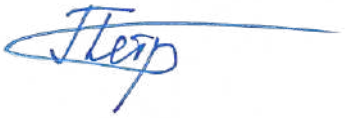
Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования
«НАУЧНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ «СИРИУС»

На правах рукописи



Петрова Виктория Михайловна

Молекулярно-генетические факторы старения на моделях животных

1.5.7. Генетика

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор,
академик РАН
Рогаев Евгений Иванович

Федеральная территория «Сириус» – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ....5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.... 12
1.1. Старение и возраст-зависимые заболевания.... 12
1.2. Эволюционные и молекулярные механизмы старения....15
1.2.1. Эволюционные теории старения.... 16
1.2.2. Молекулярные маркеры старения....18
1.2.3. Основные молекулярные пути, связанные со старением....20
1.3. Старение иммунной системы....23
1.3.1. Старение врожденного иммунитета....23
1.3.2. Старение адаптивного иммунитета....25
1.3.2.1. Инволюция тимуса и Т-клеточный компартмент....25
1.3.2.2. В-клеточный компартмент и гуморальный иммунитет....27
1.4. Модельные организмы в исследованиях старения....30
1.4.1. Классические модельные объекты.... 31
1.4.1.1. Линия крыс OXYS....32
1.4.2. Неклассические модельные объекты....35
1.4.2.1. Старение иммунной системы на модели макак....38
ГЛАВА 2. ГЕНОМНЫЕ ОСОБЕННОСТИ И ЛИНИЕСПЕЦИФИЧНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ КРЫС OXYS.... 41
2.1. Материалы и методы....41
2.1.1. Животные и сбор биоматериала.... 41
2.1.2. Экстракция ДНК....41
2.1.3. Приготовление геномных библиотек и секвенирование.... 42
2.1.4. Анализ данных полногеномного секвенирования.... 42
2.1.5. Генотипирование методом секвенирования по Сэнгеру....45
2.1.6. Оценка генетической дивергенции и анализ частот аллелей и генотипов.... 47
2.2. Результаты и обсуждение.... 47
2.2.1. Анализ однонуклеотидных вариантов (ОНВ) и инсерций/делеций (инделов)..... 50
2.2.1.1. Нарушения липидного обмена....52
2.2.1.2. Патологии мышечной ткани (саркопения и кардиомиопатия)....56
2.2.1.3. Когнитивные нарушения и нейродегенерация.... 59
2.2.1.4. Офтальмологические патологии (ретинопатия и катаракта).... 62
2.2.1.5. Ускоренная инволюция тимуса.... 66
2.2.1.6. Митохондриальная дисфункция.... 73
2.2.1.7. Анализ частот аллелей и генотипов приоритетных вариантов на объединенной выборке крыс....73
2.2.2. Анализ вариаций числа копий геномных регионов (CNV)....75
2.2.2.1. CNV в кодирующих регионах....76
2.2.2.2. CNV в регуляторных областях генома.... 78
2.3. Заключение по главе 2.... 81
ГЛАВА 3. ВОЗРАСТНЫЕ МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ЯВАНСКИХ МАКАК.... 83

