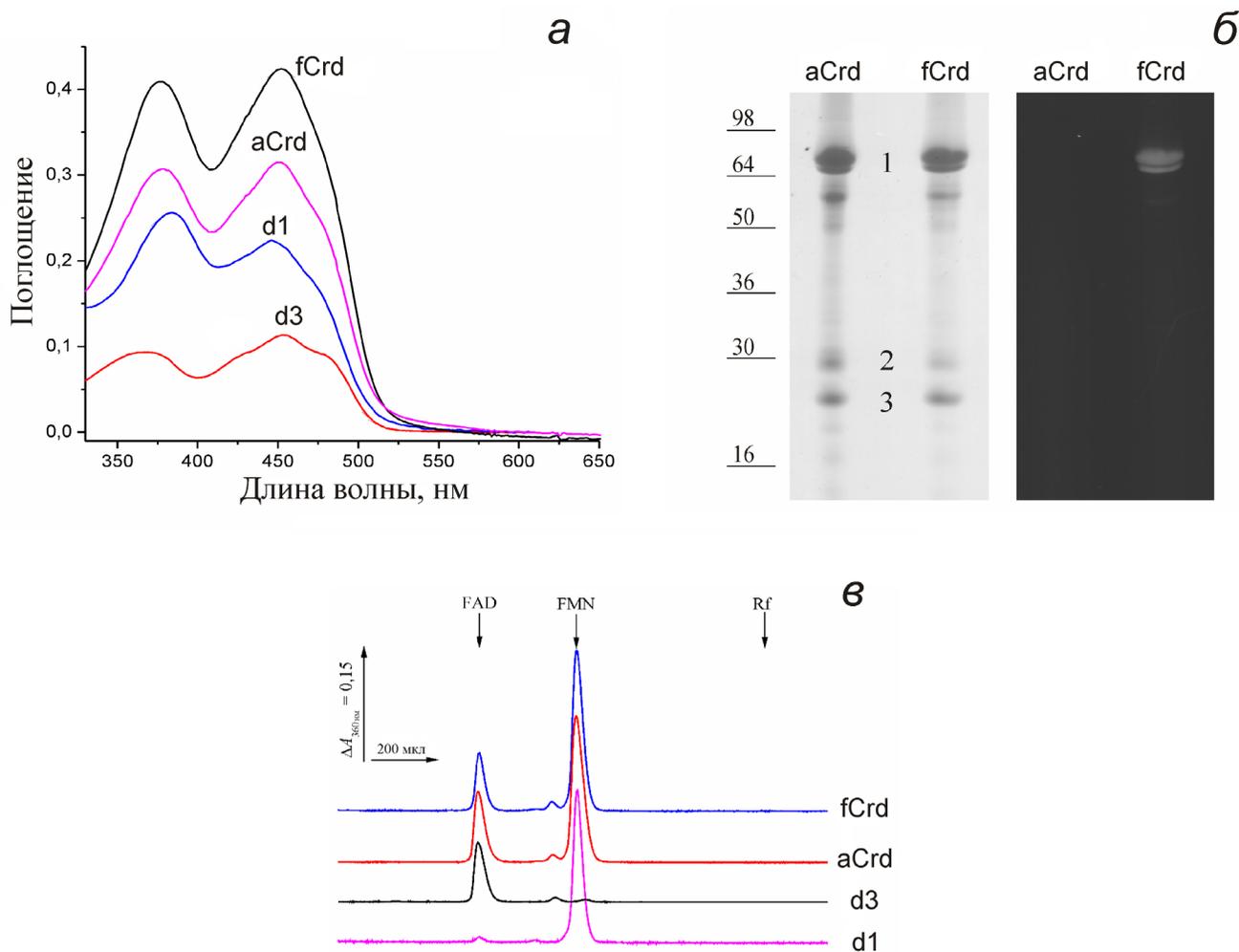


Рис. 2. Характеризация препаратов Crd. *а* – Оптические спектры препаратов полноразмерной и обрезанных (d1 и d3) форм Crd при концентрации этих белков, равной 10 мкМ. Препараты полноразмерного Crd были получены в клетках *E. coli*, содержащих или не содержащих флаavin трансферазу ArpE (fCrd и aCrd соответственно). *б* – ДСН-ПААГЭ fCrd и aCrd. Гель окрашивали с помощью красителя Кумасси (левая часть панели *б*) или сканировали при иллюминации светом с $\lambda = 473$ нм до окрашивания (правая часть панели *б*). На каждую дорожку наносили по 5 мкг белка. Полосы с числами указывают положение белковых маркеров молекулярных весов. Белковые полосы, идентифицированные с помощью MALDI-MS, указаны цифрами 1–3. *в* – Разделение нековалентно связанных флавиновых простетических групп различных препаратов Crd с помощью ВЭЖХ. Стрелками указаны объемы удержания для стандартов FAD, FMN и рибофлавина (Rf)

клетках, несет остаток FMN, ковалентно связанный с остатком Ser257 в предсказанном мотиве флавилирования домена *FMN bind*.

Для определения нековалентно связанных флавинов в составе Crd эти простетические группы были экстрагированы и разделены с помощью ВЭЖХ (рис. 2, *в*). Было показано, что оба препарата Crd (fCrd и aCrd) содержат нековалентно связанные FAD и FMN в соотношении 1/2.

Для определения локализации этих нековалентно связанных флавинов были получены генетические конструкции, кодирующие либо два домена *NADH:flavin* субъединиц CrdA и CrdB (d1 на рис. 1, *а*), либо домен *FAD binding 2* субъединицы CrdB (d3 на рис. 1, *а*). Выделенные соответствующие белки обладали оптическими спектра-

ми, характерными для флавопротеинов (рис. 2, *а*). Присутствующие в этих белках флавины были также идентифицированы с помощью ВЭЖХ (рис. 2, *в*). Было показано, что нековалентно связанный FMN обнаруживается исключительно только во фрагменте d1 (домены *NADH:flavin*), тогда как FAD обнаруживается только во фрагменте d3 (домен *FAD binding 2*). Таким образом, можно заключить, что CrdAB содержит две молекулы нековалентно связанного FMN в доменах *NADH:flavin*, одну молекулу нековалентно связанного FAD в домене *FAD binding 2* и одну молекулу ковалентно связанного остатка FMN в домене *FMN bind*.

Специфичность Crd по отношению к различным α,β -ненасыщенным карбоновым кислотам. Исходя из сходства аминокислотных остатков,

Таблица 1. Редуктазные активности fCrd по отношению к различным α,β -ненасыщенным карбоновым кислотам, измеренные в анаэробных условиях с использованием 100 мкМ восстановленного MV в качестве донора электронов

Субстрат (кислота)	Структура	k_{cat} (c^{-1})	K_m (мкМ)
Кофейная		47 ± 2	$2,2 \pm 0,4$
<i>n</i> -Кумаровая		45 ± 3	$2,4 \pm 0,5$
Феруловая		26 ± 2	$2,8 \pm 0,5$
Коричная		$22,0 \pm 1,5$	$7,1 \pm 0,6$
Акриловая		$1,3 \pm 0,2$	770 ± 50
Фумаровая		$0,20 \pm 0,03^a$	
Кротоновая		$0,06 \pm 0,02^a$	
Урокановая		$0,04 \pm 0,01^a$	
Метакриловая		$0,03 \pm 0,01^a$	

Приложение. ^a Значения активностей, измеренных в присутствии субстрата в концентрации 1 мМ.

предположительно, вовлеченных в связывание субстрата в доменах *FAD binding 2* Crd и акрилат-редуктазы Ard из *V. harveyi* (рис. 1, б), можно было предположить, что природным субстратом Crd также является акрилат. В соответствии с этим предсказанием, препарат Crd, полученный с помощью *crdAB-arpE* коэкспрессии (fCrd), оказался способен восстанавливать акрилат, используя MV в качестве донора электронов. Однако акрилат-редуктазная активность Crd ($1,3 c^{-1}$) была значительно ниже таковой для специфической акрилат-редуктазы Ard ($19 c^{-1}$ [4]). Более того, значение K_m для акрилата в случае fCrd оказалось существенно выше такового для Ard (770 и 16 мкМ соответственно), что делает каталитическую эффективность k_{cat}/K_m Crd ($0,0019 \text{ мкМ}^{-1}\cdot c^{-1}$) в ~ 640 раз более низкой по сравнению с Ard ($1,2 \text{ мкМ}^{-1}\cdot c^{-1}$ [4]). Также было показано, что fCrd способен восстанавливать фумарат с низкой, но измеряемой активностью. В то же время этот белок был практически неактивен при использовании метакрилата, кротоната и уроканата (табл. 1).

В противоположность этому fCrd оказался способным к восстановлению циннамата и его гидроксигированных производных с высокими скоростями (k_{cat} 22–47 c^{-1}) и низкими значениями K_m (2,2–7,1 мкМ) (табл. 1). Эти наблюдения позволяют описать Crd в качестве циннамат редуктазы, активной также по отношению к другим природным α,β -ненасыщенным производным коричной кислоты.

Для определения продукта реакции восстановления циннамата под действием fCrd мы провели его идентификацию с помощью ВЭЖХ. Было обнаружено, что в ходе Crd-катализируемой реакции происходит полное превращение циннамата в фенилпропионат (рис. 3, а и б). Идентификация карбоновых кислот подтверждалась не только

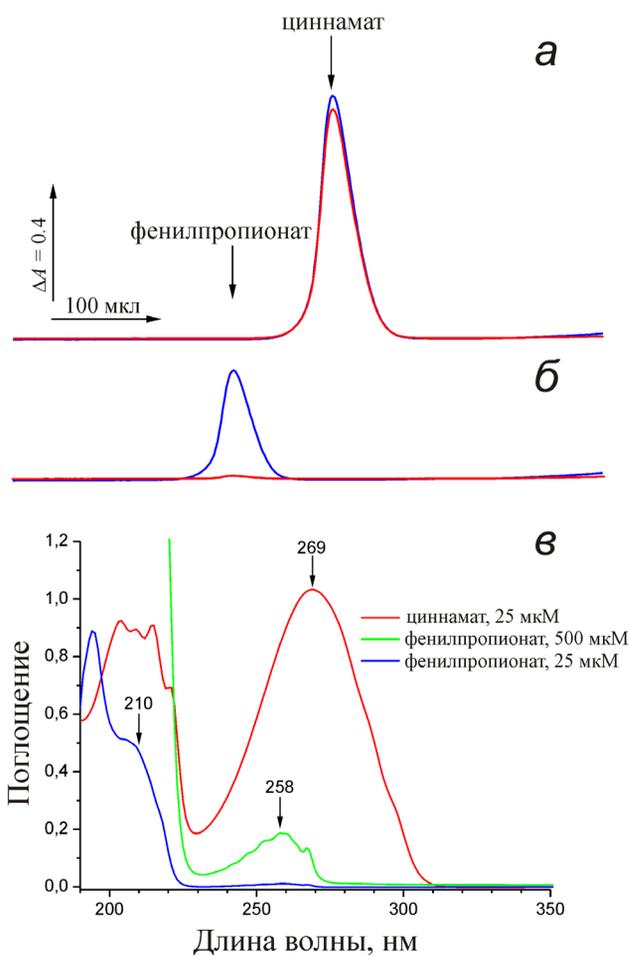


Рис. 3. Определение продукта восстановления коричной кислоты белком Crd с помощью ВЭЖХ. Циннамат (0,1 мМ) инкубировали в присутствии 10 мМ дитионита натрия, 50 мкМ MV и 0,5 мкМ fCrd. а – Реакционная среда до добавки fCrd. б – То же самое после 30-мин инкубации с fCrd. Профиль элюции отслеживали при 210 (синяя кривая) и 258 нм (красная кривая). Объемы удержания для стандартов циннамата и фенилпропионата указаны стрелками. в – УФ-спектры циннамата и фенилпропионата в 10 мМ фосфате калия (рН 6,5)

временем их удержания в ходе ВЭЖХ, но и тем, что амплитуды пиков при 210 и 258 нм были приблизительно одинаковы в случае циннамата и различались приблизительно в 40 раз в случае фенилпропионата, что находится в хорошем согласии с УФ-спектрами этих соединений (рис. 3, в). Полученные данные указывают на то, что ферментативная активность Crd заключается в восстановлении α,β -двойной связи в (гидрокси)коричневых кислотах с образованием соответствующих насыщенных соединений.

Была также проведена проверка способности Crd осуществлять катализируемую реакцию в обратном направлении. Было установлено, что этот белок катализирует окисление фенилпропионата при использовании феназинметасульфата и DCPIP в качестве акцепторов электронов, хотя и с очень низкой скоростью $0,1 \text{ с}^{-1}$.

Индукция синтеза Crd в клетках *V. ruber* под действием ненасыщенных карбоновых кислот. Для определения способности различных субстратов Crd вызывать индукцию синтеза этого белка в клетках *V. ruber* проводили выращивание этой бактерии как в аэробных, так и в анаэробных условиях при отсутствии или в присутствии различных 2-еноатов. Далее, из выращенных клеток получали осветленный клеточный лизат и измеряли его удельную MV:циннамат редуктазную активность.

Как показано в табл. 2, добавление 10 мМ циннамата (максимальная концентрация этого соединения, еще не вызывающая значительного подавления роста *V. ruber*) приводило к существенной индукции синтеза Crd. Этот эффект наблюдался как в аэробных, так и в анаэробных условиях, хотя максимальная активность обнаруживалась при отсутствии кислорода в среде выращивания. Параллельные измерения показали более чем 10-кратное увеличение уровня транскрипции гена *crdB* в присутствии циннамата, это указывает на то, что в клетках *V. ruber* MV:циннамат редуктазная активность осуществляется за счет функционирования Crd.

Другие способные восстанавливаться под действием Crd карбоновые кислоты, за исключе-

нием акрилата, также оказались способны индуцировать синтез этого белка в анаэробных условиях (рис. 4). Эти соединения добавляли в среду роста в концентрации 2 мМ, так как это была максимальная концентрация в случае акрилата и кофеата, при которой еще наблюдался рост *V. ruber* в анаэробных условиях.

Активация выделенного Crd в присутствии NADH. CrdAB содержит в своем составе домены *NADH:flavin* (рис. 1, а), поэтому можно было предположить, что NADH является природным донором восстановительных эквивалентов для этого фермента. Так как ферулат, кофеат и *n*-кумарат обладают существенным поглощением света при 340 нм, NADH-окисляющую активность Crd определяли при использовании не поглощающих при 340 нм циннамата или акрилата в качестве акцепторов электронов. Как показано на рис. 5, а (красная кривая), при проведении реакции в анаэробных условиях и ее запуске добавкой циннамата наблюдалось линейное во времени окисление NADH с относительно высокой удельной активностью 15 с^{-1} . Однако изменение порядка добавок приводило к существенному изменению хода катализируемой реакции. В ходе реакции, запущенной добавкой fCrd, наблюдался огромный временной лаг (синяя кривая на рис. 5, а). Хотя начальная скорость реакции в этом случае была очень малой, конечная скорость оказывалась сопоставимой с той, которая показана красной кривой и, по-видимому, соответствует полностью активированному Crd. Такой же временной лаг наблюдался и при запуске реакции добавкой NADH.

Эти данные означают, что выделенный fCrd неактивен и требует для активации преинкубации с NADH. Так как продолжительность временного лага в циннамат редуктазной активности не зависела от концентрации fCrd (данные не представлены), то можно заключить, что активация этого фермента не связана с изменением его олигомерной структуры. Также активация при отсутствии циннамата происходила значительно быстрее, чем в его присутствии (рис. 5, а), так как время преинкубации Crd с NADH для красной кривой этого рисунка составляло приблизительно 5 мин

Таблица 2. Корреляция между величиной MV:циннамат редуктазной активности и уровнем транскрипции гена *crdB* в клетках *V. ruber*, выращенных в различных условиях

Условия выращивания	Активность Crd ($\text{нмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$)	<i>crdB</i> мРНК/рРНК $\times 10^{-6}$
Без циннамата, без O_2	$1,2 \pm 0,4$	$2,1 \pm 0,2$
Без циннамата, $+\text{O}_2$	$0,5 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,1$
10 мМ циннамат, без O_2	86 ± 11	31 ± 4
10 мМ циннамат, $+\text{O}_2$	19 ± 3	25 ± 2

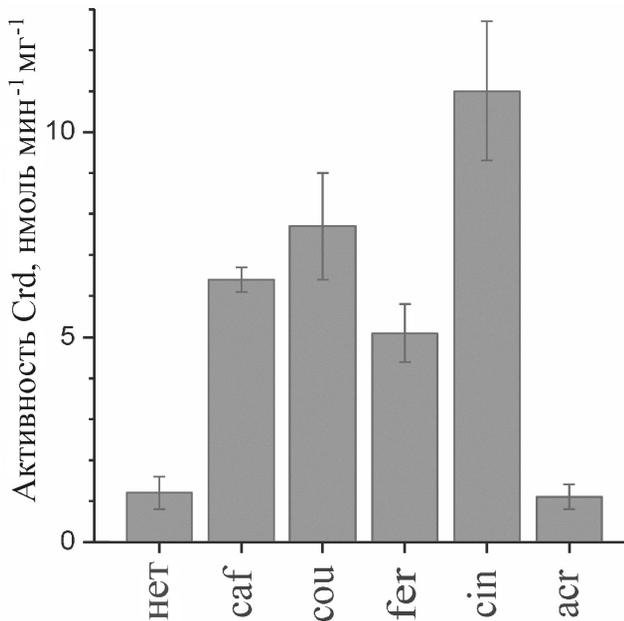


Рис. 4. MV:циннаमत редуктазная активность в клетках *V. ruber*, выращенных анаэробно в присутствии 2 мМ кофеата (caf), *p*-кумарата (cou), ферулата (fer), циннамата (cin) или акрилата (acr). Планки погрешностей показывают стандартное отклонение для двух биологических повторов

и было достаточным для полной активации при отсутствии акцептора электронов. Преинкубация фермента с 5 мМ дитионитом в течение 5 мин до старта реакции добавкой fCrd активировала фермент до того же самого уровня, что и преинкубация с NADH (данные не представлены). Таким образом, можно предположить, что для перехода Crd в активную форму необходимо не связывание NADH, а восстановление какой-то простетической группы этого белка.

Для последующего анализа проводили дифференцирование полученных кривых активации (рис. 5, а; синяя кривая) с получением кривых зависимости активности фермента от времени инкубации (рис. 5, б). Сигмоидальный характер этих кривых показывал, что активация Crd не является одностадийным процессом. Эти кривые не могли быть адекватно описаны и двухстадийным процессом (красная линия), но могли быть фитированы модельным процессом, состоящим из трех последовательных стадий (зеленая кривая). При фитировании мы предполагали, что константы скорости протекания всех стадий одинаковы, так как при этом достигается максимально продолжительный временной лаг в образовании конечного продукта. Для трехстадийного процесса определенное таким способом значение констант скоростей отдельных стадий составляло $0,060 \pm 0,003 \text{ с}^{-1}$. Таким образом, процесс активации Crd в присутствии NADH состоит из не менее чем трех стадий.

Похожую, но более быструю активацию Crd в ходе катализируемой реакции наблюдали и при анаэробном восстановлении акрилата, запущенном добавкой фермента (рис. 5, в). Максимальная ферментативная активность при использовании этого субстрата ($3,5 \text{ с}^{-1}$) составляла 23% от таковой при использовании циннамата, хотя при использовании MV в качестве донора электронов эта активность составляла лишь 6% от соответствующей активности с использованием циннамата (табл. 1). Кинетический анализ показал, что активация Crd в присутствии NADH и акрилата может быть описана двухстадийным процессом (рис. S2 в Приложении) со значением обеих констант скоростей, равном $0,27 \pm 0,02 \text{ с}^{-1}$. Также было показано, что активация Crd в присутствии NADH и при отсутствии акцепторов электронов (рис. S2 в Приложении; квадраты на левой панели) была быстрее, чем при их присутствии (рис. S2 в Приложении; кружки на левой панели; рис. 5, б; кружки). Кинетический анализ показал, что активация Crd в этом случае также может быть описана двумя последовательными стадиями с усредненной константой скорости $0,75 \pm 0,15 \text{ с}^{-1}$.

При использовании MV в качестве донора электронов (табл. 1) не наблюдалось какой-либо активации фермента во время его работы вне зависимости от порядка внесения fCrd и его субстратов. Эти результаты указывают на то, что активация/деактивация fCrd связана с функционированием его NADH-связывающих доменов *NADH:flavin*. Этот вывод подтверждался наблюдением активации фермента при катализе анаэробной NADH:FMN редуктазной реакции при ее старте добавкой fCrd (рис. 5, з). В этом случае кинетика активации была более сложной и адекватно не описывалась даже трехстадийным процессом (рис. S2 в Приложении; правая панель).

Crd, активированный инкубацией с NADH, оставался полностью активным до полного окисления NADH в ходе ферментативной реакции. Однако фермент медленно деактивировался после истощения донора электронов. В эксперименте, показанном на рис. 6, а, реакция, запущенная добавкой акрилата к преактивированному fCrd, протекала линейно до полного окисления NADH. Вторая порция добавленного NADH восстанавливала активность Crd до уровня, зависящего от временного интервала t до повторной добавки этого донора электронов (рис. 6, б). При больших значениях t реакция протекала нелинейно с временным лагом, как на рис. 5, в (синяя кривая), и активировалась до конечных значений, сходных с таковыми для красной кривой на рис. 5, в и левой кривой на рис. 6, а. Эти данные показывают, что активированный fCrd подвержен процессу постепенной деактивации при отсутствии NADH, но может быть снова

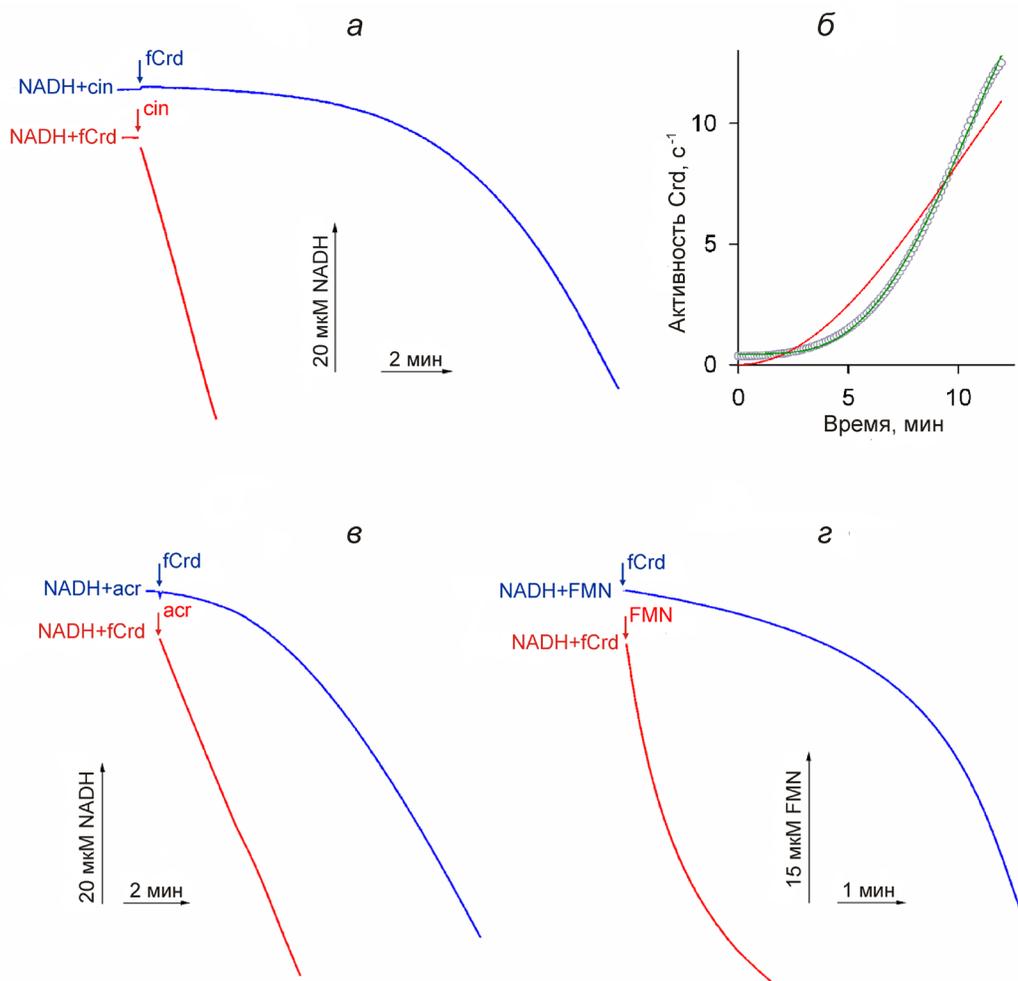


Рис. 5. Типичный ход катализируемых fCrd NADH-зависимых реакций в анаэробных условиях. *а* – Циннамат-зависимое окисление NADH. Конечная среда измерения содержала 120 мкМ NADH, 50 мкМ циннамата и 30 нМ fCrd. Реакцию запускали либо добавкой циннамата (cin, красная кривая), либо добавкой fCrd (синяя кривая). *б* – Зависимость активности Crd от времени протекания NADH:циннамат редуктазной реакции, запущенной добавкой Crd. Маленькими кружками показаны значения активности Crd в каждый момент времени, полученные дифференцированием $(-d[\text{NADH}]/dt)$ исходной кривой протекания реакции (синяя кривая на панели *а*) с использованием программного пакета Matlab. Красная и зеленая кривые показывают результаты фитирования с использованием двух- или трехстадийных кинетических моделей соответственно. *в* – Акрилат-зависимое окисление NADH. Конечная реакционная среда содержала 120 мкМ NADH, 1 мМ акрилата и 150 нМ fCrd. Реакцию запускали добавкой акрилата (acr, красная кривая) или fCrd (синяя кривая). *г* – NADH-зависимое восстановление FMN. Конечная среда измерения содержала 120 мкМ NADH и 50 мкМ FMN. Концентрация fCrd составляла 15 нМ (красная кривая, реакцию запускали добавкой FMN) или 60 нМ (синяя кривая, реакцию запускали добавкой fCrd)

медленно переведен в активное состояние после инкубации с восстановителем. Деактивация fCrd могла быть описана одностадийным процессом с полувременем 4,7 мин (рис. 6, б).

В аэробных условиях NADH-окисляющая активность Crd была очень низкой и не изменялась с течением времени (рис. 7, черная (1) кривая). Это значительно отличается от данных, полученных для других NADH:2-еноат и NADH:флавин редуктаз, которые способны окислять NADH с высокой скоростью при использовании O_2 в качестве акцептора электронов [3, 4, 27], и означает, что молекулярный кислород препятствует активации Crd.

Для определения действия O_2 на активную форму Crd, фермент преинкубировали с NADH в анаэробных условиях и запускали реакцию добавкой избытка циннамата (рис. 7, красная (2) кривая). После этого в среду измерения вносили кислород в форме H_2O_2 . В этих экспериментах использовали пониженные концентрации глюкозооксидазы и повышенную концентрацию каталазы. Как показано на рис. 7, пульс кислорода вызывал медленную инактивацию Crd, сопровождаемую после исчерпания O_2 реактивацией фермента до его исходной активности. Продолжительность переходной стадии деактивации уменьшалась при повышении

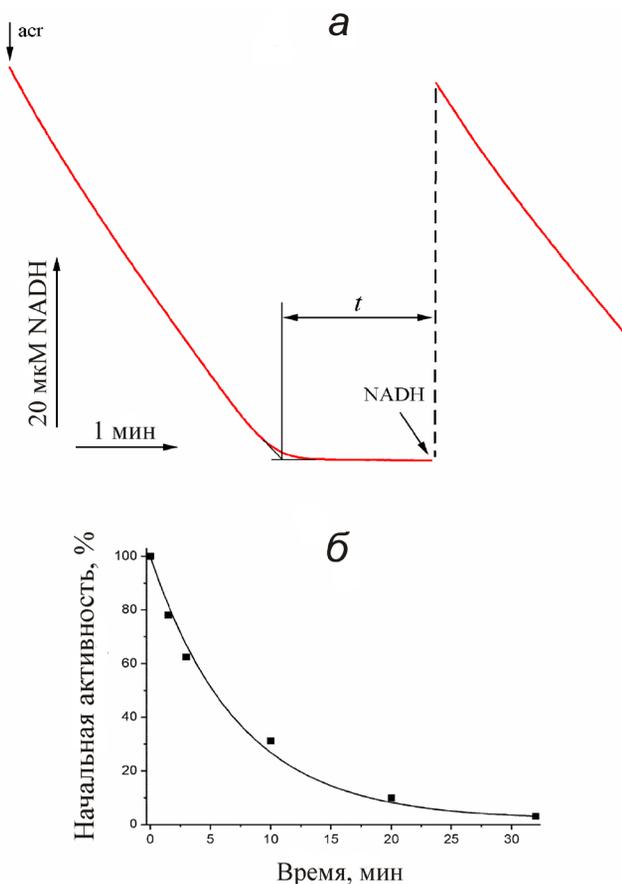


Рис. 6. Деактивация Crd. *a* – Анаэробное окисление NADH в присутствии fCrd и 1 мМ акрилата (acr). По завершении реакции при исчерпании NADH его концентрацию восстанавливали повторной добавкой до исходного уровня (~50 мкМ) после паузы в 90 с. Условия эксперимента такие же, как в случае рис. 5, в. *б* – Значения начальных скоростей окисления NADH, измеренные для второй порции добавленного NADH как функция от временного интервала *t* до его повторного внесения. 100% соответствует исходной активности фермента, измеренной для левой кривой на панели (*a*). Теоретическая кривая представляет собой моноэкспоненту с полувременем 4,7 мин

концентрации глюкозооксидазы в среде измерения (данные не представлены). Эти данные показывают, что деактивация фермента в присутствии кислорода обратима, что, по-видимому, позволяет регулировать активность Crd концентрацией O₂.

Для проверки способности fCrd окислять NADPH этот белок активировали в присутствии 30 мкМ NADH, и сразу после его исчерпания в присутствии избытка акрилата в реакционную среду добавляли 120 мкМ NADPH. Было показано, что скорость окисления NADPH при этой концентрации приблизительно в 35 раз ниже по сравнению со скоростью окисления NADH. Таким образом, именно NADH, по-видимому, является природным донором восстановительных эквивалентов для Crd.

Роль различных доменов Crd в его ферментативных активностях. Crd способен катализиро-

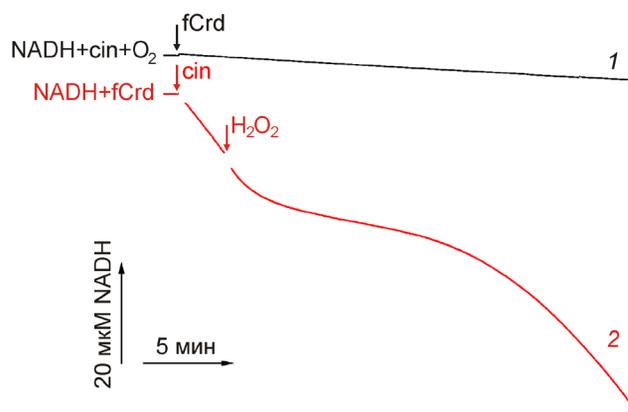


Рис. 7. Обратимая инактивация Crd под действием кислородного пульса в ходе протекания NADH-зависимого восстановления циннамата. Кривая 1 – реакцию запускали добавкой fCrd и проводили в аэробных условиях (при отсутствии глюкозооксидазы и каталазы). Все прочие условия эксперимента такие же, как для красной кривой на рис. 5, *a*. Кривая 2 – реакцию запускали добавкой 500 мкМ циннамата и проводили в анаэробных условиях до указанной добавки 500 мкМ H₂O₂ (создающей 250 мкМ концентрацию молекулярного кислорода). Концентрации глюкозооксидазы и каталазы в данном эксперименте составляли 0,6 и 50 ед./мл соответственно. Конечные среды измерения в обоих экспериментах также содержали 120 мкМ NADH и 30 нМ fCrd

вать окислительно-восстановительные реакции между различными природными и искусственными донорами и акцепторами электронов. Для того чтобы установить, какие домены Crd ответственны за осуществление разных активностей, эти активности были измерены на апо- и флавилированной формах Crd, а также на различных фрагментах этого белка. Было показано, что MV:циннамат редуктазная активность была намного выше у fCrd по сравнению с aCrd (не содержащим *FMN) и с фрагментом d3 (содержащим только домен *FAD binding 2*) (табл. 3). Эти данные показывают, что, так же как и в NADH:фумарат редуктазе *Klebsiella pneumoniae* [3], домен *FAD binding 2* необходим для восстановления природного акцептора электронов и что электрон-переносный путь от MV к этому домену включает в себя *FMN в домене *FMN bind*.

В то же время высокая NADH:FMN редуктазная активность была присуща не только полноразмерной флавилированной форме фермента (fCrd), но также и его апо-форме и фрагменту d1 (содержащему только домены *NADH:flavin*). Таким образом, можно заключить, что эта реакция катализируется доменами *NADH:flavin*. Важно отметить, что все NADH:FMN редуктазные активности, в том числе и осуществляемая фрагментом d1, демонстрировали выраженный временной лаг при старте реакции добавкой фермента, как показано на рис. 5, *з* (синяя кривая).

Таблица 3. Каталитические активности препаратов Crd и его фрагментов^a

Вариант Crd	Простетические группы	Активность, с ⁻¹		
		MV:циннамат	NADH:циннамат	NADH:FMN
fCrd	2 FMN, 1 FAD, 1 *FMN ^b	22 ± 2	15 ± 2	62 ± 15
aCrd	2 FMN, 1 FAD	0,7 ± 0,1	<0,05	58 ± 13
d1	2 FMN	Н.О. ^в	<0,05	48 ± 21
d3	1 FAD	0,7 ± 0,1	<0,05	Н.О.

Приложение. ^a Среда измерения содержала 120 мкМ NADH или 100 мкМ восстановленного MV в качестве донора электронов и 50 мкМ циннамата или FMN в качестве акцептора электронов. Значения активности приведены для реакций, запущенных добавкой акцептора электронов (реакции, запущенные добавкой фермента, сопровождалась значительным временным лагом).

^b Звездочкой отмечен ковалентно связанный флавин.

^в Н.О. – не определяли.

Полная NADH:циннамат редуктазная активность осуществлялась только fCrd, но не aCrd, не *FMN. Эти данные показывают роль *FMN в передаче электронов от NADHдегидрогеназного участка (d1) Crd на его циннамат редуктазный участок (d3).

Отдельный домен *FAD binding 2* (фрагмент d3) был способен катализировать FMN₂:циннамат редуктазную реакцию ($0,60 \pm 0,05$ с⁻¹, данные не представлены). Из-за этого возникает возможность катализа полной NADH:циннамат редуктазной реакции при смешении в соотношении 1/1 фрагментов d1 и d3 в присутствии избытка свободного FMN. Такая активность действительно была обнаружена. И хотя ее величина ($3,2 \pm 0,4$ с⁻¹, данные не представлены) была меньше, чем у fCrd, она значительно превышала FMN₂:циннамат редуктазную активность d3. Этот неожиданный результат может тем не менее быть объяснен разными условиями измерения этих двух активностей. Среда измерения FMN₂:циннамат редуктазной активности, кроме восстановленного FMN, содержала существенные количества окисленной формы этого кофермента, что могло приводить к ингибированию катализа реакции за счет повышения окислительно-восстановительного потенциала пары FMN₂^{free}/FMN^{free}. В противоположность этому, при стационарных условиях протекания NADH:циннамат редуктазной реакции, катализируемой смесью d1 + d3, практически весь FMN находился в восстановленной форме. Наличие полной NADH:циннамат редуктазной активности у смеси фрагментов d1 и d3 в присутствии свободного FMN сходно со случаем водорастворимой фумаратредуктазы дрожжей [28], где роль фрагментов d1 и d3 выполняют отдельные ферменты, а перенос электронов между ними осуществляется свободными формами цитоплазматических флавинов.

Моделирование трехмерной структуры Crd. Было проведено предсказание 3D-структуры гетеродимерного белка Crd с помощью программы AlphaFold2 [21]. Полученная структура состояла из двух частей, соединенных гибким линкером (рис. 8). Одна из частей соответствовала фрагменту d1, состоящему из субъединицы CrdA и гомологичного ей N-концевого домена *NADH:flavin* субъединицы CrdB. Эта часть Crd была сходна с трехмерными структурами гомодимерных NADH:флавинов редуктаз [16, 29]. Вторая часть белка состояла из двух других доменов CrdB – *FAD binding 2* и *FMN bind*.

Четыре флавиновые простетические группы (три молекулы FMN и одну молекулу FAD в их окисленном состоянии), а также NADH и циннамат были размещены в полученной модельной структуре с помощью программы AutoDock Vina [23]. Расположение флавиновых групп (рис. 8) было сходным с таковым для экспериментально определенных 3D-структур NAD(P)H:FMN редуктазы (PDB ID: 1X77; [29]), субъединицы NqrC Na⁺-транслоцирующей NADH:хинон оксидоредуктазы (PDB ID: 4XA7; [30]) и уроканатредуктазы (PDB ID: 6T87; [31]), гомологичных доменам *NADH:flavin*, *FMN bind* и *FAD binding 2* Crd соответственно.

d1-Часть Crd содержит два потенциальных псевдосимметричных NADH-связывающих сайта вблизи флавинов FMN_A и FMN_B, сходных с таковыми, обнаруженными в гомодимерной NADH:флавинов редуктазе [16]. Однако, по-видимому, только FMN_B-сайт может связывать NADH из-за того, что вход нуклеотида в сайт в области FMN_A блокирован C-концевым сегментом CrdA (рис. S3 в Приложении). В соответствии с этим предположением, позиции связывания NADH располагались в двух областях в окрестности FMN_A. Наименьшее расстояние между NADH и FMN_A составляло 10 Å, что слишком далеко для переноса гидрид-иона между

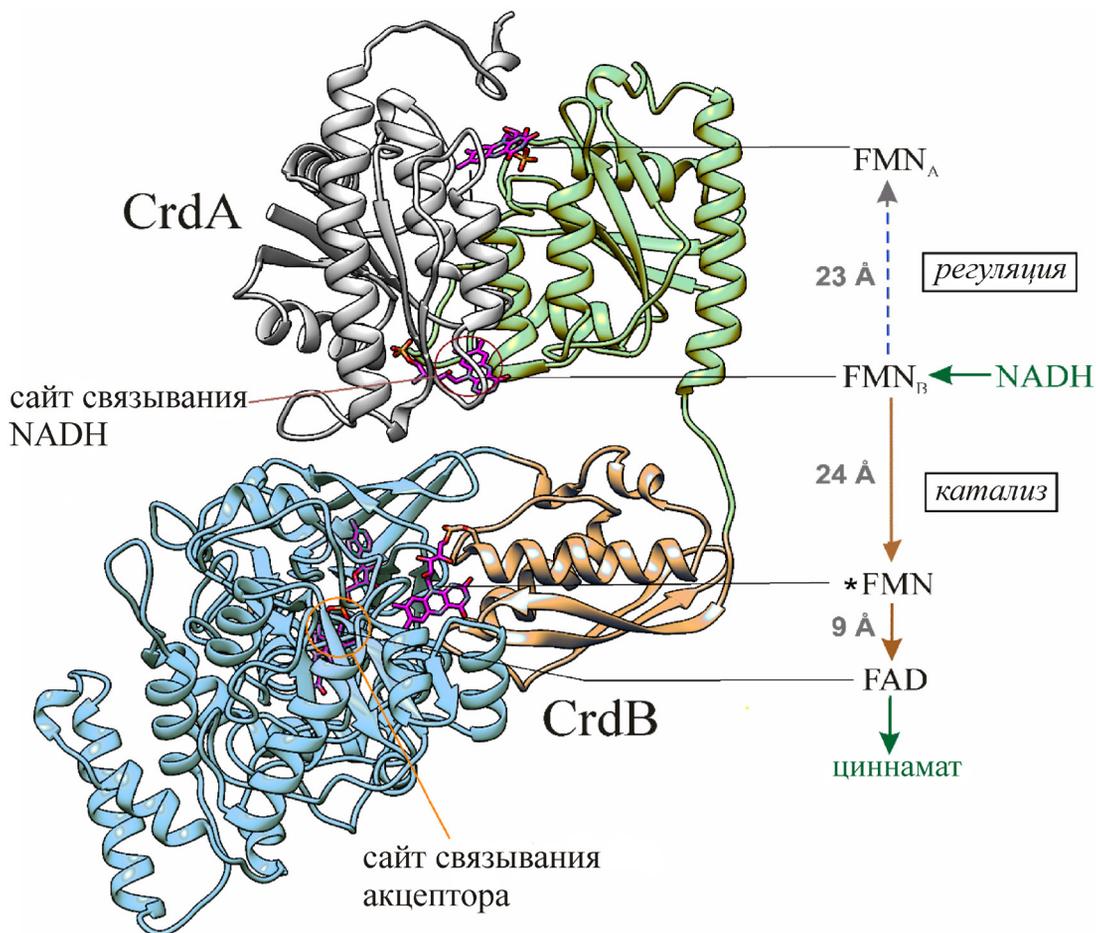


Рис. 8. Предсказанная трехмерная структура Crd со связанными флавиновыми простетическими группами. Домены показаны разными цветами, соответствующими использованным на рис. 1, а. Правая часть рисунка показывает межкраевые расстояния между простетическими группами и предполагаемые пути переноса электрона и гидрид-иона (показаны коричневыми и зелеными стрелками соответственно)

двумя этими группами (для сравнения, расстояние между NADH и FMN_B составляло всего 4 Å). Расчетные эксперименты по докингу не выявляли какого-либо NADH-связывающего участка в домене *FMN bind*. Расположение циннамата в домене *FAD binding 2* CrdB оказалось сходным с таковым для уроканата в уроканатредуктазе [31].

Межкраевое расстояние между FAD и *FMN составляло ~9 Å (рис. 8), что должно приводить к быстрому переносу электронов между двумя этими флавиновыми группами. Это находится в хорошем согласии с наблюдением, что данная стадия не является скорость-лимитирующей в известных NADH:2-еноат редуктазах [3]. В противоположность этому, FMN_B и *FMN разделены расстоянием в 24 Å (рис. 8), то есть расстоянием, при котором невозможен быстрый перенос электрона. Таким образом, для переноса электрона между FMN_B и *FMN Crd во время катализа должен принимать какую-то альтернативную конформацию, сближающую эти две флавиновые группы. Интересно отметить, что эта же стадия электронного транс-

порта является скорость-лимитирующей в канонических NADH:2-еноат редуктазах [3], указывая на то, что и в них данное расстояние не является оптимальным.

Качество предсказанной с помощью AlphaFold2 модельной структуры со связанными флавинами было подтверждено МД-симуляцией (рис. S4 в Приложении). В частности, во время проведенных симуляций ни одна из флавиновых групп не была потеряна. Более того, симуляции не приводили к изменению полученной с помощью AlphaFold2 структуры, за исключением движения d1-части, как целого, на 11 Å относительно остальной части белка (рис. S4, а и с в Приложении). Этот результат подтверждает гибкость линкера, соединяющего две части Crd. Тем не менее расстояние между флавиновыми группами существенно не изменялось в симулированной структуре (рис. S4, b в Приложении), также оно оставалось неизменным в аналогичной структуре, содержащей восстановленные формы флавиновых кофакторов (данные не представлены).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Трехдоменные NADH:2-еноат редуктазы широко распространены среди анаэробных и факультативно-анаэробных про- и эукариотических микроорганизмов, что указывает на их важную метаболическую роль. Ферменты с NADH:фумарат редуктазной активностью участвуют в анаэробном дыхании, способствуя реокислению образованного в ходе гликолиза NADH для увеличения продукции АТФ при сбраживании субстратов. Эта роль наиболее полно показана для одноклеточных эукариот класса Kinetoplastida, у которых сукцинат является одним из основных продуктов брожения, а инактивация гликосомальной и митохондриальной NADH:фумарат редуктаз полностью предотвращает фумаратное дыхание [32]. NADH:2-еноат редуктазы с другими субстратными специфичностями могут выполнять и другие функции. Например, NADH:акрилат редуктаза морской бактерии *V. harveyi*, по-видимому, вовлечена в процесс детоксификации акрилата [4], часто присутствующего в разнообразных морских средах обитания, за счет деградации диметилсульфониопропионата, основного осмолита морских водорослей.

Несмотря на то что циннамат редуктаза Crd из *V. ruber* структурно схожа с такими трехдоменными NADH:2-еноат редуктазами, как фумаратредуктаза *K. pneumoniae* и кинетопластид, а также акрилатредуктаза *V. harveyi*, в описанном в ходе данной работы белке наблюдаются и существенные особенности. Во всех этих ферментах восстановление 2-еноата происходит в домене *FAD binding 2* с помощью электронов, перенесенных с ковалентно связанного FMN в домене *FMN bind* [3]. Однако окисление NADH в Crd осуществляется доменом *NADH:flavin*, а не доменом *OYE-like* (как в NADH:фумарат редуктазе *K. pneumoniae* и NADH:акрилат редуктазе *V. harveyi*) или *FAD binding 6* (как в NADH:фумарат редуктазах кинетопластид).

Более того, только Crd содержит в своем составе дополнительную субъединицу (CrdA), представляющую собой одиночный домен *NADH:flavin*, гомологичный такому же домену субъединицы CrdB (51% идентичности, 65% схожести). Ген этой добавочной субъединицы (*crdA*) соседствует с геном *crdB* на одной из хромосом *V. ruber* (рис. 1, в). Это, наряду с наблюдением о совыделении CrdA с 6×His-меченным CrdB на никелевом носителе, указывает на то, что эти два белка образуют прочный комплекс CrdA–CrdB *in vivo*. Определенная стехиометрия для нековалентно связанных с белком FMN и FAD, равная 2/1, также находится в хорошем согласии с гетеродимерным строением Crd, так как NADH:флавин редуктазы прокариот обычно кодируются одним геном, однако функционируют в

виде гомодимера, нековалентно связывающего в качестве простетических групп две молекулы FMN в зоне контакта мономеров [16, 29]. Такое гомодимерное строение NADH:флавин редуктазы, по-видимому, затрудняет прямое слияние этого белка с другими белками с образованием протяженного мультидоменного полипептида.

В аэробных условиях трехдоменные NADH:2-еноат редуктазы катализируют восстановление O_2 с образованием активных форм кислорода (АФК). Например, NADH:фумарат редуктаза *K. pneumoniae* в присутствии кислорода окисляет NADH с формированием H_2O_2 . В этих условиях не наблюдается ускорения окисления NADH в присутствии фумарата, указывая на то, что практически все восстановительные эквиваленты расходуются на образование H_2O_2 [3]. В каких-то случаях образование АФК может быть выгодно для организма. Так, предполагается, что продукция АФК NADH:фумарат редуктазами кинетопластид служит сигналом для завершения цикла развития этих паразитов в организме насекомого-переносчика [33]. Однако интенсивная продукция АФК при переходе в аэробные условия должна быть токсичной для большинства факультативно-анаэробных микроорганизмов. Так, накопление H_2O_2 в среде роста в миллимолярных концентрациях за счет функционирования NADH:флавин редуктазы приводит к гибели клеток молочно-кислой бактерии *Lactobacillus johnsonii* в аэробных условиях [27].

Использование в Crd из *V. ruber* доменов *NADH:flavin* вместо домена *OYE-like* или *FAD binding 6*, присутствующих в других NADH:2-еноат редуктазах, по-видимому, разрешает проблему активной продукции АФК. Домены *NADH:flavin* Crd позволяют использовать уникальный механизм регуляции, обратимо инактивирующий Crd при высоких концентрациях O_2 (рис. 7). Переход между активным и неактивным состояниями в Crd, по-видимому, контролируется редокс-состоянием одной или обеих молекул FMN в доменах *NADH:flavin*. Это заключение подтверждается данными о том, что Crd может быть активирована не только NADH, но и дитионитом, а также тем, что активация/деактивация парциальной ферментативной активности наблюдается на фрагменте d1, но не на фрагменте d3.

Регуляция Crd, по-видимому, связана с гетеродимерной структурой ее NADH-дегидрогеназной части, состоящей из субъединицы CrdA и гомологичного N-концевого домена CrdB (рис. 8). Эта часть Crd сходна с NADH:флавин редуктазами [16, 29], и она также содержит две молекулы нековалентно связанного FMN и два потенциальных сайта окисления NADH. Однако возможность функционирования предполагаемого NADH-связывающего

сайта вблизи FMN_A находится под вопросом из-за стерического эффекта C-концевой петли CrdA, по-видимому, препятствующей связыванию этого кофактора. И если перенос электронов между FMN_B и *FMN может быть осуществлен за счет подвижности *FMN и/или димера доменов *NADH:flavin*, то большое расстояние между FMN_B и FMN_A (рис. 8) не может быть уменьшено подобным образом. Таким образом, перенос электронов между этими флавиновыми группами всегда должен быть медленнее, чем скорость оборота фермента [34]. Эти структурные соображения указывают на то, что FMN_B и FMN_A являются хорошими кандидатами на роль каталитической и регуляторной группы соответственно. Различная роль двух нековалентно связанных FMN в Crd хорошо согласуется со значительными различиями в аминокислотных последовательностях двух доменов *NADH:flavin* в этом белке, в отличие от случая гомодимерных и, следовательно, симметричных *NADH:flavin* редуктаз с двумя идентичными FMN-сайтами [16]. Можно далее предположить, что активация Crd заключается в последовательном восстановлении FMN_B и FMN_A, вызывающем конформационные изменения в белке и формирование функционального пути переноса электронов, связывающего между собой их донор и акцептор.

Замедление активации Crd акцепторами электронов объясняется, по-видимому, их конкуренцией с регуляторной простетической группой (FMN_A) за восстановительные эквиваленты, полученные ферментом при окислении *NADH*. В этом случае скорость активации в присутствии акцепторов электронов должна быть обратно пропорциональна скорости их восстановления. Действительно, такая корреляция наблюдалась – циннамат восстанавливается быстрее (табл. 1) и сильнее замедляет активацию Crd по сравнению с акрилатом (рис. 5). В этом случае отсутствие активации Crd в аэробных условиях может быть объяснено тем, что O₂ способен окислять регуляторную простетическую группу напрямую, без участия длинной цепи переноса электронов, как в случае циннамата или акрилата.

Несмотря на схожесть аминокислотных остатков, вовлеченных в связывание 2-еноата в доменах *FAD binding 2* акрилатредуктазы и Crd (рис. 1, б), последний фермент обладает 1000–6000-кратно меньшей каталитической эффективностью по отношению к акрилату по сравнению с катализом восстановления циннамата и его производных (табл. 1). Более того, (гидрокси)коричные кислоты, но не акрилат, вызывали индукцию синтеза Crd в клетках *V. ruber* (рис. 4). Таким образом, позиции аминокислотных остатков, взаимодействующих с карбоксильными группами акцептора электронов в fumarатредуктазах, не являются

единственными детерминантами субстратной специфичности других *NADH:2-еноат* редуктаз. Восстановление токсичных для клеток [35] циннамата и его производных, по-видимому, является основной физиологической ролью Crd. Это заключение хорошо согласуется с индукцией синтеза белка Crd не только в анаэробных, но и в аэробных условиях (табл. 2). Наряду с этим, возможно, Crd способен поддерживать анаэробное дыхание *V. ruber* с использованием циннамата и его гидроксильных производных, как это описано для кофеил-CoA редуктазы из ацетогенной бактерии *Acetobacterium woodii* [36]. Самые эффективные субстраты Crd (кофеат и ферулат) являются предшественниками при синтезе лигнина и других вторичных фенольных метаболитов в наземных растениях. Поэтому эти соединения широко распространены в разнообразных наземных средах обитания (например, в почве и кишечнике животных), но редко встречаются в морских нишах, где они синтезируются лишь очень немногочисленными водорослями [37, 38]. Интересным исключением из этого правила являются заросли морской травы, накапливающие высокие концентрации кофейной кислоты и других фенольных соединений в своей ризосфере [35], которая, возможно, и является основной средой обитания Crd-содержащих морских бактерий [39].

Схожие с Crd редуктазы довольно редко встречаются среди морских организмов, по-видимому, из-за малой распространенности (гидрокси)коричных кислот в морской среде обитания. Так, поиск с помощью программы Blast выявляет Crd-подобные белки лишь у таких морских бактерий, как *Vibrio rhizosphaerae*, *Vibrio gazogenes*, *Vibrio salinus*, *Vibrio spartinae* и *Vibrio tritonius*. В то же время эти белки довольно широко распространены среди наземных анаэробных микроорганизмов, в том числе среди бактерий, входящих в состав микробиома кишечника человека. Эти белки встречаются у многочисленных представителей родов *Clostridium*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Aeromonas*, *Paenibacillus*, *Streptococcus* и многих других. В кишечнике млекопитающих наблюдается довольно высокая концентрация фенилпропионата и *n*-гидроксифенилпропионата [40]. Ранее считалось, что образование этих соединений связано с функционированием негомологичной Crd двухдоменной 2-еноат редуктазы [1]. Однако широкое распространение Crd-подобных белков у кишечных бактерий позволяет предположить, что эти белки также вовлечены в образование фенилпропионата и *n*-гидроксифенилпропионата в кишечнике.

Двухдоменные 2-еноат редуктазы имеют значительный потенциал для применения в различных областях биотехнологии для продукции хиральных соединений, лекарств и ароматизи-

рующих добавок [11, 41]. Однако их применение в значительной степени осложняется тем, что эти ферменты крайне чувствительны к кислороду и быстро и необратимо инактивируются в аэробных условиях [1, 11]. Таким образом, менее чувствительные к O₂ Crd-подобные белки являются привлекательной альтернативой для практического применения.

Вклад авторов. А.В. Богачев – концепция работы; Ю.В. Берцова, М.В. Серебрякова, В.А. Анашкин, А.А. Байков, А.В. Богачев – получение результатов и анализ данных; А.А. Байков и А.В. Богачев – написание и редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00133).

Благодарности. MALDI-MS и лазерный сканер были доступны для нас в результате реализации Программы развития Московского государственного университета 5.13. Эта работа посвящена светлой памяти Владимира Петровича Скулачева.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте издательства Springer (www.springer.com/journal/10541), том 89, вып. 2, 2024.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tischer, W., Bader, J., and Simon, H. (1979) Purification and some properties of a hitherto-unknown enzyme reducing the carbon-carbon double bond of α,β -unsaturated carboxylate anions, *Eur. J. Biochem.*, **97**, 103-112, <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033>.
2. Besteiro, S., Biran, M., Biteau, N., Coustou, V., Baltz, T., Canioni, P., and Bringaud, F. (2002) Succinate secreted by *Trypanosoma brucei* is produced by a novel and unique glycosomal enzyme, NADH-dependent fumarate reductase, *J. Biol. Chem.*, **277**, 38001-38012, <https://doi.org/10.1074/jbc.M201759200>.
3. Bertsova, Y. V., Oleynikov, I. P., and Bogachev, A. V. (2020) A new water-soluble bacterial NADH: fumarate oxidoreductase, *FEMS Microbiol. Lett.*, **367**, fnaa175, <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa175>.
4. Bertsova, Y. V., Serebryakova, M. V., Baykov, A. A., and Bogachev, A. V. (2022) A novel, NADH-dependent acrylate reductase in *Vibrio harveyi*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **88**, e0051922, <https://doi.org/10.1128/aem.00519-22>.
5. Bertsova, Y. V., Kostyrko, V. A., Baykov, A. A., and Bogachev, A. V. (2014) Localization-controlled specificity of FAD:threonine flavin transferases in *Klebsiella pneumoniae* and its implications for the mechanism of Na⁺-translocating NADH:quinone oxidoreductase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 1122-1129, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.12.006>.
6. Serebryakova, M. V., Bertsova, Y. V., Sokolov, S. S., Kolesnikov, A. A., Baykov, A. A., and Bogachev, A. V. (2018) Catalytically important flavin linked through a phosphoester bond in a eukaryotic fumarate reductase, *Biochimie*, **149**, 34-40, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.03.013>.
7. Rohdich, F., Wiese, A., Feicht, R., Simon, H., and Bacher, A. (2001) Enoate reductases of *Clostridia*. Cloning, sequencing, and expression, *J. Biol. Chem.*, **276**, 5779-5787, <https://doi.org/10.1074/jbc.M008656200>.
8. Kuno, S., Bacher, A., and Simon, H. (1985) Structure of enoate reductase from a *Clostridium tyrobutyricum* (C. spec. La1), *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, **366**, 463-472, <https://doi.org/10.1515/bchm3.1985.366.1.463>.
9. Caldeira, J., Feicht, R., White, H., Teixeira, M., Moura, J. J., Simon, H., and Moura, I. (1996) EPR and Mössbauer spectroscopic studies on enoate reductase, *J. Biol. Chem.*, **271**, 18743-18748, <https://doi.org/10.1074/jbc.271.31.18743>.
10. Giesel, H., and Simon, H. (1983) On the occurrence of enoate reductase and 2-oxo-carboxylate reductase in clostridia and some observations on the amino acid fermentation by *Peptostreptococcus anaerobius*, *Arch. Microbiol.*, **135**, 51-57, <https://doi.org/10.1007/BF00419482>.
11. Mordaka, P. M., Hall, S. J., Minton, N., and Stephens, G. (2018) Recombinant expression and characterisation of the oxygen-sensitive 2-enoate reductase from *Clostridium sporogenes*, *Microbiology (Reading)*, **164**, 122-132, <https://doi.org/10.1099/mic.0.000568>.
12. Shieh, W. Y., Chen, Y. W., Chaw, S. M., and Chiu, H. H. (2003) *Vibrio ruber* sp. nov., a red, facultatively anaerobic, marine bacterium isolated from sea water, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **53**, 479-484, <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02307-0>.
13. Bogachev, A. V., Bertsova, Y. V., Bloch, D. A., and Verkhovskiy, M. I. (2012) Urocanate reductase: Identification of a novel anaerobic respiratory pathway in *Shewanella oneidensis* MR-1, *Mol. Microbiol.*, **86**, 1452-1463, <https://doi.org/10.1111/mmi.12067>.
14. Light, S. H., Méheust, R., Ferrell, J. L., Cho, J., Deng, D., Agostoni, M., Iavarone, A. T., Banfield, J. F., D'Orazio, S. E. F., and Portnoy, D. A. (2019) Extracellular electron transfer powers flavinylated extracellular reductases in Gram-positive bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 26892-26899, <https://doi.org/10.1073/pnas.1915678116>.
15. Bogachev, A. V., Baykov, A. A., and Bertsova, Y. V. (2018) Flavin transferase: the maturation factor of flavin-containing oxidoreductases, *Biochem. Soc. Trans.*, **46**, 1161-1169, <https://doi.org/10.1042/BST20180524>.

16. Koike, H., Sasaki, H., Kobori, T., Zenno, S., Saigo, K., Murphy, M. E., Adman, E. T., and Tanokura, M. (1998) 1.8 Å crystal structure of the major NAD(P)H:FMN oxidoreductase of a bioluminescent bacterium, *Vibrio fischeri*: overall structure, cofactor and substrate-analog binding, and comparison with related flavoproteins, *J. Mol. Biol.*, **280**, 259-273, <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.1871>.
17. Bertsova, Y. V., Kulik, L. V., Mamedov, M. D., Baykov, A. A., and Bogachev, A. V. (2019) Flavodoxin with an air-stable flavin semiquinone in a green sulfur bacterium, *Photosynth. Res.*, **142**, 127-136, <https://doi.org/10.1007/s11120-019-00658-1>.
18. Bertsova, Y. V., Fadeeva, M. S., Kostyrko, V. A., Serebryakova, M. V., Baykov, A. A., and Bogachev, A. V. (2013) Alternative pyrimidine biosynthesis protein ApbE is a flavin transferase catalyzing covalent attachment of FMN to a threonine residue in bacterial flavoproteins, *J. Biol. Chem.*, **288**, 14276-14286, <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.455402>.
19. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685, <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
20. Ells, A. H. (1959) A colorimetric method for the assay of soluble succinic dehydrogenase and pyridinenucleotide-linked dehydrogenases, *Arch. Biochem. Biophys.*, **85**, 561-562, [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90527-2](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90527-2).
21. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A. W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P., and Hassabis, D. (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold, *Nature*, **596**, 583-589, <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.
22. Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y., Heo, L., Ovchinnikov, S., and Steinegger, M. (2022) ColabFold: making protein folding accessible to all, *Nat. Meth.*, **19**, 679-682, <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01488-1>.
23. Trott, O., and Olson, A. J. (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, *J. Comput. Chem.*, **31**, 455-461, <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.
24. Case, D.A., Aktulga, H. M., Belfon, K., Ben-Shalom, I. Y., Berryman, J. T., Brozell, S. R., et al. (2022) Amber 2022, University of California, San Francisco.
25. Bolanos-Garcia, V. M., and Davies, O. R. (2006) Structural analysis and classification of native proteins from *E. coli* commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography, *Biochim. Biophys. Acta*, **1760**, 1304-1313, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.03.027>.
26. Bertsova, Y. V., Serebryakova, M. V., Baykov, A. A., and Bogachev, A. V. (2021) The flavin transferase ApbE flavinylates the ferredoxin:NAD⁺-oxidoreductase Rnf required for N₂ fixation in *Azotobacter vinelandii*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **368**, fnab130, <https://doi.org/10.1093/femsle/fnab130>.
27. Hertzberger, R., Arents, J., Dekker, H. L., Pridmore, R. D., Gysler, C., Kleerebezem, M., and de Mattos, M. J. (2014) H₂O₂ production in species of the *Lactobacillus acidophilus* group: a central role for a novel NADH-dependent flavin reductase, *Appl. Environ. Microbiol.*, **80**, 2229-2239, <https://doi.org/10.1128/AEM.04272213>.
28. Kim, S., Kim, C. M., Son, Y. J., Choi, J. Y., Siegenthaler, R. K., Lee, Y., Jang, T. H., Song, J., Kang, H., Kaiser, C. A., and Park, H. H. (2018) Molecular basis of maintaining an oxidizing environment under anaerobiosis by soluble fumarate reductase, *Nat. Commun.*, **9**, 4867, <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07285-9>.
29. Agarwal, R., Bonanno, J. B., Burley, S. K., and Swaminathan, S. (2006) Structure determination of an FMN reductase from *Pseudomonas aeruginosa* PA01 using sulfur anomalous signal, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **62**, 383-391, <https://doi.org/10.1107/S0907444906001600>.
30. Borshchevskiy, V., Round, E., Bertsova, Y., Polovinkin, V., Gushchin, I., Ishchenko, A., Kovalev, K., Mishin, A., Kachalova, G., Popov, A., Bogachev, A., and Gordeliy, V. (2015) Structural and functional investigation of flavin binding center of the NqrC subunit of sodium-translocating NADH:quinone oxidoreductase from *Vibrio harveyi*, *PLoS One*, **10**, e0118548, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118548>.
31. Venskutonyté, R., Koh, A., Stenström, O., Khan, M. T., Lundqvist, A., Akke, M., Bäckhed, F., and Lindkvist-Petersson, K. (2021) Structural characterization of the microbial enzyme urocanate reductase mediating imidazole propionate production, *Nat. Commun.*, **12**, 1347, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21548-y>.
32. Coustou, V., Besteiro, S., Rivièrè, L., Biran, M., Biteau, N., Franconi, J. M., Boshart, M., Baltz, T., and Bringaud, F. (2005) A mitochondrial NADH-dependent fumarate reductase involved in the production of succinate excreted by procyclic *Trypanosoma brucei*, *J. Biol. Chem.*, **280**, 16559-16570, <https://doi.org/10.1074/jbc.M500343200>.
33. Wagnies, M., Plazolles, N., Schenk, R., Villafraz, O., Dupuy, J.W., Biran, M., Bachmaier, S., Baudouin, H., Clayton, C., Boshart, M., and Bringaud, F. (2021) Metabolic selection of a homologous recombination-mediated gene loss protects *Trypanosoma brucei* from ROS production by glycosomal fumarate reductase, *J. Biol. Chem.*, **296**, 100548, <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100548>.
34. Page, C. C., Moser, C. C., Chen, X., and Dutton, P. L. (1999) Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction, *Nature*, **402**, 47-52, <https://doi.org/10.1038/46972>.

35. Sogin, E. M., Michellod, D., Gruber-Vodicka, H. R., Bourceau, P., Geier, B., Meier, D. V., Seidel, M., Ahmerkamp, S., Schorn, S., D'Angelo, G., Procaccini, G., Dubilier, N., and Liebeke, M. (2022) Sugars dominate the seagrass rhizosphere, *Nat. Ecol. Evol.*, **6**, 866-877, <https://doi.org/10.1038/s41559-022-01740-z>.
36. Bertsch, J., Parthasarathy, A., Buckel, W., and Müller, V. (2013) An electron-bifurcating caffeoyl-CoA reductase, *J. Biol. Chem.*, **288**, 11304-11311, <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.444919>.
37. Martone, P. T., Estevez, J. M., Lu, F., Ruel, K., Denny, M. W., Somerville, C., and Ralph, J. (2009) Discovery of lignin in seaweed reveals convergent evolution of cell-wall architecture, *Curr. Biol.*, **19**, 169-175, <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.12.031>.
38. Fernando, I. P., Kim, M., Son, K. T., Jeong, Y., and Jeon, Y. J. (2016) Antioxidant activity of marine algal polyphenolic compounds: a mechanistic approach, *J. Med. Food*, **19**, 615-628, <https://doi.org/10.1089/jmf.2016.3706>.
39. Rameshkumar, N., and Nair, S. (2009) Isolation and molecular characterization of genetically diverse antagonistic, diazotrophic red-pigmented vibrios from different mangrove rhizospheres, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **67**, 455-467, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00638.x>.
40. Smith, E. A., and Macfarlane, G. T. (1996) Enumeration of human colonic bacteria producing phenolic and indolic compounds: effects of pH, carbohydrate availability and retention time on dissimilatory aromatic amino acid metabolism, *J. Appl. Bacteriol.*, **81**, 288-302, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1996.tb04331.x>.
41. Knaus, T., Toogood, H. S., and Scrutton, N. S. (2016) *Ene-Reductases and Their Applications*. Green Biocatalysis, John Wiley and Sons, Inc., pp. 473-488.
42. Sievers, F., and Higgins, D. G. (2018) Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences, *Protein Sci.*, **27**, 135-145, <https://doi.org/10.1002/pro.3290>.

A REDOX-REGULATED, HETERODIMERIC NADH:CINNAMATE REDUCTASE IN *Vibrio ruber*

Y. V. Bertsova, M. V. Serebryakova, V. A. Anashkin, A. A. Baykov, and A. V. Bogachev*

*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119234 Moscow Russia; e-mail: bogachev@belozersky.msu.ru*

Genes of putative reductases of α,β -unsaturated carboxylic acids are abundant among anaerobic and facultatively anaerobic microorganisms, yet substrate specificity has been experimentally verified for few encoded proteins. Here, we co-produced in *Escherichia coli* a heterodimeric protein of the facultatively anaerobic marine bacterium *Vibrio ruber* (GenBank SJN56019 and SJN56021; annotated as NADPH azoreductase and urocanate reductase, respectively) with *Vibrio cholerae* flavin transferase. The isolated protein (named Crd) consists of the *sjn56021*-encoded subunit CrdB (*NADH:flavin*, *FAD binding 2*, and *FMN bind* domains) and an additional subunit CrdA (SJN56019, a single *NADH:flavin* domain) that interact via their *NADH:flavin* domains (AlphaFold2 prediction). Each domain contains a flavin group (three FMNs and one FAD in total), one of the FMN groups being linked covalently by the flavin transferase. Crd readily reduces cinnamate, *p*-coumarate, caffeate, and ferulate under anaerobic conditions with NADH or methyl viologen as the electron donor, is moderately active against acrylate and practically inactive against urocanate and fumarate. Cinnamates induced Crd synthesis in *V. ruber* cells grown aerobically or anaerobically. The Crd-catalyzed reduction started by NADH demonstrated a time lag of several minutes, suggesting a redox regulation of the enzyme activity. The oxidized enzyme is inactive, which apparently prevents production of reactive oxygen species under aerobic conditions. Our findings identify Crd as a regulated NADH-dependent cinnamate reductase, apparently protecting *V. ruber* from (hydroxy)cinnamate poisoning.

