ЗНАТЬ ВРАГА В ЛИЦО:
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ СТАРЕНИЯ

УДК 57.017.6
ВАК 03.01.04

Василевич Н.И., к.х.н., ООО "ЛабПро Медиа", nvasile2003@yahoo.com

Население всего мира стремительно стареет. По прогнозам ВОЗ, за период с 2000 по 2050 годы доля населения мира в возрасте старше 60 лет удвоится примерно с 11% до 22% и достигнет 2 миллиардов человек. Число людей в возрасте 80 лет и старше за тот же период возрастет почти в 4 раза и составит 395 миллионов человек. Хотя ВОЗ не считает старость болезнью, она сопряжена с возникновением большого числа хронических заболеваний, поэтому замедление старения и продление активного образа жизни человека – одна из основных задач современной науки. Существует ряд гипотез о том, как замедлить или даже обратить старение вспять. Известно положительное влияние здорового образа жизни, включающего правильное питание, физические нагрузки, режим сна и другие факторы. В то же время активно ведутся поиски фармакологических и генетических методов продления жизни. Однако поиск геропротекторов требует разработки животной модели оценки биологического возраста и скорости процесса. Необходимо определить, как тот или иной препарат или иная интервенция влияет на старение, не дожидаясь, когда животное умрет, чтобы сравнить продолжительность его жизни с животными контрольной группы. Этой цели служат молекулярные часы, определяющие биологический возраст организма по набору определенных маркеров. Среди предложенных часов наиболее точны и перспективны эпигенетические часы, или часы метилирования определенных сайтов ДНК.

ПРИЧИНЫ СТАРЕНИЯ

Старение – биологический процесс, сопровождающийся постепенным ухудшением всех функций и систем организма. Старение характерно для большинства видов животных, и его скорость связана с такими факторами, как размер, плодовитость, скорость метаболизма и др. Точные механизмы этого сложного биологического разрушения до сих пор не до конца понятны. Для объяснения феномена старения предложено несколько теорий, которые отчасти противоречат, а отчасти дополняют друг друга. Их можно условно разделить на два больших класса: старение как процесс, запрограммированный в генах организмов, и старение как изнашивание организма в отсутствие какой-либо программы.

Один из основных факторов, связанных со старением, – накопление в течение всей жизни повреждений, которые происходят из-за действия экзогенных химических веществ и токсинов, радиации, активных форм кислорода и т.д., а также в результате неидеальности биологических процессов. Сложные сети путей репарации способны восстанавливать большинство повреждений, однако эти системы несовершенны, и с возрастом повреждения накапливаются как в ДНК, так и в белковых молекулах. Например, под действием активных форм кислорода может происходить их окисление, что приводит к изменению структуры, а значит, каталитических и функциональных свойств. Кроме того, каждая биохимическая реакция не протекает со 100% выходом, в результате наряду с нужными биологическими молекулами образуются побочные продукты. Сами физико-химические принципы протекания реакций обусловливают несовершенность как всех биологических молекул, так и всех биологических процессов. Фактически несовершенства проникают во всю биологию и химию организмов, приводя к нежелательным, вредным, беспорядочным, разрушительным последствиям на всех уровнях, от простых молекул до органов [1, 2]. Например, белки, помимо своих прямых функций (то есть функций, для которых они эволюционировали), участвуют в нежелательных реакциях и взаимодействиях. Ферменты характеризуются ненулевой вероятностью реагировать с другими субстратами, образуя побочные продукты реакции. Для обозначения комплекса молекулярных повреждений, последствий нежелательных побочных процессов, а также увеличения беспорядка на всех уровнях, от простых молекул до клеток и органов, В.Н.Гладышевым был предложен термин "делетерием". Делетерием увеличивается с возрастом и в конечном итоге определяется генетическими, экологическими и стохастическими процессами. Его отдельные компоненты взаимно влияют друг на друга, проявляясь как старение. Авторы [3] образно называют старение войной между химическими и биохимическими процессами, и чем дольше продолжается эта война, тем больше нежелательных побочных продуктов образуется. Важно отметить, что эти побочные продукты представляют собой не только небольшие молекулы, но и все типы биомолекул, включая нуклеиновые кислоты

DOI: 10.32757/2619-0923.2020.3-4.13.118.128

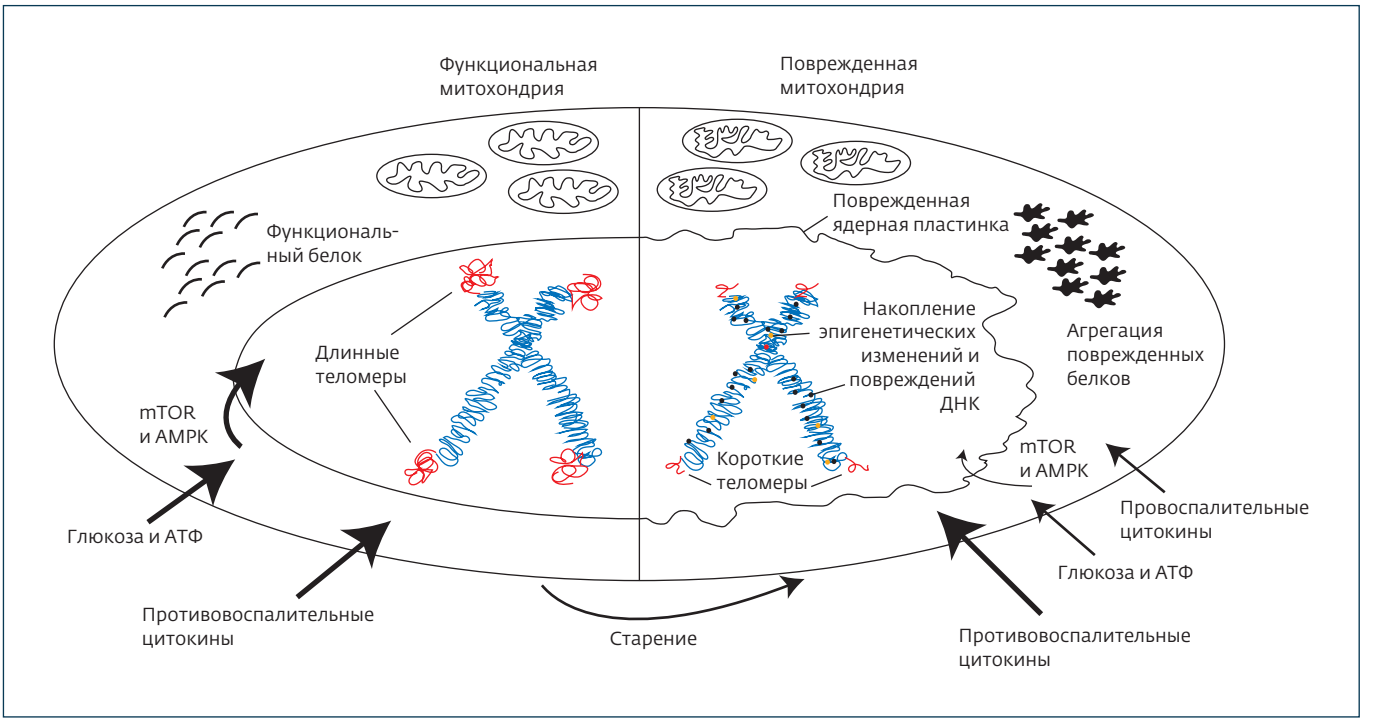


Рис.1. *Процессы, характеризующие клеточное старение [8]*

и белки. Более того, поскольку почти все молекулы, из которых состоят живые системы, от небольших метаболитов до белков, не являются термодинамически абсолютно стабильными, происходит процесс их медленного, но неизбежного неферментативного разложения. Например, авторы [3] рассматривают самопроизвольное протекание процессов деамидирования, метилирования, изомеризации и рацемизации остатков аспарагина и аспарагиновой кислоты и влияние этих процессов на старение. Последние две реакции происходят в результате образования промежуточного нестабильного сукцинимидного соединения, которое гидролизуется с образованием рацемической смеси аспартила и изоаспартила. Случайные повреждения могут взаимодействовать друг с другом: поврежденные молекулы ДНК способствуют синтезу поврежденных белков, накопление мутаций в митохондриальной ДНК приводит к накоплению активных форм кислорода и снижению производства энергии, что, в свою очередь, приводит к увеличению скорости повреждения ДНК и белков клеток и т.д.