3.1. Материалы и методы....83
3.1.1. Животные....83
3.1.2. Сбор биоматериала....84
3.1.3. Экстракция РНК....84
3.1.4. Приготовление траснкриптомных библиотек и секвенирование....85
3.1.5. Анализ данных РНК-секвенирования....86
3.1.6. Анализ состава клеточных популяций в периферической крови....87
3.2. Результаты и обсуждение....89
3.2.1. Анализ транскриптомных профилей костного мозга и периферической крови....89
3.2.2. Общие и тканеспецифичные паттерны экспрессии генов в костном мозге и периферической крови....96
3.2.3. Возрастные изменения количественного состава клеточных популяций в периферической крови....109
3.3. Заключение по главе 3....112
ЗАКЛЮЧЕНИЕ....114
ВЫВОДЫ....115
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ....117
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ....119
ПРИЛОЖЕНИЕ А
Линии крыс из Rat Genome Database, среди которых проводился анализ частот аллелей повреждающих генетических вариантов, найденных у крыс OXYS....136
ПРИЛОЖЕНИЕ Б
Данные ChIP-seq по гистоновой метке H3K27ac, использованные для получения пиков обогащения и анализа их перекрытия с CNV крыс OXYS....138
ПРИЛОЖЕНИЕ В
Анализ эволюционной консервативности аминокислотных позиций с заменами у крыс OXYS среди белков-ортологов грызунов и родственных им видов....139
ПРИЛОЖЕНИЕ Г
Анализ функциональной аннотации генов с повреждающими генетическими вариантами у крыс OXYS по молекулярным путям KEGG и биологическим процессам GO....141
ПРИЛОЖЕНИЕ Д
Анализ частот аллелей повреждающих вариантов крыс OXYS в генах, входящих в пути KEGG и биологические процессы GO из таблиц Г1, Г2, среди 146 линий крыс из RGD...145
ПРИЛОЖЕНИЕ Е
Анализ функциональной аннотации генов с повреждающими генетическими вариантами у крыс OXYS по молекулярным путям KEGG и биологическим процессам GO, связанным с митохондриальными функциями....147
ПРИЛОЖЕНИЕ Ж
Анализ частот аллелей повреждающих вариантов крыс OXYS в генах, входящих в пути KEGG и биологические процессы GO из таблицы Е1, среди 146 линий крыс из RGD....147
ПРИЛОЖЕНИЕ И
Хроматограммы секвенирования по Сэнгеру кандидатных вариантов в исследуемых генах 149
ПРИЛОЖЕНИЕ К
Выборка яванских макак, на которой был выполнен анализ состава клеточных популяций в периферической крови....151

ПРИЛОЖЕНИЕ Л
Основные метрики качества транскриптомных данных..... 153
ПРИЛОЖЕНИЕ М
Результаты анализа дифференциальной экспрессии генов.....154
ПРИЛОЖЕНИЕ Н
Статистические показатели межгруппового сравнения состава клеточных популяций в периферической крови яванских макак.....156

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Глобальное демографическое старение и сопутствующий ему рост частоты ассоциированных с возрастом патологий обусловливают приоритетный характер исследований, направленных на изучение механизмов старения и поиск способов профилактики хронических заболеваний пожилого возраста. Старение представляет собой сложный многофакторный процесс, сопровождающийся общим снижением функций различных систем органов и повышением риска развития возраст-ассоциированных патологий [1], в особенности прогрессирующей дисфункции иммунной системы [2]. Одним из активно развивающихся направлений геронтологии является использование модельных животных, позволяющих изучать различные проявления старения и оценивать эффективность антивозрастных вмешательств [3–5]. В связи с этим фундаментальную и прикладную ценность приобретает комплексное изучение животных с разными фенотипами старения. Использование крыс линии OXYS позволяет исследовать генетически детерминированные факторы преждевременного старения. В то же время модели приматов, как наиболее эволюционно и физиологически близкие к человеку, важны для выявления маркеров естественного старения, которые могут иметь высокий потенциал для использования в практической медицине.

Степень разработанности темы исследования

На сегодняшний день накоплен значительный массив данных, полученных на различных модельных организмах: от низших эукариот до приматов, что позволяет выявлять как универсальные, эволюционно консервативные механизмы старения, так и видоспецифичные особенности [3,4,6].

Наиболее распространенными модельными организмами в геронтологии являются мыши и крысы, поскольку они обладают рядом практических преимуществ: легко содержатся в стандартных виварiях, не требуют сложного ухода, имеют короткий репродуктивный период и жизненный цикл, что позволяет проводить длительные исследования в сжатые сроки. Кроме того, существует большое количество селекционных и генетически модифицированных линий крыс и мышей, моделирующих различные возраст-ассоциированные патологии, что дает возможность исследовать отдельные проявления старения [3].

