

УДК 577.71: 576.385:575.113: 612.67: 575.1

## ВОЗМОЖНО ЛИ ДОКАЗАТЬ НАЛИЧИЕ ПРОГРАММЫ СТАРЕНИЯ С ПОМОЩЬЮ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ МЕТОДОВ ОЦЕНКИ ДИНАМИКИ СМЕРТНОСТИ?

### Обзор

© 2016 Г.А. Шиловский<sup>1,2\*</sup>, Т.С. Путятин<sup>2</sup>, С.Н. Лысенков<sup>2,3</sup>,  
В.В. Ашапкин<sup>1</sup>, О.С. Лучкина<sup>4</sup>, А.В. Марков<sup>2</sup>, В.П. Скулачев<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,  
119991 Москва, Россия

<sup>2</sup> Биологический факультет, Московский государственный  
университет им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия;  
электронная почта: gregory\_sh@list.ru, grgerontol@gmail.com

<sup>3</sup> Российский геронтологический научно-клинический центр,  
129226 Москва, Россия

<sup>4</sup> Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова,  
Лаборатория экологии и функциональной морфологии  
высших позвоночных, 119071 Москва, Россия

Поступила в редакцию 16.09.16

Накопление различных повреждений приводит с возрастом к повышению уязвимости организма и вероятности смерти у большинства многоклеточных. В 2016 г. для нематоды *Caenorhabditis elegans* было показано, что разнообразные факторы, продляющие или сокращающие жизнь (окислительный стресс, изменение температуры или пищевого рациона, определенные мутации), не изменяют форму кривой выживания, а лишь растягивают или сжимают ее вдоль временной оси. Это, по мнению авторов, говорит о существовании программы старения (*Nature*, **530**, 103–107) [1]. Предложенная Струострупом и соавт. модификация модели ускоренного времени отказа (AFT, *accelerated failure time*) фактически предполагает использовать в качестве нулевой гипотезы «временное масштабирование», позволяя отделять количественные отличия в динамике старения от качественных. Возможность отслеживать момент переключения пути, «управляющего» смертностью, на какой-либо другой может быть полезна при тестировании различных геропротекторных препаратов. Данная работа посвящена этим и другим аспектам временного масштабирования.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** продолжительность жизни, старение, кривые выживания, временное масштабирование, феноптоз.

Старение организма выражается в появлении возрастных болезней, дряхлости, изнашивании организма, увеличивающих вероятность смерти с возрастом. Последнее на практике проявляется как увеличение числа умерших за определенный промежуток времени. Попытки гармоничного объединения этих двух типов явлений в единую теорию старения пока не удаются, по-видимому, из-за недостаточной изучен-

ности биологического старения. Остается до конца неясным, как именно возрастные болезни в конце концов приводят организм к смерти.

Причиной развития возрастных заболеваний и появления фенотипических признаков старения может являться, например, накопление с возрастом различных нерепарированных повреждений генома вследствие увеличения продукции активных форм кислорода и снижения эффективности систем антиоксидантной защиты и репарации. Это должно приводить к повышению уязвимости и уровня смертности многоклеточных организмов с возрастом, вне зависимости от положения вида на эволюционном древе.

Длительность жизни варьирует от особи к особи. Даже генетически сходные или идентичные особи могут иметь принципиально различ-

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; FI – индекс уязвимости (frailty index); KB – коэффициент вариации; ПЖ – продолжительность жизни; AFT – модель ускоренного времени отказа (accelerated failure time); АМРК – AMP-activated protein kinase; HIF-1 – hypoxia-inducible factor 1; PH – модель пропорциональных рисков Кокса (Cox proportional hazards model); SOD – супероксиддисмутаза; tBuOОН – гидроперексид *трет*-бутила.

\* Адресат для корреспонденции.

ные кривые выживания (например, рабочие особи и матки общественных насекомых). Вопреки имеющемуся мнению, что эволюция должна неизбежно вести к увеличению смертности и снижению рождаемости с возрастом после наступления зрелости, были обнаружены большие различия в динамике смертности у разных видов (возрастающие, постоянные, снижающиеся, выпуклые и вогнутые траектории смертности, как у долго-, так и у короткоживущих видов) [2]. Тем не менее существующие теоретические подходы еще не объясняют, почему старение развилось у одних видов и не развилось у других [3].

На это противоречие указал один из авторов настоящей статьи В.П. Скулачев, предложив концепцию запрограммированной гибели (острого и хронического фенотоза) [4]. Согласно этой концепции, существует запрограммированная смерть организма или гибель, вызываемая включением генетической программы самоликвидации особи. Это позволяет объединить вейсмановскую гипотезу старения как адаптивного механизма программируемой смерти с альтернативной точкой зрения о том, что старение – это результат накопления повреждений и ошибок [4, 5] (см. раздел «Эволюция»).

В предлагаемой работе проанализированы данные по эффектам различных генетических манипуляций, увеличивающих ПЖ у мух, червей и мышей, с помощью различных моделей с целью выбора теории, наиболее точно согласующейся с этими экспериментальными данными.

## ЭВОЛЮЦИЯ

В настоящее время нет сомнения, что старение подвержено эволюции, хотя все механизмы до сих пор не раскрыты [6–8]. Основным возражением против концепции старения как результата адаптивной эволюции являлось то, что после пика репродукции сила естественного отбора стремится к нулю, и далее имеет место лишь стохастическое снижение функциональности [6, 9–11]. Если вредные мутации, проявляющиеся в молодом возрасте, встречают жесткое сопротивление отбора из-за отрицательного вклада в приспособленность (производство потомства), то аналогичные мутации, проявляющиеся поздно, относительно нейтральны, поскольку их носители уже не участвуют в размножении.

На самом деле у многих животных некоторые признаки (навыки), полезные для популяции и приобретенные в пострепродуктивном периоде, передаются способным к размножению особям в ходе обучения, повышая их приспособленность и в целом увеличивая устойчи-

вость популяции к воздействию внешней среды. А ведь естественный отбор – это не что иное, как преимущественное размножение наиболее приспособленных особей [12]. У социальных животных старшее поколение обучает, в первую очередь, своих потомков. Чем дольше оно живет, тем большему обучит тех особей, у которых ген долголетия также может присутствовать (своих потомков!). Например, у муравьев только 3–4 особи из миллиона (которые и гнездо-то покидают один раз в жизни) могут обладать способностью к размножению, что не мешает муравьям эволюционировать, адаптируясь все к новым и новым условиям, например, к антропогенному воздействию [13]. Этот механизм работает у способных к обучению животных с пересекающимися молодыми и старыми поколениями [14], к которым относятся не только млекопитающие, но также многие общественные насекомые, птицы и некоторые другие организмы.

Естественный отбор, несомненно, сугубо индивидуален. Однако признаки в организме скореллированы, а гены плеiotропны [12]. Таким образом, гены долголетия могут быть скореллированы с каким-либо адаптивным признаком и, благодаря этому, закрепляться в популяции. Поэтому мы согласны с авторами, утверждающими, что старение может быть результатом положительной селекции [15].

На основе плеiotропии строил свою теорию старения Вильямс, постулируя наличие генов, усиливающих репродуктивный успех в молодом возрасте, несмотря на их отсроченные негативные эффекты в старости («антагонистическая плеiotропия») [16]. Мутации этих генов приводят к увеличению ПЖ за счет снижения фертильности [17]. Эта гипотеза подтверждается феноменом старения делящихся клеток (необратимое прекращение делений при повреждениях), что стимулирует в раннем возрасте жизненность путем уменьшения вероятности рака и, в то же время, ограничивает ПЖ вследствие накопления сенесцентных клеток [18]. В сходной с теорией антагонистической плеiotропии теории «одноразовой сомы» говорится о существовании генов, контролирующих перераспределение энергетических ресурсов организма от сомы к репродукции (т.е. о конкуренции этих процессов) [8]. Например, для мелких нехищных животных, ввиду неблагоприятных условий среды обитания, наиболее эффективным решением обычно являются большие энергозатраты на быстрое размножение, а не на поддержание сомы. Изменение такого распределения ресурсов будет возможно лишь при уменьшении давления среды. Известен пример, когда в популяции опоссумов, случайно заселивших отдельный островок, по срав-

нению с «материковыми», увеличилась средняя ПЖ и замедлилось физиологическое старение (определяемое по структуре коллагена сухожилий хвоста) [19].

Если эволюция старения возможна, может возникнуть и специальная программа старения. Поскольку ПЖ является такой же устойчивой видовой характеристикой, как размеры тела или плодовитость, длительность жизни (т.е. момент наступления гибели), а также ее механизмы, должны быть хотя бы частично запрограммированы в геноме [20, 21].

Вейсман первым предположил, что, поскольку нестареющие организмы вредны для популяции, так как занимают место молодых, эволюция должна приводить к появлению программы старения [22]. Биологическим механизмом такой программы он считал ограничение числа делений соматических клеток (в отличие от неограниченно пролиферирующих половых клеток), а межвидовые различия ПЖ у животных, соответственно, объяснял разным числом клеточных генераций.

Была предложена также теория «программы долголетия» на основе генов, поддерживающих выживание организма путем репарации соматических клеток [17]. Она подтверждается обнаружением десятков мутаций, увеличивающих ПЖ и влияющих на стрессоустойчивость организма [23, 24]. Значительную роль в этом играют также эпигенетические системы клетки. Большое количество экспериментальных данных свидетельствует о том, что старение сопровождается определенными эпигенетическими изменениями и, вероятно, в значительной степени определяется ими [25, 26]. В отличие от вариантов постоянного давления неблагоприятных условий среды (хищников, болезней), рассматриваемых теориями накопления мутаций и отработанной сомы, программа долголетия могла возникнуть в эволюции для приспособления к кратковременным экстремальным внешним воздействиям (колебания температуры/влажности, количества пищевых ресурсов) [17, 23].

Эффективность искусственного отбора на увеличение ПЖ [27] также говорит о том, что величина ПЖ хотя бы частично записана в геноме. При этом показанная Кеньон и соавт. [28] возможность почти двукратного увеличения ПЖ червей при выходе из строя некоторых генов, говорит в пользу существования медленной программы, ведущей к гибели организма (хронического фенотоза) [4].

Нужно отметить, что эта программа может действовать наряду с известными механизмами старения, которые даже могут быть ее частью. Таким образом, вейсмановская гипотеза старения как адаптивного механизма программируемой

смерти может быть объединена с альтернативной точкой зрения о том, что старение — это результат накопления повреждений и ошибок [5]. Кроме того, методами компьютерного моделирования показано, что в определенных условиях у мало-подвижных, прикрепленных форм (существующих не только у растений, но и у некоторых животных) вместо хронического фенотоза может развиваться острый фенотоз, причем доказана эволюционная выгода от такой замены [29].

Накопление повреждений могло бы отслеживаться специальными системами, посылающими смертоносный сигнал для активации программы фенотоза, когда уровень повреждений достигает некой критической точки. В роли такой системы может выступать, например, эпигеном, который можно рассматривать как общий сенсор клеточной дисфункции, отвечающий на любые изменения в состоянии генома и внутренней среды, в том числе связанные с процессом старения [26]. С другой стороны, эпигеном выполняет активную роль, регулируя экспрессию генов. Показано, что старение сопровождается прогрессивно нарастающими межклеточными вариациями в уровнях экспрессии генов и соответствующих им физиологических процессов [30]. Можно предположить, что это приводит к постепенному нарушению функции соответствующих тканей, пока, в конце концов, не достигается критического уровня, приводящего к отказу и запуску программы фенотоза. В частности, описанные процессы характерны для генов, кодирующих митохондриальные белки, участвующие в синтезе АТФ. Примером патологии, имеющей признаки фенотоза, является септический шок. Многие его черты указывают на то, что быстрый смертельный исход специально организован самим организмом, подвергшимся массивному вторжению бактерий. Он предотвращает развитие эпидемии. Сепсис сопровождается массовым выбросом макрофагами цитокинов, индуцирующих апоптоз [4].