Существуют и другие теории старения – старение как запрограммированный в геноме процесс. Эту точку зрения активно развивает академик В.П.Скулачев, который использует для него специальный термин – "феноптоз" [4, 5]. По словам ученого, "программа смерти закодирована в геноме живого организма и представляет собой цепь биохимических событий, вызывающих в конечном итоге его самоубийство". Примеры феноптоза описаны для многих многоклеточных организмов: достаточно вспомнить яркий пример тихоокеанского лосося, которые погибает непосредственно после нереста. Считается, что сигналом для запуска ускоренной программы старения служит переход рыбы из соленой воды в пресную. Процесс старения людей не столь выражен, и существует ряд гипотез о том, что служит триггером для его начала.

БИОМАРКЕРЫ СТАРЕНИЯ

Для большинства организмов, в т.ч. млекопитающих, процесс старения сопровождается целым рядом клеточных изменений: нестабильностью генома, укорочением теломер, эпигенетическими изменениями, потерей протеостаза, нарушением регуляции чувствительности к питательным веществам, дисфункцией митохондрий, клеточным старением, истощением стволовых клеток и нарушением межклеточной коммуникации [6]. Многие биологические показатели, такие как уровни экспрессии p16ink4a, уровень С-реактивного белка и креатинина в крови, уровень глюкозы натощак, длина теломер, число и степень метилирования гистонов, профиль метилирования определенных сайтов ДНК и др. коррелируют со старением, эти изменения могут быть оценены количественно (рис.1). Изменение каждого из этих показателей в течение жизни может служить маркером возраста организма.

В течение жизни изменения происходят не только в клетках организма, меняется и микробиота кишечника. Таким образом, профиль микробиоты также может указывать на возраст организма [7].

Однако, кроме числа прожитых лет, на степень изношенности организма влияет ряд дополнительных факторов: наследственность, питание, экология, физическая активность, применение лекарственных препаратов, стрессы, образ жизни и др. Поэтому наряду с хронологическим возрастом существует понятие биологического возраста, т.е. морфологического и физиологического состояния организма. Биологический возраст может совпадать с хронологическим, т.е. процесс старения может считаться нормальным, физиологическим, но может достаточно значительно отличаться от него, в этом случае старение будет ускоренным (биологический возраст опережает календарный) или замедленным (хронологический возраст опережает биологический). Возрастные изменения функции или состава тела, которые могут служить мерой биологического возраста и предсказывать начало возрастных заболеваний и/или остаточной продолжительности жизни, называются биомаркерами старения. Было предложено много кандидатов в биомаркеры, но в большинстве перекрестных исследований существует значительный разброс в определяемом возрасте.

В настоящее время в Европе реализуется масштабный комплексный проект MAPK-AGE с участием 3700 волонтеров, основной целью которого является определение оптимальной комбинации биомаркеров старения [9]. Исследование проводят 26 научных групп, которые оценивают следующие биомаркеры:

- генетические и эпигенетические маркеры (метилирование ДНК, длина теломер, накопление мутаций в митохондриальной ДНК);
- маркеры, основанные на белках и их модификациях (ApoJ/CLU, гликопротеины, карбоксиметиллизин, пентозидин, Арг-пиримидин и имидазолон и др.);
- иммунологические маркеры (уровень иммуноглобулинов IgG, IgE, IgM, IgA, четырнадцати цитокинов, Т- и В-клеток, молекул sjTREC, антител против тиреоглобулина; оценка моноцитов с помощью иммунофлуоресценции, анализ антител и клеточного иммунитета против кори, паротита, столбняка, цитомегаловирусной инфекции, маркеров апоптоза);
- биохимические маркеры и маркеры системного метаболизма и токсичности (азот мочевины крови и креатинин, трансферрин, ферритин, альфа-2-макроглобулин, церулоплазмин, глюкоза и инсулин натощак, гликозилированный гемоглобин);
- маркеры окислительного стресса (малоновый диальдегид, карбонилированные и нитрованные белки, окисленные липопротеиды низкой плотности, изопростаны, клеточный глутатион, α-токоферол, α-каротин, аскорбиновая кислота, Zn, Cu, Se и Fe в крови или/и сыворотке);
- маркеры системного воспаления (С-реактивный белок, гомоцистеин, мочевая кислота, фибриноген, сывороточные амилоиды А и Р, пентраксин-3, адипонектин) [10–13].

Многие научные группы работают над созданием "часов", позволяющих определить биологический или хронологический возраст человека. Среди них наибольшее внимание получили часы, основанные на определении длины теломер в быстроделящихся клетках и на степени и профиле метилирования ДНК.

ТЕЛОМЕРИЧЕСКИЕ ЧАСЫ

Теломеры – концевые участки хромосом, состоящие из консервативных нуклеотидных последовательностей TTAGGG. Начальная длина теломер млекопитающих – около 17 000 пар оснований. В каждом цикле деления теломеры клетки укорачиваются из-за неспособности ДНК-полимеразы синтезировать копию ДНК с самого конца. После примерно 50 циклов клетки перестают делиться. Это явление было открыто Леонардом Хейфликом, а в 1971 году А.М.Оловников предложил теорию маргинотомии, в рамках которой связал число клеточных делений и недорепликацию теломерных участков. Им была предложена формула для определения времени жизни любой делящейся культуры клеток, и это стало основой для создания биологических часов [14]. Вступление в фазу клеточного старения связано с достижением теломерой длины около 1500 пар оснований. В некоторых случаях клетки могут стать бессмертными благодаря активности специфического фермента – теломеразы, который восстанавливает длину теломеры. Теломераза активна в клетках зародышевой линии и в клетках злокачественной опухоли, но отсутствует в большинстве соматических клеток.