Одной из таких моделей является линия крыс OXYS с генетически детерминированным фенотипом преждевременного старения. Выведенные в ходе селекции из аутбредных крыс Wistar/Icgn по чувствительности к катарактогенному действию галактозы крысы OXYS,

сцепленно с катарактой, приобрели совокупность возраст-ассоциированных заболеваний. Так, фенотип этих животных характеризуется ранним развитием ретинопатии, ускоренного старения мозга с признаками болезни Альцгеймера, а также кардиомиопатии, саркопении, остеопороза и инволюции тимуса [7,8]. Предыдущие исследования крыс OXYS, направленные на поиск генетических вариантов, ассоциированных с их фенотипом, были проведены на данных транскриптома различных структур мозга [9–12], что ограничивало анализ только экспрессирующимися генами и не позволяло оценить варианты в некодирующих областях генома.

Преимущественное использование в доклинических исследованиях грызунов инбредных линий существенно ограничивает экстраполяцию результатов на гетерогенную популяцию людей [5]. В связи с этим нечеловеческие приматы (НЧП) занимают особое место в геронтологии благодаря эволюционной близости к человеку, схожей физиологии и схожим проявлениям старения, включая возрастные изменения иммунной системы, что делает их релевантной моделью для изучения иммуностарения [13,14]. Возрастные изменения транскриптомного профиля иммунной системы НЧП активно изучаются, однако большинство работ на макаках-резусах (*Macaca mulatta*) [15,16], тибетских макаках (*Macaca thibetana*) [17] и яванских макаках (*Macaca fascicularis*) [18] сфокусировано на анализе периферической крови. В то же время появившиеся за последний год клеточные атласы иммунных органов приматов демонстрируют выраженную возрастную перестройку гемопоэза и изменение клеточного состава непосредственно в костном мозге [19,20]. Несмотря на это, комплексный парный анализ, позволяющий напрямую сопоставить транскриптомные профили иммуностарения в костном мозге и периферической крови у одних и тех же особей *M. fascicularis*, до настоящего времени не проводился.

Цель и задачи исследования

Целью работы является характеристика генетических особенностей крыс линии OXYS и возрастных молекулярно-клеточных изменений иммунной системы яванских макак. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Охарактеризовать геномные особенности крыс линии OXYS в сравнении с контрольными крысами Wistar/Icgn.
2. Идентифицировать генетические варианты, специфичные для крыс линии OXYS.
3. Охарактеризовать возрастные изменения транскриптомных профилей костного мозга и периферической крови яванских макак и выявить тканеспецифичные и общие возрастные паттерны экспрессии генов.

4. Оценить количественный состав и иммунофенотипические характеристики клеточных популяций периферической крови яванских макак двух возрастных групп и сопоставить выявленные различия с транскриптомными изменениями.

Научная новизна

В настоящей работе впервые проведено полногеномное секвенирование крыс линии OXYS с высоким покрытием (>25×) и выполнен сравнительно-геномный анализ относительно контрольной группы крыс Wistar/Icgn, позволивший количественно охарактеризовать генетическую дивергенцию линии и определить частоты аллелей и генотипов приоритетных вариантов на расширенной выборке животных. Сопоставление генетических вариантов крыс OXYS с вариантами в контрольной выборке крыс Wistar/Icgn и 146 лабораторных линий из базы данных Rat Genome Database (RGD) позволило выявить присутствующие в гомозиготном состоянии у крыс OXYS миссенс-варианты и делеции, перекрывающиеся с областями активного хроматина (H3K27ac), в генах, вовлеченных в контроль нейрогенеза, структурно-функциональную организацию мышечной ткани и глаза, клеточный редокс-гомеостаз, аутофагию и иммунную регуляцию.