Keywords: anaerobic respiration, cinnamate, caffeate, enzyme regulation, reactive oxygen species, rhizosphere, *Vibrio*

САФАРИ С ЭЛЕКТРОННОЙ ПУШКОЙ: ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ БЕЛКОВ И МЕМБРАН МИТОХОНДРИЙ В ЕСТЕСТВЕННОЙ СРЕДЕ

© 2024 С.В. Нестеров^{1*}, К.С. Плохих¹, Ю.М. Чесноков¹, Д.А. Мустафин¹,
Т.Н. Голева¹, А.Г. Рогов¹, Р.Г. Васильев¹, Л.С. Ягужинский²

¹ НИЦ «Курчатовский институт»,
123182 Москва, Россия; электронная почта: semen.v.nesterov@phystech.edu

² НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия

Поступила в редакцию 24.09.2023

После доработки 06.02.2024

Принята к публикации 07.02.2024

В работе приводятся новые данные по структурным исследованиям митохондрий с помощью корреляционной свето-электронной микроскопии и криоэлектронной томографии (крио-ЭТ) – современных методов структурной биологии, позволяющих исследовать биологические объекты в нанометровых масштабах с минимальным вмешательством в естественные условия. Такая неинвазивность позволяет сравнивать эти методы с наблюдением за животными во время сафари. В работе приведены два направления исследований, которые можно осуществить только этими методами. В частности, визуализировано расположение агрегатов амилоида Аβ42 по отношению к митохондриям, и тем самым проверена одна из гипотез развития митохондриальной дисфункции при болезни Альцгеймера. Показано, что агрегаты Аβ42 не взаимодействуют с митохондриями, хотя некоторая часть из них и имеет близкую локализацию. Таким образом, показано, что митохондриальная дисфункция не связана с прямым влиянием агрегатов на структуру митохондрий, а её истоки нужно искать в других процессах. Вторым уникальным направлением, представленным в работе, является визуализация мембран митохондрий и белков в них с высоким разрешением. Анализ данных крио-ЭТ, проведённый в работе, показал наличие в ламеллярных структурах крист митохондрий сердца тороидальных отверстий, в которых располагаются АТФ-синтазы. Также был предложен новый механизм сортировки и кластеризации белковых комплексов в мембране на основе топологии. Согласно этому механизму, место белков системы окислительного фосфорилирования в мембране определяется её кривизной. Таким образом, томография высокого разрешения расширяет и дополняет имеющиеся представления о структурно-функциональной организации митохондрий, позволяя исследовать ранее недоступные структурные связи белков между собой и с мембранами в естественных условиях.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: мембрана, митохондрии, окислительное фосфорилирование, криоэлектронная микроскопия, суперкомплекс, АТФ-синтаза, респирасома, Аβ42, амилоидные агрегаты.

DOI: 10.31857/S0320972524020064 EDN: XMXELF

Работа посвящена памяти академика В.П. Скулачёва

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы существенный прорыв в структурной биологии был обусловлен повышением доступности и комплексным совершен-

ствованием методов криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ), произошедшим как в аппаратной части, связанной с улучшением качества детекторов и устранением шумов и аберраций, так и в области программного обеспечения для автома-

Принятые сокращения: ОКСФОС – окислительное фосфорилирование; крио-ЭМ – криоэлектронная микроскопия; крио-ЭТ – криоэлектронная томография; ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия; CLEM – корреляционная свето-электронная микроскопия.

* Адресат для корреспонденции.

тической классификации и обработки изображений [1–3]. Большое число работ по теме микроскопии посвящено исследованию выделенных белков с высоким разрешением, но в данной работе мы сосредоточимся на более узкой теме – исследовании макромолекулярной организации ферментных систем в митохондриальных мембранах в целых митохондриях без выделения из них белков. Также будут показаны возможности корреляционной свето-электронной микроскопии (CLEM) [4], которая в сочетании с генетической инженерией позволяет визуализировать с разрешением в несколько нанометров взаимодействие между любыми белками интереса, а также между белками и мембранами. По своей разрешающей способности CLEM превосходит любые чисто световые методики, в том числе микроскопию с супер-разрешением, такую как STED-микроскопия [5], позволяющую визуализировать мембраны, но не отдельные белки в них [6]. Будут представлены собственные новые результаты, выполнен глубокий анализ ряда полученных в наших предыдущих работах томографических данных, а также проведено обсуждение литературы, посвящённой «фотоэлектронной охоте» на белки митохондрий в «диких» природных условиях их обитания в белково-липидных мембранах.

Несмотря на значительное количество структурных данных о белках митохондрий, данные об их нативной организации в мембране и матриксе весьма ограничены, что затрудняет формирование цельной модели работы этих органелл. В последнее время, во многом благодаря крио-ЭМ, этот пробел начал восполняться – в том числе, например, удалось установить, что в митохондриях млекопитающих АТФ-синтазы находятся на сгибах складок внутренней мембраны (крист), а компоненты дыхательной цепи – в менее искривлённых частях мембраны. Также появилось достаточно много информации о структурном взаимодействии комплексов дыхательной цепи (респирасом). При этом, однако, многие вопросы остаются открытыми. Так, например, стандартными лабораторными методами выделения респирасом с мягким детергентом нельзя получить достоверную информацию о том, какой процент дыхательных комплексов образует респирасомы, так как часть из них все же распадается в процессе выделения, а часть может не экстрагироваться из мембраны. В то же время подробный анализ томограмм крио-ЭМ позволяет решить эту задачу – так, например, нам удалось показать, что в сердце крысы все комплексы I и III входят в состав респирасом [7]. Данные многих научных групп показывают, что перенос протона между протонными помпами и АТФ-синтазой происходит не за счёт электрохимического градиента между объёмами матрикса и межмембранного

пространства, а локализовано – латерально вдоль поверхности мембраны на небольшие расстояния. Благодаря детальному исследованию структуры мембран митохондрий и белков в них можно получить уникальную информацию, необходимую для проверки имеющихся гипотез и моделирования процессов передачи протонов в системе окислительного фосфорилирования (ОКСФОС) [8]. Остаются неизвестными и многие структурные аспекты взаимодействия митохондрий с другими органеллами или различными агрегатами. Даже такой крайне актуальный, в связи с высоким распространением болезни Альцгеймера, вопрос, как наличие или отсутствие взаимодействия агрегатов амилоида с мембраной митохондрий, всё ещё не имеет ответа, так как колокализация флуоресцентных меток не даёт достаточного разрешения для однозначных заключений. В настоящей работе благодаря CLEM нам удалось ответить в том числе и на этот вопрос.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование дрожжевых клеток. В работе использовали дрожжи *Yarrowia lipolytica* Po1f, экспрессирующие конструкцию eGFP-Аβ42 [9]. Клетки выращивали в 250-мл колбах Эрленмейера при 28 °С на роторной качалке (220 об./мин) в 50 мл полусинтетической среды, содержащей в качестве источника углерода и энергии 1,3%-ный сукцинат. Клетки собирали в ранней экспоненциальной фазе роста ($ОП_{600} = 1,0$).

Подготовка образца для крио-ЭМ. Клетки отмывали от среды выращивания в 50 мМ фосфатном буфере (рН = 5,5) и инкубировали с 500 нМ MitoTracker Red CMXRos («Thermo Fisher Scientific», США) в течение 30 мин. Затем клетки отмывали от красителя и концентрировали до $ОП_{600} = 25$. Перед нанесением на сетку для крио-ЭМ в суспензию вводили 5% глицерина, чтобы снизить количество кристаллов льда [10]. Электронно-микроскопические сетки («Ted Pella», США) предварительно подвергались процедуре гидрофилизации с помощью установки easiGlow («Pelco», США) при значении силы тока 25 мА и давлении 0,26 мБар в течение 30 с. Суспензию клеток объёмом 5 мкл наносили на сетку для микроскопии. Сетки с исследуемыми объектами подвергались двустороннему промакиванию фильтровальной бумагой и быстрой заморозке в сжиженном этане, охлаждённом до температуры жидкого азота. В процессе нанесения образца на сетку температура в камере системы Vitrobot («Thermo Fisher Scientific») составляла 4 °С, влажность – не менее 95%. В случае использования гомогената сердечной ткани или выделенных митохондрий сердца крыс

проводилась аналогичная процедура подготовки сеток, но без использования глицерина, описанная в ранее опубликованных работах [7, 11]. Кратко, 3 мкл гомогенизированной ткани сердца крысы линии Wistar или выделенных митохондрий сердца (дифференциальным центрифугированием без детергентов и протеаз, как описано ранее [12]), наносили на сетку для микроскопии и витрифицировали с помощью системы Vitrobot.

Флуоресцентная микроскопия. Витрифицированные образцы дрожжей в шаттле с жидким азотом помещали в криогенную камеру флуоресцентного микроскопа THUNDER Imager EM Cryo CLEM («Leica», Германия), оснащённого объективом HC PL APO 50×/0,90 CRYO CLEM («Leica»). Флуоресценцию eGFP-Aβ42 и MitoTracker Red выявляли с помощью соответствующих фильтров, и оценивали колокализацию агрегатов eGFP-Aβ42 и митохондрий. 3D-Реконструкцию клеток дрожжей с последующей деконволюцией изображений проводили по алгоритму «Leica Thunder» силами встроенного программного обеспечения [13]. Снимки всей сетки позволяли получить своего рода «карту» для ориентации при травлении ламелей. По полученным снимкам всей сетки выбирали области интереса.

Получение ламелей сфокусированным ионным пучком (ФИП). Микроскопические сетки с витрифицированным образцом переносили в растровый электронно-ионный микроскоп Versa 3D («Thermo Fisher Scientific»), оборудованный криодержателем и системой загрузки образцов при температуре жидкого азота Quorum 3100P («Quorum Technologies», Канада). С помощью газовой-инжекционной системы напыляли защитный слой платины на поверхность всей сетки, что позволяло снизить накопление заряда и защитить поверхность от радиационных повреждений в процессе эксперимента. Учитывая морфологию поверхности и полученные карты флуоресцентной микроскопии, выбирали области для приготовления тонких клеточных срезов с помощью крио-ФИП. Выбирали области ближе к центру сетки с клетками, лежащими в один слой. Ламели прорезали в данных квадратах с расчётом прохождения вдоль нескольких клеток, лежащих на достаточном расстоянии от металлического каркаса сетки. Для этого использовали ионы Ga⁺ с энергией 30 кэВ и последовательное понижение тока от 1 нА до 30 пА для минимизации радиационных повреждений приповерхностного слоя. Данный подход позволяет получить срезы объекта толщиной 150–250 нм. Наклон плоскости среза по отношению к плоскости микроскопической сетки составлял 10–12°.

Просвечивающая крио-ЭМ и криоэлектронная томография (крио-ЭТ). Крио-ЭМ-исследования

проводили с помощью криогенного просвечивающего электронного микроскопа Titan Krios 60–300 («Thermo Fisher Scientific»), оснащённого системой прямого детектирования электронов Falcon II при ускоряющем напряжении 300 кВ. Для каждой микроскопической сетки отбирали участки для получения поворотных серий изображений. Каждый набор данных состоял из 56 изображений, полученных в результате наклона образца в диапазоне от –50 до 60 градусов с угловым шагом в 2°. Набор данных проводили в автоматическом режиме с помощью программного обеспечения Tomography4 («Thermo Fisher Scientific») в режиме малых доз, что позволило минимизировать радиационные повреждения, сохраняя нативную структуру исследуемых объектов. Для набора томографических серий использовали увеличение 18 000× (размер пикселя – 0,37 нм; размер изображения – 1516 нм) со значением дефокусировки в диапазоне 5–8 мкм. Суммарное значение дозы электронов, прошедших через единицу площади образца, за всё время экспозиции не превышало ~120 е⁻/Å².

Обработка данных. Для полученных данных применялась процедура томографического восстановления с использованием метода взвешенной обратной проекции (WBP, Weighted Back Projections) в программном пакете IMOD [14]. Выравнивание поворотных серий изображений клеток осуществляли с помощью вычисления кросс-корреляции между областями томографической серии (процедура «patch tracking» [15]), так как в образец невозможно внести наночастицы коллоидного золота. В случае исследования фрагментов выделенных митохондрий для получения более высокого разрешения использовались коллоидные наночастицы золота диаметром 10 нм [7, 16].

Для уменьшения шума и анизотропии разрешения в разных плоскостях полученных томограмм использовалась фильтрация в программе IsoNet [17]. Данный инструмент использует нейронную сеть типа U-net и обучается на небольших участках томограмм с добавлением дополнительного шума. Сегментация мембран митохондрий производилась в автоматическом режиме с использованием программы TomoSegMemTV [18]. Дефекты автоматической сегментации корректировали вручную на основе исходных данных томограммы.

Томограммы после фильтрации использовали для определения положения различных молекулярных комплексов в ручном режиме. Положения и ориентации различных макромолекул определялись также и в автоматическом режиме посредством использования трёхмерных шаблонов этих молекул в программе Dynamo [19] или WARP [20]. Для исключения ложно-выбранных координат проводилась последующая итерационная трёхмерная

классификация. Для увеличения соотношения сигнал/шум и пространственного разрешения [21] макромолекул использовалось усреднение выровненных друг относительно друга небольших участков томограммы (так называемых субтомограмм), содержащих отдельные макромолекулы [22]. Данный процесс называется субтомографическим усреднением и позволяет одновременно получить информацию об ориентации макромолекул, которая используется для последующей визуализации объекта путём вставки модели усреднённой структуры в нужной ориентации.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Визуализация амилоидных агрегатов в клетках. На основе данных флуоресцентной микроскопии ранее предполагалось, что агрегаты бета амилоида (A β 42) могут взаимодействовать с мембранами митохондрий, за счёт чего нарушать биоэнергетику [9]. Для эксперимента была выбрана ранее использованная модель на основе дрожжей аэробного типа обмена *Y. lipolytica*, экспрессирующая конструкцию eGFP-A β 42 [9]. Авторами было показано, что экспрессия A β 42 или репортёрной генетической конструкции eGFP-A β 42 приводила к дисфункции и фрагментации митохондрий дрожжей [9]. Выявленная в работе колокализация амилоидных агрегатов и митохондрий привела к гипотезе о прямом физическом контакте амилоидных агрегатов с мембраной митохондрий. Для проверки этого предположения была проведена работа по протоколу CLEM-микроскопии, завершающаяся крио-ЭТ выбранных областей интереса. Важно отметить, что крио-ЭТ для данной задачи является единственным подходящим методом исследования, поскольку при процедуре витрификации и дальнейшем микроскопическом исследовании практически не нарушается нативность образцов, что является важным параметром, ведь флуоресцирующие объекты находятся на небольшом расстоянии, и даже незначительное изменение их колокации в случае применения стандартной методики фиксации и контрастирования образца для электронной микроскопии могло привести к появлению артефактов.

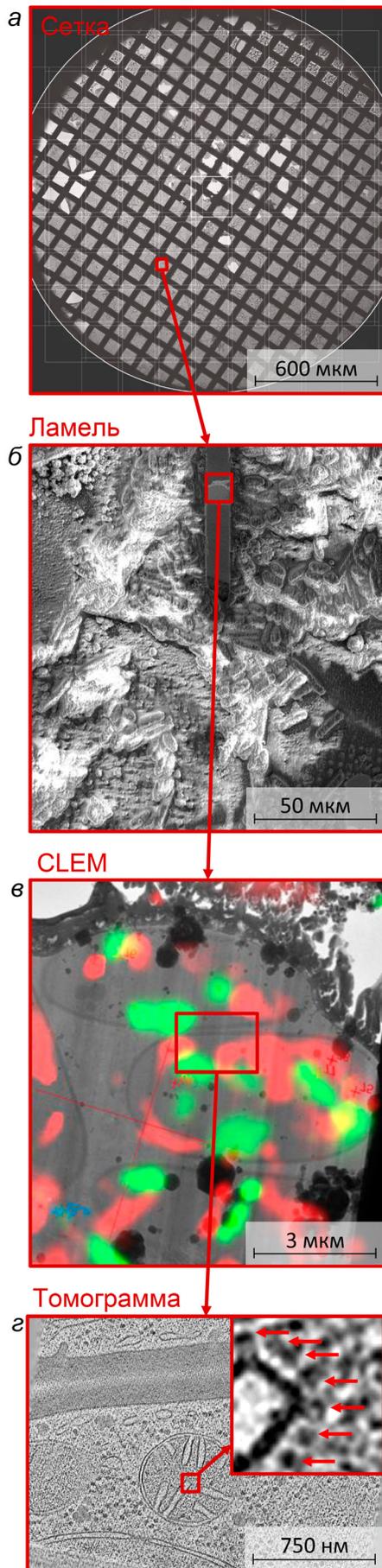
Протокол криогенной CLEM предполагал поиск методом флуоресцентной микроскопии в витрифицированном образце наиболее представительных полей зрения, где предполагалась колокализация митохондрий, окрашенных MitoTracker Red, и флуоресцирующих агрегатов eGFP-A β 42. При выявлении области интереса проводилась съёмка z-стека изображений с реконструкцией трёхмерного расположения участков, содержащих митохондрии и агрегаты eGFP-A β 42. На основании

этой информации проводилась настройка ФИП для получения ламели, содержащей интересующий участок, для которой были получены криоэлектронные томограммы. На рис. 1 изображены промежуточные результаты каждой стадии исследования.

В результате была получена серия подробных томограмм областей интереса, в которых накладывается как флуоресценция митохондрий (красный канал, MitoTracker Red), так и агрегаты амилоида (зелёный канал, eGFP-A β 42). При этом разрешение криоэлектронных томограмм существенно превосходило разрешение флуоресцентного микроскопа и позволило различать как мембраны, так и отдельные белки в митохондриях, имеющие характерные особенности структуры, например, АТФ-синтазы (рис. 1, 2). Благодаря флуоресцентному сигналу eGFP удалось однозначно идентифицировать локализацию агрегатов амилоида, которые без флуоресцентной метки и использования CLEM нельзя было бы точно распознать. Показано, что агрегаты не взаимодействуют с мембраной митохондрий. Как видно из рис. 1, часть агрегатов вообще не локализуется рядом с митохондриями, что видно даже при флуоресцентной микроскопии. Что касается неоднозначных областей, где есть пересечение флуоресцентных сигналов, то были собраны статистические данные для нескольких десятков агрегатов в этих зонах (рис. 2) и показано, что подавляющее большинство агрегатов находилось на расстоянии 30–300 нм от поверхности мембраны митохондрий.

Среди наиболее близко расположенных агрегатов не найдено их физических контактов с мембраной митохондрий. Этот результат имеет большое значение для понимания механизмов развития болезни Альцгеймера, так как указывает на то, что нарушение биоэнергетики митохондрий, коррелирующее с накоплением агрегатов [23, 24], не вызвано прямым действием амилоидных агрегатов на структуру и функцию митохондрий, а опосредовано другими факторами.

Исследование топологии внутренней мембраны митохондрий и расположения белков системы ОКСФОС. Метод крио-ЭМ одиночных частиц (single-particle cryo-EM), который основан на компьютерной классификации и усреднении огромных массивов изображений, полученных с помощью просвечивающей ЭМ, позволяет изучать структуры крупных белковых комплексов и суперкомплексов. Наличие или отсутствие суперкомплексов долгое время было дискуссионной темой в биоэнергетике, в то время как этот факт является крайне важным. Наличие суперкомплексов предполагает прямую передачу метаболитов в них с минимальным участием диффузии в этом процессе. Такая схема гораздо более устойчива



к стрессам, снижает утечку электронов и генерацию активных форм кислорода, что делает всю систему более энергоэффективной. Существование крупных суперкомплексов дыхательной цепи в митохондриях до использования крио-ЭМ удалось доказать наличием совместной миграции их компонент при нативном электрофорезе после экстракции белка из мембран мягкими детергентами [25]. В настоящее время благодаря крио-ЭМ одиночных частиц существование суперкомплексов дыхательной цепи – респирасом – уже не вызывает ни у кого сомнений, так как их структуры из разных организмов и тканей продемонстрированы в большом числе работ [26–33]. Тем не менее остаются дискуссионными более детальные вопросы, такие как точная конфигурация и состав суперкомплексов в тех или иных условиях, их функциональная, регуляторная и структурная значимость для биоэнергетики. В частности, не до конца ясны механизмы регуляции респирасом, наличие какого-либо их структурного взаимодействия с АТФ-синтазами, а также роль мембраны в этих процессах. Для решения этих проблем мы провели анализ наших ранее полученных данных совместно с анализом новых литературных данных. На рис. 3 приведены эволюционно достаточно далёкие структуры респирасом из митохондрий растения *Arabidopsis* sp. и из митохондрий сердца крысы, которые на удивление оказались не только схожи по структуре, но и схожим образом искривляют мембрану, создавая её перегиб в месте контакта комплексов I и III.

Метод крио-ЭТ позволяет реконструировать целые области мембраны, определяя расположение в ней белков, имеющих характерные структурные особенности. Такими белками, например,

Рис. 1. Последовательность работы с образцом клеток при CLEM-микроскопии в сочетании с крио-ЭТ. *а* – Фотография сетки с витрифицированным образцом под просвечивающим световым микроскопом; *б* – увеличение выделенной на панели *а* области с напылённым слоем платины и вырезанной методом криогенного фокусированного ионного пучка областью, в которой оставлена тонкая ламель (выделена красной рамкой). Снимок с помощью растрового электронно-ионного микроскопа. *в* – Корреляционная свето-электронная микроскопия (CLEM) ламели. Наложение области флуоресцентной съёмки, соответствующей вытравленной ламели. Красная флуоресценция – Mitotracker Red (митохондриальный маркер); зелёная флуоресценция – eGFP (из конструкции eGFP- β 42). *г* – Срез томограммы, построенной по области внутри ламели, на котором видны две митохондрии, а также другие компоненты клетки (клеточная стенка, рибосомы, агрегаты амилоида, различные везикулярные структуры); на вставке – увеличенный фрагмент кристы митохондрии, на котором красные стрелки указывают на F_1 -субъединицы АТФ-синтазы, выступающие из мембраны

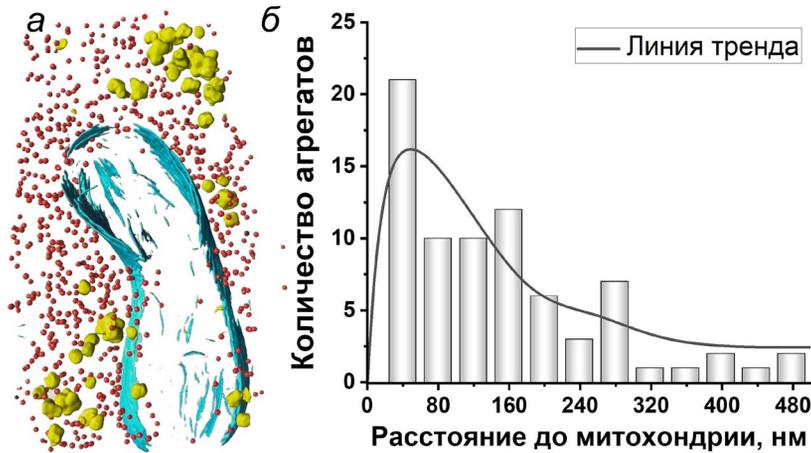


Рис. 2. Визуализация и оценка расстояний между агрегатами Аβ42 и внешней мембраной митохондрий на нескольких томограммах. *а* – Пример компьютерной реконструкции томограммы с автоматически размеченными митохондриальными мембранами (показано голубым), агрегатами амилоида (показано жёлтым) и рибосомами (показано красным). *б* – Распределение расстояний между агрегатами и внешней митохондриальной мембраной, собранное на основе данных из томограмм

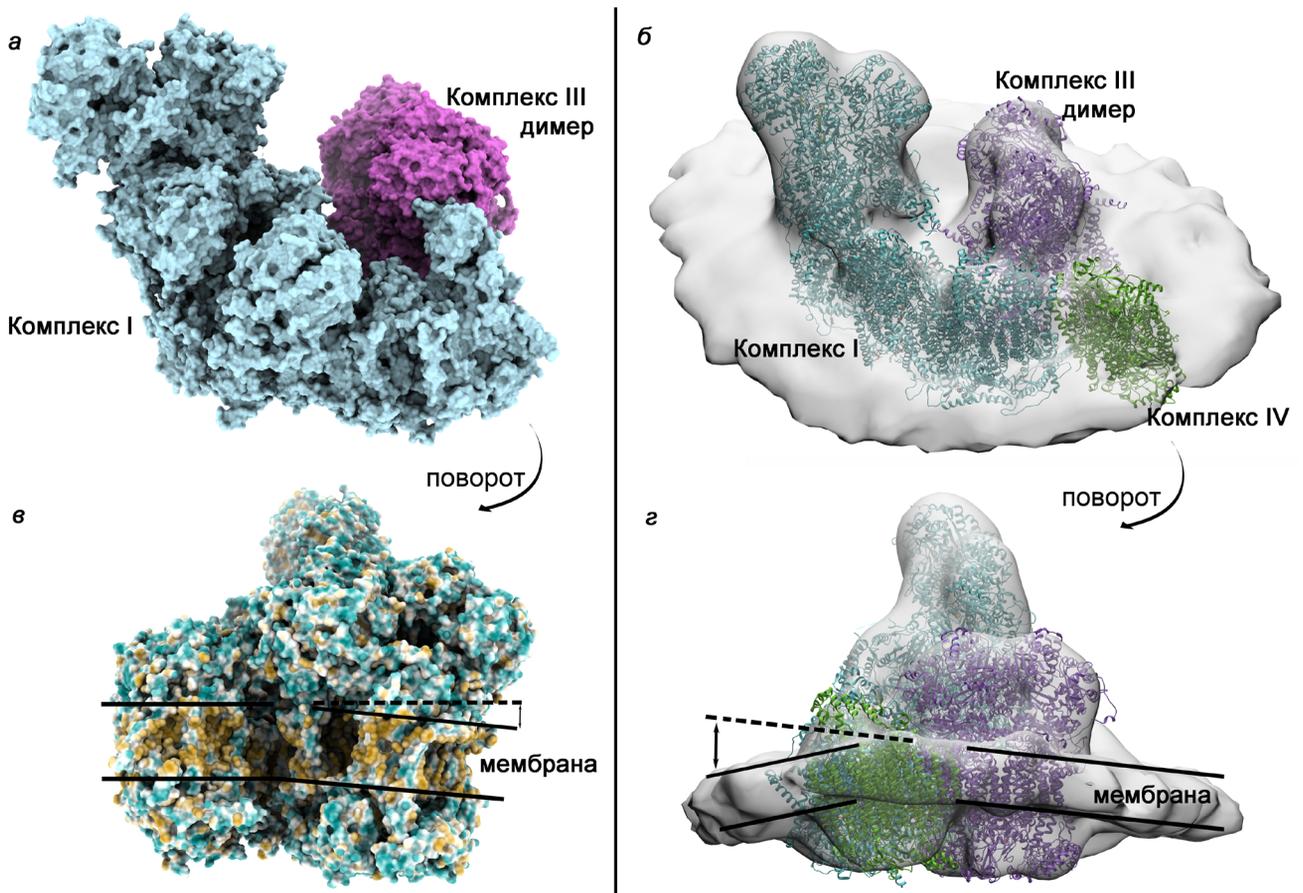


Рис. 3. Иллюстрация структур суперкомплекса дыхательной цепи митохондрий различных организмов. *а, в* – Разные проекции структуры поверхности респирасомы из митохондрий *Arabidopsis* sp., полученной методом крио-ЭМ одиночных частиц (разрешение ~ 2Å, PDB ID: 8VPX) [34]. *б, г* – Разные проекции структуры респирасомы из митохондрий сердца крысы, полученной с помощью субтомографического усреднения без экстракции респирасом из мембраны, по данным работы Nesterov et al. [7]. На панелях *а* и *б* цветом выделены различные комплексы в составе суперкомплекса (голубой – комплекс I; фиолетовый – комплекс III; зелёный – комплекс IV (присутствует только в респирасомах крысы)). На панели *в* цветовое отображение сделано по гидрофильности поверхности (синий – гидрофильный; жёлтый – гидрофобный) для более наглядной иллюстрации наличия изгиба мембраны

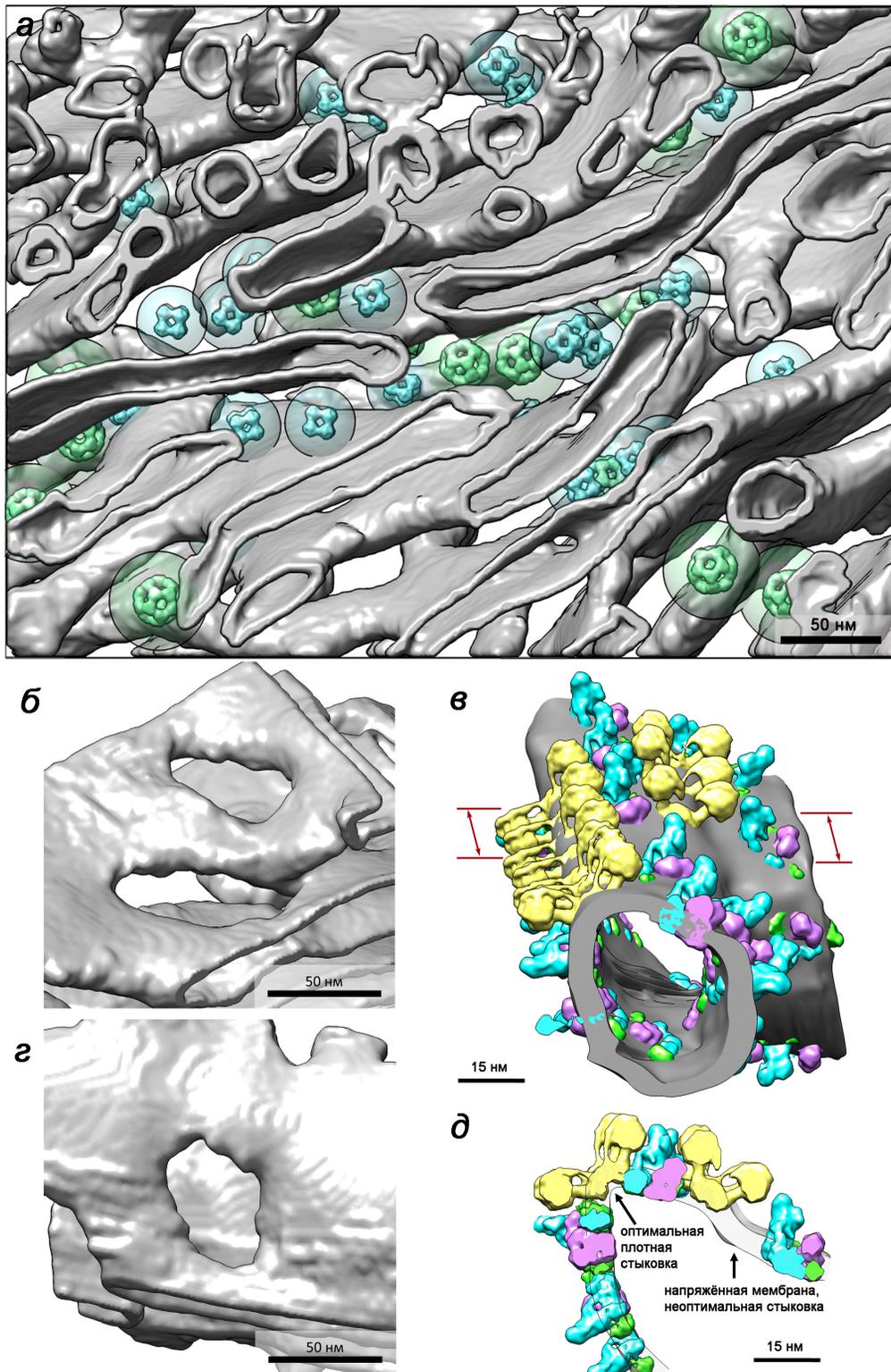


Рис. 4. Реконструкция сложной структуры мембран митохондрий сердца. *а* – Реконструкция томограммы большой области в целой интактной митохондрии сердца крысы; голубым указаны ядра комплексов кето-глутаратдегидрогеназ или дегидрогеназ кетокислот с разветвлённой цепью; зелёным – ядра комплексов дегидрогеназ пирувата. *б, в* – Фрагменты, иллюстрирующие наличие отверстий торoidalной топологии. *в* – Реконструкция фрагмента томограммы кристы митохондрии сердца крысы. Жёлтым указаны АТФ-синтазы; голубым – комплексы I; фиолетовым – димеры комплексов III; зелёным – комплексы IV. Мембрана показана серым цветом (не прозрачной) и закрывает гидрофобные части комплексов. *д* – Тонкий срез части кристы в месте, показанном стрелками на панели *в*. Мембрана показана прозрачной, что позволяет видеть также гидрофобные части комплексов. Визуализация выполнена на основе томографических данных, полученных в ходе выполнения предыдущих работ [7, 11]

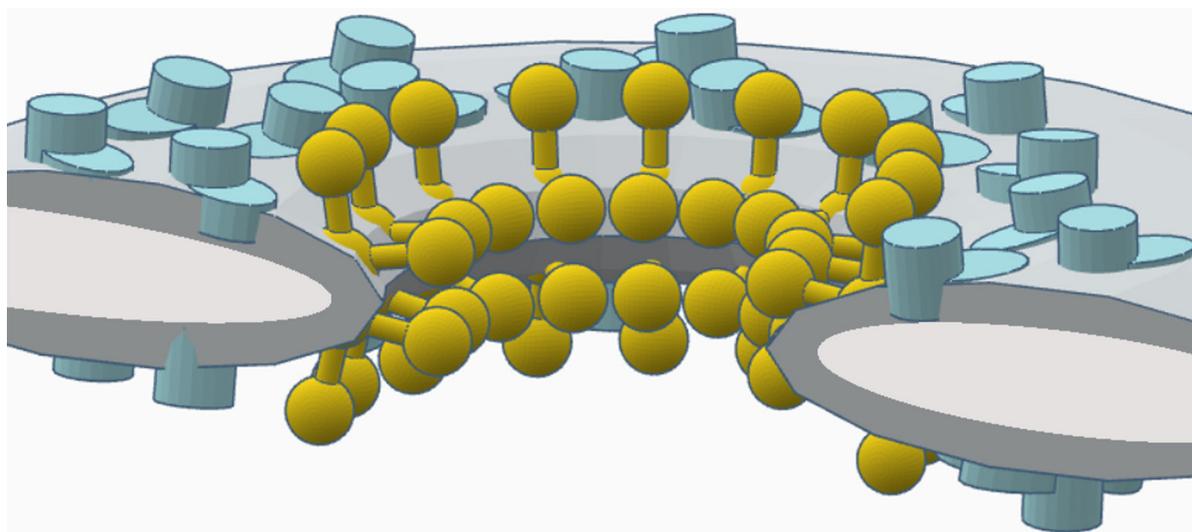


Рис. 5. Схематичная модель предполагаемого расположения белковых комплексов системы ОКСФОС в окрестности тороидальных отверстий в псевдоламеллярных участках крист. Модель построена на основе ручной обработки крио-ЭТ нескольких тороидальных отверстий с разметкой расположения F_1 -субъединиц АТФ-синтаз во внутренней мембране митохондрий сердца крыс. Жёлтым обозначены димеры АТФ-синтаз; голубым – респирасомы; тёмно-серым – мембрана; светло-серым – межмембранное пространство

являются АТФ-синтазы и комплексы I, имеющие уникальную форму большой выступающей из мембраны гидрофильной части (рис. 4, а и б). Помимо этого, можно выполнять реконструкцию трёхмерной структуры внутренней мембраны митохондрий с разрешением, которое существенно превышает разрешение томографии, основанной на анализе срезов фиксированных образцов митохондрий. В результате на крио-ЭТ внутренние мембраны митохондрий сердца представлены с большей детализацией и представляют собой не волнообразные ламеллярные структуры, как они интерпретируются на основе просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) ультратонких срезов [35], а сложную структуру из множества небольших плоских фрагментов, испещрённых множеством трубчатых перемычек (рис. 4). Такая структура даёт ответ на вопрос, как димеры АТФ-синтаз размещаются во внутренней мембране митохондрий сердца. Наиболее распространены олигомеры из АТФ-синтаз на перегибах крист с высокой кривизной [36], однако встречаются менее длинные кластеры АТФ-синтаз в областях меньшей кривизны, где, однако, создаётся возмущённая структура, в которой невозможна плотная упаковка респирасом и АТФ-синтаз (рис. 4, б).

При меньшем масштабе (без визуализации отдельных мембранных белков) можно провести подробную реконструкцию внутренней мембраны митохондрий сердца с высоким разрешением, доступным с помощью крио-ЭТ. Такая реконструкция была проведена нами недавно с целью визуализации положения крупных дегидрогеназных комплексов относительно мембраны в нативных

условиях [11]. Полученные данные свидетельствуют о том, что митохондрии сердца представляют собой сложный лабиринт из сильно искривлённых мембран, имеющих ламеллярно-трубчатую структуру (рис. 5). При этом в полностью ламеллярных плоских участках не могут располагаться димеры АТФ-синтаз [36]. С точки зрения обеспечения оптимальной структуры и функциональности митохондрий ламеллярная структура мембраны получается не подходящей для размещения ключевых компонентов ОКСФОС. Отчасти это может решаться формированием волнообразных искривлений бислоя внутренней мембраны, на искривлённых участках которых могут локализоваться АТФ-синтазы. Такая топология действительно наблюдается на некоторых снимках ПЭМ [37]. Однако часто структуры мембраны визуализируются именно как ламеллярные, что не позволяет образовываться даже напряжённым структурам с димерами АТФ-синтаз, одна из которых приведена на рис. 4, в. Парадокс наличия видимых с помощью классической электронной микроскопии ламелей был решён нами благодаря более высокому разрешению крио-ЭТ. Компьютерная реконструкция показала, что в ламеллярных участках образуются тороидальные отверстия, на краях которых могут размещаться димеры АТФ-синтаз, а около них в областях с меньшей кривизной – респирасомы. В отличие от краёв кристы, показанных на рис. 3, в тороидальных отверстиях по краям может располагаться не только один ряд из димеров АТФ-синтаз, но даже два плотно стыкованных ряда АТФ-синтаз. Это обеспечивает максимально эффективное использование достаточно небольших

(по сравнению со всей площадью крист) искривлённых областей мембраны для расположения на них димеров АТР-синтаз. В тороидальных отверстиях в области высокой кривизны может располагаться олигомерная структура из димеров АТР-синтаз, схожая с изображённой на рис. 4, в. Однако предварительный ручной анализ показывает в некоторых тороидных отверстиях большее количество структур, по размерам совпадающих с F_1 -субъединицами АТР-синтаз, что говорит о возможности размещения на складке мембраны сразу двух рядов из димеров АТР-синтаз. Из-за высокой плотности белка, препятствующей получению высокого разрешения, точной компьютерной реконструкции с усреднением АТР-синтаз в этих областях пока сделать не удалось. Схематичное отображение предполагаемого нами расположения комплексов ОКСФОС в таких структурах показано на рис. 5.

Такая сложная топология мембран митохондрий может поддерживаться благодаря высокой концентрации в мембране липидов конической формы, таких как кардиолипиды и фосфатидилэтаноламин. Предположительно, перемычки мембраны настолько обогащены этими липидами, и их структура так отличается от бислоя, что методом ЯМР они определялись как небислоидная фаза липида [37, 38]. Учитывая необходимость кардиолипидов для работы системы ОКСФОС [39] и оптимальность его структуры для обеспечения переноса протона вдоль мембраны [8], можно предположить, что склонность респиросом и АТР-синтаз создавать кривизну мембраны по крайней мере отчасти может быть эволюционно обусловлена необходимостью концентрации кардиолипидов в приграничной зоне белков системы ОКСФОС.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Отсутствие прямого взаимодействия амилоидных агрегатов с мембранами митохондрий. Продвинутое моделирование хронических заболеваний, связанных с дисфункцией митохондрий, на основе дрожжей аэробного типа обмена *Y. lipolytica* [9] показали себя мощным инструментом для выявления внутриклеточного действия маркеров этих заболеваний. В случае патологий, связанных с дисфункцией митохондрий [40], это является важной задачей, поскольку митохондрии довольно глубоко вовлечены в работу систем клеточной сигнализации, и зачастую сложно понять, является ли их дисфункция первичной или опосредована патологическими изменениями клеточного окружения. Дрожжи *Y. lipolytica*, будучи одноклеточными организмами, лишены сложной системы межклеточных взаимодействий, а кроме этого, обладают

разветвлённой системой полностью функциональных митохондрий «животного типа», содержащих все комплексы дыхательной цепи.

В работе Eremyan et al. [9] показано, что экспрессия Аβ42 в дрожжах вызывала дисфункцию митохондрий, характерную для ранних стадий развития болезни Альцгеймера в нейронах. Кроме того, колокализация митохондрий и амилоидных агрегатов позволили предположить наличие физического контакта митохондрий и амилоидных агрегатов, на что указывали некоторые другие работы [41]. Поскольку витрификация образцов для криогенной микроскопии является наименее разрушающим методом фиксации объектов, данные, полученные в этой работе, можно считать наиболее достоверно показывающими отсутствие контакта агрегатов амилоидного белка и митохондрий.

Тем не менее распределение расстояний между агрегатами и митохондриальной мембраной свидетельствует о концентрации агрегатов вблизи митохондрий, что может иметь значение в процессах транспорта митохондриальных субстратов, или влиянии агрегатов на биосинтез белков по причине большого числа рибосом, располагающихся также вблизи митохондрий.

Модель топологической связи суперкомплексов в мембране митохондрий. Интересной особенностью, которую удалось установить именно благодаря крио-ЭТ, оказался факт, что АТР-синтазы не только димеризуются (это можно обнаружить и с помощью нативного электрофореза), но ещё и образуют олигомерные ряды, которые деформируют мембрану, создавая на ней существенную кривизну [16, 42, 43]. Как оказалось, респиросомы тоже влияют на кривизну мембраны, что видно на криоэлектронных изображениях респиросом разных организмов [30, 34]. При этом взаимодействие комплекса I и димера комплекса III в респиросоме консервативно, и структура респиросомы имеет высокое сходство между видами [44], что указывает и на консервативность взаимодействия респиросом с мембраной. Это позволяет предположить, что связь респиросом с АТР-синтазами, показанная в работе Nesterov et al. [7] (рис. 4, в), может осуществляться в значительной степени за счёт механических свойств мембраны, стремящейся компенсировать избыточное напряжение. Димеры АТР-синтаз создают около себя область наибольшей кривизны мембраны [36], создавая тем самым напряжение в бислое и отклоняя его от энергетически оптимальной структуры, которая была бы при самоорганизации липида при отсутствии белка. В области, отстоящей от АТР-синтаз, мембрана стремится прийти к равновесной топологии ламеллярного бислоя. В то же время респиросомы также создают напряжение мембраны,

но липидный бислои вокруг них обладает существенно меньшей кривизной, чем около димеров АТФ-синтаз. Для того чтобы респирасомы не создавали отдельную область с искривлением мембраны, им выгодно располагаться ближе к АТФ-синтазам в той части мембраны, где кривизна для них уже и так является оптимальной и не требуется дополнительная энергия для механического напряжения липидного бислоя. В таком случае должна наблюдаться предпочтительная ориентация респирасом вдоль одной оси, что действительно подтверждается экспериментом на митохондриях сердца [7]. Таким образом, сила, притягивающая респирасомы к АТФ-синтазе, имеет энтропийную топологическую природу и определяется мембраной, которая стремится минимизировать своё отклонение от равновесной приближенной к бислою структуры. Необходимо также отметить, что интегральные белковые комплексы, которые создают искривление митохондриальной мембраны, создают вместе с тем вокруг себя мембранные домены (рафты) из кардиолипина и других липидов, имеющих коническую форму, так как именно они оптимально подходят для создания кривизны в липидном бислое [45]. Связь с кардиолипином АТФ-синтаз и дыхательных комплексов (как по отдельности, так и собранных в респирасомы) многократно подтверждена экспериментами [38, 46–53]. Способность кардиолипина формировать мембранные домены также показана в эксперименте [54].

Сортировка белков на основе их взаимодействия с липидами мембраны хорошо известна – в клетке на основе рафтов и нанорафтов функционирует система сортировки [55]. Сортировка белков в мембранных рафтах происходит преимущественно на основе совпадения или несовпадения толщины их гидрофобной мембранной зоны с толщиной определённого кластера из липидов мембраны (принцип гидрофобного несоответствия, *hydrophobic mismatch*). Вышеприведённые данные о мембранах митохондрий, помимо хорошо известного принципа кластеризации белков со схожей гидрофобной зоной, позволяют добавить ещё один принцип сортировки – на основе сродства белковых комплексов к зонам разной кривизны мембраны. Сложная топология внутренней мембраны митохондрий сердца и наличие в ней небислоиных фаз наводит на мысль, что самоорганизация комплексов системы ОКСФОС в митохондриях сердца может идти по механизму, схожему с кристаллизацией *in meso* мембранных белков [56].

Таким образом, вышеприведённые данные показывают, что структура респирасом эволюционно отобрана так, что посредством взаимодействия с липидами мембраны она обеспечивает локализа-

цию респирасом около димеров АТФ-синтаз и тем самым кластеризацию всей системы ОКСФОС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе показано экспериментальное применение одного из самых современных методов структурной биологии для исследования взаимодействия агрегатов с мембранами, топологии самих мембран и взаимного расположения мембранных белков в митохондриях в нативных условиях. Проведён ряд новых экспериментов с использованием CLEM, которые показали, что амилоидные агрегаты не взаимодействуют с внешней мембраной митохондрий и не попадают в митохондрии. Также более глубоко проанализированы собственные данные последних лет и современные литературные данные по криоэлектронной просвечивающей микроскопии и томографии митохондрий и митохондриальных мембран. Показано комплексное устройство и сложная топология мембран митохондрий сердца крыс, обогащённых крупными суперкомплексами, влияющими на кривизну мембраны. В полном соответствии с этим мембрана митохондрий сердца имеет лишь незначительные области, в которых она близка к плоскому бислою, в то время как большая часть мембраны представляет собой сложную сеть из перемычек с высокой кривизной, на которых расположены ряды из димеров АТФ-синтаз и суперкомплексов дыхательной цепи. Те области мембраны, которые на ПЭМ тонких срезов выглядят как ламеллярные, на самом деле испещрены множеством отверстий, в которых размещаются плотно стыкованные кластеры белковых комплексов системы ОКСФОС. В работе обсуждаются также теоретические основы, объясняющие кластеризацию мембранных белков системы ОКСФОС и кардиолипина минимизацией энергии деформации липидной части мембраны. Такой принцип организации мембранных белков предложено назвать топологическим.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке НИЦ Курчатовский институт (тематический план 1ф.4.1 «Изучение процессов генерации, передачи и распределения энергии в живых организмах, направленное на поиск новых подходов к созданию терапевтических средств, новых биоэнергетических устройств и систем искусственного фотосинтеза»).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. В рамках настоящей статьи не проводилось каких-либо новых экспериментов с участием людей или животных, кроме дрожжей, в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Saibil, H. R. (2022) Cryo-EM in molecular and cellular biology, *Mol. Cell*, **82**, 274-284, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.12.016>.
2. Guaita, M., Watters, S. C., and Loerch, S. (2022) Recent advances and current trends in cryo-electron microscopy, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **77**, 102484, <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2022.102484>.
3. Chua, E. Y. D., Mendez, J. H., Rapp, M., Ilca, S. L., Tan, Y. Z., Maruthi, K., Kuang, H., Zimanyi, C. M., Cheng, A., Eng, E. T., Noble, A. J., Potter, C. S., and Carragher, B. (2022) Better, faster, cheaper: recent advances in cryo-electron microscopy, *Annu. Rev. Biochem.*, **91**, 1-32, <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-032620-110705>.
4. Hoffman, D. P., Shtengel, G., Xu, C. S., Campbell, K. R., Freeman, M., Wang, L., Milkie, D. E., Pasolli, H. A., Iyer, N., Bogovic, J. A., Stabley, D. R., Shirinifard, A., Pang, S., Peale, D., Schaefer, K., Pomp, W., Chang, C.-L., Lippincott-Schwartz, J., Kirchhausen, T., Solecki, D. J., Betzig, E., and Hess, H. F. (2020) Correlative three-dimensional super-resolution and block-face electron microscopy of whole vitreously frozen cells, *Science*, **367**, eaaz5357, <https://doi.org/10.1126/science.aaz5357>.
5. Liu, T., Stephan, T., Chen, P., Keller-Findeisen, J., Chen, J., Riedel, D., Yang, Z., Jakobs, S., and Chen, Z. (2022) Multi-color live-cell STED nanoscopy of mitochondria with a gentle inner membrane stain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **119**, e2215799119, <https://doi.org/10.1073/pnas.2215799119>.
6. Wang, C., Taki, M., Sato, Y., Tamura, Y., Yaginuma, H., Okada, Y., and Yamaguchi, S. (2019) A photostable fluorescent marker for the superresolution live imaging of the dynamic structure of the mitochondrial cristae, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 15817-15822, <https://doi.org/10.1073/pnas.1905924116>.
7. Nesterov, S., Chesnokov, Y., Kamyshinsky, R., Panteleeva, A., Lyamzaev, K., Vasilov, R., and Yaguzhinsky, L. (2021) Ordered clusters of the complete oxidative phosphorylation system in cardiac mitochondria, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, <https://doi.org/10.3390/ijms22031462>.
8. Nesterov, S. V., Yaguzhinsky, L. S., Vasilov, R. G., Kadantsev, V. N., and Goltsov, A. N. (2022) Contribution of the collective excitations to the coupled proton and energy transport along mitochondrial cristae membrane in oxidative phosphorylation system, *Entropy*, **24**, 1813, <https://doi.org/10.3390/e24121813>.
9. Epremyan, K. K., Rogov, A. G., Goleva, T. N., Lavrushkina, S. V., Zinovkin, R. A., and Zvyagil'skaya, R. A. (2023) Altered mitochondrial morphology and bioenergetics in a new yeast model expressing A β 42, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, <https://doi.org/10.3390/ijms24020900>.
10. Bischof, J., Hunt, C. J., Rubinsky, B., Burgess, A., and Pegg, D. E. (1990) Effects of cooling rate and glycerol concentration on the structure of the frozen kidney: Assessment by cryo-scanning electron microscopy, *Cryobiology*, **27**, 301-310, [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(90\)90029-4](https://doi.org/10.1016/0011-2240(90)90029-4).
11. Plokhikh, K. S., Nesterov, S. V., Chesnokov, Y. M., Rogov, A. G., Kamyshinsky, R. A., Vasiliev, A. L., Yaguzhinsky, L. S., and Vasilov, R. G. (2024) Association of 2-oxoacid dehydrogenase complexes with respirasomes in mitochondria, *FEBS J.*, **291**, 132-141, <https://doi.org/10.1111/febs.16965>.
12. Nesterov, S. V., Skorobogatova, Y. A., Panteleeva, A. A., Pavlik, L. L., Mikheeva, I. B., Yaguzhinsky, L. S., and Nartsissov, Y. R. (2018) NMDA and GABA receptor presence in rat heart mitochondria, *Chem. Biol. Interact.*, **291**, 40-46, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.06.004>.
13. Sibarita, J.-B. (2005) Deconvolution microscopy, in *Microscopy Techniques* (Rietdorf, J., ed) Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 201-243.
14. Kremer, J. R., Mastronarde, D. N., and McIntosh, J. R. (1996) Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD, *J. Struct. Biol.*, **116**, 71-76, [https://doi.org/10.1016/1047-8477\(96\)00029-4](https://doi.org/10.1016/1047-8477(96)00029-4).
15. Wan, W., and Briggs, J. A. G. (2016) *Cryo-Electron Tomography and Subtomogram Averaging*, 1st Edn, Elsevier.
16. Nesterov, S. V., Chesnokov, Y. M., Kamyshinsky, R. A., Yaguzhinsky, L. S., and Vasilov, R. G. (2020) Determining the structure and location of the ATP synthase in the membranes of rat's heart mitochondria using cryoelectron tomography, *Nanotechnol. Russia*, **15**, 83-89, <https://doi.org/10.1134/S1995078020010139>.
17. Liu, Y.-T., Zhang, H., Wang, H., Tao, C.-L., Bi, G.-Q., and Zhou, Z. H. (2022) Isotropic reconstruction for electron tomography with deep learning, *Nat. Commun.*, **13**, 6482, <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33957-8>.
18. Martinez-Sanchez, A., Garcia, I., Asano, S., Lucic, V., and Fernandez, J. J. (2014) Robust membrane detection based on tensor voting for electron tomography, *J. Struct. Biol.*, **186**, 49-61, <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2014.02.015>.
19. Castaño-Díez, D., Kudryashev, M., Arheit, M., and Stahlberg, H. (2012) Dynamo: A flexible, user-friendly development tool for subtomogram averaging of cryo-EM data in high-performance computing environments, *J. Struct. Biol.*, **178**, 139-151, <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.12.017>.
20. Tegunov, D., and Cramer, P. (2019) Real-time cryo-electron microscopy data preprocessing with Warp, *Nat. Methods*, **16**, 1146-1152, <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0580-y>.
21. Bharat, T. A. M., and Scheres, S. H. W. (2016) Resolving macromolecular structures from electron cryo-tomography data using subtomogram averaging in RELION, *Nat. Protoc.*, **11**, 2054-2065, <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.124>.

22. Asano, S., Fukuda, Y., Beck, F., Aufderheide, A., Förster, F., Danev, R., and Baumeister, W. (2015) A molecular census of 26S proteasomes in intact neurons, *Science*, **347**, 439-442, <https://doi.org/10.1126/science.1261197>.
23. Ashleigh, T., Swerdlow, R. H., and Beal, M. F. (2023) The role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease pathogenesis, *Alzheimers Dement.*, **19**, 333-342, doi: 10.1002/alz.12683.
24. Bhatia, S., Rawal, R., Sharma, P., Singh, T., Singh, M., and Singh, V. (2022) Mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease: opportunities for drug development, *Curr. Neuropharmacol.*, **20**, 675-692, <https://doi.org/10.2174/1570159X19666210517114016>.
25. Eubel, H., Heinemeyer, J., and Braun, H.-P. (2004) Identification and characterization of respirasomes in potato mitochondria, *Plant Physiol.*, **134**, 1450-1459, <https://doi.org/10.1104/pp.103.038018>.
26. Chaban, Y., Boekema, E. J., and Dudkina, N. V. (2014) Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilization, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 418-426, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.10.004>
27. Dudkina, N. V., Kouřil, R., Peters, K., Braun, H.-P., and Boekema, E. J. (2010) Structure and function of mitochondrial supercomplexes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1797**, 664-670, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.12.013>.
28. Bultema, J. B., Braun, H.-P., Boekema, E. J., and Kouril, R. (2009) Megacomplex organization of the oxidative phosphorylation system by structural analysis of respiratory supercomplexes from potato, *Biochim. Biophys. Acta*, **1787**, 60-67, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.10.010>.
29. Dudkina, N. V., Kudryashev, M., Stahlberg, H., and Boekema, E. J. (2011) Interaction of complexes I, III, and IV with the bovine respirasome by single particle cryoelectron tomography, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 15196-15200, <https://doi.org/10.1073/pnas.1107819108>.
30. Mühleip, A., Flygaard, R. K., Baradaran, R., Haapanen, O., Gruhl, T., Tobiasson, V., Maréchal, A., Sharma, V., and Amunts, A. (2023) Structural basis of mitochondrial membrane bending by the I-II-III₂-IV₂ supercomplex, *Nature*, **615**, 934-938, <https://doi.org/10.1038/s41586-023-05817-y>.
31. Guo, R., Zong, S., Wu, M., Gu, J., and Yang, M. (2017) Architecture of human mitochondrial respiratory megacomplex I₂III₂IV₂, *Cell*, **170**, 1247-1257.e12, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.050>.
32. Gu, J., Wu, M., Guo, R., Yan, K., Lei, J., Gao, N., and Yang, M. (2016) The architecture of the mammalian respirasome, *Nature*, **537**, 639-643, <https://doi.org/10.1038/nature19359>.
33. Vercellino, I., and Sazanov, L. A. (2021) Structure and assembly of the mammalian mitochondrial supercomplex CIII₂CIV, *Nature*, **598**, 364-367, <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03927-z>.
34. Klusch, N., Dreimann, M., Senkler, J., Rugen, N., Kühlbrandt, W., and Braun, H.-P. (2023) Cryo-EM structure of the respiratory I + III₂ supercomplex from *Arabidopsis thaliana* at 2 Å resolution, *Nat Plants.*, **9**, 142-156, <https://doi.org/10.1038/s41477-022-01308-6>.
35. Kühlbrandt, W. (2015) Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes, *BMC Biol.*, **13**, 89, <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0201-x>.
36. Strauss, M., Hofhaus, G., Schröder, R. R., and Kühlbrandt, W. (2008) Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane, *EMBO J.*, **27**, 1154-1160, <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.35>.
37. Garab, G., Yaguzhinsky, L. S., Dlouhý, O., Nesterov, S. V., Špunda, V., and Gasanoff, E. S. (2022) Structural and functional roles of non-bilayer lipid phases of chloroplast thylakoid membranes and mitochondrial inner membranes, *Prog. Lipid. Res.*, **86**, 101163, <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2022.101163>.
38. Gasanov, S. E., Kim, A. A., Yaguzhinsky, L. S., and Dagda, R. K. (2018) Non-bilayer structures in mitochondrial membranes regulate ATP synthase activity, *Biochim. Biophys. Acta*, **1860**, 586-599, <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2017.11.014>.
39. Paradies, G., Paradies, V., De Benedictis, V., Ruggiero, F. M., and Petrosillo, G. (2014) Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 408-417, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.10.006>.
40. Epremyan, K. K., Goleva, T. N., Rogov, A. G., Lavrushkina, S. V., Zinovkin, R. A., and Zvyagilskaya, R. A. (2022) The first *Yarrowia lipolytica* yeast models expressing hepatitis B virus X protein: changes in mitochondrial morphology and functions, *Microorganism*, **10**, 1817, <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091817>.
41. Völgyi, K., Badics, K., Sialana, F. J., Gulyássi, P., Udvari, E. B., Kis, V., Drahos, L., Lubec, G., Kékesi, K. A., and Juhász, G. (2018) Early presymptomatic changes in the proteome of mitochondria-associated membrane in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease, *Mol. Neurobiol.*, **55**, 7839-7857, <https://doi.org/10.1007/s12035-018-0955-6>.
42. Buzhynskyy, N., Sens, P., Prima, V., Sturgis, J. N., and Scheuring, S. (2007) Rows of ATP synthase dimers in native mitochondrial inner membranes, *Biophys. J.*, **93**, 2870-2876, <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.109728>.
43. Blum, T. B., Hahn, A., Meier, T., Davies, K. M., and Kühlbrandt, W. (2019) Dimers of mitochondrial ATP synthase induce membrane curvature and self-assemble into rows, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 4250-4255, <https://doi.org/10.1073/pnas.1816556116>.

44. Davies, K. M., Blum, T. B., and Kühlbrandt, W. (2018) Conserved *in situ* arrangement of complex I and III₂ in mitochondrial respiratory chain supercomplexes of mammals, yeast, and plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 3024-3029, <https://doi.org/10.1073/pnas.1720702115>.
45. Beltrán-Heredia, E., Tsai, F.-C., Salinas-Almaguer, S., Cao, F. J., Bassereau, P., and Monroy, F. (2019) Membrane curvature induces cardiolipin sorting, *Commun. Biol.*, **2**, 1-7, <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0471-x>.
46. Arias-Cartin, R., Grimaldi, S., Arnoux, P., Guigliarelli, B., and Magalon, A. (2012) Cardiolipin binding in bacterial respiratory complexes: structural and functional implications, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 1937-1949, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.04.005>.
47. Arnarez, C., Marrink, S. J., and Periole, X. (2013) Identification of cardiolipin binding sites on cytochrome *c* oxidase at the entrance of proton channels, *Sci. Rep.*, **3**, 1-9, <https://doi.org/10.1038/srep01263>.
48. Duncan, A. L., Robinson, A. J., and Walker, J. E. (2016) Cardiolipin binds selectively but transiently to conserved lysine residues in the rotor of metazoan ATP synthases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 8687-8692, <https://doi.org/10.1073/pnas.1608396113>.
49. Pfeiffer, K., Gohil, V., Stuart, R. A., Hunte, C., Brandt, U., Greenberg, M. L., and Schägger, H. (2003) Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes, *J. Biol. Chem.*, **278**, 52873-52880, <https://doi.org/10.1074/jbc.M308366200>.
50. Mühleip, A., McComas, S. E., and Amunts, A. (2019) Structure of a mitochondrial ATP synthase with bound native cardiolipin, *eLife*, **8**, e51179, <https://doi.org/10.7554/eLife.51179>.
51. Mileykovskaya, E., and Dowhan, W. (2014) Cardiolipin-dependent formation of mitochondrial respiratory supercomplexes, *Chem. Phys. Lipids*, **179**, 42-48, <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2013.10.012>.
52. Zhang, M., Mileykovskaya, E., and Dowhan, W. (2005) Cardiolipin is essential for organization of complexes III and IV into a supercomplex in intact yeast mitochondria, *J. Biol. Chem.*, **280**, 29403-29408, <https://doi.org/10.1074/jbc.M504955200>.
53. Zhang, M., Mileykovskaya, E., and Dowhan, W. (2002) Gluing the respiratory chain together. Cardiolipin is required for supercomplex formation in the inner mitochondrial membrane, *J. Biol. Chem.*, **277**, 43553-43556, <https://doi.org/10.1074/jbc.C200551200>.
54. Mileykovskaya, E., and Dowhan, W. (2009) Cardiolipin membrane domains in prokaryotes and eukaryotes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1788**, 2084-2091, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.04.003>.
55. Diaz-Rohrer, B., Levental, K. R., and Levental, I. (2014) Rafting through traffic: Membrane domains in cellular logistics, *Biochim. Biophys. Acta*, **1838**, 3003-3013, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.07.029>.
56. Zabara, A., Meikle, T. G., Newman, J., Peat, T. S., Conn, C. E., and Drummond, C. J. (2017) The nanoscience behind the art of *in meso* crystallization of membrane proteins, *Nanoscale*, **9**, 754-763, <https://doi.org/10.1039/C6NR07634C>.

SAFARI WITH AN ELECTRON GUN: VISUALIZATION OF PROTEIN AND MEMBRANE INTERACTIONS IN MITOCHONDRIA IN THE NATURAL ENVIRONMENT

S. V. Nesterov^{1*}, K. S. Plokhikh¹, Yu. M. Chesnokov¹, D. A. Mustaphin¹, T. N. Goleva¹, A. G. Rogov¹, R. G. Vasilov¹, and L. S. Yaguzhinsky²

¹ National Research Center "Kurchatov Institute",
123182 Moscow, Russia; e-mail: semen.v.nesterov@phystech.edu

² Belozersky Research Institute for Physico Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119992 Moscow, Russia

This paper presents new structural data about mitochondria using correlative light and electron microscopy and cryo-electron tomography (cryo-ET). These state-of-the-art structural biology methods allow the study of biological objects at nanometer scales in natural conditions. The non-invasiveness of these methods makes them comparable to observing animals in their natural environment on a safari. The paper highlights two areas of research that can only be accomplished using these methods. The study visualized the location of A β 42 amyloid aggregates in relation to mitochondria to test a hypothesis for the development of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. The results showed that A β 42 aggregates do not interact with mitochondria, although some of them are closely located. Therefore, the study demonstrated that mitochondrial dysfunction is not directly influenced by aggregates on mitochondrial structure. The source of mitochondrial dysfunction should be investigated in other processes.

Second unique area presented in this work is the high-resolution visualization of mitochondrial membranes and proteins in them. The analysis of cryo-ET data reveals toroidal holes in the lamellar structures of cardiac mitochondrial cristae, where ATP synthases are located. The study proposes a new mechanism for sorting and clustering protein complexes in the membrane based on topology. According to this mechanism, the position of oxidative phosphorylation system proteins in the membrane is determined by its curvature. High-resolution tomography expands and complements existing ideas about the structural and functional organization of mitochondria. This makes it possible to study the previously inaccessible structural interactions of proteins with each other and with membranes *in vivo*.

Keywords: membrane, mitochondria, oxidative phosphorylation, supercomplex, cryo-electron microscopy, ATP-synthase, respirasome, A β 42, amyloid aggregates

КАРКАСНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ ИЛИ СВОБОДНЫЙ ГЕЛЕОБРАЗНЫЙ МЕЖКЛЕТОЧНЫЙ МАТРИКС КАК ОБЯЗАТЕЛЬНОЕ УСЛОВИЕ ДЛЯ ПОСТРОЕНИЯ ОРГАНЫХ СТРУКТУР ПРИ РЕГЕНЕРАЦИИ

Обзор

© 2024 В.Н. Манских

*НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119991 Москва, Россия; электронная почта: Manskikh@mail.ru*

Поступила в редакцию 14.09.2023

После доработки 02.11.2023

Принята к публикации 15.11.2023

За последние десятилетия было сделано необозримо большое число попыток восстановить структуру органов млекопитающих путем введения в них стволовых клеток после повреждения. Однако оказалось, что такая процедура не ведет к полноценному восстановлению. При этом известно, что в органах, обладающих способными к пролиферации паренхиматозными клетками, в некоторых случаях возможна полная регенерация (реституция). Анализ таких моделей позволяет сделать вывод, что важнейшим условием восстановления гистологических структур органа (при наличии стволового пула) является сохранение в нем каркасных структур из коллагена, служащих «направляющими рельсами» для пролиферирующих и дифференцирующихся клеток. Альтернативным условием полной реконструкции структур органа является наличие свободного «морфогенетического пространства», состоящего из гелеобразного матрикса типа эмбриональной соединительной ткани, которое имеет место в эмбриональном органогенезе или при полной регенерации у амфибий. Подходы, направленные на сохранение каркасных структур или на создание «морфогенетического пространства» могли бы радикально улучшить результаты регенерации органов как за счет местных, так и за счет экзогенных стволовых клеток.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: регенеративная медицина, регенерация, эмбриональная соединительная ткань, каркасные структуры, стволовые клетки.

DOI: 10.31857/S0320972524020078 EDN: XMWPEO

ВВЕДЕНИЕ

Вряд ли нужно обосновывать утверждение, что достижение полного восстановления органов после повреждения является одной из важнейших и все еще не решенных задач биологии и медицины. При этом, наряду с чрезвычайно подробно разработанными вопросами, такими как роль различных цитокинов, стромальных или стволовых клеток, есть и такие аспекты, которые почти не обсуждаются в литературе. Настоящая работа будет посвящена изложению и обоснованию подхода к достижению полной регенерации (реституции) органических структур, который, хотя и имеет несколько примеров частных реализаций на экспериментальных моделях, еще никогда не рассматривался в качестве общего ключевого условия. Представляется, что несоблюдение этого усло-

вия и является причиной регулярных неудач при попытках достижения полного восстановления структуры органов в эксперименте и в клинике путем введения разнообразных факторов роста или стволовых клеток.

НЕУДАЧНЫЕ ПОПЫТКИ ВОССТАНОВИТЬ ОРГАНИЧЕСКИЕ СТРУКТУРЫ ПОСЛЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ С ПОМОЩЬЮ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Попытки вызвать полную регенерацию органов у млекопитающих и человека путем введения стволовых (первоначально – эмбриональных стволовых) клеток после повреждения были предприняты очень давно [1–16]. Однако результаты этих работ были обескураживающе незначительными.