Биологическое старение следует отличать от чисто химического, не запрограммированного в геноме старения. Примером химического старения может быть L→D-изомеризация аминокислот в белках-кристаллинах хрусталика глаза кита. Этот спонтанный, самопроизвольный процесс ведет к тому, что, например, у 200-летнего кита ~40% L-аспартата в кристаллине превращается в D-изомер, что должно негативно сказаться на свойствах этого белка, который, однажды образовавшись в хрусталике, сохраняется там всю жизнь. Другими примерами незапрограммированного, химического старения могут быть процессы карбонилирования и дезамидирования белков [4].

Изучение биологического старения осложняется тем, что в природе многие животные умирают от случайных причин, не доживая до срока, определяемого основным механизмом старения; строго его можно исследовать только в лаборатории, хотя и в природе старение действует как фактор, увеличивающий вероятность смерти [6].

До последнего времени математические модели преимущественно строились на основании старения по Гомперцу, т.е. анализа динамики смертности в когортах организмов [2, 31, 32]. Например, Джонс с соавт. провели сравнительный анализ кривых выживаемости, смертности и фертильности широкого спектра систематических групп (23 позвоночных, 10 беспозвоночных, 12 сосудистых растений и одна водоросль) [2]. Выборка была достаточно представительна, но выводы неочевидны, поэтому мы сочли необходимым обсудить их в своей статье [33]. Мы рассортировали опубликованные Институтом демографических исследований [2] кривые выживаемости, смертности и фертильности на четыре большие группы по отношению смертности в терминальном возрасте к средней, где группа I включает виды с наименьшим изменением смертности с возрастом, а IV – с наибольшим.

В приводимых Джонсом данных, на наш взгляд, не удастся выявить явных признаков старения по Гомперцу у растений и водорослей. Неоднократно высказывалось мнение, что с возрастом у растений, в отличие от животных, постаревшие клетки не накапливаются, а отмирают, причем не случайным, а запрограммированным образом. Кроме того, погибшие клетки не выбрасываются, но входят в состав структур, выполняющих опорную и проводящую функции. Таким образом, можно предположить, что растения научились бороться со старением с помощью запрограммированной клеточной гибели.

Старению по Гомперцу в наибольшей степени подвержены, кроме млекопитающих, виды с большим количеством постмитотических клеток, например, насекомые. Большой разброс по проявлению старения по Гомперцу наблюдается у птиц, от балийского скворца до большой синицы. Крупные птицы, вопреки выводам Джонса, все же стареют, но биологическое старение их может начать проявляться в довольно позднем возрасте, до которого в естественных условиях, возможно, доживает менее 5% особей. Старение же мелких птиц, имеющих много врагов и высокую экзогенную смертность, как и предсказывал Медавар, в природе выявить практически невозможно [10].

Земноводные и пресмыкающиеся находятся в группе I с плоскими кривыми смертности. Рептилии живут и сохраняют способность к

размножению чрезвычайно долго, однако число долгожителей среди них, по-видимому, также не превышает 5%. Поэтому динамика их старения с трудом поддается анализу методом Джонса и соавт., рассматривавших динамику показателей только до возраста, до которого доживает 5% особей, и называвших такой возраст «терминальным».

Для долгоживущих видов с менее выраженным увеличением смертности с возрастом, а также животных, которые достигают терминального возраста раньше, чем успевают постареть, метод Джонса способен охарактеризовать лишь малую часть жизненного цикла, не позволяя судить о том, как проявляется старение на его поздних стадиях.

## РАЗРАБОТКА НОВЫХ МОДЕЛЕЙ

Хотя скорость старения сильно варьирует у разных видов, проявления старения удивительно последовательны. С одной стороны, родственные виды, такие как мыши и голые землекопы, отличаются по ПЖ более чем в десять раз. С другой стороны, такие далеко отстоящие друг от друга на эволюционном древе виды, как дрожжи и человек, характеризуются сходными молекулярными изменениями в ходе старения [34]. Случайные факторы приводят к большому разбросу индивидуальной ПЖ даже в однородных популяциях [35, 36]. Изучение этого стохастического поведения может помочь связать процесс старения с определенными молекулярными механизмами, которые определяют ПЖ.

Полупараметрическая модель пропорциональных рисков Кокса (РН, *Cox proportional hazards model*) [37] широко применяется в медицине и эпидемиологии, но мало – в исследованиях ПЖ и старения. Она описывает оценку зависящих от возраста уровней смертности в разных условиях, т.е. соотношение рисков, что удобно в медицинских исследованиях (например, риски смертности в различные моменты после операции), но не является интуитивно удобным для анализа старения, где предпочитают представление результатов в виде кривых выживаемости [37]. В модели РН вычисляется функция  $h_i(t)$  – риск смерти  $i$ -го индивида в момент  $t$ , как произведение базовой функции риска  $h_0(t)$  и функции, зависящей от коэффициентов  $\beta_1, \dots, \beta_p$  и переменных  $x_1, \dots, x_p$  для  $i$ -го индивида.

$$h_i(t) = \exp(\beta_1 x_{1i} + \beta_2 x_{2i} + \dots + \beta_p x_{pi}) h_0(t).$$

В отсутствие дополнительных переменных в модель включают только одну переменную  $x_1$

для отличия контрольной (0) и экспериментальной (1) групп. В таком случае соотношение функций риска  $h_i(t)/h_0(t)$  (HR, *hazard ratio*) вычисляется как  $HR = \exp(\beta_1)$ . Модель РН предполагает, что соотношение функций риска одинаково на всех этапах жизненного цикла, т.е. не зависит от  $t$ . Для диагностических графиков вычисляют логарифмы функции риска против логарифма времени (*log-cumulative hazard plot*) [38]. На этих графиках непропорциональные риски проявляются как пересекающиеся (не параллельные) кривые.

*Модель ускоренного времени отказа (АФТ)* 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:  $S_1(\lambda t) = S_0(t)$ . 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.

Таким образом, параметр  $\lambda$  является безразмерным коэффициентом, определяющим величину эффекта, который одинаков для любой квантили. Он может быть разложен на компоненты, отвечающие отдельным факторам, рассматриваемым как дискретные состояния (контроль—опыт, высокая температура—низкая температура, разные генотипы и т.д.):  $\lambda = \exp(\beta_1 x_1 \cdot \dots \cdot \beta_p x_p)$ , где  $x_i$  — переменная, кодирующая то или иное дискретное состояние фактора, а  $\beta_i$  — эффект этого фактора на ПЖ [1, 39]. Эффект отдельных факторов может быть оценен на основе этой модели с помощью регрессионного анализа по результатам серии экспериментов [39]. В отсутствие ковариаций, единственная переменная  $x_1$  определяется как 0 для контрольной группы и 1 — для экспериментальной, а  $\beta_1$  определяет коэффициент замедления старения  $\lambda$  по формуле:  $\lambda = \exp(\beta_1)$ . Дополнительными переменными могут быть пол, дата рождения, характеристики родителей и т.п.

Одно из основных предположений, лежащих в основе модели АФТ, это мультипликативность эффектов воздействий на ПЖ. Например, если одно воздействие увеличивает ожидаемую ПЖ в 1,2 раза ( $\lambda = 1,2$ ), а второе — в 1,5 раза ( $\lambda = 1,5$ ), то вместе эти два воздействия увеличат ее в 1,8 раза ( $1,2 \times 1,5$ ). Модель АФТ может применяться не только для ПЖ, но и для времени наступле-

ния иных онтогенетических событий — полового созревания, менопаузы и т.д.

Основным преимуществом этой модели, помимо интуитивно комфортной формы представления результатов, является возможность статистического анализа и определения доверительного интервала для  $\lambda$ . С другой стороны, она базируется на неочевидном допущении, что экспериментальное воздействие оказывает одинаковый по силе эффект на особей разного возраста. Кроме того, она требует указания параметрического распределения, которому подчиняется форма кривой выживания [39]. Чаще всего наилучшие результаты получаются, когда для кривой выживания используется распределение Вейбулла, но в целом выбор между наилучшим и вторым по качеству распределением (обычно Гомперца) не сильно влияет на конечные результаты [39, 40].

В работе Суинделла «сырые» данные по эффектам различных генетических манипуляций, увеличивающих ПЖ у мышей, анализировали с помощью обеих моделей с целью выбора более точно согласующейся с этими экспериментальными данными [39]. При использовании модели АФТ наибольшим эффектом 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*<sup>+/-</sup>, *Irs2*<sup>+/-</sup> у самцов ( $1,20 < \lambda < 1,40$ ). Остальные генетические манипуляции действовали сходно и довольно слабо ( $1,03 < \lambda < 1,20$ ). В случае *Irs2*<sup>+/-</sup> эффект у самцов был сильнее, чем у самок, а в случае *Clk1*<sup>+/-</sup> он был разным у двух разных линий мышей. В целом, модель АФТ хорошо описывала экспериментальные данные.

При использовании модели РН соотношения рисков заметно варьировали между экспериментами и мало коррелировали с оценками коэффициентов замедления старения в модели АФТ. В некоторых случаях значения соотношения рисков получались абсурдно большими.

Очевидно модель АФТ в большинстве случаев наиболее адекватно описывает эффекты генетических манипуляций на ПЖ. Как уже упоминалось, она часто трактуется в рамках понятия «биологические часы», которые могут быть замедлены (увеличение ПЖ) или ускорены (сокращение ПЖ). В отличие от модели РН, она в большинстве случаев не требует включения дополнительных зависимых от возраста переменных для согласованности с экспериментальными данными. В целом, модель АФТ дает более устойчивые по отношению к случайным вариациям результаты, чем модель РН. Во всех исследованных случаях предсказанные моделью АФТ коэффициенты замедления старения укла-

дываются в узкий интервал ( $1,03 < \lambda < 1,48$ ) и довольно точны, даже когда они зависят от возраста (что формально противоречит модели). Результаты модели РН, наоборот, варьируют в очень широких пределах ( $1,22 < HR < 515$ ) и подчас противоречат здравому смыслу. Основным недостатком модели АФТ представляется ее предположение об одинаковой форме кривых выживаемости в сравниваемых группах — она очевидно не применима для сравнения произвольных видов и популяций, многие из которых различаются как раз формой кривой выживаемости [33]. Более того, изучение эффектов различных генетических манипуляций показывает, что во многих случаях они явно зависят от возраста, поэтому кривые выживания в контрольной и экспериментальной группах различаются по форме. Например, при частичной инактивации рецептора инсулин-подобного фактора роста 1 в мозге мышей (*bIGFIRKO<sup>+/-</sup>*) наблюдается явное увеличение выживания на ранних этапах жизненного цикла, но не изменяется выживание на поздних этапах и максимальная ПЖ [41].

Как бы то ни было, при анализе каждого конкретного эксперимента полезно использовать обе модели и выбирать наиболее адекватную. Предположение об одинаковых эффектах одной и той же манипуляции в разных возрастах оправдывается при анализе большинства мутаций, увеличивающих ПЖ. Тем не менее его справедливость нужно проверять в каждом конкретном исследовании.

**Общая характеристика старения *Caenorhabditis elegans*.** Выявление и измерение возрастных изменений, или маркеров старения, является одним из основных элементов исследования процесса старения, так как его понимание и построение гипотез о причинах старения требуют описания конкретных старческих изменений.

Нематода *C. elegans* часто используется для изучения старения, так как имеет ПЖ около двух недель при нормальных условиях и легко культивируется в лаборатории.