Впервые проведен парный сравнительный анализ транскриптомных профилей костного мозга и периферической крови одних и тех же особей яванских макак разных возрастных групп. Выявлены общие для обеих тканей возрастные изменения: снижение экспрессии генов, регулирующих врожденный иммунный ответ, хемотаксис, фагоцитоз и распознавание паттернов патогенов, а также повышение экспрессии маркеров цитотоксических лимфоцитов на фоне снижения маркеров наивных Т-клеток при отсутствии активации провоспалительных факторов секреторного фенотипа, ассоциированного со старением (SASP). Установлены тканеспецифичные особенности старения: в периферической крови они затрагивают метаболические процессы и антиген-опосредованный сигналинг, тогда как в костном мозге характеризуются выраженным снижением экспрессии генов организации внеклеточного матрикса, коллагеновых волокон, межклеточной адгезии и биоминерализации.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость работы заключается в расширении фундаментальных представлений о генетических особенностях модельных животных с признаками преждевременного старения, а также о молекулярно-клеточных возрастных изменениях иммунной системы приматов. Сравнительно-геномный анализ крыс линий OXYS и Wistar/Icgn позволил выявить присутствующие в гомозиготном состоянии генетические варианты в генах, участвующих в ключевых процессах поддержания клеточного и тканевого гомеостаза и

регуляции иммунного ответа. Полученные данные создают основу для дальнейшего экспериментального изучения функциональной роли этих вариантов и определения перспективных молекулярных мишеней при разработке геропротекторных препаратов.

Парный анализ транскриптомов костного мозга и периферической крови яванских макак позволил установить общие для обеих тканей и тканеспецифичные возрастные изменения экспрессии генов, соотнести их с возрастными различиями клеточного состава крови и расширить представления об особенностях иммуностарения у нечеловеческих приматов. Выявленные транскриптомные маркеры требуют дальнейшего изучения с целью оценки возможности их применения для мониторинга возрастных изменений иммунной системы, в том числе у человека.

Методология и методы исследования

В работе использованы следующие молекулярно-генетические методы: выделение ДНК и РНК, полимеразная цепная реакция (ПЦР), секвенирование по Сэнгеру, а также приготовление геномных и транскриптомных библиотек для массового параллельного секвенирования на платформе Illumina NovaSeq 6000.

Методология исследования генетических особенностей крыс линии OXYS включала сравнительно-геномный анализ крыс линий OXYS и Wistar/Icgn, оценку распространенности выявленных у крыс OXYS гомозиготных вариантов среди лабораторных линий из базы данных Rat Genome Database (RGD), а также расчет показателей гомо- и гетерозиготности, индекса фиксации Райта – F_{ST}, частот аллелей и генотипов на расширенной выборке животных. Для оценки функциональной значимости миссенс-вариантов использовали анализ эволюционной консервативности аминокислотных позиций на основе множественного выравнивания последовательностей ортологов и паралогов, а также моделирование и сравнение пространственной структуры белков дикого типа и с заменами. Для идентификации делеций, перекрывающихся с предполагаемыми цис-регуляторными элементами, их геномные координаты сопоставляли с областями обогащения гистоновой меткой H3K27ac.

Методология исследования возрастных изменений иммунной системы яванских макак включала анализ дифференциальной экспрессии генов в периферической крови и костном мозге, анализ функционального обогащения биологических процессов и молекулярных путей, а также выявление тканеспецифичных и общих возрастных паттернов экспрессии. Клеточный состав периферической крови оценивали методами гематологического анализа и проточной цитометрии.

Биоинформатический анализ транскриптомных данных, популяционно-генетические расчеты и статистическую обработку результатов проводили в программной среде R v4.5.3.