Хотя вначале можно было предполагать, что причиной неудач была чужеродность эмбриональных стволовых клеток, использование индуцированных плюрипотентных аутологичных клеток положение принципиально не улучшило [8]. При этом, без всяких сомнений, во многих случаях наблюдается образование новых дифференцированных клеток (и даже целых участков монотонно построенных тканей, например миокарда) из пересаженного стволового пула [1–16]. Однако сложные органнне структуры (типа нефронов) или полную регенерацию органа получить не удалось. Очевидно, что в данном случае наблюдается противоречие опытных данных и исходной концепции, предполагающей, что стволовой пул – главное, чего не хватает для полной регенерации органов. Последнее утверждение противоречит и двум другим группам фактов, а именно: 1) во многих органах, таких как кожа, желудочно-кишечный тракт, печень, почки, имеется собственный стволовой пул; 2) при репаративной регенерации в естественных условиях, учитывая ее сжатые сроки, главную роль играет пролиферация относительно дифференцированных элементов, поскольку стволовые клетки в нормальных тканях очень редки (менее 0,1% популяции) и они делятся относительно редко. Поэтому стволовые клетки имеют большее значение для самоподдержания клеточной популяции, чем для репаративной регенерации как таковой [17].

Неудачи в попытках использовать стволовые клетки привели к смещению акцента в сторону изучения роли «стволовых ниш» и цитокинов при регенерации [16, 18–22]. При этом осталась без достаточного внимания большая группа фактов, свидетельствующих о том, что органы, имеющие собственный пул пролиферирующих паренхиматозных клеток, способны в ряде случаев самостоятельно полностью восстанавливать свою структуру после повреждения.

СТВОЛОВЫЕ И ДРУГИЕ ПРОЛИФЕРИРУЮЩИЕ КЛЕТКИ ИМЕЮТСЯ ВО МНОГИХ ОРГАНАХ И СПОСОБНЫ САМИ ВОССТАНАВЛИВАТЬ ИХ СТРУКТУРУ ПРИ ОПРЕДЕЛЕННЫХ УСЛОВИЯХ

Такие паренхиматозные органы млекопитающих, как печень или почка, способны полностью восстанавливать свою структуру при некоторых вариантах повреждения. Так, например, при действии тиоацетамида в дозах, вызывающих апоптоз (но не некроз) гепатоцитов, возможно полное восстановление структуры печени – с явлениями активной пролиферации и гипертрофии сохранившихся гепатоцитов [23–24] (рис. 1, а и б). Из клини-

ческих наблюдений давно и хорошо известно, что исход острой (в отличие от хронической) почечной недостаточности в подавляющем большинстве случаев (при выздоровлении) сопровождается полным восстановлением структуры нефронов без развития хронической почечной недостаточности [25–27]. Безусловно, это связано с тем, что в этих органах имеется пул собственных низкодифференцированных (в том числе и стволовых) клеток, без которых восстановление невозможно, как, например, невозможна регенерация миокарда после инфаркта [3, 14]. Однако наличие собственного стволового пула еще не освобождает от ситуаций, когда восстановление поврежденного органа оказывается невозможным, более того, такие ситуации встречаются как раз наиболее часто – это хронические инфекционные гепатиты и токсические поражения печени, обычно заканчивающиеся циррозом, или пиелонефриты и инфаркты, приводящие к развитию грубых рубцов в почках [25]. И противопоставление условий этих двух исходов может быть очень продуктивным для понимания механизмов полной регенерации. Чрезвычайно интересен в этом отношении случай острых токсических поражений почек, при которых происходит массовая гибель эпителиоцитов почечных канальцев и их удаление с мочой без разрушения базальных мембран. Как было сказано выше, возникающая при интоксикациях острая почечная недостаточность, как правило, заканчивается полным восстановлением структуры нефронов. Однако в тех исключительных случаях, когда острая почечная недостаточность все же заканчивается развитием хронической недостаточности с фиброзом почек (например, при отравлениях соединениями ртути), она обязательно сопровождается не только гибелью эпителия почечных канальцев, но и тубулорексисом с повреждением базальных мембран, попаданием в интерстиций компонентов мочи, остатков некротизированных клеток и развитием воспаления [25]. Аналогично, если для экспериментального повреждения печени использовать не малые дозы тиоацетамида, а другие индукторы повреждения, вызывающие некроз (а не апоптоз) гепатоцитов с развитием воспаления, то в исходе такого эксперимента возникает фиброз печени [23, 24, 28] (рис. 1, в и г).

Еще одним замечательным примером является регенерация семенника. После умеренного воздействия радиации сперматогенные клетки гибнут почти полностью, но архитектура канальцев оказывается сохраненной, и потому через некоторое время структура органа полностью восстанавливается; если же речь идет о травме в виде механического повреждения или химического некроза, то поврежденная часть со временем подвергается резорбции, а ее место замещается

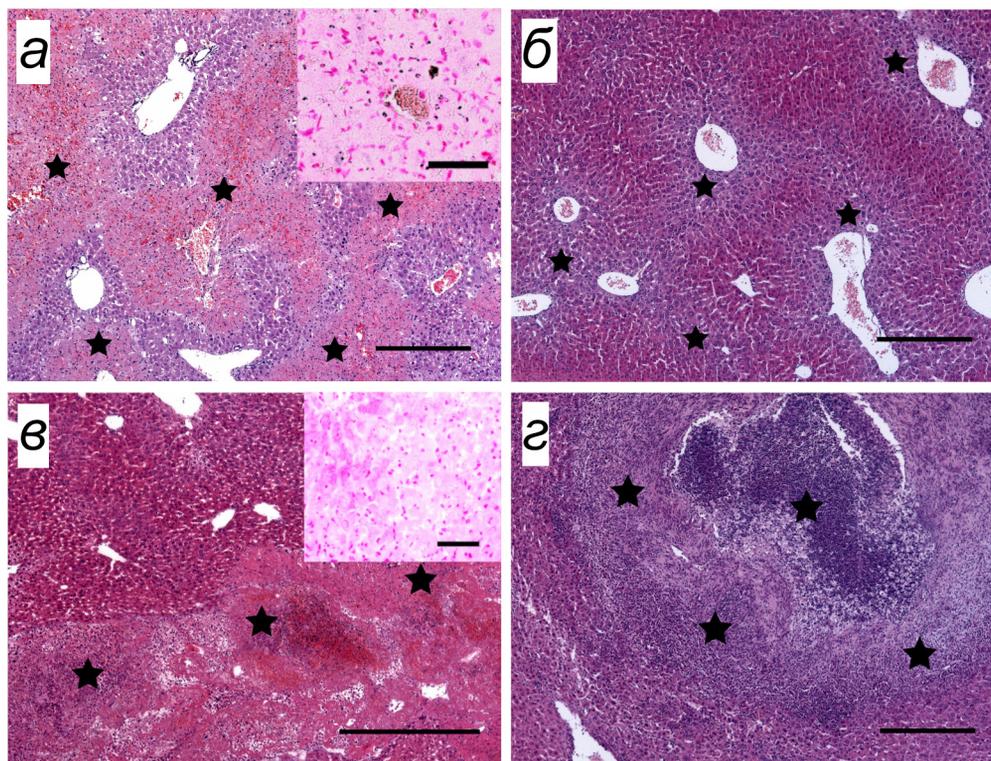


Рис. 1. Развитие полной (реституции) и неполной (субституции) регенерации печени в зависимости от условий повреждения. *a* и *б* – Регенерация печени мышей C57BL/6 после введения тиоацетамида: *a* – через 48 часов (массовый апоптоз без воспаления; доказан TUNEL-методом (черные ядра на врезке)); *б* – через 12 суток (полное восстановление долек с явлениями гипертрофии гепатоцитов). *в* и *г* – Регенерация печени мышей C57BL/6 после криоповреждения: *в* – через 48 часов (некроз и воспаление, TUNEL-негативные ядра – см. врезку); *г* – через 12 суток (участок воспаления и фиброза). На всех фотографиях зоны повреждения и последующей регенерации обозначены черными звездочками. Масштабные линейки и увеличения: *a–г* – 200 мкм, увеличение – 100× (врезка на панели *a* – 20 мкм, на панели *в* – 15 мкм; увеличение – 1000×); окраска гематоксилином и эозином (врезки на панелях *a* и *в* – TUNEL-методом). Фото автора из книги [24]

за счет удлинения сохранившейся части семенных канальцев, рост которых происходит по направлению от сети яичка [29].

Из этих примеров следует не только вывод о способности органов с пулом собственных стволовых клеток к полному восстановлению (реституции), но и указания на конкретные условия, делающие такое восстановление возможным или невозможным.

СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ НЕ СПОСОБНЫ СОЗДАВАТЬ ЗАНОВО ОРГАНЫЕ СТРУКТУРЫ ВО ВЗРОСЛОМ ОРГАНИЗМЕ

Важно отметить, что, хотя потенции к дифференцировке у стволовых элементов (прежде всего, у индуцированных плюрипотентных стволовых клеток) могут быть очень широки, это не означает, что также широки возможности построения из этих клеток сложных упорядоченных органных структур в постфетальном организме. Особенно наглядно архитектурные возможности стволовых клеток проявляются в случае опухолевого роста,

когда речь идет о высококодифференцированных новообразованиях. В этом случае могут возникать солидные массы, пласты, глобулы, альвеолы, трубки, розетки и в особых случаях, таких как нефробластомы, – примитивные почечные клубочки [30]. Однако на этом процессы морфогенеза заканчиваются, печеночная долька или нефрон из таких стволовых клеток никогда не образуются. Даже в доброкачественных тератомах возникают перечисленные примитивные элементы, а не полноценные фрагменты органов [31]. Аналогично ведут себя клетки-предшественники и в случаях, когда орган «вынужден» увеличивать свои функциональные возможности. В частности, при викарной (заместительной) гипертрофии почки не происходит образования новых нефронов, а только увеличение протяженности уже существующих канальцев [24], что на гистологических препаратах выглядит как резкое увеличение площади, занимаемой канальцами при разреженных клубочках (рис. 2, *a*). При регенерации почек в случае острого некротического нефроза неповрежденные базальные мембраны тубул служат своеобразными «направляющими рельсами», по которым

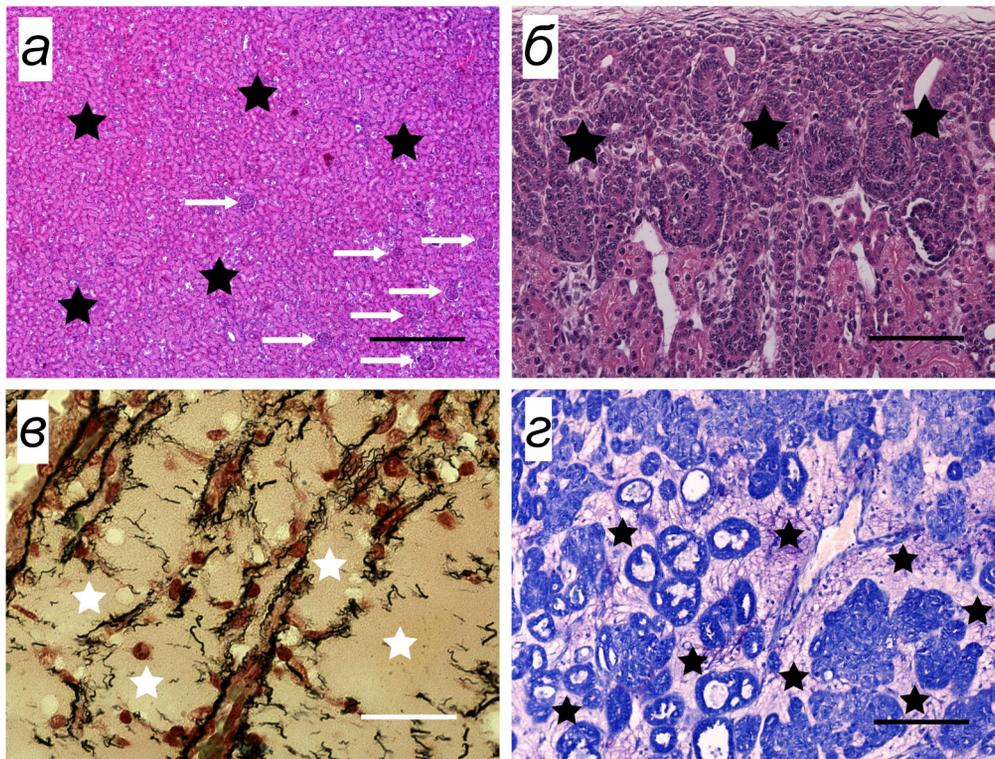


Рис. 2. Тканевые реакции при гипертрофии и образовании новых органических структур. *а* – Почка мыши BALB/c в состоянии викарной гипертрофии после ишемии второй почки (относительное уменьшение числа клубочков (все они указаны стрелками) на фоне большой площади, занимаемой на срезе одними канальцами – обозначено звездочками); *б* – почка новорожденного кролика породы «Шиншилла», субкапсулярная зона коры (звездочками обозначена метанефрогенная бластема и формирующиеся из нее новые нефроны); *в* – «эмбриональная» соединительная ткань мозгового вещества почки новорожденного кролика породы «Шиншилла» (скудное количество коллагена и рыхлая ретикулиновая строма; основное бесструктурное вещество соединительной ткани (обозначено звездочками) заполняет пространство между формирующимися канальцами); *г* – спонтанная аденокарцинома матки кролика породы «Шиншилла» (звездочками обозначена метахроматически окрашенная миксоидная строма, похожая на эмбриональную соединительную ткань). Масштабные линейки и увеличения: *а* – 200 мкм, увеличение – 100×; *б* – 50 мкм, увеличение – 400×; *в* – 20 мкм, увеличение – 1000×; *г* – 100 мкм, увеличение – 200×. Методы окраски: *а–б* – окраска гематоксилином и эозином; *в* – импрегнация по Гордону–Свиту с докраской смесью Туорта (нейтральный красный – лихтгрюн); *г* – окраска тионином

пролиферирующие клетки могут выстроить разрушенные элементы нефрона от клубочка до собирающих трубок, и именно поэтому тубулорексис делает регенерацию нефрона невозможной [25]. Точно такая же ситуация имеет место в печеночных дольках, которые при гипертрофии печени только увеличиваются в размерах, но не образуются вновь, и в семенниках, где после повреждения удлиняются старые канальцы, но не образуются новые.

Таким образом, имеющиеся в регенерирующей ткани или введенные извне стволовые клетки вполне могут встраиваться в уже существующие структуры (как это происходит при физиологической регенерации), но не строить новые, поскольку необходимые для этого морфогенетические эмбриональные градиенты уже отсутствуют. При этом в поврежденной ткани во многих случаях протекают процессы, препятствующие процессам регенерации по каркасу.

КАРКАСНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ И ИХ РОЛЬ В ПОСТРОЕНИИ ОРГАНИЧЕСКИХ СТРУКТУР

В описанных выше, как и во многих других примерах, кажется очевидным, что важнейшей причиной, приводящей к невозможности реституции, является нарушение архитектоники каркасных структур органов. К каркасным компонентам надо отнести такие образования из внеклеточного матрикса, которые не только обеспечивают механическую прочность, но и имеют упорядоченную структуру, соответствующую нормальной архитектонике органа и, собственно, сама эта архитектоника обеспечивается данными компонентами. Можно назвать как минимум три типа таких структур.

1) Сложные трехмерные структуры, представляющие собой совокупность базальных мембран (основу которых составляет коллаген IV типа для эпителиев и III и V типов – для мышц,

а также перлекан, ламинины и множество других компонентов [31–34]), вместе образующих контурную основу для элементарной единицы определенного органа (печеночной дольки, нефрона и т.д.); такие каркасные структуры актуальны для органов, паренхима которых построена из эпителиальных тканей, и для мышечных образований; роль таких структур состоит в том, чтобы обеспечить не только опору, но и упорядоченное расположение (для эпителиев) и объединение в одну механическую структуру (для мышц).

2) Трехмерная сеть, образованная ретикулиновыми волокнами (основу которых составляет коллаген III типа), представляющая каркасные структуры в органах кроветворения и иммуногенеза (тимусе, селезенке, лимфатических узлах, костном мозге) или заполняющая пространство между органами структурами, разграниченными базальными мембранами (в почке, печени и др.); ретикулиновые образования позволяют компартментализировать орган (например, они составляют основу фолликулов селезенки и лимфатических узлов) и при этом не препятствовать локомоции подвижных клеток и даже служить для них опорой [31, 32].

3) Каркасные структуры специальных типов, например, миелиновые футляры для аксонов нервных клеток, эластические мембраны и разные коллагеновые волокна стенок сосудов, основное вещество роговицы глаза, состоящее из упорядоченно расположенных коллагеновых волокон I типа и др.

Очень важно отметить, что каркасные структуры закладываются в эмбриогенезе как единая система сразу во всем строящемся органе одновременно с формированием всех его компартментов, что обеспечивает соответствующее позиционное морфогенетическое воздействие на дифференцирующиеся клетки. Такую позиционную информацию во взрослом организме, по-видимому, сохраняют именно описанные выше каркасные элементы, и именно поэтому их разрушение не позволяет выстроить органные структуры заново.

Следует подчеркнуть, что каркасные структуры межклеточного матрикса, несомненно, могут влиять на внутриклеточные сигнальные пути и важнейшие клеточные реакции (предотвращать аноксис, индуцировать специфическую дифференцировку клеток и т.д.) [34, 35]. Так, в частности, известно, что состав ламининов базальной мембраны определяет направление дифференцировки эпителиальных клеток (например, от него зависит, какой эпителий будет развиваться в данном отделе кишечника) [36], развитие ретикулиновых волокон и эластического каркаса предопределяет компартментализацию легких в эмбриогенезе [37], а ретикулиновые волокна

и даже балки из волокон коллагена I типа определяют ветвление развивающихся протоколов молочной и слюнной желез [38–40]. Представляется, однако, что эти и подобные эффекты являются только важным дополнением к роли «направляющих рельсов» при построении органных структур при регенерации.

ФАКТОРЫ, ПРЕПЯТСТВУЮЩИЕ ВОССТАНОВЛЕНИЮ НОРМАЛЬНОЙ СТРУКТУРЫ ОРГАНА ПРИ НАЛИЧИИ В НЕМ ПРОЛИФЕРИРУЮЩИХ ПАРЕНХИМАТОЗНЫХ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ

Если принять сохранность каркасных структур в качестве основного условия для полного восстановления органа после повреждения у взрослых млекопитающих, то можно обозначить факторы, препятствующие такому восстановлению. Среди причинных факторов на первое место следует поставить типичную для фиброза трансформацию фибробластов в миофибробласты, особенно активно секретирующие коллаген, и связанное с этим развитие рубцовой ткани у млекопитающих [33, 34]. Представляется, что такая ткань, с одной стороны, заполняет собой пространство органа, развитие в котором (из-за механических и метаболических причин, в частности, аваскулярности) паренхиматозных элементов оказывается невозможным, а во-вторых, – из-за того, что оказываются поврежденными каркасные компоненты органа. Фибробласты и миофибробласты являются клетками, значительно менее требовательными к условиям для выживания и пролиферации, по сравнению с паренхиматозными элементами, и заполняют собой и коллагеном тканевый дефект намного быстрее последних [25, 41]. Они секретируют матриксные металлопротеиназы, которые разрушают коллаген каркасных структур и базальных мембран [33, 34], и производят большое количество фибринозного коллагена, что в конечном счете ведет к грубому нарушению архитектоники органного каркаса. Между прочим, ключевая роль сохранившихся направляющих каркасных элементов давно уже осознана в случае регенерации проводниковых структур нервной системы (нервов, спинного мозга) [42–44] и как индуктор дифференцировки костной ткани [45–47], но, очевидно, не вполне учитывается, когда речь идет о восстановлении паренхиматозных органов (печени, почек, миокарда, различных желез). С другой стороны, именно такой принцип широко используется сегодня для создания искусственных органов *in vitro*, когда для их построения применяют децеллюляризованные коллагеновые каркасы, заселяемые стволовыми клетками [48–52].

Если продолжить анализ далее, то следует назвать другое негативное условие – воспаление, которое часто приводит к фиброзу и без морфологически выраженной альтерации ткани [25]. Этому способствуют так называемые M2-макрофаги, или макрофаги второй фазы воспаления, цитокиновый профиль которых (прежде всего, секреция TGF- β) как раз направлен на создание условий для неполной репаративной регенерации по типу субституции (рубца) [53–55]. Кроме того, в условиях воспаления клетки-эффекторы – нейтрофилы и макрофаги – сами по себе за счет выделяемых ими протеаз (коллагеназ) могут разрушать каркасные структуры, и в некоторых случаях это повреждение может быть более значительным, чем то, которое вызвало некроз ткани. Например, наши исследования показали, что при повреждении почки, вызванном фототромбозом, аргирофильный каркас и базальные мембраны пораженных канальцев не имеют резко выраженных изменений, и развитие фиброза в данной модели связано с последующей воспалительной инфильтрацией зоны некроза [56].

В свою очередь, одним из условий развития воспаления после повреждения является высвобождение лигандов для Toll-подобных рецепторов и других молекул, ассоциированных с повреждением (DAMPs) из клеток, погибших по пути некроза. Апоптоз же в подавляющем большинстве случаев не сопровождается индукцией воспаления [25, 28, 57–59]. Впрочем, когда фагоцитоз апоптотических телец почему-либо задерживается (например, когда апоптоз носит необычайно массовый характер), возможен их вторичный некроз с развитием воспалительного ответа [60], а следовательно, и фиброза. Таким образом, тип гибели и судьба остатков погибших клеток являются еще одним фактором, определяющим полноту регенерации. И если имеет место некроз, то процесс обычно заканчивается развитием фиброзной ткани, а не восстановлением исходной структуры органа.

Стоит подчеркнуть тот принципиальный факт, что при сохранении каркасных структур во всех описанных случаях регенерирующий орган не нуждается ни в экзогенных стволовых клетках, ни даже в факторах роста и дифференцировки, хотя именно эти элементы представляются как ключевые в подавляющем большинстве работ, посвященных стимуляции репаративной регенерации [16, 18–22]. Надо при этом заметить, что, в отличие от условий, связанных с состоянием пролиферирующих паренхиматозных элементов, существующие *in vivo* каркасные структуры очень мало обсуждаются в литературе, посвященной репаративной регенерации.

СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ МОГУТ СТРОИТЬ ОРГАНЫЕ СТРУКТУРЫ В СВОБОДНОМ «МОРФОГЕНЕТИЧЕСКОМ ПРОСТРАНСТВЕ»

Однако кажется принципиально возможным и другой путь построения органных структур, не требующий ранее сформированного каркаса. Как известно, у новорожденных животных при нетравматическом повреждении (например, при экспериментальной ишемии) почки обычно происходит практически полное восстановление структур органов [60]. Если же обратиться к морфологии неонатальной почки, то можно увидеть, что в ней все еще идет активное образование новых нефронов из субкапсулярно расположенной бластемы (рис. 2, б). При этом обращает на себя внимание не только плотно заполненная недифференцированной метанефрогенной тканью кортикальная зона с формирующимися элементами нефронов, но и особый характер соединительной ткани, заполняющей пространство между еще относительно редкими канальцами, растущими по направлению от коркового вещества к лоханке. Эта ткань состоит из отросчатых мезенхимоподобных клеток, между которыми почти нет коллагена и только очень рыхлая сеть из ретикулиновых волокон (рис. 2, в). Основной же объем этой ткани приходится на бесструктурное основное вещество, которое отчетливо обнаруживается при окраске гистологических препаратов нейтральным красным, тионином или прочным зеленым FCF (рис. 2, в). Между прочим, очень похожая ткань имеется у личинок бесхвостых амфибий, которая, по-видимому, допускает возможность различных перестроек при метаморфозе и позволяет им восстанавливать утраченные конечности [61] (не исключено, что такая дифференцировка фибробластов и является критическим условием, которое делает возможным полную (эпиморфную) регенерацию органов и конечностей из бластемы у хвостатых амфибий). Таким образом, образование новых нефронов в почках у новорожденных животных происходит не только в условиях наличия недифференцированной бластемы, но и особой эмбриональной соединительной ткани, похожей на слизистую соединительную ткань пуповины – вартонов студень. Эта ткань, отличаясь обилием основного вещества и бедностью жесткими волокнистыми структурами, обеспечивает, с одной стороны, объемную основу органа (иначе – при наличии жесткой капсулы – возникли бы механические препятствия для образования новых органных структур), а с другой – создает пространство, которое позволяет растущим во всех направлениях и ветвящимся концам собираемых трубок беспрепятственно достигать метанефрогенной бластемы, а мочевым канальцам

новообразованных нефронов – увеличиваться в длину [62]. Следовательно, в данном случае морфогенез идет не в жестком предсуществующем морфогенетическом каркасе, а в своеобразном свободном «матриксе», который делает возможным трехмерный рост новых элементов паренхимы. Очень похожая ситуация имеет место *in vitro* при воссоздании органических структур в матриксе [63]. В постфетальном периоде вместо «матрикса» объем почки заполняется канальцами и жесткими коллагеновыми структурами, что делает невозможным образование новых нефронов.

ПУТИ ДОСТИЖЕНИЯ ПОЛНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ: СОХРАНЕНИЕ КАРКАСНЫХ СТРУКТУР И СОЗДАНИЕ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКОГО ПРОСТРАНСТВА

Исходя из сказанного, возникает несколько возможностей для воздействия на поврежденный орган с целью создать в нем условия, способствующие полному восстановлению (реституции), а не субституции (развитию фиброзной ткани).

В первую очередь, к ним относятся все мероприятия, направленные на сохранение каркасных структур.

1. Переключение типа клеточной гибели с некроза на апоптоз (быть может, даже парадоксальным путем – с упреждающим применением индукторов апоптоза, провоцирующих гибель клеток, смерть которых в естественных условиях происходит по типу некроза). К сожалению, в этом отношении пока нет определенных указаний на конкретные терапевтические воздействия, которые были бы эффективны.

2. Активация фагоцитоза апоптотических телец макрофагами и паренхиматозными клетками с целью их скорейшей резорбции и недопущения вторичного некроза и развития воспаления. Удаление погибших клеток довольно легко происходит самопроизвольно в канальцах почек и очень затруднено – в печени, где массы погибших клеток могут образовывать большие скопления с отложением солей кальция, очень препятствующих регенерации. Удаление мертвых клеток особенно актуально в случае, если действительно удастся переключать некротическую гибель клеток на путь апоптоза и последний будет носить массовый характер. К сожалению, как и первую возможность, этот вариант пока следует рассматривать как исключительно гипотетический. Нужно еще иметь в виду, что быстрая резорбция погибшей ткани, если она не будет сопровождаться столь же быстрой регенерацией или заполнением освободившегося места матриксом, приведет не к восстановлению, а к атрофии участка органа.

3. Ингибирование воспалительного ответа. В этом отношении имеется богатый арсенал фармакологических агентов, многие из которых давно применяются в клинической практике, в том числе и при альтеративных патологиях типа ишемической болезни сердца [64]. Речь идет, прежде всего, о группе нестероидных противовоспалительных препаратов последних поколений, а также об ингибиторах провоспалительных сигнальных путей и цитокинов типа TNF α [64–66]. Другое дело, что именно в отношении сохранности каркасных структур эти препараты специально не исследовались, и нет указаний на их оптимальную комбинацию или режим введения; в то же время известно, что некоторые из них могут в качестве побочного эффекта стимулировать фиброз [66].

4. Ингибирование фиброза. Этот путь рассматривается уже довольно давно и возможен в нескольких вариантах – ингибирование пролиферации фибробластов и дифференцировки их в миофибробласты (например, путем воздействия на сигнальные пути, связанные с TGF- β), торможения дифференцировки M2-макрофагов, подавления синтеза коллагена. Этот привлекательный путь крайне затруднителен вследствие физиологической универсальности молекулярных механизмов, которые необходимо для этого подавить. Впрочем, относительно недавно были опубликованы первые данные о фармакологических агентах из этой группы, способных в эксперименте подавлять развитие фиброза [67–69].

Принципиально иной путь может быть связан с созданием морфогенетического пространства, в котором введенные извне (например, в миокарде) или эндогенные (в почке, в печени) стволовые клетки могли бы создавать заново органические структуры. Такой подход имеет как минимум два варианта исполнения.

1. Создание искусственных полостей и колонок с гелеобразным матриксом и факторами дифференцировки в самом органе. Очень близким (хотя и примитивным) примером такого подхода можно назвать уже испытываемые в эксперименте скэффолды и «биореакторы» с гиалуроновой кислотой [52, 67–73], позволившие получить, в частности, успешную регенерацию конечностей у взрослых бесхвостых амфибий (у которых она, в отличие от хвостатых, не происходит) [70].

2. Направление, связанное с изменением дифференцировки стромальных фибробластов таким образом, чтобы они образовывали не фиброзный коллаген, а «матриксную» эмбриональную соединительную ткань типа стромы почки новорожденного животного или вартонова студня. Хотя возможности применения клеток последнего для целей регенеративной медицины уже

рассматривались, однако только с точки зрения получения плюрипотентных стволовых клеток [74, 75]. Было бы крайне важно идентифицировать факторы, индуцирующие дифференцировку таких клеток и способы ее фармакологической регуляции. На возможность активации в постфетальных тканях «вартоновской» дифференцировки указывает ее появление в условиях опухолевого роста – в случае миксом и миксоидной стромы опухолей (рис. 2, г). Последний случай особенно интересен, поскольку речь идет об изменении дифференцировки неопухолевых клеток, и он часто наблюдается именно в дифференцированных опухолях типа тубулярных аденокарцином, рост которых происходит путем удлинения и образования новых тубул (тогда как опухоли с фиброзной стромой – скирры – обычно образованы низкодифференцированными опухолевыми клетками с предельно примитивными морфогенетическими процессами) [76, 77]. Такого рода случаи могли бы служить моделями для изучения факторов, индуцирующих «миксоидную» строму в постфетальном организме. Индукция дифференцировки эмбриональной стромы, с одной стороны, позволила бы заполнить матриксом место резорбирующейся погибшей ткани и предохранить участок органа от коллапса и атрофии, а с другой – создать плацдарм для проявления морфогенетических потенций местных или введенных стволовых клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изложенные в данной статье материалы позволяют предполагать, что общей причиной неудач при попытках добиться восстановления структуры органов после повреждения путем введения стволовых клеток или факторов роста является разрушение каркасных элементов орган-

ных структур, которые в организме большинства взрослых позвоночных животных могут возникать только в период эмбрионального органогенеза. Сохранение этих структур является необходимым и во многих случаях – достаточным условием для того, чтобы способные к пролиферации клетки органа смогли восстановить его структуру без какого-либо дополнительного воздействия. Альтернативой этого подхода может быть создание в органе пространства из гелеобразного матрикса, подобного тому, какое имеет место в эмбриогенезе – либо путем искусственного введения, либо изменением дифференцировки стромальных клеток и переключения их на синтез соответствующих компонентов межклеточного вещества. В таком пространстве, по аналогии с эмбриогенезом или с перестройками при метаморфозе амфибий, можно ожидать возникновения органных структур без наличия каркасных моделей. Однако, если пути сохранения каркасных структур кажутся вполне достижимыми за счет уже известных методических подходов, то реализация второго предложения пока представляется только обозначенным направлением для будущих исследований.

Разработка перечисленных здесь подходов, как кажется, позволит не только достигнуть полного восстановления структур органов из собственных пролиферирующих и стволовых элементов, но и добиться радикальных успехов в тех случаях (сердце, нервная ткань), где необходимое введение стволовых клеток извне пока не привело к клинически значимым результатам.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Guo, R., Morimatsu, M., Feng T., Lan, F., Chang, D., Wan, F., and Ling, Y. (2020) Stem cell-derived cell sheet transplantation for heart tissue repair in myocardial infarction, *Stem Cell Res. Ther.*, **11**, 19, <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1536-y>.
2. Lukomska, B., Stanaszek, L., Zuba-Surma, E., Legosz, P., Sarzynska, S., and Drela, K. (2019) Challenges and controversies in human mesenchymal stem cell therapy, *Stem Cells Int.*, 2019, 9628536, <https://doi.org/10.1155/2019/9628536>.
3. Chien, K. R., Frisén, J., Fritsche-Danielson, R., Melton, D. A., Murry, C. E., and Weissman, I. L. (2019) Regenerating the field of cardiovascular cell therapy, *Nat. Biotechnol.*, **37**, 232-237, <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0042-1>.
4. Lee, C. W., Chen, Y. F., Wu, H. H., and Lee, O. K. (2018) Historical perspectives and advances in mesenchymal stem cell research for the treatment of liver diseases, *Gastroenterology*, **154**, 46-56, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.09.049>.
5. Boyd, A., Newsome, P., and Lu, W. Y. (2019) The role of stem cells in liver injury and repair, *Expert. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **13**, 623-631, <https://doi.org/10.1080/17474124.2019.1618186>.

6. Brychtova, M., Thiele, J. A., Lysak, D., Holubova, M., Kralickova, M., and Vistejnova, L. (2019) Mesenchymal stem cells as the near future of cardiology medicine – truth or wish? *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc. Czech. Repub.*, **163**, 8-18, <https://doi.org/10.5507/bp.2018.071>.
7. Zhu, Y., Chen, X., Yang, X., and El-Hashash, A. (2018) Stem cells in lung repair and regeneration: Current applications and future promise, *J. Cell Physiol.*, **233**, 6414-6424, <https://doi.org/10.1002/jcp.26414>.
8. Wang, Y. H., Wu, D. B., Chen, B., Chen, E. Q., and Tang, H. (2018) Progress in mesenchymal stem cell-based therapy for acute liver failure, *Stem Cell Res. Ther.*, **9**, 227, <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0972-4>.
9. Shiota, G., and Itaba, N. (2017) Progress in stem cell-based therapy for liver disease, *Hepatol. Res.*, **47**, 127-141, <https://doi.org/10.1111/hepr.12747>.
10. Jiang, J., Wang, Y., Liu, B., Chen, X., and Zhang, S. (2018) Challenges and research progress of the use of mesenchymal stem cells in the treatment of ischemic stroke, *Brain Dev.*, **40**, 612-626, <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2018.03.015>.
11. Lazzeri, E., Romagnani, P., and Lasagni, L. (2015) Stem cell therapy for kidney disease, *Expert Opin. Biol. Ther.*, **15**, 1455-1468, <https://doi.org/10.1517/14712598.2015.1067300>.
12. Sagrinati, C., Ronconi, E., Lazzeri, E., Lasagni, L., and Romagnani, P. (2018) Stem-cell approaches for kidney repair: choosing the right cells, *Trends Mol. Med.*, **14**, 277-285, <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2008.05.005>.
13. Morizane, R., Miyoshi, T., and Bonventre, J. V. (2017) Concise review: kidney generation with human pluripotent stem cells, *Stem Cells*, **35**, 2209-2217, <https://doi.org/10.1002/stem.2699>.
14. Laffamme, M. A., and Murry, C. E. (2011) Heart regeneration, *Nature*, **473**, 326-335, <https://doi.org/10.1038/nature10147>.
15. Rota, C., Morigi, M., and Imberti, B. (2019) Stem cell therapies in kidney diseases: progress and challenges, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 2790, <https://doi.org/10.3390/ijms20112790>.
16. Marcheque, J., Bussolati, B., Csete, M., and Perin, L. (2019) Concise reviews: stem cells and kidney regeneration: an update, *Stem Cells Transl. Med.*, **8**, 82-92, <https://doi.org/10.1002/sctm.18-0115>.
17. Фриденштейн А. Я., Лалыкина К. С. (1973) *Индукция костной ткани и остеогенные клетки-предшественники*, Медицина, Москва.
18. Sedrakyan, S., Angelow, S., De Filippo, R. E., and Perin, L. (2012) Stem cells as a therapeutic approach to chronic kidney diseases, *Curr. Urol. Rep.*, **13**, 47-54, <https://doi.org/10.1007/s11934-011-0230-0>.
19. Cai, P., Ni, R., Lv, M., Liu, H., Zhao, J., He, J., and Luo, L. (2023) VEGF signaling governs the initiation of biliary-mediated liver regeneration through the PI3K-mTORC1 axis, *Cell Rep.*, **42**, 113028, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.113028>.
20. Jiang M., Ren J., Belmonte, J. C. I., and Liu, G.-H. (2023) Hepatocyte reprogramming in liver regeneration: Biological mechanisms and applications, *FEBS J.*, <https://doi.org/10.1111/febs.16930>.
21. Jin, Y., Li, S., Yu, Q., Chen, T., and Liu, D. (2023) Application of stem cells in regeneration medicine, *Med. Commun.*, **4**, e291, <https://doi.org/10.1002/mco2.291>.
22. Liu, D., Cheng, F., Pan, S., and Liu, Z. (2020) Stem cells: a potential treatment option for kidney diseases, *Cell Res. Ther.*, **11**, 249, <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01751-2>.
23. Mangipudy, R. S., Chanda, S., and Mehendale, H. M. (1995) Tissue repair response as a function of dose in thioacetamide hepatotoxicity, *Environ. Health Perspect.*, **103**, 260-267, <https://doi.org/10.1289/ehp.95103260>.
24. Манских В. Н. (2017) *Патоморфология лабораторной мыши, Т.3 Атлас*, ВАКО, Москва.
25. Струков А. И., Серов В. В. (1995) *Патологическая анатомия*, Медицина, Москва.
26. Liu, K. D. (2003) Molecular mechanisms of recovery from acute renal failure, *Crit. Care Med.*, **31**, 572-581, <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000081592.36382.BC>.
27. Ogbadu, J., Singh, G., and Aggarwal, D. (2019) Factors affecting the transition of acute kidney injury to chronic kidney disease: Potential mechanisms and future perspectives, *Eur. J. Pharmacol.*, **865**, 172711, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172711>.
28. Greaves, P. (2011) *Histopathology of Preclinical Toxicity Studies*, Academic Press, Elsevier.
29. Бреслер В. М. (1964) *Цитологические механизмы бластомогенеза в яичке*, Наука, Москва-Ленинград.
30. Moch, H., Humphrey, P. A., Ulbright, T. M., and Reuter, V. (2016) *WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.02.028>.
31. Montes, G. S. (1996) Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems, *Cell. Biol. Int.*, **20**, 15-27, <https://doi.org/10.1006/cbir.1996.0004>.
32. Ushiki, T. (2002) Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint, *Arch. Histol. Cytol.*, **65**, 109-126, <https://doi.org/10.1679/aohc.65.109>.
33. Guvatova, Z. G., Borisov, P. V., Alekseev, A. A., and Moskalev, A. A. (2022) Age-related changes in extracellular matrix, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 1535-1551, <https://doi.org/10.1134/S0006297922120112>.

34. Bonnans, C., Chou, J., and Werb, Z. (2014) Remodelling the extracellular matrix in development and disease, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **15**, 786-801, <https://doi.org/10.1038/nrm3904>.
35. Daley, W. P., and Yamada, K. M. (2013) ECM-modulated cellular dynamics as a driving force for tissue morphogenesis, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **23**, 408-414, <https://doi.org/10.1016/j.gde.2013.05.005>.
36. Mahoney, Z. X., Stappenbeck, T. S., and Miner, J. H. (2008) Laminin $\alpha 5$ influences the architecture of the mouse small intestine mucosa, *J. Cell Sci.*, **121**, 2493-2502, <https://doi.org/10.1242/jcs.025528>.
37. Mammoto, T., Jiang, E., Jiang, A., and Mammoto, A. (2013) Extracellular matrix structure and tissue stiffness control postnatal lung development through the lipoprotein receptor-related protein 5/Tie2 signaling system, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **49**, 1009-1018, <https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0147OC>.
38. Nakanishi, Y., Sugiura, F., Kishi, J., and Hayakawa, T. (1986) Collagenase inhibitor stimulates cleft formation during early morphogenesis of mouse salivary gland, *Dev. Biol.*, **113**, 201-206, [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(86\)90122-3](https://doi.org/10.1016/0012-1606(86)90122-3).
39. Keely, P. J., Wu, J. E., and Santoro, S. A. (1995) The spatial and temporal expression of the $\alpha 2\beta 1$ integrin and its ligands, collagen I, collagen IV, and laminin, suggest important roles in mouse mammary morphogenesis, *Differentiation*, **59**, 1-13, <https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.1995.5910001.x>.
40. Brownfield, D. G., Venugopalan, G., Lo, A., Mori, H., Tanner, K., Fletcher, D. A., and Bissell, M. J. (2013) Patterned collagen fibers orient branching mammary epithelium through distinct signaling modules, *Curr. Biol.*, **23**, 703-709, <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.03.032>.
41. Liozner, L. D., and Farutina, L. M. (1971) Regeneration of the kidney in newborn rabbits, *Biull. Eksp. Biol. Med.*, **71**, 684-686, <https://doi.org/10.1007/BF00813598>.
42. Li, X., Liu, D., Xiao, Z., Zhao, Y., Han, S., Chen, B., and Dai, J. (2019) Scaffold-facilitated locomotor improvement post complete spinal cord injury: motor axon regeneration versus endogenous neuronal relay formation, *Biomaterials*, **197**, 20-31, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.01.012>.
43. Peng, Z., Gao, W., Yue, B., Jiang, J., Gu, Y., Dai, J., Chen, L., and Shi, Q. (2018) Promotion of neurological recovery in rat spinal cord injury by mesenchymal stem cells loaded on nerve-guided collagen scaffold through increasing alternatively activated macrophage polarization, *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, **12**, 1725-1736, <https://doi.org/10.1002/term.2358>.
44. Telegin, G. B., Minakov, A. N., Chernov, A. S., Kazakov, V. A., Kalabina, E. A., Manskikh, V. N., Asyutin, D. S., Belogurov, A. A. Jr, Gabibov, A. G., Konovalov, N. A., and Spallone, A. (2021) A new precision minimally invasive method of glial scar simulation in the rat spinal cord using cryoapplication, *Front. Surg.*, **8**, 607551, <https://doi.org/10.3389/fsurg.2021.607551>.
45. Karyagina, A., Orlova, P., Poponova, M., Bulygina, I., Choudhary, R., Zhulina, A., Grunina, T., Nikitin, K., Strukova, N., Generalova, M., Ryazanova, A., Kovaleva, P., Zimina, A., Lukinova, E., Plakhotniuk, E., Kirsanova, M., Kolesnikov, E., Zakharova, E., Manskikh, V., Senatov, F., and Gromov, A. (2022) Hybrid implants based on calcium-magnesium silicate ceramics diopside as a carrier of recombinant BMP-2 and demineralized bone matrix as a scaffold: dynamics of reparative osteogenesis in a mouse craniotomy model, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 1277-1291, <https://doi.org/10.1134/S0006297922110074>.
46. Senatov, F., Zimina, A., Chubrik, A., Kolesnikov, E., Permyakova, E., Voronin, A., Poponova, M., Orlova, P., Grunina, T., Nikitin, K., Krivozubov, M., Strukova, N., Generalova, M., Ryazanova, A., Manskikh, V., Lunin, V., Gromov, A., and Karyagina, A. (2022) Effect of recombinant BMP-2 and erythropoietin on osteogenic properties of biomimetic PLA/PCL/HA and PHB/HA scaffolds in critical-size cranial defects model, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, **135**, 112680, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2022.112680>.
47. Zimina, A., Senatov, F., Choudhary, R., Kolesnikov, E., Anisimova, N., Kiselevskiy, M., Orlova, P., Strukova, N., Generalova, M., Manskikh, V., Gromov, A., and Karyagina, A. (2020) Biocompatibility and physico-chemical properties of highly porous PLA/HA Scaffolds for bone reconstruction, *Polymers (Basel)*, **12**, 2938, <https://doi.org/10.3390/polym12122938>.
48. Kim, I. H., Ko, I. K., Atala, A., and Yoo, J. J. (2015) Whole kidney engineering for clinical translation, *Curr. Opin. Organ Transplant.*, **20**, 165-170, <https://doi.org/10.1097/MOT.0000000000000173>.
49. Moon, K. H., Ko, I. K., Yoo, J. J., and Atala, A. (2016) Kidney diseases and tissue engineering, *Methods*, **99**, 112-119, <https://doi.org/10.1016/j.jymeth.2015.06.020>.
50. Bonandrini, B., Figliuzzi, M., Papadimou, E., Morigi, M., Perico, N., Casiraghi, F., Dipl, C., Sangalli, F., Conti, S., Benigni, A., Remuzzi, A., and Remuzzi, G. (2014) Recellularization of well-preserved acellular kidney scaffold using embryonic stem cells, *Tissue Eng. Part A*, **20**, 1486-1498, <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2013.0269>.
51. Chen, H., Xie, S., Yang, Y., Zhang, J., and Zhang, Z. (2018) Multiscale regeneration scaffold *in vitro* and *in vivo*, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, **106**, 1218-1225, <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33926>.
52. Yazdani, M., Shahdadfar, A., Jackson, C. J., and Utheim, T. P. (2019) Hyaluronan-based hydrogel scaffolds for limbal stem cell transplantation: a review, *Cells*, **8**, E245, <https://doi.org/10.3390/cells8030245>.

53. Anrather, J., and Iadecola, C. (2016) Inflammation and stroke: an overview, *Neurotherapeutics*, **13**, 661-670, <https://doi.org/10.1007/s13311-016-0483-x>.
54. Prabhu, S. D., and Frangogiannis, N. G. (2016) The biological basis for cardiac repair after myocardial infarction: from inflammation to fibrosis, *Circ. Res.*, **119**, 91-112, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303577>.
55. Duann, P., Lianos, E. A., Ma, J., and Lin, P. H. (2016) Autophagy, innate immunity and tissue repair in acute kidney injury, *Int. J. Mol. Sci.*, **17**, 662, <https://doi.org/10.3390/ijms17050662>.
56. Brezgunova, A. A., Andrianova, N. V., Popkov, V. A., Tkachev, S. Y., Manskikh, V. N., Pevzner, I. B., Zorova, L. D., Timashev, P. S., Silachev, D. N., Zorov, D. B., and Plotnikov, E. Y. (2023) New experimental model of kidney injury: Photothrombosis-induced kidney ischemia, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, **1869**, 166622, <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2022.166622>.
57. Padanilam, B. J. (2003) Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis, *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, **284**, 608-627, <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00284.2002>.
58. Манских В. Н. (2007) Пути гибели клетки и их биологическое значение, *Цитология*, **49**, 909-915.
59. Белушкина И. И., Северин С. Е. (2001) Молекулярные основы патологии апоптоза, *Арх. пат.*, **63**, 51-60.
60. Pevzner, I. B., Pavlenko, T. A., Popkov, V. A., Andrianova, N. V., Zorova, L. D., Brezgunova, A. A., Zorov, S. D., Yankauskas, S. S., Silachev, D. N., Zorov, D. B., and Plotnikov, E. Y. (2018) Comparative study of the severity of renal damage in newborn and adult rats under conditions of ischemia/reperfusion and endotoxin administration, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **65**, 189-194, <https://doi.org/10.1007/s10517-018-4127-5>.
61. Алешин Б. В. (1937) Исследования по метаморфозу амфибий. Эмбриональная соединительная ткань амфибий, *Академику Н. В. Насонову к восьмидесятилетию со дня рождения и шестидесятилетию научной деятельности* (ред. В. Л. Комаров), Изд-во Академии наук СССР, Москва, 570-650.
62. Фалин Л. И. (1976) *Эмбриология человека. Атлас*, Медицина, Москва.
63. Zhou, B., Feng, Z., Xu, J., and Xie, J. (2023) Organoids: approaches and utility in cancer research, *Chin. Med. J. (Engl)*, **136**, 1783-1793, <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000002477>.
64. Oh, G. C., Choi, Y. J., Park, B. W., Ban, K., and Park, H. J. (2023) Are there hopeful therapeutic strategies to regenerate the infarcted hearts? *Korean Circ. J.*, **53**, 367-386, <https://doi.org/10.4070/kcj.2023.0098>.
65. Harrington, R., Harkins, P., and Conway, R. (2023) Targeted therapy in rheumatoid-arthritis-related interstitial lung disease, *J. Clin. Med.*, **12**, 6657, <https://doi.org/10.3390/jcm12206657>.
66. Венгеровский А. И. (2015) *Фармакология: курс лекций*, 4-е издание, Москва, ГЭОТАР-медиа.
67. Park, Ch. H., and Yoo, T.-H. (2022) TGF- β inhibitors for therapeutic management of kidney fibrosis, *Pharmaceuticals (Basel)*, **15**, 1485, <https://doi.org/10.3390/ph15121485>.
68. Zhao, X., Kwan, J. Y. Y., Yip, K., Liu, P. P., and Liu, F. F. (2020) Targeting metabolic dysregulation for fibrosis therapy, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **19**, 57-75, <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0040-5>.
69. Stefanovic, B., Manojlovic, Z., Vied, C., Badger, C. D., and Stefanovic, L. (2019) Discovery and evaluation of inhibitor of LARP6 as specific antifibrotic compound, *Sci. Rep.*, **9**, 326, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36841-y>.
70. Herrera-Rincon, C., Golding, A. S., Moran, K. M., Harrison, C., Martyniuk, C. J., Guay, J. A., Zaltsman, J., Carabello, H., Kaplan, D. L., and Levin, M. (2018) Brief local application of progesterone via a wearable bioreactor induces long-term regenerative response in adult xenopus hindlimb, *Cell Rep.*, **25**, 1593-1609.e7, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.010>.
71. Toole, B. P. (1997) Hyaluronan in morphogenesis, *J. Intern. Med.*, **242**, 35-40, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.1997.00171.x>.
72. Toole, B. P. (2004) Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue, *Nat. Rev. Cancer*, **4**, 528-539, <https://doi.org/10.1038/nrc1391>.
73. Ahmadian, E., Eftekhari, A., Dizaj, S. M., Sharifi, S., Mokhtarpour, M., Nasibova, A. N., Khalilov, R., and Samiei, M. (2019) The effect of hyaluronic acid hydrogels on dental pulp stem cells behavior, *Int. J. Biol. Macromol.*, **140**, 245-254, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.119>.
74. Abbaszadeh, H., Ghorbani, F., Derakhshani, M., Movassaghpour, A., and Yousefi, M. (2020) Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: a novel therapeutic paradigm, *J. Cell Physiol.*, **235**, 706-717, <https://doi.org/10.1002/jcp.29004>.
75. Corrao, S., La Rocca, G., Lo Iacono, M., Zummo, G., Gerbino, A., Farina F., and Anzalone, R. (2013) New frontiers in regenerative medicine in cardiology: the potential of Wharton's jelly mesenchymal stem cells, *Curr. Stem Cell Res. Ther.*, **8**, 39-45, <https://doi.org/10.2174/1574888X11308010006>.
76. Hirose, S., Honjou, H., Nakagawa, H., Nishimura, K., Kuroda, Y., Tsuji, M., Miwa, A., and Kitagawa, M. (1989) Scirrhus carcinoma of the stomach: a clinical and pathological study of 106 surgical cases, *Gastroenterol. Jpn.*, **24**, 481-487, <https://doi.org/10.1007/BF02773873>.
77. Van Bogaert, L. J., and Maldague, P. (1980) Scirrhus carcinoma of the female breast, *Invest. Cell. Pathol.*, **3**, 377-382.

FRAMEWORK ELEMENTS OR FREE INTERCELLULAR GEL-LIKE MATRIX AS A NECESSARY CONDITION FOR BUILDING OF ORGAN STRUCTURES DURING REGENERATION

Review

V. N. Manskikh

*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119991 Moscow, Russia; e-mail: Manskikh@mail.ru*

Over the past decades, an unimaginably large number of attempts have been made to restore the structure of mammalian organs after damage by introducing stem cells into them. However, this procedure does not lead to a full recovery. At the same time, it is known that complete regeneration (restitution without fibrosis) is possible in organs with proliferating parenchymal cells. An analysis of such models allows us to conclude that the most important condition for the repair of the histological structures of an organ (in the presence of a stem cells) is the preservation of collagen frame structures in it, which serve as “guide rails” for proliferating and differentiating cells. An alternative condition for the complete reconstruction of organ structures is the presence of a free “morphogenetic space” consisting of a gel-like matrix of the embryonic-type connective tissue, which takes place in embryonal development of organs in mammals or during complete regeneration in amphibians. Approaches aimed at preserving scaffold structures or creating a “morphogenetic space” could radically improve the results of organ regeneration using both local and exogenous stem cells.

Keywords: regenerative medicine, regeneration, embryonic connective tissue, morphogenetic framework, stem cells

ВОЗРАСТ-ЗАВИСИМЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРОДУКЦИИ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЕ ЧЕЛОВЕКА

© 2024 М.Ю. Высоких^{1,2,3*}, М.А. Виговский⁴, В.В. Филиппов⁴, Я.Р. Бородай⁴, М.В. Марей², О.А. Григорьева⁴, Т.Ф. Вепхвадзе³, Н.С. Курочкина³, Л.А. Манухова², А.Ю. Ефименко⁴, Д.В. Попов³, **В.П. Скулачѳв**¹

¹ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия; электронная почта: mikhail.vyssokikh@gmail.com; mike@genebee.msu.ru

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

³ Институт медико-биологических проблем РАН, 123007 Москва, Россия

⁴ Медицинский научно-образовательный центр Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119192 Москва, Россия

Поступила в редакцию 12.12.2023

После доработки 30.01.2024

Принята к публикации 01.02.2024

Уменьшение массы мышц и их функциональных возможностей (сила, работоспособность и интулиновая чувствительность) – это один из интегральных признаков старения. Одним из триггеров старения является увеличение продукции митохондриальных активных форм кислорода. В нашем исследовании впервые для скелетной мышцы человека изучались возраст-зависимые изменения продукции митохондриальных активных форм кислорода, ассоциированные со снижением доли связанной с митохондриями гексокиназы-2. Для этого брали биопсию *m. vastus lateralis* у 10 молодых здоровых добровольцев и 70 пациентов (26–85 лет) с многолетним первичным артрозом коленного/тазобедренного сустава. Оказалось, что старение (сопоставление разных групп пациентов), в отличие от снижения двигательной активности/хронического воспаления (сопоставление молодых здоровых людей и молодых пациентов), вызывает выраженное увеличение продукции перекиси изолированными митохондриями. Это коррелировало с возраст-зависимым распределением гексокиназы-2 между митохондриальной и цитозольной фракциями, снижением скорости сопряженного дыхания выделенных митохондрий и дыхания при стимуляции глюкозой (субстратом гексокиназы). Обсуждается, что эти изменения могут быть вызваны возраст-зависимым снижением содержания кардиолипина – потенциального регулятора митохондриального микрокомпартамента, содержащего гексокиназу. Полученные результаты способствуют более глубокому пониманию возрастных патогенетических процессов в скелетных мышцах и открывают перспективы для поиска фармакологических/физиологических подходов к коррекции этих патологий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: старение, скелетная мышца, митохондрия, митохондриальные активные формы кислорода, гексокиназа.

DOI: 10.31857/S0320972524020088 EDN: XMILPQ

ВВЕДЕНИЕ

Старение – это комплексный процесс, присущий всем организмам и включающий ряд общих черт, в частности, прогрессирующее снижение

Принятые сокращения: мАФК – митохондриальные активные формы кислорода.

* Адресат для корреспонденции.

функциональных и регенеративных возможностей организма, развивающееся на фоне нарушения адаптации к внешним и внутренним стрессорным воздействиям и приводящее в конечном итоге к смерти. Одной из наиболее хорошо разработанных теорий старения является митохондриальная теория, впервые предложенная Харманом в 1956 г., согласно которой триггером старения считается дисфункция митохондрий, ассоциированная с про-

дукцией ими активных форм кислорода (АФК) и окислительными повреждениями биологических макромолекул [1]. Один из интегральных признаков старения – уменьшение массы и силы скелетных мышц, приводящее к выраженному снижению физической работоспособности и качества жизни. Последнее связано с тем, что скелетные мышцы не только обеспечивают движение и поддержание позы, но также играют важную роль в регуляции метаболизма всего организма. Так, в норме скелетные мышцы, составляя до 40% массы тела, потребляют от 20 до 30% производимой энергии [2] и являются одним из основных инсулинзависимых потребителей глюкозы [3]. Считается, что, в отличие от других тканей, снижение функций митохондрий скелетных мышц является основным медиатором снижения их массы и силы у пожилых людей [4].

Важнейшую роль в регуляции метаболизма и потребления глюкозы из крови [5] играет фермент гексокиназа (EC 2.7.1.1), катализирующий скорость-лимитирующую реакцию гликолиза и осуществляющий перенос фосфорильного остатка с АТФ на глюкозу с образованием глюкозо-6-фосфата – интермедиата гликолиза и пентозофосфатного пути. В мышцах, как и в других инсулин-чувствительных тканях, преимущественно экспрессируются I и II из пяти известных изозимов гексокиназы; они имеют высокое сходство аминокислотных последовательностей, однако довольно сильно различаются по кинетическим параметрам и метаболическим функциям (для обзора см. работу Wilson et al. [6]). В скелетных мышцах большая часть гексокиназы локализована на поверхности митохондрий, формируя метаболический компартмент, в котором для фосфорилирования гексоз используется АТФ, синтезируемый в митохондриях, что стимулирует дыхание митохондрий и функционально связывает гликолиз с окислительным фосфорилированием [7]. Связывание гексокиназы с митохондриями опосредовано белок-белковыми взаимодействиями с VDAC1 – основным белком внешней мембраны митохондрий, обеспечивающим транспорт различных соединений между митохондриями и остальной частью клетки [8]. Формирование этого белкового комплекса приводит к сближению мембран митохондрий и стабилизации так называемых контактных сайтов, являющихся структурной основой метаболического микрокомпартамента митохондрий, отвечающего за челночное движение АТФ/ADP между активными центрами АТФ-синтетазы и гексокиназы [9, 10].

Примерно 1–2% молекулярного кислорода в клетке при участии комплексов I и III дыхательной цепи конвертируется в супероксид, спонтанно или при помощи ферментных систем, регулирующих продукцию перекиси водорода с последую-

щим образованием митохондриальных активных форм кислорода (МАФК), способных повреждать биологические макромолекулы [11]. Установлено, что дисбаланс продукции и утилизации активных форм кислорода (АФК) лежит в основе окислительного стресса и индукции программированной гибели клетки, что является одной из ключевых причин развития сердечно-сосудистых и нейродегенеративных патологий [12]. Важно отметить, что небольшое снижение митохондриального мембранного потенциала практически полностью останавливает генерацию МАФК [13]. В частности, в изолированных митохондриях активация окислительного фосфорилирования при добавлении ADP приводила к снижению трансмембранного потенциала на небольшую величину – примерно на 20% (мягкая деполяризация), предотвращая образование H_2O_2 . Исследуя этот эффект, А. Галина с коллегами описали новый антиоксидантный механизм, состоящий в циклическом движении ADP, образующегося при фосфорилировании глюкозы за счёт АТФ, производимого при окислительном фосфорилировании и попадающего к активному центру гексокиназы через канал VDAC1 [14].

Ранее на моделях коротко- и долгоживущих грызунов нами было показано, что мягкая деполяризация митохондрий, ассоциированная с активацией связанной гексокиназы, приводит к снижению продукции МАФК в различных тканях (в том числе в скелетных мышцах), а нарушение этого механизма коррелирует с возрастом короткоживущих животных [15]. Целью этого исследования было изучение возрастного характера распределения гексокиназы, а также зависимости скорости продукции перекиси водорода митохондриями от активации митохондриальной гексокиназы её субстратами в скелетной мышце человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования. Исследование было одобрено Комитетом по биомедицинской этике ГНЦ РФ – ИМБП РАН и Локальным этическим комитетом МНОЦ МГУ имени М.В. Ломоносова (протокол № 2/20 от 16.03.2020). Все добровольцы подписали добровольное согласие на участие в исследовании.

В исследовании приняли участие 10 здоровых добровольцев (возраст от 25 до 43 лет) и 70 пациентов с многолетним первичным артрозом коленного/тазобедренного сустава (возраст от 26 до 85 лет), разделённых на группы молодого ($n = 8$, 39 (26–45) лет), среднего ($n = 20$, 59 (58–62) лет) и пожилого ($n = 42$, 72 (66–83) года) возраста (табл. 1). Эту патологию использовали ранее как модель для изучения эффектов снижения двигательной

активности и хронического воспаления для скелетных мышц бедра, в том числе и при старении [16–19]. Критериями невключения добровольцев в исследование были: онкологические или системные заболевания в анамнезе; психические, физические и прочие причины, не позволяющие адекватно оценивать своё поведение и правильно выполнять условия протокола исследования; наличие в анамнезе любого существенного, по мнению врача-исследователя, состояния/заболевания или обстоятельства, препятствующего включению в исследование; противопоказания для проведения оперативного лечения на момент включения; беременность и лактация. У всех участников исследования был собран анамнез, оценен субъективный уровень физических возможностей (анкета SF12 [20]), а также уровень глюкозы и инсулина в крови натощак. У пациентов в начале плановой операции по замене тазобедренного/коленного сустава брали биопсию наружной головки четырёхглавой мышцы бедра (~500 мг). У здоровых добровольцев пробы из наружной головки четырёхглавой мышцы бедра (~200 мг) брали с помощью игольчатой биопсии с аспирацией под местной анестезией (1 мл 2%-ного лидокаина), как описано ранее [21]. Образец мышечной ткани сразу же помещали в пробирку с кардиоплегическим раствором («Custodiol», США); через 10 мин часть пробы отбирали на гистологические и биохимические исследования (см. ниже), а оставшуюся часть переносили в свежую аликвоту раствора Custodiol для выделения митохондрий.

Гистологический анализ. Образцы скелетных мышц фиксировали в 10%-ном забуференном нейтральном формалине в течение 24–48 ч. Гистологическая проводка осуществлялась по стандартной методике с использованием 8 смен изопропилового спирта (общая продолжительность – 5,5 ч при 37 °C) и 3 смен парафина (общая продолжительность – 5 ч при 62 °C). Затем препараты заливали в парафиновые блоки, изготавливали срезы толщиной 1 мкм и монтировали их на предметные стёкла («Menzel GmbH & Co KG», Германия). Окрасивание производили по стандартной методике с использованием гематоксилина Майера и эозина («PanReas AppliChem», Испания). Микроскопическое исследование проводили на микроскопе Leica DM600B с камерой Leica DFC 420X («Leica Microsystems GmbH», Германия), используя репрезентативные поля зрения для получения микрофотографий. Обработку и анализ изображений проводили с помощью программного обеспечения LasX («Leica Microsystems GmbH») и Fiji.

Выделение митохондрий. Выделение митохондрий проводили, как описано ранее [15]. Биопсийные образцы мышечной ткани ополаскивали ледяным раствором 0,9%-ного NaCl, обсушивали

фильтровальной бумагой, взвешивали и фрагментировали на кусочки размером 0,5–1 мм охлаждёнными и промытыми средой выделения (см. ниже) ножницами с загнутыми концами. Полученные фрагменты гомогенизировали с помощью микрогомогенизатора Поттера (стекло/тефлон) с клиренсом 200 микрон в течение 2 мин при 4 °C в соотношении 10 : 1 (v/m) в среде выделения следующего состава: 300 мМ маннит, 0,5 мМ ЭГТА, 20 мМ HEPES/NaOH, pH 7,6 и 0,1% БСА. Гомогенат центрифугировали при 1000 g в течение 10 мин при 4 °C на центрифуге 5410 («Eppendorf», Германия). Супернатант собирали и центрифугировали при 9000 g в тех же условиях. Осадок митохондрий суспендировали в том же объёме среды выделения без БСА (использовали микрогомогенизатор) и центрифугировали при 10 500 g в течение 10 мин и при 4 °C. Полученный осадок суспендировали в минимальном объёме, типичная концентрация белка полученного препарата митохондрий составляла 90–100 мг/мл, что определялось методом бицинониновой кислоты («Pierce», США). Содержание белка в препаратах митохондрий определяли с бицинониновой кислотой и 1 мг/мл раствором БСА в качестве стандарта согласно инструкции производителя («Pierce»). Все процедуры по выделению и хранение митохондрий во время экспериментов проводили при 4 °C.

Измерение скорости дыхания. Скорость потребления кислорода митохондриями измеряли при 30 °C с помощью электрода Кларка закрытого типа на оксиграфе («Hansatech», Великобритания), как описано ранее [15, 22]. Митохондрии (0,05–0,1 мг белка) инкубировали в ячейке оксиграфа, содержащей 0,5 мл дыхательной среды MIR05 [23] (0,5 мМ ЭГТА, 3 мМ MgCl₂, 60 мМ калия лактобионат, 20 мМ таурин, 10 мМ KН₂РO₄, 20 мМ HEPES, 110 мМ сахароза, 1 г/л БСА (свободный от жирных кислот), 100 мкМ ди-аденозинпентафосфат калия), и оценивали эффективность дыхания в присутствии 5,5 мМ пирувата/малата или 10 мМ сукцината/2 мкМ ротенона, 1 мкМ олигомицина, 0,1 мМ ADP, 5 мМ глюкозы, 10 нМ карбонил цианид-4-(трифлуорометокси)фенилгидразона (FCCP) (все реагенты – «Sigma-Aldrich», США).

Измерение скорости продукции перекиси. Скорость продукции перекиси водорода митохондриями оценивали по методу Zhou et al. [24] с модификациями, описанными нами ранее [25, 26]. Для регистрации продукции H₂O₂ митохондриями использовали реагент Amplex Red (10-ацетил-3,7-дигидроксифеноксазин; «Invitrogen», США). Резорурфин, продукт индуцированного H₂O₂ окисления Amplex Red, измеряли путём мониторинга его флуоресценции (максимумы возбуждения/эмиссии ~550/595 нм) на спектрофотометре Cary Eclipse («Agilent», США) в течение 10–15 мин.

Митохондрии (0,15 мг/мл митохондриального белка) инкубировали при 37 °С с перемешиванием встроеной магнитной мешалкой в среде MIR05, содержащей 5 мкМ Amplex Red, пероксидазу хрена (12 ед./мл, «Sigma-Aldrich») и супероксиддисмутазу (45 ед./мл, «Sigma-Aldrich»). Реакцию инициировали добавлением 10 мМ сукцината, после достижения максимальной скорости продукции перекиси вносили ADP (до 0,1 мМ конечной концентрации) и глюкозу (конечная концентрация 5 мМ). Скорость образования H_2O_2 рассчитывали по изменению интенсивности флуоресценции, как описано ранее [27]. Калибровочные кривые получали добавлением к аналитической среде свеже-разбавленной H_2O_2 (концентрацию маточного раствора перекиси водорода проверяли при 240 нм с использованием молярного коэффициента экстинкции 43,6).

Измерение активности ферментов. Определение ферментативной активности гексокиназы проводили в нефракционированном гомогенате ткани мышц, цитозольной и митохондриальной фракциях по методу Scheer et al. [28] с небольшими модификациями. Буфер для анализа содержал 50 мМ Tris-HCl, 5 мМ меркаптоэтанол, 5 мМ АТР, 10 мМ $MgCl_2$, 0,5 мМ глюкозу, 0,8 мМ NAD^+ и 1 ед./мл дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата из *Leuconostoc mesenteroides* («Roche», Австрия) при рН 7,5. Все анализы проводили при 25 °С в общем объёме 1,0 мл, активность фермента определяли с использованием спектрофотометра Cary Varion 300 («Agilent») путём измерения увеличения оптической плотности при длине волны 340 нм, где за 1 единицу фермента принимали количество, катализирующее превращение 1 мкмоль субстрата в продукт в течение 1 мин. Расчёты проводили с учётом фактора разведения, различного для разных фракций. Для каждого измерения проводили три технических повтора. Использовали реагенты фирмы «Sigma-Aldrich».

Электрофорез в ПААГ и вестерн-блот анализ содержания гексокиназы в митохондриальных препаратах. Электрофорез в полиакриламидном геле проводили по методу Лэммли [29]. Митохондрии лизировали в буфере следующего состава: 150 мМ хлорид натрия, 50 мМ Tris-HCl, рН 8,0, 0,5% Нонидет П-40, 1%-ный дезоксихолат натрия, 0,5%-ный додецилсульфат натрия с коктейлем ингибиторов протеаз («Thermo Fisher Scientific», США). После разделения (30 мкг белка на дорожку) белки из 12%-ного полиакриламидного геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану при помощи комбинированной системы для электрофореза/иммуноблоттинга («Bio-Rad», США) и проводили иммуноблоттинг, как описано ранее [30]. Использовали первичные мышинные моноклональные антитела против человеческих изоформ гексо-

киназы-1 и -2 (ab150013, ab227198, «Abcam», США) и против белка внешней мембраны митохондрий VDAC1 (ab186321, «Abcam»), а также вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (ab97023, «Abcam») в соответствии с рекомендациями производителя. Для визуализации сигнала использовали кит Novex ECL Kit («Invitrogen», США) и сканер ChemiDoc («Bio-Rad»).