Старение характеризуется прогрессирующими дегенеративными изменениями во многих тканях. Наиболее очевидной характеристикой старения является увеличение с возрастом вероятности смерти индивидуума. Старение *C. elegans* неразрывно связано с ее способностью двигаться. Несмотря на непродолжительную жизнь, у нематоды наблюдаются явно выраженные признаки возрастной дегенерации, в том числе саркопения и потеря способности к размножению после 10-дневного возраста. Подразделение стареющих нематод *C. elegans* на возрастные группы производится по их способности дви-

гаться и глоточному всасыванию, которое сильно страдает из-за возрастной саркопии. Аналогичное снижение физиологических процессов имеет место и у мутантов *daf-2*, *age-1*, *daf-16*, *eat-2* и *clk-1*, несмотря на изменение ПЖ [35, 42].

Для выяснения взаимоотношения между дегенеративными изменениями у *C. elegans* разработаны методы количественной оценки возрастных изменений и проанализированы корреляции между этими изменениями в лонгитудинальном исследовании [42]. Возрастное снижение глоточного всасывания и движений тела отрицательно коррелируют с ПЖ. Снижение этих параметров приводят к снижению вероятности выживания [35, 42]. Были разработаны классификация и разделение *C. elegans* на три группы, основанные на разнице в двигательной активности, хорошо коррелирующей с ПЖ: ритмично движущихся (тип I), нерегулярно двигающихся (тип II), и неподвижных, но отвечающих на прикосновение червей (тип III). Эти группы различались по чувствительности к красителю нильскому синему: черви I типа были полностью устойчивы к нему, черви II типа — жизнеспособными в 0,1%-ном растворе нильского синего в течение 2 ч, но 20–30% особей гибли в 1%-ном растворе, все черви III типа гибли в 1%-ном растворе нильского синего [43]. Дамбруа и соавт. разработали метод для выявления физиологически старых особей в синхронизированной популяции дрозофилы, основанный на возрастном увеличении кишечной проницаемости, вызывающем рост вероятности смерти. Этот физиологический маркер старения присутствует у *C. elegans*, двух видов дрозофил, а также рыбы семейства карповых *Danio rerio*. Данные Дамбруа и соавт. позволяют предположить, что дисфункция кишечного барьера может быть важным событием в процессе старения в широком диапазоне видов, в том числе, возможно, и у человека [44].

## ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАНИПУЛЯЦИИ И ПЖ

Число известных генетических манипуляций, увеличивающих ПЖ, достаточно велико [39, 44–46], во многом благодаря исследованиям беспозвоночных модельных организмов [46]. Лишь немногие из них были рассмотрены в контексте старения млекопитающих. Показано, что гены, модулирующие старение, структурно и функционально консервативны в течение более миллиарда лет эволюции, т.е. генетический компонент детерминации ПЖ в значительной степени законсервирован [46].

В модельных системах *C. elegans* и *Saccharomyces cerevisiae* геномный скрининг показал, что ПЖ увеличивается путем манипулирования активностью 0,1–3% генов [45]. Смит и соавт. выполнили первый количественный анализ степени консервативности генов долголетия между двумя весьма далекими видами эукариот, дрожжами *S. cerevisiae* и нематодой *C. elegans* [46]. Они показали, что в 15% случаев делеции генов, ортологичных генам, замедляющим старение нематоды, вызывают увеличение ПЖ также и у дрожжей. При этом лишь 3,4% от случайных делеций приводят к увеличению ПЖ.

Первым сигнальным путем у *C. elegans*, для которого была доказана важная роль в регуляции ПЖ, оказался путь с участием инсулина/инсулин-подобного фактора роста 1 (IIS, *insulin/insulin-like growth factor-1 signaling*) [67]. Позже было обнаружено множество генов, функционально связанных с регуляцией старе-

ния и, возможно, опосредующих эффекты внешних факторов на скорость старения и ПЖ (табл. 1).

Мутации, уменьшающие активность DAF-2 – рецептора insulin/IGF-1, увеличивают ПЖ *C. elegans* более чем в два раза [28]. AGE-1 является нижележащей мишенью IIS, гомологом PI3K. Мутации гена *age-1*, изменяющие его активность, также увеличивают ПЖ [68]. Эффекты мутаций IIS абсолютно зависимы от DAF-16, гомолога транскрипционных факторов FoxO [69]. Белки DAF-2, AGE-1 и DAF-16 являются ключевыми компонентами сигнального пути IIS. Умеренное ингибирование IIS увеличивает ПЖ и устойчивость к стрессам у разных видов. Низкая активность IIS приводит к транслокации DAF-16 в ядро, где он модулирует активность генов, участвующих в ответах на стресс-факторы (белки теплового шока, супероксиддисмутаза (SOD), каталаза), метаболизме и ау-

Таблица 1. Генетические и химические манипуляции, изменяющие ПЖ у *C. elegans*

Делеция гена или химическое воздействие	Увеличение ПЖ, %	Литература	λ, по [1]
<i>age-1</i>	<b>210</b>	[47]	<b>1,647</b>
<i>lrs-2</i>	200 при 20°; 30 при 25°	[48]	
Рост в аксенной среде	200	[49, 50]	
<i>age-1</i>	<b>128</b>	[42]	<b>1,647</b>
<i>age-1</i>	<b>100</b>	[28]	<b>1,647</b>
<i>daf-2</i>	<b>111</b>	[51]	<b>1,414</b>
<i>daf-2</i>	<b>100</b>	[28]	<b>1,414</b>
<i>eat-2</i>	<b>100</b>	[52]	<b>1,463</b>
Пониженная концентрация бактерий	100	[53]	
SOD и каталаза	100	[54]	
<i>isp-1</i>	80	[55]	
<i>daf-2</i>	<b>64,5</b>	[42, 56]	<b>1,414</b>
WT 15°	64,5	[42]	
Удаление отдельных зародышевых клеток Z2, Z3	60	[57]	
Сукцимид и др. противосудорожные средства	50	[58]	
<i>mot-1 (HSP70F)</i>	43	[59]	
<i>clk-1</i>	30	[60]	
<i>clk-1</i>	27	[51]	
<i>eat-2</i>	<b>18</b>	[56]	<b>1,463</b>
Ресвератрол	15	[61, 62]	
<i>clk-1</i>	10	[42]	
Вортманнин и LY294002	10 – wild-type; 12 – <i>age-1</i>	[63]	
<i>daf-16</i>	<b>-16</b>	[42, 56, 64]	<b>0,780</b>
<i>lin-4</i>	-27	[65]	
<i>hsf-1</i>	<b>-40</b>	[66]	<b>0,723</b>

тофагии [48]. В сумме эти эффекты приводят к увеличению ПЖ. Сверхэкспрессия DAF-16 у животных дикого типа незначительно увеличивает ПЖ [70]. Ядерной локализации DAF-16 как таковой также недостаточно для увеличения ПЖ. Канонический мотив связывания DAF-16 присутствует в 5 т.п.н. областях перед 78% генов *C. elegans*, но лишь немногие из них активированы у молодых взрослых животных [71]. Очевидно играют роль и другие факторы, помимо DAF. Увеличение ПЖ при мутациях *daf-7* (кодирует белок семейства TGF- $\beta$ ) также зависимо от DAF-16 [72]. TGF- $\beta$  может быть вышележащим регулятором активности IIS. Система убиквитин-протеасома также регулирует активность DAF. Утрата *rle-1*, кодирующего убиквитин-лигазу E3, увеличивает ПЖ [73], а утрата *math-33*, кодирующего деубиквитилазу, супрессирует увеличение ПЖ у мутантов *daf-2* [74]. Мутации *hsf-1* (гомолог фактора транскрипции теплового шока) [66], *skn-1* (Nrf2, гомолог nuclear respiration factor 2) [75] и *pqm-1* (белок с цинковыми «пальцами» C2H2-типа и лейциновой «застежкой») [76] препятствуют увеличению ПЖ у мутантов *daf-2*. По-видимому, HSF-1, SKN-1 и PQM-1 действуют кооперативно с DAF-16, контролируя перекрывающиеся наборы генов, регулирующих ПЖ. SKN-1 активируется МРК-1, гомологом киназы ERK MAP, и регулирует активность DAF. Для нейтрализации эффектов мутаций *daf-2* и *age-1* на ПЖ достаточно восстановить нормальный уровень экспрессии соответствующих генов в нейронах, тогда как его восстановления в клетках кишечника недостаточно [77].

TOR (*target of rapamycin*) – серин/треониновая киназа, регулирующая клеточный рост, пролиферацию, подвижность и выживание, а также синтез белка, аутофагию и транскрипцию [78]. TOR активируется при условиях достатка питательных веществ и энергии, стимулируя пути роста и блокируя пути экономии ресурсов, таких как реутилизация через аутофагию. Уменьшение активности TOR имитирует ситуацию дефицита питательных веществ и энергии и увеличивает ПЖ у *C. elegans* DAF-16-зависимым механизмом [79]. Эти эффекты опосредованы факторами транскрипции PHA-4/FoxA. PHA-4 регулирует аутофагию. Комбинация двух увеличивающих ПЖ генетических манипуляций – ингибирование *daf-2* и ингибирование *rsk-1* (S6 киназа – еще одна мишень TOR) аддитивно увеличивает ПЖ [80]. Следовательно, пути IIS и TOR вместе регулируют ПЖ. Ингибирование активности TOR при ограничении питания увеличивает ПЖ опосредовано через индукцию PHA-4. В условиях голодания путь TOR увеличивает ПЖ путем ингибирования активности пути IIS.

Возможно, эффекты пути TOR на ПЖ направлены в зависимости от условий.

Сиртуины (NAD-зависимые деацетилазы) непосредственно связаны с окислительным обменом с участием NAD<sup>+</sup>. Sir2 является позитивным регулятором ПЖ у дрожжей и *C. elegans*. Сверхэкспрессия SIR-2.1 у *C. elegans* увеличивает ПЖ DAF-16-зависимым механизмом [81]. SIR-2.1 связывается с DAF-16 при ответах на стресс-факторы и активирует его. Мутации *sir-2.1* супрессируют многие эффекты увеличения ПЖ: очевидно, сиртуины играют позитивную роль в регуляции ПЖ. Тем не менее во многих случаях увеличение ПЖ не зависит от сиртуинов.

АМР-активируемая протеин-киназа (АМРК) – консервативный энергетический сенсор, помогающий клетке адаптироваться к условиям дефицита энергии. Она стимулирует катаболические процессы и блокирует энергозатратные. Нуль-мутации кодирующего ее гена *aak-2* у *C. elegans* уменьшают ПЖ, а его сверхэкспрессия – увеличивает [82].

Ингибирование комплекса H3K4-метилирования (ASH-2, WDR-5, SET-2) и сверхэкспрессия H3K4-деметилазы RBR-2 увеличивают ПЖ у *C. elegans*, причем этот эффект зависит от продукции зрелых яиц и передается по наследству до четырех поколений [83]. Ингибирование H3K27-деметилазы UTX-1 также увеличивает ПЖ [84].

MicroRNA (miRNA) *lin-4* регулирует ПЖ у *C. elegans* [65]. Действие *lin-4* и ее мишени LIN-14 опосредовано IIS. В регуляции ПЖ участвует также ряд других miRNA [36]. miR-228 и miR-71 необходимы для увеличения ПЖ при ограничении питания [85]. Они взаимодействуют с PHA-4/FoxA и SKN-1/Nrf2. PHA-4 регулирует экспрессию miRNAs при ограничении питания.

Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) является главным регулятором ответов на гипоксию. Сверхэкспрессия HIF-1 существенно увеличивает ПЖ [86]. HIF-1 опосредует увеличение ПЖ под действием параквата и ингибирования дыхания. Нейрональный HIF-1 увеличивает ПЖ, регулируя экспрессию флаavin-содержащей монооксигеназы (*fmo-2*) в кишечнике через секрецию серотонина [87].

Хуанг и соавт., изучавшие возрастное снижение физиологических процессов и изменение ПЖ у мутантов *C. elegans daf-2, age-1, daf-16, eat-2* и *clk-1* по сравнению с диким типом, предложили систему из четырех этапов, которая описывает процесс старения и полезна для анализа генетических и экологических воздействий на процесс старения [42].

Аналогично Джонсон и соавт., исследуя кривые выживания *C. elegans* дикого типа (100 000 и

более особей), выявил сегментарные возрастные воздействия на смертность мутаций *age-1*, *clk-1* или *spe-26* [56]. Мутация *age-1* снижала смертность более чем в пять раз в наиболее позднем возрасте. В отличие от этого, мутант *spe-26* имел в десять раз более низкую смертность приблизительно до двухнедельного возраста, но, в конечном счете, достигал более высокого уровня смертности, в то время как *clk-1* мутанты демонстрировали несколько более высокую смертность, чем черви дикого типа, в течение фертильного периода, т.е. в начале жизни, но затем эффект исчезал.

### МАТЕМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КРИВЫХ ВЫЖИВАНИЯ

**Нематода *Caenorhabditis elegans*.** В работе Струструпа и соавт. червей подвергали различным воздействиям, которые увеличивают или уменьшают ПЖ (температура, окислительный стресс, продлевающее ПЖ питание, несколько генетических мутаций). Путем анализа статистических данных о смертности в больших популяциях было показано, что столь разные воздействия, как изменения рациона питания или температуры, окислительный стресс и выключение генов (*hsf-1*, *hif-1*, и трех компонентов пути ИС: *daf-2*, *age-1*, *daf-16*), изменяют распределение ПЖ путем растяжения или сжатия временной шкалы (временное масштабирование, *temporal scaling*) [1]. Детально с температурой и с перекисью изучали три гена ИС-пути: *daf-2*, *daf-16* и *age-1*.

Каждая мутантная популяция характеризуется распределением ПЖ, масштабируемым из распределения дикого типа, как при 20°, так и при 33°. Каких-либо существенных зависимых от температуры отклонений от временного масштабирования не было обнаружено в пределах двух температурных диапазонов: 19–30° и 30,5–33°. Температура до определенного предела влияет на ПЖ не очень сильно (например, при повышении температуры с 20 до 27°, ПЖ снижается в 1,59 раза). При 29° ПЖ снижается в 3,64 раза, при 30° ПЖ — в 6,8 раза, причем здесь происходит переход в следующий температурный интервал [1].

Струструп и соавт. количественно оценивали эффект окислителя гидроперекиси *трет*-бутила (tBuOОН) и обнаружили, что он количественно изменяет масштаб распределения ПЖ в зависимости от дозы вплоть до 3 мМ со значительными отклонениями, наблюдаемыми при 6 мМ [1]. Удаление DAF-16 в присутствии tBuOОН уменьшает ПЖ на постоянную величину,  $19,5 \pm 8,8\%$ , при всех изученных концентрациях. Струструп делает вывод, что DAF-16 действует антагонис-

тически, но параллельно с механизмами, через которые tBuOОН и температура уменьшают ПЖ. DAF-16, tBuOОН и температура, по всей видимости, влияют на старение за счет их влияния на детерминанты риска в нижеследующей цепи мишеней [1]. Величина временного масштабирования, вызываемая аллелями *daf-2* (e1368) и *age-1* (hx546), варьировала в зависимости от концентрации tBuOОН, что кажется еще одним аспектом количественной стресс-зависимой регуляции DAF-16, присутствующей у этих штаммов, но отсутствующей у дикого типа [1].

Инактивация *daf-2*, *daf-16*, *hif-1* или *hsf-1* вызывает отчетливые метаболические, клеточные и поведенческие эффекты [66, 71], как и изменения в рационе питания [88], температура [89] и воздействие tBuOОН [90]. Тем не менее временное масштабирование возникает независимо от молекулярных мишеней, специфичных для каждого вмешательства и требует, чтобы все детерминанты риска были затронуты в одной и той же степени. Исключениями являются мутация гена *eat-2*, нарушающая пищевое поведение червей, и гена *nuo-6*, нарушающая работу комплекса I дыхательной цепи митохондрий и снижающая двигательную активность червя (такие мутанты потребляют меньше кислорода, медленнее двигаются, но зато дольше живут). Как оказалось, они меняют форму кривой выживания, делая ее более пологой (т.е. увеличивая коэффициент вариации (КВ)). Однако даже у этих мутантов другие воздействия, влияющие на ПЖ, в том числе изменения температуры, приводят только к временному масштабированию новой кривой выживания.

Результаты своих опытов на *C. elegans* Струструп и соавт. интерпретируют как указание на генетическую запрограммированность именно формы кривой выживания. Каждому масштабированию, видимо, соответствует определенный молекулярный механизм и барьерный процесс, доминирующий на временной шкале старения [1]. Это совершенно неожиданно, поскольку подразумевает, что испытанные манипуляции, изменяющие ПЖ, меняют вероятность всех возможных причин смерти согласованно, в одной и той же степени [34]. Наблюдение почти идеального масштабирования по времени в очень разных условиях, таким образом, накладывает определенные ограничения на то, как эти условия влияют на выживание [34]. Формально одним из возможных объяснений является то, что каждая причина смерти у червей имеет одну и ту же энергию активации и реагирует одинаково на изменения в рационе, токсические воздействия и различные генетические мутации. Поскольку такая гипотеза представляется невероятной, то

мы должны обратиться к другой интерпретации, а именно, что черви имеют один единственный механизм смерти. Существует некоторое критическое состояние, в котором сходятся все протестированные вмешательства [34]. Такое состояние в свое время постулировал Гаврилов [31], назвав его «нежилецом».

Следует, однако, отметить, что данное открытие Струострупа не обязательно означает открытие универсальной программы старения живых организмов. Дело в том, что метод АФТ широко распространен, и показано, что он благополучно работает не только у червей, но у мух и мышей и даже на объектах неживой природы, например, механизмах и даже болтах и гайках. Было бы преувеличением предполагать наличие у всего перечисленного программы старения. Скорее здесь речь идет об устойчивости данного объекта к нагрузкам. Для биологии старения это имеет большое значение, так как позволяет выявить молекулярные реакции организма на то или иное воздействие, хотя пути перехода жильца в «нежилца» множественны и запрограммированы.

В работе Струострупа и соавт. главный недостаток модели АФТ обращен во благо: описываемое моделью временное масштабирование кривых выживаемости рассматривается как нулевая гипотеза, отклонения от которой могут служить указанием на изменение динамики старения на качественном уровне.

Разработанная Струострупом и соавт. модификация критерия Колмогорова–Смирнова позволяет выявлять отклонения от временного масштабирования при наличии цензурированных данных, когда часть особей покинула эксперимент до своей смерти (при анализе старения таким убытием может считаться и смерть, не зависящая от возраста). Также стоит отметить, что предложенная в статье модификация критерия Колмогорова–Смирнова не требует каких-либо предварительных знаний или предположений о форме сравниваемых кривых выживаемости, что необходимо при традиционном использовании АФТ, для количественной оценки эффектов факторов, влияющих на ПЖ. Так авторы обнаружили, что кривые выживаемости сохраняют свою форму, даже когда инактивирован сигнальный путь IIS, занимающий центральное место во многих аспектах старения у разных видов, а также при мутациях и факторах, которые действуют независимо от пути IIS [34].

Наиболее логичным объяснением этих наблюдений может быть множественность причин смерти. Иными словами, риск смерти определяется не каким-либо одним путем, а есть свой-

ство, которое возникает из взаимодействия между различными молекулярными процессами, которые влияют на старение. Это свойство, названное «устойчивостью», есть внутреннее биологическое свойство старения *C. elegans*, так же, как температура и давление – собственные термодинамические свойства газов, которые вытекают из взаимодействия составляющих их молекул. Аналогично, изменения в молекулярных процессах, которые способствуют устойчивости, могут изменить скорость старения, не меняя форму кривой выживания [34].

Альтернатива – одно физическое свойство (например, внутриклеточные окислительно-восстановительные уровни [91] или глобальные уровни растворимости белка и скорость метаболизма [92]) действует на многие молекулярные процессы и влияет на риск смерти от различных причин и лежит в основе устойчивости организма. Резкое снижение ПЖ, наблюдаемое при 30° у дрозофилы [93], совпадает с отклонением от временного масштабирования распределения ПЖ у *C. elegans*, что позволяет предположить важность этой температуры для старения хладнокровных.

Воздействия одного или всех определяющих факторов риска суммируются в виде общесистемного свойства,  $r(t)$  [1]. Временное масштабирование ПЖ ограничивает динамику переменной состояния  $r(t)$ : единственный стохастический процесс, определяющий ПЖ *C. elegans*, должен быть инвариантным к шкале преобразования времени и следовать средней динамике, управляемой эффективной константой скорости:  $dr/dt = -k_r F(r)$ , где  $F(r)$  является неизвестной функцией  $r$ , которая не зависит от  $k_r$ . В этой формулировке, временное масштабирование возникает, когда воздействия меняют  $k_r$  на  $k_r/\lambda$  [1].  $F(r)$  определяет саму форму кривой, которая растягивается или сжимается лямбдой. У разных организмов она может быть различной.

**Мухи *Drosophila melanogaster*.** Изучали кривые выживания 1) нормальных дрозофил (мухи, предки которых жили много поколений на нормальной среде) (в статье [94] они обозначены  $M_n$ ); 2) мух, предки которых жили много поколений на среде с крахмалом (в статье они обозначены  $M_k$ ); 3) мух, живущих в условиях симпатрии (их предкам в течение всех поколений доступно два типа среды – крахмаловая и вторая, условно названная соленой) (обозначены  $M_{ks}$ ). Для  $M_k$  и  $M_{ks}$  характерно ускорение роста смертности с возрастом по сравнению с  $M_n$ . Так, на нормальной среде средняя ПЖ мух  $M_n$  составила 88,1 сут,  $M_k$  – 69,1 сут,  $M_{ks}$  – 75,0 сут. Средовые воздействия (смена корма) и эволюционные изменения (адаптация к различаю-

щимся средам) могут менять среднюю ПЖ в широких пределах [94].

Если значения КВ ПЖ различаются не более, чем на 10%, то форма кривых выживания сходная, и можно говорить о наличии временного масштабирования. Например, у мух Мк на нормальной и крахмаловой средах значения КВ очень близки (31,8 и 31,9), хотя средние ПЖ различаются (69,1 и 58,2 сут). Соответственно, в данном случае наблюдается временное масштабирование [94].

С другой стороны, у мух Мн на тех же двух средах значения КВ сильно различаются (22,7 и 31,1); соответственно, различается и форма кривой выживания (в первом случае она более выпуклая), т.е. масштабирование отсутствует. При рассмотрении суммарных данных по обоим полам можно заметить, что в 5 из 6 случаев значения КВ довольно близкие (варьируют в пределах от 27,8 до 31,9), и только в контроле (мухи Мн на нормальной среде) значение КВ значительно ниже (22,7) [94].

В табл. 2, а приведено сравнение выживаемости между линиями мух, живущих на нормальной (Н) и крахмаловой (К) средах.

Рассматривается три линии, обозначенные номерами 1, 2, 3. Коэффициенты временного масштабирования ( $\lambda$ ) приведены для сравниваемой линии относительно линии сравнения. Серым выделены значимые отличия от временного масштабирования ( $p < 0,006$ ). Из-за особенностей критерия там приводятся не точные значения вероятности, а интервалы.