Положения, выносимые на защиту

1. Крысы линии OXYS характеризуются высокой степенью генетической дивергенции от родительской линии Wistar/Icgn (средневзвешенный F_{ST} = 0,475), повышенной гомозиготностью (85,74%) и снижением отношения гетерозигот к альтернативным гомозиготам (0,30) в геноме, а также гомозиготным носительством линиеспецифичных миссенс-вариантов в генах *Akap6, Nqo2, Cic, Cerkl* и *Notch4.*
2. Возрастные изменения транскриптома костного мозга и периферической крови яванских макак проявляются снижением экспрессии генов, связанных с регуляцией врожденного иммунитета, а также повышением экспрессии генов, ассоциированных с NK- и Т-клеточной цитотоксичностью.
3. Возрастная перестройка клеточного состава периферической крови яванских макак характеризуется снижением численности нейтрофилов и В-клеток, уменьшением доли Т-хелперов и ростом содержания дважды положительных CD4+CD8+ Т-лимфоцитов.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов обеспечивается использованием современных молекулярно-генетических и биоинформатических методов, а также строгих статистических критериев для обработки данных.

Результаты исследования были представлены на научной конференции BGRS/SB-2026 в качестве устного доклада «Генетические основы преждевременного старения: полногеномный анализ крыс OXYS» (Новосибирск, 2026).

По теме научного исследования было опубликовано 3 статьи в изданиях, индексируемых международными базами данных Web of Science и Scopus и рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования России:

1. **Petrova, V.M.**, Simoroz, E.V., Dudko, N.A., Vasilevska, J. Non-Human Primates as a Comprehensive Model for Studying Epigenetic Markers of Aging // Genes. – 2026. – Т. 17, № 8. – С. 905. DOI: 10.3390/genes17080905
2. **Петрова В.М.**, Протасова М.С., Манахов А.Д., Стефанова Н.А., Колосова Н.Г., Рогаев Е.И. Полногеномное исследование генетических детерминант преждевременного старения крыс OXYS // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2026. – Т. 30, № 6. – С. 883–898. DOI: 10.18699/vjgb-26-90
3. **Petrova, V.M.**; Bulgin, D.V.; Radomskaya, E.Y.; Shevelov, V.A.; Zhukova, D.S.; Chzhu, O.P.; Manakhov, A.D.; Popov, A.V.; Rybtsov, S.A. Transcriptomic Markers of Immunosenescence in Cynomolgus Macaques: A Pilot Study // Genes. – 2026. – Т. 17, № 8. – С. 944. DOI: 10.3390/genes17080944

Тезисы докладов в материалах конференций и симпозиумов:

1. Генетические основы преждевременного старения: полногеномный анализ крыс OXYS / Петрова В.М., Протасова М.С., Манахов А.Д., Стефанова Н.А., Колосова Н.Г., Рогаев Е.И. // Сборник тезисов 15-ой международной мультиконференции «Биоинформатика регуляции и структуры геномов/системная биология» BGRS/SB-2026, DOI: 10.18699/bgrs2026-1666. Новосибирск, 2026. Устный доклад.

Личный вклад автора

Все представленные в работе результаты получены автором лично либо при его участии. Автор принимал непосредственное участие в планировании и проведении молекулярно-генетических экспериментов, интерпретации полученных результатов, а также в подготовке публикаций по теме диссертационного исследования. Автором самостоятельно выполнен биоинформатический анализ данных полногеномного секвенирования крыс OXYS и Wistar/Icgn, а также транскриптомов костного мозга и периферической крови яванских макак. Количественную оценку клеточного состава в крови макак на автоматическом гематологическом анализаторе проводили сотрудники Курчатовского центра медицинской приматологии ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт». Проточная цитометрия образцов крови макак была выполнена сотрудниками ресурсного центра клеточных технологий и иммунологии лабораторного комплекса АНОО ВО «Университет «Сириус». Статистическую обработку и визуализацию полученных данных автор выполнял самостоятельно.