Было установлено, что скорость укорочения теломер соотносится с индивидуальной продолжительностью жизни для ряда видов млекопитающих, включая людей. Линейная корреляция между длиной теломер в клетках кожи и возрастом была продемонстрирована в работе [15]. В соматических клетках длина теломер очень неоднородна, но, как правило, уменьшается с возрастом в пролиферирующих тканях, способствуя возрастной потере стволовых клеток. Есть мнение, что укорочение теломер создает тем самым барьер для онкогенеза, но не все ученые согласны с этим утверждением [16]. На длину теломер оказывает влияние не только возраст, но и ряд хронических дегенеративных заболеваний: диабет 2 типа, сердечно-сосудистые заболевания, остеопо-

роз и рак, а также генетическая предрасположенность и факторы окружающей среды. Одним из наиболее важных факторов, вызывающих укорочение, является окислительный стресс. В клеточных линиях человека теломеры обычно укорачиваются на 30–200 пар оснований в каждом раунде репликации ДНК, но только приблизительно 10 пар оснований исчезает в результате репликации; остальная потеря происходит, вероятно, из-за окислительного повреждения. Авторы [16] утверждают, что теломеры служат индикатором уровня повреждения, вызванного стрессом, а не "счетчиком" митоза. Но принимая во внимание, что окислительный стресс представляет собой общий причинный механизм как укороченного возраста теломер, так и заболеваний, связанных с возрастом, есть основания полагать, что длина теломер служит показателем предыдущего воздействия окислительного стресса, который также повышает риск хронических заболеваний. Таким образом, длина теломер отражает не только время деления клеток, но учитывает более сложный процесс воздействия стресса в клеточной линии, а значит, биологический возраст (рис.2).

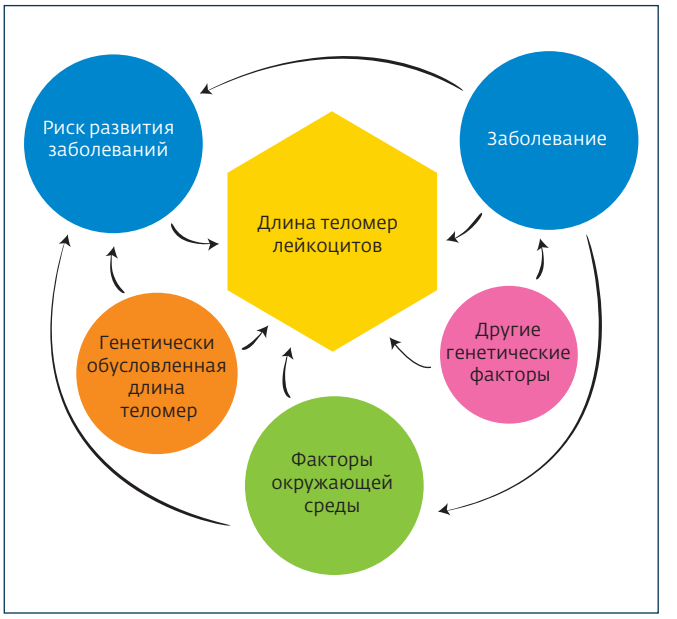


Рис.2. *Динамическая связь длины теломер с состоянием организма и факторами окружающей среды*

В работе [17] исследовалась связь длины теломер лейкоцитов с резистентностью к инсулину, окислительным стрессом и гипертонией и было показано, что длина теломер обратно пропорциональна возрасту, а при введении поправки на возраст – с инсулинорезистентностью, артериальной гипертонией и показателями системного окислительного стресса.

Большое влияние на длину теломер оказывают и наследственные факторы. Анализ длины теломер клеток крови среди 962 человек в возрасте от 0 до 102 лет обнаружил очень значимые корреляции между длиной теломер отца и ребенка, независимо от пола ребенка, и слабые корреляции с длиной теломер матери [18].

Авторы обзоров [19–21] провели анализ большого числа эпидемиологических исследований и пришли к выводу о значимости оценки длины теломер лейкоцитов для оценки возраста, а также риска смерти и развития связанных с возрастом заболеваний. Однако это мнение разделяют не все ученые: в ряде работ говорится об отсутствии корреляции между длиной теломер и старческой уязвимостью, саркопенией и инфарктом миокарда [22–25].

Точность часов на основе длины теломер в целом невысока и уступает точности эпигенетических часов, основанных на профиле метилирования ДНК.

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЧАСЫ

Эпигенетические часы основываются на химических и структурных изменениях, происходящих с течением времени в геноме. Эти изменения не затрагивают последовательность ДНК, но могут влиять на экспрессию генов. В большинстве случаев исследователи сосредотачивают свое внимание на уровне и профиле метилирования CpG-сайтов ДНК. Сайты CpG – это области ДНК, где за цитозиновым нуклеотидом следует гуаниновый нуклеотид в линейной последовательности оснований в направлении 5 '→ 3'. Человеческий геном содержит около 28 миллионов таких сайтов, но их плотность особенно высока в области промотеров генов. Метилирование цитозина в CpG изменяет экспрессию гена, а наличие множественных метилированных сайтов CpG в промотерах вызывает стабильное молчание генов. Возраст сильно влияет на уровни и профиль метилирования ДНК на десятках тысяч сайтов CpG, что послужило основанием для создания ряда эпигенетических часов. На сегодняшний день эпигенетические часы считаются наиболее точным методом определения биологического возраста человека.

Первые такие часы были созданы в 2011 году Стивом Хорватом, который обнаружил, что степень метилирования 88 сайтов CpG в слюне 34 пар близнецов в возрасте от 21 до 55 лет хорошо коррелирует с возрастом. Он также подтвердил линейную корреляцию возраста и сайтов метилирования в промотерах трех генов в выборке из 31 мужчины и 29 женщин в возрасте от 18 до 70 лет. Средняя точность предсказания составила 5,2 года [26]. Два года спустя Хорват опубликовал выдающуюся работу, где предложил эпигенетические часы, основанные на 353 сайтах и работающие на разных

Табл.1. *Сравнительная характеристика 11 эпигенетических часов [30]*

Первый автор, год	Определяемый возраст	Число сайтов CpG	Ткань
Bocklandt S., 2011	Хронологический	1	Слюна
Gatagnani P., 2012	Хронологический	1	Цельная кровь
Horvath S., 2013	Хронологический	353	51 тип ткани
Hannum G., 2013	Хронологический	71	Цельная кровь
Weidner C.I., 2014	Хронологический	3	Цельная кровь
Lin Q., 2016	Смертность	99	Цельная кровь
Vidal-Bralo L., 2013	Хронологический	8	Цельная кровь
Yang Z., 2016	Хронологический	385	Цельная кровь
Zhang Y., 2017	Смертность	10	Цельная кровь
Levine M., 2018	Фенотипический	513	Цельная кровь
Horvath S., 2018	Хронологический	391	Кожа

тканях организма [27]. В том же году результаты исследования более 450 000 CpG-динуклеотидов из клеток крови людей в возрасте от 19 до 101 года опубликовала группа ученых, среди которых первым автором выступал Грегори Ханнум. Используя статистические методы, они выделили 71 сайт CpG для определения биологического возраста крови [28]. Обе группы авторов разрабатывали свои алгоритмы на больших выборках (8000 в первом случае и 656 во втором), охватывающих всю продолжительность взрослой жизни и различные этнические группы населения. Точность определения биологического возраста также была близкой и составляла 3,6 года для часов Хорвата и 4,9 года для часов Ханнума. Выбор сайтов CpG для обоих предикторов был сделан с использованием аналогичной модели регрессии, тем не менее среди сайтов метилирования, предложенных учеными в качестве маркеров возраста, только шесть оказались общими.