В табл. 2, б представлены результаты сравнения самцов и самок.

Нашей задачей было сравнить К1 с Н1, К2 с Н2, К3 с Н3 (такие сравнения отражают фенотипическую пластичность; сравниваются мухи одной линии, живущие на разных средах), а также Н2 с Н1, Н3 с Н1, Н3 с Н2, К2 с К1, К3 с К1 и К3 с К2 (такие сравнения отражают эволюционные изменения; сравниваются попарно различные линии, тестируемые на одной и той же среде). За основу взята методика, предложенная в статье Строуструпа и др. [1], модифицированная в связи с тем, что в наших данных не было цензурированных наблюдений, так как нам известны точные ПЖ всех организмов. Данные по ПЖ логарифмировали (использовался десятичный логарифм) и приводили логарифмирован-

**Таблица 2, а.** Сравнение выживаемости между линиями мух, живущих на нормальной (Н) и крахмаловой (К) средах. Рассмотрены три линии, обозначенные номерами 1, 2, 3. Коэффициенты временного масштабирования ( $\lambda$ ) приведены для сравниваемой линии относительно линии сравнения. Серым выделены значимые отличия от временного масштабирования ( $p < 0,006$ ). Из-за особенностей критерия там приводятся неточные значения вероятности, а интервалы

Линия сравнения	КВ	Сравниваемая линия	КВ	$\lambda$	$p$	Временное масштабирование по данным о КВ
<b>Н1</b>	<b>22,7</b>	<b>Н2</b>	<b>31,8</b>	<b>0,84</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>нет</b>
Н2	31,8	Н3	29,1	0,90	< 0,025	есть
Н1	22,7	Н3	29,1	1,07	> 0,10	есть
Н2	31,8	К2	31,9	0,76	> 0,10	есть
К1	31,1	К2	31,9	0,91	> 0,10	есть
Н3	29,1	К3	27,8	0,75	< 0,10	есть
К1	31,1	К3	27,8	0,95	> 0,10	есть
К2	31,9	К3	27,8	1,05	> 0,10	есть

**Таблица 2, б.** Результаты сравнений самцов и самок

Линия	КВ ♂	КВ ♀	$\lambda$	$p$	Временное масштабирование по данным о КВ
Н1	20,5	24,2	1,04	$p > 0,10$	есть
Н2	25,9	36,3	0,98	$p < 0,001$	нет
Н3	22,1	34,0	1,02	$p < 0,005$	нет
К1	21,4	28,1	1,43	$p < 0,005$	нет
К2	34,8	25,9	1,30	$p < 0,10$	нет
К3	25,5	27,9	1,17	$p > 0,10$	есть

ные данные 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 сравнивались попарно критерием Колмогорова–Смирнова с поправкой Бонферрони. Она необходима для множественных попарных сравнений, чтобы уменьшить вероятность ложноположительных результатов [95]. Значимые различия в распределениях говорят об отклонениях от временного масштабирования. Статистический анализ проводился с помощью программы Statistica.

Соответственно, 4 кривые выживания из 6 имеют похожую (сглаженную) форму, сильно отличающуюся от выпуклой кривой выживания мух *Mn* на среде *H*, что сходно с результатами, полученными в работе [94]. Тем не менее при сравнении выводов о наличии временного масштабирования по данным о КВ и по методу Строуструпа точного согласия нет, причем есть как ложноположительные, так и ложноотрицательные результаты. Отметим, что, в отличие от метода Строуструпа, «метод Маркова» не дает уровня значимости: утверждение «Если значения КВ различаются не более, чем на 10%, то форма линий выживания сходная, и можно говорить о наличии временного масштабирования» предполагает независимое от объема выборки критическое значение различий. Таким образом, «метод Маркова» прост в использовании и позволяет предположить наличие временного масштабирования, тогда как для окончательных выводов необходимо применение метода Строуструпа.

При рассмотрении самцов и самок по отдельности картина получается более сложная, но в целом аналогичная: в одних случаях значения КВ (и форма кривых выживания) сходные, что позволяет говорить о наличии временного масштабирования, тогда как в других масштабирование отсутствует.

Диапазоны значений КВ и форма кривых выживания достаточно близки у *D. melanogaster* и *C. elegans*. Следует отметить, что этого нельзя сказать о других видах, представленных, например, в работе Джонса и соавт. [1] (подробнее [33]).

## МЫШИ

В опытах на различных мутантах мышей Суинделл и соавт. [39] на первом этапе подгонки модели АФТ тестировали различные параметрические распределения для  $T_i$ : экспоненциальное, Вейбулла, Гомперца, лог-нормальное и др. Выбирали те, при котором обеспечивалось минимальное значение критерия АИС (Akaike's

Information Criterion) [96]. Почти во всех случаях наилучшим оказывалось распределение Вейбулла, но в принципе характер выбранного распределения не сильно влиял на результаты: разница между наилучшим и вторым по критерию АИС распределением в среднем составляла 3,9% (0,3–11,4%), а различие в статистической достоверности конечного результата наблюдалось лишь в двух из 22 случаев (мутанты TRX-Tg и  $p66^{+/-}$ ).

В целом, модель АФТ хорошо описывала экспериментальные данные. Для 18 из 22 экспериментов генетические манипуляции не изменяли параметр формы распределения Вейбулла (за исключением мутантов  $bIrs2^{-/-}$ ,  $bIrs2^{+/-}$ ,  $flr^{-/-}$  и *Klotho*). В шести случаях правильность модели АФТ была сомнительна ( $Irs2^{+/-}$ (M),  $bIrs2^{-/-}$ ,  $bIrs2^{+/-}$ ,  $Igf1r^{+/-}$ (F),  $Clk^{+/-}$ (S2), TRX-TG). В каждом из них наблюдалась тенденция, что эффект на ранних стадиях жизненного цикла сильнее, чем на поздних. Это может быть как прямым следствием реальной зависимости эффекта от возраста, так и результатом отсутствия учета каких-то необходимых дополнительных переменных. Тем не менее даже в этих шести случаях вычисленные коэффициенты замедления старения оказались довольно точными оценками средней величины эффекта.

Исключение выпадающих случаев (чаще всего – экстремальных долгожителей контрольной группы) мало влияло на конечный результат [кроме мутанта *Prop1*(df/df), где оно увеличивало оценку  $\lambda$  с 1,48 до 1,54, и мутанта  $Clk1^{+/-}$ (S2) – с 1,32 до 1,41].

При использовании модели РН соотношения рисков заметно варьировали между экспериментами и мало коррелировали с оценками коэффициентов замедления старения в модели АФТ ( $r = 0,22$ ,  $r_s = 0,71$ ). В некоторых случаях значения соотношения рисков получались очень большими. Например, для  $Irs2^{+/-}$ (M) зависящая от возраста смертность в контрольной группе была в 515 раз выше, чем в экспериментальной. Очевидно, по сравнению с моделью АФТ, результаты использования модели РН гораздо чувствительнее к отклонениям экспериментальных данных от предсказанных. В целом применимость модели РН оказалась сомнительной: лог-трансформированные функции рисков у экспериментальной и контрольной групп пересекались в половине случаев ( $p66^{-/-}$ ,  $\alpha$ MUPA,  $bIrs2^{+/-}$ , MCAT,  $Clk1^{+/-}$ (S1), *Klotho*,  $bIrs2^{-/-}$ , TRX-Tg, *Hcrt*-UCP2,  $Surf1^{-/-}$ ,  $Igf1r^{+/-}$ (F),  $Ghr^{-/-}$ ,  $Gpx4^{+/-}$ ). Наиболее явными отклонения от модели были в экспериментах с  $bIrs2^{+/-}$  и  $bIrs2^{-/-}$  ( $p < 0,01$ ); весьма сомнительной адекватность модели оказалась для эффектов  $Surf1^{-/-}$ .

Очевидно, модель АГТ в большинстве случаев наиболее адекватно описывает эффекты генетических манипуляций на ПЖ и дает более устойчивые по отношению к случайным вариациям результаты, чем модель РН.

Интересным результатом данного исследования являются прогрессивно уменьшающееся влияние на ПЖ мутаций в генах, кодирующих все более нижележащие компоненты сигнального пути гормон роста — инсулин-подобный фактор роста I (GH/IGF-I): *Prop1*(df/df), *Pit1*(dw/dw), *Ghrhr*(lit/lit), *Ghr*<sup>-/-</sup>, *PappA*<sup>-/-</sup>, *Igf1r*<sup>+/-</sup>(F), *Irs2*<sup>+/-</sup>(M), *Irs2*<sup>+/-</sup>(F), *bIrs2*<sup>+/-</sup>, *bIrs2*<sup>-/-</sup>. Возможно, более сильные эффекты *Prop1*(df/df) и *Pit1*(dw/dw) объясняются дефектами пролактина и тиреоид-стимулирующего гормона, которые характерны только для этих мутантов.

### КОЭФФИЦИЕНТ ВАРИАЦИИ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ

В своем комментарии к статье Струострупа Марков указывают на другие примеры временного масштабирования, применяя для его выявления другой метод — неизменность КВ ПЖ при ее изменении [94]. Этот подход основан на том факте, что при временном масштабировании КВ действительно не изменяется.

Однако из этого не следует, вообще говоря, что неизменный КВ говорит о временном масштабировании — возможно придумать ситуацию, когда два теоретических распределения с различными средними и одинаковыми КВ будут иметь различия в форме, описываемыми высшими моментами (например, асимметрией). Такая ситуация свидетельствовала бы о незапрограммированности — или, скорее, о переключении между несколькими запрограммированными режимами — например, когда особи в основном умирают в молодом возрасте, но есть отдельные долгожители (сверхдолгожители), или когда молодежь почти не умирает, зато пожилые гибнут за относительно короткий промежуток времени, без сильных отклонений в долгожительство.

Метод Струострупа, непосредственно сравнивающий формы кривых выживаемости, в таком случае обнаружит отклонения от временного масштабирования. Это тем более важно, что у многих животных кривая распределения ПЖ характеризуется правой асимметрией [31].

Однако использование КВ как указания на временное масштабирование представляется желательным исследовать методами анализа

мощности, чтобы выявить то, насколько этот метод склонен обнаруживать отклонения в форме кривых.

Гаврилова и соавт. [97] также использовали КВ ПЖ для выяснения ответа на вопрос о запрограммированности ПЖ. Используя опубликованные данные национального обследования населения США и 14 других стран, они проанализировали достоверность одного из аргументов оппонентов этой точки зрения, а именно того факта, что разброс индивидуальной ПЖ и других событий, связанных со старением, значительно превышает разброс событий, связанных с программой онтогенеза [98]. Авторы обнаружили, 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, и относительная изменчивость возраста начала изменений, связанных со старением (менопауза), примерно одинаковы. Так, КВ для возраста начала полового созревания составил 8–13%, для возраста начала менопаузы — 7–11%, а для возраста смерти — 16–21%. Таким образом, относительная изменчивость возраста смерти лишь вдвое больше относительной изменчивости возраста полового созревания, а относительные изменчивости возраста начала менопаузы и возраста полового созревания почти одинаковы [97].

Идея, что старение обусловлено изменениями физиологического состояния организма, поразному формулировалась с точки зрения таких понятий, как организация, жизнеспособность, резервы организма или устойчивость [10, 99]. При этом какие-либо аспекты физиологии *C. elegans*, которые изменяются с течением времени, но не влияют на ПЖ, влияющие на «качество», а не «количество» жизни, не обязаны изменяться в согласии с  $r(t)$  [1].