Благодарности

Автор выражает благодарность научному руководителю Рогаеву Е. И. и коллегам из направления «Генетика» АНОО ВО «Университета «Сириус» за возможность освоить широкий спектр молекулярно-генетических и биоинформатических методов. Автор также искренне благодарит Колосову Н. Г. и Стефанову Н. А. из Института цитологии и генетики СО РАН за предоставление образцов крыс линий OXYS и Wistar/Icgn, а также сотрудников Курчатовского центра медицинской приматологии за предоставление биоматериала (крови и костного мозга) яванских макак и проведение анализа состава клеточных популяций в крови макак. Автор признателен сотрудникам ресурсного центра клеточных технологий и иммунологии лабораторного комплекса АНОО ВО «Университета «Сириус» за выполнение иммунофенотипирования клеток крови яванских макак и выражает отдельную благодарность Рыбцову С. А. за ценную помощь в интерпретации полученных данных.

Структура и объем работы

Диссертация включает введение, обзор литературы, 2 главы, заключение, выводы, список сокращений и условных обозначений, список литературы и 12 приложений. Работа изложена на 135 страницах машинописного текста и содержит 45 рисунков и 10 таблиц. Список литературы включает 273 источника.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Старение и возраст-зависимые заболевания

Старение – это сложный биологический процесс, характеризующийся постепенным снижением функциональных возможностей организма и повышением риска смертности и развития ряда заболеваний [1]. В отличие от отдельных патологических состояний, старение является системным процессом, затрагивающим различные уровни организации организма: от молекулярных и клеточных механизмов до функционирования целых органов и их систем [21,22].

Одним из главных проявлений старения является увеличение частоты развития возраст-ассоциированных заболеваний. К ним относятся нейродегенеративные и сердечно-сосудистые патологии, злокачественные новообразования, метаболические нарушения, заболевания опорно-двигательной системы, а также дегенеративные изменения органов зрения [22].

Нейродегенеративные заболевания, болезнь Альцгеймера (БА) и болезнь Паркинсона (БП), являются одними из наиболее распространенных возрастных патологий нервной системы. Их развитие сопровождается нарушением функций нейронов и глиальных клеток, синаптической передачи, накоплением поврежденных белков, а также нейровоспалением [23].

БА является наиболее распространенной формой возрастной деменции и характеризуется накоплением внеклеточных β-амилоидных бляшек, внутриклеточных нейрофибриллярных клубков гиперфосфорилированного тау-белка, синаптической дисфункцией и прогрессирующей гибелью нейронов [24]. В зависимости от генетической природы выделяют редкую наследственную (семейную) форму с ранним началом и наиболее распространенную спорадическую форму с поздним началом. Семейная форма БА связана преимущественно с мутациями в генах *APP*, *PSEN1* и *PSEN2*, продукты которых участвуют в процессинге белка-предшественника β-амилоида (АβРР) и формировании β-амилоида (Аβ) [25]. При этом большинство случаев заболевания относятся к поздней спорадической форме, развитие которой обусловлено генетической предрасположенностью, влиянием окружающей среды и возрастными изменениями. Основным генетическим фактором риска спорадической БА у человека является аллель гена *APOE* ε4. Его патогенетическое действие связано с нарушением липидного обмена, транспорта холестерина, клиренса Аβ, а также с активацией нейровоспаления [26].

Для БП характерны прогрессирующая гибелью дофаминергических нейронов преимущественно в компактной части черной субстанции и накопление внутриклеточных

агрегатов α-синуклеина, являющихся основным компонентом телец Леви [27]. В патогенезе заболевания важную роль играют нарушения митохондриальной функции, аутофагии и поддержания протеостаза, сопровождающиеся клеточным стрессом. Генетические факторы также вносят вклад в развитие заболевания. Патогенные варианты в ряде генов, включая *SNCA, LRRK2, PRKN, PINK1* и *PARK7*, связаны с наследственными формами БП, а варианты в гене *GBA* являются одним из наиболее значимых генетических факторов риска [28].