Экстракция липидов и анализ содержания кардиолипина методом ВЭТСХ. Экстракцию липидов проводили по методу Блай и Дайера в потоке азота бескислородными растворами, барботированными в течение ночи 99,9%-ным N_2 [31]. Экстрагированные липиды растворяли в смеси хлороформ/метанол 2 : 1 (v/v), хранили под азотом при -80 °С в эксикаторе с силикагелем. Тонкослойную хроматографию проводили по методике Pinault et al. [32], используя органические растворители аналитической чистоты и ВЭТСХ хроматографические пластины с силикагелем на алюминиевой подложке («Merck», Дармштадт, ФРГ). Перед нанесением образца или стандарта в день использования пластины для ВЭТСХ размером 10 на 10 см готовили следующим образом: однократно погружали в 2,3%-ную борную кислоту в этаноле, сушили в течение 2 ч под вытяжным шкафом и активировали при 110 °С в течение 20 мин на песчаной бане. Образцы наносили с помощью самодельного стеклянного капиллярного аппликатора с шаровым клапаном (приводимым в действие потоком азота) в виде полос длиной 10 мм на расстоянии 15 мм от края пластины с постоянной скоростью нанесения около 200 нл/с при непрерывной сушке потоком азота при давлении 1,5–2,0 бар. Для стандартов фосфолипидов («Avanti Polar Lipids», Франция) готовили исходный раствор (1 мг/мл) в смеси хлороформ/метанол (2 : 1, v/v). Элюирование проводили в стеклянной камере, уравновешенной парами элюента не менее 1 ч перед хроматографией; элюент состоял из смеси хлороформ/этанол/триэтиламин/вода (3 : 3,5 : 3,5 : 0,7, v/v). Хроматографию прекращали при достижении фронтом 10 мм от верхнего края пластины, после двухчасовой сушки в вытяжном шкафу проводили окрашивание пластины путём погружения на 2 мин в 0,5%-ный сульфат меди (m/v) в 1,16 М ортофосфорной кислоте, высушивания в вытяжном шкафу в течение 2 ч при комнатной температуре в потоке азота и проявления на песчаной бане в течение 15 мин при 155 °С. Пластины фотографировали в сканере ChemiDoc («Bio-Rad»). Измеренные величины интенсивности полос фосфолипидов были интегрированы и значения площади поверхности пиков были выражены в условных единицах с помощью программы ImageJ, далее рассчитывали концентрацию кардиолипина и монолизокардиолипина (нмоль/мг митохондриального белка),

используя калибровочные кривые для соответствующих стандартов.

Статистические методы. Сравнение групп проводили с использованием дисперсионного анализа и критерия множественного сравнения Тьюки. Данные представлены в виде медианы с интерквартильным разбросом, значения $p < 0,05$ считались значимыми. Корреляционный анализ проводили, используя ранговый коэффициент корреляции Спирмана. Статистическую обработку проводили при помощи программы Prism 7.0 («Graph Software Inc.», Ла-Джолла, Калифорния, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Характеристика групп добровольцев. Клинико-anamnestические характеристики участников исследования представлены в табл. 1; было показано, что субъективная оценка физических возможностей у пациентов значительно ниже, чем у молодых здоровых людей, а индекс массы тела и индекс инсулинорезистентности увеличены только у средневозрастных и пожилых пациентов.

Гистологический анализ выявил прогрессирующие с возрастом нарушения мышечных волокон у пациентов, а именно: атрофию мышечных волокон, смещение ядер от периферии волокна, инфильтрации иммунными клетками и увеличение расстояния между волокнами, предположительно связанное с увеличением доли соединительнотканного компонента (рис. 1).

Распределение гексокиназы между клеточными фракциями. Между здоровыми добровольцами и молодыми пациентами не было найдено различий в активности гексокиназы ни в гомогенате, ни в изолированных фракциях (рис. 2).

У пожилых пациентов было выявлено снижение общей активности гексокиназы по сравнению с остальными группами ($p < 0,01$ для ЗД, $p < 0,05$ для МП и СП, рис. 2, а) и достоверное повышение её активности для цитозольной фракции по сравнению с группой молодых пациентов ($p < 0,05$, рис. 2, б). Однако у средневозрастных и пожилых пациентов активность гексокиназы в митохондриальной фракции была ниже по сравнению как со здоровыми добровольцами ($p < 0,01$ и $0,001$ соответственно), так и с молодыми пациентами ($p < 0,05$ и $0,01$ соответственно); более того, различия были обнаружены между средневозрастными и пожилыми пациентами ($p < 0,05$) (рис. 2, в).

Известно, что в скелетных мышцах человека соотношение I и II изозимов гексокиназы варьирует и по данным разных авторов составляет от 1/10 до 1/3 [5, 33, 34]. При этом более 90% изозима I связано с митохондриями [35], и уровень экспрессии этого гена, равно как и представленность белка в скелетной мышце, не зависят ни от метаболической нагрузки, ни от физической активности, ни от концентрации глюкозы или инсулина в крови [36]. Напротив, для изозима II такая зависимость ярко выражена – экспрессия мРНК и концентрация белка для гексокиназы-2 в скелетной мышце может кратно изменяться при изменении концентрации глюкозы или инсулина в крови, а также при изменении уровня (повседневной) двигательной активности [2, 5, 8, 37, 38].

Учитывая различный уровень связывания этих изозимов с митохондриальной мембраной и разную регуляцию их экспрессии, измерение активности проводили при 42 °С, когда подавляющая часть гексокиназы-2 инактивирована, а активность гексокиназы-1 меняется незначительно [5]. Было показано отсутствие различий активности гексокиназы-1 во фракции митохондрий

Таблица 1. Характеристика групп участников исследования

	<i>n</i>	Возраст, лет	ИМТ, кг/м ²	НОМА-IR, у.е.	Физические возможности SF-12, у.е.
<i>Норма</i>			18,5–25,0	< 2,7	40–60
Здоровые добровольцы (ЗД)	10	25–43 (34,5)	18,9–29,4 (22,5)	0,14–3,3 (1,3)	52,0–59,8 (56,3)
Молодые пациенты (МП)	8	26–44 (38)	20,8–30,9 (25,7)	1,43–4,65 (2,7)	16,1–31,7 (26,8)
Средневозрастные пациенты (СП)	20	52–64 (59)	21,3–49,3 (34,5)	0,81–12,5 (4,6)	19,1–29,8 (25,2)
Пожилые пациенты (ПП)	42	65–85 (72)	20,8–45 (30,4)	1,12–10,96 (3,4)	15,5–37,7 (23,0)

Примечание. Представлен разброс, минимальные и максимальные значения. ИМТ – индекс массы тела, НОМА-IR – индекс инсулинорезистентности.

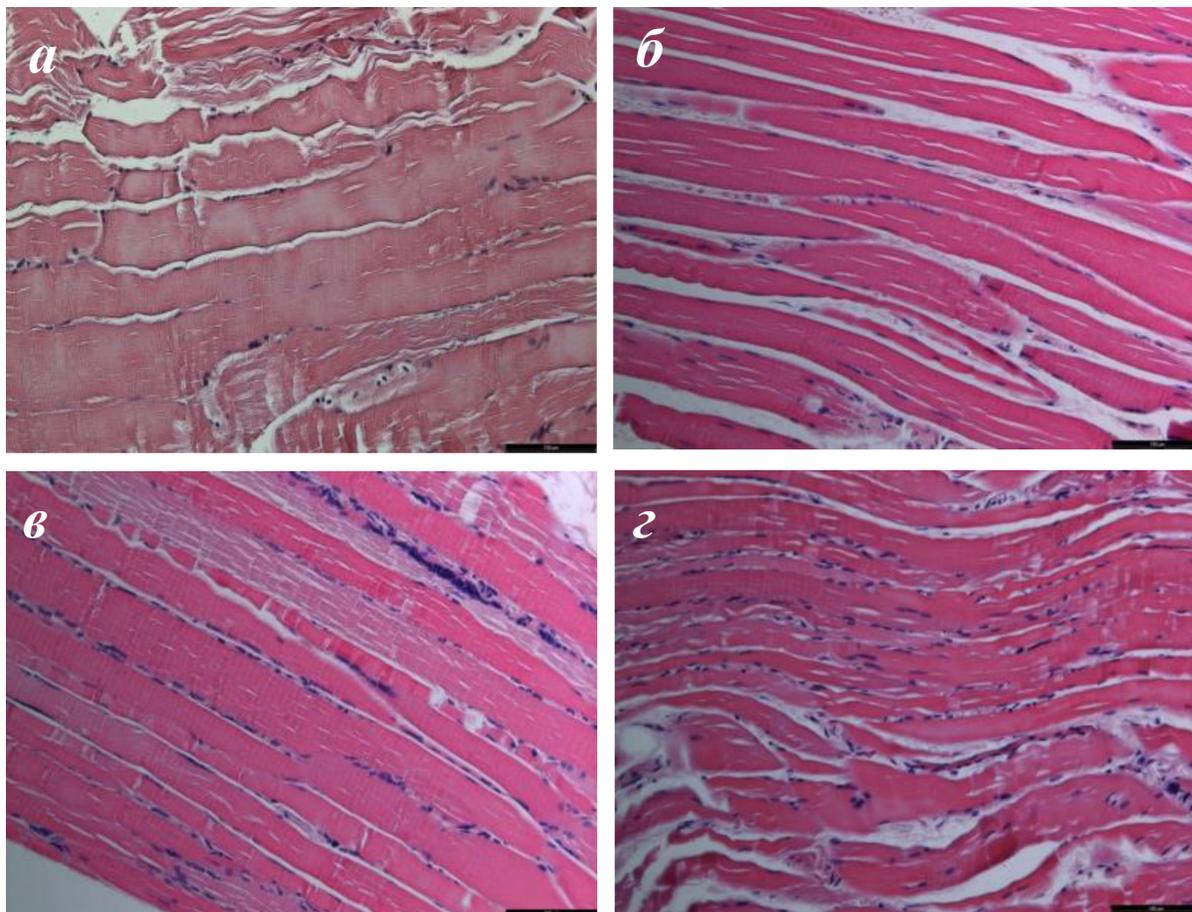


Рис. 1. Репрезентативные микрофотографии продольных срезов скелетных мышц, окрашенные гематоксилином-эозином. Объектив 20×. *а* – Образец участника исследования 35 лет (группа ЗД, $n = 10$); *б* – образец пациента 37 лет (группа МП, $n = 8$); *в* – образец пациента 56 лет (группа СП, $n = 20$); *г* – образец пациента 72 лет (группа ШП, $n = 42$)

вне зависимости от возраста и клинического статуса (рис. 4, *г*).

Данные анализа распределения изозимов в группах различного возраста были подтверждены при помощи электрофореза митохондриальных белков с последующим иммуноблоттингом; репрезентативные блоты представлены на рис. 3.

Полученные данные позволили предположить, что, во-первых, наблюдаемые различия в распределении активности гексокиназы между митохондриями и цитозолем в большей степени определяются возрастом, а не снижением двигательной активности/хроническим воспалением, а во-вторых, выявленные различия связаны с изменением содержания гексокиназы-2, а не -1.

Дыхание изолированных митохондрий.

Скорость дыхания изолированных митохондрий определяли при помощи полярографа, оценивая изменение концентрации кислорода во времени; репрезентативные полярограммы представлены на рис. 4, *а*. Полученные значения скорости дыхания митохондрий скелетных мышц в разных состояниях в зависимости от возраста участни-

ков исследования представлены на рис. 4, *б–ж*. Эндогенное дыхание (состояние 1) инициировали добавлением респираторного субстрата пирувата совместно с малатом, как описано выше, а после внесения ингибитора комплекса I – ротенона – дыхание вновь активировали сукцинатом. Он несколько стимулировал дыхание; теперь оно было ограничено отсутствием ADP (акцептора энергии, состояние 2). Добавление 0,1 мМ ADP увеличивало частоту дыхания до максимального уровня (состояние 3); однако в течение нескольких минут потребление O_2 снижалось до уровня, предшествующего добавлению ADP, поскольку ADP истощался при фосфорилировании до АТФ (состояние 4). Максимальная скорость потребления O_2 была достигнута после добавления протонофорного разобщителя дыхания и фосфорилирования – FCCP. Блокирование дыхания достигалось добавлением 1 мМ цианида калия (KCN), скорость дыхания в его присутствии вычиталась из всех полученных ранее значений [22].

Представленные на рис. 4, *а, е* и *ж* данные демонстрируют изменение скорости дыхания при

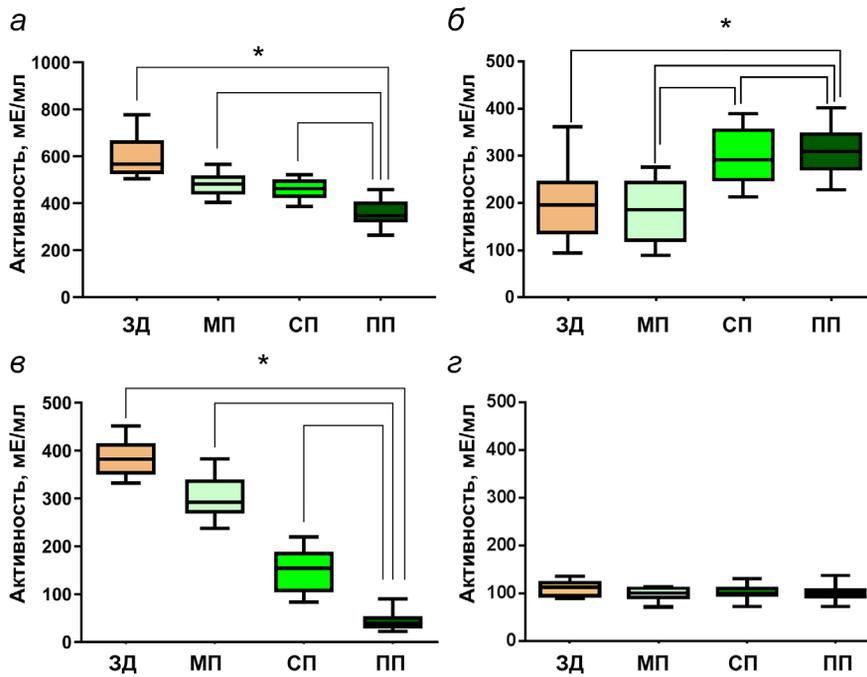


Рис. 2. Активность гексокиназы в скелетной мышце молодых здоровых добровольцев (ЗД, $n = 10$), молодых (МП, $n = 8$), средневозрастных (СП, $n = 20$) и пожилых (ПП, $n = 42$) пациентов. а – Суммарная активность гексокиназы в гомогенате; б – активность гексокиназы цитозольной фракции; в – активность гексокиназы-2, связанной с митохондриями; з – активность гексокиназы-1, связанной с митохондриями. Представлены медианы и интерквартильные разбросы. * $p < 0,05$

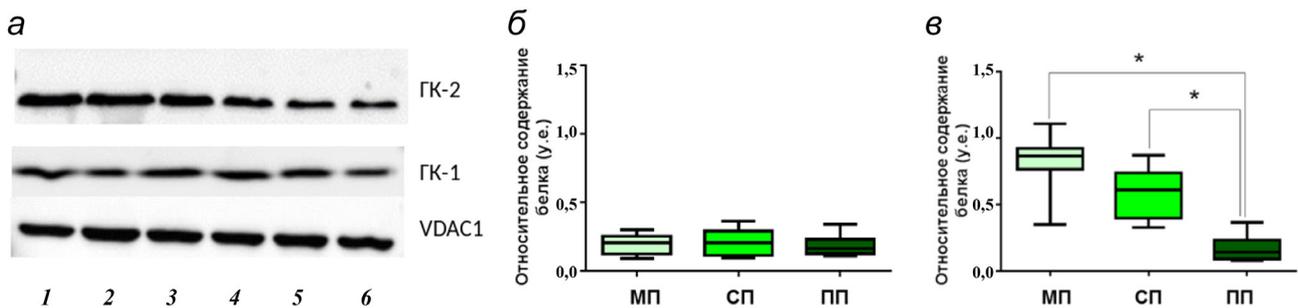


Рис. 3. Содержание I и II изоформ гексокиназы (ГК-1 и 2 соответственно) в митохондриях скелетной мышцы пациентов разного возраста. а – Репрезентативные электрофореграммы: 1 и 2 – молодые пациенты (МП) 37 и 39 лет, 3 и 4 – средневозрастные пациенты (СП) 59 и 60 лет, 5 и 6 – пожилые пациенты (ПП) 77 и 81 лет. Мембранный белок VDAC1 использован как контроль нагрузки митохондриального белка. б – Возрастные изменения содержания GK-1 (слева) и GK-2 (справа), для всех групп пациентов $n = 8$, * $p < 0,001$

добавлении 5 мМ глюкозы к митохондриям в состоянии 4 на фоне сукцината после истощения ADP. При этом фактически состояние 3 продолжается и дыхание происходит практически с максимальной скоростью, как если бы добавленный ADP не был истощен, что говорит о его постоянном уровне в микрокомпарменте вследствие гексокиназной реакции при насыщающей концентрации глюкозы и доступе к митохондриальному АТФ, что полностью подтверждает ранее полученные С. Бессманом и Д. Вильсоном данные [7, 39]. Таким образом, можно утверждать, что связанная на поверхности митохондрий гексокиназа сохра-

нила функциональную сопряжённость в составе микрокомпартамента при фракционировании митохондрий, т.е. после выделения митохондрии представляли собой высокосопряжённый препарат (рис. 4, ж-и).

Было показано, что субстратное дыхание в состоянии 2 достоверно снижается, как при активации комплекса I, так и комплекса II (рис. 4, б и в) для групп средневозрастных и пожилых пациентов в сравнении не только со здоровыми добровольцами, но и с молодыми пациентами. При этом стимулированное дыхание (ADP или FCCP) не различалось между здоровыми добровольцами

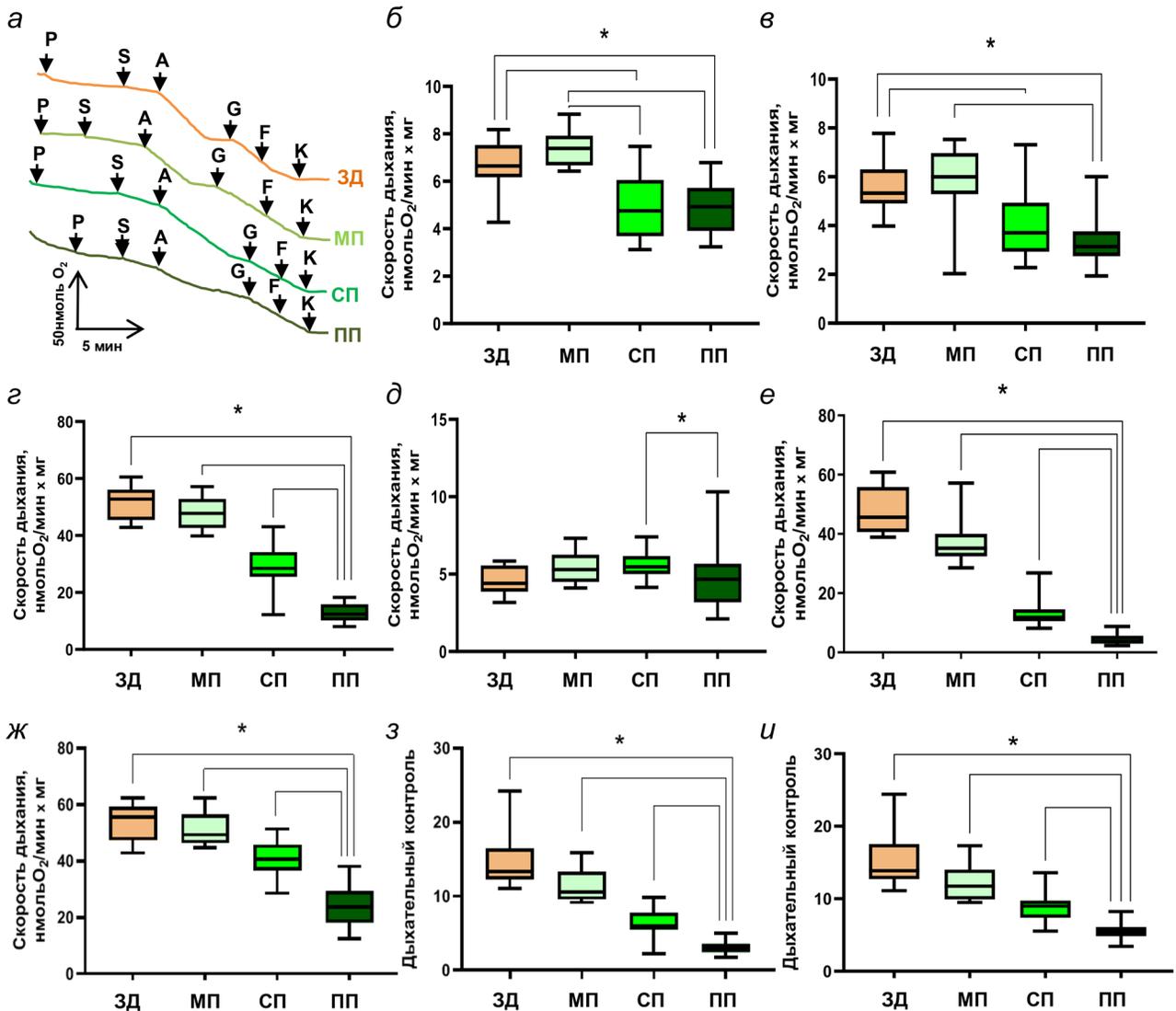


Рис. 4. Дыхание митохондрий скелетной мышцы молодых здоровых добровольцев (ЗД, $n = 10$), молодых (МП, $n = 8$), средневозрастных (СП, $n = 20$) и пожилых (ПП, $n = 42$) пациентов. а – Репрезентативные полярограммы: P – пируват + малат, S – сукцинат + ротенон, A – ADP, G – глюкоза, F – FCCP, K – KCN; б – скорость дыхания на пирувате с малатом; в – скорость дыхания на сукцинате в присутствии ротенона; г – скорость фосфорилирующего дыхания на сукцинате с ротенонем в присутствии ADP (состояние 3); д – скорость дыхания на сукцинате с ротенонем в состоянии 4; е – скорость фосфорилирующего дыхания на сукцинате с ротенонем в присутствии ADP и глюкозы; ж – скорость разобщенного дыхания в присутствии FCCP; з и и – дыхательный контроль по ADP и FCCP соответственно. Представлены медианы и интерквартильные разбросы; * $p < 0,05$

и молодыми пациентами, но демонстрировало выраженное (кратное) возрастное снижение: для групп «СП» и «ПП» по сравнению со здоровыми добровольцами и для «ПП» по сравнению с молодыми пациентами (рис. 4, г и ж). Эффект продолженного состояния 3 (см. выше) при измерении скорости дыхания в присутствии глюкозы исчезал с возрастом, причём для группы «ПП» различия были значимы по отношению ко всем остальным группам, в том числе средневозрастных пациентов (рис. 4, е).

Продукция перекиси митохондриями. Было показано, что генерация перекиси митохондриями, энергизованными сукцинатом, имеет тен-

денцию к увеличению уже у молодых пациентов по сравнению со здоровыми добровольцами того же возраста (рис. 5, а), однако достоверный прирост этого показателя наблюдался при увеличении возраста пациентов, что коррелировало со степенью диссоциации гексокиназы с мембраной митохондрии (рис. 2, табл. 2) и снижением скорости фосфорилирующего дыхания (рис. 3, рис. S1, в Приложения и табл. 2). Подтверждая ранее полученные нами и другими исследователями данные [15, 40–46], мы обнаружили значимое снижение генерации перекиси водорода митохондриями при стимуляции дыхания в присутствии субстрата гексокиназной реакции ($p < 0,05$ для групп «ЗД»

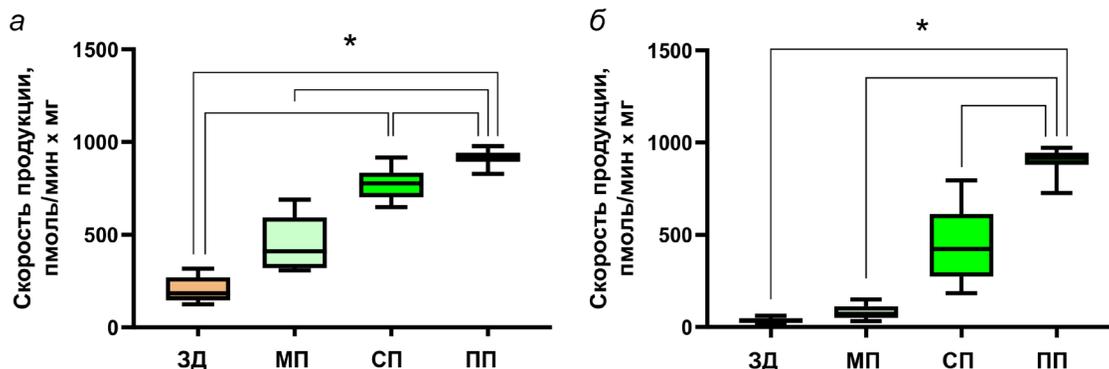


Рис. 5. Продукция перекиси водорода митохондриями скелетной мышцы молодых здоровых добровольцев (ЗД, $n = 10$), молодых (МП, $n = 8$), средневозрастных (СП, $n = 20$) и пожилых (ПП, $n = 42$) пациентов. *a* – Продукция в присутствии сукцината; *б* – продукция в присутствии сукцината при активации митохондриальной гексокиназы субстратами ферментативной реакции. Представлены медианы и интерквартильные разбросы; * $p < 0,05$

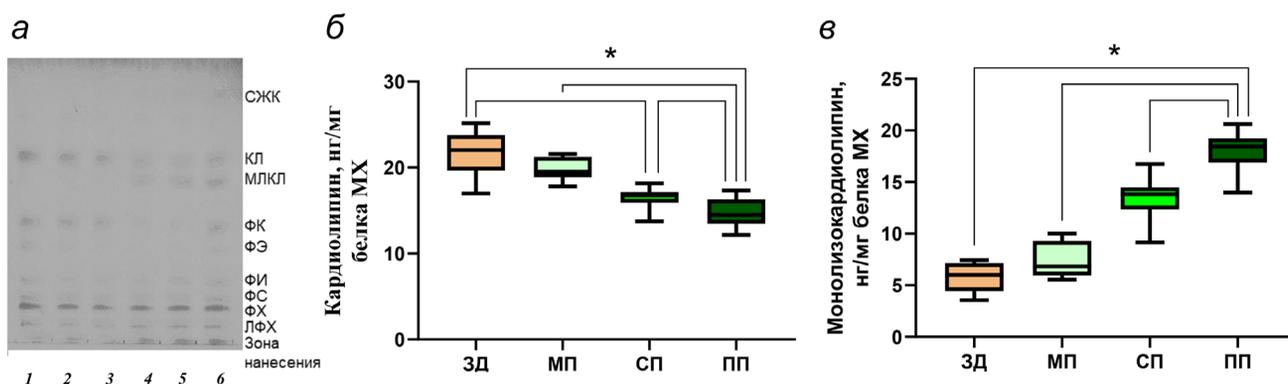


Рис. 6. Содержание кардиолипина в митохондриях скелетной мышцы молодых здоровых добровольцев (ЗД), молодых (МП), средневозрастных (СП) и пожилых (ПП) пациентов, для всех групп $n = 8$. *a* – Репрезентативная тонкослойная хроматограмма: 1–3 – молодые пациенты, 4–6 – пожилые пациенты. СЖК – свободные жирные кислоты, КЛ и МЛКЛ – кардиолипин и монолизокардиолипин, ФК – фосфатидная кислота, ФЭ – фосфатидилэтаноламин, ФИ – фосфатидилинозитол, ФС – фосфатидилсерин, ФХ и ЛФХ – фосфатидилхолин и лизофосфатидилхолин; *б* и *в* – усреднённые значения содержания кардиолипина и монолизокардиолипина, нормированные на содержание фосфатидилхолина

и «МП» на рис. 5, *a* и *б*, см. также рис. S1, *д* Приложения) и выявили отсутствие достоверных изменений для групп «СП» и «ПП». Кроме того, оказалось, что для молодого возраста, вне зависимости от клинического статуса, значения скорости продукции перекиси достоверно снижаются в присутствии глюкозы, т.е. при активации АТФ/АДП-челнока в микрокомпарimente гексокиназы и внешней мембраны митохондрий, в то время как в среднем и пожилом возрасте продукция перекиси при добавлении субстрата гексокиназной реакции остаётся высокой (как в присутствии сукцината) (рис. 5, *a* и *б*, а также рис. S2 Приложения).

Содержание кардиолипина в митохондриях. Ранее мы показали важность сохранения интактной структуры и общего содержания митохондриального липида кардиолипина, а также продемонстрировали, что кардиолипин присутствует в составе протеолипидных комплексов ми-

тохондрий, включающих гексокиназу, связанную с VDAC1 [10, 47]. В настоящей работе были выявлены значимые различия в содержании кардиолипина в митохондриях скелетных мышц пожилых пациентов по сравнению с группой здоровых добровольцев ($p < 0,01$) и группой молодых пациентов ($p < 0,05$) (рис. 6, *б*), в то время как для монолизокардиолипина значимые различия наблюдали между следующими группами: пациенты среднего возраста по отношению к здоровым добровольцам ($p < 0,01$) и молодым пациентам ($p < 0,05$); пожилые пациенты и здоровые добровольцы ($p < 0,001$); пожилые пациенты и молодые пациенты ($p < 0,01$). Таким образом, уменьшение содержания митохондриального кардиолипина и накопление монолизокардиолипина не происходит у молодых пациентов относительно здоровых людей, но наблюдается при увеличении возраста пациентов (рис. 6), и это коррелирует с продукцией МАФК (табл. 2).

Таблица 2. Взаимосвязь (коэффициент корреляции Спирмана) показателей, характеризующих функции митохондрии в скелетных мышцах человека, в отдельных группах

Группы	ЗД (n = 10)	МП (n = 8)	СП (n = 20)	ПП (n = 42)
ГК связанная/возраст	нет	r = -0,809 p = 0,015	r = -0,953 p = 0,0012	r = -0,866 p = 0,0002
Дыхание (сукц. + ADP)/возраст	r = -0,814 p = 0,004	нет	r = -0,88 p = 3,2e-7	r = -0,514 p = 3,6e-4
Дыхание (сукц. + ADP + глюк.)/возраст	r = -0,843 p = 0,002	r = -0,8 p = 0,017	r = -0,917 p = 0,001	r = -0,746 p = 0,002
Дыхание (сукц. + ADP + глюк.)/ГК связанная	r = 0,793 p = 0,006	r = 0,921 p = 0,001	r = 0,836 p = 4,5e-6	r = 0,824 p = 6,37e-12
Продукция перекиси (сукц.)/возраст	r = 0,87 p = 0,01	r = 0,77 p = 0,025	r = 0,872 p = 5,5e-7	r = 0,555 p = 9,57e-5
Продукция перекиси (сукц.)/ГК связанная	r = -0,761 p = 0,037	нет	r = -0,887 p = 1,85e-7	r = -0,556 p = 8,92e-5
Продукция перекиси (сукц.)/дыхание (сукц. + ADP + глюк.)	r = -0,703 p = 0,023	нет	r = -0,762 p = 9,34e-5	r = -0,477 p = 0,001
Продукция перекиси (сукц. + ADP + глюк.)/дыхание (сукц. + ADP + глюк.)	r = -0,765 p = 0,01	нет	r = -0,791 p = 3,25e-5	r = -0,766 p = 1,35e-9
Продукция перекиси (сукц. + ADP + глюк.)/ГК связанная	нет	нет	r = -0,932 p = 2,32e-9	r = -0,813 p = 2,07e-11
Продукция перекиси (сукц. + ADP + глюк.)/возраст	r = 0,94 p = 5,21e-5	r = 0,882 p = 0,004	r = 0,925 p = 5,67e-9	r = 0,674 p = 5,22e-7
Продукция перекиси (сукц. + ADP + глюк.)/дыхание (сукц. + ADP)	r = -0,754 p = 0,012	нет	r = -0,854 p = 1,7e-6	нет
ГК общая/возраст	нет	нет	нет	r = -0,361 p = 0,016
Содерж. кардиолипина/дыхание (сукц. + ADP + глюк.)	нет	нет	нет	r = 0,622 p = 6,7e-06
Содерж. кардиолипина/ГК связанная	нет	нет	нет	r = 0,841 p = 9,53e-13
Содерж. кардиолипина/продукция перекиси (сукц.)	нет	нет	нет	r = -0,521 p = 0,00029
Содерж. кардиолипина/продукция перекиси (сукц. + ADP + глюк.)	r = -0,802 p = 0,005	нет	нет	r = -0,612 p = 1,03e-05
Содерж. монолизокардиол./ дыхание (сукц. + ADP + глюк.)	нет	r = -0,71 p = 0,048	нет	r = -0,594 p = 2,13e-05
Содерж. монолизокардиол./ГК связанная	нет	r = -0,805 p = 0,016	нет	r = -0,718 p = 3,99e-08
Содерж. монолизокардиол./продукция перекиси (сукц.)	нет	нет	нет	r = 0,432 p = 0,003
Содерж. монолизокардиол./продукция перекиси (сукц. + ADP + глюк.)	нет	нет	нет	r = 0,544 p = 0,00014
Дых. контроль (FCCP)/возраст	нет	нет	нет	r = -0,874 p = 0,0002

Таблица 2 (окончание)

Группы	ЗД (n = 10)	МП (n = 8)	СП (n = 20)	ПП (n = 42)
Дыхание (сукц. + ADP)/ИМТ	нет	r = 0,719 p = 0,044	нет	нет
НОМА-IR/ГК связанная	нет	нет	нет	нет
НОМА-IR/дыхание (сукц. + ADP)	нет	нет	нет	нет
НОМА-IR/возраст	r = 0,94 p = 5e-5	r = 0,882 p = 0,004	r = 0,925 p = 0,0001	r = 0,674 p = 2e-5
НОМА-IR/ИМТ	нет	нет	r = 0,453 p = 0,045	r = 0,472 p = 0,001
НОМА-IR/ дыхание (сукц. + ADP + глюк.)	нет	нет	r = 0,448 p = 0,047	нет

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В работе исследовали влияние снижения двигательной активности/хронического воспаления у молодых людей, а также возраста у пациентов с артрозом коленного/тазобедренного сустава на регуляцию продукции мАФК в скелетной мышце человека. Впервые для мышечной ткани человека была показана ассоциация возраст-зависимого увеличения продукции перекиси водорода митохондриями со снижением доли гексокиназы-2, связанной с митохондриями. Это подтверждается данными о возраст-зависимом изменении распределения гексокиназы-2 между митохондриальной и цитозольной фракциями и снижении скорости сопряжённого дыхания выделенных митохондрий и дыхания при стимуляции глюкозой – субстратом гексокиназы. Эти наблюдения хорошо согласуются и дополняют наши предыдущие данные по исследованию продукции мАФК тканями долго- и короткоживущих грызунов [15].

Можно предположить, что описанное нами возраст-зависимое снижение эффективности сопряжённого дыхания митохондрий скелетных мышц (рис. 4, 2) связано с увеличением энергодефицита в стареющей мышце, которое ранее было показано в работах на грызунах и первичных миобластах человека (для обзора см. работы Bratic et al., Pedersen et al. [48, 49]). Выраженное возрастное падение чувствительности выделенных митохондрий к ADP (рис. 4, 2) подтвердило показанный Г. Холлоуэй и коллегами эффект уменьшения ADP-индуцируемого снижения продукции перекиси в пермеабиллизованных мышечных волокнах пожилых людей по сравнению с молодыми [50]. При этом отсутствие влияния добавления гексокиназы на дыхание и генерацию перекиси в цитируемой работе можно объяснить тем, что, во-первых, для сохранения микрокомпартамента в интактном со-

стоянии при фракционировании митохондрий необходимо присутствие в среде ионов Mg^{2+} ; во-вторых, при выделении митохондрий реассоциация гексокиназы с внешней мембраной не происходит зеркально диссоциации и требует специальных условий; в-третьих, добавленный фермент примерно в десять раз менее эффективен, в сравнении с адсорбированным, для стимуляции дыхания ADP, образующимся при фосфорилировании глюкозы [39, 51].

Вызванные окислительным стрессом патологические состояния скелетных мышц особенно ярко проявляются при старении, что приводит к апоптозу, атрофии и мышечной дисфункции [52–54]. Всё больше данных в литературе указывает на связь между окислительным стрессом, вызываемым избыточной продукцией мАФК гиперполяризованными митохондриями, и гипергликемией [13, 15, 44, 55]. Наши данные подтверждают это наблюдение и частично объясняют механизмы, ответственные за эти изменения [52]. Гексокиназа-2, в отличие от остальных изозимов этого фермента, имеет второй (не каталитический) сайт связывания глюкозы; оккупация этого сайта, вызванная гипергликемией, блокирует связывание с ним шаперона HSP7C (Heat shock cognate 71, кодируемого геном *HSPA8*), индуцирующего протеолитическую деградацию гексокиназы [44]. Это приводит к повышению внутриклеточного содержания гексокиназы-2 и накоплению глюкозо-6-фосфата, который обладает сольбилизирующим действием и вызывает десорбцию гексокиназы с поверхности митохондрий. По-видимому, эти события лежат в основе наблюдаемого нами и другими авторами возраст-зависимого разрушения микрокомпартамента внешней мембраны, включающего гексокиназу-2 [14, 15], что ведёт не только к увеличению мембранного потенциала, повышению продукции мАФК и окислительному стрессу, но и может вы-

звать апоптоз за счёт связывания проапоптотического белка Вах с VDAC1 [56].

Мы обнаружили коррелирующее с возрастом снижение содержания кардиолипина в митохондриях скелетных мышц (рис. 5, табл. 2). Известно, что ADP/АТФ-трансфераза 1 (ANT), входящая в микромембрану и локализованная во внутренней мембране, входит в протеолипидный комплекс контактных сайтов митохондрий [57], включающий 3 молекулы прочносвязанного кардиолипина; при этом окисление кардиолипина приводит к нарушению структуры этого комплекса [58, 59]. Ранее было показано, что нарушение конформации ANT приводит к разрушению его комплекса с VDAC1 и контактных сайтов митохондрии [60]. Можно предположить, что обнаруженное нами возраст-зависимое снижение содержания кардиолипина в митохондриях скелетных мышц человека, коррелирующее с количеством связанной гексокиназы, продукцией МАФК и фосфорилирующего дыхания, является частью общего механизма нарушения мягкой деполяризации митохондрий скелетных мышц при старении. Это предположение открывает перспективы для дальнейших исследований по изучению механизмов, лежащих в основе возраст-зависимого нарушения структуры контактных сайтов митохондрий, которые ассоциированы с ремоделингом кардиолипина при окислительном стрессе. Исследование этих механизмов представляется перспективным для поиска фармакологических/физиологических подходов к коррекции возрастных патологий скелетных мышц, вызванных нарушениями в окислении глюкозы и продукции МАФК.

Вклад авторов. М.Ю. Высоких, А.Ю. Ефименко, Д.В. Попов, В.П. Скулачѳ – концепция и руководство работой; М.Ю. Высоких, М.А. Виговский, В.В. Филиппов, Я.Р. Бородай, М.В. Марей, О.А. Григорьева, Т.Ф. Вепхвадзе, Н.С. Курочкина, Л.А. Манухова – проведение экспериментов; М.Ю. Высоких, М.А. Виговский, А.Ю. Ефименко, Д.В. Попов, В.П. Скулачѳ – обсуждение результатов исследования; М.Ю. Высоких, А.Ю. Ефименко, Д.В. Попов – написание текста; М.Ю. Высоких, А.Ю. Ефименко, Д.В. Попов – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа была поддержана грантом РФФИ № 21-15-00405 (исследование со здоровыми добровольцами, эксперименты с дыханием митохондрий) и государственным заданием МНОЦ МГУ имени М.В. Ломоносова (исследование с пациентами, клинические и гистологические исследования).

Конфликт интересов. Авторы заявляют 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 её последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием животных в качестве объектов.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Harman, D. (1972) The biologic clock: the mitochondria? *J. Am. Geriatr. Soc.*, **20**, 145-147, <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.1972.tb00787.x>.
2. Anderson, C. M., Hu, J., Barnes, R. M., Heidt, A. B., Cornelissen, I., and Black, B. L. (2015) Myocyte enhancer factor 2C function in skeletal muscle is required for normal growth and glucose metabolism in mice, *Skelet. Muscle*, **5**, 7, <https://doi.org/10.1186/s13395-015-0031-0>.
3. Hargreaves, M. (2004) Muscle glycogen and metabolic regulation, *Proc. Nutr. Soc.*, **63**, 217-220, <https://doi.org/10.1079/PNS2004344>.
4. Fealy, C. E., Grevendonk, L., Hoeks, J., and Hesselink, M. K. C. (2021) Skeletal muscle mitochondrial network dynamics in metabolic disorders and aging, *Trends Mol. Med.*, **27**, 1033-1044, <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2021.07.013>.
5. Vogt, C., Yki-Jarvinen, H., Iozzo, P., Pipek, R., Pendergrass, M., Koval, J., Ardehali, H., Printz, R., Granner, D., Defronzo, R., and Mandarino, L. (1998) Effects of insulin on subcellular localization of hexokinase II in human skeletal muscle *in vivo*, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **83**, 230-234, <https://doi.org/10.1210/jcem.83.1.4476>.
6. Wilson, J. E. (2003) Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function, *J. Exp. Biol.*, **206**, 2049-2057, <https://doi.org/10.1242/jeb.00241>.
7. Gots, R. E., Gorin, F. A., and Bessman, S. P. (1972) Kinetic enhancement of bound hexokinase activity by mitochondrial respiration, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 1249-1255, [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(72\)90602-x](https://doi.org/10.1016/0006-291x(72)90602-x).
8. Sui, D., and Wilson, J. E. (1997) Structural determinants for the intracellular localization of the isozymes of mammalian hexokinase: intracellular localization of fusion constructs incorporating structural elements from the hexokinase isozymes and the green fluorescent protein, *Arch. Biochem. Biophys.*, **345**, 111-125, <https://doi.org/10.1006/abbi.1997.0241>.

9. Brdiczka, D., Knoll, G., Riesinger, I., Weiler, U., Klug, G., Benz, R., and Krause, J. (1986) Microcompartmentation at the mitochondrial surface: its function in metabolic regulation, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **194**, 55-69, https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5107-8_5.
10. Vyssokikh, M., and Brdiczka, D. (2004) VDAC and peripheral channelling complexes in health and disease, *Mol. Cell Biochem.*, **256-257**, 117-126, <https://doi.org/10.1023/b:mcbi.0000009863.69249.d9>.
11. Cadenas, E., Boveris, A., Ragan, C. I., and Stoppani, A. O. (1977) Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria, *Arch. Biochem. Biophys.*, **180**, 248-257, [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(77\)90035-2](https://doi.org/10.1016/0003-9861(77)90035-2).
12. Morse, P. T., Wan, J., Bell, J., Lee, I., Goebel, D. J., Malek, M. H., Sanderson, T. H., and Huttemann, M. (2022) Sometimes less is more: inhibitory infrared light during early reperfusion calms hyperactive mitochondria and suppresses reperfusion injury, *Biochem. Soc. Trans.*, **50**, 1377-1388, <https://doi.org/10.1042/BST20220446>.
13. Korshunov, S. S., Skulachev, V. P., and Starkov, A. A. (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria, *FEBS Lett.*, **416**, 15-18, [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(97\)01159-9](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(97)01159-9).
14. Da-Silva, W. S., Gomez-Puyou, A., de Gomez-Puyou, M. T., Moreno-Sanchez, R., De Felice, F. G., de Meis, L., Oliveira, M. F., and Galina, A. (2004) Mitochondrial bound hexokinase activity as a preventive antioxidant defense: steady-state ADP formation as a regulatory mechanism of membrane potential and reactive oxygen species generation in mitochondria, *J. Biol. Chem.*, **279**, 39846-39855, <https://doi.org/10.1074/jbc.M403835200>.
15. Vyssokikh, M. Y., Holtze, S., Averina, O. A., Lyamzaev, K. G., Panteleeva, A. A., Marey, M. V., Zinovkin, R. A., Severin, F. F., Skulachev, M. V., Fasel, N., Hildebrandt, T. B., and Skulachev, V. P. (2020) Mild depolarization of the inner mitochondrial membrane is a crucial component of an anti-aging program, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 6491-6501, <https://doi.org/10.1073/pnas.1916414117>.
16. Callahan, D. M., Miller, M. S., Sweeny, A. P., Tourville, T. W., Slaughterbeck, J. R., Savage, P. D., Maugan, D. W., Ades, P. A., Beynnon, B. D., and Toth, M. J. (2014) Muscle disuse alters skeletal muscle contractile function at the molecular and cellular levels in older adult humans in a sex-specific manner, *J. Physiol.*, **592**, 4555-4573, <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.279034>.
17. Callahan, D. M., Tourville, T. W., Miller, M. S., Hackett, S. B., Sharma, H., Cruickshank, N. C., Slaughterbeck, J. R., Savage, P. D., Ades, P. A., Maughan, D. W., Beynnon, B. D., and Toth, M. J. (2015) Chronic disuse and skeletal muscle structure in older adults: sex-specific differences and relationships to contractile function, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **308**, C932-943, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00014.2015>.
18. Miller, M. S., Callahan, D. M., Tourville, T. W., Slaughterbeck, J. R., Kaplan, A., Fiske, B. R., Savage, P. D., Ades, P. A., Beynnon, B. D., and Toth, M. J. (2017) Moderate-intensity resistance exercise alters skeletal muscle molecular and cellular structure and function in inactive older adults with knee osteoarthritis, *J. Appl. Physiol.*, **122**, 775-787, <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00830.2016>.
19. Suetta, C., Aagaard, P., Magnusson, S. P., Andersen, L. L., Sipila, S., Rosted, A., Jakobsen, A. K., Duus, B., and Kjaer, M. (2007) Muscle size, neuromuscular activation, and rapid force characteristics in elderly men and women: effects of unilateral long-term disuse due to hip-osteoarthritis, *J. Appl. Physiol.*, **102**, 942-948, <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00067.2006>.
20. Ware, J., Jr., Kosinski, M., and Keller, S. D. (1996) A 12-Item Short-Form Health Survey: construction of scales and preliminary tests of reliability and validity, *Med. Care*, **34**, 220-233, <https://doi.org/10.1097/00005650-199603000-00003>.
21. Popov, D. V., Makhnovskii, P. A., Shagimardanova, E. I., Gazizova, G. R., Lysenko, E. A., Gusev, O. A., and Vinogradova, O. L. (2019) Contractile activity-specific transcriptome response to acute endurance exercise and training in human skeletal muscle, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **316**, E605-E614, <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00449.2018>.
22. Skulachev, V. P., Bogachev, A. V., and Kasparinsky, F. O. (2013) Comprehensive up-to-date treatment of molecular bioenergetic mechanisms, *Principl. Bioenerg.*, <https://doi.org/10.1007/978-3-642-33430-6>.
23. Gnaiger, E., Kuznetsov, A. V., Schneeberger, S., Seiler, R., Brandacher, G., Steurer, W., and Margreiter, R. (2000) Mitochondria in the cold, *Life Cold*, 431-442, https://doi.org/10.1007/978-3-662-04162-8_45.
24. Zhou, M., Diwu, Z., Panchuk-Voloshina, N., and Haugland, R. P. (1997) A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases, *Anal. Biochem.*, **253**, 162-168, <https://doi.org/10.1006/abio.1997.2391>.
25. Shabalina, I. G., Vyssokikh, M. Y., Gibanova, N., Csikasz, R. I., Edgar, D., Hallden-Waldemarson, A., Rozhdestvenskaya, Z., Bakeeva, L. E., Vays, V. B., Pustovidko, A. V., Skulachev, M. V., Cannon, B., Skulachev, V. P., and Nedergaard, J. (2017) Improved health-span and lifespan in mtDNA mutator mice treated with the mitochondrially targeted anti-oxidant SkQ1, *Aging (Albany NY)*, **9**, 315-339, <https://doi.org/10.18632/aging.101174>.
26. Antonenko, Y. N., Avetisyan, A. V., Bakeeva, L. E., Chernyak, B. V., Chertkov, V. A., Domnina, L. V., Ivanova, O. Y., Izyumov, D. S., Khailova, L. S., Klishin, S. S., Korshunova, G. A., Lyamzaev, K. G., Muntyan, M. S., Nepryakhina, O. K.,

- Pashkovskaya, A. A., Pletjushkina, O. Y., Pustovidko, A. V., Roginsky, V. A., Rokitskaya, T. I., Ruuge, E. K., et al. (2008) Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 1. Cationic plastoquinone derivatives: synthesis and *in vitro* studies, *Biochemistry (Moscow)*, **73**, 1273-1287, <https://doi.org/10.1134/s0006297908120018>.
27. Shabalina, I. G., Vrbacky, M., Pecinova, A., Kalinovich, A. V., Drahota, Z., Houstek, J., Mracek, T., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2014) ROS production in brown adipose tissue mitochondria: the question of UCP1-dependence, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 2017-2030, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.04.005>.
 28. Scheer, W. D., Lehmann, H. P., and Beeler, M. F. (1978) An improved assay for hexokinase activity in human tissue homogenates, *Anal. Biochem.*, **91**, 451-463, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90531-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90531-6).
 29. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685, <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
 30. Buscher, T., Luh, E., and Pette, D. (1964) Simple and Compound Optical Tests with Pyridine Nucleotides, in *Hoppe-Seyler/Thierfelder, Handbook of Physiological and Pathological Chemical Analysis* [in German], **VI/A**, 292-339.
 31. Bligh, E. G., and Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911-917, <https://doi.org/10.1139/o59-099>.
 32. Pinault, M., Guimaraes, C., Dumas, J., Servais, S., Chevalier, S., Besson, P., and Goupille, C. (2020) A 1D high performance thin layer chromatography method validated to quantify phospholipids including cardiolipin and monolysocardiolipin from biological samples, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **122**, <https://doi.org/10.1002/ejlt.201900240>.
 33. Kruszynska, Y. T., Mulford, M. I., Baloga, J., Yu, J. G., and Olefsky, J. M. (1998) Regulation of skeletal muscle hexokinase II by insulin in nondiabetic and NIDDM subjects, *Diabetes*, **47**, 1107-1113, <https://doi.org/10.2337/diabetes.47.7.1107>.
 34. Vestergaard, H., Bjorbaek, C., Hansen, T., Larsen, F. S., Granner, D. K., and Pedersen, O. (1995) Impaired activity and gene expression of hexokinase II in muscle from non-insulin-dependent diabetes mellitus patients, *J. Clin. Invest.*, **96**, 2639-2645, <https://doi.org/10.1172/JCI118329>.
 35. Ritov, V. B., and Kelley, D. E. (2001) Hexokinase isozyme distribution in human skeletal muscle, *Diabetes*, **50**, 1253-1262, <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.6.1253>.
 36. Mandarino, L. J., Printz, R. L., Cusi, K. A., Kinchington, P., O'Doherty, R. M., Osawa, H., Sewell, C., Consoli, A., Granner, D. K., and DeFronzo, R. A. (1995) Regulation of hexokinase II and glycogen synthase mRNA, protein, and activity in human muscle, *Am. J. Physiol.*, **269**, E701-708, <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1995.269.4.E701>.
 37. Wilson, J. E. (1995) Hexokinases, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **126**, 65-198, <https://doi.org/10.1007/BFb0049776>.
 38. Cunha, T. F., Vieira, J. S., Santos, J. B., Coelho, M. A., Brum, P. C., and Gabriel-Costa, D. (2022) Lactate modulates cardiac gene expression in mice during acute physical exercise, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **55**, e11820, <https://doi.org/10.1590/1414-431X2022e11820>.
 39. BeltrandelRio, H., and Wilson, J. E. (1991) Hexokinase of rat brain mitochondria: relative importance of adenylate kinase and oxidative phosphorylation as sources of substrate ATP, and interaction with intramitochondrial compartments of ATP and ADP, *Arch. Biochem. Biophys.*, **286**, 183-194, [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(91\)90026-f](https://doi.org/10.1016/0003-9861(91)90026-f).
 40. Saraiva, L. M., Seixas da Silva, G. S., Galina, A., da-Silva, W. S., Klein, W. L., Ferreira, S. T., and De Felice, F. G. (2010) Amyloid-beta triggers the release of neuronal hexokinase 1 from mitochondria, *PLoS One*, **5**, e15230, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015230>.
 41. De-Souza-Ferreira, E., Rios-Neto, I. M., Martins, E. L., and Galina, A. (2019) Mitochondria-coupled glucose phosphorylation develops after birth to modulate H₂ O₂ release and calcium handling in rat brain, *J. Neurochem.*, **149**, 624-640, <https://doi.org/10.1111/jnc.14705>.
 42. Silva-Rodrigues, T., de-Souza-Ferreira, E., Machado, C. M., Cabral-Braga, B., Rodrigues-Ferreira, C., and Galina, A. (2020) Hyperglycemia in a type 1 Diabetes Mellitus model causes a shift in mitochondria coupled-glucose phosphorylation and redox metabolism in rat brain, *Free Radic. Biol. Med.*, **160**, 796-806, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.09.017>.
 43. Tan, V. P., Smith, J. M., Tu, M., Yu, J. D., Ding, E. Y., and Miyamoto, S. (2019) Dissociation of mitochondrial HK-II elicits mitophagy and confers cardioprotection against ischemia, *Cell Death Dis*, **10**, 730, <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1965-7>.
 44. Rabbani, N., Xue, M., and Thornalley, P. J. (2022) Hexokinase-2-linked glycolytic overload and unscheduled glycolysis-driver of insulin resistance and development of vascular complications of diabetes, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, <https://doi.org/10.3390/ijms23042165>.
 45. Bryson, J. M., Coy, P. E., Gottlob, K., Hay, N., and Robey, R. B. (2002) Increased hexokinase activity, of either ectopic or endogenous origin, protects renal epithelial cells against acute oxidant-induced cell death, *J. Biol. Chem.*, **277**, 11392-11400, <https://doi.org/10.1074/jbc.M110927200>.
 46. Ahmad, A., Ahmad, S., Schneider, B. K., Allen, C. B., Chang, L. Y., and White, C. W. (2002) Elevated expression of hexokinase II protects human lung epithelial-like A549 cells against oxidative injury, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **283**, L573-584, <https://doi.org/10.1152/ajplung.00410.2001>.

47. Shilovsky, G. A., Putyatina, T. S., Ashapkin, V. V., Yamskova, O. V., Lyubetsky, V. A., Sorokina, E. V., Shram, S. I., Markov, A. V., and Vyssokikh, M. Y. (2019) Biological diversity and remodeling of cardiolipin in oxidative stress and age-related pathologies, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1469-1483, <https://doi.org/10.1134/S000629791912006X>.
48. Bratic, I., and Trifunovic, A. (2010) Mitochondrial energy metabolism and ageing, *Biochim. Biophys. Acta*, **1797**, 961-967, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.01.004>.
49. Pedersen, Z. O., Pedersen, B. S., Larsen, S., and Dysgaard, T. (2023) A scoping review investigating the “gene-dosage theory” of mitochondrial DNA in the healthy skeletal muscle, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, <https://doi.org/10.3390/ijms24098154>.
50. Holloway, G. P., Holwerda, A. M., Miotto, P. M., Dirks, M. L., Verdijk, L. B., and van Loon, L. J. C. (2018) Age-associated impairments in mitochondrial ADP sensitivity contribute to redox stress in senescent human skeletal muscle, *Cell Rep.*, **22**, 2837-2848, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.069>.
51. BeltrandelRio, H., and Wilson, J. E. (1992) Coordinated regulation of cerebral glycolytic and oxidative metabolism, mediated by mitochondrially bound hexokinase dependent on intramitochondrially generated ATP, *Arch. Biochem. Biophys.*, **296**, 667-677, [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(92\)90625-7](https://doi.org/10.1016/0003-9861(92)90625-7).
52. Vincent, A. M., Olzmann, J. A., Brownlee, M., Sivitz, W. I., and Russell, J. W. (2004) Uncoupling proteins prevent glucose-induced neuronal oxidative stress and programmed cell death, *Diabetes*, **53**, 726-734, <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.3.726>.
53. Bellanti, F., Lo Buglio, A., and Vendemiale, G. (2022) Muscle delivery of mitochondria-targeted drugs for the treatment of sarcopenia: rationale and perspectives, *Pharmaceutics*, **14**, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122588>.
54. Russell, J. W., Golovoy, D., Vincent, A. M., Mahendru, P., Olzmann, J. A., Mentzer, A., and Feldman, E. L. (2002) High glucose-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurons, *FASEB J.*, **16**, 1738-1748, <https://doi.org/10.1096/fj.01-1027com>.
55. Green, K., Brand, M. D., and Murphy, M. P. (2004) Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes, *Diabetes*, **53 Suppl 1**, S110-118, <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.2007.s110>.
56. Vyssokikh, M. Y., Zorova, L., Zorov, D., Heimlich, G., Jurgensmeier, J. J., and Brdiczka, D. (2002) Bax releases cytochrome c preferentially from a complex between porin and adenine nucleotide translocator. Hexokinase activity suppresses this effect, *Mol. Biol. Rep.*, **29**, 93-96, <https://doi.org/10.1023/a:1020383108620>.
57. Beutner, G., Ruck, A., Riede, B., and Brdiczka, D. (1997) Complexes between hexokinase, mitochondrial porin and adenylate translocator in brain: regulation of hexokinase, oxidative phosphorylation and permeability transition pore, *Biochem. Soc. Trans.*, **25**, 151-157, <https://doi.org/10.1042/bst0250151>.
58. Kunji, E. R., Aleksandrova, A., King, M. S., Majd, H., Ashton, V. L., Cerson, E., Springett, R., Kibalchenko, M., Tavoulari, S., Crichton, P. G., and Ruprecht, J. J. (2016) The transport mechanism of the mitochondrial ADP/ATP carrier, *Biochim. Biophys. Acta*, **1863**, 2379-2393, <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.03.015>.
59. Duncan, A. L., Ruprecht, J. J., Kunji, E. R. S., and Robinson, A. J. (2018) Cardiolipin dynamics and binding to conserved residues in the mitochondrial ADP/ATP carrier, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, **1860**, 1035-1045, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.01.017>.
60. Allouche, M., Pertuiset, C., Robert, J. L., Martel, C., Veneziano, R., Henry, C., dein, O. S., Saint, N., Brenner, C., and Chopineau, J. (2012) ANT-VDAC1 interaction is direct and depends on ANT isoform conformation *in vitro*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **429**, 12-17, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.10.108>.

AGE-DEPENDENT CHANGES IN THE PRODUCTION OF MITOCHONDRIAL REACTIVE OXYGEN SPECIES IN HUMAN SKELETAL MUSCLE

M. Y. Vyssokikh^{1,2,3*}, M. A. Vigovskiy⁴, V. V. Philippov⁴, Y. R. Boroday⁴, M. V. Marey², O. A. Grigorieva⁴, T. F. Vepkhvadze³, N. S. Kurochkina³, L. A. Manukhova², A. Yu. Efimenko⁴, D. V. Popov³, and V. P. Skulachev¹

¹ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia; e-mail: mikhail.vyssokikh@gmail.com; mike@genebee.msu.ru

² National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology Named after Academician V. I. Kulakov, 117997 Moscow, Russia

³ Institute of Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences, 123007 Moscow, Russia

⁴ Medical Research and Educational Center of Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia

A decrease in muscle mass and its functionality (strength, performance and insulin sensitivity) is one of the integral signs of aging. One of the triggers of aging is an increase in the production of mitochondrial reactive oxygen species. In our study, for the first time, age-dependent changes in the production of mitochondrial reactive oxygen species associated with a decrease in the proportion of mitochondria-associated hexokinase-2 in human skeletal muscle were studied. For this purpose, a biopsy from *m. vastus lateralis* in 10 young healthy volunteers and 70 patients (26-85 years old) with long-term primary arthrosis of the knee/hip joint was taken. It turned out that aging (comparison of different groups of patients), in contrast to inactivity/chronic inflammation (comparison of young healthy people and young patients), causes a pronounced increase in peroxide production by isolated mitochondria. This correlated with an age-dependent disruption of the mechanism of mild depolarization of mitochondria, namely with the distribution of hexokinase between the mitochondrial and cytosolic fractions, a decrease in the rate of coupled respiration of isolated mitochondria and respiration stimulated by glucose (the substrate of hexokinase). It is discussed that these changes may be caused by an age-dependent decrease in the content of cardiolipin, a potential regulator of the mitochondrial microcompartment containing hexokinase. The results obtained contribute to a deeper understanding of age-related pathogenetic processes in skeletal muscles and open prospects for the search for pharmacological/physiological approaches to the correction of these pathologies.

Keywords: aging, skeletal muscle, mitochondria, mitochondrial reactive oxygen species, hexokinase

AgeMeta: КОЛИЧЕСТВЕННАЯ БАЗА ДАННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ПРОЦЕССЕ СТАРЕНИЯ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

© 2024 С.А. Тихонов^{1,2}, М.А. Батин³, В.Н. Гладышев⁴,
С.Е. Дмитриев^{1,2}, А.Э. Тышковский^{1,4*}

¹ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия

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

³ Open Longevity, бульвар Вентура, Шерман-Окс, Калифорния, 91403 США

⁴ Гарвардская медицинская школа,
Женская больница Бригема, медицинский факультет, кафедра генетики,
Бостон, Массачусетс, 02115 США; электронная почта: atyshkovskii@bwh.harvard.edu

Поступила в редакцию 12.10.2023

После доработки 12.12.2023

Принята к публикации 13.02.2024

База данных AgeMeta содержит системное и количественное описание старения млекопитающих на уровне экспрессии генов. В ней представлены возрастные транскриптомные изменения в различных тканях человека, мыши и крысы на основе комплексного мета-анализа 122 общедоступных наборов данных по экспрессии генов из 26 исследований. AgeMeta содержит интуитивно понятный визуальный интерфейс для количественной оценки транскриптомики старения как на уровне отдельных генов, так и на уровне их функциональных групп, и позволяет легко сравнивать различные ткани и виды животных. Кроме того, все данные из AgeMeta могут быть скачаны пользователем и проанализированы независимо. Данная работа способствует лучшему пониманию сложной сети биологических процессов, лежащих в основе старения млекопитающих. AgeMeta находится в свободном доступе по ссылке: <https://age-meta.com/>.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: старение, экспрессия генов, дифференциальная экспрессия, транскриптомика, млекопитающие, мета-анализ, AgeMeta, age-meta, база данных, GSEA.

DOI: 10.31857/S0320972524020099 EDN: XMHQEG

ПОСВЯЩЕНИЕ

Мы посвящаем эту работу светлой памяти Владимира Петровича Скулачёва – нашего уважаемого учителя, наставника, коллеги и выдающегося учёного. Академик Скулачёв известен в первую очередь своими прорывными работами в области клеточной биоэнергетики и функции митохондрий, однако в последние годы его неугасимый интерес к науке также распространялся на биологию старения, что привело к множеству выдающихся открытий. Наследие Владимира Петровича определяется не только его научными достижениями, но и тем неизгладимым впечатлением, которое он производил на своих коллег благодаря своей мудрости, доброте и замечательному характеру.

* Адресат для корреспонденции.

Его глубокое влияние простиралось далеко за пределы академических кругов, поскольку он активно занимался также организаторской и педагогической деятельностью. В наших сердцах он навсегда займёт особое место, память о нём будет служить источником вдохновения для нынешнего и будущих поколений.

ВВЕДЕНИЕ

Старение является основным фактором риска развития множества хронических заболеваний, что делает его значимой и глобальной медицинской проблемой [1]. Понимание молекулярных основ старения и межвидовых различий в этом процессе – важный этап на пути к разработке эффективных геропротекторов и преодолению

трудностей, которые старение приносит нашему обществу. В последние годы системный подход к изучению старения становится всё более популярным. Этому способствует, в частности, активное развитие методов высокопроизводительного секвенирования. Экспоненциальное накопление общедоступных омиксных данных приводит к необходимости их агрегации в специализированные базы данных, где они становятся более доступными для мета-анализа.

На сегодняшний день существует несколько баз данных, посвящённых геномике и транскриптомике старения, в том числе Aging Atlas [2], HAGR [3], Digital Ageing Atlas [4], AGEMAP [5] и Open Genes [6]. Некоторые из них предоставляют информацию не только о транскриптомике старения, но и о вмешательствах, увеличивающих продолжительность жизни, о фенотипе старения и эпигенетике. Однако при описании экспрессии генов эти базы, как правило, ограничиваются лишь списками соответствующих генов (например, дифференциально экспрессирующихся с возрастом). Насколько нам известно, на данный момент не существует баз данных, которые бы содержали количественную информацию, полученную на основе мета-анализа, об общих закономерностях изменения экспрессии генов с возрастом, включая видоспецифичные, тканеспецифичные и глобальные тенденции, и позволяли бы легко сравнивать и визуализировать эти данные для каждого гена на уровне отдельных наборов данных и отдельных образцов внутри каждого набора данных. Чтобы восполнить этот пробел, мы разработали базу данных AgeMeta, предоставляющую интерактивный пользовательский интерфейс для исследования возрастных биомаркеров генной экспрессии в конкретных тканях и видах млекопитающих, а также клеточных функций, обогащённых в транскриптомных паттернах старения. Наш ресурс представляет эту информацию как на уровне общих закономерностей, так и на уровне отдельных наборов данных. Для удобства использования мы разработали подробное руководство по каждому разделу базы данных и сделали её содержимое доступным для скачивания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Полный список наборов данных, использованных для построения транскриптомных сигнатур старения млекопитающих и интегрированных в AgeMeta, включал следующие идентификаторы исследований из баз данных GEO [7], ArrayExpress [8] и SRA [9]: GSE9103, GSE123981, GSE3150, GSE6591, GSE74463, GSE53960, GSE66715, GSE11291, GSE34378, GSE27625, GSE12480, GSE36192, GSE1572, GSE28422,

GSE25941, GSE53890, GSE38718, GSE674, GSE17612, GSE21935, GSE362, GSE132040, E-MTAB-3374, PRJNA281127, PRJNA516151. Помимо этих исследований, мы также использовали данные GTEx [10]. Наборы данных содержали образцы RNA-Seq и микрочипов, полученные из различных тканей *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* и *Homo sapiens*. Содержание тканей варьировалось у разных видов. 23 ткани, используемые для всех трёх видов, включали жировую ткань (в некоторых случаях обозначаемую отдельно как бурая, брыжеечная, голадная или подкожная жировые ткани), надпочечники, кровеносные сосуды, кость и костный мозг, головной мозг (в некоторых случаях обонятельные луковицы, мозжечок и лобная кора обозначались отдельно), пищевод, сердце, почки, печень, лёгкие, мышцы, нервы, поджелудочную железу, гипофиз, простату, слюнную железу, кожу, тонкий кишечник, селезёнку, семенник, щитовидную железу и цельную кровь (в некоторых случаях белые кровяные тельца обозначались отдельно). Аннотацию каждого набора данных, использованного в этом исследовании, включающую информацию о количестве образцов, возрастном диапазоне, линии, ткани и половой принадлежности, можно найти в дополнительных материалах (табл. S1 Приложения).

Процедура предварительной обработки данных для RNA-Seq и микрочипов подробно описана в работе Tyshkovskiy et al. [11]. Для обоих типов данных все идентификаторы генов стандартизировали в виде идентификаторов Entrez и, в случае образцов крыс и людей, переводили в идентификаторы мышинных ортологов, имеющих однозначное соответствие с исходными Entrez-идентификаторами. Эти два этапа предварительной обработки привели к тому, что некоторые гены были исключены из данных. Гены, которые не имели значений дифференциальной экспрессии более чем в 40% наборов данных, использованных для построения конкретной сигнатуры, также были отфильтрованы перед соответствующим мета-анализом. Таким образом, если определённый ген отсутствует в AgeMeta, это может быть вызвано его исключением на любом из вышеуказанных этапов обработки данных.