Эпигенетические часы первого поколения показали высокую корреляцию с хронологическим возрастом, но практически не отражали влияние физиологической дисрегуляции, например, артериального давления или уровня глюкозы, которые являются результатом не только возрастных молекулярных изменений, но также эндогенных или экзогенных факторов стресса. Поэтому были разработаны новые эпигенетические часы старения, DNAm PhenoAge, которые значительно превосходили часы Хорвата и Ханнума в отношении прогнозов для различных исходов старения, включая смертность от всех причин, раковые заболевания, болезнь Альцгеймера и т.д. Новая методология включала анализ 513 CpG, отбор которых осуществлялся с учетом средневзвешенного значения по 10 клиническим характеристикам: хронологический возраст, уровни альбумина, креатинина, глюкозы и С-реактивного белка, процентное содержание лимфоцитов, средний объем клеток, распределение эритроцитов, уровни щелочной фосфатазы и лейкоцитов [29]. DNAm PhenoAge отражает возраст организма и функциональное состояние многих систем и тканей органов, однако, подобно часам Ханнума, может привести к искаженным оценкам возраста у детей и в тканях, отличных от крови.

За последние годы предложен целый ряд различных эпигенетических часов, основанных на разном наборе сайтов CpG из разных тканей, обладающих разной степенью точности. Некоторые из них приведены в табл.1, а их сравнительная характеристика дана в работе [30].

На рис.3 приводится сравнение трех наиболее известных эпигенетических часов [31]. Часы Хорвата (синяя линия) хорошо коррелируют с хронологическим воз-

VI Междисциплинарная конференция Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии

Подробная информация на сайте: www.mobi-chem.org

В 2020 году регулярная научная конференция МОБИ-ХимФарма традиционно рассмотрит междисциплинарные аспекты создания инновационных лекарственных средств и медицинских изделий, новейшие достижения химических, биологических и медицинских наук, которые находят применение в том числе в фармацевтических и фармакологических исследованиях и разработках. С докладами на МОБИ-ХимФарма выступят известные учёные и исследователи академического и промышленного секторов, а также молодые химики, биологи, медики и фармакологи.

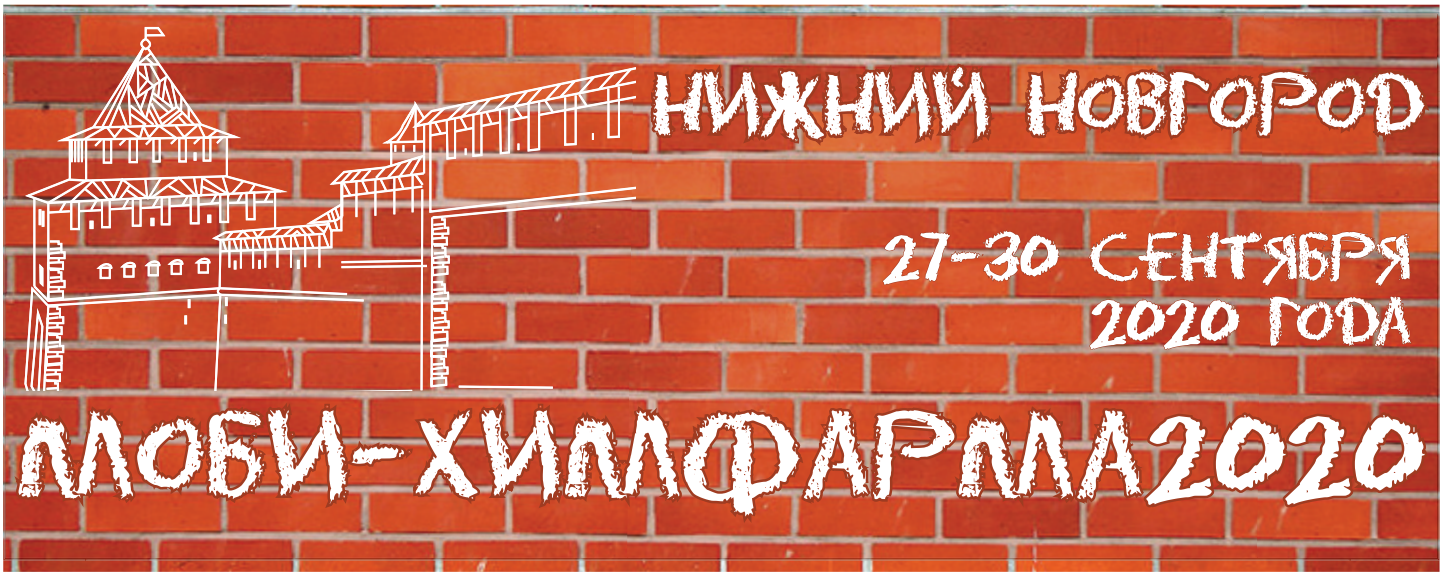
Программа конференции включает в себя пленарные лекции, устные доклады, постерные сессии, а также дискуссии в рамках круглых столов.

Научная программа будет включать следующие темы и секции:

- Биологическая химия
- Медицинская химия
- Молекулярная биология
- Организация и проведение доклинических и клинических исследований кандидатов в лекарственные препараты
- Органическая химия
- Таргетная терапия
- Трансляционные исследования в медицине
- Фармакология
- Фармацевтика

Научные дискуссии пройдут в насыщенной творческой атмосфере на специально подготовленных для этого площадках, оснащенных всем необходимым оборудованием, а также запланировано неформальное общение с представителями различных научных школ и направлений.

Желающие принять участие в конференции или стать информационными партнерами могут получить всю необходимую информацию на нашем сайте, www.mobi-chem.org. *Заявки на участие можно подать в любое удобное для вас время.*