Одним из ранних проявлений сосудистого старения является эндотелиальная дисфункция, которая сопровождается снижением биодоступности оксида азота (NO), ослаблением эндотелий-зависимой вазодилатации и нарастанием окислительного стресса. Структурные изменения сосудистой стенки, включающие снижение содержания эластина и деградацию эластиновых волокон, а также ремоделирование внеклеточного матрикса приводят к повышению жесткости крупных артерий. Данные процессы нарушают регуляцию сосудистого тонуса, ухудшают тканевую перфузию и ведут к развитию возраст-ассоциированных патологий сердечно-сосудистой системы [29].

Существенную роль в патогенезе возрастных сосудистых изменений играет хроническое низкоуровневое воспаление. Дисфункция иммунных и эндотелиальных клеток наряду с нарушением митофагии активирует воспалительные процессы и индуцирует атеросклеротические поражения. Накопление дефектных митохондрий в сосудистой стенке вызывает избыточную продукцию активных форм кислорода (АФК), что дополнительно повреждает эндотелий. При этом повышение уровня провоспалительного цитокина IL-6 в сосудистой стенке может формировать положительную обратную связь с митохондриальной дисфункцией, ускоряя атерогенез. Таким образом, возрастные изменения сосудистой и иммунной систем совместно могут способствовать развитию и прогрессированию атеросклероза [30].

Структурно-функциональные изменения при старении затрагивают также непосредственно миокард. Повышение жесткости артерий увеличивает постнагрузку на левый желудочек, стимулируя его гипертрофию. Накопление фиброзной ткани во внеклеточном матриксе ведет к снижению сократительной способности сердца при физической нагрузке. В результате постепенно развивается деградация кардиальной функции и повышается вероятность возникновения сердечной недостаточности в пожилом возрасте [31].

Старение скелетной мускулатуры выражается в постепенном снижении мышечной массы, силы и выносливости: уменьшается размер и количество миофибрилл, меняется их состав, разрастается жировая и соединительная ткань, угнетается регенерация. Развитие возрастной саркопении сопровождается митохондриальной дисфункцией, повышением окислительного стресса, хроническим низкоуровневым воспалением и дестабилизацией

белкового гомеостаза. Дополнительный вклад могут вносить дефекты иннервации и деградация нейромышечных соединений [32].

С возрастом нарушается баланс процессов обновления костной ткани: снижается способность остеобластов к ее формированию, тогда как резорбция, осуществляемая остеокластами, относительно усиливается. Структурная перестройка костной ткани и изменения клеточного состава костного мозга сопряжены с увеличением количества клеток с признаками клеточного старения. В костномозговом микроокружении увеличивается доля мезенхимальных клеток, дифференцирующихся по адипогенному пути, и развивается воспаление. Совокупность этих процессов приводит к постепенной потере костной массы и нарушению микроархитектуры кости, что повышает ее хрупкость [33].

Основными причинами повышенного канцерогенеза в пожилом возрасте являются накопление повреждений генома и соматических мутаций, эпигенетические перестройки, а также снижение эффективности механизмов поддержания геномной стабильности. Возрастные изменения генетического и эпигенетического ландшафта могут затрагивать гены, регулирующие клеточный цикл, репарацию ДНК и апоптоз. В частности, нарушение функций ключевых регуляторов клеточного цикла и противоопухолевой защиты (*TP53, p16, p21, RB1* и др.) приводит к ослаблению контроля клеточной пролиферации. Реорганизация тканевого микроокружения, хроническое воспаление и спад эффективности иммунного надзора дополнительно способствуют онкотрансформации и прогрессированию опухолевых процессов [34].

С возрастом дестабилизируется углеводный и липидный обмен, нарушается метаболическая функция жировой ткани, что ведет к снижению чувствительности к инсулину и развитию инсулинорезистентности [35,36]. В сочетании с дисфункцией β-клеток поджелудочной железы это существенно повышает риск возникновения сахарного диабета 2 типа. Расстройства липидного метаболизма также способствуют эктопическому накоплению жиров в некостных тканях, в частности, избыточному отложению липидов в гепатоцитах и последующему развитию неалкогольной жировой болезни печени [35].