Логарифмы кратности изменения экспрессии генов (logFC), используемые для построения сигнатур старения, рассчитывали как коэффициент наклона в линейной модели, когда в выборке присутствовали образцы с более чем двумя уникальными возрастными, или как разность средних значений в противном случае, с использованием пакета limma для R [12]. Модель смешанных эффектов использовали для агрегирования изменений экспрессии из всех наборов данных в сигнатуры старения с помощью пакета metafor [13]. В качестве входных данных использовали logFC и соответствующие им

стандартные ошибки, а идентификатор исследования, ткань и вид вводили в модель как случайные эффекты. Анализ обогащения наборов генов проводили с использованием пакета fgsea [14] с 10 000 пермутаций для отдельных наборов данных и сигнатур старения. Для создания веб-сайта AgeMeta использовали пакет Shiny для R [15].

ОПИСАНИЕ БАЗЫ ДАННЫХ

Содержимое базы данных основано на семи транскриптомных сигнатурах старения, идентифицированных в нашем недавнем исследовании [11]. Транскриптомные сигнатуры представляют собой общие тенденции изменения экспрессии генов с возрастом, построенные путём мета-анализа 122 наборов данных из 26 исследований (таблица). Тканеспецифичные сигнатуры мозга, скелетных мышц и печени были получены из соответствующих наборов данных человека, мыши и крысы, а видоспецифичные сигнатуры обобщают данные по множеству различных тканей определённого вида. Глобальная сигнатура включает в себя все данные по трём видам и 23 тканям (см. раздел «Материалы и методы»).

База данных состоит из 5 основных модулей (рис. 1). Первый из них – это интерфейс для сравнения сигнатур, содержащий агрегированные количественные оценки возрастных изменений экспрессии (нормализованный logFC) в конкретной ткани и виде вместе с соответствующими показателями статистической значимости (*p*-value до и после поправки Бенджамини–Хохберга [16]) для каждого гена. Ресурс позволяет выбрать одну из сигнатур, а также сортировать и фильтровать гены в соответствии с их значимостью в выбранной сигнатуре. Кроме того, с помощью базы данных пользователь может сравнить значения дифференциальной экспрессии выбранных генов и их значимость между всеми 7 сигнатурами старения, используя правую часть интерактивной таблицы, где цветные стрелки рядом со значениями logFC иллюстрируют направление изменений экспрессии генов, а оттенки ячеек показывают статистическую значимость (рис. 2). Боковое меню

позволяет фильтровать гены по их присутствию и значимости во всех семи сигнатурах, а также на основании того, повышается или понижается их уровень экспрессии с возрастом в соответствии с каждой из сигнатур.

Если пользователь захочет проследить происхождение каждого значения logFC в интерактивной таблице, он может щёлкнуть по ячейке с соответствующим значением, что переведёт его на график модели смешанных эффектов, связанный с выбранным геном и сигнатурой (рис. 3, а). Модель смешанных эффектов использовалась для агрегирования данных дифференциальной экспрессии из отдельных наборов данных в сигнатуры (см. «Материалы и методы»). На графике каждая точка представляет один набор данных, то есть одну уникальную комбинацию вида, ткани, пола, линии и идентификатора исследования. Описание набора данных отображается при наведении курсора мыши на каждую точку. Красная линия показывает агрегированное среднее значение logFC для данного гена, представленное в таблице для сравнения сигнатур (это значение является результатом модели смешанных эффектов), а значение по оси ординат для каждой точки отображает logFC из соответствующего набора данных. Цвет и форму точек можно настроить для удобства различения видов, тканей, исследований, пола, платформ и типов моделей, используемых для получения значений дифференциальной экспрессии, что позволяет пользователю настроить график под свои потребности. Щелчок по точке на этом графике перенаправляет пользователя на график экспрессии для одного набора данных, который показывает, как экспрессия выбранного гена меняется с возрастом в выбранном наборе данных (рис. 3, б). Целью данного графика экспрессии является отображение необработанных данных, используемых для расчёта значения logFC и его стандартной ошибки для конкретного набора данных.

Последние два модуля базы данных в основном дублируют первые два, за исключением того, что вместо генов здесь представлены функциональные группы генов. Функциональное обогащение сигнатур и отдельных наборов данных проводили с помощью метода «Gene Set Enrichment Analysis» [17, 18],

Обзор семи транскриптомных сигнатур старения

Критерий	Человек	Мышь	Крыса	Мозг	Мышцы	Печень	Глобальная
Кол-во наборов данных	51	52	19	25	17	11	122
Кол-во генов	15 959	13 459	10 382	16 125	15 339	12 805	15 170
Кол-во генов, экспрессия которых значимо ассоциирована с возрастом (<i>p</i> adjusted < 0,05)	649	184	501	1526	379	1219	7

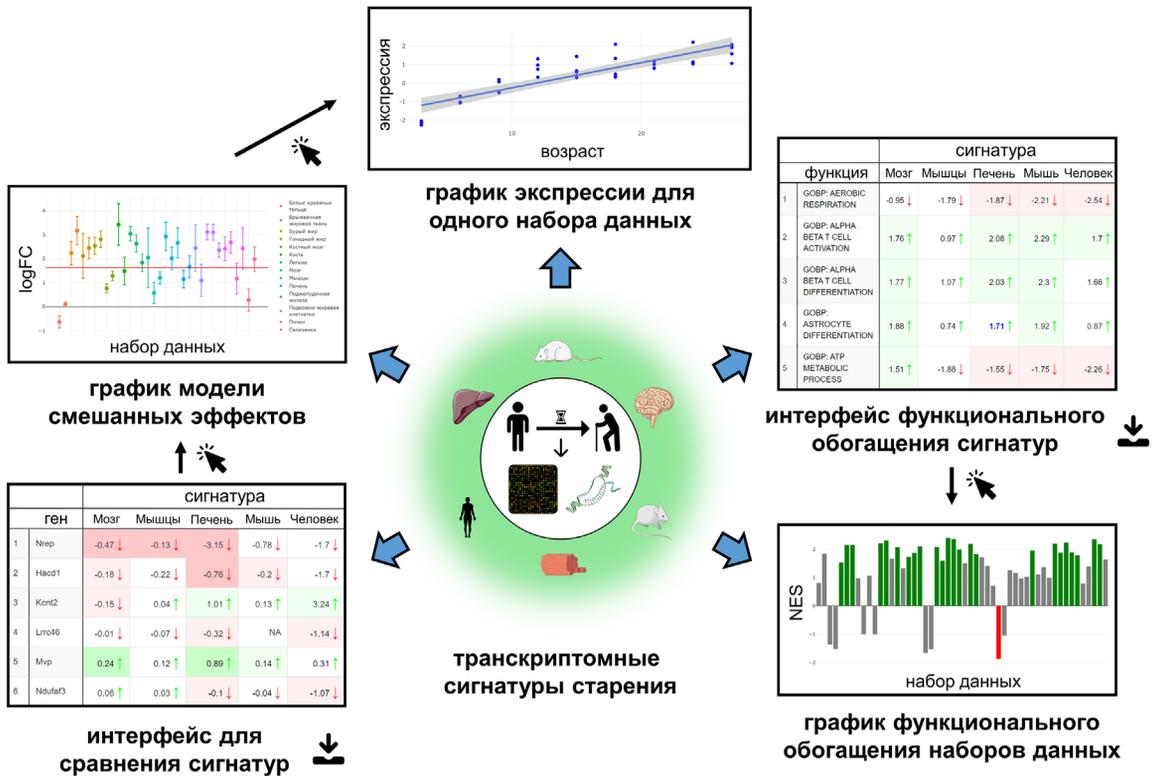


Рис. 1. Структура базы данных AgeMeta. AgeMeta представляет собой визуальный интерфейс, посвящённый 7 транскриптомным сигнатурам старения. Он содержит две интерактивные таблицы, отображающие количественные возрастные изменения в транскрипте для индивидуальных генов (интерфейс для сравнения сигнатур) и функциональных групп генов (интерфейс функционального обогащения сигнатур), а также позволяет сравнивать между собой сигнатуры. AgeMeta также содержит три типа графиков, на которых представлены: дифференциальная экспрессия гена в сигнатуре на уровне различных наборов данных (график модели смешанных эффектов), изменение экспрессии гена с возрастом в отдельном наборе данных (график экспрессии для одного набора данных) и показатели обогащения функциональных групп генов в отдельных наборах данных, связанных с определённой сигнатурой (график функционального обогащения наборов данных). Щелчок по ячейкам таблиц переводит пользователя к соответствующим графикам, а щелчок по точкам на графике модели смешанных эффектов переводит пользователя к графику экспрессии, связанному с выбранным набором данных. Обе таблицы доступны для скачивания в отдельном разделе базы данных



Рис. 2. Интерфейс для сравнения сигнатур. Цвета стрелок отображают направление изменений экспрессии генов в каждой сигнатуре (названия сигнатур указаны в заголовках столбцов), а цвета ячеек передают статистическую значимость этих изменений. Если значение p-value после поправки на множественное тестирование оказывается ниже мягкого порога, ячейка окрашивается тусклым оттенком, а если ниже жёсткого порога – более ярким оттенком. Оба порога могут быть настроены в меню в левой части страницы. Все ячейки в правой части таблицы со значениями logFC доступны для нажатия. Нажатие на них перенаправляет пользователя на соответствующий график модели смешанных эффектов

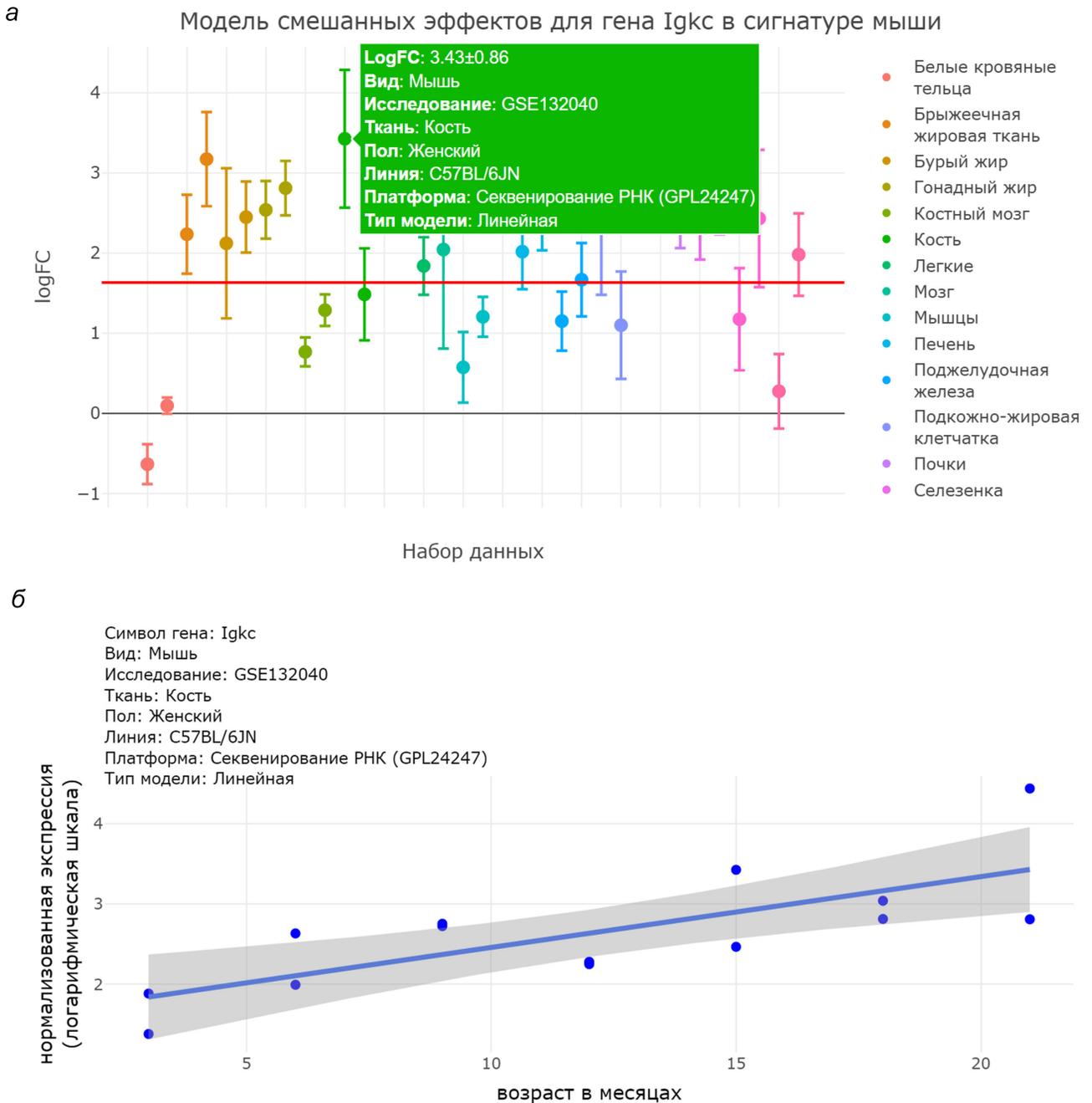


Рис. 3. Примеры графиков модели смешанных эффектов и экспрессии. *а* – Пример графика модели смешанных эффектов. Каждая точка представляет собой один набор данных. Форма и цвет точек обозначают вид и ткань соответственно. Данные отображают средний нормализованный наклон/ $\log_{2}FC \pm SE$. При наведении курсора мыши на точку в текстовом поле появляется подробная информация о соответствующем наборе данных. *б* – Пример графика экспрессии для одного набора данных, соответствующего точке, выбранной на графике модели смешанных эффектов. Наклон линии регрессии соответствует значению $\log_{2}FC$ для гена в выбранном наборе данных (координата по оси ординат выбранной точки), а ширина затенённой области вокруг линии отражает стандартную ошибку наклона прямой

в результате чего были рассчитаны количественные нормализованные показатели обогащения (NES) и *p*-value после поправки Бенджамини–Хохберга. В модуле интерфейса функционального обогащения сигнатур пользователь может сравнить показатели обогащения и соответствующие статистические значимости для всех семи сигнатур.

Функциональные группы генов можно фильтровать по их присутствию, статистической значимости, направлению изменения экспрессии в соответствии с сигнатурами, а также на основе базы данных, к которой относятся эти группы. Используемые базы включали в себя GO Biological Process [19, 20], KEGG [21–23], Reactome [24] и Biocarta [25].

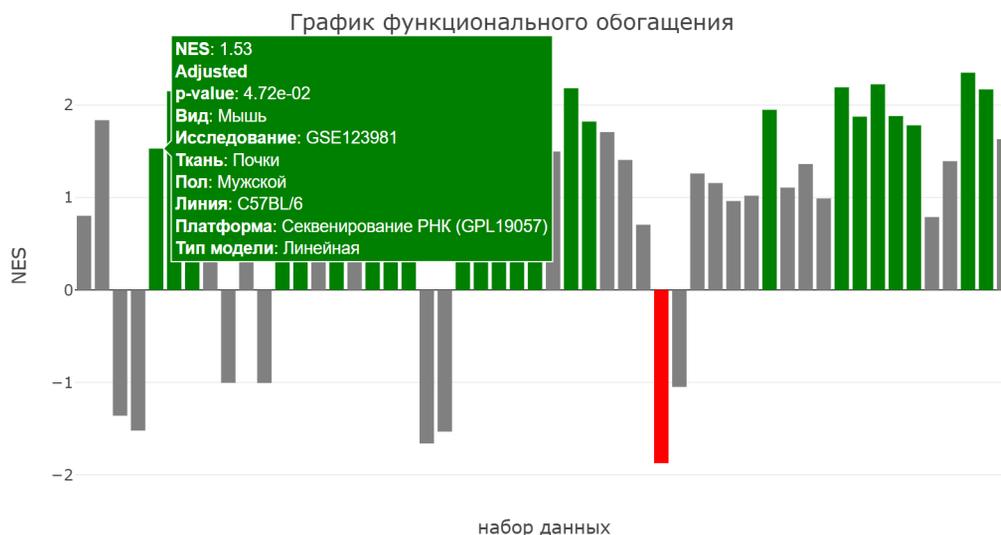


Рис. 4. Пример графика функционального обогащения наборов данных. График отображает функцию «GOBP: обработка и презентация антигенов» в сигнатуре мыши. Столбцы окрашены в зависимости от статистической значимости: зелёный и красный цвета указывают на статистически значимое повышение и понижение экспрессии функциональной группы генов с возрастом соответственно, а серые столбцы обозначают незначимое обогащение. Подробное описание каждого набора данных отображается в текстовом поле при наведении курсора мыши на соответствующий столбец графика

Поскольку многие функциональные группы генов вложены друг в друга, для упрощения навигации мы добавили функцию, позволяющую одновременно отобразить в таблице все родительские и дочерние наборы генов для выбранного функционального термина, т.е. группы, которые содержат выбранный набор генов или являются подмножествами этого набора соответственно. При нажатии на название функционального термина таблица автоматически фильтруется, в результате чего остаётся только выбранный термин, а также его родительские и дочерние термины. Кнопка «Вернуться к полной таблице» восстанавливает таблицу в исходное состояние со всеми функциональными группами из базы данных.

Щелчок по ячейке таблицы направляет пользователя к графику функционального обогащения наборов данных, на котором отображаются оценки обогащения и статистическая значимость для всех отдельных наборов данных, соответствующих выбранным функциональному термину и сигнатуре (рис. 4). Хотя агрегированные показатели функционального обогащения сигнатур не были получены из оценок отдельных наборов данных, этот график даёт общее представление о согласованности возрастного повышения или понижения экспрессии генов, связанных с выбранным путём, в разных наборах данных и помогает обосновывать значения в интерактивной таблице. Каждый столбец на графике представляет один набор данных, описание которого отображается при наведении курсора мыши. Зелёные и красные столбцы обозначают статистически значимое

повышение или понижение экспрессии генов с возрастом соответственно, а серые столбцы отражают показатели обогащения, не достигшие порога статистической значимости, установленного в боковом меню (по умолчанию порог на p -value после поправки на множественное тестирование равен 0,1).

Для удобства пользователей мы разработали раздел «Руководство», где подробно описан каждый модуль базы данных с примерами таблиц и графиков. Кроме того, ресурс доступен на двух языках: английском и русском. Чтобы упростить независимый анализ представленной в базе информации, мы добавили функцию скачивания данных дифференциальной экспрессии и данных функционального обогащения. Доступ к ним можно получить через раздел «Скачать данные».

ОБСУЖДЕНИЕ

В базе данных AgeMeta представлена информация об изменении экспрессии нескольких тысяч генов, связанных со старением. С помощью инструментов, встроенных в AgeMeta, можно легко визуализировать паттерны дифференциальной экспрессии, а также их межвидовые или межтканевые различия для любого из этих генов или для их функциональных групп. Интерактивные таблицы и графики позволяют анализировать информацию на уровне транскриптомных сигнатур и отдельных наборов данных. Успешное применение подобных сигнатур в недавних работах

для предсказания и описания новых интервенций, направленных на увеличение продолжительности жизни и омоложение [11, 26], свидетельствует о том, что сигнатуры старения, включённые в AgeMeta, могут способствовать открытию и разработке новых потенциальных геропротекторов.

На сегодняшний день существует несколько баз данных по геномике и транскриптомике старения, поэтому стоит выделить наиболее важные различия между базой AgeMeta и наиболее схожими с ней ресурсами. GenAge, являющаяся частью собрания баз данных, известного как «Human Ageing Genomic Resources» или HAGR [3], фокусируется на описании воздействия геномных интервенций (например, нокаутов генов) на продолжительность жизни таких модельных организмов, как *Mus musculus*. Однако связь этих эффектов с возрастными транскриптомными изменениями нетривиальна: геномные интервенции, приводящие к увеличению продолжительности жизни, не всегда оказывают влияние, противоположное изменениям экспрессии генов при старении. Отчасти это можно объяснить тем, что некоторые возрастные изменения экспрессии генов являются вредными для организма, а другие – адаптивными, оказывающими положительное влияние на здоровье стареющих животных [11]. Примером такого эффекта является экспрессия гена *Pparg*, которая значительно повышается с возрастом в тканях мышей, в то время как нокаут этого гена приводит к существенному снижению продолжительности их жизни [27].

Существуют и другие базы данных, посвящённые транскриптомике старения, такие как Aging Atlas [2] и AGEMAP [5]. Обе они содержат информацию о дифференциальной экспрессии генов из отдельных исследований (AGEMAP включает только одно исследование). Однако ни одна из них не предоставляет значений дифференциальной экспрессии, полученных на основе мета-анализа, агрегированных по нескольким исследованиям с различными тканями и видами животных, что является ключевой особенностью AgeMeta. Aging Atlas содержит также мультиомиксные данные, такие как белок-белковые взаимодействия, данные ChIP-Seq и транскриптомики одиночных клеток, описание которых выходит за рамки нашего исследования. Другая база данных, Open Genes [6], содержит описания генов с различными типами

ассоциаций со старением, включая нокауты, влияющие на продолжительность жизни, и возрастную дифференциальную экспрессию. Однако эта база данных также не содержит результатов количественного мета-анализа.

Следует отметить несколько ограничений нашей работы. Во-первых, сигнатуры старения, используемые в AgeMeta, были основаны на линейных моделях дифференциальной экспрессии. Это может означать, что некоторые важные нелинейные возрастные изменения экспрессии генов могли оказаться не идентифицированы как статистически значимые в данной работе. Во-вторых, наше исследование ограничивалось анализом изменений экспрессии индивидуальных генов, хотя в других работах была отмечена дифференциальная ко-экспрессия, наблюдаемая с возрастом у различных видов млекопитающих [28–30]. Интеграция мета-анализа нелинейной дифференциальной экспрессии и паттернов ко-экспрессии генов в нашу базу данных может в будущем дополнительно увеличить её полноту и применимость, а также способствовать более глубокому пониманию научным сообществом молекулярных механизмов старения млекопитающих.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistry.moscow.com>).

Вклад авторов. А.Э.Т., С.Е.Д. и М.А.Б. разработали план исследования; С.А.Т. и А.Э.Т. проектировали базу данных; С.А.Т. выполнил анализ данных и написал код для базы данных; С.А.Т., М.А.Б., В.Н.Г., С.Е.Д. и А.Э.Т. интерпретировали данные; А.Э.Т. руководил исследованием; С.А.Т. и А.Э.Т. написали рукопись при участии всех остальных авторов. Все авторы прочли и одобрили окончательную версию рукописи.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 23-14-00218, С.Е.Д. – обработка данных и создание транскриптомных сигнатур) и Open Longevity (С.А.Т. и А.Э.Т. – разработка базы данных).

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Harman, D. (1991) The aging process: Major risk factor for disease and death, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 5360-5363, <https://doi.org/10.1073/pnas.88.12.5360>.
2. Consortium, A. A. (2021) Aging Atlas: a multi-omics database for aging biology, *Nucleic Acids Res.*, **49**, 825-830, <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa894>.

3. Tacutu, R., Thornton, D., Johnson, E., Budovsky, A., Barardo, D., Craig, T., Diana, E., Lehmann, G., Toren, D., Wang, J., De Magalh, P., and Fraiefeld, E. (2018) Human Ageing Genomic Resources: new and updated databases, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 1083-1090, <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1042>.
4. Craig, T., Smelick, C., Tacutu, R., Wuttke, D., Wood, S. H., Stanley, H., Janssens, G., Savitskaya, E., Moskalev, A., De Magalh, P., and Arking, R. (2015) The Digital Ageing Atlas: integrating the diversity of age-related changes into a unified resource, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 873-878, <https://doi.org/10.1093/nar/gku843>.
5. Zahn, J. M., Poosala, S., Owen, A. B., Ingram, D. K., Lustig, A., Carter, A., Weeraratna, A. T., Taub, D. D., Gorospe, M., Mazan-Mamczarz, K., Lakatta, E. G., Boheler, K. R., Xu, X., Mattson, M. P., Falco, G., Ko, M. S. H., Schlessinger, D., Firman, J., Kummerfeld, S. K., Wood, H. W., 3rd, Zonderman, A. B., Kim, S. K., and Becker, K. G. (2007) AGEMAP: a gene expression database for aging in mice, *PLoS Genet.*, **3**, e201, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030201>.
6. Rafikova, E., Nemirovich-Danchenko, N., Ogmen, A., Parfenenkova, A., Velikanova, A., Tikhonov, S., Peshkin, L., Rafikov, K., Spiridonova, O., Belova, Y., Glinin, T., Egorova, A., and Batin, M. (2023) Open Genes – a new comprehensive database of human genes associated with aging and longevity, *Nucleic Acids Res.*, **52**, D950-D962, <https://doi.org/10.1093/nar/gkad712>.
7. Edgar, R., Domrachev, M., and Lash, A. E. (2002) Gene expression omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository, *Nucleic Acids Res.*, **30**, 207-210, <https://doi.org/10.1093/nar/30.1.207>.
8. Parkinson, H., Kapushesky, M., Shojatalab, M., Abeygunawardena, N., Coulson, R., Farne, A., Holloway, E., Kolesnykov, N., Lilja, P., Lukk, M., Mani, R., Rayner, T., Sharma, A., William, E., Sarkans, U., and Brazma, A. (2007) Array-Express – a public database of microarray experiments and gene expression profiles, *Nucleic Acids Res.*, **35**, 747-50, <https://doi.org/10.1093/nar/gkl995>.
9. Leinonen, R., Sugawara, H., and Shumway, M. (2011) The sequence read archive, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 2010-2012, <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1019>.
10. Lonsdale, J., Thomas, J., Salvatore, M., Phillips, R., Lo, E., Shad, S., Hasz, R., Walters, G., Garcia, F., Young, N., Foster, B., Moser, M., Karasik, E., Gillard, B., Ramsey, K., Sullivan, S., Bridge, J., Magazine, H., Syron, J., Fleming, J., Siminoff, L., Traino, H., Mosavel, M., Barker, L., Jewell, S., Rohrer, D., Maxim, D., Filkins, D., Harbach, P., Cortadillo, E., Berghuis, B., Turner, L., Hudson, E., Feenstra, K., Sobin, L., Robb, J., Branton, P., Korzeniewski, G., Shive, C., Tabor, D., Qi, L., Groch, K., Nampally, S., Buia, S., Zimmerman, A., Smith, A., Burges, R., Robinson, K., Valentino, K., Bradbury, D., Cosentino, M., Diaz-Mayoral, N., Kennedy, M., Engel, T., Williams, P., Erickson, K., Ardlie, K., Winckler, W., Getz, G., DeLuca, D., MacArthur, D., Kellis, M., Thomson, A., Young, T., Gelfand, E., Donovan, M., Meng, Y., Grant, G., Mash, D., Marcus, Y., Basile, M., Liu, J., Zhu, J., Tu, Z., Cox, N. J., Nicolae, D. L., Gamazon, E. R., Im, H. K., Konkashbaev, A., Pritchard, J., Stevens, M., Flutre, T., Wen, X., Dermitzakis, E. T., Lappalainen, T., Guigo, R., Monlong, J., Sammeth, M., Koller, D., Battle, A., Mostafavi, S., McCarthy, M., Rivas, M., Maller, J., Rusyn, I., Nobel, A., Wright, F., Shabalina, A., Feolo, M., Sharopova, N., Sturcke, A., Paschal, J., Anderson, J. M., Wilder, E. L., Derr, L. K., Green, E. D., Struewing, J. P., Temple, G., Volpi, S., Boyer, J. T., Thomson, E. J., Guyer, M. S., Ng, C., Abdallah, A., Colantuoni, D., Insel, T. R., Koester, S. E., Little, A. R., Bender, P. K., Lehner, T., Yao, Y., Compton, C. C., Vaught, J. B., Sawyer, S., Lockhart, N. C., Demchok, J., and Moore, H. F. (2013) The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project, *Nat. Genet.*, **45**, 580-585, <https://doi.org/10.1038/ng.2653>.
11. Tyshkovskiy, A., Ma, S., Shindyapina, A. V., Tikhonov, S., Lee, S. G., Bozaykut, P., Castro, J. P., Seluanov, A., Schork, N. J., Gorbunova, V., Dmitriev, S. E., Miller, R. A., and Gladyshev, V. N. (2023) Distinct longevity mechanisms across and within species and their association with aging, *Cell*, **186**, 2929-2949.e20, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.05.002>.
12. Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., and Smyth, G. K. (2015) Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies, *Nucleic Acids Res.*, **43**, e47, <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>.
13. Viechtbauer, W. (2010) Conducting meta-analyses in R with the metafor, *J. Stat. Softw.*, **36**, 1-48, <https://doi.org/10.18637/jss.v036.i03>.
14. Korotkevich, G., Sukhov, V., and Sergushichev, A. (2021) Fast gene set enrichment analysis, *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/060012>.
15. Chang, W., Cheng, J., Allaire, J., Sievert, C., Schloerke, B., Xie, Y., Allen, J., McPherson, J., Dipert, A., and Borges, B. (2022) Shiny: Web Application Framework for R.
16. Benjamini, Y., Hochberg, Y. (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing, *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, **57**, 289-300, <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>.
17. Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., and Mesirov, J. P. (2005) Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 15545-15550, <https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>.
18. Mootha, V. K., Lindgren, C. M., Eriksson, K. F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., Puigserver, P., Carlsson, E., Ridderstråle, M., Laurila, E., Houstis, N., Daly, M. J., Patterson, N., Mesirov, J. P., Golub, T. R., Tamayo, P., Spiegel-

- man, B., Lander, E. S., Hirschhorn, J. N., Altshuler, D., and Groop, L. C. (2003) PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes, *Nat. Genet.*, **34**, 267-273, <https://doi.org/10.1038/ng1180>.
19. Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., Harris, M. A., Hill, D. P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G. M., and Sherlock, G. (2000) Gene Ontology: tool for the unification of biology, *Nat. Genet.*, **25**, 25-29, <https://doi.org/10.1038/75556>.
 20. Carbon, S., Douglass, E., Good, B. M., Unni, D. R., Harris, N. L., Mungall, C. J., Basu, S., Chisholm, R. L., Dodson, R. J., Hartline, E., Fey, P., Thomas, P. D., Albou, L. P., Ebert, D., Kesling, M. J., Mi, H., Muruganujan, A., Huang, X., Mushayahama, T., LaBonte, S. A., Siegele, D. A., Antonazzo, G., Attrill, H., Brown, N. H., Garapati, P., Marygold, S. J., Trovisco, V., dos Santos, G., Falls, K., Tabone, C., Zhou, P., Goodman, J. L., Strelets, V. B., Thurmond, J., Garmiri, P., Ishtiaq, R., Rodríguez-López, M., Acencio, M. L., Kuiper, M., Lægreid, A., Logie, C., Lovering, R. C., Kramarz, B., Sav-erimuttu, S. C. C., Pinheiro, S. M., Gunn, H., Su, R., Thurlow, K. E., Chibucos, M., Giglio, M., Nadendla, S., Munro, J., Jackson, R., Duesbury, M. J., Del-Toro, N., Meldal, B. H. M., Paneerselvam, K., Perfetto, L., Porras, P., Orchard, S., Shrivastava, A., Chang, H. Y., Finn, R. D., Mitchell, A. L., Rawlings, N. D., Richardson, L., Sangrador-Vegas, A., Blake, J. A., Christie, K. R., Dolan, M. E., Drabkin, H. J., Hill, D. P., Ni, L., Sitnikov, D. M., Harris, M. A., Oliver, S. G., Rutherford, K., Wood, V., Hayles, J., Bähler, J., Bolton, E. R., de Pons, J. L., Dwinell, M. R., Hayman, G. T., Kaldunski, M. L., Kwitek, A. E., Laulederkind, S. J. F., Plasterer, C., Tutaj, M. A., VEDI, M., Wang, S. J., D'Eustachio, P., Matthews, L., Balhoff, J. P., Aleksander, S. A., Alexander, M. J., Cherry, J. M., Engel, S. R., Gondwe, F., Karra, K., Miyasato, S. R., Nash, R. S., Simison, M., Skrzypek, M. S., Weng, S., Wong, E. D., Feuermann, M., Gaudet, P., Morgat, A., Bakker, E., Berardini, T. Z., Reiser, L., Subramaniam, S., Huala, E., Arighi, C. N., Auchincloss, A., Axelsen, K., Argoud-Puy, G., Bateman, A., Blatter, M. C., Boutet, E., Bowler, E., Breuza, L., Bridge, A., Britto, R., Bye-A-Jee, H., Casas, C. C., Coudert, E., Denny, P., Es-Treicher, A., Famiglietti, M. L., Georghiou, G., Gos, A. N., Gruaz-Gumowski, N., Hatton-Ellis, E., Hulo, C., Ignatchenko, A., Jungo, F., Laiho, K., Le Mercier, P., Lieberherr, D., Lock, A., Lussi, Y., MacDougall, A., Ma-Grane, M., Martin, M. J., Masson, P., Natale, D. A., Hyka-Nouspikel, N., Orchard, S., Pedruzzi, I., Pourcel, L., Poux, S., Pundir, S., Rivoire, C., Speretta, E., Sundaram, S., Tyagi, N., Warner, K., Zaru, R., Wu, C. H., Diehl, A. D., Chan, J. N., Grove, C., Lee, R. Y. N., Muller, H. M., Raciti, D., van Auken, K., Sternberg, P. W., Berriman, M., Paulini, M., Howe, K., Gao, S., Wright, A., Stein, L., Howe, D. G., Toro, S., Westerfield, M., Jaiswal, P., Cooper, L., and Elser, J. (2021) The gene ontology resource: enriching a Gold mine, *Nucleic Acids Res.*, **49**, D325-334, <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1113>.
 21. Kanehisa, M. (2000) KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes, *Nucleic Acids Res.*, **28**, 27-30, <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>.
 22. Kanehisa, M. (2019) Toward understanding the origin and evolution of cellular organisms, *Protein Sci.*, **28**, 1947-1951, <https://doi.org/10.1002/pro.3715>.
 23. Kanehisa, M., Furumichi, M., Sato, Y., Ishiguro-Watanabe, M., and Tanabe, M. (2021) KEGG: Integrating viruses and cellular organisms, *Nucleic Acids Res.*, **49**, D545-551, <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa970>.
 24. Jassal, B., Matthews, L., Viteri, G., Gong, C., Lorente, P., Fabregat, A., Sidiropoulos, K., Cook, J., Gillespie, M., Haw, R., Loney, F., May, B., Milacic, M., Rothfels, K., Sevilla, C., Shamovsky, V., Shorser, S., Varusai, T., Weiser, J., Wu, G., Stein, L., Hermjakob, H., and D'Eustachio, P. (2020) The reactome pathway knowledgebase, *Nucleic Acids Res.*, **48**, D498-D503, <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1031>.
 25. Rouillard, A. D., Gundersen, G. W., Fernandez, N. F., Wang, Z., Monteiro, C. D., McDermott, M. G., and Ma'ayan, A. (2016) The harmonizome: a collection of processed datasets gathered to serve and mine knowledge about genes and proteins, *Database (Oxford)*, **2016**, 1-16, <https://doi.org/10.1093/database/baw100>.
 26. Zhang, B., Lee, D. E., Trapp, A., Tyshkovskiy, A., Lu, A. T., Bareja, A., Kerepesi, C., McKay, L. K., Shindyapina, A. V., Dmitriev, S. E., Baht, G. S., Horvath, S., Gladyshev, V. N., and White, J. P. (2023) Multi-omic rejuvenation and lifespan extension on exposure to youthful circulation, *Nat. Aging*, **3**, 948-964, <https://doi.org/10.1038/s43587-023-00451-9>.
 27. Argmann, C., Dobrin, R., Heikkinen, S., Auburtin, A., Pouilly, L., Cock, T. A., Koutnikova, H., Zhu, J., Schadt, E. E., and Auwerx, J. (2009) Ppar γ 2 is a key driver of longevity in the mouse, *PLoS Genet.*, **5**, e1000752, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000752>.
 28. Bernard, G., Teulière, J., Lopez, P., Corel, E., Lapointe, F. J., and Baptiste, E. (2022) Aging at evolutionary crossroads: longitudinal gene co-expression network analyses of proximal and ultimate causes of aging in bats, *Mol. Biol. Evol.*, **39**, msab302, <https://doi.org/10.1093/molbev/msab302>.
 29. Southworth, L. K., Owen, A. B., and Kim, S. K. (2009) Aging mice show a decreasing correlation of gene expression within genetic modules, *PLoS Genet.*, **5**, e1000776, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000776>.
 30. Hu, Y., Xu, Y., Mao, L., Lei, W., Xiang, J., Gao, L., Jiang, J., Huang, L., Luo, O. J., Duan, J., and Chen, G. (2021) Gene expression analysis reveals age and ethnicity signatures between young and old adults in human PBMC, *Front. Aging*, **2**, 1-16, <https://doi.org/10.3389/fragi.2021.797040>.

AgeMeta: QUANTITATIVE GENE EXPRESSION DATABASE OF MAMMALIAN AGING

S. Tikhonov^{1,2}, M. Batin³, V. N. Gladyshev⁴, S. E. Dmitriev^{1,2}, and A. Tyshkovskiy^{1,4*}

¹*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia*

²*Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia*

³*Open Longevity, 15260 Ventura Blvd, STE 2230, Sherman Oaks, CA 91403, USA*

⁴*Division of Genetics, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA; e-mail: atyshkovskii@bwh.harvard.edu*

AgeMeta is a database that provides systemic and quantitative description of mammalian aging at the level of gene expression. It encompasses transcriptomic changes with age across various tissues of humans, mice, and rats, based on a comprehensive meta-analysis of 122 publicly available gene expression datasets from 26 studies. AgeMeta provides an intuitive visual interface for quantification of aging-associated transcriptomics at the level of individual genes and functional groups of genes, allowing easy comparison among various species and tissues. Additionally, all the data in the database can be downloaded and analyzed independently. Overall, this work contributes to the understanding of the complex network of biological processes underlying mammalian aging and supports future advancements in this field. AgeMeta is freely available at: <https://age-meta.com/>.

Keywords: aging, ageing, gene expression, differential expression, transcriptomics, mammalian, meta-analysis, AgeMeta, age-meta, database, GSEA

ПРИЧИНЫ ДОЛГОЛЕТИЯ Tetrapoda: ЗАЩИЩЕННОСТЬ ВАЖНЕЕ УРОВНЯ МЕТАБОЛИЗМА

© 2024 Г.А. Шиловский^{1,2,3*}, Т.С. Путяткина², А.В. Марков²

¹ НИИ физико-химической биологии имени 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 имени А.А. Харкевича РАН, 127051 Москва, Россия

Поступила в редакцию 26.11.2023

После доработки 04.12.2023

Принята к публикации 29.12.2023

Различные экологические морфологические и поведенческие факторы могут быть определяющими в долголетию представителей различных таксонов. У долгоживущих видов развиваются системы, направленные на повышение устойчивости и защищенности организма, и в конечном счете увеличивающие продолжительность жизни. Кроме того, долгоживущие виды характеризуются различным уровнем проявления благоприятных для долголетия факторов (геронтологическим успехом): размер тела, уровень метаболизма, уровень активности репарационных систем организма и систем антиоксидантной защиты, устойчивость к токсическим веществам и опухолеобразованию, наличие неотенических признаков. В продолжение работы о млекопитающих, в настоящей работе мы провели сравнительный анализ признаков, отличающих долгоживущих эктотерм (крокодилов и черепах), в сравнении их как с таковыми у других представителей эктотерм (чешуйчатых и амфибий), так и эндотерм (птиц и млекопитающих). В статье рассматриваются также математические показатели, применяемые для оценки предрасположенности к долголетию у разных видов. Эти показатели включают в себя как стандартные (уровень смертности, максимальная продолжительность жизни (ПЖ), коэффициент вариации ПЖ), так и производные от них. Эволюционные закономерности старения дополнительно объясняются защитными фенотипами и стратегиями жизненного цикла. В работе оценивали сопряженность ПЖ и различных изучаемых факторов, включая размеры и температуру тела, энцефализацию, защищенность занимаемых экониш, наличие защитных структур (например, панциря и остеодерм), температуры среды обитания и др., а также влияние их на распределение ПЖ как статистической величины. Не подтвердилась гипотеза об уровне метаболизма и температуре, как наиболее определяющих факторах долголетия. Выяснилось, что животные, защищенные панцирем (черепахи с их исключительным долголетием), живут дольше видов, обладающих ядом или лишенных защитных приспособлений. Совершенствование способов защиты от внешних угроз у долгоживущих эктотермных животных согласуется с особенностями долгоживущих эндотерм (например, голых землекопов, обитающих в ходах под землей, или рукокрылых и птиц, способность которых к полету также представляет собой один из наилучших способов защиты).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эволюция, долголетие, старение, продолжительность жизни, рептилии, амфибии, феноптоз, программы антистарения, окислительный стресс, героуспех.

DOI: 10.31857/S0320972524020105 EDN: ХМНІКМ

ВВЕДЕНИЕ

Старение проявляется как биологически (изнашивание организма и ухудшение двигательных, физиологических и когнитивных характеристик), так и демографически (математически), как уве-

личение смертности с возрастом [1–3]. Закономерности старения описывают такие эволюционные теории, как ослабление отбора с возрастом [4] и антагонистическая плейотропия [5]. Теория одно-разовой сомы [6] дополняет эти концепции и предполагает, что вредные мутации, влияющие на соматическую ткань, могут накапливаться, если отбор менее чувствителен к ним, чем к мутациям,

* Адресат для корреспонденции.

вредящим зародышевой линии. Вероятность смерти организма, однако, не всегда определяется только степенью нарастающего с возрастом износа, который включает накопление повреждений и ошибок [7], а иногда проходит крайне быстро: после размножения (в первую очередь у семельпарных животных) или для предотвращения распространения инфекции в популяции. На это указал академик В.П. Скулачев, предложив концепцию острого и хронического фенотоза [8]. Видовая продолжительность жизни (ПЖ) и выраженность процессов старения весьма разнообразны. В ходе эволюции в большинстве групп животных происходит усложнение организации, появление новых типов клеток и тканей, поведенческих реакций. На практике это будет означать, что с каждым витком эволюции по пути усложнения будут появляться новые виды дегенеративных расстройств и поломок, определяющих как максимальную ПЖ, так и структуру смертности в целом. С усложнением (и увеличением размеров) организмов увеличивается количество составляющих их клеток.

Признаки, способствующие долголетию у Metazoa (героуспех). В царстве многоклеточных животных (Metazoa), несмотря на явное отсутствие единого тренда ПЖ в целом, можно говорить о наличии локальных тенденций. Первая в том, что для целого ряда примитивных Metazoa характерно такое явление, как нестарение, или старение пренебрежимо медленное (*negligible senescence*) [9]. Jones et al. [10] определяют как нестареющий вид коралл *Paramuricea clavata* (вероятность смерти практически не растет с возрастом, а ПЖ составляет сотни лет) [10, 11]. Медуза *Turritopsis dohrnii* достигает потенциального бессмертия за счет способности перехода от стадии медузы обратно к полипу, закольцовывая свой жизненный цикл. *Hydra magnipapillata* считается потенциально практически бессмертной из-за близкой к нулю (и не растущей с возрастом) смертности в лаборатории [12], хотя в природе, согласно Comfort [1], она живет не более трех лет. В то же время ПЖ₉₅ (время, за которое при данном уровне смертности умрет 95% особей) для *H. magnipapillata* в лабораторных условиях составляет ни много ни мало 1400 лет [10]. Все вышперечисленные долгоживущие виды обитают в водной среде, однако с выходом на сушу перечень признаков, способствующих долголетию, становится гораздо более разнообразным [13–15]. Чем примитивнее вид, тем легче ему сохранить признаки долголетия от предшествующих ему на эволюционном древе таксонов. Были высказаны предположения, что бесполое размножение [16],

модульность, отсутствие отделения зародышевой линии от сомы [14, 16], отсутствие давления хищников и защищенность убежищ [17], способность к регенерации, а также малочисленность разных типов клеток [12] способствуют замедлению старения [10]. В то же время различие в размерах клеток одного типа у разных видов гораздо меньше, чем различие в размерах самих организмов. Это означает, что количество клеток больше у крупных животных и, поскольку теоретически опухоль может развиться даже из одной трансформировавшейся клетки, то важным аспектом предрасположенности к долгой жизни у крупных животных является устойчивость к онкогенезу (парадокс Пето) [18, 19]. Сохранение способности к росту и регенерации, а также медленный метаболизм и низкая температура тела, которые способствуют более медленному производству в организме окислительных радикалов, считаются одними из основных механизмов старения у животных. Эти признаки характерны для животных, являющихся абсолютными чемпионами по ПЖ среди Metazoa: небольшой двустворчатый моллюск *Arctica islandica* (507 лет), крупная очень медленная гренландская акула *Somniosus microcephalus* (392 года).

Ранее нами была опубликована статья об эволюции долголетия у млекопитающих [15]. Целью данной работы является рассмотрение механизмов формирования ПЖ как видового признака и эволюции долголетия у холоднокровных (эктотермных) Tetrapoda, а также геронтологического успеха как особого типа биологического успеха. В настоящей работе мы более подробно рассматриваем рептилий и амфибий, сравнивая их в конечном счете с млекопитающими. Мы анализируем **признаки, способствующие долголетию (героуспех), и сравниваем эффективность использования признаков, способствующих долголетию (эффективность героуспеха)** в различных кладах амфибий и особенно рептилий, которые включают в себя большое количество долгоживущих видов, в первую очередь среди черепах. В статье также рассматриваются математические показатели, применяемые для оценки предрасположенности к долголетию у разных видов. Эти показатели включают в себя как стандартные уровень смертности и базальный уровень смертности, так и их разброс (коэффициент вариации (КВ)), а также производные от них показатели. Текущая статья посвящена рассмотрению видов из эктотермных таксонов (с низким уровнем метаболизма, но сильно варьирующих в размерах). Разбираются, в частности, способы обеспечения безопасности вида и особенности занимаемых экониш. Все используемые в работе величины видовой ПЖ позвоночных взяты из крупнейшей базы данных Anage [20] (если не указано иное). Для построения

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; КВ – коэффициент вариации; ПЖ – продолжительность жизни.

дерева распределения ПЖ использовали классификацию позвоночных из базы данных Ensembl [21] и данные по ПЖ из базы AnAge. ПЖ, как длительность существования особи, в нашей работе характеризует максимальный возраст, известный для обсуждаемого вида.

ПРИЗНАКИ ГЕРОУСПЕХА И ДОЛГОЛЕТИЕ В РАЗЛИЧНЫХ ТАКСОНАХ ТЕТРАПОД

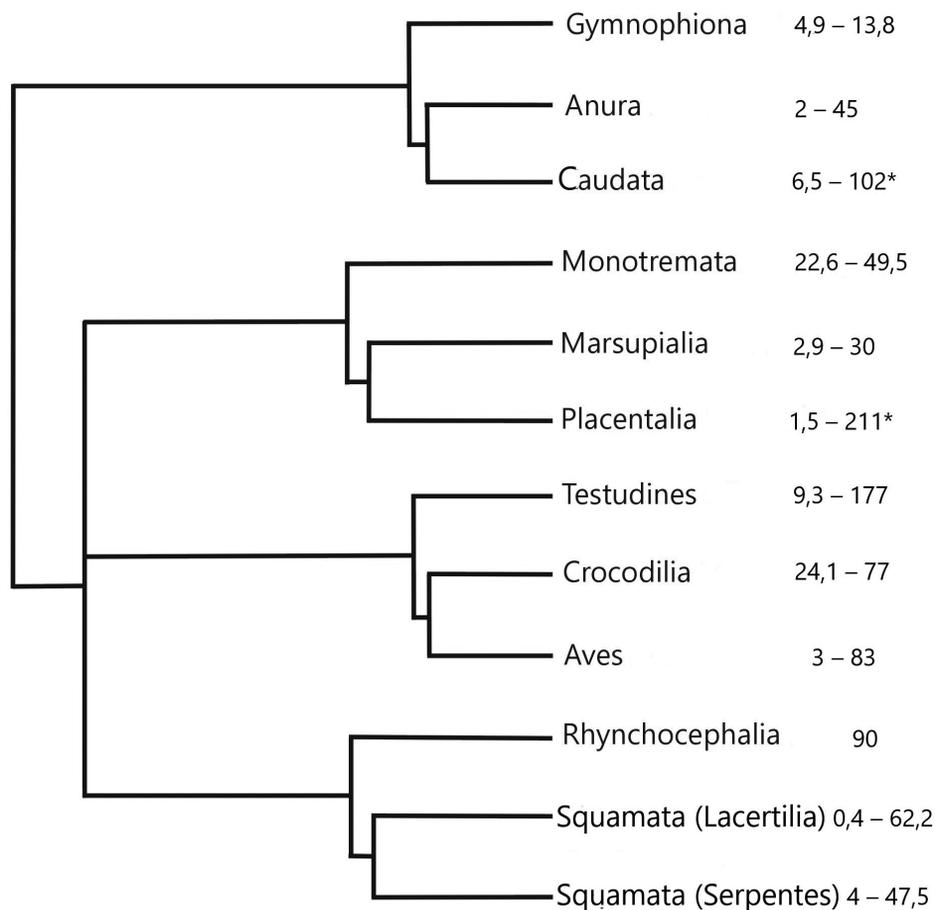
С точки зрения эволюции, «главной задачей» живых организмов является максимизация приспособленности, как величины генетического вклада организма в последующие поколения. По этой причине при прочих равных условиях долгая жизнь предпочтительнее короткой. Однако в реальности ей мешают сопутствующие условия. На приспособленность влияет, помимо ПЖ, плодовитость, степень защищенности потомства, социальность, распределение репродуктивного усилия по возрастам, величина родительского вклада и т.д. Понятно, что в разных ситуациях оптимальными с эволюционной точки зрения будут разные значения ПЖ: иногда низкие, а иногда высокие. Поэтому мы не наблюдаем единой глобальной тенденции к росту ПЖ в ходе эволюции живых организмов – точно так же, как мы не наблюдаем глобальной тенденции, скажем, к росту плодовитости или родительского вклада в потомство (хотя и высокая плодовитость, и большой родительский вклад в потомство *при прочих равных условиях* являются полезными признаками, т.е. повышают приспособленность). Поэтому виды с высокими и низкими значениями ПЖ сложным образом распределены по филогенетическому дереву животных. Анализируя это распределение у позвоночных, можно попытаться выявить и понять основные факторы эволюции долголетия. Как уже отмечалось нами ранее, в целом, высокая ПЖ в природе встречается не очень часто, являясь, видимо, не самым значимым для адаптации признаком. Либо этот признак слишком «дорогой» с точки зрения отбора, если большинство мутаций, повышающих долголетие, попутно наносят ущерб другим компонентам приспособленности, таким как плодовитость или родительская забота. Не вполне однозначная связь наблюдается между скоростью старения и ПЖ. Хотя при высокой скорости старения жизнь не может быть долгой, в то же время при низкой скорости старения она может быть как долгой, так и короткой: это зависит от базовой смертности, в том числе от пресса хищников. Различными общепризнанными признаками, способствующими долголетию у позвоночных (признаками героуспеха), являются сохранение способности к росту и регенерации

во взрослом состоянии [22], медленный метаболизм (рыбы, амфибии, рептилии) [23], сохранение ювенильных признаков у взрослых животных, неотения (амфибии) [24–26] и устойчивость к сильно повышенному (вследствие приобретенной способности к полету) уровню метаболизма (птицы) [27]. Высокая способность к транзиторной репаративной регенерации, вызванной повреждением или утратой части органа, сохраняется и у более близких родственников позвоночных – иглокожих [28, 29]. В дальнейшем в ходе эволюции позвоночных способность к такой регенерации снижается по мере повышения уровня организации. Так, в лаборатории ИППИ РАН был обнаружен ген *c-Answer*. Кодируемый им белок отвечает за регенерацию у амфибий. Но у млекопитающих этот ген не сохранился, что, видимо, способствует (за счет снижения активности Fgf8) развитию переднего мозга – отличительного признака высших позвоночных [30]. Скорость метаболизма у эктотермных позвоночных, включая рыб, рептилий и амфибий, меньше, по сравнению с эндотермными (птицами и млекопитающими), и, соответственно, ниже скорость образования окислительных радикалов митохондриями. Это может способствовать эволюции высокой ПЖ и замедленного старения у отдельных видов, в том числе появлению экстремально долгоживущих (некоторые акулы) [22], а также видов с пренебрежимым старением (некоторые представители семейства карповых) [31]. Reinke et al. [32] выяснили, что из 30 известных видов позвоночных, которые могут дожить до 100 лет, 26 являются эктотермами (животными, которые зависят от внешних источников тепла). На основе этих данных можно предположить, что фактором, вносящим наибольший вклад в долголетие у эктотермных позвоночных, может являться такой признак героуспеха, как медленный метаболизм. Следствием появления долгожителей в благоприятных местообитаниях являются адаптационные изменения, заключающиеся в возникновении способствующих долголетию признаков на молекулярном и клеточном уровнях (поддержание генетической стабильности и т.д.) или на уровне организмов (например, неотении) [33, 34].

ПРИЗНАКИ ГЕРОУСПЕХА У РЕПТИЛИЙ И АМФИБИЙ

У амфибий и рептилий есть свои характерные признаки героуспеха. Незначительное старение наблюдалось по крайней мере у одного вида в каждой группе эктотерм, включая лягушек, саламандр, ящериц, крокодилов и черепах [1, 32].

Старение и продолжительность жизни у рептилий и амфибий. Медленно стареющие дикие



Диапазон видовой продолжительности жизни (ПЖ) в различных таксонах Tetrapoda. Числовыми интервалами обозначен диапазон видовых ПЖ (в годах) в данном таксоне. В случае, если в базе данных Anage присутствует только один вид, то в схеме приведена величина его ПЖ. * Отмеченная звездочкой величина является расчетной

черепahi лидировали среди изученных тетрапод по степени сопряженности низкого метаболизма с замедлением старения и большой ПЖ. Так, самыми живучими оказались одни из крупнейших представителей сухопутных черепах (Testudinidae): слоновые черепахи с Галапагосских островов (достигают длины 2 м и веса в 500 кг) и сейшельские гигантские черепахи *Testudo gigantea* (*Aldabrachelys gigantea*), которые чуть мельче, зато являются рекордсменами по ПЖ среди рептилий [32]. Согласно базе данных Anage, ПЖ крупнейшего (до 7 м в длину и массой до 2000 кг) представителя отряда крокодилов, гребнистого крокодила *Crocodylus porosus*, превышает 100 лет, хотя эта информация и нуждается в дополнительном подтверждении («...might be true»). Факторами, благоприятно влияющими на ПЖ гребнистого крокодила, являются способность крайне эффективно противостоять инфекции (а значит, и острому феноптозу), в том числе за счет особенностей микробиома [18], способность переключать метаболизм и быстро впадать в спячку при необходимости, хорошо развитая осморегуляция (водно-солевой обмен), а также

забота о потомстве (охрана яиц) и почти полное отсутствие врагов [35]. У амфибий относительно высокая ПЖ характерна для хвостатых амфибий с чемпионом в виде протей *Proteus anguinus*, ПЖ которого (правда, лишь расчетная) превышает 100 лет. Крупные саламандры также имеют большую ПЖ по сравнению с мелкими. Что касается бесхвостых амфибий, их максимальная ПЖ не превышает 30–45 лет (рисунок). Рекордсменом среди жаб (40 лет) является серая жаба *Bufo bufo*, а среди лягушек (45 лет) – очень крупная (весом до 1,4 кг и длиной тела более 24 см) роющая лягушка *Rhacophorus adspersus*.

Далее мы сосредоточимся на изучении способствующих долголетию признаков (героуспеха), отличающих долгоживущих эктотерм (крокодилов и черепах), и сравнению их как с таковыми у других представителей эктотерм (чешуйчатых и амфибий), так и эндотерм (птиц и млекопитающих). Кроме того, тенденции к изменению долголетия и скорости старения (pace and shape of aging), существующие в животном мире, требуют для своего выявления развитого математического аппарата.

Известны, например, расчеты рекордных максимальных видовых ПЖ у млекопитающих (211 лет – для гренландского кита) и свыше 100 лет – у амфибий (протей). Помимо физиологических, морфологических и поведенческих характеристик, существуют методы математического анализа данных, позволяющие, помимо ПЖ (т.е. величины, характеризующей *fast-slow continuum*), исследовать скорость старения (*pace of aging*, т.е. относительную скорость роста смертности с возрастом), а также сопряженность ПЖ и различных изучаемых факторов, включая размеры и температуру тела, энцефализацию, защищенность занимаемых экониш, наличие защитных структур (например, панциря и остеодерм), температуру среды обитания и др., и влияние их на распределение ПЖ как статистической величины.

Терморегуляция. Еще одним важным генетологическим фактором является температура [36]. С одной стороны, активная терморегуляция способствует адаптации, позволяя заселять более холодные территории и увеличивая подвижность [37]. У эктотермных животных (например, амфибий и рептилий) многие виды активны только при определенных температурах окружающей среды. С другой стороны, у эндотермных животных (птиц и млекопитающих) значительная энергия затрачивается на поддержание относительно постоянной температуры тела при различных температурах окружающей среды. Эволюция эндотермии связана с изменениями многих показателей, таких как скорость метаболизма, выносливость и аэробная способность. Высокая температура тела способствует увеличению уровня продукции свободных радикалов, что является важным компонентом путей старения [38–40].

Moreira et al. [36] обнаружили, что у эндотермных животных температура тела не значительно выше, чем у эктотермных. При этом скорость изменения температуры тела существенно различается в эволюции наземных тетрапод. Moreira et al. также определили предковые температуры тела для основных клад тетрапод с помощью дисперсионного анализа множественной регрессионной модели (*a multiple variance Brownian Motion model*). Предполагаемая температура тела предка тетрапод – 28,0 °C (95%; доверительный интервал 23,7–32,4). Предковые температуры тела у крокодилов ($\theta = 30,1$ °C [27,3–32,9]), лепидозавров (чешуйчатые и клювоголовые; $\theta = 28,5$ °C [24,0–32,9]) и черепах ($\theta = 27,5$ °C [23,6–31,3]) мало отличались от температуры предполагаемого предка тетрапод. У предков млекопитающих ($\theta = 32,3$ °C [28,8–35,6]) и птиц ($\theta = 39,4$ °C [37,5–41,4]) наблюдались более высокие температуры тела, тогда как предкам земноводных ($\theta = 24,0$ °C [20,2–27,9]) была присуща более низкая температура тела. Разброс значений темпе-

ратуры тела внутри каждой из упомянутых выше клад был значительно ниже у млекопитающих и птиц, чем у амфибий. Крокодилы, лепидозавры и черепахи показали промежуточные показатели, близкие к общим показателям по всему дереву. Обнаружено [36], что температура тела демонстрирует сильную филогенетическую связь и консерватизм. То есть температура тела обычно отражает эволюционную историю видов: более близкие виды имеют тенденцию иметь более схожую температуру тела, а некоторые группы сохраняют схожие температуры тела в течение удивительно длительных периодов времени, измеряемых сотнями млн лет. Температура тела тетрапод часто не связана с климатом, а вот связь с режимами дневной и ночной активности бывает различной. Используя филогенетический дисперсионный анализ, не обнаружили достоверных различий между средними температурами тела ночных и дневных видов ни у тетрапод в целом, ни у черепах, ни у земноводных. Тем не менее различия были существенными внутри клады птиц и лепидозавров, а у млекопитающих – близки к уровню значимости. Важно, что различия между ночными и дневными видами были статистически значимы для рассматриваемых по отдельности эктотерм и эндотерм. У эктотермных животных и, что удивительно, у эндотермных температура тела обычно выше у дневных видов, чем у ночных. Таким образом, температура тела в значительной степени связана с филогенией и моделями суточной активности внутри и между группами тетрапод, а не с климатом и делением эндотерм-эктотерм [36].

Физиологическое старение. В отличие от млекопитающих, черепахи и крокодилы продолжают расти на протяжении всей жизни и характеризуются крайне медленным демографическим и физиологическим старением [41]. Предполагается, что некоторые виды, такие как водные и сухопутные черепахи, могут проявлять пренебрежимое старение, без выраженного роста смертности [42] и ухудшения физиологического состояния организма с возрастом [43]; чешуйчатые занимают промежуточное положение [44]. В некоторых работах к видам с пренебрежимым старением относят, помимо черепах, и крокодилов [18, 41]. В то же время у чешуйчатых (*Squamata*) существуют данные как о физиологическом (накопление возрастных дегенеративных изменений, включая увеличение жесткости коллагена, накопление измененных молекул ферментов, снижение метаболизма и способности реагировать на стресс), так и репродуктивном старении (снижение способности к размножению с возрастом, снижение плодовитости с возрастом и увеличение репродуктивной продуктивности на грамм веса самки) [41, 45]. Данные о постепенном старении ящериц (например,

Calotes versicolor) и змей (например, *Natrix natrix*) подтверждают концепцию общности явлений старения у чешуйчатых и позвоночных в целом [41]. Увеличение сшивок коллагена, накопление возрастных пигментов (липофусцина и меланина), снижение метаболизма и потеря иммунокомпетентности – явления старения, общие как для амфибий, так и для млекопитающих. Тем не менее преимуществом чешуйчатых, по сравнению с млекопитающими, является меньшая выраженность возрастного увеличения смертности [10] и репродуктивного старения [41]. Кроме того, в отличие от млекопитающих, для амфибий характерны полифиодонтия, а также сохранение нейрогенеза и миогенеза и продолжение оогенеза в течение взрослой жизни [46]. Близкое по смыслу предположение, тоже основанное на идее о положительной связи между уровнем метаболизма и накоплением повреждений, состоит в том, что холоднокровные, живущие в теплом климате, должны стареть быстрее, чем их сородичи из более прохладных районов. Reinke et al. [32] проверили это, используя данные по средним, максимальным и минимальным температурам в районах обитания изученных популяций. Как выяснилось, у рептилий действительно есть слабая положительная связь между температурой окружающей среды и скоростью старения. У амфибий, однако, все наоборот: лягушки и саламандры, живущие в прохладном климате, стареют в среднем быстрее, чем их собратья из теплых районов. Рептилии при высоких температурах стареют быстрее, а амфибии – медленнее. У жабы Эндрю (*Bufo andrewsi*) обнаружили, что возраст половой зрелости, средний возраст и ПЖ увеличиваются с уменьшением среднегодовой температуры, тогда как возраст половой зрелости увеличивался с уменьшением сезонности температуры, подразумевая, что температура является важнейшей характеристикой среды обитания. При этом размер тела увеличивается с увеличением количества осадков в самый засушливый месяц и сезонностью интенсивности солнечной инсоляции, но не зависит от температуры, что не соответствует правилу Бергмана [47].

Изменение уровня смертности с возрастом (актуарное старение). В обширном сравнительном исследовании на черепахах, живущих в природе, и черепахах, живущих в зоопарках и аквариумах, было показано, что около 75% из 52 видов демонстрируют медленное или незначительное старение. Обнаружили, что масса тела положительно связана с продолжительностью взрослой жизни. Примерно для 80% видов черепахах темпы старения ниже, чем у современного человека [43]. Следует отметить, что, хотя черепахи в частности, как и рептилии в целом, считались «иконой» долгожительства и недрасположенности к

старению [23, 48], в настоящее время появились работы, опровергающие эту точку зрения [49, 50]. Правда, пока эта дискуссия затрагивает не крупных черепах с неограниченным ростом, а несколько мелких, считающихся нестареющими, несмотря на ограниченность роста, представителей семейства американских пресноводных черепах (Emydidae): каролинскую коробчатую черепаху *Terrapene carolina* (138 лет), болотную черепаху *Emys orbicularis* (120 лет), черепаху Блэндинга (*Emydoidea blandingii*, 77 лет) и расписную черепаху *Chrysemys picta* (61 год). Сходный медленный рост смертности с возрастом, аналогично описанному Warner et al. [49] для пресноводной черепахи *Chrysemys picta* (Emydidae), был показан для небольших (размер карапакса – 23–35 см) сухопутных африканских черепах: зубчатой киниксы *Kinixys erosa* (ПЖ 24,8 года), лесной киниксы *Kinixys homeana* и гладкой киниксы *Kinixys belliana nogueyi* (ПЖ 26,5 лет), относящихся к семейству Testudinidae, т.е. тому же, что и гофер, для которого в работе Jones et al. [10] показано отрицательное старение. Связь между уровнем смертности и возрастом в природе была почти линейной и достигала 100% к 17 годам [51]. В связи с этим измерение устойчивости смертности (времени, в течение которого смертность практически не растет – плато на кривой выживания) и характеристик распределения ПЖ приобретает еще большую важность.

Jones et al. [10] анализировали смертность животных и растений от наступления половой зрелости до возраста, соответствующего 95%-ному вымиранию исходной половозрелой когорты, используя в качестве критерия наличия/отсутствия старения (*отношение смертности в возрасте, соответствующем 95%-ному вымиранию когорты, к средней за весь исследованный период*). Хотя черепаха-гофер (*Gopherus agassizii*) была объявлена самым нестареющим животным, крокодил *Crocodylus johnstoni* попал в середину списка, но люди-долгожители (японки) и животные, демонстрирующие долгое время околонулеву смертность (глупыши *Fulmarus glacialisoides*), были отнесены к наиболее стареющим видам. Из-за высокой фоновой смертности в ранних возрастах ПЖ₉₅ для крайне долгоживущей сосны *Pinus sylvestris* составила 30 лет. Что же касается долгоживущих видов с менее выраженным увеличением смертности с возрастом (например, для крокодила Джонстона *Crocodylus johnstoni*, рака-отшельника *Pagurus longicarpus* или сосны *Pinus sylvestris*, а также животных со средней ПЖ, которые достигают барьера 5%-ного выживания раньше, чем успевают постареть физиологически, то для них метод Джонса позволяет охарактеризовать лишь малую часть жизненного цикла, не позволяя судить о том, как проявляется старение на его поздних стадиях.

Например, к нестареющим видам была отнесена большая синица *Parus major*, хотя она просто не успевает постареть (влияние смертности, вызванной внутренними причинами, здесь будет невелико) из-за высокой внешней смертности, вызванной прессом хищников. Ее популяция заканчивается даже до достижения 50% от видовой ПЖ.

Кроме того, с точки зрения героуспеха можно отметить, что синица, хотя и является видом биологически успешным, но не имеет каких-либо способствующих долголетию признаков, выделяющих ее среди других птиц. Также и ее ПЖ (15,4 года) не является в целом для птиц значительной. В то же время человек и глупыши, хоть и подвержены старению (их смертность растет, начиная с определенного возраста), тем не менее такими признаками героуспеха обладают (признаки человека (и голого землекопа) приведены в статье Skulachev et al. [33]). Аналогично, в работе Saucuela et al. [51] сравнивали возрастную динамику смертности трех видов сухопутных черепах семейства Testudinidae (зубчатой киниксы *K. erosa* (ПЖ 24,8 года), лесной киниксы *K. homeana* и гладкой киниксы *K. belliana noguey* (ПЖ 26,5 лет)) и трех видов змей (габонской гадюки *Bitis gabonica*, гадюки-носорога *Bitis nasicornis* и пятнистой жабы-гадюки *Causus maculatus* (ПЖ 6,6 лет)). У *Kinixys* связь между уровнем смертности и возрастом была положительной и линейной, что предполагает постепенный медленный рост смертности на протяжении всей жизни черепах. Напротив, у змей *Bitis* и *Causus* связь между уровнем смертности и возрастом была резко отрицательной, предполагая, таким образом, наличие положительного старения у черепах и отрицательного старения – у змей [51]. Иными словами, по Гомпертцу, для амфибий и рептилий, не говоря уже о долгоживущих стрекающих или тем более древесных растениях, в отличие от людей, гораздо сложнее предсказать, какой процент особей проживет среднюю ПЖ, сколько проживет 25% от максимальной видовой ПЖ, сколько – 75%, сколько будет долгожителей (90%) и сверхдолгожителей (95%). Мы пришли к выводу, что классификация, предложенная Jones et al. [10], дает возможность приблизительно разделить животных и растения только по степени увеличения вероятности смерти с возрастом, тогда как для оценки подверженности физиологическому старению необходимо построение более сложных моделей и показателей [34, 52, 53].