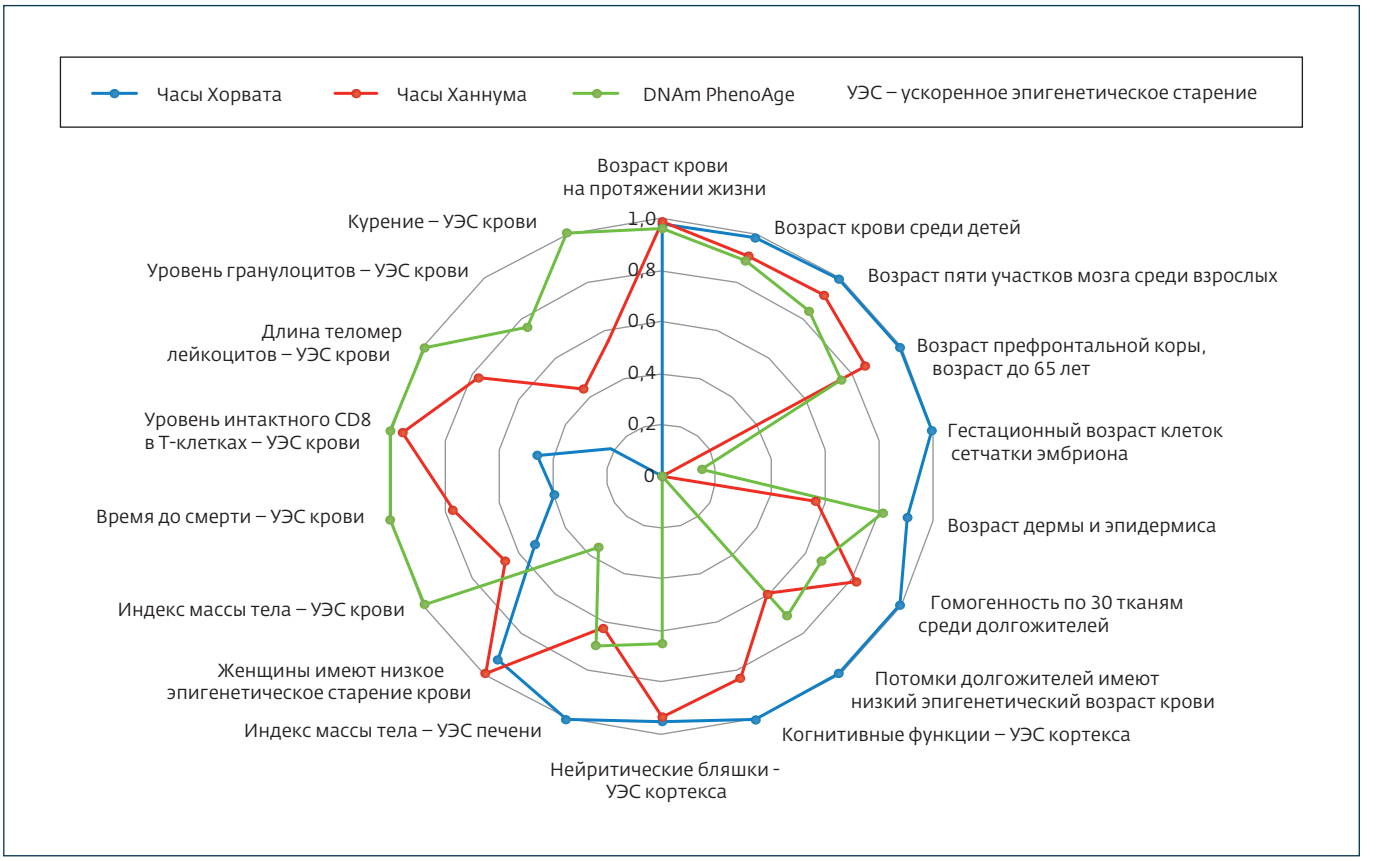


Рис.3. *Сравнение трех эпигенетических часов – корреляция с возрастом и некоторыми факторами старения*

растом по множественным типам тканей, в т.ч. у детей, с гестационным возрастом (днем дифференциации) в моделях культуры нейрональных клеток и отличаются однородностью оценок возраста по тканям. Фенотипическая оценка возраста (зеленая линия) дает достаточно точные прогнозы для времени до смерти, эти часы также чувствительны к факторам, влияющим на старение, например, курение, ожирение.

Оценка эпигенетического возраста имеет важное клиническое значение. Расхождение между эпигенетическим и хронологическим возрастом может отражать вероятность наступления болезни и смерти. Было показано, что некоторые часы предсказывают основные заболевания, связанные со старением, включая ишемическую болезнь сердца, диабет и некоторые формы рака, а также отражают ВИЧ-инфекцию, ожирение, синдром Хатчинсона–Гилфорда и семейное долголетие. Кроме того, опережающее старение головного мозга по сравнению с другими тканями может быть связано с болезнью Альцгеймера и с синдромом Дауна. На эпигенетический возраст также влияют образ жизни, физические нагрузки, качество и продолжительность сна, курение и даже уровень доходов и образования (табл.2 [32]). Последние два фактора влияют на старение опосредованно, определяя уровень стресса, качество питания, образ жизни и т.д.

ТЕЛОМЕРИЧЕСКИЕ ИЛИ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЧАСЫ

Многие исследователи пытались сопоставить теломерические и эпигенетические часы и найти корреляцию между определяемым ими возрастом.

Например, была исследована популяция, включающая 1005 участников с высоким риском сердечно-сосудистых заболеваний. В то время как наблюдалась значимая корреляция между эпигенетическим и хронологическим возрастом, практически отсутствовала взаимосвязь между длиной теломер и эпигенетическим возрастом. Авторы считают, что наблюдаемые несоответствия говорят о том, что длина теломер и уровень метилирования отражают разные аспекты биологического возраста [32]. Сходные закономерности отмечалась и в исследовании [33]: обнаруживалась явная корреляция между эпигенетическим и хронологическим возрастом и незначительная – между двумя моделями оценки возраста.

Табл.2. *Связь факторов, влияющих на старение, с эпигенетическим возрастом [32]*

Факторы	Источник ДНК	Эпигенетические часы
Болезнь Альцгеймера	Префронтальная кора	Часы Хорвата
Амилоидная нагрузка и невропатология	Префронтальная кора	Часы Хорвата
Артериальное давление (систолическое)	Кровь	Часы Ханнума
Ожирение	Печень	Часы Хорвата
Рак	Кровь	Все часы
Сердечно-сосудистые заболевания	Кровь	DNAm PhenoAge
Ишемическая болезнь сердца	Кровь	DNAm PhenoAge
Клеточное старение (онкоген-индуцированное)	Разные	Часы Хорвата
Семейное долголетие	Кровь	Часы Хорвата
Холестерин высокой плотности	Кровь	Часы Ханнума и DNAm PhenoAge
Когнитивная деятельность	Кровь и мозг	Часы Хорватаи DNAm PhenoAge
Уровень С-реактивного белка	Кровь	Все часы
Каротиноиды в питании	Кровь	Часы Ханнума и DNAm PhenoAge
Деменция	Кровь	DNAm PhenoAge
Синдром Дауна	Кровь и мозг	Часы Хорвата
Уровень образования	Кровь	Часы Ханнума и DNAm PhenoAge
Физическая активность	Кровь	Часы Ханнума и DNAm PhenoAge
Старческая астения	Кровь	Часы Хорвата и DNAm PhenoAge
Пол	Кровь	Все часы
Гестационный возраст	Кровь и мозг	Часы Хорвата
Уровень глюкозы	Кровь	Все часы
Болезнь Хантингтона	Кровь и мозг	Часы Хорвата
Уровень дохода	Кровь	Часы Ханнума и DNAm PhenoAge
Уровень инсулина	Кровь	Все часы
Менопауза	Кровь и слюна	Часы Хорвата
Смерть независимо от причины	Кровь	Все часы
Остеоартрит	Хрящи	Часы Хорвата
Болезнь Паркинсона	Кровь	Все часы
Пубертатное развитие	Кровь	Часы Хорвата
Время сна	Кровь	Часы Ханнума
Курение	Кровь	DNAm PhenoAge
Экспрессия TERT	Кровь и фибробласты	Часы Хорвата
Уровень триглицеридов	Кровь	Все часы
Скорость хождения	Кровь	DNAm PhenoAge
Синдром Вернера	Кровь	Часы Ханнума и Хорвата

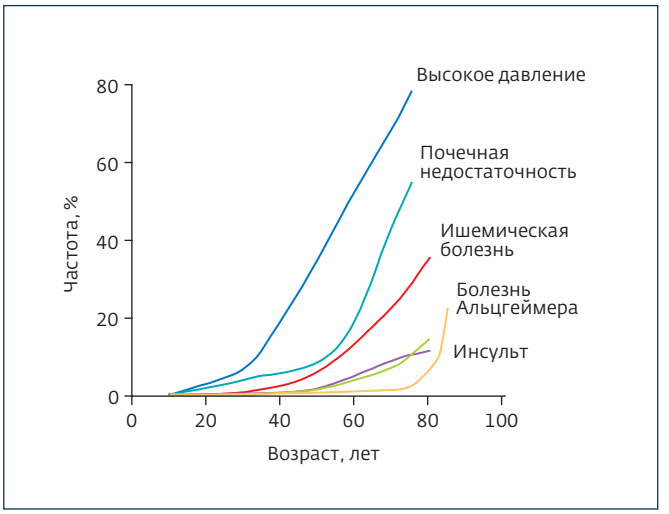


Рис.4. *Возраст – основной фактор риска возникновения болезней*

Авторы сравнивали результаты семи методов оценки биологического старения для 964 людей среднего возраста: длина теломер, 3 вида эпигенетических часов и 3 комплексных биомаркера на основе клинических данных. Вопреки ожиданиям ученых, согласие между различными оценками старения было крайне низким. Незначительными оказались и корреляции между скоростью старения, определяемой исследуемыми часами, и показателями, на которые в основном направлена геропротективная терапия: физическое функционирование, снижение когнитивных функций, внешний вид лица и т.д. По мнению ученых, это означает, что различные методы количественной оценки биологического старения измеряют разные аспекты процесса старения [34].