Неизвестны ни физиологические основы состояния  $r(t)$ , ни динамика их изменения с возрастом. Тем не менее можно ожидать, что широкий набор детерминантов ПЖ влияют только на  $k_r$ . Будущие исследования должны быть направлены на выяснение природы  $r$  [1].

Струоструп и соавт. выделили несколько изменяющих форму кривой выживаемости воздействий у *C. elegans* (например, мутация, которая приводит к изменению способности питаться, и другая, изменяющая функционирование митохондрий), что может указывать путь к выяснению природы этих механизмов. При этом природа уязвимости организма пока неясна. Пинкус предполагает, что, в частности, индекс

уязвимости (FI, *frailty index*) [100], показывающий долю измеряемых клинических маркеров, находящихся в дефиците, является близким теоретическим соответствием «устойчивости» [34].

И, наконец, Строуструп и др. рассматривают только хронологическое увеличение ПЖ, но не обязательно увеличение ПЖ «в добром здравии» (*healthspan*) [34]. Так, для учета гетерогенности состояния здоровья и скорости старения, Митницки и соавт. предположили, что состояние здоровья человека может быть представлено накоплением проблем со здоровьем (в широком смысле биологическими и клиническими характеристиками). Индекс уязвимости (FI) является отношением накопленных нарушений у человека к общему числу рассматриваемых нарушений (например, в базе данных или эксперименте). Изменения FI характеризуют скорость индивидуального старения. FI растет с возрастом по закону Гомперца, имеет более высокие значения у самок, сильные ассоциации с неблагоприятными исходами (например, смертность) и имеет универсальный предел (~0,7).

Митницки показал, что среднее число «дефицитов» у человека является продуктом средней интенсивности экологических стрессов и среднего времени восстановления. Возрастное увеличение времени восстановления приводит к накоплению «дефицитов» (т.е., по Гаврилову, постепенному переходу от жильца к «нежилцу»). Это объясняет не только, почему число дефектов может быть использовано для оценки индивидуальных различий в скорости старения, но также предполагает, что меры, ориентированные на скорость восстановления (например, путем профилактических или терапевтических вмешательств) позволят уменьшить количество дефицита и тем самым улучшить ожидаемую ПЖ [100].

На вопрос о том, запрограммирован ли процесс старения, одни исследователи отвечают, что специальной генетической программы старения не существует [8, 98, 101], тогда как другие признают возможность существования как запрограммированных, так и случайных компонент процесса старения [5, 21, 24, 102–104].

Многие манипуляции (как генетические и экологические) увеличивают ПЖ у *C. elegans*. Многие изменения, которые увеличивают ПЖ, могут рассматриваться как способы «обмануть» сигнальные пути животного, имитируя недостаточность ресурсов или наличие повреждающих агентов. Это может привести к «вложению средств» в поддержание «сомы», сводя к минимуму повреждение клеточных компонентов. Хендерсон и соавт. предположили, что увеличение ПЖ опосредуется изменениями в функцио-

нировании TOR и IIS путей [60]. Точно так же несколько геронтогенов подчеркивают роль контроля энергетического метаболизма, например, сверхэкспрессия АМР-активируемой протеинкиназы увеличивает ПЖ [105]. Так, например, *aak-2* взаимодействует с несколькими путями, определяющими старение у червей; IIS и деацетилаза *sig 2.1* продлевают ПЖ независимо от *aak-2*. Следует отметить, что в дикой природе размножение является более важным, чем большая ПЖ, и ресурсы не могут быть потрачены впустую. Неспособность *age-1* мутантов выжить в условиях конкурентного эксперимента с животными дикого типа при изменении условий окружающей среды подтверждает эту идею [106]. Т.о., все воздействия, которые увеличивают ПЖ у *C. elegans*, можно разделить на три основные категории: а) нестрессогенные изменения, которые приводят к активации путей стресс-реакции (сенсорных и сигнальных путей) в условиях, которые не требуют этого; б) изменения, которые снижают доступность ресурсов до такой степени, что активируются пути репарации, но сами по себе вредными не являются (например, ограничение питания); в) нелетальные стрессовые меры, мобилизующие ответ организма на стресс, перевешивая вредное воздействие стрессирующего агента (гормезис). С помощью описываемого метода Строуструп и соавт. показали, что выживание после практически любого воздействия, изученного ими (как то: изменение температуры, выключение некоторых генов или обработка перекисью), можно описать моделью АFT. Это означает, что эти воздействия лишь растягивают (или сжимают) кривую выживания вдоль оси *x* (ось времени), не меняя ее форму [1]. В биологическом смысле такой эффект должен означать, что механизмы влияния на ПЖ у перечисленных воздействий одни и те же. Авторы, как и Марков с соавт. [94], считают, что это является следствием того, что эксперименты проведены на примитивных червях, у которых многие опосредующие старение молекулярные пути сходятся и накладываются. Однако известно широкое применение метода АFT на дрозофилах [94] или, например, на мышах [39], которые сильно отличаются от нематод по своему положению на эволюционном древе.

Равенство КВ распределения ПЖ у контрольной и опытной группы означает, в терминах модели АFT, что все факторы, влияющие на ПЖ, изменились в одинаковой мере, на одинаковое количество процентов, что невозможно, если процесс контроля ПЖ стохастичен. По мнению Строуструпа и др., такая неизменность КВ означает запрограммированность путей старения и увеличения вероятности гибели орга-

низма с возрастом. Мы полагаем, что здесь речь идет о запрограммированности путей передачи клеточных сигналов, регулирующих ПЖ у живых организмов. Косвенным доказательством нашей точки зрения является тот факт, что в работе одного из авторов данной статьи было выявлено наличие временного масштабирования при смене рациона питания у одних штаммов дрозофил, и его отсутствие — у других. Между тем сложно себе представить, что у одних линий дрозофил старение запрограммировано, а у других — нет.

Вейсмановская гипотеза старения как адаптивного механизма программируемой смерти может быть объединена с альтернативной точкой зрения о том, что старение — это результат накопления повреждений и ошибок. Накопление повреждений могло бы отслеживаться специальными системами, посылающими активирующий сигнал для запуска программы острого или хронического фенотоза. В случае стохастичности процесса старения сложно было бы предполагать, что мутации генов, т.е. в сущности, индуцированные поломки генома, могут приводить к улучшению работы организма или к увеличению срока его службы. Тем не менее более 500 мутаций увеличивают ПЖ у различных животных. Особенно демонстративен этот эффект у короткоживущих видов с ярко выраженным старением (группа III) [33].

В табл. 1 представлено более 30 мутаций, большая часть из которых увеличивает среднюю ПЖ у нематоды. Наиболее широко охарактеризованным сигнальным путем, который регулирует ПЖ *C. elegans*, является путь инсулин/инсулиноподобный фактор роста 1 (IIS) [23]. Наиболее выраженный эффект на ПЖ вызывают мутации именно этого пути (табл. 1). Эффекты других сигнальных путей зачастую влияют опосредованно через IIS или непосредственно на него, усиливая или ослабляя его действие. Следует отметить, что путь IIS в значительной степени подавлен у «устойчивого к старению» грызуна — голого землекопа *Geterocephalus glaber* [107].

Исходя из этого, можно предположить, что система IIS отвечает не столько за механизм старения, сколько за его скорость, являясь, таким образом, природным регулятором текущего уровня смертности. (При выключении этого пути ПЖ возрастает в 2–3 раза.) Таким образом, путь IIS уменьшает ПЖ. Этому эффекту противодействует DAF-16, однако лишь частично: при его инактивации ПЖ сокращается лишь на 20–30% (табл. 1).

Следует отметить, что если у нематод (как и у других животных) генный нокаут приводит к

изменению временного масштабирования ПЖ в 2–3 раза, то влияние перекиси — до 17 раз, а температуры — до 7. Дальнейшее повышение концентрации также будет сокращать ПЖ, но уже с нарушением временного масштабирования. Струоструп выделил три температурных интервала с различным временным масштабированием, т.е., предположительно, с различными механизмами, «управляющими» смертностью. Действие генного нокаута генов пути IIS также различается в этих температурных интервалах, за исключением гена *daf-16*.

В работе Суинделла показано, что эффекты экспериментального воздействия на выживаемость сходны на ранних, средних и поздних стадиях жизни мышей [39]. В этом случае коэффициенты масштабирования отражают эффект воздействия во всех возрастах (в том числе, позднем), и поэтому информативны в отношении максимальной ПЖ. Тем не менее они выявили шесть генетических манипуляций, для которых эффекты воздействия были явно сильнее в начале жизни по сравнению с концом жизни (*Irs2<sup>+/-</sup>*(M), *bIrs2<sup>-/-</sup>*, *bIrs2<sup>+/-</sup>*, *Igf1r<sup>+/-</sup>*(F), *Clk1<sup>+/-</sup>*(S1), TRX-TG). Для этих сравнений коэффициенты масштабирования модели AFT обеспечивают «усредненную» оценку эффективности воздействия на протяжении всей жизни, но завышают его эффект в позднем возрасте.

Струоструп и соавт. проверяли мощность теста на распределении Вейбулла: то, насколько хорошо тест обнаруживает отклонения от временного масштабирования. Получилось, что для выявления отклонений необходима выборка от 500 до 1500 животных (при 10% цензурированных данных). При меньших выборках даже существенные отклонения останутся незамеченными. Следует отметить легкость в расчетах и широкий диапазон применения — например, таким образом можно сравнивать кривые с сильно разными масштабами по оси времени, и, в отличие от Гемперца, наличием одного параметра, а не двух.

Насколько можно судить, предложенный метод, позволяющий оценить адекватность модели AFT (их модификация теста Колмогорова–Смирнова), выявил, что она действительно работает во многих случаях. При этом Струоструп и соавт. отмечают, что модель временного масштабирования явно работает не всегда — есть виды организмов с заведомо разными кривыми ПЖ.

В целом, модель AFT дает более устойчивые по отношению к случайным вариациям результаты, чем модель РН. Во всех исследованных случаях предсказанные моделью AFT коэффициенты замедления старения укладываются в

узкий интервал ( $1 < \lambda < 2$ ) и довольно точны, даже когда они зависят от возраста, что формально противоречит модели. Мы предполагаем, что использование «временного масштабирования» позволяет в первую очередь отграничивать количественные отличия в динамике старения от качественных. Так при тестировании в технике деталей воздействие нагрузки на деталь при изменении нагрузки будет изменяться, сохраняя временное масштабирование динамики старения, т.е. износа. Исчезновение временного масштабирования в таком случае будет означать, что деталь сломалась, то есть количественные изменения перешли в качественные. При этом естественно, что никакой программы старения у детали нет, оно служит отражением ее

внутренней структуры, свойств составляющих ее материалов. Возможность отслеживать момент переключения пути, «управляющего» смертностью, на какой-либо другой может быть полезна при тестировании различных геропротекторных препаратов.