Коэффициент вариации продолжительности жизни (КВПЖ). Мы изучали КВПЖ (как меру выраженного в процентах разброса величины относительно среднего), а также коэффициентов асимметрии и эксцесса у различных представителей животного царства [52, 53], используя данные, приведенные Институтом демографических

исследований [10]. Мы выяснили, что, в отличие от человека и лабораторных животных, у подавляющего числа рассмотренных видов полученные величины гетерогенны ввиду большого влияния фоновой смертности, а также немонотонности общей смертности в дикой природе, особенно в самых ранних возрастах. У рептилий, согласно нашему анализу [52, 53] исходных данных работы Jones et al. [10], у крокодила Джонсона (*Crocodylus johnstoni*) величина КВПЖ для полной когорты равна 195%, т.е. выборка чрезвычайно неоднородна (таблица). Для преодоления проблемы влияния аномально высокой (например, детской и младенческой) смертности используется и усечение поздних возрастных интервалов до 95%-ной смертности либо время в годах, начиная от полового созревания до смерти 95% половозрелых особей в популяции (ПЖ₉₅) [10, 32]. Как уже упоминалось выше, эта мера не идеальна, но все же она надежнее для тестирования моделей (проверки сопряженности эффекта различных экологических факторов с длительностью жизни), чем максимальная (рекордная) ПЖ, которая слишком сильно зависит от размера выборки. Если животное может умереть с вероятностью 1 к 100 в возрасте 10 лет и 1 к 100 – в 90 лет, то это незначительное старение. При использовании «усеченных» наборов данных обсчитывать параметры распределения ПЖ человека начинают с 10-летнего возраста, считая его возрастом начала подъема зависимой от возраста смертности [54], либо с 12–15 лет – возраста половой зрелости [10]. Так, уменьшение эффекта возраст-независимой компоненты давало снижение КВПЖ с 60% до 15–20% (таблица). Сходное значение имеет КВПЖ, характерный для близнецов (т.е. с близким к нулю различием в действии генетической составляющей) [55].

Для иллюстрации, насколько величина КВПЖ в 100% свидетельствует о неупорядоченности (разбросе) ПЖ, рассмотрим разброс ПЖ в когорте, где величина ПЖ определяется подкидыванием монеты: решка – 0 лет, орел – 100 лет. Таким образом, помимо максимальной ПЖ, имеется еще одна область концентрации значений, к тому же максимально удаленная от наибольшей ПЖ (ситуация, максимально увеличивающая КВПЖ). Средняя ПЖ в таком случае будет равна 50, среднеквадратичное отклонение – также 50, а их отношение (КВПЖ) будет соответственно равно единице (или 100%). Соответственно, при еще большей неупорядоченности, когда меньших значений ПЖ будет больше (преобладание внешней смертности, не дающей особям достигнуть их видовой ПЖ в 100 лет) КВПЖ может еще возрасти.

В когорте при исключении из рассмотрения первого года жизни (КВПЖ = 92%) неоднородность снижается за счет удаления детской смертности.

Сравнение параметров распределения ПЖ рептилий и человека

Вид (латинское название)	Отряд	ПЖ	Число лет (от рождения), исключенных из рассмотрения	КВПЖ, %	As	Es
Рептилии						
Живородящая ящерица (<i>Lacerta vivipara</i>)	Чешуйчатые (Squamata)	11	0	69	2,41	5,3
			1	56	0,84	-0,29
Гофер (<i>Gopherus agassizii</i>)	черепахи (Testudines)	64	0	160	5,59	44,9
			1	135	4,42	26,51
			11	117	1,89	3,3
Крокодил Джонсона (<i>Crocodylus johnsoni</i>)	Крокодилы (Crocodylia)	55	0	195	3,46	12,44
			1	92	1,08	0,38
			2	60	0,79	-0,01
			11	34	0,86	0,38
Человек (<i>Homo sapiens</i>)						
Японки в 2009 г.	Приматы (Primates)	122	0	16	-2,23	8,28
			10	16	-1,73	4,63
0			58	-0,6	-1,12	
1			47	-0,85	-0,51	
10			37	-0,91	-0,08	
0			101	0,54	-1,25	
Индейцы-аче			2	61	-0,1	-1,29
			10	55	-0,17	-1,2

Примечание. Коэффициенты вариации (КВПЖ), асимметрии (As) и эксцесса (Es) продолжительности жизни (ПЖ) у рептилий по сравнению с человеком (из развитых стран: японками, шведками и живущими в дикой природе индейцами-аче). Значения для полной когорты выделены жирным шрифтом. Внутри вида значения сгруппированы по размеру отсечки (увеличению количества лет [от рождения], исключенных из рассмотрения).

В когорте при исключении из рассмотрения первых двух лет жизни КВПЖ снижается до 60%, а при исключении из рассмотрения первых 11 лет жизни (усечение по Джонсу до возраста полового созревания) – до КВПЖ = 34% (таблица). Асимметрия и эксцесс при этом существенно не меняются. Таким образом, отсечения двух лет достаточно для устранения влияния чрезвычайно высокой детской смертности, отсечение же до возраста полового созревания снижает КВПЖ более чем втрое. Во всех случаях наблюдается существенная правосторонняя асимметрия, показывающая высокий уровень смертности в раннем возрасте, который далее снижается. Значение эксцесса для полной когорты неприемлемо высоко, в остальных случаях эксцесс близок к нулю. У ящерицы *Lacerta*

vivipara для полной когорты КВПЖ = 69% за счет высокой смертности в первый год. В когорте за вычетом особей, погибших в первый год жизни, КВПЖ = 56%, что говорит о сохранении неоднородности популяции. У гофера *G. agassizii* (черепахи) самая неоднородная выборка: в полной когорте КВПЖ = 160%, что является чрезмерно высоким значением. При таких значениях можно предположить, что ни КВПЖ, ни среднее не характеризуют ход старения исследуемой популяции. Видимо, несмотря на большую ПЖ и устойчивость к старению, влияние детской смертности чересчур велико. В когорте за вычетом особей, погибших в первый год жизни (детская смертность), КВПЖ = 98%. В когорте при удалении первых 11 лет жизни КВПЖ = 56%. Хотя с вычетом 11 лет КВПЖ

понизился (за счет удаления детской смертности, а также за счет снижения численности), в итоге он все равно остался очень высоким. Высокая смертность наблюдается лишь в ранних возрастах, а далее – низка и не растет с возрастом. В дальнейших расчетах мы показали, что для достижения гомогенности когорты по ПЖ (КВПЖ = 33%) у черепаха необходимо отсечь ни много ни мало первые 25 лет жизни. До этого ПЖ черепах в большей степени зависит от фоновой смертности. Возможно, именно этим объясняется разгоревшаяся в последние годы дискуссия о том, стареют ли черепахи (растет ли вероятность их смерти с возрастом).

Поддержание способности к росту и размножению. Уникальная физиология рептилий, недетерминированный рост и возрастающая плодовитость на протяжении всей жизни у взрослых самок мотивируют изучение того, как физиология на механистическом уровне, история жизни на уровне организма и естественный отбор на эволюционной временной шкале регулируют ПЖ в этой разнообразной таксономической группе [56–60]. С точки зрения героуспеха невыгодным представляется как быстрый рост (с повышенным уровнем метаболизма), так и быстрое его прекращение по достижении видовых размеров. Наиболее выгодной с точки зрения долголетия стратегией является сохранение способности к медленному росту в течение всей жизни [18]. Примеры этого мы можем видеть на всем эволюционном древе: от гидр, кораллов и губок до усатых китов. У современных архозавров сохраняются все вышеупомянутые стратегии роста [61]. В каждом таксоне есть идиоадаптации, обеспечивающие его представителям биологический успех, и, соответственно, ПЖ разной величины. Так, малая ПЖ крупного животного делала бы его неконкурентоспособным, поэтому (в общем же случае) чем крупнее животное, тем больше оно должно жить. С другой стороны, сильное увеличение размеров делает животное более уязвимым к резкому изменению условий существования (ибо его потребность в ресурсах и чувствительность к изменению условий существования велики) [62, 63]. Практически во всех отрядах позвоночных гигантские виды вымерли, несмотря на то что их размеры делали их практически неуязвимыми (гигантские черепахи и крокодилы, гигантские ленивцы, олени, носороги и т.д.). Крупные амфибии ринезухи (*Rhinesuchus whaitsi*), размерами и общим обликом похожие на крокодилов («gasp crocodile»), не пережили пермь-триасового вымирания 250 млн лет назад.

Скорость эволюции рептилий обычно низкая, но иногда они развиваются быстро, реагируя на изменение среды (например, с потеплением климата их размеры увеличиваются) [64]. Для предковых форм архозавров был характерен более

быстрый рост и более высокий уровень метаболизма, чем у их потомков [65, 66]. Переход к замедленному росту произошел при появлении ранних крокодиломорф в позднем триасе. В кладе архозавров известны быстро растущие виды псевдозухий (*Pseudosuchia*), также не пережившие массового вымирания в конце триаса [61]. Характерным примером действия стабилизирующего отбора [67] являются крокодилы, практически не менявшие ни внешний вид, ни эконишу (влажные тропические болота), и, найдя, таким образом, оптимальное для себя состояние, поддерживают его, пока окружающая среда не заставит их адаптироваться к новым условиям [64].

Хотя многие представители отряда крокодилов продолжают расти на протяжении всей жизни [41], сообщалось, что у американских аллигаторов (*Alligator mississippiensis*; Alligatoridae) рост прекращается через некоторое время после созревания. Два типа роста сохранилось и у черепах: известны как нестареющие виды у сухопутных черепах (Testudinidae) с неограниченным ростом в течение всей жизни (например, исполинская черепаха *Testudo gigantea* (= *Aldabrachelys gigantea*) или гофер *G. agassizii*), так и небольшие черепахи, чей рост заканчивается к 30–40 годам. Это в первую очередь касается мелких представителей семейства американских пресноводных черепах (Emydidae): каролинской коробчатой черепахи *T. carolina* (ПЖ 138 лет), болотной черепахи *E. orbicularis* (120 лет), черепахи Блэндинга (*Emydoidea blandingii*; 77 лет) и расписной черепахи *Chrysemys picta* (61 год). Однако и среди них есть виды, которые относят к видам с пренебрежимым старением (*T. carolina* и *E. orbicularis*) [1, 48, 68]. Аналогично предположили детерминированный рост у морских черепах [69]. Однако даже если рост является детерминированным, продолжение роста после полового созревания является нормой для рептилий и отличает их от млекопитающих и птиц [70]. Так, соотношение между длиной в возрасте половой зрелости и максимальной длиной тела взрослой особи составляет 0,95 для слонов (*Elephas maximus*), 0,9 – для морских котиков (*Arctocephalus forsteri*) и 0,97 – для белого медведя (*Ursus maritimus*) [71–73]. Напротив, доля оставшегося роста после размножения у змей, черепах и ящериц составляет в среднем 0,68, 0,70 и 0,74 соответственно [74, 75].

Обеспечение безопасности. Как мы уже обсуждали ранее [15], эволюции долголетия способствует развитие и совершенствование способов защиты и освоение защищенных экониш. Большие адаптационные ограничения существуют у амфибий: привязанность к влажным местам, неспособность (из-за отсутствия тазовых почек) жить в морской воде, примитивность систем

защиты (в основном яды), относительно малые размеры (масса ни одного представителя амфибий не дотягивает даже до 100 кг), отсутствие амниотической оболочки у яиц, отсутствие развитых систем активной защиты. В случае рептилий таковыми могут быть панцири черепах и непробиваемая шкура крокодилов, тогда как у амфибий таких защитных приспособлений нет. Более «активной» защитой у части тетрапод является наличие ядов, выделяемых кожными железами, или появление специальных структур (в том числе ядовитых зубов). В ходе филогенетических исследований обнаружили, что каждый отряд в отношении ядовитости имеет свою модель эволюции. В частности, эволюция биосинтеза гораздо менее динамична, чем эволюция получения токсинов из рациона. Наконец, в отличие от амфибий, у рептилий наблюдается положительная связь между эволюцией синтеза и применения ядов и более высоким видовым разнообразием [76]. Если животное защищено от хищников, например, прочным панцирем или непригодностью в пищу/токсичностью/ядовитостью, то следует ожидать, что оно будет, при прочих равных условиях, стареть медленнее, чем его незащищенные родственники. Reinke et al. [32] рассмотрели два вида защитных адаптаций: физические (панцири черепах, прочная чешуя крокодилов и некоторых чешуйчатых) и химические (всевозможные яды), и показали, что защищенные виды действительно стареют в среднем медленнее, чем незащищенные. У видов с физической защитой среднее значение коэффициента уравнения Гомпертца, характеризующего скорость старения (β_1), составляет 0,05, с химической – 0,28, у беззащитных – 0,47, показывая десятикратное преимущество защищенных видов по данному показателю.

Энцефализация (повышение размеров мозга относительно размеров тела), бесспорно, положительно связанная с долголетием у млекопитающих, для других позвоночных может иметь связь с обратным знаком (вследствие чрезвычайной энергозатратности мозга, превышающей пользу от когнитивных преимуществ более развитого крупного мозга). Так, у хрящевых рыб энцефализация отрицательно связана с видовой ПЖ, в то время как у костных рыб такой связи не выявлено [77]. Исследуя компромисс (trade-off) между изменением размера мозга и долголетием у 265 видов, выявили отрицательную связь между размером мозга и ПЖ у рептилий (как и ранее у хрящевых рыб [77]), тогда как у амфибий такой связи выявлено не было [78]. Тем не менее в работе, в которой анализировали такую взаимосвязь у 40 видов лягушек (с учетом влияния общего филогенетического происхождения и размера тела), обнаружили положительную корреляцию между размером моз-

га, возрастом полового созревания и ПЖ (несмотря на то что в целом бесхвостые амфибии не характеризуются высокой ПЖ по сравнению с другими амфибиями) [79]. Более того, у лягушек с большей ПЖ более развиты вентральные области мозга, включая обонятельные луковицы [79].

ОБСУЖДЕНИЕ

Сочетание эволюционного успеха и долголетия (эволюционные стратегии). Эволюционный успех в развитии таксономической группы определяется ее биологическим прогрессом. Как известно, критериями биологического прогресса являются: увеличение численности особей, расширение ареала и прогрессивная дифференциация – увеличение числа систематических групп, составляющих данный таксон. Само по себе длительное присутствие той или иной группы в истории по отношению к быстрому вымиранию таксона также рассматривается как эволюционный успех. Высокую численность особей в популяции можно удерживать за счет большого числа потомков (рожденных одновременно или за N поколений) и небольшой ПЖ (стратегия 1) или за счет малого числа потомков (рожденных одновременно или за N поколений) и большой ПЖ (стратегия 2). Сочетание высокой плодовитости и долгой ПЖ (стратегия 3) встречается относительно редко и, как правило, сопряжено с высокой ранней смертностью (черепахи, рыбы). Виды, которые обладают и небольшой ПЖ, и небольшим числом потомков (стратегия 4), как правило, не могут удерживать высокую численность и вымирают. В отличие от млекопитающих, чемпионы по долголетию среди рассматриваемых в этой статье амфибий и рептилий, а именно черепахи и крокодилы, следуют стратегии 3, сочетающей высокую плодовитость и высокую ПЖ. Это предполагаемое смешение элементов r- и K-стратегий, на наш взгляд, может объясняться большим процентом гибели потомства на ранних стадиях роста. Таким образом, уже в начале жизни когорты остается малое число потомков, что как раз и характерно для K-стратегов. Механизмы и особенности формирования долголетия в ходе эволюции были сформулированы нами в прошлой статье [15]. Кратко: 1) *прямой отбор на замедление старения*, суть которого в том, что при прочих равных условиях долгая жизнь всегда лучше короткой (больше времени на размножение, значит выше приспособленность, она же – генетический вклад в следующие поколения), именно поэтому нас и удивляет, почему в ходе эволюции сохраняется такой, казалось бы, очевидно вредный признак, как старение; 2) *косвенный отбор на замедление старения*; ведет к развитию адаптаций,

повышающих защищенность организма от тех или иных опасностей; такие адаптации могут в качестве побочного эффекта приводить к продлению жизни; например, хорошая способность к регенерации, защищая от травм, может попутно и замедлить старение; 3) *прямой отбор на ускорение старения* (гипотеза фенотоза): старение либо ускоряет эволюцию каких-то полезных признаков, либо имеет место наследование ресурсов и родственный отбор, как показано для *Caenorhabditis elegans* и некоторых лососей [15, 80, 81]. У рептилий наличие острого фенотоза, приводящего к быстрому старению и гибели (подобной гибели у сумчатых мышей после спаривания и лососевых рыб после нереста), показано у африканского сцинка *Mabuia buettneri* [41]. 4) *Косвенный отбор на ускорение старения* (гипотеза антагонистической плеiotропии [5]); основан на том, что многие аллели, повышающие приспособленность в раннем возрасте (например, раннюю плодовитость), делают это ценой ускоренного снижения приспособленности в старших возрастах; отбор поддерживает такие аллели, потому что до старших возрастов всегда доживает меньше особей, чем до ранних, даже при отсутствии старения, а значит общий ущерб для приспособленности от поздно проявляющихся вредных признаков всегда меньше, чем от рано проявляющихся («для отбора ранние признаки важнее поздних»); чем выше внешняя неизбирательная смертность, тем важнее для отбора ранние признаки по сравнению с поздними; поэтому защищенность способствует эволюции долголетия. 5) «Порог дрейфа»: с возрастом вероятность дожить до данного возраста снижается даже у нестареющих, поскольку не бывает нулевой смертности [4], поэтому чем позднее проявляется вредный эффект аллеля, тем слабее отбор против него; рано или поздно обязательно наступает такой возраст, что отбор, отбраковывающий мутации, приносящие вред в этом возрасте и позже, уже не может противостоять дрейфу; такие мутации свободно накапливаются. Medawar называл это «selection shadow» (имея в виду возраст, до которого не достигает «свет» очищающего отбора); более общее название – «drift limit» (порог дрейфа); чем сильнее внешняя неизбирательная смертность, тем в более раннем возрасте находится порог дрейфа для вредных мутаций фиксированного уровня вредности; поэтому защищенность организма способствует эволюции долголетия.

Эффективность героуспеха рептилий и амфибий. Далее, мы подытожим, какие из факторов героуспеха являются определяющими для долголетия рептилий и амфибий, а какие являются менее значимыми. Первой из предполагаемых причин долголетия является холоднокровность, а второй – размер тела (согласно общему закону,

чем больше размер, тем больше ПЖ). Однако у рептилий и амфибий мы видим, что их более низкий, по сравнению с млекопитающими, уровень метаболизма и эктотермность не обязательно приводят к высокой ПЖ (рисунок). Так, долгожители встречаются среди черепах (в отличие от млекопитающих, долгожители обнаруживаются у сухопутных, а не у морских видов) и крупных крокодилов. Присутствует также отмеченная нами для млекопитающих тенденция на увеличение ПЖ в таксоне у наиболее массивных видов, ввиду сопряженности этих показателей в ходе эволюции. У млекопитающих это справедливо для усатых и зубатых китов, моржей и тюленей, приматов, непарнокопытных и других групп. Исключением являются таксоны, где в ходе эволюции размеры животных не увеличиваются, а, скорее, уменьшаются (летучие мыши), либо животные, рано отколовшиеся от данной ветви эволюционного древа (как семейство Bathyergidae от других грызунов). Гаттерия (*Sphenodon punctatus*) также отличается большой ПЖ (90 лет), но, к сожалению, является единственным представителем клювоголовых. В то же время для чешуйчатых (Squamata) наличие долгоживущих видов не характерно [82]. Тем не менее изучение старения змей позволяет подтвердить гипотезу, связывающую большую ПЖ с механизмами производства свободных радикалов и репарации [56].

Судя по филогенетическому дисперсионному анализу температуры тела на уровне клад, показатели у эктотермных и эндотермных животных значительно различаются. Разница была сильнее после исключения земноводных, когда сравнивали только клады амниот. У эндотермных животных темпы эволюционного изменения температуры тела ниже, чем у эктотермных. Земноводные сильно отличались друг от друга по этому показателю по сравнению с другими тетраподами: у них были более низкие средние температуры тела и более высокие темпы изменения температуры тела в эволюции. Таким образом, основное различие в эволюции температуры тела у тетрапод существует между амфибиями и амниотами. Что касается ПЖ, то она не коррелирует с температурой ни у рептилий, ни у амфибий. Зависимость от внешних температур, как и низкий метаболизм, не являются гарантией долголетия у холоднокровных [32].

Как и у эктотерм, у эндотерм более низкий уровень метаболизма не означает увеличения видовой ПЖ. Например, птицы обычно стареют медленнее, чем млекопитающие сходного размера, хотя температура тела у них, как правило, выше. Ранее [15] мы обсуждали тот факт, что млекопитающие практически в полном составе сделали выбор в пользу большей подвижности и меньшей зависимости от низких температур, при этом

проиграв (в качестве trade-off) в потенциальном долголетию: млекопитающие живут меньше, чем птицы, рептилии и амфибии той же массы. Что же касается абсолютных рекордсменов по ПЖ, то лишь усатые киты обгоняют гигантских сухопутных черепах приблизительно на 20%, при более чем 100-кратной разнице в массе. Тем не менее ПЖ неравномерно распределена на эволюционном древе как млекопитающих, так и амфибий и рептилий. Как уже говорилось, столь универсальный метод достижения долголетия (longevity assurance), как снижение уровня метаболизма, не характерен для млекопитающих в целом. Он наблюдается у рано отделившихся от общего древа групп, например у грызунов Bathyergidae (землекоповые). Представители семейства Bathyergidae живут долго (особенно с учетом массы тела) [83], по сравнению с другими грызунами, эволюционно успешными [84], но в целом короткоживущими. У млекопитающих Austad [2] установил тот факт, что сумчатые, представители сестринской к плацентарным клады, обладая пониженным уровнем метаболизма (по сравнению с плацентарными), не имеют долгоживущих видов, т.е. не выиграли взамен в долголетию (рисунок). При сравнимой массе тела плацентарное будет жить дольше, чем сумчатое той же массы. Кроме того, они практически проиграли эволюционную гонку на всех континентах, кроме Австралии, и, отчасти, Южной Америки (и одного вида в Северной Америке).

Поскольку важная составляющая процесса старения состоит в накоплении разнообразных молекулярных повреждений, в том числе из-за окислительного стресса, можно предположить, что у эндотермных (теплокровных) животных повреждения должны накапливаться быстрее, чем у эктотермных, потому что у них выше уровень метаболизма. В таком случае теплокровные и стареть должны быстрее, чем амфибии и рептилии. Однако данные, проанализированные в этой работе, не подтвердили этого. После внесения необходимых поправок на массу тела и эволюционное родство оказалось, что скорость старения у холоднокровных значимо не отличается от таковой у теплокровных. При этом она сильнее варьирует от вида к виду [32, 36]. Кроме того, выяснилось, что амфибии и рептилии, защищенные панцирем, остеодермами или ядом, стареют медленнее, причем виды с панцирем или остеодермами живут дольше видов, обладающих ядом или лишенных защитных приспособлений [32]. Данные по теплокровным тоже не всегда подтверждают «метаболическую гипотезу». Она неплохо работает на уровне внутривидовой изменчивости (особи с более высокой температурой тела стареют быстрее), но при межвидовых сравнениях все не так очевидно. Например, птицы обычно стареют медленнее, чем

млекопитающие сходного размера, хотя температура тела у них, как правило, выше. Что касается ПЖ, то она не коррелирует с температурой ни у рептилий, ни у амфибий. Зависимость от внешних температур, как и низкий метаболизм, не являются гарантией долголетия у холоднокровных [32].

Эволюционные теории старения и долголетие. Теория, впервые изложенная Medawar [4], основана на классической эволюционной теории старения, согласно которой главной его причиной является недостаточно сильное действие очищающего отбора на поздно проявляющиеся вредные мутации. Даже если животное не стареет, оно не бессмертно: рано или поздно оно умрет от каких-то внешних причин (будь то неблагоприятная температура/влажность окружающей среды, недостаток корма или пресс хищников). Если вероятность смерти постоянна (не растет с возрастом), то вероятность дожить до возраста X экспоненциально убывает с ростом X . Если какая-либо мутация снизит жизнеспособность организма в возрасте, до которого мало кто доживает, то отбор не сможет ее отбраковать. Поэтому с течением времени в популяции должны накапливаться вредные мутации с поздно проявляющимися эффектами. Они-то и являются причиной старения [32, 85]. Из этого следует, что итоговая скорость старения, определяемая балансом мутаций и отбора, должна зависеть от уровня внешней, не зависящей от возраста смертности. Например, если пресс хищников настолько велик, что у жертв почти нет шансов прожить больше двух-трех лет, то отбор не будет эффективно отбраковывать мутации, снижающие жизнеспособность после этого возраста. В результате жертвы будут эволюционировать в сторону быстрого старения (и раннего размножения). И наоборот, если внешние угрозы минимальны, отбор будет способствовать эволюции медленного старения. Роль защитных адаптаций заключается в том, что при их наличии (например, прочный панцирь или непригодность в пищу/ядовитость и т.д.) следует ожидать, что представители данного вида будут, при прочих равных условиях, стареть медленнее, чем незащищенные представители родственных таксонов. Reinke et al. [32] рассмотрели два вида защитных адаптаций: физические (панцири черепах, прочная чешуя крокодилов и некоторых чешуйчатых) и химические (всевозможные яды), и показали, что защищенные виды действительно стареют в среднем медленнее, чем незащищенные. К слову заметим, что медленное старение птиц по сравнению с млекопитающими тоже хорошо объясняется «гипотезой защитных адаптаций». Ведь у птиц (помимо повышенной устойчивости к окислительному стрессу на клеточном уровне) есть одна из лучших защитных адаптаций, придуманных природой – способность к полету.

Более того, птицам противостоят только хищники, относящиеся к тому же таксону птиц, в то время как число видов наземных хищников гораздо выше и более разнообразно по таксономическому составу. Кроме того, и в самой кладе птиц хищные виды появляются относительно поздно, эволюция долгое время шла при отсутствии хищных птиц (не относящихся к таксону новонебных (Neoaves)) [86]. То же относится и к летучим мышам (у которых хищные виды не появились вовсе), которые живут в среднем намного дольше, чем нелетающие звери того же размера. Ну а у млекопитающих, включая голых землекопов и людей, в роли защитной адаптации, способствовавшей эволюции медленного старения и долгой жизни, вероятно, выступала высокоразвитая социальность и наличие защищенных убежищ [33, 34, 87].

Помимо идеи об ослаблении отбора с возрастом, классическая эволюционная теория старения включает идею о балансе между ранней приспособленностью (т.е. эффективностью размножения в раннем возрасте) и сохранением жизнеспособности в течение долгого времени. При прочих равных то, что происходит в раннем репродуктивном возрасте, для отбора важнее происходящего позже, потому что еще неизвестно, доживет особь до позднего возраста или нет. Поэтому если возникнет мутация, повышающая раннюю приспособленность ценой сопоставимого снижения поздней, отбор ее, скорее всего, поддержит, даже если до проявления негативных эффектов этой мутации у многих особей есть шанс дожить [5]. По-видимому, мутации, повышающие эффективность размножения в молодости, действительно часто делают это ценой ускоренного износа организма или имеют другие негативные поздние эффекты (антагонистическая плейотропия). Следовательно, можно ожидать, что между компонентами ранней приспособленности (скорость полового созревания, плодовитость) и долголетия (высокая ПЖ, медленное старение) будет существовать отрицательная корреляция. В зависимости от условий (например, от того же пресса хищников) одни виды будут выбирать стратегию быстрой жизни («живи быстро, умри молодым»), а другие последуют максиме «тише едешь – дальше будешь». Данные по рептилиям и амфибиям хорошо согласуются с этой гипотезой. Рептилии, позднее достигающие половой зрелости, стареют медленнее и живут дольше созревающих рано. У амфибий есть значимая положительная связь между плодовитостью (количеством икры, выметываемой в год) и скоростью старения. Как и у рептилий, скорость полового созревания у них отрицательно коррелирует с ПЖ. В свете этих данных становится понятнее исключительное долголетие черепах: у них на высоте

и защита, и медленный образ жизни (хотя более развитые когнитивные функции с большей ПЖ не связаны). Таким образом, важнейшими факторами, влияющими на скорость старения и ПЖ тетрапод, являются температура окружающей среды, наличие защитных приспособлений, возраст начала размножения и плодовитость. А удивительное долголетие черепах, судя по всему, связано с тем, что они обладают еще и панцирем, который обеспечивает им защиту от хищников. Следует отметить также, что величина ПЖ крупных крокодилов, видимо, является сильно заниженной и на самом деле у наиболее крупных видов превышает 100 лет (см. ранее). Что касается развитости мозга (энцефализации), то когнитивные преимущества более крупного мозга (например, лучшее восприятие сенсорной информация, когнитивная обработка и поведенческая гибкость) позволяют более эффективно противостоять действию внешних факторов смертности, и, соответственно, косвенно способствовать замедлению старения, продлевающему ПЖ («гипотеза когнитивного буфера») [77, 88]. Однако, согласно теории одноразовой сомы [6], значительные энергетические затраты, связанные с поддержанием нервной ткани, поставят под угрозу энергетический бюджет организмов с большим мозгом и их инвестиции в поддержание и восстановление соматических клеток, тем самым ускоряя старение и сокращая ПЖ. Среди эктотермных животных высокие метаболические затраты на производство нервной ткани, по-видимому, превосходят когнитивные преимущества развития более крупного мозга. Следовательно, естественный отбор благоприятствует оптимизации энергетической экономики, а не преимуществам, обеспечиваемым развитыми когнитивными функциями. Также не получили подтверждения и другие популярные гипотезы, что теплокровные из-за более активного метаболизма должны стареть быстрее, чем холоднокровные, и о том, что эктотермы, обитающие в районах с теплым климатом, должны стареть быстрее обитателей прохладных мест.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Долгоживущие виды у позвоночных в целом могут появляться: 1) среди представителей эволюционно успешных таксонов; 2) среди видов, рано отделившихся от эволюционно успешных таксонов с r-стратегией. Для таких таксонов характерно появление какого-либо признака, дающего им преимущество (например, эусоциальность, способность к полету, нахождение на вершине пищевой цепи и т.д.). Некоторые из них часто встречаются вместе (положительная ковариация).

Таким образом, предполагается, что видо-вая ПЖ имеет тесную функциональную связь с другими анатомическими и физиологическими видовыми признаками, сходную по своему характеру с аллометрическими соотношениями между размерами тела или скорости обмена веществ с массой тела [89].

Разные признаки с разной силой влияют на ПЖ. Таким образом, представляется важным различать две категории факторов старения/долголетия.

1) Факторы физиологические/биохимические/молекулярные, непосредственно влияющие на скорость старения (темпы производства активных форм кислорода (АФК), эффективность борьбы с АФК, активность конкретных биохимических путей, ферментов репарации и т.д.). Это – непосредственные причины более быстрого или медленного старения; это – **результаты отбора на долголетие, действовавшего ранее**, который мог быть более или менее интенсивным в зависимости от факторов категории 2.

2) Факторы эволюционные (социальность, защищенность, низкий уровень внешней безвыборочной (независимой от возраста) смертности; скорее всего, сюда относится и размер, так как крупный размер не делает животное автоматически долгоживущим, а лишь создает предпосылки для более сильного отбора на долголетие). Эти факторы определяют, насколько интенсивным будет отбор на долголетие (или, наоборот, на короткую жизнь). Оценку этого процесса можно проводить с использованием методов анализа разброса ПЖ как меры неупорядоченности (неравенства длительности жизни, коэффициента Джини, энтропии Кейфитца и т.д.) [34].

Возможно наличие большого набора способствующих долголетию признаков, но его эффект будет мал. Относительная скорость прироста ПЖ на единицу увеличения какого-либо развивающегося в данном таксоне признака (например, на единицу прироста массы) и будет говорить об эффективности данного признака с точки зрения долголетия (т.е. героуспеха). То же самое можно сказать и о скорости эволюции ответственных за эти признаки генов. Наличие генов, ответственных за долголетие в данном таксоне (генов репарации, онкоустойчивости, антиоксидантной защиты и т.д.), зачастую сопряжено с появлением изоформ продуктов этих генов, характерных именно для долгоживущих видов данного таксона. Сами по себе панцирь черепахи или социальность голых землекопов не замедляют старение. Но эти факторы повышают вероятность того, что на популяцию будет действовать более сильный отбор на долголетие. И в результате изменятся какие-нибудь признаки из категории 1 факторов старе-

ния/долголетия, что и приведет к увеличению или уменьшению долголетия.

Признаки, дающие преимущество тому или иному таксону (например, цефализация у приматов), будут развиваться у них быстрее или в большей степени, чем у других таксонов. В героуспешных таксонах часто появляются виды, успешные даже на их фоне (голый землекоп среди *Bathergidae* и человек среди *Hominidae*). Кроме того, часто героуспешными (за счет долгого стабилизирующего отбора) являются реликтовые виды, такие как ехидна *Tachyglossus aculeatus*, утконос *Ornithorhynchus anatinus*, гаттерия *Sphenodon punctatus*, крокодилы, в том числе и долгоживущие *Crocodylus porosus*, *Crocodylus niloticus* и *Osteolaemus tetraspis*, протей *P. anguinus*, латимерия *Latimeria chalumnae* и т.д. Усложнение строения тела и ускорение метаболизма может способствовать захвату новых экониш и вытеснению других групп животных из старых [90]. Однако с точки зрения героуспеха это может создавать новые потенциально уязвимые сложные системы, вероятность отказа которых будет увеличиваться с возрастом (процесс биологического старения, «медленного фенотоза»). Противодействием ему будет совершенствование защитных систем организма (программ антистарения по Skulachev et al. [34]), что будет отражаться в эволюционных изменениях в соответствующих генах. Скорость эволюции таких генов, ответственных за развитие признака, выгодного для изучаемого таксона (большого мозга, социальности, панциря, ферментов пути синтеза яда и т.д.), можно сопоставить со скоростью эволюции генов антивозрастных программ (в первую очередь репарационной и антиоксидантной систем организма) [60, 91–95]. Кроме того, у долгоживущих видов зачастую тем или иным способом решается проблема снижения ущерба продуцируемых митохондриями АФК (один из самых известных факторов старения) [34, 39, 40, 59, 96, 97]. Данные по амфибиям и рептилиям позволяют выявлять отличия в закономерностях эволюции ПЖ и скорости старения у эктотермных тетрапод по сравнению с эндотермными. Как выяснилось, амфибии и рептилии более разнообразны по этим показателям, чем млекопитающие и птицы. В каждом отряде амфибий и рептилий есть нестареющие виды, у которых вероятность смерти практически не растет с возрастом (среди теплокровных видами с похожей терморегуляцией (мезотермами) являются голый землекоп и утконос). Виды, имеющие хорошую физическую или химическую защиту (прочная чешуя, костяной панцирь, ядовитые железы), как правило, живут дольше и стареют медленнее, чем незащищенные. Это подтверждает классическую эволюционную гипотезу, согласно которой высокая независимая от возраста смертность

способствует эволюции быстрого старения и долгой жизни (стратегия 1 – см. выше подраздел «Эволюционные стратегии»). Например, дрозофила или нематода живут мало, но тем не менее старение у них очень выражено. Кроме того, опыты группы А.В. Маркова [98] показывают, что можно проводить отбор как на уменьшение, так и на увеличение ПЖ (замедление старения). Кроме того, возможны ситуации, когда короткая ПЖ связана не с быстрым старением, а с высоким уровнем смертности, достаточным, однако, для того чтобы часть особей смогла бы дожить до зрелости и оставить достаточное для воспроизводства популяции количество потомства (например, синица *Parus major* в работе Jones et al. [10]). Подтвердилась и гипотеза об «эволюционном компромиссе» между ранним размножением и долголетием: виды, рано достигающие половой зрелости и производящие каждый год многочисленное потомство, живут меньше и стареют быстрее.

Таким образом, сложившаяся в ходе эволюции видовая ПЖ является результатом баланса нескольких разнонаправленных эволюционных сил. Для нас интересны признаки, способствующие большой видовой ПЖ тетрапод (признаки героуспеха), и эффективность их использования. Успех млекопитающих как таксона, как мы разбирали ранее [15], произошел благодаря теплокровности, энцефализации, увеличению размеров, а главное – социальности, но, в целом, для тетрапод такие тенденции не наблюдаются.

Для высокой ПЖ необходим не только **героуспех** (наличие признаков, способствующих долголетию), но и эффективное использование этих признаков, т.е. как тот или иной вид работает с программами старения и антистарения. Skulachev et al. [34] сформулировали этот принцип как «множественность путей старения [и антистарения]». До этого в геронтологической литературе преобладали две крайности. Первая – теория, связанная с обычным накоплением повреждений, т.е. старение и его скорость (fast-slow aging continuum) будут зависеть лишь от скорости продукции повреждений в организме и скорости их репарации. Другой крайностью являются эволюционные теории, в первую очередь теория антагонистической плейотропии (см. выше), где гены, ответственные за рост/развитие/размножение в первой части жизни, дают столь большую выгоду, что она перевешивает их негативные эффекты во второй. На наш взгляд, эти подходы не противоречат друг другу и могут быть верными одновременно. Например, возникает мутация, повышающая раннюю плодовитость ценой ускоренного накопления повреждений с возрастом. Теоретически отбор может поддержать эту мутацию, например, потому что ранняя плодовитость у данного

вида оказалась важнее для общей приспособленности, чем ускоренное накопление повреждений. Это будет одновременно и типичный пример антагонистической плейотропии, и иллюстрация того, что старение «зависит от скорости накопления повреждений и репарации». Как представляется, обе эти теории совместимы друг с другом. Однозначно идентифицировать такие системы и сигнальные каскады довольно сложно, пожалуй, кроме ответственных за рост, пролиферацию и регенерацию.

В продолжение работы о млекопитающих, в настоящей работе мы провели сравнительный анализ признаков, способствующих долголетию в сестринских кладах амфибий и в первую очередь рептилий, включающих в себя большое количество долгоживущих видов, особенно черепах. Математические показатели, применяемые для оценки предрасположенности к долголетию у разных видов, включают в себя как стандартные (уровень смертности и базальный уровень смертности и ее разброс (коэффициент вариации ПЖ)), так и производные от них. Защитные фенотипы и стратегии жизненного цикла дополнительно объясняют макроэволюционные закономерности старения. Анализ эктотермных тетрапод в сравнительном контексте расширяет наше понимание эволюции старения.

Эволюция долголетия идет сопряженно с основными трендами эволюции, критерием которых является биологический прогресс. Само по себе долголетие очень редко является актуальным для эволюционного успеха признаком, поэтому мы не наблюдаем ни одного таксона высокого ранга, для которого причиной успеха являлся именно тренд на долголетие. Действительно, большая ПЖ редко дает преимущества как в межиндивидуальном, так и в групповом отборе. Так, совершенствуясь в ходе эволюции и обеспечивая себе эволюционный успех, таксоны могут обретать одни, способствующие долголетию, признаки, теряя при этом другие. Эволюцию этих процессов можно объяснить в рамках теории Skulachev et al. [34, 81] о многообразии онтогенетических программ старения и антистарения у животных в целом и у рептилий и амфибий в частности. Таким образом, уровень внешней смертности, определяющий давление отбора на вредные мутации с поздним эффектом, и компромисс между быстрой и долгой жизнью, два фактора, предсказываемые эволюционной теорией старения, судя по всему, сильнее влияют на эволюцию долголетия у наземных позвоночных, чем интенсивность метаболизма. Что же касается энцефализации, то среди эктотермных животных высокие метаболические затраты на производство нервной ткани, по-видимому, превосходят когнитивные преимущества развития более крупного мозга. В результате это приводит к оптимизации

энергетической экономики в ходе естественного отбора, а не к развитию и совершенствованию когнитивных функций. Две другие популярные гипотезы не получили подтверждения: о том, что теплокровные из-за более активного метаболизма должны стареть быстрее, чем холоднокровные, и о том, что холоднокровные, обитающие в районах с теплым климатом, должны стареть быстрее обитателей прохладных мест. По-видимому, это значит, что интенсивность метаболизма, ведущая к ускоренному накоплению молекулярных повреждений, – менее значимый фактор эволюции старения, чем отбор на способность с этими повреждениями справляться. С излагаемой нами теорией героуспеха согласуется замечание Sacher [89], что важен не уровень метаболизма, а его качество (степень его оптимальности). По-видимому, нужно признать, что уровень метаболизма не является решающим фактором в эволюции старения.

Молекулярные повреждения любой природы (будь то производство свободных радикалов, утрата теломер, производство цитокинов стареющими клетками или повреждения ДНК) должны накапливаться быстрее при интенсивном метаболизме. Но эволюционная судьба вида, т.е. то, с какой скоростью он в итоге будет стареть, по-видимому, определяется не столько темпом накопления повреждений, сколько силой отбора на способность с этими повреждениями бороться, включающей, помимо систем репарации и антиоксидантной защиты [91, 60, 97, 92, 93, 99, 100], контроля производства АФК митохондриями [39, 96], наличие чрезвычайно разнообразных (начиная уже с одно-клеточных) путей клеточной гибели, позволяющих выбраковывать сенесцентные и склонные к трансформации клетки [34, 101, 102]. В этом смысле эволюция сильнее биохимии. Так, факторами, влияющими на скорость старения и ПЖ тетрапод, являются температура окружающей среды, наличие защитных приспособлений, возраст начала размножения и плодовитость; но исключительное долголетие черепах (в отличие от млекопитающих), судя по всему, связано с первую очередь

не с низким уровнем метаболизма, развитым мозгом или социальностью, а с наличием защитных структур (панцирем), которые обеспечивают им защиту от хищников. Следует, однако, еще раз отметить представление об эффективности героуспеха: факторы, чрезвычайно благоприятные для ПЖ одних тетрапод, не обязательно будут столь же благоприятны для других. Так, у снабженных панцирями броненосцев (Mammalia, Cingulata) один из простейших показателей эффективности героуспеха, коэффициент долголетия (ПЖ с поправкой на массу тела) колеблется в интервале от 1,12 до 1,5. Лишь у одного вида, шаровидного броненосца *Tolypeutes matacus*, коэффициент долголетия достигает относительно высокого значения (2,46), приблизительно равного таковому для шимпанзе *Pan troglodytes* (2,70). Чемпионами же по данному показателю (рассчитываемому для млекопитающих) являются голый землекоп (3,68), человек (4,63) и несколько видов ночниц, с наивысшим показателем у ночницы Брандта *Myotis brandtii* (6,43). Совершенствование в первую очередь путей обеспечения безопасности согласуется с защитным путем голых землекопов (обитание в ходах под землей) и рукокрылых (способность к полету также представляет собой один из наилучших способов защиты).

Вклад авторов. Г.А. Шиловский – концепция работы, написание и редактирование текста статьи, подготовка таблиц и рисунков; Т.С. Путяткина и А.В. Марков – написание и редактирование текста статьи, подготовка таблиц и рисунков.

Благодарности. Авторы благодарят доцента кафедры зоологии позвоночных С.В. Огурцова, А.В. Селиверстова и О.С. Лучкину за ценные советы в процессе написания 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. Comfort, A. (1979) *The Biology of Senescence*, Churchill Livingstone, Edinburgh and London.
2. Austad, S. N. (1997) *Why We Age*, John Wiley and Sons, New York.
3. Finch, C. E. (2009) Update on slow aging and negligible senescence – a mini-review, *Gerontology*, **55**, 307-313, <https://doi.org/10.1159/000215589>.
4. Medawar, P. B. (1952) *An Unsolved Problem of Biology*, H. C. Lewis & Co LTD, London.
5. Williams, G. C. (1957) Pleiotropy, natural selection and the evolution of senescence, *Evolution*, **11**, 398-411, <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1957.tb02911.x>.
6. Kirkwood, T. B. L. (1977) Evolution of ageing, *Nature*, **270**, 301-304, <https://doi.org/10.1038/270301a0>.
7. Rando, T. A., and Chang, H. Y. (2012) Aging, rejuvenation, and epigenetic reprogramming: resetting the aging clock, *Cell*, **148**, 46-57, doi 10.1016/j.cell.2012.01.003.

8. Skulachev, M. V., and Skulachev, V. P. (2014) New data on programmed aging – slow phenoptosis, *Biochemistry (Moscow)*, **79**, 977-993, <https://doi.org/10.1134/S0006297914100010>.
9. Vaupel, J. W., Baudisch, A., Dölling, M., Roach, D. A., and Gampe, J. (2004) The case for negative senescence, *Theor. Popul. Biol.*, **65**, 339-351, <https://doi.org/10.1016/j.tpb.2003.12.003>.
10. Jones, O. R., Scheuerlein, A., Salguero-Gómez, R., Camarda, C. G., Schaible, R., Schaible, R., Casper, B. B., Dahlgren, J. P., Ehrlén, J., García, M. B., Menges, E., Quintana-Ascencio, P. F., Caswell, H., Baudisch, A., and Vaupel, J. W. (2014) Diversity of ageing across the tree of life, *Nature*, **505**, 169-173, <https://doi.org/10.1038/nature12789>.
11. Lemoine, M. (2021) The evolution of the hallmarks of aging, *Front. Genet.*, **12**, 693071, <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.693071>.
12. Martínez, D. E. (1998) Mortality patterns suggest lack of senescence in hydra, *Exp. Gerontol.*, **33**, 217-225, [https://doi.org/10.1016/s0531-5565\(97\)00113-7](https://doi.org/10.1016/s0531-5565(97)00113-7).
13. Bilinski, T., Bylak, A., and Zdrag-Tecza, R. (2016) Principles of alternative gerontology, *Aging (Albany NY)*, **8**, 589-602, <https://doi.org/10.18632/aging.100931>.
14. Bilinski, T., Bylak, A., Kukuła, K., and Zdrag-Tecza, R. (2021) Senescence as a trade-off between successful land colonisation and longevity: critical review and analysis of a hypothesis, *PeerJ*, **9**, e12286, <https://doi.org/10.7717/peerj.12286>.
15. Shilovsky, G. A., Putyatina, T. S., and Markov, A. V. (2022) Evolution of longevity as a species-specific trait in mammals, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 1579-1599, <https://doi.org/10.1134/S0006297922120148>.
16. Martinez, D. E., and Levinton, J. S. (1992) Asexual metazoans undergo senescence, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 9920-9923, <https://doi.org/10.1073/pnas.89.20.9920>.
17. Healy, K., Ezard, T. H. G., Jones, O. R., Salguero-Gómez, R., and Buckley, Y. M. (2019) Animal life history is shaped by the pace of life and the distribution of age-specific mortality and reproduction, *Nat. Ecol. Evol.*, **3**, 1217-1224, <https://doi.org/10.1038/s41559-019-0938-7>.
18. Hoekstra, L. A., Schwartz, T. S., Sparkman, A. M., Miller, D. A. W., and Bronikowski, A. M. (2020) The untapped potential of reptile biodiversity for understanding how and why animals age, *Funct. Ecol.*, **34**, 38-54, <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13450>.
19. Dart, A. (2022) Peto's paradox put to the test, *Nat. Rev. Cancer*, **22**, 129, <https://doi.org/10.1038/s41568-022-00447-4>.
20. De Magalhães, J. P., and Costa, J. (2009) A database of vertebrate longevity records and their relation to other life-history traits, *J. Evol. Biol.*, **22**, 1770-1774, <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2009.01783.x>.
21. Martin, F. J., Amode, M. R., Aneja, A., Austine-Orimoloye, O., Azov, A. G., Azov, A. G., Barnes, I., Becker, A., Bennett, R., Berry, A., Bhai, J., Bhurji, S. K., Bignell, A., Boddu, S., Branco Lins, P. R., Brooks, L., Ramaraju, S. B., Charkhchi, M., Cockburn, A., Da Rin Fiorretto, L., Davidson, C., Dodiya, K., Donaldson, S., El Houdaigui, B., El Naboulsi, T., et al. (2023) Ensembl 2023, *Nucleic Acids Res.*, **51**, 933-941, <https://doi.org/10.1093/nar/gkac958>.
22. Nielsen, J., Hedeholm R. B., Heinemeier J., Bushnell P. G., Christiansen J. S., Olsen J., Ramsey C. B., Brill R. W., Simon M., Steffensen K. F., and Steffensen J. F. (2016) Eye lens radiocarbon reveals centuries of longevity in the Greenland shark (*Somniosus microcephalus*), *Science*, **353**, 702-704, <https://doi.org/10.1126/science.aaf1703>.
23. Congdon, J. D., Nagle, R. D., Kinney, O. M., van Loben Sels, R. C., Quinter, T., and Tinkle, D. W. (2003) Testing hypotheses of aging in long-lived painted turtles (*Chrysemys picta*), *Exp. Gerontol.*, **38**, 765772, [https://doi.org/10.1016/s0531-5565\(03\)00106-2](https://doi.org/10.1016/s0531-5565(03)00106-2).
24. Voituron, Y., De Fraipont, M., Issartel, J., Guillaume, O., and Clobert, J. (2011) Extreme lifespan of the human fish (*Proteus anguinus*): a challenge for ageing mechanisms, *Biol. Lett.*, **7**, 105107, <https://doi.org/10.1098/rsbl.2010.0539>.
25. Kostanjšek, R., Diderichsen, B., Recknagel, H., Gunde-Cimerman, N., Gostinčar, C., Fan, G., Kordiš, D., Trontelj, P., Jiang, H., Bolund, L., and Luo, Y. (2022) Toward the massive genome of *Proteus anguinus*-illuminating longevity, regeneration, convergent evolution, and metabolic disorders, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1507**, 5-11, <https://doi.org/10.1111/nyas.14686>.
26. Voituron, Y., Guillaume, O., Dumet, A., Zahn, S., Criscuolo, F. (2023) Temperature-independent telomere lengthening with age in the long-lived human fish (*Proteus anguinus*), *Proc. Biol. Sci.*, **290**, 20230503, <https://doi.org/10.1098/rspb.2023.0503>.
27. Delhaye, J., Salamin, N., Roulin, A., Criscuolo, F., Bize, P., and Christe, P. (2016) Interspecific correlation between red blood cell mitochondrial ROS production, cardiolipin content and longevity in birds, *Age (Dordr)*, **38**, 433-443, <https://doi.org/10.1007/s11357-016-9940-z>.
28. Amir, Y., Insler, M., Giller, A., Gutman, D., and Atzmon, G. (2020) Senescence and longevity of sea urchins, *Genes (Base)*, **11**, 573, <https://doi.org/10.3390/genes11050573>.
29. Medina-Feliciano, J. G., and García-Arrarás, J. E. (2021) Regeneration in echinoderms: molecular advancements, *Front. Cell. Dev. Biol.*, **9**, 768641, <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.768641>.
30. Korotkova, D. D., Lyubetsky, V. A., Ivanova, A. S., Rubanov, L. I., Seliverstov, A. V., Zverkov, O. A., Martynova, N. Y., Nesterenko, A. M., Tereshina, M. B., Peshkin, L., and Zaraisky, A. G. (2019) Bioinformatics screening of genes specific

- for well-regenerating vertebrates reveals c-answer, a regulator of brain development and regeneration, *Cell Rep.*, **29**, 1027-1040.e6, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.09.038>.
31. Kolora, S. R. R., Owens, G. L., Vazquez, J. M., Stubbs, A., Chatla, K., Jainese, C., Seeto, K., McCrea, M., Sandel, M. W., Vianna, J. A., Maslenikov, K., Bachtrog, D., Orr, J. W., Love, M., and Sudmant, P. H. (2021) Origins and evolution of extreme life span in Pacific Ocean rockfishes, *Science*, **374**, 842-847, <https://doi.org/10.1126/science.abg5332>.
 32. Reinke, B. A., Cayuela, H., Janzen, F. J., Lemaître, J. F., Gaillard, J. M., Lawing, A. M., Iverson, J. B., Christiansen, D. G., Martínez-Solano, I., Sánchez-Montes, G., Gutiérrez-Rodríguez, J., Rose, F. L., Nelson, N., Keall, S., Crivelli, A. J., Nazirides, T., Grimm-Seyfarth, A., Henle, K., et al. (2022) Diverse aging rates in ectothermic tetrapods provide insights for the evolution of aging and longevity, *Science*, **376**, 1459-1466, <https://doi.org/10.1126/science.abm0151>.
 33. Skulachev, V. P., Holtze, S., Vyssokikh, M. Y., Bakeeva, L. E., Skulachev, M. V., Markov, A. V., Hildebrandt, T. B., and Sadovnichii, V. A. (2017) Neoteny, prolongation of youth: From naked mole rats to “naked apes” (humans), *Physiol. Rev.*, **97**, 699-720, <https://doi.org/10.1152/physrev.00040.2015>.
 34. Skulachev, V. P., Shilovsky, G. A., Putyatina, T. S., Popov, N. A., Markov, A. V., Skulachev, M. V., and Sadovnichii, V. A. (2020) Perspectives of *Homo sapiens* lifespan extension: focus on external or internal resources? *Aging (Albany NY)*, **12**, 5566-5584, <https://doi.org/10.18632/aging.102981>.
 35. Wilkinson, P. M., Rainwater, T. R., Woodward, A. R., Leone, E. H., and Carter, C. (2016) Determinate growth and reproductive lifespan in the American alligator (*Alligator mississippiensis*): evidence from long-term recaptures, *Copeia*, **104**, 843-852, <https://doi.org/10.1643/CH-16-430>.
 36. Moreira, M. O., Qu, Y. F., and Wiens, J. J. (2021) Large-scale evolution of body temperatures in land vertebrates, *Evol. Lett.*, **5**, 484-494, <https://doi.org/10.1002/evl3.249>.
 37. Clarke, A., and Pörtner, H. O. (2010) Temperature, metabolic power and the evolution of endothermy, *Biol. Rev.*, **85**, 703-727, <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2010.00122.x>.
 38. Skulachev, M. V., Severin, F. F., and Skulachev, V. P. (2015) Aging as an evolvability-increasing program which can be switched off by organism to mobilize additional resources for survival, *Curr. Aging Sci.*, **8**, 95-109, <https://doi.org/10.2174/1874609808666150422122401>.
 39. Skulachev, V. P., Vyssokikh, M. Y., Chernyak, B. V., Averina, O. A., Andreev-Andrievskiy, A. A., Zinovkin, R. A., Lyamzaev, K. G., Marey, M. V., Egorov, M. V., Frolova, O. J., Zorov, D. B., Skulachev, M. V., and Sadovnichii, V. A. (2023) Mitochondrion-targeted antioxidant SkQ1 prevents rapid animal death caused by highly diverse shocks, *Sci. Rep.*, **13**, 4326, <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31281-31289>.
 40. Skulachev, V. P., Vyssokikh, M. Y., Chernyak, B. V., Mulikidjanian, A. Y., Skulachev, M. V., Shilovsky, G. A., Lyamzaev, K. G., Borisov, V. B., Severin, F. F., and Sadovnichii, V. A. (2023) Six functions of respiration: isn't it time to take control over ROS production in mitochondria, and aging along with it? *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 12540, <https://doi.org/10.3390/ijms241612540>.
 41. Patnaik, B. K. (1994) Ageing in reptiles, *Gerontology*, **40**, 200-220, <https://doi.org/10.1159/000213588>.
 42. Alvarez, J. A., and Vaupel, J. W. (2023) Mortality as a function of survival, *Demography*, **60**, 327-342, <https://doi.org/10.1215/00703370-10429097>.
 43. da Silva, R., Conde, D. A., Baudisch, A., and Colchero, F. (2022) Slow and negligible senescence among testudines challenges evolutionary theories of senescence, *Science*, **376**, 1466-1470, <https://doi.org/10.1126/science.abl7811>.
 44. Frýdlová, P., Mrzilková, J., Šeremeta, M., Křemen, J., Dudák, J., Žemlička, J., Minnich, B., Kverková, K., Němec, P., Zach, P., and Frynta, D. (2020) Determinate growth is predominant and likely ancestral in squamate reptiles, *Proc. Biol. Sci.*, **287**, 20202737, <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.2737>.
 45. Sparkman, A. M., Arnold, S. J., and Bronikowski, A. M. (2007) An empirical test of evolutionary theories for reproductive senescence and reproductive effort in the garter snake *Thamnophis elegans*, *Proc. Biol. Sci.*, **274**, 943-950, <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.0072>.
 46. Kara, T. C. (1994) Ageing in amphibians, *Gerontology*, **40**, 161-173, <https://doi.org/10.1159/000213585>.
 47. Jiang, Y., Zhao, L., Luan, X., and Liao, W. (2022) Geographical variation in body size and the Bergmann's rule in Andrew's toad (*Bufo andrewsi*), *Biology (Basel)*, **11**, 1766, <https://doi.org/10.3390/biology11121766>.
 48. Miller, J. K. (2001) Escaping senescence: demographic data from the threetoed box turtle (*Terrapene carolina triunguis*), *Exp. Gerontol.*, **36**, 829-832.
 49. Warner, D. A., Miller, D. A., Bronikowski, A. M., and Janzen, F. J. (2016) Decades of field data reveal that turtles senesce in the wild, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 6502-6507, <https://doi.org/10.1073/pnas.1600035113>.
 50. Bronikowski, A. M., Hedrick, A. R., Kutz, G. A., Holden, K. G., Reinke, B., and Iverson, J. B. (2023) Sex-specific innate immunity and ageing in long-lived fresh water turtles (*Kinosternon flavescens*: Kinosternidae), *Immun. Ageing*, **20**, 11, <https://doi.org/10.1186/s12979-023-00335-x>.
 51. Cayuela, H., Akani, G. C., Hema, E. M., Eniang, E. A., Amadi, N., Ajong, S. N., Dendi, D., Petrozzi, F., and Luiselli, L. (2019) Life history and age-dependent mortality processes in tropical reptiles, *Biol. J. Linn. Soc. Lond.*, **128**, 251-262, <https://doi.org/10.1093/biolinnean/blz103>.

52. Shilovsky, G. A., Putyatina, T. S., Markov, A. V., and Skulachev, V. P. (2015) Contribution of quantitative methods of estimating mortality dynamics to explaining mechanisms of aging, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 1547-1559, <https://doi.org/10.1134/S0006297915120020>.
53. Shilovsky, G. A., Putyatina, T. S., Ashapkin, V. V., Luchkina, O. S., and Markov, A. V. (2017) Coefficient of variation of lifespan across the tree of life: is it a signature of programmed aging? *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 1480-1492, <https://doi.org/10.1134/S0006297917120070>.
54. Gavrilova, N. S., Gavrilov, L. A., Severin, F. F., and Skulachev, V. P. (2012) Testing predictions of the programmed and stochastic theories of aging: comparison of variation in age at death, menopause, and sexual maturation, *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 754-760, <https://doi.org/10.1134/S0006297912070085>.
55. Finch, C. E., and Tanzi, R. E. (1997) Genetics of aging, *Science*, **278**, 407-411, <https://doi.org/10.1126/science.278.5337.407>.
56. Bronikowski, A. M. (2008) The evolution of aging phenotypes in snakes: a review and synthesis with new data, *Age (Dordr)*, **30**, 169-176, <https://doi.org/10.1007/s11357-008-9060-5>.
57. Robert, K. A., and Bronikowski, A. M. (2010) Evolution of senescence in nature: physiological evolution in populations of garter snake with divergent life histories, *Am. Nat.*, **175**, 147-159, <https://doi.org/10.1086/649595>.
58. Olsson, M., Wapstra, E., and Friesen, C. (2018) Ectothermic telomeres: it's time they came in from the cold, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **373**, 20160449, <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0449>.
59. Holtze, S., Gorshkova, E., Braude, S., Cellerino, A., Dammann, P., Hildebrandt, T. B., Hoeflich, A., Hoffmann, S., Koch, P., Terzibas Tozzini, E., Skulachev, M., Skulachev, V. P., and Sahn, A. (2021) Alternative animal models of aging research, *Front. Mol. Biosci.*, **8**, 660959, <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.660959>.
60. Omotoso, O., Gladyshev, V. N., and Zhou, X. (2021) Lifespan extension in long-lived vertebrates rooted in ecological adaptation, *Front. Cell. Dev. Biol.*, **9**, 704966, <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.704966>.
61. Botha, J., Weiss, B. M., Dollman, K., Barrett, P. M., Benson, R. B. J., and Choiniere, J. N. (2023) Origins of slow growth on the crocodylian stem lineage, *Curr. Biol.*, **8**, S0960-9822(23)01137-5, <https://doi.org/10.1016/j.cub.2023.08.057>.
62. Ripple, W. J., Newsome, T. M., Wolf, C., Dirzo, R., Everatt, K. T., Galetti, M., Hayward, M. W., Kerley, G. I., Levi, T., Lindsey, P. A., Macdonald, D. W., Malhi, Y., Painter, L. E., Sandom, C. J., Terborgh, J., and Van Valkenburgh, B. (2015) Collapse of the world's largest herbivores, *Sci. Adv.*, **1**, e1400103, <https://doi.org/10.1126/sciadv.1400103>.
63. Fraser, D., Villasenor, A., Toth, A. B., Balk, M. A., Eronen, J. T., Andrew Barr, W., Behrensmeyer, A. K., Davis, M., Du, A., Tyler Faith, J., Graves, G. R., Gotelli, N. J., Jukar, A. M., Looy, C. V., McGill, B. J., Miller, J. H., Pineda-Munoz, S., Potts, R., Shupinski, A. B., Soul, L. C., and Kathleen Lyons, S. (2022) Late quaternary biotic homogenization of North American mammalian faunas, *Nat. Commun.*, **13**, 3940, <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31595-8>.
64. Stockdale, M. T., Benton, M. J. (2021) Environmental drivers of body size evolution in crocodile-line archosaurs, *Commun. Biol.*, **4**, 38, <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01561-5>.
65. Legendre, L. J., Guénard, G., Botha-Brink, J., and Cubo, J. (2016) Palaeohistological evidence for ancestral high metabolic rate in archosaurs, *Syst. Biol.*, **65**, 989-996, <https://doi.org/10.1093/sysbio/syw033>.
66. Wiemann, J., Menéndez, I., Crawford, J. M., Fabbri, M., Gauthier, J.A., Hull, P. M., Norell, M. A., and Briggs, D. E. G. (2022) Fossil biomolecules reveal an avian metabolism in the ancestral dinosaur, *Nature*, **606**, 522-526, <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04770-6>.
67. Шмальгаузен И. И. (1982) Организм как целое в индивидуальном и историческом развитии, *Избранные труды*, Наука, Москва.
68. Edmonds, D., Dreslik, M. J., Lovich, J. E., Wilson, T. P., and Ernst, C. H. (2021) Growing as slow as a turtle: Unexpected maturational differences in a small, long-lived species, *PLoS One*, **16**, e0259978, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259978>.
69. Omeyer, L. C. M., Fuller, W. J., Godley, B. J., Snape, R. T. E., and Broderick, A. C. (2018) Determinate or indeterminate growth? Revisiting the growth strategy of sea turtles, *Marine Ecology Progress Series*, **596**, 199-211, <https://doi.org/10.3354/meps12570>.
70. Hariharan, I. K., Wake D. B., and Wake, M. H. (2015) Indeterminate growth: could it represent the ancestral condition? *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **8**, a019174, <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019174>.
71. Derocher, A. E., and Wiig, O. (2002) Postnatal growth in body length and mass of polar bears (*Ursus maritimus*) at Svalbard, *J. Zool.*, **256**, 343-349, <https://doi.org/10.1017/S0952836902000377>.
72. McKenzie, J., Page, B., Goldsworthy, S. D. and Hindell, M. A. (2007) Growth strategies of New Zealand fur seals in southern Australia, *J. Zool.*, **272**, 377-389, <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2006.00278.x>.
73. Mumby, H. S., Chapman, S. N., Crawley, J. A. H., Mar, K. U., Htut, W., Soe, A. T., Aung, H. H. and Lummaa, V. (2015) Distinguishing between determinate and indeterminate growth in a long-lived mammal, *BMC Evol. Biol.*, **15**, 214, <https://doi.org/10.1186/s12862-015-0487-x>.
74. Shine, R. and Charnov, E. L. (1992) Patterns of survival, growth, and maturation in snakes and lizards, *Am. Naturalist*, **139**, 1257-1269, <https://doi.org/10.1086/285385>.

75. Shine, R., and Iverson, J. B. (1995) Patterns of survival, growth and maturation in turtles, *Oikos*, **72**, 343-348, <https://doi.org/10.2307/3546119>.
76. Harris, R. J., and Arbuckle, K. (2016) Tempo and mode of the evolution of venom and poison in tetrapods, *Toxins (Basel)*, **8**, 193, <https://doi.org/10.3390/toxins8070193>.
77. Stark, G. (2022) Large and expensive brain comes with a short lifespan: the relationship between brain size and longevity among fish taxa, *J. Fish. Biol.*, **101**, 92-99, <https://doi.org/10.1111/jfb.15074>.
78. Stark, G., and Pincheira-Donoso, D. (2022) The evolution of brain size in ectothermic tetrapods: large brain mass trades-off with lifespan in reptiles, *Evol. Biol.*, **49**, 180-188, <https://doi.org/10.1007/s11692-022-09562-4>.
79. Yu, X., Zhong, M. J., Li, D. Y., Jin, L., Liao, W. B., and Kotrschal, A. (2018) Large-brained frogs mature later and live longer, *Evolution*, **72**, 1174-1183, <https://doi.org/10.1111/evo.13478>.
80. 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.
81. Lidsky, P. V., Yuan, J., Rulison, J. M., and Andino-Pavlovsky, R. (2022) Is aging an inevitable characteristic of organic life or an evolutionary adaptation? *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 1413-1445, <https://doi.org/10.1134/S0006297922120021>.
82. Bronikowski, A., and Vleck, D. (2010) Metabolism, body size and life span: a case study in evolutionarily divergent populations of the garter snake (*Thamnophis elegans*), *Integr. Comp. Biol.*, **50**, 880-887, <https://doi.org/10.1093/icb/icq132>.
83. Dammann, P., Šaffa, G., and Šumbera, R. (2022) Longevity of a solitary mole-rat species and its implications for the assumed link between sociality and longevity in African mole-rats (Bathyergidae), *Biol. Lett.*, **18**, 20220243, <https://doi.org/10.1098/rsbl.2022.0243>.
84. Burgin, C. J., Colella, J. P., Kahn, P. L., and Upham, N. S. (2018) How many species of mammals are there? *J. Mammal.*, **99**, 1-14, <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyx147>.
85. Giaimo, S., and Traulsen, A. (2022) The selection force weakens with age because ageing evolves and not vice versa, *Nat. Commun.*, **13**, 686, <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28254-3>.
86. Prum, R. O., Berv, J. S., Dornburg, A., Field, D. J., Townsend, J. P., Lemmon, E. M., and Lemmon, A. R. (2015) A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted next-generation DNA sequencing, *Nature*, **526**, 569-573, <https://doi.org/10.1038/nature15697>.
87. Rotger, A., Tenan, S., Igual, J. M., Bonner, S., and Tavecchia, G. (2023) Life span, growth, senescence and island syndrome: Accounting for imperfect detection and continuous growth, *J. Anim. Ecol.*, **9**, 183-194, <https://doi.org/10.1111/1365-2656.13842>.
88. Van Schaik, C. P., Song, Z., Schuppli, C., Drobnik, S. M., Heldstab, S. A., Griesser, M. (2023) Extended parental provisioning and variation in vertebrate brain sizes, *PLoS Biol.*, **21**, e3002016, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002016>.
89. Sacher, G. A. (1968) Molecular versus systemic theories on the genesis of ageing, *Exp. Gerontol.*, **3**, 265-271, [https://doi.org/10.1016/0531-5565\(68\)90011-9](https://doi.org/10.1016/0531-5565(68)90011-9).
90. Knope, M. L., Bush, A. M., Frishkoff, L. O., Heim, N. A., and Payne, J. L. (2020) Ecologically diverse clades dominate the oceans via extinction resistance, *Science*, **367**, 1035-1038, <https://doi.org/10.1126/science.aax6398>.
91. Lewis, K. N., Wason, E., Edrey, Y. H., Kristan, D. M., Nevo, E., and Buffenstein, R. (2015) Regulation of Nrf2 signaling and longevity in naturally long-lived rodents, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 3722-3727, <https://doi.org/10.1073/pnas.1417566112>.
92. Shilovsky, G. A., Shram, S. I., Morgunova, G. V., and Khokhlov, A. N. (2017) Protein poly(ADP-ribosyl)ation system: Changes in development and aging as well as due to restriction of cell proliferation, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 1391-1401, <https://doi.org/10.1134/S0006297917110177>.
93. Shilovsky, G. A. (2022) Lability of the Nrf2/Keap/ARE cell defense system in different models of cell aging and age-related pathologies, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 70-85, <https://doi.org/10.1134/S0006297922010060>.
94. Jové, M., Mota-Martorell, N., Fernández-Bernal, A., Portero-Otin, M., Barja, G., and Pamplona R. (2023) Phenotypic molecular features of long-lived animal species, *Free Radic. Biol. Med.*, **208**, 728-747, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2023.09.023>.
95. Rafikova, E., Nemirovich-Danchenko, N., Ogmen, A., Parfenenkova, A., Velikanova, A., Tikhonov, S., Peshkin, L., Rafikov, K., Spiridonova, O., Belova, Y., Glinin, T., Egorova, A., and Batin, M. (2023) Open Genes – a new comprehensive database of human genes associated with aging and longevity, *Nucleic Acids Res.*, **gkad712**, <https://doi.org/10.1093/nar/gkad712>.
96. Vyssokikh, M. Y., Holtze, S., Averina, O. A., Lyamzaev, K. G., Panteleeva, A. A., Marey, M. V., Zinovkin, R. A., Severin, F. F., Skulachev, M. V., Fasel, N., Hildebrandt, T. B., and Skulachev, V. P. (2020) Mild depolarization of the inner mitochondrial membrane is a crucial component of an antiaging program, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 64916501, <https://doi.org/10.1073/pnas.1916414117>.