ЧАСЫ ДЛЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

ВОЗ не рассматривает старение как заболевание, в то же время старение выступает основным фактором возникновения хронических заболеваний и смерти (рис.4). Поэтому перед исследователями стоит важная задача замедления старения и продления периода активной жизни человека.

В последние годы появилась надежда на то, что эту задачу удастся решить. Существуют доказательства того, что некоторые интервенции могут замедлить процесс старения у мышей и даже обратить его вспять. К ним относятся воздействия, связанные с питанием, такие как ограничение калорий и интервальное голодание, применение фармакологических препаратов, например, метформина и рапамицина, и генетические манипуляции, в том числе введение четырех факторов Яманаки. Однако прежде чем испытывать подобные интервенции на человеке, необходимо отработать их применение на модельных животных, например, на мышах. Прямое сопоставление возраста человека и лабораторного животного невозможно, поскольку их продолжительности жизни кардинально различны: средняя продолжительность жизни мыши составляет 2.5 года в лаборатории и около года в дикой природе, а человека – 70 лет. Содержать животных в лаборатории на протяжении всей их жизни для прямого определения ее продолжительности слишком затратно. Поэтому возникла необходимость создания специальных часов для оценки биологического возраста каждого вида животного.

Эпигенетические часы, определяющие возраст мыши, были созданы в 2017 г. группой Вадима Гладышева в результате изучения метилома в крови 141 мыши в возрасте от 3 до 35 месяцев [35]. В каждом из собранных образцов исследователи обнаружили 3,9–13,0 миллионов сайтов CpG, из них более 1,9 миллиона были общими для всех проб. Анализ изменения этих сайтов в зависимости от возраста мыши позволил выделить 90 сайтов CpG, разбросанных по всему геному, профиль метилирования которых характеризует возрастные изменения. Среди этих сайтов были те, степень которых увеличивается со временем, и те, степень метилирования которых уменьшается. На основании полученных данных были построены эпигенетические часы, с высокой точностью предсказывавшие возраст особей контрольной группы (рис.5).

Известно, что ограничение калорий в диете мышей продлевает жизнь животных на 30–40%. Оказалось, что

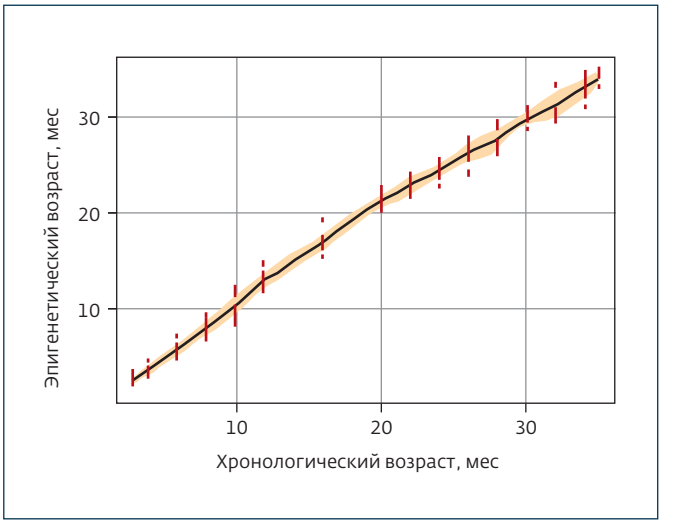


Рис.5. *Точность определения возраста мышей контрольной группы. Каждая точка - одно животное*

Табл.3. *Эпигенетические часы для определения возраста мыши [36]*

Тип ткани	Точность, R2	Диапазон возраста в тренировочном наборе	Число сайтов CpG	Ссылка
Кровь	>0,9008	3–35	90	[35]
Печень	0,91	0,2–26	148	[37]
Множественные ткани	0,7	0,2–9,5	329	[38]
Множественные ткани	0,89	0,2–35	435	[36]

это выражается в показателях их эпигенетического возраста: мыши на низкокалорийной диете имели меньший биологический возраст по сравнению с хронологическим.

Существует еще несколько вариантов эпигенетических часов для мышей, основанных на разных тканях и наборе сайтов метилирования (табл.3) [36].

* * * *

За последние 100 лет средняя продолжительность жизни в мире увеличилась почти в два раза и составила 70 лет, а в некоторых развитых странах она достигает 84 лет. Однако, как считают большинство ученых в мире, это не предел. Благодаря пониманию основных механизмов старения и развитию фармакологических и генных технологий человеческая жизнь может быть существенно продлена. Для успешного исследования новых геропротекторов и способов репрограммирования как отдельных органов, так и целого организма должны существовать надежные методы оценки биологического возраста человека и модельных животных. Наиболее точными и перспективными методами для этого служат разнообразные эпигенетические часы, базирующиеся на изменении профиля метилома. Такие часы содержат как хронологическую, так и биологическую информацию, относительная доля каждой из которых зависит от набора CpG, лежащего в основе часов.