### Благодарности

Авторы выражают благодарность Е.Ю. Яковлевой, И.Д. Кану и Л.С. Ягужинскому за ценные советы и замечания при написании данной статьи.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-50-00029).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. Jones, O.R., Scheuerlein, A., Salguero-Gomez, R., Camarda, C.G., Schaible, R., Casper, B.B., Dahlgren, J.P., Ehrlén, J., Garcia, M.B., Menges, E.S., Quintana-Ascencio, P.F., Caswell, H., Baudisch, A., and Vaupel, J.W. (2014) Diversity of ageing across the tree of life, *Nature*, **505**, 169–173.
3. Baudisch, A. (2008) *Inevitable Aging? Contributions to Evolutionary-Demographic Theory*, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
4. Skulachev, M.V., and Skulachev, V.P. (2014) New data on programmed aging – slow phenoptosis, *Biochemistry (Moscow)*, **79**, 977–993.
5. 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.
6. Comfort, A. (1979) *The biology of senescence*, Churchill Livingstone, Edinburgh; London.
7. Medvedev, Z.A. (1990) An attempt at a rational classification of theories of ageing, *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, **65**, 375–398.
8. Kirkwood, T.B.L. (2010) Systems biology of ageing and longevity, *Phil. Trans. R. Soc. B.*, **366**, 64–70.
9. Fisher, R.A. (1930) *The genetical theory of natural selection*, Clarendon Press, Oxford.
10. Medawar, P.B. (1952) *An Unsolved Problem of Biology*, London: H.K. Lewis.
11. Hamilton, W.D. (1966) The moulding of senescence by natural selection, *J. Theor. Biol.*, **12**, 12–45.
12. Северцов А.С. (2005) *Теория эволюции*, Гуманитарный издательский центр «Владос», Москва.
13. Putiatina, T.S. (2011) Effect of recreational pressure on ant communities of open biocenoses in Moscow, *Mosc. Univ. Biol. Sci. Bull.*, **66**, 42–45.
14. Зорина З.А., Полегаева И.И., Резникова Ж.И. (1999) *Основы этологии и генетики поведения*, МГУ, Москва.
15. Nusbaum, N.J. (1996) What good is it to get old? *Med. hypotheses*, **47**, 77–79.
16. Williams, G.C. (1957) Pleiotropy, natural selection and the evolution of senescence, *Evolution*, **11**, 398–411.
17. Vijg, J., and Suh, Y. (2005) Genetics of longevity and aging, *Annu. Rev. Med.*, **56**, 193–212.
18. Campisi, J. (2005) Aging, tumor suppression and cancer: high wire-act! *Mech. Ageing Dev.*, **126**, 51–58.
19. Weinert, B.T., and Timiras, P.S. (2003) Invited review: Theories of aging, *J. Appl. Physiol.*, **95**, 1706–1716.
20. 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.
21. Skulachev, V.P. (1999) Phenoptosis: programmed death of an organism? *Biochemistry (Moscow)*, **64**, 1418–1426.
22. Weismann, A. (1889) *Essays upon heredity and kindred biological problems*, Oxford, Clarendon Press.
23. Guarente, L., and Kenyon, C. (2000) Genetic pathways that regulate ageing in model organisms, *Nature*, **408**, 255–262.
24. Longo, V.D., Mitteldorf, J., and Skulachev, V.P. (2005) Programmed and altruistic ageing, *Nature Rev. Genet.*, **6**, 866–872.
25. Ashapkin, V.V., Kutueva, L.I., and Vanyushin, B.F. (2015) Aging epigenetics: accumulation of errors or realization of a specific program? *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 1406–1417.
26. Boyd-Kirkup, J.D., Green, C.D., Wu, G., Wang, D., and Han, J.D. (2013) Epigenomics and the regulation of aging, *Epigenomics*, **5**, 205–227.
27. Zwaan, B., Bijlsma, R., and Hoekstra, R.E. (1995) Direct selection on life-span in *Drosophila melanogaster*, *Evolution*, **49**, 649–659.
28. Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A., and Tabtiang, R.A. (1993) *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type, *Nature*, **366**, 461–464.
29. Markov, A.V. (2012) Can kin selection facilitate the evolution of the genetic program of senescence? *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 733–737.
30. Bahar, R., Hartmann, C.H., Rodriguez, K.A., Denny, A.D., Busuttill, R.A., Dolle, M.E., Calder, R.B., Chisholm, G.B., Pollock, B.H., Klein C.A., and Vijg, J. (2006) Increased cell-to-cell variation in gene expression in ageing mouse heart, *Nature*, **441**, 1011–1014.
31. Gavrilov, L.A., and Gavrilova, N.S. (1991) *The Biology of Life Span: A Quantitative Approach*, Harwood Academic Publisher, N.Y.

32. Khalyavkin, 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.
33. 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.
34. Pincus, Z. (2016) Ageing: a stretch in time, *Nature*, **530**, 37–38.
35. Herndon, L.A., Schmeissner, P.J., Dudaronek, J.M., Brown, P.A., Listner, K.M., Sakano, Y., Paupard, M.C., Hall, D.H., and Driscoll, M. (2002) Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing *C. elegans*, *Nature*, **419**, 808–814.
36. Pincus, Z., Smith-Vikos, T., and Slack, F.J. (2011) MicroRNA predictors of longevity in *Caenorhabditis elegans*, *PLoS Genet.*, **7**, e1002306.
37. Cox, D.R. (1972) Regression models and life-tables, *J. Roy. Statist. Soc. Ser.*, **34**, 187–202.
38. Collett, D. (2003) *Modelling Survival Data in Medical Research*, Vol. 2. CRC Press, Boca Raton.
39. Swindell, W.R. (2009) Accelerated failure time models provide a useful statistical framework for aging research, *Exp. Gerontol.*, **44**, 190–200.
40. Swindell, W.R. (2016) Meta-analysis of 29 experiments evaluating the effects of rapamycin on life span in the laboratory mouse, *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, doi:10.1093/gerona/glw153 (2016).
41. Kappeler, L., De Magalhaes Filho, C., Dupont, J., Leneuve, P., Cervera, P., Perin L., Loudes C., Blaise A., Klein R., Epelbaum J., Le Bouc Y., and Holzenberger, M. (2008) Brain IGF-1 receptors control mammalian growth and lifespan through a neuroendocrine mechanism, *PLoS Biol.*, **6**, e254.
42. Huang, C., Xiong, C., and Kornfeld, K. (2004) Measurements of age-related changes of physiological processes that predict lifespan of *Caenorhabditis elegans*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 8084–8089.
43. Hosono, R., Sato, Y., Aizawa, S.I., and Mitsui, Y. (1980) Age-dependent changes in mobility and separation of the nematode *Caenorhabditis elegans*, *Exp. Gerontol.*, **15**, 285–289.
44. Dambroise, E., Monnier, L., Ruisheng, L., Aguilaniu, H., Joly, J.S., Tricoire, H., and Rera, M. (2016) Two phases of aging separated by the Smurf transition as a public path to death, *Sci. Rep.*, **6**, 23523.
45. Kennedy, B.K. (2008) The genetics of ageing: insight from genome-wide approaches in invertebrate model organisms, *J. Intern. Med.*, **263**, 142–152.
46. Smith, E.D., Tsuchiya, M., Fox, L.A., Dang, N., Hu, D., Kerr, E.O., Johnston, E.D., Tchao, B.N., Pak, D.N., Welton, K.L., Promislow, D.E., Thomas, J.H., Kaerberlein, M., and Kennedy, B.K. (2008) Quantitative evidence for conserved longevity pathways between divergent eukaryotic species, *Genome Res.*, **18**, 564–570.
47. Murakami, H., Bessinger, K., Hellmann, J., and Murakami, S. (2005) Aging-dependent and -independent modulation of associative learning behavior by insulin/insulin-like growth factor-1 signal in *Caenorhabditis elegans*, *J. Neurosci.*, **25**, 10894–10904.
48. Lee, S.S., Lee, R.Y., Fraser, A.G., Kamath, R.S., Ahringer, J., and Ruvkun, G. (2003) A systematic RNAi screen identifies a critical role for mitochondria in *C. elegans* longevity, *Nat. Genet.*, **33**, 40–48.
49. Houthoofd, K., Braeckman, B.P., Johnson, T.E., and Vanfleteren, J.R. (2003) Life extension via dietary restriction is independent of the Ins/IGF-1 signalling pathway in *Caenorhabditis elegans*, *Exp. Gerontol.*, **38**, 947–954.
50. De Cuyper, C. and Vanfleteren, J.R. (1982) Oxygen consumption during development and aging of the nematode *Caenorhabditis elegans*, *Comp. Biochem. Physiol.*, **73A**, 283–289.
51. Chen, J., Senturk, D., Wang, J.L., Muller, H.G., Carey, J.R., Caswell, H., and Caswell-Chen, E.P. (2007) A demographic analysis of the fitness cost of extended longevity in *Caenorhabditis elegans*, *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, **62**, 126–135.
52. Lakowski, B., and Hekimi, S. (1998) The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 13091–13096.
53. Klass, M.R. (1977) Aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*: Major biological and environmental factors influencing life span, *Mech. Ageing Dev.*, **6**, 413–429.
54. Melov, S., Ravenscroft, J., Malik, S., Gill, M.S., Walker, D.W., Clayton, P.E., Wallace, D.C., Malfroy, B., Doctrow, S.R., and Lithgow, G.J. (2000) Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics, *Science*, **289**, 1567–1569.
55. Feng, J., Bussiere, F., and Hekimi, S. (2001) Mitochondrial electron transport is a key determinant of life span in *Caenorhabditis elegans*, *Dev. Cell*, **1**, 633–644.
56. Johnson, T.E., Wu, D., Tedesco, P., Dames, S., and Vaupel, J.W. (2001) Age-specific demographic profiles of longevity mutants in *Caenorhabditis elegans* show segmental effects, *J. Gerontol. Biol. Sci.*, **56A**, 331–339.
57. Hsin, H., and Kenyon, C. (1999) Signals from the reproductive system regulate the lifespan of *C. elegans*, *Nature*, **399**, 362–366.
58. Evason, K., Huang, C., Yamben, I., Covey, D.F., and Kornfeld, K. (2005) Anticonvulsant medications extend worm life-span, *Science*, **307**, 258–262.
59. Yokoyama, K., Fukumoto, K., Murakami, T., Harada, S., Hosono, R., Wadhwa, R., Mitsui, Y., and Ohkuma, S. (2002) Extended longevity of *Caenorhabditis elegans* by knocking in extra copies of hsp70F, a homolog of mot-2 (mortalin)/mthsp70/Grp75, *FEBS Lett.*, **516**, 53–57.
60. Henderson, S.T., Bonafe, M., and Johnson, T.E. (2006) daf-16 protects the nematode *Caenorhabditis elegans* during food deprivation, *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, **61**, 444–460.
61. Viswanathan, M., Kim, S.K., Berdichevsky, A., and Guarente, L. (2005) A role for SIR-2.1 regulation of ER stress response genes in determining *C. elegans* life span, *Dev. Cell*, **9**, 605–615.
62. Wood, J.G., Rogina, B., Lavu, S., Howitz, K., Helfand, S.L., Tatar, M., and Sinclair, D. (2004) Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans, *Nature*, **430**, 686–698.
63. Babar P., Adamson, C., Walker, G.A., Walker, D.W., and Lithgow, G.J. (1999) P13-kinase inhibition induces dauer formation, thermotolerance and longevity in *C. elegans*, *Neurobiol. Aging*, **20**, 513–519.
64. Lin, K., Dorman, J.B., Rodan, A., and Kenyon, C. (1997) daf-16: An HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans*, *Science*, **278**, 1319–1322.
65. Boehm, M., and Slack, F. (2005) A developmental timing microRNA and its target regulate life span in *C. elegans*, *Science*, **310**, 1954–1957.
66. Hsu A.L., Murphy C.T., and Kenyon, C. (2003) Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor, *Science*, **300**, 1142–1145.
67. Uno, M., and Nishida, E. (2016) Lifespan-regulating genes in *C. elegans*, *npj Aging and Mechanisms of Disease*, **2**, 16010; doi:10.1038/npjamd.2016.10.
68. Friedman, D.B., and Johnson, T.E. (1988) Three mutants that extend both mean and maximum life span of the