97. Odeh, A., Eddini, H., Shawasha, L., Chaban, A., Avivi, A., Shams, I., and Manov, I. (2023) Senescent secretome of blind mole rat *Spalax* inhibits malignant behavior of human breast cancer cells triggering bystander senescence and targeting inflammatory response, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 5132, <https://doi.org/10.3390/ijms24065132>.
98. Yakovleva, E. U., Naimark, E. B., and Markov, A. V. (2016) Adaptation of *Drosophila melanogaster* to unfavorable growth medium affects lifespan and age-related fecundity, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 1445-1460, <https://doi.org/10.1134/S0006297916120063>.
99. Jacobs, P. J., Hart, D. W., Merchant, H. N., Voigt, C. and Bennett, N. C. (2023) The evolution and ecology of oxidative and antioxidant status: a comparative approach in African mole-rats, *Antioxidants (Basel)*, **12**, 1486, <https://doi.org/10.3390/antiox12081486>.
100. Tyshkovskiy, A., Ma, S., Shindyapina, A. V., Tikhonov, S., Lee, S. G., Bozaykut, P., Castro, J. P., Seluanov, A., Schork, N. J., Gorbunova, V., Dmitriev, S. E., Miller, R. A., and Gladyshev, V. N. (2023) Distinct longevity mechanisms across and within species and their association with aging, *Cell*, **186**, 2929-2949.e20, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.05.002>.
101. Grosfeld, E. V., Bidiuk, V. A., Mitkevich, O. V., Ghazy, E. S. M. O., Kushnirov, V. V., and Alexandrov, A. I. (2021) A systematic survey of characteristic features of yeast cell death triggered by external factors, *J. Fungi (Basel)*, **7**, 886, <https://doi.org/10.3390/jof7110886>.
102. Khan, I., Yousif, A., Chesnokov, M., Hong, L., and Chefetz, I. (2021) A decade of cell death studies: breathing new life into necroptosis, *Pharmacol. Ther.*, **220**, 107717, <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107717>.

EVOLUTION OF LONGEVITY IN TETRAPODA: SAFETY IS MORE IMPORTANT THAN METABOLISM LEVEL

G. A. Shilovsky^{1,2,3*}, T. S. Putyatina², and A. V. Markov²

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 (Kharkevich Institute), Russian Academy of Sciences,
127051 Moscow, Russia

Various environmental morphological and behavioral factors may be decisive in the longevity of representatives of various taxa. Long-lived species develop systems aimed at increasing the body's stability and defense, and ultimately increasing life expectancy. In addition, long-living species are characterized by different levels of manifestation of factors favorable to longevity (gerontological success): body size, slow metabolism, level of activity of the body's repair systems and antioxidant defense systems, resistance to toxic substances and tumor formation, and the presence of neotenic characteristics. Continuing the work on mammals, in this work we studied the characteristics that distinguish long-lived ectotherms (crocodiles and turtles) and compared them with those of other representatives of ectotherms (squamates and amphibians) and endotherms (birds and mammals). The article also discusses mathematical indicators used to assess the predisposition to longevity in different species. These indicators include both standard ones (mortality rate, maximum lifespan, coefficient of variation of lifespan) and derivatives from them. Evolutionary patterns of aging are further explained by protective phenotypes and life history strategies. The work assessed the relationship between lifespan and various studied factors, including body size and temperature, encephalization, protection of occupied niches, the presence of protective structures (for example, shell and osteoderms), environmental temperature, etc.), and their influence on the distribution of lifespan as a statistical quantities. The hypothesis about the level of metabolism and temperature as the most determining factors of longevity was not confirmed. It turned out that animals protected by shells (turtles with their exceptional longevity) live longer than species that have poison or lack protective devices. The improvement of methods of defense against external threats in long-lived ectotherms is consistent with the characteristics of long-lived endotherms (for example, naked mole rats that live in tunnels underground, or bats and birds, whose ability to fly is also one of the best methods of defense).

Keywords: evolution, longevity, aging, lifespan, reptiles, amphibians, phenoptosis, anti-aging programs, oxidative stress, gerosuccess

ИЗУЧЕНИЕ СМЕРТНОСТИ И СТАРЕНИЯ ЧЕЛОВЕКА С ТОЧКИ ЗРЕНИЯ ТЕОРИИ НАДЁЖНОСТИ

Обзор

© 2024 Л.А. Гаврилов^{1,2*}, Н.С. Гаврилова^{1,2}

¹ NORC at the University of Chicago, 60637 Chicago, IL, USA

² Институт демографических исследований, ФНИСЦ РАН,
109028 Москва, Россия; электронная почта: lagavril@yahoo.com

Поступила в редакцию 14.12.2023

После доработки 27.01.2024

Принята к публикации 28.01.2024

Важнейшим проявлением старения является повышение риска смерти с возрастом, что характеризуется эмпирическими закономерностями, известными как законы смертности. Мы выделяем три наиболее важных закономерности: закон Гомперца, компенсационный эффект смертности (КЭС) и замедление роста смертности в конце жизни, а также описываем новые разработки в этой области. Сделано предсказание, что КЭС приводит к снижению относительной вариабельности смертности в старших возрастах. Гипотеза фазы покоя о незначительном актуарном старении в более молодом возрасте проверена и опровергнута путём анализа смертности более современных когорт рождения. Для понимания механизмов старения очень важно объяснить наблюдаемые эмпирические закономерности смертности. В качестве наглядного примера моделирования, ориентированного на данные, и тех знаний, которые оно даёт, мы кратко описываем две различные надёжностные модели, применённые к смертности людей. Объяснение старения с помощью теории надёжности согласуется с эволюционными теориями старения, включая идею хронического феноптоза. Это соответствие обусловлено тем, что надёжностные модели сосредоточены на выяснении самого процесса деградации организма, а не на рассмотрении причин, по которым организмы не предназначены для вечного существования. Эта статья входит в специальный выпуск журнала, посвящённый наследию выдающегося российского учёного Владимира Петровича Скулачёва (1935–2023) и его смелым идеям об эволюции биологического старения и феноптозе.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: старение, смертность, модель Гомперца, компенсационный эффект смертности, замедление смертности, надёжностная теория старения, эволюционные модели старения.

DOI: 10.31857/S0320972524020117 EDN: XMEYAS

ВВЕДЕНИЕ

Растущий интерес к разгадке механизмов старения подчёркивает необходимость создания всеобъемлющей теоретической базы. Объём эмпирических данных о старении значительно возрос, что отражает существенное расширение наших представлений о процессах старения. Изучение отдельных генов и молекул для понимания механизмов, модулирующих старение, действительно достигло значительного прогресса. Исследователи добились успехов в определении факторов, уча-

ствующих в процессе старения. Однако проблема заключается в том, чтобы понять, как эти различные факторы взаимодействуют в более широком масштабе, влияя на процессы старения. Хотя мы можем точно определить конкретные гены, пути метаболизма и молекулы, объединение этих элементов в комплексное понимание старения, включая появление функциональных фенотипов, таких как законы смертности, остаётся сложной задачей [1].

Эволюционные теории могут дать более широкое понимание феномена старения. До недавнего времени среди геронтологов существовал консенсус о том, что не существует определённой программы старения, поскольку такая программа не могла появиться из-за того, что подавляющее

Принятые сокращения: КЭС – компенсационный эффект смертности.

* Адресат для корреспонденции.

большинство животных в дикой природе и людей в прошлом не доживали до преклонного возраста [2–4]. Однако в последнее десятилетие эта точка зрения была пересмотрена, и теперь появилось больше аргументов в пользу того, что старение – это программа. Среди исследователей, продвигавших идею запрограммированного старения, был Владимир Петрович Скулачев. Он попытался реанимировать теорию Вейсмана о запрограммированной смерти, предложив существование отдельной программы самоуничтожения для целых организмов, названной «феноптозом» [5–7]. Считается, что эта программа выполняет «важнейшие функции, очищая сообщества организмов от нежелательных особей» [7]. Таким образом, эволюционная теория запрограммированной смерти Вейсмана продолжает оставаться предметом научных дебатов и исследований. Более того, среди геронтологов набирают популярность идеи о неблагоприятной роли с точки зрения эволюции, которую играют пожилые люди в популяции, накапливая инфекции [6, 8]. Тем не менее теории и гипотезы о запрограммированном старении в основном проясняют причины, по которым организмы по своей природе не предназначены для вечной жизни, но не объясняют сам процесс возрастной деградации.

Основное ограничение эволюционных теорий старения заключается в том, что они опираются на концепцию естественного отбора и уменьшения его влияния с возрастом. Однако старение наблюдается и в нерепродуцирующих технических системах, таких как автомобили, которые лишены способности к воспроизводству самих себя и поэтому не подвержены эволюции, обусловленной естественным отбором.

Понимание этого более широкого контекста побуждает нас к поиску более универсальных объяснений старения, выходящих за рамки эволюционных теорий. Помимо всеобъемлющих концепций, существует острая необходимость в изучении эмпирических закономерностей старения и смертности, часто называемых законами смертности. Это стремление направлено на обеспечение комплексного понимания феномена старения, выходящего за рамки традиционных эволюционных представлений.

В этом контексте мы рассматриваем известные законы смертности наряду с последними достижениями в области биодемографии старения. Существующие закономерности смертности и старения рассматриваются через призму теории надёжности. Кроме того, в рамках этой дискуссии представлены дальнейшие разработки в области надёжностных моделей старения, способствующие более глубокому пониманию механизмов, формирующих процесс старения.

ЗАКОНЫ СМЕРТНОСТИ В БИОЛОГИИ СТАРЕНИЯ И ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ

Для более точного понимания механизмов, лежащих в основе старения организма, мы можем рассмотреть закономерности смертности, которые часто называют законами смертности. Здесь мы исходим из определения старения, применяемого в теории надёжности, которая рассматривает старение как процесс, ведущий к увеличению риска смерти с возрастом [9]. В экологии этот процесс называют также актуарным старением [10].

Уравнение Гомперца–Мейкема. В 1825 г. британский актуарий Бенджамин Гомперц открыл закон смертности, ныне известный как закон Гомперца [2, 11–13]. Согласно закону Гомперца, смертность взрослого человека удваивается примерно каждые 8 лет возраста:

$$\mu(x) = Re^{\alpha x}, \quad (1)$$

где x – возраст, R и α – параметры (отсекаемый отрезок Гомперца и наклон Гомперца, так как в полулогарифмических координатах данная зависимость представляет собой прямую линию).

Экспоненциальный рост смертности с возрастом наблюдается у многих биологических видов, включая плодовых мушек [2, 14], мучных жуков *Tribolium confusum* [2], мышей [14, 15], павианов [16, 17] и других животных. Самое главное, что этот закон описывает смертность людей [2, 11–14, 18, 19].

В реальной жизни смертность организмов может включать в себя как связанные, так и не связанные со старением слагаемые, как это видно из закона смертности Гомперца–Мейкема [2, 11, 13, 19, 20]:

$$\mu(x) = A + Re^{\alpha x}. \quad (2)$$

В этом уравнении начальное, не зависящее от возраста слагаемое (известное как параметр Мейкема, A) означает постоянную, «нестареющую» часть коэффициента смертности, предположительно обусловленную внешними причинами смерти, такими как несчастные случаи и острые инфекции. В биодемографии это не зависящее от возраста слагаемое называется фоновой смертностью (background mortality) [2]. Следующее, зависящее от возраста слагаемое (функция Гомперца, $Re^{\alpha x}$) представляет собой «стареющую» часть смертности, предположительно возникающую в результате возрастных дегенеративных заболеваний, таких как рак и сердечно-сосудистые заболевания. Это связанное со старением слагаемое получило название возрастной смертности (senescent mortality) [21].

Carnes и Olshansky предложили другой способ классификации смертности, используя причины смерти. Смертность от внешних причин смерти и инфекций они назвали внешней смертностью (extrinsic mortality), а смертность от причин, связанных со старением, – внутренней смертностью (intrinsic mortality) [22]. Таким образом, и внешние, и внутренние типы смертности могут зависеть от возраста. Важно отметить, что коэффициент наклона Гомперца α характеризует видимую или актуарную скорость старения, указывая на скорость роста смертности с возрастом. Если α равен нулю, то видимого старения нет, то есть уровень смертности с возрастом остаётся неизменным.

Некоторые авторы предлагают использовать обобщённую форму закона Гомперца–Мейкема (GGM) [23]. В этом альтернативном варианте показатель экспоненты, свидетельствующий о стрессоустойчивости, рассматривается как функция, выходящая за рамки линейной формы. Слагаемое Мейкема, традиционно рассматриваемое как константа, переопределяется так, чтобы быть связанным со смертностью в результате непреодолимых по своей природе стрессов, и зависит от возраста. Эта модификация стандартного закона Гомперца–Мейкема представляет собой более гибкий подход к моделированию смертности [23].

Для технических систем одной из наиболее популярных моделей интенсивности отказов стареющих систем является модель Вейбулла, степенная функция увеличения интенсивности отказов с возрастом [2]:

$$\mu(x) = \alpha x^\beta \text{ для } x \geq 0, \text{ где } \alpha, \beta > 0. \quad (3)$$

Закон Вейбулла, предложенный шведским инженером и математиком В. Вейбуллом в 1939 г. для описания прочности материалов, широко используется для характеристики старения и выхода из строя технических устройств [9]. Он также нашёл применение в изучении смертности некоторых биологических видов, включая нематод *Caenorhabditis elegans* [24–26]. Согласно закону Вейбулла, логарифм частоты отказов линейно увеличивается с логарифмом возраста.

Сравнительный мета-анализ 129 таблиц смертности плодовых мушек и 285 таблиц смертности человека показал, что закон Гомперца более точно описывает данные для каждого из этих двух биологических видов по сравнению с законом Вейбулла [2].

При работе с данными по смертности человека было обнаружено, что смертность женщин в полупологарифмическом масштабе демонстрирует несколько более вогнутую траекторию, чем предсказывает модель Гомперца, а смертность муж-

чин – несколько более выпуклую [2]. Аналогичные отклонения от закона Гомперца описывались и другими исследователями [27]. Дальнейший анализ локальных оценок коэффициента наклона Гомперца с использованием «табличной скорости старения» (life table aging rate, LAR) выявил увеличение LAR после 60 лет в основном среди женщин [28, 29]. Недавно было обнаружено ускорение LAR после 60 лет как для мужчин, так и для женщин, а также для поперечных и когортных данных по смертности на основе современных данных [30]. Несмотря на эти небольшие отклонения, закон Гомперца очень хорошо описывает смертность (см. рис. 1). Действительно, можно наблюдать лишь небольшие колебания смертности вокруг основной траектории Гомперца, в то время как общее направление линии смертности остаётся стабильным. У людей модель Гомперца описывает смертность как для поперечных, так и для когортных данных [31, 32].

В дополнение к широко используемому закону Гомперца и стандартному двухпараметрическому закону Вейбулла был предложен и теоретически обоснован с точки зрения математической теории надёжности ещё один закон смертности, известный как биномиальный закон смертности [2, 9]. Этот закон можно считать частным случаем трёхпараметрической функции Вейбулла:

$$\mu(x) = \alpha (x_0 + x)^\beta. \quad (4)$$

В данном уравнении параметр x_0 называется начальным виртуальным возрастом системы [2, 9, 33]. Этот параметр, измеряемый в единицах времени, представляет собой возраст, к которому исходно идеальная система накопит повреждения, равные повреждениям реальной системы в начальном возрасте ($x = 0$).

Когда система находится в неповреждённом состоянии с начальным виртуальным возрастом, равным нулю, смертность имеет вид степенной функции возраста, что соответствует характеристикам, описанным в законе Вейбулла. Однако по мере накопления начальной повреждающей нагрузки происходит отклонение от закона Вейбулла. Это отклонение становится всё более выраженным с увеличением уровня начальной повреждающей нагрузки, что в конечном итоге приводит к переходу, когда динамика разрушения соответствует квази-Гомперцевскому закону смертности [9].

Компенсационный закон или компенсационный эффект смертности. Другой эмпирической закономерностью, известной как компенсационный эффект смертности (КЭС), является конвергенция смертности в старших возрастах. Это происходит, когда более высокие значения параметра

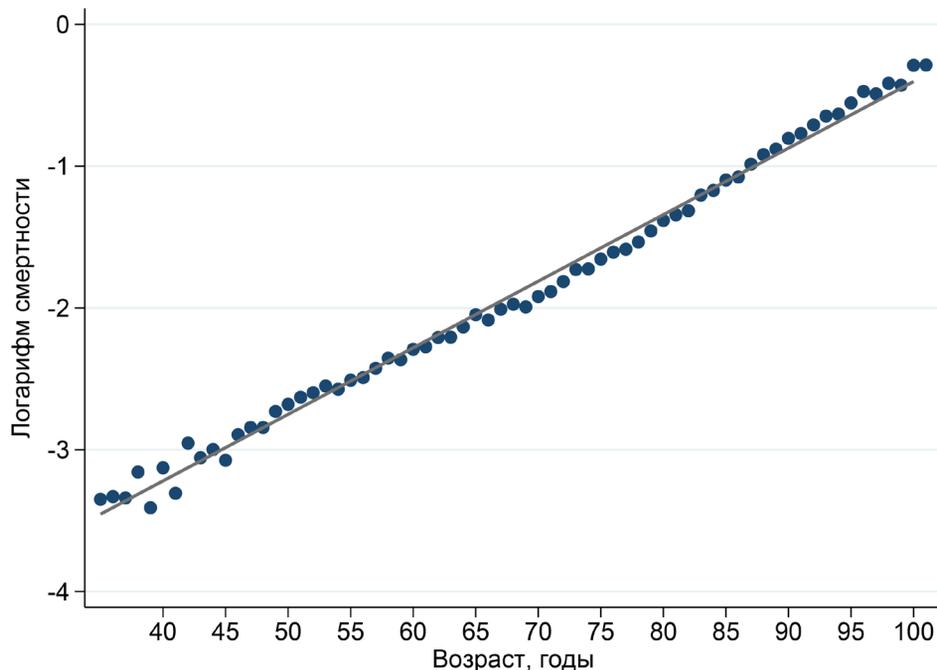


Рис. 1. Смертность женщин Норвегии в 2010 г. в полулогарифмической шкале и её описание линейной функцией в соответствии с законом Гомперца. Источник данных: Human Mortality Database (<https://www.mortality.org>)

наклона α (в функции Гомперца) компенсируются более низкими значениями параметра отсекаемого отрезка R в разных популяциях данного вида:

$$\ln(R) = \ln(M) - B\alpha, \quad (5)$$

где B и M являются видовыми константами.

Эту зависимость иногда называют корреляцией Стрелера–Милдвана [13, 34], хотя данная корреляция была в значительной степени подвержена систематическим ошибкам в оценке параметров из-за игнорирования фоновой смертности или параметра Мейкема, A [2, 20]. Параметр B в формуле (5) называется видовой продолжительностью жизни, а параметр M – видовой смертностью [2, 9, 35]. Недавно оценки параметров B и M , полученные с использованием данных для современных популяций человека, показали, что эти оценки остаются довольно стабильными с течением времени [31, 32]. Эти параметры представляют собой координаты, в которых траектории возрастной смертности для функции Гомперца в полулогарифмических координатах при экстраполяции сходятся в одну точку [2]. Это означает, что в неблагоприятных популяциях данного вида высокие уровни смертности компенсируются более медленными темпами «видимого старения» (что приводит к более длительному периоду удвоения смертности). В результате этой компенсации относительные различия в уровне смертности имеют тенденцию к уменьшению с возрастом внутри данного биологического вида.

Термин «компенсационный эффект смертности» был предложен в 1978 г., когда учёт параметра Мейкема привёл к существенно иным оценкам параметров корреляции Стрелера–Милдвана [35]. Этот эффект определяется как конвергенция возрастной смертности в старших возрастах [2, 35]. КЭС наблюдается не только для человека, но и для некоторых других видов [2, 36, 37].

Некоторые авторы утверждали, что корреляция Стрелера–Милдвана возникает как статистический артефакт ложной корреляции между оценками параметров Гомперца и не существует в действительности [38]. Тем не менее даже с учётом коллинеарности коэффициенты корреляции между параметрами Гомперца уменьшаются лишь незначительно, в то время как основная корреляция остаётся неизменной [31]. Кроме того, стоит отметить, что сближение траекторий смертности в полулогарифмическом масштабе (КЭС) в старших возрастах можно наблюдать независимо от оценки параметров Гомперца [31, 32]. В случае популяций человека КЭС можно наблюдать как для поперечных, так и для когортных данных [31, 32].

По мере сближения траекторий смертности в старших возрастах можно ожидать уменьшения относительной вариабельности смертности. Следовательно, мы ожидаем снижения относительной вариабельности смертности, оцениваемой с помощью таких показателей, как коэффициент вариации и стандартное отклонение логарифма смертности, по мере достижения точки конвергенции,

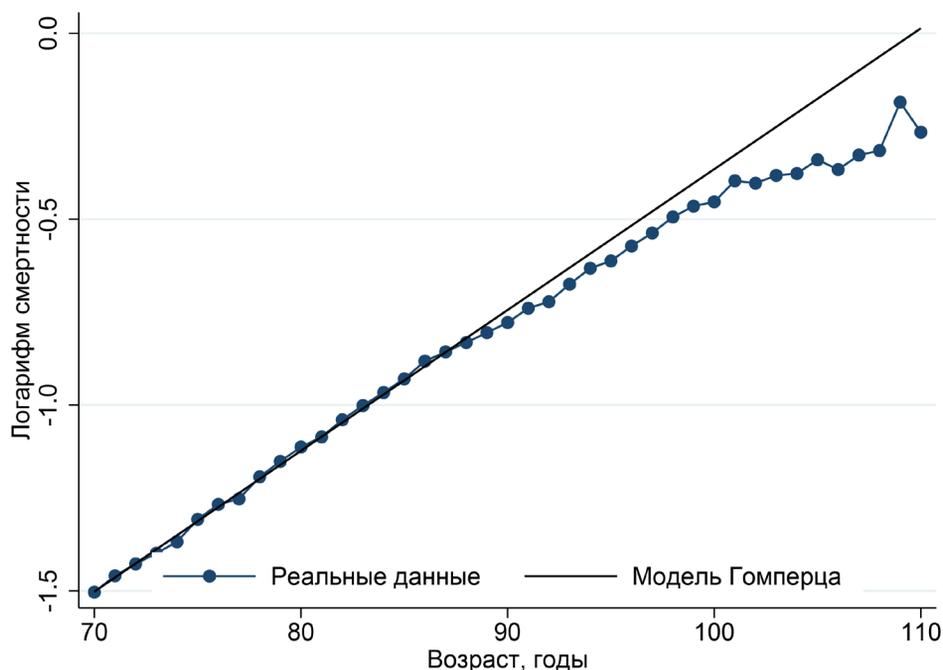


Рис. 2. Замедление роста смертности в старших возрастах у женщин США, родившихся в 1886 г. Источник данных: Human Mortality Database (<https://www.mortality.org>)

соответствующей видовой продолжительности жизни. Это теоретическое предсказание подлежит проверке в дальнейших исследованиях.

Замедление роста смертности в старших возрастах. В более старших возрастах (после 80 лет у людей) иногда возникает явление, известное как «замедление роста смертности в старших возрастах», при котором уровень смертности увеличивается с возрастом медленнее, чем ожидалось на основании закона Гомперца [2, 21, 39–41]. Это замедление роста смертности в конечном итоге приводит к «плато смертности в позднем возрасте» в экстремально старших возрастах [2, 43, 44]. Некоторые биологи назвали данное прекращение роста смертности (состояние нестарения) «революцией в исследованиях старения» [42], хотя для людей это явление было известно актуариям ещё со времён Гомперца.

Актуарии, в том числе и сам Гомперц, были одними из первых, кто наблюдал это явление. Они предложили логистическую формулу для моделирования возрастного увеличения смертности с целью учёта снижения роста смертности в пожилом возрасте.

Рис. 2 иллюстрирует замедление роста смертности в старших возрастах на примере смертности для когорты женщин США, родившихся в 1886 г. Можно заметить, что после 90 лет наблюдаемая смертность в этом конкретном случае отклоняется от закона Гомперца.

У людей замедление роста смертности почти всегда наблюдается для поперечных данных. Что

касается когортных данных, то единого мнения относительно траектории смертности в старших возрастах пока не существует. Более ранние исследования показали, что смертность после 80 лет растёт с возрастом медленнее по сравнению с экспоненциальным законом Гомперца. Такое замедление роста смертности в старших возрастах наблюдалось как для когортных, так и для поперечных данных разных стран [21]. Однако для когортных данных США было обнаружено, что смертность подчиняется закону Гомперца в широком возрастном диапазоне 80–106 лет [45, 46]. Похожие результаты были недавно получены на когортных данных Франции [47]. Другие авторы обнаружили, что степень замедления роста смертности варьирует в разных странах [48, 49]. Основной проблемой этих исследований была попытка сделать вывод о существовании только одной возможной формы траектории смертности. Недавно существующие разногласия по поводу формы траектории смертности в старших возрастах были разрешены путём изучения длинных временных рядов для когортных данных в США. Оказалось, что в более ранних когортах рождения (для родившихся до 1887 г.) всегда наблюдается замедление роста смертности. С другой стороны, когорты более позднего года рождения следуют закону Гомперца вплоть до возраста 105–106 лет [50]. Эта тенденция, получившая название гомперциализации траектории смертности, наблюдается и в других странах, хотя и с более медленными темпами [51].

ИЗУЧЕНИЕ ДРУГИХ АСПЕКТОВ СТАРЕНИЯ

Как известно, фаза старения составляет значительную часть продолжительности жизни для многих видов, поэтому необходимо, чтобы любая модель смертности предлагала объяснение этого длительного периода жизни. Для моделирования процесса старения важно учитывать некоторые дополнительные возрастные явления.

Сходство между закономерностями смертности биологических и технических систем. Между живыми организмами и техническими устройствами существует заметная параллель в траектории их возрастной смертности, часто следующей так называемой «кривой ванны» [9]. Эта кривая состоит из трёх различных периодов. Первоначально уровень смертности высок и постепенно снижается с возрастом, что называется периодом «приработки» или фазой «выгорания» дефектных компонентов. Подобный ранний период, известный как «младенческая смертность», можно наблюдать у большинства живых организмов, включая человека. После этого наступает «нормальный рабочий период», характеризующийся относительно низкой и стабильной интенсивностью отказов. Хотя этот период существует и у людей, он, как правило, относительно короткий и длится примерно 10–15 лет, прежде чем переходит в третий период, известный как «период старения». На этом этапе уровень смертности неумолимо увеличивается с возрастом, следуя взрывной экспоненциальной траектории, похожей на кривую Гомперца. Для людей этот период старе-

ния обычно длится от 20 до 100 лет. Это сходство в структуре смертности между техническими и биологическими системами дополнительно подчёркивается наличием четвёртого общего периода в экстремально старших возрастах. Эта фаза называется в биологии «выход смертности на плато в старших возрастах» и также наблюдается в технических системах [52].

Учитывая это сходство фаз возрастной смертности биологических и технических систем, Siler предложил эмпирическое уравнение, описывающее смертность биологических организмов в течение всего периода жизни [53]. Это уравнение учитывает три слагаемых смертности. Первое слагаемое описывает снижение смертности с возрастом после рождения и может быть описано убывающей экспоненциальной функцией. Два других слагаемых представляют собой уже известные фоновую и возрастную компоненты смертности. Минимальная смертность в возрасте около 10 лет недавно привлекла внимание исследователей. Оказалось, что минимальный уровень смертности, измеренный с использованием поперечных данных, наблюдается на очень коротком отрезке времени, в то время как в случае когортных данных смертность может оставаться неизменной в течение гораздо более длительного периода. Этот длительный период практически неизменной смертности был назван «фазой покоя» [54] и наблюдался для когорт людей, рождённых в районе 20-х гг. XX столетия (рис. 3).

Это явление служит наглядным примером почти нулевой видимой (актуарной) скорости

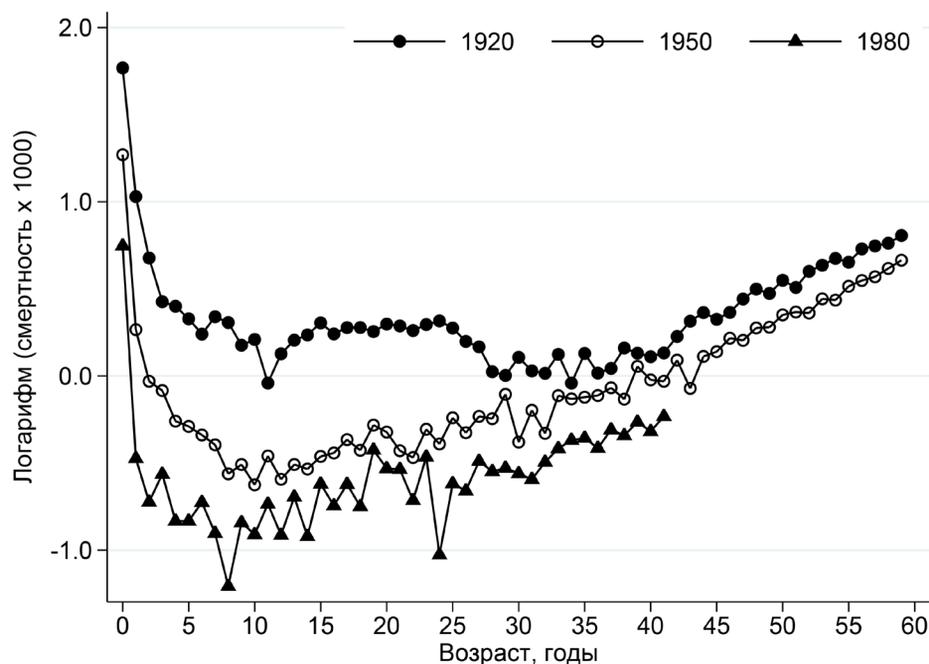


Рис. 3. Смертность трёх когорт женщин Швеции. Источник данных: Human Mortality Database (<https://www.mortality.org>)

старения, возникающей в результате противодействующего влияния двух противостоящих сил, которые компенсируют друг друга: положительного эффекта снижения смертности (обусловленного достижениями в области здравоохранения и улучшения условий жизни) и отрицательного воздействия старения [32]. На рис. 3 показано, что смертность в возрасте 10 лет для когорты 1920-х гг. почти такая же, как и в возрасте 30–40 лет, так что чёткого минимума смертности в возрасте 10–40 лет не существует. Эта фаза выглядит как довольно длительный «нормальный рабочий период» в технических системах, но является скорее результатом снижения смертности благодаря достижениям здравоохранения и улучшению условий жизни [51].

Авторы оригинального исследования фазы покоя ограничили свой анализ лишь экстинктными (угасшими) когортами [54]. Однако смертность в молодом возрасте можно изучать для когорт более поздних годов рождения. На рис. 3 показано, что в когортах 1950 и 1980 годов рождения смертность не является постоянной и медленно увеличивается с возрастом. Похоже также, что положение минимума смертности со временем смещается в сторону более молодых возрастов. Когда смертность от инфекционных заболеваний была в основном ликвидирована и исторический спад смертности замедлился, фаза покоя практически исчезла, и смертность начала расти с самых ранних возрастов (8–12 лет) без видимого горба. Следует отметить, что мы используем здесь данные по женщинам, чтобы избежать существенной внешней смертности от социальных факторов, характерной для мужчин в возрасте 18–25 лет. Рис. 3 показывает, что смертность для более поздних когорт рождения может быть описана двумя, а не тремя фазами с исчезновением «нормального рабочего периода» или фазы покоя.

Концепция высокой начальной нагрузки повреждениями. В 1991 г. было высказано предположение о том, что ранние процессы развития живых организмов порождают исключительно высокую нагрузку первоначальными повреждениями, сравнимую по величине с последующим накоплением возрастных дефектов на протяжении всей взрослой жизни [2]. Хотя эта концепция, известная как гипотеза высокой начальной нагрузки повреждениями (High Initial Damage Load или HIDL) [55], может показаться контринтуитивной, она согласуется с эмпирическими наблюдениями за значительными потерями клеток на ранних стадиях развития [56]. Недавние достижения в области молекулярной биологии развития признали стохастическую природу развития, которую часто называют «шумом развития». Это явление потенциально может вызвать фенотипическую гетеро-

генность даже при отсутствии каких-либо других изменений в генах или окружающей среде [57]. В человеческом организме каждую секунду в результате митоза образуется около ста тысяч клеток, и сопоставимое их количество подвергается физиологическому самоубийственному процессу, известному как апоптоз. Значительная часть клеток, образующихся во время эмбрионального развития млекопитающих, подвергается физиологической гибели до завершения перинатального периода [58]. Значительные потери клеток на ранних этапах развития создают условия для неравномерного распределения организмов по количеству оставшихся работоспособных клеток, которое можно смоделировать с помощью биномиального распределения или даже распределения Пуассона [2].

Идея высокой начальной повреждённости биологических систем в последнее время получила дальнейшее развитие. Установлено, что смертность и заболеваемость возрастными заболеваниями описываются U-образной кривой, минимум которой приходится на период до полового созревания. Однако количественные биомаркеры старения, такие как соматические мутации и метилирование ДНК, не следуют этой закономерности и продолжают увеличиваться, начиная с рождения или даже до него [59]. Было высказано предположение, что старение начинается рано, но маскируется снижением смертности в раннем возрасте. Согласно этой идее, старение можно представить как рост суммы вредных изменений или делетериома [59, 60].

Концепция высокой первоначальной нагрузки повреждениями также предполагает, что события, происходящие в раннем возрасте, могут повлиять на выживание в более позднем взрослом возрасте за счёт уровня первоначальных повреждений. Этот прогноз был подтверждён на таких показателях раннего периода жизни, как возраст родителей на момент зачатия человека и месяц рождения человека [61–66]. Появляется всё больше данных, подтверждающих идею о внутриутробном происхождении дегенеративных заболеваний у взрослых [67, 68] и о программировании старения и долголетия в раннем возрасте [55, 69–71].

Потеря функциональных элементов в организме в течение его жизни. Старение характеризуется прогрессирующей потерей функциональных тканей под влиянием сочетания генетических факторов и факторов окружающей среды, питания и образа жизни [72–74].

Накопление повреждений в различных клеточных структурах в сочетании с потерей полностью дифференцированных и незаменимых клеток, таких как нейроны и кардиомиоциты, следует рассматривать как необратимое. Если эти незаменимые компоненты организма стареют

и в конечном итоге погибают, то, следовательно, стареет и организм в целом. Это подчёркивает критическую роль повреждения клеток и потери жизненно важных компонентов в общем старении организмов [75].

Механизмы гибели клеток традиционно подразделяются на два типа: механизмы запрограммированной гибели клеток (ЗГК), которые требуют энергии, и механизмы некротической гибели клеток, которые не требуют энергии [73, 74]. Увеличение встречаемости ЗГК во время старения связано с ослаблением иммунной системы, атрофией скелетных мышц (саркопенией), потерей клеток сердца и нейродегенеративными заболеваниями. В процессе старения в некоторых тканях происходит потеря клеток, связанная либо с ЗГК, либо с ЗГК-подобными процессами. У млекопитающих наблюдается связанная со старением атрофия скелетных мышц, известная как саркопение, характеризующаяся уменьшением размера мышечных волокон и их потерей [73]. Некроптоз, регулируемая форма гибели клеток, играет роль в возникновении и прогрессировании различных опасных для жизни заболеваний, включая рак, неврологические расстройства, сердечную миопатию и диабет [73].

Исследования указывают на снижение количества специализированных клеток с возрастом, включая значительное сокращение нефронов в почках здорового человека. При сравнении самой молодой (18–29 лет) и самой старшей (70–75 лет) возрастных групп отмечено снижение с возрастом количества несклеротических клубочков на 48%, тогда как объём коры уменьшился лишь на 16% [76].

Несмотря на значительный объём знаний о конкретных молекулярных механизмах гибели клеток [74, 77], возрастная динамика снижения количества клеток представлена в ограниченном количестве публикаций [78–80]. Существующие исследования обнаружили возможность того, что некоторые клетки стареющего организма могут проявлять характеристики нестарения. Было показано, что для разнообразного спектра нейродегенеративных состояний, связанных со старением (18 различных примеров наследственной и приобретённой нейродегенерации, включая болезнь Паркинсона), скорость гибели нейронов не увеличивается с возрастом [79, 81, 82]. Нейроны в различных частях мозга когнитивно здоровых людей демонстрируют постоянную скорость атрофии с возрастом [83]. Эти результаты согласуются с наблюдением о том, что «впечатляющий диапазон клеточных функций в большинстве органов остаётся неизменным на протяжении всей жизни» [11] (стр. 425). Таким образом, современное понимание кинетики потери клеток с возрастом указывает

на то, что экспоненциальное распределение (с постоянной смертностью) является правдоподобным приближением механизма потери с возрастом жизненно важных элементов, таких как функциональные клетки или теломеры.

ОБЪЯСНЕНИЕ ЗАКОНОВ СМЕРТНОСТИ С ТОЧКИ ЗРЕНИЯ ТЕОРИИ НАДЁЖНОСТИ

В настоящее время существует целый спектр моделей, пытающихся объяснить наблюдаемые явления смертности. Модели гетерогенности были одними из первых моделей, пытавшихся объяснить старение и смертность человека, и стали популярными после публикации Beard в 1959 г. [84]. Эти модели предполагают экспоненциальное увеличение исходного риска смерти. Гетерогенность в этих моделях обычно вводится постулированием гамма-распределения индивидуальных рисков [85–87]. Модели гетерогенности известны тем, что объясняют замедление роста смертности в позднем возрасте и плато смертности как результат селекции. Однако в этих моделях заранее постулируется экспоненциальный рост риска смерти с возрастом. Поэтому было бы интереснее рассмотреть модель, которая может использовать информацию о структуре и свойствах организма для вывода наблюдаемых эмпирических закономерностей смертности.

Следует отметить, что увеличение смертности с возрастом и последующий выход смертности на плато по своей сути являются ожидаемыми свойствами надёжных моделей, которые концептуализируют старение как прогрессивное накопление повреждений или потерю жизненно важных элементов с возрастом [2, 9, 33]. Надёжные модели старения, более подробно описанные ранее [2, 33], рассматривают живой организм как систему с последовательно-параллельной структурой надёжности. В системе из n независимых компонентов, соединённых последовательно, вся система выйдет из строя, если выйдет из строя хотя бы один из компонентов. Это означает, что надёжность системы зависит от надёжности каждого отдельного последовательно соединённого компонента. Очевидно, что такие органы человека, как сердце, мозг или печень, можно рассматривать как жизненно важные компоненты, соединённые последовательно, поскольку отказ любого из этих органов приводит к гибели всего организма. С другой стороны, в параллельной системе из n независимых компонентов система выходит из строя только тогда, когда все компоненты выходят из строя одновременно. В этой конфигурации система остаётся работоспособной до тех пор, пока продолжает функционировать хотя бы

один из параллельных компонентов, обеспечивая резервирование, повышающее общую надёжность системы. Также очевидно, что функциональные клетки в каждом жизненно важном органе можно рассматривать как компоненты, соединённые параллельно, хотя в реальных органах порог нормального функционирования может быть больше одного элемента (клетки). Таким образом, модели надёжности в контексте живых организмов учитывают внутреннюю функциональную структуру и динамику биологических систем. Эти модели признают и включают наблюдаемые процессы, такие как потеря функциональных клеток с возрастом. Этот подход помогает понять сложные взаимосвязи между различными элементами биологических систем и их влияние на общую смертность.

Рассмотрим параллельную систему, состоящую из n нестареющих элементов, каждый из которых характеризуется постоянной интенсивностью отказов, обозначаемой μ , и функцией надёжности (выживаемости), выраженной как $e^{-\mu x}$ [9]. При таком сценарии функцию надёжности для всей параллельной системы можно описать как:

$$S(x) = 1 - (1 - p)^n = 1 - (1 - e^{-\mu x})^n. \quad (6)$$

Это уравнение применимо к самому простому сценарию, когда отказы отдельных элементов статистически независимы. В результате интенсивность отказов всей системы, обозначаемая как $\mu_s(x)$, может быть выражена следующим образом:

$$\mu_s(x) = -\frac{dS(x)}{S(x)dx} = \frac{n\mu e^{-\mu x}(1 - e^{-\mu x})^{n-1}}{1 - (1 - e^{-\mu x})^n}, \quad (7)$$

$\approx n\mu^n x^{n-1}$ при $x \ll 1/\mu$ (приближение для начального периода, когда $1 - e^{-\mu x} \approx \mu x$);

$\approx \mu$ при $x \gg 1/\mu$ (приближение для позднего периода, когда $1 - e^{-\mu x} \approx 1$).

Следовательно, интенсивность отказов системы первоначально растёт с возрастом в соответствии со степенной функцией (согласно закону Вейбулла). Согласно этой модели, системы с различными начальными уровнями резервирования (параметр n) будут демонстрировать различную интенсивность отказов на ранних стадиях, но эти различия будут уменьшаться со временем, когда показатели приближаются к верхнему пределу, определяемому скоростью потери элементов (параметр μ). Следовательно, ожидаемый результат этой модели соответствует КЭС (в его слабой форме).

Интенсивность отказов простой параллельной системы, состоящей из нестареющих элементов, увеличивается с возрастом не по закону Гомперца, при этом начальная кинетика отказов соответствует закону Вейбулла. Это отклонение

от закона Гомперца возникает из-за предположения модели о том, что система построена с изначально идеальной структурой, где все элементы с самого начала функциональны. Это ограничение подчёркивает важность рассмотрения реальных сценариев, когда компоненты изначально не могут быть безупречными и могут со временем испытывать изменения в функциональности, влияя на общую кинетику отказов системы. Чтобы получить квази-гомперцевский рост смертности, нам необходимо рассмотреть модели с распределённой избыточностью.

Важно подчеркнуть, что надёжностные модели органично согласуются с эволюционными моделями, включая концепцию запрограммированной смерти. Накопление повреждений может следовать стохастическому процессу, тогда как параметры, управляющие этим накоплением, такие как начальный уровень избыточности и скорость повреждения, могут быть заранее запрограммированы. Эволюционные модели объясняют, почему организмы имеют различные свойства, а надёжностные модели конкретно объясняют сам процесс разрушения, который можно рассматривать как медленный или хронический фенотип [71, 88].

Надёжностная модель исходно однородной популяции. Модель, которая была опубликована ранее [33], рассматривает сценарий, в котором блоки (например, определённые органы) внутри каждого организма демонстрируют разную степень избыточности, в то время как сами организмы изначально считаются идентичными друг другу и имеют одинаковый риск смерти. Это предположение может быть оправдано в следующих случаях [2]:

1. Однородность популяции может возникнуть, когда жёсткая генетическая программа определяет начальную степень избыточности каждого блока (органа) в организме. Такая ситуация может возникнуть в ходе запрограммированной гибели клеток на ранних стадиях развития. В этом случае изменчивость избыточности блоков не является полностью случайной, а однородные модели применимы, поскольку генетически запрограммированное распределение блоков по их избыточности может быть аппроксимировано распределением Пуассона или биномиальным распределением.

2. Организмы могут иметь практически одинаковое распределение числа блоков с разным уровнем избыточности, даже если механизм формирования избыточности является случайным. Это происходит, когда количество незаменимых (жизненно важных) блоков очень велико. Следовательно, популяция практически однородна с точки зрения риска гибели каждого организма, несмотря на потенциальную неоднородность риска отказа отдельных блоков.

Простейшей моделью этого семейства надёжных моделей является модель последовательно-параллельной структуры с распределённой избыточностью внутри организма. Эта модель, изложенная в работе Gavrilov et al. [33], рассматривает распределение подсистем на основе изначально функциональных элементов, описываемых законом Пуассона из-за высокой начальной нагрузки повреждениями. В таких системах интенсивность отказов может быть первоначально аппроксимирована экспоненциальным законом (Гомперца) с последующим выходом смертности на плато [33]. В системах с меньшим уровнем повреждённости, где изначально функциональные элементы подчиняются биномиальному распределению, интенсивность отказов первоначально растёт согласно биномиальному закону смертности [2].

Следует отметить, что ранее высказывались утверждения об ошибках в этой простой модели [89]. Однако важно подчеркнуть, что авторы не поняли, что данная модель была разработана для исходно однородной популяции, и предлагали неверную рекомендацию использовать формулу, адаптированную для гетерогенной популяции [89].

Интересный вывод из модели исходно однородной популяции связан с возможностью оценки скорости потери жизненно важных элементов в организме человека или истинной скорости старения. Эта скорость примерно равна обратной величине видовой продолжительности жизни ($1/V$, V взято из уравнения 5). Установлено, что расчётная видовая продолжительность жизни стабильна во времени и равна 95–97 годам [2, 31]. Таким образом, расчётная скорость потери жизненно важных элементов примерно равна 1% в год. Интересно, что эта скорость согласуется с эмпирическими оценками ежегодной потери клеток в ряде нервных тканей – 0,6–1,6% [78]. Эмпирически оцененная скорость потери теломер в мононуклеарных клетках периферической крови у человека несколько ниже – 0,5% пар оснований в год [90], но всё же имеет сходный порядок величин. Установлено, что скорость потери теломер является видоспецифичным признаком и пропорциональна продолжительности жизни различных видов животных [90].

Надёжная модель гетерогенной популяции. Учёт гетерогенности популяции приводит нас к другой модели, которая даёт объяснение основным законам смертности даже в простейшем случае, когда организм представляет собой единый жизненный блок из n элементов.

Модель рассматривает простейший случай, когда организм состоит из одного жизненно важного блока с n элементами, соединёнными параллельно, где q – вероятность того, что элемент

изначально работоспособен. Тогда вероятность встретить организм с i исходно функциональными элементами из общего числа n элементов определяется биномиальным законом распределения.

Окончательная формула интенсивности отказов в гетерогенной популяции, $\mu_p(x)$, даётся формулой (см. работу Gavrilov et al. [2] для более подробной информации):

$$\mu_p(x) = - \frac{F'(x)}{1 - F(x)} = \frac{nq\mu e^{-\mu x}(1 - qe^{-\mu x})^{n-1}}{1 - (1 - qe^{-\mu x})^n}, \quad (8)$$

$\approx Cnq\mu(1 - q + q\mu x)^{n-1}$ при $x \ll 1/\mu$;

$\approx \mu$ при $x \gg 1/\mu$, где C является нормирующим множителем.

Таким образом, смертность в гетерогенной популяции сначала растёт с возрастом согласно биномиальному закону смертности, а затем асимптотически приближается к верхнему пределу μ :

$$\mu_p(x) \approx Cn(q\mu)^n \left[\frac{1 - q}{q\mu} + x \right]^{n-1} = Cn(q\mu)^n (x_0 + x)^{n-1} \quad (9)$$

при $x \ll 1/\mu$;

$\mu_p(x) \approx \mu$ при $x \gg 1/\mu$, где $x_0 = (1 - q)/q\mu$, параметр, названный начальным виртуальным возрастом популяции.

Этот параметр имеет размерность времени и соответствует возрасту, к которому первоначально однородная популяция накопила бы столько же повреждений, сколько имеет реальная популяция в начальный момент времени (при $x = 0$). В частном случае, когда $q = 1$, т. е. когда все элементы в каждом организме изначально функциональны, начальный виртуальный возраст популяции равен нулю, а смертность популяции растёт как степенная функция возраста (закон Вейбулла). Однако, когда популяция изначально гетерогенна ($q < 1$), мы приходим к уже упомянутому биномиальному закону смертности. Таким образом, описанная здесь гетерогенная популяционная модель может также дать теоретическое обоснование биномиального закона смертности.

Модель гетерогенности также объясняет КЭС. КЭС очевиден, когда различия в смертности обусловлены различиями в числе элементов в организме (n) между популяциями, в то время как другие параметры, в том числе истинная скорость старения (μ), остаются практически одинаковыми для всех популяций данного вида [2, 9].

На рис. 4 показаны модель Гомперца, биномиальная модель и модель Вейбулла, описывающие смертность женщин Норвегии, родившихся в 1920 г. В случае биномиальной модели предполагается, что каждый блок (например, жизненно важный орган) имеет в среднем 50 жизненно важных элементов, а начальный виртуальный возраст

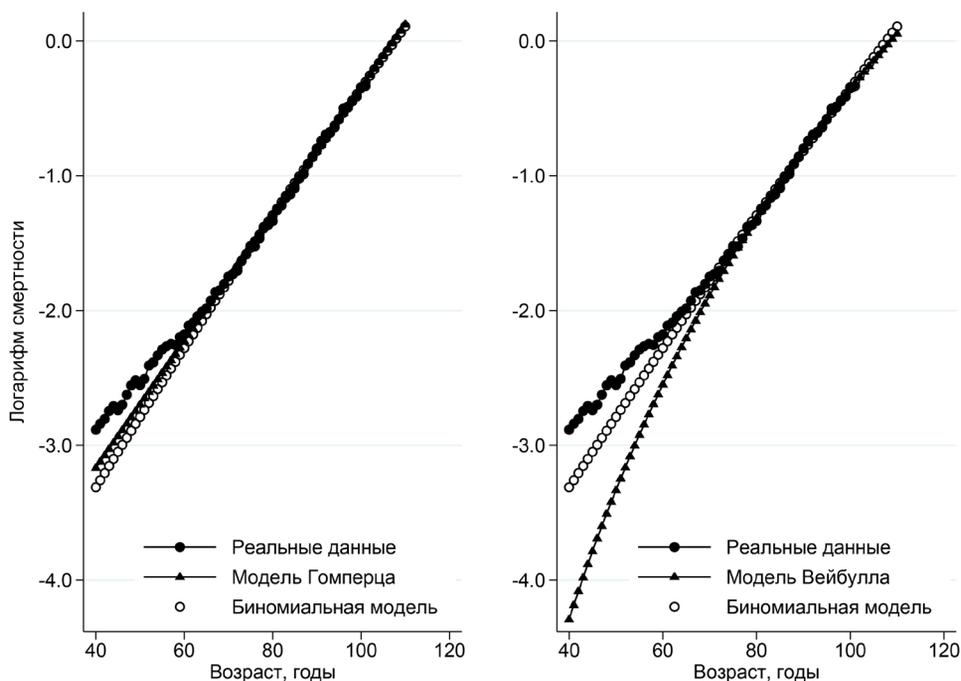


Рис. 4. Описание смертности женщин Норвегии, родившихся в 1920 г., с помощью биномиального закона и конкурирующих законов Гомперца (слева) и Вейбулла (справа). Источник данных: Human Mortality Database (<https://www.mortality.org>)

(показатель начальной нагрузки повреждениями), рассчитанный методом нелинейной регрессии, равен 370 годам. Можно заметить, что биномиальная модель описывает смертность почти так же хорошо, как модель Гомперца с близкими значениями информационного критерия Акаике (-466 и -462 соответственно), тогда как модель Вейбулла значительно недооценивает смертность в более молодом возрасте (см. рис. 4). Важно отметить, что внешняя смертность в возрасте до 60 лет значительна. Однако поправка на внешнюю смертность с использованием модели Гомперца–Мейкема становится сложной задачей из-за изменения слагаемого Мейкема с течением времени в когортных данных. Таким образом, даже эта упрощённая модель гетерогенности способна описать смертность людей, связанную со старением.

Таким образом, модель гетерогенной популяции даёт объяснение закономерностям смертности организма: первоначальному квази-экспоненциальному росту смертности с последующим замедлением роста смертности, а также КЭС, что следует из формул модели [2].

Модель гетерогенной популяции разделяет основные выводы с исходно однородной моделью последовательно соединённых блоков с различной степенью избыточности [33]. Однако это две разные модели. В первой модели индивидуальный риск смертности одинаков для всех организмов и экспоненциально растёт с возрастом. Во второй модели изначально существует n субпопуляций

живых организмов с разным риском смерти, который увеличивается с возрастом как степенная функция, а не экспоненциально.

Тот факт, что эти две разные модели дают почти идентичную интерпретацию некоторых явлений смертности, даёт некоторый повод для оптимизма. Например, КЭС – общая черта всех этих моделей, возникающая только тогда, когда скорость необратимых возрастных изменений (истинная скорость старения) остаётся постоянной внутри вида. Такая трактовка КЭС не уникальна для обсуждаемых здесь моделей, поскольку она согласуется и с другими моделями [34, 35, 91, 92]. Существование различных конкурирующих моделей не препятствует надёжной и значимой интерпретации многих явлений смертности, поскольку несколько моделей могут прийти к согласию по нескольким аспектам.

Дальнейшее развитие надёжных моделей. Мы хотели бы упомянуть здесь несколько исследований, направленных на дальнейшее развитие надёжных моделей старения. Одна из первых надёжных моделей старения была предложена в 1978 г. и основана на явлении линейного снижения функции клеток с течением времени [91]. Эта простая модель объясняла закон Гомперца, КЭС и плато смертности в позднем возрасте. Этот подход был развит далее Milne, который предложил «вложенную биномиальную» модель, также объясняющую существующие закономерности смертности [93]. Данные модели

объясняли смертность в терминах вероятности смерти и не учитывали структуру организма.

Laird и Sherrat расширили описанный выше подход применения теории надёжности к старению биологических систем, рассмотрев три альтернативных типа элементной/генетической архитектуры [94]. Помимо «параллельной» модели, они также представили «последовательную» и третий тип модели – «каскадную», аналогичную многостадийной модели развития заболевания, при которой непоправимые повреждения происходят в строгой последовательности. Они показали, что избыточность приводит к актуарному старению в параллельных и каскадных моделях, но не в последовательной модели. Наконец, авторы попытались добавить эволюционную динамику в свою модель надёжности и обнаружили, что равновесная избыточность популяции чувствительна к условиям окружающей среды, преобладавшим во время её эволюции, таким как уровень внешней смертности [94]. Почему-то авторы не рассматривали последовательно-параллельную модель надёжности, хотя только эта модель близка к структуре реального организма, где жизненно важные органы соединены последовательно, а специализированные клетки в каждом органе соединены параллельно. Авторы не пытались описывать реальные данные с помощью своих моделей, поэтому проверить значимость моделей сложно.

Другая модель оказалась способна объяснить все три упомянутые выше закономерности смертности. Это простая математическая модель, сочетающая гетерогенность популяций с предположением, что смертность в каждой субпопуляции растёт экспоненциально с возрастом [95]. Доказано, что эта модель способна воспроизвести всю картину смертности в популяции человека, включая наблюдаемые особенности на ранних и поздних этапах жизни. Авторы обнаружили, что эволюция параметров модели подтверждает применимость КЭС к каждой субпопуляции в отдельности. Это исследование показало, что структура популяции меняется так, что популяция имеет тенденцию становиться более однородной с течением времени [95].

Ещё в одном исследовании авторы систематически анализировали практическую полезность моделей избыточности для количественного изучения механизмов старения [96]. Авторы проанализировали предсказания надёжностной модели исходно однородной популяции, описанной в предыдущем разделе [33]. Они показали, что модели избыточности хорошо соответствуют реальным данным, и утверждают, что в этом состоит преимущество моделей избыточности по сравнению с немеханистическими моделями, поскольку: (1) когда контрастирующие модели старения можно понять

в рамках единой механистической модели, это указывает на то, что модель может отражать сущность процесса старения, и (2) результат изучения параметров избыточности может рассказать нам о лежащих в основе механизмах и как таковой может быть использован для разработки новых гипотез [96].

Подводя итоги, можно сделать вывод, что надёжностные модели старения продолжают развиваться и способны объяснить существующие закономерности смертности, описанные ранее.

ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

В этой статье мы рассмотрели различные эмпирические закономерности, связанные с процессом старения, и представили некоторые новые идеи в описании моделей смертности с использованием концепции теории надёжности.

Значительный объём исследований старения привёл к множеству важных и разнообразных открытий, что вызвало необходимость создания единой теоретической основы для консолидации этих знаний. Эволюционные теории старения, основанные на концепции уменьшения интенсивности естественного отбора с возрастом, демонстрируют практическую применимость различных теоретических принципов в области исследований старения [97–99]. Академик В.П. Скулачёв сыграл значительную роль в развитии эволюционных концепций. Его вклад сыграл важную роль в формировании современных взглядов на старение, предполагая наличие определённой программы или механизма, влияющего на процесс старения. Работы В.П. Скулачёва углубили изучение эволюционных теорий, бросив вызов традиционным взглядам и открыв путь для дальнейших исследований молекулярных и генетических аспектов старения. Он предположил, что если старение действительно запрограммировано, его можно задерживать, предотвратить или даже потенциально обратить вспять с помощью вмешательств, которые нарушают выполнение этой программы, аналогично нашей способности вмешиваться в программы гибели клеток [5, 100]. Его взгляды породили множество гипотез, характеризующих старение как запрограммированный процесс.

В этой статье наша цель состояла в том, чтобы предложить более полное объяснение старения как процесса разрушения, выходящего за рамки репродуцирующих биологических видов, посредством применения общей теории отказа систем, известной как теория надёжности. Этот подход органично согласуется с эволюционными теориями, в том числе связанными с запрограммированным старением, когда старение рассматривается

как хронический феноптоз. Стало очевидным, что избыточность играет центральную роль в понимании старения, особенно в системных рамках. Системы, в которых имеется резервирование основных компонентов, со временем неизбежно подвергаются деградации (т.е. старению), даже если они построены из элементов, которые не стареют. Избыточность имеет двойное воздействие: повышает устойчивость к повреждениям, снижает смертность и продлевает продолжительность жизни, но также способствует накоплению повреждений, вызывая тем самым явление старения.

Системы с более высоким уровнем избыточности демонстрируют более высокую видимую (актуарную) скорость старения или проявление старения при прочих равных условиях. Это понимание даёт ценную информацию о наблюдении незначительного старения в определённых условиях, показывая, что некоторые случаи незначительного старения могут быть связаны с отсутствием резервирования системы. Например, птицы демонстрируют более высокую продолжительность жизни относительно их веса и низкую скорость актуарного старения (незначительное старение). Но при этом у них наблюдается относительно высокая смертность в более молодом возрасте, что позволяет предположить низкий уровень избыточности (клеточных резервов) [9]. С другой стороны, сложные, резервируемые системы, рассчитанные на большую долговечность, могут демонстрировать более выраженные проявления старения.

На протяжении всей своей жизни организмы теряют свои клетки и резервные возможности, что потенциально объясняет такие явления, как КЭС (конвергенция смертности в старшем возрасте), замедление роста смертности в позднем возрасте и плато смертности. Организмы, по-видимому, начинают свою жизнь с высоким уровнем исходной нагрузки повреждениями [55, 59], а особенности их продолжительности жизни и старения могут быть чувствительны к ранним условиям жизни,

которые определяют эту первоначальную нагрузку повреждениями во время развития. Эта концепция программы раннего развития имеет потенциальные последствия для мер, направленных на укрепление здоровья и долголетия.

Старение – сложное явление, и использование целостного подхода, включающего теорию надёжности, может помочь в его изучении, понимании и потенциальном управлении им. В настоящее время геронтологи осознают, что для полного понимания и объяснения феномена старения необходим системный подход [1].

Благодарности. Мы выражаем глубочайшую благодарность профессору Владимиру Петровичу Скулачёву (1935–2023), выдающемуся российскому учёному, который с 1970-х годов был нашим бесценным научным наставником и советником. Данная статья является частью специального выпуска журнала, посвящённого его памяти. Академик В.П. Скулачёв сыграл ключевую роль в написании нашей книги «Биология продолжительности жизни», которая упоминается в этой статье, научным редактором которой он был [2]. Более того, его поддержка привела к важному совместному с ним исследованию изменчивости характеристик жизненного цикла человека [101].

Вклад авторов. Л.Г. разрабатывал план статьи, подготавливал и редактировал рукопись. Н.Г. проводила статистический анализ данных и подготавливала рукопись.

Финансирование. Работа частично поддержана грантом Национального института здоровья (NIH R21AG054849).

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

Соблюдение этических норм. Данная статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов изучения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cohen, A. A., Ferrucci, L., Fulop, T., Gravel, D., Hao, N., Kriete, A., Levine, M. E., Lipsitz, L. A., Rikkert, M., Rutenberg, A., Stroustrup, N., and Varadhan, R. (2022) A complex systems approach to aging biology, *Nat. Aging*, **2**, 580-591, <https://doi.org/10.1038/s43587-022-00252-6>.
2. Gavrilov, L. A., and Gavrilova, N. S. (1991) *The Biology of Life Span: A Quantitative Approach*, Harwood Academic Publisher, New York.
3. Kirkwood, T. B. L. (1999) *Time of Our Lives: The Science of Human Aging*, Weidenfeld & Nicolson, London, p. 40.
4. Kowald, A., and Kirkwood, T. B. L. (2016) Can aging be programmed? A critical literature review, *Aging Cell*, **15**, 986-998, <https://doi.org/10.1111/ace1.12510>.
5. Skulachev, M. V., and Skulachev, V. P. (2017) Programmed aging of mammals: Proof of concept and prospects of biochemical approaches for anti-aging therapy, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 1403-1422, <https://doi.org/10.1134/s000629791712001x>.
6. Skulachev, V. P. (1999) Phenoptosis: programmed death of an organism, *Biochemistry (Moscow)*, **64**, 1418-1426.

7. Skulachev, V. P. (2001) The programmed death phenomena, aging, and the Samurai law of biology, *Exp. Gerontol.*, **36**, 995-1024, [https://doi.org/10.1016/s0531-5565\(01\)00109-7](https://doi.org/10.1016/s0531-5565(01)00109-7).
8. Lidsky, P. V., and Andino, R. (2022) Could aging evolve as a pathogen control strategy? *Trends Ecol. Evol.*, **37**, 1046-1057, <https://doi.org/10.1016/j.tree.2022.08.003>.
9. Gavrilov, L. A., and Gavrilova, N. S. (2006) *Reliability Theory of Aging and Longevity* in *Handbook of the Biology of Aging* (Masoro, E. J., and Austad, S. N., eds.), 6 Ed., Academic Press, San Diego, pp. 3-42.
10. Gaillard, J. M., and Lemaitre, J. F. (2017) The Williams' legacy: A critical reappraisal of his nine predictions about the evolution of senescence, *Evolution*, **71**, 2768-2785, <https://doi.org/10.1111/evo.13379>.
11. Finch, C. E. (1990) *Longevity, Senescence, and the Genome*, The University of Chicago Press, Chicago.
12. Olshansky, S. J., and Carnes, B. A. (1997) Ever since Gompertz, *Demography*, **34**, 1-15, <https://doi.org/10.2307/2061656>.
13. Strehler, B. L. (1978) *Time, Cells, and Aging*, 2nd edition, Academic Press, New York and London.
14. Greenwood, M. (1928) "Laws" of mortality from the biological point of view, *J. Hyg.*, **28**, 267-294.
15. Kunstyr, I., and Leuenberger, H.-G. W. (1975) Gerontological data of C57BL/6J mice. I. Sex differences in survival curves, *J. Gerontol.*, **30**, 157-162, <https://doi.org/10.1093/geronj/30.2.157>.
16. Bronikowski, A. M., Alberts, S. C., Altmann, J., Packer, C., Carey, K. D., and Tatar, M. (2002) The aging baboon: comparative demography in a non-human primate, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 9591-9595.
17. Bronikowski, A. M., Altmann, J., Brockman, D. K., Cords, M., Fedigan, L. M., Pusey, A., Stoinski, T., Morris, W. F., Strier, K. B., and Alberts, S. C. (2011) Aging in the natural world: comparative data reveal similar mortality patterns across primates, *Science*, **331**, 1325-1328, <https://doi.org/10.1126/science.1201571>.
18. Gompertz, B. (1825) On the nature of the function expressive of the law of human mortality and on a new mode of determining life contingencies, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. A*, **115**, 513-585.
19. Makeham, W. M. (1860) On the law of mortality and the construction of annuity tables, *J. Inst. Actuaries*, **8**, 301-310.
20. Golubev, A. (2004) Does Makeham make sense? *Biogerontology*, **5**, 159-167, <https://doi.org/10.1023/b:ngen.0000031153.63563.58>.
21. Horiuchi, S., and Wilmoth, J. R. (1998) Deceleration in the age pattern of mortality at older ages, *Demography*, **35**, 391-412.
22. Carnes, B. A., and Olshansky, S. J. (1997) A biologically motivated partitioning of mortality, *Exp. Gerontol.*, **32**, 615-631, [https://doi.org/10.1016/s0531-5565\(97\)00056-9](https://doi.org/10.1016/s0531-5565(97)00056-9).
23. Golubev, A. (2009) How could the Gompertz-Makeham law evolve, *J. Theor. Biol.*, **258**, 1-17, <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2009.01.009>.
24. Ricklefs, R. E., and Scheuerlein, A. (2002) Biological implications of the Weibull and Gompertz models of aging, *J. Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **57**, B69-B76.
25. Vanfleteren, J. R., De Vreese, A., and Braeckman, B. P. (1998) Two-parameter logistic and Weibull equations provide better fits to survival data from isogenic populations of *Caenorhabditis elegans* in axenic culture than does the Gompertz model, *J. Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **53**, B393-B403.
26. Stroustrup, N., Anthony, W. E., Nash, Z. M., Gowda, V., Gomez, A., Lopez-Moyado, I. F., Apfeld, J., and Fontana, W. (2016) The temporal scaling of *Caenorhabditis elegans* ageing, *Nature*, **530**, 103-107, <https://doi.org/10.1038/nature16550>.
27. Pakin, Y. V., and Hrisanov, S. M. (1984) Critical analysis of the applicability of the Gompertz-Makeham law in human populations, *Gerontology*, **30**, 8-12, <https://doi.org/10.1159/000212600>.
28. Horiuchi, S., and Wilmoth, J. R. (1997) Age patterns of the life table aging rate for major causes of death in Japan, 1951-1990, *J. Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **52**, B67-B77.
29. Li, T., Yang, Y. C., and Anderson, J. J. (2013) Mortality increase in late-middle and early-old age: heterogeneity in death processes as a new explanation, *Demography*, **50**, 1563-1591, <https://doi.org/10.1007/s13524-013-0222-4>.
30. Golubev, A. (2023) An underappreciated peculiarity of late-life human mortality kinetics assessed through the lens of a generalization of the Gompertz-Makeham law, *Biogerontology*, <https://doi.org/10.1007/s10522-023-10079-2>.
31. Gavrilov, L. A., and Gavrilova, N. S. (2022) Trends in human species-specific lifespan and actuarial aging rate, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 1998-2011, <https://doi.org/10.1134/S0006297922120173>.
32. Gavrilov, L. A., and Gavrilova, N. S. (2023) Actuarial aging rates in human cohorts, *Biochemistry (Moscow)*, **88**, 1778-1785, <https://doi.org/10.1134/S0006297923110093>.
33. Gavrilov, L. A., and Gavrilova, N. S. (2001) The reliability theory of aging and longevity, *J. Theor. Biol.*, **213**, 527-545, <https://doi.org/10.1006/jtbi.2001.2430>.
34. Strehler, B. L., and Mildvan, A. S. (1960) General theory of mortality and aging, *Science*, **132**, 14-21, <https://doi.org/10.1126/science.132.3418.14>.
35. Gavrilov, L. A., Gavrilova, N. S., and Yaguzhinsky, L. S. (1978) Main regularities of animal aging and death viewed in terms of reliability theory [In Russian], *Zhurn. Obshch. Biol.*, **39**, 734-742.