Автор благодарит проф. Гарвардского университета В.Н.Гладышева за неоценимую помощь в подготовке статьи.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Gladyshev V.N.** Aging: progressive decline in fitness due to the rising deleteriome adjusted by genetic, environmental, and stochastic processes // Aging Cell. 2016. V. 15. P. 594–602. Doi: 10.1111/acel.12480.
2. **Gladyshev V.N.** The Origin of Aging: Imperfectness-Driven Non-Random Damage Defines the Aging Process and Control of Lifespan // Trends Genet. 2013. V. 29. No. 9. P. 506–512. doi:10.1016/j.tig.2013.05.004.
3. **Clarke S.** Aging as war between chemical and biochemical processes: Protein methylation and the recognition of age-damaged proteins for repair // Ageing Research Reviews. 2003. V. 2. P. 263–285.
4. **Скулачев В.П.** Что такое "феноптоз" и как с ним бороться? // Биохимия. 2012. Т. 77. № 7. С. 827–846.
5. **Shilovsky G.A.**, **Putyatina T.S.**, **Lysenkov S.N.**, **Ashapkin V.V.**, **Luchkina O.S.**, **Markov A.V.**, **Skulachev V.P.** Is It Possible to Prove the Existence of an Aging Program by Quantitative Analysis of Mortality Dynamics? // Biochemistry (Moscow). 2016. V. 81. No. 12, P. 1461–1476.
6. **López-Otín C.**, **Blasco M.A.**, **Partridge L.**, **Serrano M.**, **Kroemer G.** The Hallmarks of Aging // Cell. 2013. V. 153. No. 6. P. 1194–217. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039.
7. **Galkin F.**, **Mamoshina P.**, **Aliper A.**, **Putin E.**, **Moskalev V.**, **Gladyshev V.N.**, **Zhavoronkov A.**, Human gut microbiome aging clock based on taxonomic profiling and deep learning ISCIENCE. 2020. V. 23. No. 6. P. 101199. doi: https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101199.
8. **Sarkar T.J.**, **Sebastiano V.** Rejuvenation on the Road to Pluripotency // Pluripotent Stem Cells – From the Bench to the Clinic. 2016. Chapter 5. 532 p.
9. http://markage.eu/, https://cordis.europa.eu/project/id/200880/reporting.
10. **Bürkle A.**, **Moreno-Villanueva M.**, **Bernhard J.**, **Blasco M.**, **Zondag G.**, **Hoeijmakers J.H.**, **Toussaint O.**, **Grubeck-Loebenstein B.**, **Mocchegiani E.**, **Collino S.**, **Gonos E.S.**, **Sikora E.**, **Gradinaru D.**, **Dollé M.**, **Salmon M.**, **Kristensen P.**, **Griffiths H.R.**, **Libert C.**, **Grune T.**, **Breusing N.**, **Simm A.**, **Franceschi C.**, **Capri M.**, **Talbot D.**, **Caiafa P.**, **Friguet B.**, **Slagboom P.E.**, **Hervonen A.**, **Hurme M.**, **Aspinall R.** MARK-AGE biomarkers of ageing // Mech Ageing De. v. 2015. . V. 151. P. 2–12. doi: 10.1016/j.mad.2015.03.006.
11. **Moreno-Villanuevaa M.**, **Caprib M.**, **Breusingc N.**, **Siepelmeyerd A.**, **Sevinib F.**, **Ghezzoh A.**, **de Craene A.J.M.**, **Hervonenf A.**, **Hurmef M.**, **Schönd Ch.**, **Grunec T.**, **Franceschib C.**, **Bürklea A.** MARK-AGE standard operating procedures (SOPs): A successful effort // Mech Ageing De. 2015. V. 151. P. 18–25. doi. org/10.1016/j.mad.2015.03.007.
12. **Capria M.**, **Moreno-Villanuevac M.**, **Ceveninia E.**, **Pinia E.**, **Scurtia M.**, **Borellia V.**, **Giustina Palmasb M.**, **Zolid M.**, **Schöne Ch.**, **Siepelmeyere A.**, **Bernhardte J.**, **Fieglf S.**, **Zondagg G.**, **de Craenh A.J.M.**, **Hervoneni A.**, **Hurmei M.**,

Sikoraj E., **Gonosk E.S.**, **Voutetakisk K.**, **Toussaintl O.**, **Debacq-Chainiauxl F.**, **Grubeck-Loebensteinm B.**, **Bürklea A.**, **Franceschia C.** MARKAGE population: From the human model to new insights // Mech Ageing De. 2015. V. 151. P. 13–17.
13. **Moreno-Villanueva M.**, **Bürkle A.** Epigenetic and redox biomarkers: Novel insights from the MARK-AGE study // Mech Ageing De. 2019. V. 177. P. 128-134. doi: 10.1016/j.mad.2018.06.006.
14. **Olovnikov A.M.** A Theory of Marginotomy. The Incomplete Copying of Template Margin in Enzymic Synthesis of Polynucleotides and Biological Significance of the Phenomenon // J Theor Biol. 1973. V. 41. P. 181–90. doi: 10.1016/0022-5193(73)90198-7.
15. **Lindsey J.**, **McGill N.I.**, **Lindsey L.A.**, et al. In vivo loss of telomeric repeats with age in humans // Mutation Res 1991. V. 256. P. 45–8. DOI: 10.1016/0921-8734(91)90032-7.
16. **Mitteldorf J.J.** Telomere Biology: Cancer Firewall or Aging Clock? // Biochemistry (Moscow), 2013. V. 78. No. 9. P. 1054–1060. DOI: 10.1134/S0006297913090125.
17. **Demissie S.**, **Levy D.**; **Benjamin E.J.**, **Cupples L.A.**, **Gardner J.P.**, **Herbert A.**, **Kimura M.**, **Larson M.G.**, **Meigs J.B.**, **Keaney J.F.** et al. Insulin resistance, oxidative stress, hypertension, and leukocyte telomere length in men from the Framingham Heart Study // Aging Cell. 2006. V. 5. P. 325–530.
18. **Nordfjäll K.**, **Svenson U.**, **Norrback K.F.**, **Adolfsson R.**, **Roos G.** Large-scale parent–child comparison confirms a strong paternal influence on telomere length // European Journal of Human Genetics. 2010. V. 18. No. 3. P. 385–389. doi: 10.1038/ejhg.2009.178.
19. **Sanders J.L.**, **Newman A.B.** Telomere Length in Epidemiology: A Biomarker of Aging, Age-Related Disease, Both, or Neither? // Epidemiol Re. 2013. V. 35. P. 112–131.
20. **Fasching C.L.** Telomere length measurement as a clinical biomarker of aging and disease // Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences. 2018. V. 55. No. 7. P. 443–465. DOI: 10.1080/10408363.2018.1504274.
21. **Wang Q.**, **Zhan Y.**, **Pedersen N.L.**, **Fang F.**, **Hägg S.** Telomere Length and All-Cause Mortality: A Meta-analysis // Ageing Res Re. 2018. V. 48. P. 11–20. doi: 10.1016/j.arr.2018.09.002.
22. **Breitling L.P.**, **Saum K.U.**, **Perna L.**, **Schöttker B.**, **Holleczek B.**, **Brenner H.** Frailty Is Associated With the Epigenetic Clock but Not With Telomere Length in a German Cohort // Clin Epigenetics. 2016. V. 8. P. 21.doi: 10.1186/s13148-016-0186-5.
23. **Yu R.**, **Tang N.**, **Leung J.**, **Woo J.** Telomere length is not associated with frailty in older Chinese elderly: Cross-sectional and longitudinal analysis // Mech Ageing De. 2015. V. 152. P. 74–9. doi: 10.1016/j.mad.2015.10.002.
24. **Østhus I.B.**, **Lydersen S.**, **Dalen H.**, **Nauman J.**, **Wisløff U.** Association of Telomere Length with Myocardial Infarction: A Prospective Cohort from the Population Based HUNT 2 Study // Prog Cardiovasc Dis. 2017. V. 59. No. 6. P. 649–655. doi: 10.1016/j.pcad.2017.04.001.
25. **Zee R.Y.**, **Michaud S.E.**, **Germer S.**, **Ridker P.M.**Association of shorter mean telomere length with risk of incident myocardial infarction: a prospective, nested case-control approach // Clin Chim Acta. 2009. V. 403. No. 1–2. P. 139–41. doi: 10.1016/j.cca.2009.02.004.
26. **Bocklandt S.**, **Lin W.**, **Sehl M.E.**, **Sanchez F.J.**, **Sinsheimer J.S.**, **Horvath S.**, **Vilain E.** Epigenetic predictor of age. PLOS ONE. 2011. V. 6. P. e14821. DOI: org/10.1371/journal.pone.0014821.
27. **Horvath S.** DNA methylation age of human tissues and cell types. Genome Biology. 2013. V. 14. P. R115. DOI: org/10.1186/gb-2013-14-10-r115.
28. **Hannum G.**, **Guinney J.**, **Zhao L.**, **Zhang L.**, **Hughes G.**, **Sadda S.**, **Klotzle B.**, **Bibikova M.**, **Fan J.B.**, **Gao Y.**, **Deconde R.**, **Chen M.**, **Rajapakse I.**, **Friend S.**, **Ideker T.**, **Zhang K.** Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. Molecular Cell. 2013. V. 49. P. 359–367. DOI: org/10.1016/j.molcel.2012.10.016.
29. **Levine M.E.**, **Lu A.T.**, **Quach A.**, **Chen B.H.**, **Assimes T.L.**, **Bandinelli S.**, **Hou L.**, **Baccarelli A.A.**, **Stewart J.D.**, **Li Y.**, **Whitsel E.A.**, **Wilson J.G.**, **Reiner A.P.**, **Aviv A.**, **Lohman K.**, **Liu Y.**, **Ferrucci L.**, **Horvath S.** An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan // Aging. 2018. V. 10. P. 573–591. DOI: org/10.18632/aging.101414.
30. **Liu Z.**, **Leung D.**, **Levine M.** Comparative analysis of epigenetic aging clocks from CpG characteristics to functional associations // bioRxiv 512483; doi: https://doi.org/10.1101/512483.
31. **Horvath S.**, **Raj K.** DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing // Nature Reviews Genetics. 2018. V. 19. P. 371–384. DOI: https://doi.org/10.1038/s41576-018-0004-3.
32. **Banszerus V.L.**, **Vetter V.M.**, **Salewsky B.**, **König M.**, **Demuth I.** Exploring the Relationship of Relative Telomere Length and the Epigenetic Clock in the LipidCardio Cohort // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. P. 3032. doi: 10.3390/ijms20123032.
33. **Vetter V.M.**, **Meyer A.**, **Karbasiyan M.**, **Thiessen E.S.**, **Hopfenmüller W.**, **Demuth I.** Epigenetic Clock and Relative Telomere Length Represent Largely Different Aspects of Aging in the Berlin Aging Study II (BASE-II) // J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2019. V. 74. P. 27–32. doi: 10.1093/gerona/gly184.
34. **Belsky D.W.**, **Moffitt T.E.**, **Cohen A.A.**, **Corcoran D.L.**, **Levine M.E.**, **Prinz J.E.**, **Schaefer J.**, **Sugden K.**, **Williams B.**, **Poulton R.**, **Caspi A.** Eleven Telomere, Epigenetic Clock, and Biomarker-Composite Quantifications of Biological Aging: Do They Measure the Same Thing? // Am J Epidemiol. 2018. V. 187. No. 6. P. 1220–1230.
35. **Petkovich D.A.**, **Podolskiy D.I.**, **Lobanov A.V.**, **Lee S.G.**, **Miller R.A.**, **Gladyshev V.N.** Using DNA Methylation Profiling to Evaluate Biological Age and Longevity Interventions // Cell Metabolism. 2017. V. 25. P. 954–960. doi.org/10.1016/j.cmet.2017.03.016.
36. **Meer M.V.**, **Podolskiy D.I.**, **Tyshkovskiy A.**, **Gladyshev V.N.** A whole lifespan mouse multi-tissue DNAmethylation clock // eLife. 2018. V. 7. P. e40675. DOI: https://doi.org/10.7554/eLife.40675.
37. **Wang T.**, **Tsui B.**, **Kreisberg J.F.**, **Robertson N.A.**, **Gross A.M.**, **Yu M.K.**, **Carter H.**, **Brown-Borg H.M.**, **Adams P.D.**, **Ideker T.** Epigenetic aging signatures in mice livers are slowed by dwarfism, calorie restriction and rapamycin treatment // Genome Biology. 2017. V. 18. P. 57. DOI: https://doi.org/10.1186/s13059-017-1186-2.
38. **Stubbs T.M.**, **Bonder M.J.**, **Stark A.K.**, **Krueger F.**, **von Meyenn F.**, **Stegle O.**, **Reik W.**, BI Ageing Clock Team. Multitissue DNA methylation age predictor in mouse // Genome Biology. 2017. V. 18. P. 68. DOI: https://doi.org/10.1186/s13059-017-1203-5.