- nematode, *Caenorhabditis elegans*, define the age-1 gene, *J. Gerontol.*, **43**, 102–109.
69. Ogg, S., Paradis, S., Gottlieb, S., Patterson, G.I., Lee, L., Tissenbaum, H.A., and Ruvkun, G. (1997) The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*, *Nature*, **389**, 994–999.
  70. Henderson, S.T., and Johnson, T.E. (2001) DAF-16 integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*, *Curr. Biol.*, **11**, 1975–1980.
  71. Murphy, C.T., McCarroll, S.A., Bargmann, C.I., Fraser, A., Kamath, R.S., Ahringer, J., Li, H., and Kenyon, C. (2003) Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*, *Nature*, **424**, 277–283.
  72. Shaw, W.M., Luo, S., Landis, J., Ashraf, J. and Murphy, C.T. (2007) The *C. elegans* TGF- $\beta$  Dauer pathway regulates longevity via insulin signaling, *Curr. Biol.*, **17**, 1635–1645.
  73. Li, W., Gao, B., Lee, S.M., Bennett, K. and Fang, D. (2007) RLE-1, an E3 ubiquitin ligase, regulates *C. elegans* aging by catalyzing DAF-16 polyubiquitination, *Dev. Cell*, **12**, 235–246.
  74. Heimbucher, T., Liu, Z., Bossard, C., McCloskey, R., Carrano, A.C., Riedel, C.G., Tanasa, B., Klammt, C., Fonslow, B.R., Riera, C.E., Lillemeier, B.F., Kempfues, K., Yates, J.R. 3rd, O’Shea, C., Hunter, T., and Dillin, A. (2015) The Deubiquitylase MATH-33 controls DAF-16 stability and function in metabolism and longevity, *Cell Metab.*, **22**, 151–163.
  75. Tullet, J.M., Hertweck, M., An, J.H., Baker, J., Hwang, J.Y., Liu, S., Oliveira, R.P., Baumeister, R., and Blackwell, T.K. (2008) Direct inhibition of the longevity-promoting factor SKN-1 by insulin-like signaling in *C. elegans*, *Cell*, **132**, 1025–1038.
  76. Tepper, R.G., Ashraf, J., Kaletsky, R., Kleemann, G., Murphy, C.T., and Bussemaker, H.J. (2013) PQM-1 complements DAF-16 as a key transcriptional regulator of DAF-2-mediated development and longevity, *Cell*, **154**, 676–690.
  77. Wolkow, C.A., Kimura, K.D., Lee, M.S., and Ruvkun, G. (2000) Regulation of *C. elegans* lifespan by insulin-like signaling in the nervous system, *Science*, **290**, 147–150.
  78. Wullschlegel, S., Loewith, R., and Hall, M.N. (2006) TOR signaling in growth and metabolism, *Cell*, **124**, 471–484.
  79. Vellai, T., Takacs-Vellai, K., and Zhang, Y., Kovacs, A.L., Orosz, L., and Muller, F. (2003) Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*, *Nature*, **426**, 620–627.
  80. Chen, D., Li, P. W.-L., Goldstein, B.A., Goldstein, B.A., Cai, W., Thomas, E.L., Chen, F., Hubbard, A.E., Melov, S., and Kapahi, P. (2013) Germline signaling mediates the synergistically prolonged longevity produced by double mutations in *daf-2* and *rsk-1* in *C. elegans*, *Cell Rep.*, **5**, 1600–1610.
  81. Berdichevsky, A., Viswanathan, M., Horvitz, H.R., and Guarente, L. (2006) *C. elegans* SIR-2.1 interacts with 14-3-3 proteins to activate DAF-16 and extend lifespan, *Cell*, **125**, 1165–1177.
  82. Apfeld, J., O’Connor, G., McDonagh, T., DiStefano, P.S. and Curtis, R. (2004) The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in *C. elegans*, *Genes Dev.*, **18**, 3004–3009.
  83. Greer, E.L., Maures, T.J., Ucar, D., Hauswirth, A.G., Mancini, E., Lim, J.P., Benayoun, B.A., Shi, Y., and Brunet, A. (2011) Transgenerational epigenetic inheritance of longevity in *Caenorhabditis elegans*, *Nature*, **479**, 365–371.
  84. Jin, C., Li, J., Green, C.D., Yu, X., Tang, X., Han, D., Xian, B., Wang, D., Huang, X., Cao, X., Yan, Z., Hou, L., Liu, J., Shukeir, N., Khaitovich, P., Chen, C.D., Zhang, H., Jenuwein, T., and Han, J.D. (2011) Histone demethylase UTX-1 regulates *C. elegans* life span by targeting the insulin/IGF-1 signaling pathway, *Cell Metab.*, **14**, 161–172.
  85. Smith-Vikos, T., de Lencastre, A., Inukai, S., Shlomchik, M., Holtrup, B., and Slack, F.J. (2014) MicroRNAs mediate dietary-restriction-induced longevity through PHA-4/FOXA and SKN-1/Nrf transcription factors, *Curr. Biol.*, **24**, 2238–2246.
  86. Zhang, Y., Shao, Z., Zhai, Z., Shen, C., and Powell-Coffman, J.A. (2009) The HIF-1 hypoxia-inducible factor modulates lifespan in *C. elegans*, *PLoS One*, **4**, e6348.
  87. Leiser, S.F., Miller, H., Rossner, R., Rossner, R., Fletcher, M., Leonard, A., Primitivo, M., Rintala, N., Ramos, F.J., Miller, D.L., Kaerberlein, M. (2015) Cell nonautonomous activation of flavin-containing monooxygenase promotes longevity and health span, *Science*, **350**, 1375–1378.
  88. Walker, G., Houthoofd, K., Vanfleteren, J.R., and Gems, D. (2005) Dietary restriction in *C. elegans*: from rate-of-living effects to nutrient sensing pathways, *Mech. Ageing Dev.*, **126**, 929–937.
  89. McColl, G., Rogers, A.N., Alavez, S., Hubbard, A.E., Melov, S., Link, C.D., Bush, A.I., Kapahi, P., and Lithgow, G.J. (2010) Insulin-like signaling determines survival during stress via posttranscriptional mechanisms in *C. elegans*, *Cell Metab.*, **12**, 260–272.
  90. Oliveira, R.P., Porter Abate, J., Dilks, K., Landis, J., Ashraf, J., Murphy, C.T., and Blackwell, T.K. (2009) Condition-adapted stress and longevity gene regulation by *Caenorhabditis elegans* SKN-1/Nrf, *Aging Cell*, **8**, 524–541.
  91. Kirstein, J., Morito D., Kakihana, T., Sugihara, M., Minnen, A., Hipp, M.S., Nussbaum-Krammer, C., Kasturi, P., Hartl, F.U., Nagata, K., and Morimoto, R.I. (2015) Proteotoxic stress and ageing triggers the loss of redox homeostasis across cellular compartments, *EMBO J.*, **34**, 2334–2349.
  92. Vilchez, D., Simic, M.S. and Dillin, A. (2014) Proteostasis and aging of stem cells, *Trends Cell Biol.*, **24**, 161–170.
  93. Atlan, H., Miquel, J., Helmle, L.C., and Dolkas, C.B. (1976) Thermodynamics of aging in *Drosophila melanogaster*, *Mech. Ageing Dev.*, **5**, 371–387.
  94. Марков А.В., Наймарк Е.Б., Яковлева Е.Ю. (2016) Временное масштабирование возрастной динамики смертности: ход старения *Caenorhabditis elegans* легко замедлить или ускорить, но трудно изменить его траекторию (Комментарий к статье Stroustrup et al., 2016), *Биохимия*, **81**, 1148–1155.
  95. 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, life-history traits and anthropogenic factors, *Proc. Biol. Sci.*, **282**, 20150728.
  96. Akaike, A. (1974) A new look at the statistical model identification, *IEEE Trans. Autom. Control.*, **19**, 716–723.
  97. 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.
  98. Austad, S.N. (2004) Is aging programmed? *Aging Cell*, **3**, 249–2
  99. Gladyshev, V.N. (2013) The origin of aging: imperfectness-driven non-random damage defines the aging process and control of lifespan, *Trends Genet.*, **29**, 506–512.

100. Mitnitski, A., and Rockwood, K. (2016) The rate of aging: the rate of deficit accumulation does not change over the adult life span, *Biogerontology*, **17**, 199–204.
101. Khokhlov, A.N. (2010) Does aging need an own program or the existing development program is more than enough, *Russ. J. Gen. Chem.*, **80**, 1507–1513.
102. Blagosklonny, M.V. (2007) Program-like aging and mitochondria: instead of random damage by free radicals, *J. Cell. Biochem.*, **102**, 1389–1399.
103. Goldsmith, T.C. (2008) Aging, evolvability, and the individual benefit requirement; medical implications of aging theory controversies, *J. Theor. Biol.*, **252**, 764–768.
104. Libertini, G. (2008) Empirical evidence for various evolutionary hypotheses on species demonstrating increasing mortality with increasing chronological age in the wild, *Sci. World J.*, **8**, 182–193.
105. Curtis, R., O'Connor, G., and DiStefano, P.S. (2006) Aging networks in *Caenorhabditis elegans*: AMP-activated protein kinase (*aak-2*) links multiple aging and metabolism pathways, *Aging Cell*, **5**, 119–126.
106. Jenkins, N.L., McColl, G., and Lithgow, G.J. (2004) Fitness cost of extended lifespan in *Caenorhabditis elegans*, *Proc. Biol. Sci.*, **271**, 2523–2526.
107. Fang, X., Seim, I., Huang, Z., Gerashchenko, M.V., Xiong, Z., Turanov, A.A., Zhu, Y., Lobanov, A.V., Fan, D., Yim, S.H., Yao, X., Ma, S., Yang, L., Lee, S.G., Kim, E.B., Bronson, R.T., Sumner, R., Buffenstein, R., Zhou, X., Krogh, A., Park, T.J., Zhang, G., Wang, J., and Gladyshev, V.N. (2014) Adaptations to a subterranean environment and longevity revealed by the analysis of mole rat genomes, *Cell. Rep.*, **8**, 1354–1364.

## IS IT POSSIBLE TO SHOW EXISTENCE OF AN AGING PROGRAM BY QUANTITATIVE METHODS OF ESTIMATING MORTALITY DYNAMICS?

G. A. Shilovsky<sup>1,2\*</sup>, T. S. Putyatina<sup>2</sup>, S. N. Lysenkov<sup>2,3</sup>,  
V. V. Ashapkin<sup>1</sup>, O. S. Luchkina<sup>4</sup>, A. V. Markov<sup>2</sup>,  
and V. P. Skulachev<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Lomonosov Moscow State University, Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, 119991 Moscow, Russia; E-mail: gregory\_sh@list.ru, grgerontol@gmail.com*

<sup>2</sup> *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119991 Moscow, Russia*

<sup>3</sup> *Russian Clinical Research Center for Gerontology, 129226 Moscow, Russia*

<sup>4</sup> *Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia*

Received September 16, 2016

Accumulation of various types of damage should lead to increasing vulnerability and to monotonously increasing mortality rate with age independently of the species position on the evolutionary tree. We have concluded that the classification proposed by Jones et al. makes it possible to approximately divide animals and plants only by their levels of the Gompertz type of senescence (i.e. actuarial senescence), whereas susceptibility to biological senescence can be estimated only when principally different models are applied. Thus, in 2016 it was shown that in the nematode *Caenorhabditis elegans* (unlike long-living animals) variable factors reducing or extending the lifespan (e.g. oxidative stress, temperature change, or diet) do not change the shape of survival curve, but only stretch or compress it along the time axis. This phenomenon, according to the authors, suggests the existence of an «aging program». Existing data show that additional changes in the mathematical analysis of laboratory animals' survival curves are needed in testing of various geroprotectors and geropromotors to take into account the possible presence of such and aging program.

*Key words:* lifespan, aging, survival curves, temporal scaling, phenoptosis