36. Golubev, A. (2019) A 2D analysis of correlations between the parameters of the Gompertz-Makeham model (or law?) of relationships between aging, mortality, and longevity, *Biogerontology*, **20**, 799-821, <https://doi.org/10.1007/s10522-019-09828-z>.
37. Shen, J., Landis, G. N., and Tower, J. (2017) Multiple metazoan life-span interventions exhibit a sex-specific Strehler-Mildvan inverse relationship between initial mortality rate and age-dependent mortality rate acceleration, *J. Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **72**, 44-53, <https://doi.org/10.1093/gerona/glw005>.
38. Tarkhov, A. E., Menshikov, L. I., and Fedichev, P. O. (2017) Strehler-Mildvan correlation is a degenerate manifold of Gompertz fit, *J. Theor. Biol.*, **416**, 180-189, <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2017.01.017>.
39. Economos, A. C. (1980) Kinetics of metazoan mortality, *J. Soc. Biol. Struct.*, **3**, 317-329, [https://doi.org/10.1016/0140-1750\(80\)90039-1](https://doi.org/10.1016/0140-1750(80)90039-1).
40. Vaupel, J. W., Carey, J. R., Christensen, K., Johnson, T. E., Yashin, A. I., Holm, N. V., Iachine, I. A., Kannisto, V., Khazaeli, A. A., Liedo, P., Longo, V. D., Zeng, Y., Manton, K. G., and Curtsinger, J. W. (1998) Biodemographic trajectories of longevity, *Science*, **280**, 855-860, <https://doi.org/10.1126/science.280.5365.855>.
41. Greenwood, M., and Irwin, J. O. (1939) The biostatistics of senility, *Hum. Biol.*, **11**, 1-23.
42. Rose, M. R., Rauser, C. L., Mueller, L. D., and Benford, G. (2006) A revolution for aging research, *Biogerontology*, **7**, 269-277, <https://doi.org/10.1007/s10522-006-9001-6>.
43. Curtsinger, J. W., Fukui, H., Townsend, D., and Vaupel, J. W. (1992) Demography of genotypes: failure of the limited life-span paradigm in *Drosophila melanogaster*, *Science*, **258**, 461-463, <https://doi.org/10.1126/science.1411541>.
44. Economos, A. C. (1983) Rate of aging, rate of dying and the mechanism of mortality, *Arch. Gerontol. Geriatr.*, **1**, 3-27, [https://doi.org/10.1016/0167-4943\(82\)90003-6](https://doi.org/10.1016/0167-4943(82)90003-6).
45. Gavrilov, L. A., and Gavrilova, N. S. (2011) Mortality measurement at advanced ages: a study of the social security administration death master file, *North Am. Actuar. J.*, **15**, 432-447, <https://doi.org/10.1080/10920277.10922011.10597629>.
46. Gavrilova, N. S., and Gavrilov, L. A. (2015) Biodemography of old-age mortality in humans and rodents, *J. Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **70**, 1-9, <https://doi.org/10.1093/gerona/glu009>.
47. Dang, L., Camarda, C., Ouellette, N., Mesle, F., Robine, J.-M., and Vallin, J. (2023) The question of the human mortality plateau: Contrasting insights by longevity pioneers, *Demograph. Res.*, **48**, 321-338, <https://doi.org/10.4054/DemRes.2023.4048.4011>.
48. Bebbington, M., Green, R., Lai, C. D., and Zitikis, R. (2014) Beyond the Gompertz law: exploring the late-life mortality deceleration phenomenon, *Scand. Actuar. J.*, **3**, 189-207, <https://doi.org/10.1080/03461238.2012.676562>.
49. Feehan, D. M. (2018) Separating the signal from the noise: evidence for deceleration in old-age death rates, *Demography*, **55**, 2025-2044, <https://doi.org/10.1007/s13524-018-0728-x>.
50. Gavrilov, L. A., and Gavrilova, N. S. (2019) New trend in old-age mortality: Gompertzialization of mortality trajectory, *Gerontology*, **65**, 451-457, <https://doi.org/10.1159/000500141>.
51. Gavrilov, L. A., and Gavrilova, N. S. (2023) Living to 100 in the time of COVID-19: A study of late-life mortality trajectories, in *2023 Living to 100 Compendium*, Society of Actuaries, Schaumburg, IL, p. 26.
52. Economos, A. C. (1979) A non-gompertzian paradigm for mortality kinetics of metazoan animals and failure kinetics of manufactured products, *Age*, **2**, 74-76.
53. Siler, W. (1979) Competing-risk model for animal mortality, *Ecology*, **60**, 750-757, <https://doi.org/10.2307/1936612>.
54. Engelman, M., Seplaki, C. L., and Varadhan, R. (2017) A quiescent phase in human mortality? Exploring the ages of least vulnerability, *Demography*, **54**, 1097-1118, <https://doi.org/10.1007/s13524-017-0569-z>.
55. Gavrilov, L. A., and Gavrilova, N. S. (2004) Early-life programming of aging and longevity – The idea of high initial damage load (the HIDL hypothesis), in *Strategies for Engineered Negligible Senescence: Why Genuine Control of Aging May Be Foreseeable* (DeGrey, A. D. N., ed.) New York Acad. Sci., New York, pp. 496-501.
56. Finch, C. E., and Kirkwood, T. B. L. (2000) *Chance, Development, and Aging*, Oxford University Press, New York, Oxford.
57. Roy, S., and Majumdar, S. (2022) Developmental noise and stability, in *Noise and Randomness in Living System*, Springer Singapore, Singapore, pp. 119-124.
58. Vaux, D. L., and Korsmeyer, S. J. (1999) Cell death in development, *Cell*, **96**, 245-254, [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80564-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80564-4).
59. Kinzina, E. D., Podolskiy, D. I., Dmitriev, S. E., and Gladyshev, V. N. (2019) Patterns of Aging Biomarkers, Mortality, and Damaging Mutations Illuminate the Beginning of Aging and Causes of Early-Life Mortality, *Cell Reports*, **29**, 4276-4284, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.11.091>.
60. Gladyshev, V. N. (2016) Aging: progressive decline in fitness due to the rising deleteriome adjusted by genetic, environmental, and stochastic processes, *Aging Cell*, **15**, 594-602, <https://doi.org/10.1111/acel.12480>.
61. Gavrilov, L. A., and Gavrilova, N. S. (1997) Parental age at conception and offspring longevity, *Rev. Clin. Gerontol.*, **7**, 5-12, <https://doi.org/10.1017/S0959259897000026>.

62. Gavrilov, L. A., and Gavrilova, N. S. (2015) Predictors of exceptional longevity: Effects of early-life and midlife conditions, and familial longevity, *North Am. Actuar. J.*, **19**, 174-186, <https://doi.org/10.1080/10920277.2015.1018390>.
63. Gavrilov, L. A., Gavrilova, N. S., Kroutko, V. N., Evdokushkina, G. N., Semyonova, V. G., Gavrilova, A. L., Lapshin, E. V., Evdokushkina, N. N., and Kushnareva, Y. E. (1997) Mutation load and human longevity, *Mutat. Res.*, **377**, 61-62, [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(97\)00058-4](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(97)00058-4).
64. Doblhammer, G., and Vaupel, J. (2001) Lifespan depends on month of birth, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 2934-2939, <https://doi.org/2910.1073/pnas.041431898>.
65. Gavrilov, L. A., and Gavrilova, N. S. (2011) Season of birth and exceptional longevity: comparative study of american centenarians, their siblings, and spouses, *J. Aging Res.*, 104616, <https://doi.org/10.4061/2011/104616>.
66. Jarry, V., Gagnon, A., and Bourbeau, R. (2013) Maternal age, birth order and other early-life factors: a family-level approach to exploring exceptional survival, *Vienna Yearbook Populat. Res.*, **11**, 263-284.
67. Barker, D. J. P. (1998) *Mothers, Babies, and Disease in Later Life* (2nd Edn), Churchill Livingstone, London.
68. Kuh, D., and Ben-Shlomo, B. (1997) *A Life Course Approach to Chronic Disease Epidemiology*, Oxford University Press, Oxford.
69. Gavrilov, L. A., and Gavrilova, N. S. (2003) Early-life factors modulating lifespan, in *Modulating Aging and Longevity* (Rattan, S. I. S. ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 27-50.
70. Vaiserman, A. M. (2019) *Early Life Origins of Ageing and Longevity*, Springer Cham.
71. Leake, D. W. (2022) Tracing slow phenoptosis to the prenatal stage in social vertebrates, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 1512-1527, <https://doi.org/1510.1134/S0006297922120094>.
72. Richardson, R. B., Allan, D. S., and Le, Y. (2014) Greater organ involution in highly proliferative tissues associated with the early onset and acceleration of ageing in humans, *Exp. Gerontol.*, **55**, 80-91, <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.03.015>.
73. Tower, J. (2015) Programmed cell death in aging, *Ageing Res. Rev.*, **23**, 90-100, <https://doi.org/10.1016/j.arr.2015.04.002>.
74. Galkin, F., Zhang, B. H., Dmitriev, S. E., and Gladyshev, V. N. (2019) Reversibility of irreversible aging, *Ageing Res. Rev.*, **49**, 104-114, <https://doi.org/10.1016/j.arr.2018.11.008>.
75. Wu, H. E. (2014) *Cell Death. Mechanism and Disease*, Springer New York, <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9302-0>.
76. Denic, A., Lieske, J. C., Chakera, H. A., Poggio, E. D., Alexander, M. P., Singh, P., Kremers, W. K., Lerman, L. O., and Rule, A. D. (2016) The substantial loss of nephrons in healthy human kidneys with aging, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **28**, 313-320, <https://doi.org/10.1681/asn.2016020154>.
77. Fricker, M., Tolkovsky, A. M., Borutaite, V., Coleman, M., and Brown, G. C. (2018) Neuronal cell death, *Physiol. Rev.*, **98**, 813-880, <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2017>.
78. Buetow, D. E. (1971) Cellular content and cellular proliferation changes in the tissues and organs of the aging mammal, in *Cellular and Molecular Renewal in the Mammalian Body* (Cameron, I. L., and Thrasher, J. D., eds.), Academic Press, New York, pp. 87-107.
79. Clarke, G., Collins, R. A., Leavitt, B. R., Andrews, D. F., Hayden, M. R., Lumsden, C. J., and McInnes, R. R. (2000) A one-hit model of cell death in inherited neuronal degenerations, *Nature*, **406**, 195-199, <https://doi.org/10.1038/35018098>.
80. Clarke, G., and Lumsden, C. J. (2005) Scale-free neurodegeneration: cellular heterogeneity and the stretched exponential kinetics of cell death, *J. Theor. Biol.*, **233**, 515-525, <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2004.10.028>.
81. Heintz, N. (2000) One-hit neuronal death, *Nature*, **406**, 137-138, <https://doi.org/10.1038/35018196>.
82. Clarke, G., Lumsden, C. J., and McInnes, R. R. (2001) Inherited neurodegenerative diseases: the one-hit model of neurodegeneration, *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 2269-2275, <https://doi.org/10.1093/hmg/10.20.2269>.
83. Holland, D., Desikan, R. S., Dale, A. M., and McEvoy, L. K. (2012) Rates of decline in Alzheimer's disease decrease with age, *PLoS One*, **7**, 12, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042325>.
84. Beard, R. E. (1959) Note on some mathematical mortality models, in *The lifespan of Animals* (Wolstenholme, E. W., and O'Connor, M. O., eds), Little, Brown and Company, Boston, pp. 302-311.
85. Beard, R. E. (1971) Some aspects of theories of mortality, cause of death analysis, forecasting and stochastic processes, in *Biological Aspects of Demography* (Brass, W., ed.), Taylor and Francis, London, pp. 57-68.
86. Vaupel, J. W., Manton, K. G., and Stallard, E. (1979) Impact of heterogeneity in individual frailty on the dynamics of mortality, *Demography*, **16**, 439-454.
87. Yashin, A. I., Vaupel, J. W., and Iachine, I. A. (1994) A duality in aging – the equivalence of mortality models based on radically different concepts, *Mech. Ageing Dev.*, **74**, 1-14, [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(94\)90094-9](https://doi.org/10.1016/0047-6374(94)90094-9).
88. Skulachev, M. V., and Skulachev, V. P. (2014) New data on programmed aging – slow phenoptosis, *Biochemistry (Moscow)*, **79**, 977-993, <https://doi.org/10.1134/s0006297914100010>.
89. Steinsaltz, D., and Evans, S. N. (2004) Markov mortality models: implications of quasistationarity and varying initial distributions, *Theor. Popul. Biol.*, **65**, 319-337, <https://doi.org/10.1016/j.tpb.2003.10.007>.
90. Whittmore, K., Vera, E., Martínez-Nevado, E., Sanpera, C., and Blasco, M. A. (2019) Telomere shortening rate predicts species life span, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 15122-15127, <https://doi.org/10.1073/pnas.1902452116>.

91. Gavrilov, L. A. (1978) Mathematical model of aging of animals, *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **238**, 490-492.
92. Avraam, D., de Magalhaes, J. P., and Vasiev, B. (2013) A mathematical model of mortality dynamics across the lifespan combining heterogeneity and stochastic effects, *Exp. Gerontol.*, **48**, 801-811, <https://doi.org/10.1016/j.exger.2013.05.054>.
93. Milne, E. M. G. (2008) The natural distribution of survival, *J. Theor. Biol.*, **255**, 223-236, <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2008.07.021>.
94. Laird, R. A., and Sherratt, T. N. (2010) The evolution of senescence in multi-component systems, *Biosystems*, **99**, 130-139, <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2009.10.008>.
95. Avraam, D., Arnold, S., Jones, D., and Vasiev, B. (2014) Time-evolution of age-dependent mortality patterns in mathematical model of heterogeneous human population, *Exp. Gerontol.*, **60**, 18-30, <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.09.006>.
96. Boonekamp, J. J., Briga, M., and Verhulst, S. (2015) The heuristic value of redundancy models of aging, *Exp. Gerontol.*, **71**, 95-102, <https://doi.org/10.1016/j.exger.2015.09.005>.
97. Charlesworth, B. (1994) *Evolution in Age-structured Populations*, 2nd Edn., Cambridge University Press, Cambridge.
98. Charlesworth, B. (2000) Fisher, Medawar, Hamilton and the evolution of aging, *Genetics*, **156**, 927-931, <https://doi.org/10.1093/genetics/156.3.927>.
99. Flatt, T., and Partridge, L. (2018) Horizons in the evolution of aging, *BMC Biol.*, **16**, 13, <https://doi.org/10.1186/s12915-018-0562-z>.
100. Skulachev, V. P. (2011) Aging as a particular case of phenoptosis, the programmed death of an organism (A response to Kirkwood and Melov "On the programmed/non-programmed nature of ageing within the life history"), *Aging*, **3**, 1120-1123, <https://doi.org/10.18632/aging.100403>.
101. Gavrilova, N. S., Gavrilov, L. A., Severin, F. F., and Skulachev, V. P. (2012) Testing predictions of the programmed and stochastic theories of aging: comparison of variation in age at death, menopause, and sexual maturation, *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 754-760, <https://doi.org/10.1134/S0006297912070085>.

EXPLORING PATTERNS OF HUMAN MORTALITY AND AGING: A RELIABILITY THEORY VIEWPOINT

Review

L. A. Gavrilov^{1,2*} and N. S. Gavrilova^{1,2}

¹ NORC at the University of Chicago, 60637 Chicago, IL, USA

² Institute for Demographic Research, Federal Center of Theoretical and Applied Sociology,
Russian Academy of Sciences, 109028 Moscow, Russia; e-mail: lagavril@yahoo.com

The most important manifestation of aging is an increased risk of death with advancing age, a mortality pattern characterized by empirical regularities known as mortality laws. We highlight three significant ones: the Gompertz law, compensation effect of mortality (CEM), and late-life mortality deceleration and describe new developments in this area. It is predicted that CEM should result in declining relative variability of mortality at older ages. The quiescent phase hypothesis of negligible actuarial aging at younger adult ages is tested and refuted by analyzing mortality of the most recent birth cohorts. To comprehend the aging mechanisms, it is crucial to explain the observed empirical mortality patterns. As an illustrative example of data-directed modeling and the insights it provides, we briefly describe two different reliability models applied to human mortality patterns. The explanation of aging using a reliability theory approach aligns with evolutionary theories of aging, including idea of chronic phenoptosis. This alignment stems from their focus on elucidating the process of organismal deterioration itself, rather than addressing the reasons why organisms are not designed for perpetual existence. This article is a part of a special issue of the journal that commemorates the legacy of the eminent Russian scientist Vladimir Petrovich Skulachev (1935-2023) and his bold ideas about evolution of biological aging and phenoptosis.

Keywords: aging, mortality, Gompertz model, compensation effect of mortality, mortality deceleration, reliability theory of aging, evolutionary models of aging

ДВА ТИПА КРИВЫХ ДОЖИТИЯ У РАЗЛИЧНЫХ ЛИНИЙ ПРОГЕРИЧЕСКИХ МЫШЕЙ

Мини-обзор

© 2024 С.С. Соколов, Ф.Ф. Северин*

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

Поступила в редакцию 26.08.2023

После доработки 02.12.2023

Принята к публикации 29.12.2023

На протяжении большей части срока жизни многих видов животных вероятность их смерти увеличивается с возрастом. Закон Гомперца утверждает, что это увеличение имеет экспоненциальную зависимость. В данной работе мы сравнивали литературные данные по кинетикам дожития у различных линий прогерических мышей. Визуальный анализ показал, что у шести из таких быстро стареющих мутантов вероятность смерти не имеет строгой зависимости от возраста. Напротив, у десяти линий прогерических мышей кривые дожития похожи на таковые контрольных животных, то есть, подчиняясь закону Гомперца, похожи по форме на перевёрнутую экспоненту. Интересно, что эти десять мутаций вызывают совершенно разные нарушения функционирования клеток. Мы предполагаем, что общее у этих мутаций – это сокращение срока жизни клеток и/или ускорение перехода в состояние senescence. Таким образом, наши данные, как и данные многих ранее опубликованных работ, указывают на то, что старение организма является следствием старения отдельных клеток.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: прогерия, кривые дожития, закон Гомперца, старение.

DOI: 10.31857/S0320972524020126 EDN: XMBURJ

Начиная с середины девяностых, Владимир Петрович много работал над различными аспектами процесса старения. Его разработки по теории феноптоза органично дополняли практический проект по ионам Скулачёва. Было много статей на тему старения, книга, конференции. Были семинары по четвергам. С его уходом в нашем институте интерес к теме старения как-то угас. Пользуюсь случаем, чтобы обратиться к читателям журнала «Биохимия», участникам тех семинаров: а может, возобновим четверговые семинары по геронтологии? Неужели все наши общие интеллектуальные усилия на тему старения уже в прошлом?

Конечно же, вопросы старения он и я обсуждали не только на семинарах, а ещё и дома, ну или на прогулке с собакой. Мне не хватает этих бесед. Думаю, его заинтересовал бы один любопытный факт, который обнаружился в процессе чтения литературы по быстро стареющим мышам.

Фёдор

В лабораторной практике широко используются мыши с мутациями, вызывающими ускоренное старение. В частности, это делается для того, чтобы опыты по продолжительности жизни мы-

шей не занимали слишком много времени. Важно отличать прогерические мутации от мутаций, просто сокращающих срок жизни животного. Прогерическими считаются такие животные, продолжительность жизни которых значительно ниже, чем у контрольных, и при этом у них с возрастом

* Адресат для корреспонденции.

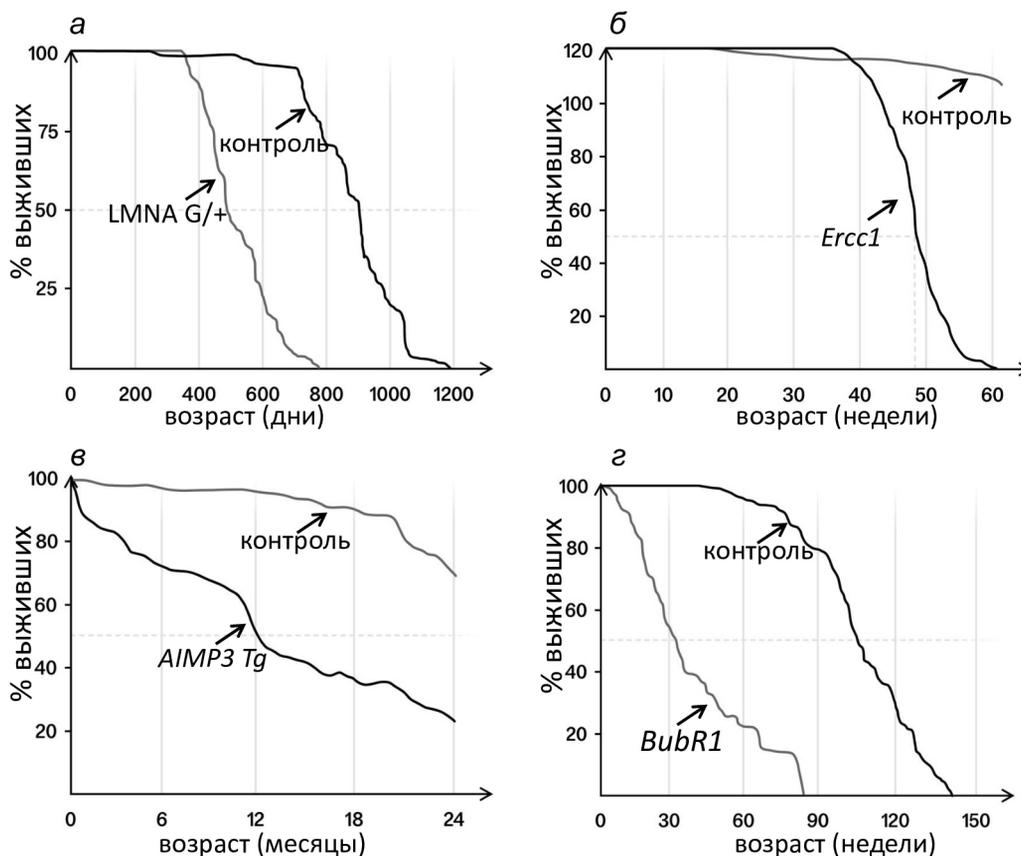
проявляются типичные признаки старения, такие как кифоз, атрофия жировой и мышечной тканей, кардиомиопатия и ряд других (см. обзор Liao et al. [1]). Как ни странно, в наборе этих признаков не присутствует форма кривой дожития мышей. Хорошо известно, что увеличение вероятности смерти с возрастом происходит согласно экспоненциальной зависимости. Это закон Гомперца, которому подчиняются кинетики дожития мышей, людей и многих других живых существ (см. обзор Gavrilov et al. [2]). В этой работе мы попытались определить, кривые дожития каких из прогерических линий мышей, согласно закону Гомперца, имеют форму перевёрнутой экспоненты (или похожую на неё).

Визуальный анализ форм кривых показал, что они бывают двух типов. Один тип кривых похож на таковой для контрольных мышей, то есть, видимо, соответствует закону Гомперца. Второй тип кривых существенно отличается от первого. Можно предположить, что у этих прогерических мышей вероятность смерти не зависит от возраста. На панелях *a* и *б* рисунка представлены примеры кривых дожития первого типа, на панелях *в* и *г* – второго. График *a* представляет кривую дожития мутанта *Lmna*^{G608G}. График *б* – мутант *Ercc1*^{-/-},

в – мутант *BubR1*^{H/H}; *г* – мутант *AIMP3*^{Tg}. Графики взяты из работ Cabral et al., Vermeij et al., Wijshake et al. и Oh et al. [3–6] соответственно.

В таблице приведено большинство используемых в лабораторной практике линий прогерических мышей (согласно таблице 5.2 обзора Liao et al. [1]). По результатам визуального анализа эти линии разделены на две группы: те, кривые дожития которых похожи на кривые на рисунке, *a* и *б*, и те, которые сходны с таковыми из панелей *в* и *г*. Как видно из таблицы, кривые дожития у десяти мутантных линий похожи на таковые контрольных мышей, то есть как на панелях *a* и *б* (левый столбец).

Примечательно, что мутации, представленные в левом столбце таблицы, имеют совершенно разную природу. Они затрагивают белок ядерной оболочки ламин А, репарацию ядерной ДНК, репликацию митохондриальной ДНК, защиту от окислительного стресса, деацетилирование гистонов, супрессию роста опухолей. Тем не менее эти совершенно разные вмешательства в физиологию клеток имеют, очевидно, очень похожий результат на уровне организма: ускорение кинетики старения в рамках закона Гомперца. Как это можно объяснить? Возможно, все эти мутации, каждая



Два типа кривых дожития прогерических мышей. На панелях *a* и *б* показаны кривые, похожие на таковые для контрольных животных. Кривые на панелях *в* и *г* визуально отличаются от представленных на панелях *a* и *б*. Графики построены по данным из работ, указанных в тексте

Мутации, вызывающие у мышей ускоренное старение, и функции белков, кодируемых мутированными генами

Линии мышей с кривыми дожития, похожими на контрольные	Линии мышей, у которых вероятность смерти визуально не зависит от возраста
<p><i>Lmna</i>^{G608G}, ламин А, белок ядерной оболочки</p> <p><i>Xpd</i>^{-/-}, ДНК-репараза</p> <p><i>Ercc1</i>^{-/-}, ДНК-репараза</p> <p><i>Polga</i>^(mut), митохондриальная ДНК-полимераза</p> <p><i>Sod1</i>^{-/-}, супероксиддисмутаза</p> <p><i>MsrA</i>^{-/-}, метионин сульфоксидредуктаза</p> <p><i>p62</i>^{-/-}, белок-адаптор, функция при аутофагии и окислительном стрессе</p> <p><i>Mtr</i>^{-/-}, теломераза</p> <p><i>Sirt6</i>^{-/-}, деацетилаза гистонов</p> <p><i>p53</i>^{+m}, супрессор роста опухолей</p>	<p><i>ku86</i>^{-/-}, рекомбинация, репарация двунитевых разрывов ДНК</p> <p><i>top3B</i>^{-/-}, топоизомераза</p> <p><i>BubR1</i>^{hh}, митотический чекпоинт</p> <p><i>Terc1</i>^{-/-}<i>Atm</i>^{-/-}, поддержка теломер</p> <p><i>Sirt1</i>^{-/-}, деацетилаза гистонов</p> <p><i>AIMP3</i>Tg, супрессор роста опухолей</p>

своим уникальным образом, либо снижают срок жизни клеток, либо ускоряют переход в состояние senescence. Действительно, хорошо известно, что при старении изменяется тканевый состав органов. Например, в скелетных мышцах миофибриллы атрофируются и заменяются клетками жировой и соединительной тканей. Кроме того, в различных тканях с возрастом увеличивается доля клеток в состоянии senescence.

Другими словами, это наблюдение является ещё одним доводом в пользу того, что первичная причина старения – это старение индивидуальных клеток, а не, например, возрастные изменения в межклеточных взаимодействиях. То, что прогерические мутации укорачивают срок жизни культуральных клеток, показано как минимум для двух мутаций из левого столбца таблицы. Есть данные о том, что старение первичных фибробластов, взятых у больных прогерией, вызванной мутацией в ламине А, происходит быстрее, чем у контрольных клеток [7]. То же самое наблюдается у предшественников клеток крови (hematopoietic progenitors) из прогерических мышей с нокаутированным геном [8]. В этих двух работах исследовалось так называемое репликативное старение.

Надо отметить, что существует два типа экспериментальных моделей старения культуральных клеток – старение репликативное и хронологическое. Большинство работ этого направления посвящено репликативному старению. Так, было показано, что количество делений первичных

фибробластов ограничено лимитом Хейфлика. Хронологическое старение связано с тем, что после достижения состояния монослоя деление клеток прекращается, и через некоторое время клетки начинают умирать. Обе модели имеют свои ограничения, но при этом успешно используются для поиска геропротекторов [9].

Наконец, можно задать вопрос: могут ли геропротекторы либо генетические вмешательства изменить тип кривой дожития прогерических мышей? Нам не удалось найти примеров превращения кривой первого типа (визуально подчиняющейся закону Гомперца) в кривую второго типа. Например, митохондриально направленный антиоксидант SkQ1 достоверно увеличивает продолжительность жизни мышей линии *Polga*^(mut), но форма кривой дожития при этом не меняется (работа Shabalina et al. [10], рис. 9). Кривые же второго типа могут измениться. Так, делеция гена *p21*, экспрессия которого активируется при повреждении ДНК, продлевает жизнь мышам с делецией теломеразы *Terc1*. При этом форма кривой дожития становится визуально похожей на перевёрнутую экспоненту (Choudhury et al. [11], рисунок).

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта РФФ (22-24-00533).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. В рамках данного исследования опыты с участием людей или животных в качестве объектов не производились.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Liao, C.-Y., and Kennedy, B. K. (2014) Mouse models and aging: longevity and progeria, *Curr. Top. Dev. Biol.*, **109**, 249-285. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397920-9.00003-2>.
2. Gavrilov, L. A. and Gavrilova, N. S. (2015) New developments in the biodemography of aging and longevity, *Gerontology*, **61**, 364-371, <https://doi.org/10.1159/000369011>.
3. Cabral, W. A., Tavares, U. L., Beeram, I., Yeritsyan, D., Boku, Y. D., Eckhaus, M. A., et al. (2021) Genetic reduction of mTOR extends lifespan in a mouse model of Hutchinson-Gilford Progeria syndrome, *Aging Cell*, **20**, e13457, <https://doi.org/10.1111/accel.13457>.
4. Vermeij, W. P., Dollé, M. E. T., Reiling, E., Jaarsma, D., Payan-Gomez, C., Bombardieri, C. R., et al. (2016) Restricted diet delays accelerated ageing and genomic stress in DNA-repair-deficient mice, *Nature*, **537**, 427-431, <https://doi.org/10.1038/nature19329>.
5. Wijshake, T., Malureanu, L. A., Baker, D. J., Jeganathan, K. B., van de Sluis, B., and van Deursen, J. M. (2012) Reduced life- and healthspan in mice carrying a mono-allelic BubR1 MVA mutation, *PLoS Genet.*, **8**, e1003138, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003138>.
6. Oh, Y. S., Kim, D. G., Kim, G., Choi, E.-C., Kennedy, B. K., Suh, Y., et al. (2010) Downregulation of lamin A by tumor suppressor AIMP3/p18 leads to a progeroid phenotype in mice, *Aging Cell*, **9**, 810-822, <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00614.x>.
7. Goldman, R. D., Shumaker, D. K., Erdos, M. R., Eriksson, M., Goldman, A. E., Gordon, L. B., et al. (2004) Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 8963-8968, <https://doi.org/10.1073/pnas.0402943101>.
8. Prasher, J. M., Lalai, A. S., Heijmans-Antonissen, C., Ploemacher, R. E., Hoeijmakers, J. H. J., Touw, I. P., et al. (2005) Reduced hematopoietic reserves in DNA interstrand crosslink repair-deficient *Ercc1^{-/-}* mice, *EMBO J.*, **24**, 861-871, <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600542>.
9. Khokhlov, A. N., and Morgunova, G. V. (2017) Testing of geroprotectors in experiments on cell cultures: pros and cons, in *Anti-Aging Drugs: From Basic Research to Clinical Practice* (Vaiserman, A. M., ed), Royal Society of Chemistry, p. 53-74, <https://doi.org/10.1039/9781782626602-00051>.
10. Shabalina, I. G., Vysokikh, M. Y., Gibanova, N., Csikasz, R. I., Edgar, D., et al. (2017) Improved health-span and lifespan in mtDNA mutator mice treated with the mitochondrially targeted antioxidant SkQ1, *Aging (Albany NY)*, **9**, 315-339, <https://doi.org/10.18632/aging.101174>.
11. Choudhury, A. R., Ju, Z., Djojotubroto, M. W., Schienke, A., Lechel, A., et al. (2007) Cdkn1a deletion improves stem cell function and lifespan of mice with dysfunctional telomeres without accelerating cancer formation, *Nat. Genet.*, **39**, 99-105, <https://doi.org/10.1038/ng1937>.

TWO TYPES OF SURVIVAL CURVES OF DIFFERENT LINES OF PROGERIC MICE

Mini-Review

S. S. Sokolov and F. F. Severin*

*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119992 Moscow, Russia; e-mail: severin@belozersky.msu.ru*

For the most of their lifespan, the probability of death for many animal species increases with age. Gompertz's law states that this increase is exponential. In this work, we have compared previously published data on the survival kinetics of different lines of progeric mice. Visual analysis showed that in six lines of these rapidly aging mutants, the probability of death did not strictly depend on age. In contrast, ten lines of progeric mice have the survival curves similar to those of the control animals, that is, in agreement with Gompertz's law, similar to the shape of an exponential curve upside down. Interestingly, these ten mutations cause completely different cell malfunctions. We speculate that what these mutations have in common is a reduction in the lifespan of cells and/or an acceleration of the transition to the state of cell senescence. Thus, our analysis, similar to the conclusions of many previously published works, indicates that the aging of an organism is a consequence of the aging of individual cells.

Keywords: progeria, survival curves, Gompertz law, aging

ИСЧИСЛЕНИЕ СТАРЕНИЯ: АНАЛИЗ КРИВЫХ ВЫЖИВАНИЯ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ, КОЛЕБАНИЕ ДИНАМИКИ СМЕРТНОСТИ, ХАРАКТЕРИСТИКИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ И ПОКАЗАТЕЛИ ЕЕ РАЗБРОСА

© 2024 Г.А. Шиловский^{1,2,3}

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

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234 Москва, Россия

³Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН, 127051 Москва, Россия

Поступила в редакцию 24.11.2023

После доработки 24.11.2023

Принята к публикации 29.12.2023

В работе приведена история изучения данных по продолжительности жизни, проводимого в НИИ ФХБ под руководством акад. В.П. Скулачева, начиная с 70-х гг. XX века, с особым акцентом на последнее десятилетие. Применение, помимо гомпертцевых методов анализа, моделей ускоренного отказа (AFT, accelerated failure time) и анализа коэффициента вариации (КВ) продолжительности жизни (ПЖ) позволяет проверять кривые выживания на наличие временного масштабирования (фактически на проявление ускоренного старения), без изменения формы кривой выживания с сохраняющимся КВ. Модификация модели AFT фактически предполагает использовать в качестве нулевой гипотезы «временное масштабирование», позволяя отделять количественные отличия в динамике старения от качественных. Также показано, что сравнивать данные по выживанию видов с кривой выживания исходной формы (особенно «плоские», без выраженного роста вероятности смерти с возрастом, характерные для медленно стареющих видов) возможно при рассмотрении распределения ПЖ как статистической случайной величины и сравнении параметров такого распределения. Так, показано, что чем выше влияние (в дополнение к возраст-зависимой смертности) компоненты смертности, вызванной внешними причинами (фоновой смертности), тем выше будет неупорядоченность значений смертности, тем дальше значение КВ ПЖ человека будет от КВ, характерного для людей из развитых стран (15–20%). Для сравнения, для парагвайских индейцев-аче величина КВ ПЖ составляет 100% (а если рассматривать [по методике Jones et al.] группу только с начала полового созревания – 57%). Следующим шагом, по В.П. Скулачеву, является рассмотрение колебаний смертности как меры неупорядоченности данных по выживанию. Важные для последующего анализа данные, однако, могут быть получены уже при визуальном анализе кривых выживания. Так, Sokolov и Severin {2024, Биохимия} обнаружили, что мутации по-разному влияют на форму кривых выживания. В одном случае кривая выживания (I типа) в целом сохраняет стандартную (выпуклую) ректангуляризованную форму, а в случае кривой II типа происходит резкое увеличение смертности, и кривая становится похожей на вогнутую экспоненту с высоким постоянным уровнем смертности. Примечательно, что, несмотря на такие различия, мутации I и II группы имеют сходную природу. Они связаны с i) «метаболизмом ДНК» (репарация, транскрипция, репликация ДНК); ii) защитой от окислительного стресса, связанной с активностью транскрипционного фактора Nrf2; iii) регуляцией пролиферации, причем эти категории могут перекрываться. Тем не менее эти разные мутации имеют, видимо, схожий результат на уровне организма: ускорение старения по закону Гомпертца. Возможно, это можно объяснить тем, что все эти мутации, каждая своим уникальным путем, либо снижают ПЖ клеток, либо ускоряют переход в сенесцентное состояние, что поддерживает концепцию В.П. Скулачева о множественности путей старения (хронического фенотоза).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: кривые смертности, старение, неравномерность продолжительности жизни, фенотоз, острый фенотоз, биоритмы, хронобиология.

DOI: 10.31857/S0320972524020138 EDN: XMARUU

ВВЕДЕНИЕ

В настоящем номере журнала «Биохимия», посвященном памяти выдающегося геронтолога и биохимика Владимира Петровича Скулачева, вышла статья [1], где упоминается тот самый диалог, в котором было высказано предположение, что не только величина видовой предположительности жизни (ПЖ) [2], но и траектория ее достижения в когорте (кривая выживания), и сравнение таких кривых имеют важное значение для решения задач одного из направлений геронтологии, развиваемых в НИИ ФХБ, а именно направлений, связанных с биологией ПЖ.

Именно это направление является для НИИ ФХБ исторически наиболее ранним и развивалось в отделе биоэнергетики еще с 1970-х гг. (см., например, работу Гаврилова и соавт. [3]), а в 1991 г. вышла (сразу на двух языках) монография по этому направлению геронтологии, с тех пор считающаяся классическим учебником на данную тему [4]. Известно, что по закону Гомпертца увеличение вероятности смерти с возрастом (по крайней мере в определенном возрастном интервале) происходит согласно экспоненциальной зависимости. Этому закону подчиняются кривые выживания по крайней мере у млекопитающих, а также у некоторых лабораторных животных: нематод и дрозофил (подробнее о характере кривых выживания у животных см. далее) [5, 6].

Шли годы, и выяснилось, что не все задачи удобно решать с помощью анализа таблиц выживания с использованием уравнения Гомпертца (или Гомпертца–Мейкема) как модели повышения риска смерти с возрастом, что выяснилось, например, при дискуссии о границах применения константы Мейкема и производной от закона Гомпертца корреляции Стрелера–Милдвана [4–6]. Предположения, обсуждаемые в статье Sokolov et al. [1], были интересными для Владимира Петровича, и десять лет назад он создал в Институте небольшую группу для изучения этой темы и руководил ею, принимая самое непосредственное участие в ее работе (см., например, опубликованные работы [7–10]).

Sokolov и Severin [1] продемонстрировали результаты наиболее простого метода предварительных исследований, визуального сравнения кривых выживания на примере десяти линий мутантных прогерических мышей из опубликованных работ [11–17], и обнаружили, что они бывают двух типов: кривые выживания **I типа**, похожие на таковые контрольных мышей, и кривые **II типа**, которые имеют форму *перевернутой*

экспоненты (или похожи на нее). Следует отметить, что речь здесь идет лишь о предупредительном первичном анализе данных, позволяющем, однако, оценить тяжесть воздействия изучаемой мутации на ход кривой выживания ее носителей. На самом деле обычная кривая выживания плохо аппроксимируется перевернутой экспонентой. Эта функция [вида $\exp(-ct)$] не имеет точек перегиба, но имеет длинный хвост и заметно отличается от прямой линии. На приведенных же в работе Sokolov et al. [1] функциях точка перегиба видна даже на ступенчатом графике. Этот факт не совсем корректно игнорировать при анализе кривых выживания. Ведь точка перегиба означает наличие долгожителей, которые вполне заметны и не могут объясняться ошибкой измерения. Для последующего анализа данных в работах группы В.П. Скулачева применялись методы, рассмотренные в следующем разделе.

МОДЕЛИ АНАЛИЗА ДАННЫХ

Работы группы В.П. Скулачева. Коэффициент вариации (КВ). Одной из основных вех этого направления исследований можно считать работу В. П. Скулачева, Н. и Л. Гавриловых и одного из авторов обсуждаемой статьи [1], Ф.Ф. Северина [18]. Используя данные национального обследования населения США и 14 наиболее развитых стран, они перешли от рассмотрения кривых выживания к изучению ПЖ как случайно распределенной статистической величины, подчеркивая, что важность имеет не только сама величина и ее динамика, но и относительный ее разброс (коэффициент вариации (КВ) ПЖ). Было показано, что относительные изменчивости параметров развития и старения человека похожи, т.е. относительная изменчивость возраста, когда происходит такое контролируемое в онтогенезе событие, как половое созревание женщины (менархе), и относительная изменчивость возраста начала изменений, связанных со старением (менопауза), и ПЖ (как возраста наступления смерти) примерно одинаковы, и КВ для них колеблется в районе 15–20% [18]. Позднее аналогичные показатели КВ ПЖ были получены [7] и при анализе данных из открытой базы [19] по выживанию японок. Действительно, все исследования дополнительных демографических показателей, в том числе и рассматриваемых, например, Баудиш, Вепелем и Кольхеро ([20], для обзора см. работу Skulachev et al. [10]), начались с осознания того, что существуют методы, позволяющие получить новую

Принятые сокращения: КВ – коэффициент вариации; ПЖ – продолжительность жизни; АФТ – модель ускоренного времени отказа (*accelerated failure time*).

информацию о ходе смертности. Так, еще одной не только значимой, но и знаменующей собой определенный этап анализа данных типа ПЖ была опубликованная в 2014 г. в *Nature* работа Института Макса Планка (Росток, ФРГ/Оденсе, Дания) [19], в которой было проведено сравнение кривых выживания, смертности и фертильности широкого спектра систематических групп (23 вида позвоночных, 10 беспозвоночных, 12 сосудистых растений и одна водоросль), начиная с возраста полового созревания до возраста, до которого доживает лишь 5% особей («терминального»). Любопытно, что в итоговой таблице Jones et al. [19] не приводят кривые выживания (и расчет изучаемых показателей) для лабораторных мышей, несмотря на обилие таких данных. Они объясняют это тем, что *кривые выживания линейных мышей сильно искажены по сравнению с другими животными (видимо, за счет груза мутаций, накопившегося в результате содержания в лабораторных условиях)*. Владимир Петрович считал работу Jones et al. воистину фундаментальным трудом, собравшим результаты о наиболее достоверных данных о кривых выживания самых разных видов, и неоднократно обсуждал выводы и идеи этой работы на геронтологических семинарах, в своих статьях [10, 21] и даже в своей книге «Жизнь без старости» [22]. Однако он предположил, что, несмотря на представительность рассмотренной выборки, выводы [19] не столь очевидны, и потому необходимо провести их критический анализ [7, 9]. По итогам расчетов кривые выживаемости, смертности и фертильности, опубликованные Институтом демографических исследований [19], были разделены на 4 большие группы по отношению смертности в терминальном возрасте к средней, где группа I включает виды с наименьшим ростом смертности с возрастом (отношение максимальной смертности к средней за весь исследуемый возрастной интервал), а IV – с наибольшим [7]. Так, на наш взгляд, признаки старения по Гомпертцу отсутствуют у растений и водорослей, некоторых низших Metazoa (стрекающих), а из позвоночных – у земноводных и пресмыкающихся. В наибольшей степени старению по Гомпертцу подвержены, кроме млекопитающих, виды с большим количеством постмитотических клеток, например, насекомые (хотя смертность других артропод, например, крабов, может и не расти с возрастом). Наиболее рельефно ограничения метода [19] проявляются у птиц. Так, крупные птицы, вопреки выводам Jones, все же стареют, но их биологическое старение может начать проявляться в довольно позднем возрасте, до которого в естественных условиях доживает менее 5% особей. Старение же мелких птиц, имеющих много врагов и высокую экзогенную смертность, как предполагается, в природе выявить практически невозможно.

Таким образом, в итоговой таблице они будут находиться рядом с медленно стареющими видами (неоднократно упоминающаяся в биogerонтологической литературе ситуация, когда вызванная внешними причинами смертность настолько велика, что совершенно скрывает собой возраст-зависимую компоненту смертности) (случай, аналогичный кривым **II типа** в работе Sokolov et al. [1]).

Полупараметрическая модель пропорциональных рисков Кокса (PH, Cox proportional hazards model) и модель ускоренного времени отказа (AFT, accelerated failure time). Предполагается, что мутации у мышей, просто сокращающие ПЖ, будут отличаться в том числе и по форме кривой выживания (pace and shape of aging) от прогрессивных мутаций, которые не только снижают ПЖ, но при которых развиваются и характерные для данного вида признаки возрастных патологий. Поскольку определение форм кривых на глаз не всегда приводит к точным результатам (именно поэтому в свое время отказались от проверок на глаз, например, нормальности распределения), в биogerонтологии стали применяться специальные демографические методы. *Полупараметрическая модель пропорциональных рисков Кокса (PH, Cox proportional hazards model)* [23] широко применяется в медицине и эпидемиологии, но редко – в исследованиях ПЖ и старения. Она описывает оценку зависящих от возраста уровней смертности в разных условиях, т.е. соотношение рисков (логарифмы функции риска против логарифма времени (*log-cumulative hazard plot*)), что является удобным для медицинских исследований (например, оценки рисков смертности в различные моменты после операции), но не для анализа кривых выживаемости [23, 24]. *Модель ускоренного времени отказа (AFT)* сравнивает не непосредственные вероятности гибели в тот или иной момент времени, а целые кривые выживания. При этом кривые выживания переходят одна в другую путем замены переменных: $S_1(\lambda t) = S_0(t)$, где параметр λ является *безразмерным коэффициентом, определяющим величину эффекта*, который одинаков для любой квантили. Биологический смысл этой формулы состоит в том, что для двух сравниваемых групп особей «биологические часы» идут с разной скоростью, но при этом характер изменения риска смерти с возрастом качественно остается тем же самым. Графически кривые выживаемости S_1 и S_0 будут выглядеть как растянутые или сжатые друг относительно друга по временной оси. При этом средняя, медианная и максимальная ПЖ также изменяются пропорционально, а вышеупомянутый КВ остается [практически] постоянным [25]. Таким образом, имеет место **временное масштабирование** (temporal scaling), когда многие самые разнообразные факторы, увеличивающие

или сокращающие ПЖ (окислительный стресс, изменение температуры или пищевого рациона, мутации), не изменяют форму кривой выживания, а лишь растягивают или сжимают ее вдоль оси времени. Это, по мнению авторов, говорит о существовании программы старения [26]. В работе Swindell et al. [25] «сырые» данные по эффектам различных генетических манипуляций, увеличивающих ПЖ у мышей, анализировали с помощью обеих моделей с целью выбора более точно соответствующей с этими экспериментальными данными. При использовании модели AFT наибольшим влиянием на ПЖ у мышей обладали гомозиготные мутации *Prop1* ($\lambda = 1,48$) и *Pit1* ($\lambda = 1,39$). Несколько слабее действовали гомозиготная мутация *PappA* и гетерозиготные мутации *Clk1*^{+/-}, *Irs2*^{+/-} у самцов ($1,20 < \lambda < 1,40$). Остальные генетические манипуляции вызывали сходный и довольно слабый эффект ($1,03 < \lambda < 1,20$). В случае *Irs2*^{+/-} эффект у самцов был сильнее, чем у самок, а в случае *Clk1*^{+/-} был разным у двух разных линий мышей.

В 2016 г. для нематоды *Caenorhabditis elegans* (с использованием разработанной автоматической системы, позволяющей точно фиксировать момент смерти нематоды) показано, что у нематод генный нокаут приводит к изменению коэффициента временного масштабирования ПЖ (λ) в 2–3 раза, влияние перекиси – до 17 раз, а температуры – до 7 [26]. Markov et al. [27] проводили отбор дрозофил на замедление старения (а следовательно, и на долгожительство). Анализируя кривые выживания обычных, долгоживущих (отбираемых на долголетие) и короткоживущих (культивируемых на неблагоприятном корме и отбираемых на раннее размножение) дрозофил, Марков предположил, что при небольшой разнице в КВ ПЖ сравниваемых групп дрозофил у них будет наблюдаться временное масштабирование кривых выживания («правило Маркова»). В группе под руководством В.П. Скулачева [8] данные по выживанию дрозофил, полученных при содержании на нормальной и неблагоприятной (крахмаловой и соленой) средах [27], сравнивали методом, предложенным Stroustrup et al. [26]. Кратко, данные по ПЖ логарифмировали, и логарифмированные данные приводили к единой временной шкале, деля на среднюю ПЖ в группе. Преобразованные таким образом данные имели среднее, равное единице, во всех группах. Распределения отклонений от среднего в разных группах сравнивали попарно критерием Колмогорова–Смирнова с поправкой Бонферрони [8], необходимой для множественных попарных сравнений, чтобы уменьшить вероятность ложноположительных результатов [28]. Было показано, что правило Маркова справедливо при небольших различиях в КВ ПЖ (~10%) и непересякающихся кривых выживания, и, таким обра-

зом, хорошо применимо для первичного анализа данных по выживанию [8].

Теории и механизмы старения. Выбор белков – ключевых факторов старения. Опираясь на примеры возрастной дегенерации тканевого состава органов (атрофия миофибрилл в скелетных мышцах и замена их клетками жировой и соединительной тканей и увеличение в целом доли клеток в сенесцентном состоянии), авторы работы Sokolov et al. [1] делают заключение в пользу гипотезы о том, что первичная причина старения заключена в старении отдельных клеток, а не, например, в возрастных изменениях межклеточных структур. Sokolov и Severin [1] обнаружили, что несмотря на то, что мутации по-разному влияют на форму кривых выживания, они имеют сходную природу. Они связаны с i) «метаболизмом ДНК» (репарация, транскрипция, репликация ДНК); ii) защитой от окислительного стресса, связанной с активностью транскрипционного фактора Nrf2, iii) регуляцией пролиферации, причем эти категории могут перекрываться. Тем не менее эти разные мутации имеют, видимо, схожий результат на уровне организма: ускорение старения по закону Гомпертца. Возможно, это можно объяснить тем, что все эти мутации, в том числе две мутации двух генов белков «настоящих прогерий»: прогерии Хатчинсона–Гилфорда (*Lmna*^{G608G}) и пигментной ксеродермы, *XPD* (xeroderma pigmentosum D), каждая своим уникальным путем, либо снижают ПЖ клеток, либо ускоряют переход в сенесцентное состояние [1], что поддерживает концепцию В.П. Скулачева о множественности путей старения (хронического фенотоза) [10].

Рассматривая различия в эффекте мутаций, мы склонны предположить, что эффект мутаций II типа для ПЖ более пагубен. Раз старение перестает зависеть от возраста (а ПЖ снижается), то ситуация с жизнеспособностью столь плоха, что животные умирают, не успевая постареть еще больше. Это объясняет приводимый в работе Sokolov et al. [1] факт того, что кривые II типа (со сниженной ПЖ) можно относительно легко изменить (например, делеция гена *p21* (*Cdkn*^{-/-}) увеличивает ПЖ мышам с делецией теломеразы *Terc1*, делая форму кривой выживания визуально похожей на перевернутую экспоненту [29]). Чтобы, наоборот, превратить кривую I типа в кривую II, нужно не защитное, а дополнительное повреждающее воздействие.

Модели клеточного старения. Согласно Sokolov et al. [1], существует два типа экспериментальных моделей старения культуральных клеток: репликативное и хронологическое. Обе модели имеют свои ограничения, но при этом успешно используются для тестирования геропротекторов [30]. Тем не менее упоминаемый

ими Khokhlov [30] сразу оговаривает тот факт, что теория репликативного старения (и существование лимита Хейфлика) не объясняет старение организма [31]. Дискуссионным вопросом является и утверждение о том, что старение клеток однозначно является главной причиной старения организма. Так, авторы работы Sokolov et al. [1] ссылаются на теорию старения А.Н. Хохлова. Однако если взять его наиболее высокорейтинговую статью в журнале *Biogerontology* [32], то там говорится как раз другое: «По-видимому, главную роль в механизмах старения многоклеточных организмов по-прежнему играет нарушение регуляторных процессов, реализующихся на нейрогуморальном уровне, а не просто накопление макромолекулярных дефектов в отдельных клетках. Похоже, что с возрастом ухудшается не качество самих клеток, а надежность контроля организма над клетками, органами и тканями, что приводит к увеличению вероятности гибели». Аналогично Владимир Петрович не раз отмечал важность в контроле старения управления этим процессом на уровне организма, а именно действие Больших биологических часов (Master clock), расположенных в клетках супрахиазматического ядра гипоталамуса [33].

Действительно, при изучении влияния мутаций не исключено, что нокаут генов не будет одновременно влиять и на другие процессы, то есть такое исследование лучше выполнять в привязке к какому-либо определенному гену/белку, играющему важную роль в рассматриваемом в каждой конкретной работе конкретном же механизме старения. Так, для группы Хохлова, ставящей во главу угла повреждение ДНК, роль такого белка играет PARP1, универсальный сенсор поврежденный такого рода [34]. Владимир Петрович, в свою очередь, считал одним из важнейших представителей программ антистарения (витаукта) систему транскрипционного фактора Nrf2/Keap1/ARE [33], руководящую практически всей антиоксидантной защитой клетки [35], в том числе и экспрессией генов белков, ответственных за борьбу с окислительным стрессом, упомянутых и в работе Sokolov et al. [1], где транскрипция всех трех генов белков-защитников от окислительного стресса находится под контролем Nrf2 (из-за содержания элемента

ARE в своей промоторной области); также белок p62 защищает Nrf2 от протеасомной деградации при участии адаптера убиквитинлигазы Keap1.

Немонотонность тренда смертности. Следующим шагом, по В.П. Скулачеву, является рассмотрение колебаний смертности как меры неупорядоченности данных по выживанию; теоретические основы такого подхода см., например, у Buescu et al. и Ebmeier et al. [36, 37]. Анализ демографических данных свидетельствует о неравномерном распределении смертности в течение года, месяца и даже недели. Высота максимумов таких колебаний определяется, как предполагается, двумя параметрами: закономерным – указывающим их положение на оси времени, и случайным – высотой, отражающей степень неблагоприятного воздействия на организм внешней среды и степень периодически возникающего резкого снижения неспецифической резистентности организма [38, 39]. Изучение особенностей колебаний смертности позволяет перейти от воздействия биоритмов (Большие биологические часы) на развитие процессов острого и хронического фенотоза непосредственно к изучению паттернов самих ритмов детерминированной смертности (ритмов фенотоза).

В заключение хочется сказать, что невозможно не присоединиться к высказанному Ф.Ф. Севериным [1] пожеланию о сохранении проводившихся под эгидой акад. В.П. Скулачева геронтологических исследований и возобновлению геронтологических семинаров по четвергам. Они привлекали не только сотрудников НИИ ФХБ и биофака МГУ, но и многих ученых из других институтов, что лишним раз подтверждает актуальность затрагиваемых там тем.

Вклад авторов. Г.А. Шиловский – концепция работы и написание текста статьи.

Благодарности. Автор благодарит А.В. Селиверстова за ценные советы в процессе написания статьи.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sokolov, S. S., and Severin, F. F. (2023) Two types of survival curves in different lines of progeric mice, *Biochemistry (Moscow)*, **89**, 371-376, <https://doi.org/10.1134/S0006297924020159>.
2. Kowald, A. (2002) Lifespan does not measure ageing, *Biogerontology*, **3**, 187-190, <https://doi.org/10.1023/a:1015659527013>.
3. Гаврилов Л. А., Гаврилова Н. С., Ягужинский Л. С. (1978) Основные закономерности старения и гибели животных с точки зрения теории надежности, *Ж. общей биологии*, **39**, 734-742.

4. Gavrilov, L. A., and Gavrilova, N. S. (1991) *The Biology of Life Span: a Quantitative Approach*, Harwood Academic Publisher, New York.
5. Khaliavkin, A. V. (2001) Influence of environment on the mortality pattern of potentially non-senescent organisms. General approach and comparison with real populations, *Adv. Gerontol.*, **7**, 46-49.
6. Tarkhov, A. E., Menshikov, L. I., and Fedichev, P. O. (2017) Strehler-Mildvan correlation is a degenerate manifold of Gompertz fit, *J. Theor. Biol.*, **416**, 180-189, doi: 10.1016/j.jtbi.2017.01.017.
7. Shilovsky, G. A., Putyatina, T. S., Markov, A. V., and Skulachev, V. P. (2015) Contribution of quantitative methods of estimating mortality dynamics to explaining mechanisms of aging, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 1547-1559, <https://doi.org/10.1134/S0006297915120020>.
8. Shilovsky, G. A., Putyatina, T. S., Lysenkov, S. N., Ashapkin, V. V., Luchkina, O. S., Markov, A. V., and Skulachev, V. P. (2016) Is it possible to prove the existence of an aging program by quantitative analysis of mortality dynamics? *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 1461-1476, <https://doi.org/10.1134/S0006297916120075>.
9. Shilovsky, G. A., Putyatina, T. S., Ashapkin, V. V., Luchkina, O. S., and Markov, A. V. (2017) Coefficient of variation of lifespan across the tree of life: Is it a signature of programmed aging? *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 1480-1492, <https://doi.org/10.1134/S0006297917120070>.
10. 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**, 5566-5584, doi: 10.18632/aging.102981.
11. Goldman, R. D., Shumaker, D. K., Erdos, M. R., Eriksson, M., Goldman, A. E., Gordon, L. B., et al. (2004) Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 8963-8968, <https://doi.org/10.1073/pnas.0402943101>.
12. Prasher, J. M., Lalai, A. S., Heijmans-Antonissen, C., Ploemacher, R. E., Hoeijmakers, J. H. J., Touw, I. P., et al. (2005) Reduced hematopoietic reserves in DNA interstrand crosslink repair-deficient *Ercc1^{-/-}* mice, *EMBO J.*, **24**, 861-871, <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600542>.
13. Oh, Y. S., Kim, D. G., Kim, G., Choi, E.-C., Kennedy, B. K., Suh, Y., et al. (2010) Downregulation of lamin A by tumor suppressor AIMP3/p18 leads to a progeroid phenotype in mice, *Aging Cell*, **9**, 810-822, <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00614.x>.
14. Wijshake, T., Malureanu, L. A., Baker, D. J., Jeganathan, K. B., van de Sluis, B., and van Deursen, J. M. (2012) Reduced life- and healthspan in mice carrying a mono-allelic *BubR1* MVA mutation, *PLoS Genet.*, **8**, e1003138, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003138>.
15. Liao, C.-Y., and Kennedy, B. K. (2014) Mouse models and aging: longevity and progeria, *Curr. Top. Dev. Biol.*, **109**, 249-285, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397920-9.00003-2>.
16. Vermeij, W. P., Dollé, M. E. T., Reiling, E., Jaarsma, D., Payan-Gomez, C., Bombardieri, C. R., Wu, H., Roks, A. J. M., Botter, S. M., van der Eerden, B. C., Youssef, S. A., Kuiper, R. V., Nagarajah, B., van Oostrom, C. T. et al. (2016) Restricted diet delays accelerated ageing and genomic stress in DNA-repair-deficient mice, *Nature*, **537**, 427-431, <https://doi.org/10.1038/nature19329>.
17. Cabral, W. A., Tavarez, U. L., Beeram, I., Yeritsyan, D., Boku, Y. D., Eckhaus, M. A., et al. (2021) Genetic reduction of mTOR extends lifespan in a mouse model of Hutchinson-Gilford progeria syndrome, *Aging Cell*, **20**, e13457, <https://doi.org/10.1111/accel.13457>.
18. Gavrilova, N. S., Gavrilov, L. A., Severin, F. F., and Skulachev, V. P. (2012) Testing predictions of the programmed and stochastic theories of aging: comparison of variation in age at death, menopause, and sexual maturation, *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 754-760, doi: 10.1134/S0006297912070085.
19. Jones, O. R., Scheuerlein, A., Salguero-Gomez, R., Camarda, C. G., Schaible, R., et al. (2014) Diversity of ageing across the tree of life, *Nature*, **505**, 169-173, <https://doi.org/10.1038/nature12789>.
20. Vaupel, J. W., Carey, J. R., Christensen, K., Johnson, T. E., Yashin, A. I., et al. (1998) Biodemographic trajectories of longevity, *Science*, **280**, 855860, doi: 10.1126/science.280.5365.855.
21. Skulachev, V. P., Holtze, S., Vyssokikh, M. Y., Bakeeva, L. E., Skulachev, M. V., Markov, A. V., Hildebrandt, T. B., and Sadovnichii, V. A. (2017) Neoteny, prolongation of youth: from naked mole rats to "naked apes" (humans), *Physiol. Rev.*, **97**, 699-720, <https://doi.org/10.1152/physrev.00040.2015>.
22. Скулачев В. П., Скулачев М. В., Фенюк Б. А. (2017) *Жизнь без старости*. М. МГУ.
23. Cox, D. R. (1972) Regression models and lifetables, *J. Roy. Statist. Soc. Ser.*, **34**, 187-202.
24. Collett, D. (2003) *Modelling Survival Data in Medical Research*, Vol. 2. CRC Press, Boca Raton.
25. Swindell, W. R. (2009) Accelerated failure time models provide a useful statistical framework for aging research, *Exp. Gerontol.*, **44**, 190-200, <https://doi.org/10.1016/j.exger.2008.10.005>.
26. Stroustrup, N., Anthony, W. E., Nash, Z. M., Gowda, V., Gomez, A., López-Moyado, I. F., Apfeld, J., and Fontana, W. (2016) The temporal scaling of *Caenorhabditis elegans* ageing, *Nature*, **530**, 103-107, <https://doi.org/10.1038/nature16550>.

27. Markov, A. V., Naimark, E. B., and Yakovleva, E. U. (2016) Temporal scaling of age-dependent mortality: dynamics of aging in *Caenorhabditis elegans* is easy to speed up or slow down, but its overall trajectory is stable, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 906-911, <https://doi.org/10.1134/S0006297916080125>.
28. Asgharian, H., Chang, P. L., Lysenkov, S., Scobeyeva, V. A., Reisen, W. K., and Nuzhdin, S. V. (2015) Evolutionary genomics of *Culex pipiens*: global and local adaptations associated with climate, lifehistory traits and anthropogenic factors, *Proc. Biol. Sci.*, **282**, 20150728, <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.0728>.
29. Choudhury, A. R., Ju, Z., Djojotubroto, M. W., Schienke, A., Lechel, A., et al. (2007) *Cdkn1a* deletion improves stem cell function and lifespan of mice with dysfunctional telomeres without accelerating cancer formation, *Nat. Genet.*, **39**, 99-105, <https://doi.org/10.1038/ng1937>.
30. Khokhlov, A. N., and Morgunova, G. V. (2017) Testing of geroprotectors in experiments on cell cultures: pros and cons, in *Anti-Aging Drugs: From Basic Research to Clinical Practice* (Vaiserman A. M., ed), Royal Society of Chemistry, <https://doi.org/10.1039/9781782626602-00051>.
31. Khokhlov, A. N. (2010) From Carrel to Hayflick and back or what we got from the 100 years of cytogerontological studies, *Radiats. Biol. Radioecol.*, **50**, 304-311, <https://doi.org/10.1134/S0006350910050313>.
32. Khokhlov, A. N. (2013) Impairment of regeneration in aging: appropriateness or stochasticity? *Biogerontology*, **14**, 703-708, <https://doi.org/10.1007/s10522-013-9468-x>.
33. Shilovsky, G. A., Putyatina, T. S., Morgunova, G. V., Seliverstov, A. V., Ashapkin, V. V., Sorokina, E. V., Markov, A. V., and Skulachev, V. P. (2021) A crosstalk between the biorhythms and gatekeepers of longevity: dual role of glycogen synthase kinase-3, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 433-448, <https://doi.org/10.1134/S0006297921040052>.
34. Shilovsky, G. A., Shram, S. I., Morgunova, G. V., and Khokhlov, A. N. (2017) Protein poly(ADP-ribosylation) system: Changes in development and aging as well as due to restriction of cell proliferation, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 1391-1401, <https://doi.org/10.1134/S0006297917110177>.
35. Omotoso, O., Gladyshev, V. N., and Zhou, X. (2021) Lifespan extension in long-lived vertebrates rooted in ecological adaptation, *Front. Cell. Dev. Biol.*, **9**, 704966, <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.704966>.
36. Buescu, J., Oliveira, H. M., and Sousa, M. (2023) Growth rate, evolutionary entropy and ageing across the tree of life, *J. Biol. Dyn.*, **17**, 2256766, <https://doi.org/10.1080/17513758.2023.2256766>.
37. Ebmeier, S., Thayabaran, D., Braithwaite, I., Bunamara, C., Weatherall, M., et al. (2017) Trends in international asthma mortality: analysis of data from the WHO Mortality Database from 46 countries (1993-2012), *Lancet*, **390**, 935945, doi: 10.1016/S01406736(17)314484.
38. Gavrilov, L. A., and Gavrilova, N. S. (2020) What can we learn about aging and COVID-19 by studying mortality? *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 1499-1504, <https://doi.org/10.1134/S0006297920120032>.
39. Shilovsky, G. A. (2022) Variability of mortality: Additional information on mortality and morbidity curves under normal and pathological conditions, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 294-299, <https://doi.org/10.1134/S0006297922030087>.

CALCULATION OF AGING: ANALYSIS OF SURVIVAL CURVES IN NORMAL AND IN PATHOLOGY, FLUCTUATIONS IN MORTALITY DYNAMICS, CHARACTERISTICS OF LIFE SPAN DISTRIBUTION AND INDICATORS OF ITS VARIATION

G. A. Shilovsky^{1,2,3}

¹ *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia; e-mail: gregory_sh@list.ru, grgerontol@gmail.com*

² *Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia*

³ *Institute for Information Transmission Problems, Russian Academy of Sciences, 127051 Moscow, Russia*

The article describes the history of studies of survival data carried out at the Research Institute of Physico-Chemical Biology under the leadership of Academician V. P. Skulachev from 1970s until present, with special emphasis on the last decade. The use of accelerated failure time (AFT) model and analysis of coefficient of variation of lifespan ($CV_{L,S}$) in addition to the Gompertz methods of analysis, allows to assess survival curves for the presence of temporal scaling (i.e., manifestation of accelerated aging), without changing the shape of survival curve with the same coefficient of variation. A modification of the AFT model that uses temporal scaling as the null hypothesis made it possible to distinguish between the quantitative and qualitative differences in the dynamics of aging. It was also shown that it is possible

to compare the data on the survival of species characterized by the survival curves of the original shape (i.e., “flat” curves without a pronounced increase in the probability of death with age typical of slowly aging species), when considering the distribution of lifespan as a statistical random variable and comparing parameters of such distribution. Thus, it was demonstrated that the higher impact of mortality caused by external factors (background mortality) in addition to the age-dependent mortality, the higher the disorder of mortality values and the greater its difference from the calculated value characteristic of developed countries (15-20%). For comparison, CV_{Ls} for the Paraguayan Ache Indians is 100% (57% if we exclude prepuberty individuals as suggested by Jones et al.). According to Skulachev, the next step is considering mortality fluctuations as a measure for the disorder of survival data. Visual evaluation of survival curves can already provide important data for subsequent analysis. Thus, Sokolov and Severin [1] found that mutations have different effects on the shape of survival curves. Type I survival curves generally retains their standard convex rectangular shape, while type II curves demonstrate a sharp increase in the mortality which makes them similar to a concave exponential curve with a stably high mortality rate. It is noteworthy that despite these differences, mutations in groups I and II are of a similar nature. They are associated (i) with “DNA metabolism” (DNA repair, transcription, and replication); (ii) protection against oxidative stress, associated with the activity of the transcription factor Nrf2, and (iii) regulation of proliferation, and (or these categories may overlap). However, these different mutations appear to produce the same result at the organismal level, namely, accelerated aging according to the Gompertz’s law. This might be explained by the fact that all these mutations, each in its own unique way, either reduce the lifespan of cells or accelerate their transition to the senescent state, which supports the concept of Skulachev on the existence of multiple pathways of aging (chronic phenoptosis).

Keywords: mortality curves, aging, lifespan inequality, phenoptosis, acute phenoptosis, biorhythms, chronobiology