ЦЕНТР ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫХ ПРОГРАММ ПРОФЕССИЯ

КНИГИ ДЛЯ ПРОФЕССИОНАЛОВ

20 лет на рынке профессиональной литературы

ВНИМАНИЮ СПЕЦИАЛИСТОВ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ!

БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЕ ПРОИЗВОДСТВО. Разработка, проектирование и внедрение технологических процессов

Г. Ягшиш, Э. Линдског, К. Лаки, П. Галлихер

Перевод с англ. (2018, *Biopharmaceutical Processing. Development, Design, and Implementation of Manufacturing Processes*)

Под ред. Ишмухаметова А.А., Пятигорской Н.В.

2020 г., 2 тома, ок. 1500 с., цв.ил., табл., тв. пер., 210×270 мм

Цена – 9 500 р.

В уникальном издании рассматривается весь спектр биотехнологий от создания линии клеток до получения лекарственной субстанции. Описанные в нем методы и стратегии представляют собой сведения, необходимые для всех исследователей, инженеров-технологов и специалистов, занятых в области производства биофармацевтических препаратов и вакцин.

Целостность биопроцесса в конечном итоге определяет качество биотерапевтического препарата, и в настоящей книге подробно рассматриваются все стадии производства, включая все технологии, связанные с очисткой целевого продукта и процессом культивирования. Особое внимание уделено обширным экономическим аспектам с рекомендациями по уменьшению затрат и повышению эффективности. Приведены многочисленные данные, расчеты и руководства, что позволяет использовать издание в качестве незаменимого инструмента для исследователей и управленческих работников биофармацевтической отрасли. В специальных главах рассмотрены аналитические методы и вопросы регулирования.

Российскими авторами, сотрудниками регуляторных и ведущих научных учреждений (Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения (Росздравнадзор), Федерального научного центра исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, кафедры промышленной фармации Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова) добавлены главы, касающиеся аспектов обращения биопрепаратов в Российской Федерации и странах ЕАЭС; рассмотрены актуальные регуляторные требования к фармаконадзору и государственному контролю качества биологических препаратов, освещены принципы производства продукции на первичной культуре клеток, современные подходы к процессу лиофилизации, производство полиомиелитных вакцин, аспекты качества и безопасности биопрепаратов. Широкий круг рассматриваемых в данных главах вопросов делает издание особенно ценным для отечественных разработчиков и производителей биофармацевтических препаратов.

Издание не имеет российских аналогов и адресовано специалистам биофармацевтических производств - исследователям, биотехнологам, биоинженерам, разработчикам вакцин, биосубстанций и препаратов, руководителям и менеджерам, отвечающим за организацию, внедрение, безопасность и контроль качества, органам регулирования и надзора биофармацевтических производств, преподавателям и студентам профильного направления.

Оглавление

1. Здравоохранение и биофармацевтическая промышленность, препараты и процессы
2. Принципы и методы upstream-процессов (культивирования)
3. Процессы, принципы и методы выделения целевого продукта
4. Процессы очистки, принципы и методы
5. Оборудование для биопроизводства
6. Проектирование промышленного процесса
7. Проектирование и эксплуатация производственной площадки
8. Аналитические методы, регуляторные нормативы, аспекты качества и безопасности
9. Финансовое управление и стоимость процесса

www.epcprof.ru - заказ on-line и все книги издательства

по тел./факсу: +7 (812) 313-54-14

почтой по адресу: 190020, Санкт-Петербург, а/я 140

по электронной почте: shop@epcprof.ru, info@epcprof.ru