К возраст-ассоциированным заболеваниям органов зрения относятся возрастная макулярная дегенерация, катаракта и глаукома. Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) характеризуется прогрессирующим повреждением ретинального пигментного эпителия (РПЭ) и фоторецепторов в области макулы, что может приводить к выраженной потере центрального зрения [37]. Одним из ранних морфологических признаков заболевания является образование друз – внеклеточных отложений между РПЭ и мембраной Бруха. Их накопление обусловлено, в первую очередь, нарушением способности клеток РПЭ к фагоцитозу и лизосомной деградации наружных сегментов фоторецепторов [38].

Катаракта характеризуется постепенным снижением прозрачности хрусталика, связанным со структурными и функциональными изменениями его белков. Нарушение протеостаза и избыток дефектных макромолекул являются важными механизмами формирования возрастной (сенильной) катаракты. С возрастом в хрусталике происходит агрегация окислительно поврежденных и других модифицированных белков-кристаллинов, а также снижается эффективность механизмов поддержания их стабильности и растворимости [39,40].

В целом системное старение сопровождается постепенным снижением функциональных резервов организма и повышением риска возникновения широкого спектра возраст-зависимых патологий. Несмотря на различия в клинических проявлениях и локализации патологических процессов, их патогенез тесно связан с прогрессирующим увеличением молекулярных и клеточных повреждений.

1.2. Эволюционные и молекулярные механизмы старения

Существующие представления о природе старения можно разделить на концепции, связывающие возрастные изменения с накоплением повреждений, и подходы, рассматривающие старение как генетическую программу, которую можно отрегулировать. Согласно теориям накопления повреждений, возрастные изменения являются результатом постепенного накопления молекулярных и клеточных повреждений, возникающих вследствие ограниченной эффективности механизмов поддержания и восстановления клеточного гомеостаза. Альтернативные подходы предполагают наличие генетических программ, которые регулируют старение и могут иметь адаптивное значение [41].

Эволюционные теории направлены на объяснение причин возникновения и сохранения старения в популяциях, тогда как молекулярно-клеточные концепции раскрывают конкретные механизмы возрастных изменений. Эти подходы дополняют друг друга, поскольку эволюционные процессы задают границы для систем поддержания и восстановления организма, внутри которых старение протекает на молекулярном и клеточном уровнях [42].

1.2.1. Эволюционные теории старения

Первые эволюционные представления о старении включали гипотезу его адаптивной, генетически запрограммированной природы. Август Вейсман предположил, что ограничение продолжительности жизни и естественная смерть многоклеточных организмов могли представлять собой эволюционно сформировавшуюся адаптацию. Он рассматривал ограничение продолжительности жизни как результат эволюционного процесса и связывал возникновение смерти с определенными преимуществами для вида [43]. Впоследствии данная концепция перестала рассматриваться как основное объяснение эволюции старения, поскольку она основывалась на предположении о пользе старения для вида и, соответственно, опиралась преимущественно на механизм группового отбора, который обычно слабее отбора на уровне отдельных особей [44].

Другое направление эволюционных представлений о старении получило развитие в работах Рональда Фишера и Джона Холдейна, заложивших популяционно-генетические основы представлений о возрастном снижении силы естественного отбора. Естественный отбор оказывает более сильное давление на признаки, определяющие выживание и репродукцию в раннем возрасте, чем на признаки, проявляющиеся позднее [45,46]. Впоследствии эта концепция получила математическую формализацию в работе Уильяма Гамильтона [47].

Одним из факторов, определяющих возрастную динамику силы естественного отбора, является смертность от внешних причин, включая заболевания, хищников и несчастные случаи. Такие факторы снижают вероятность доживания особей до позднего возраста, вследствие чего генетические варианты, влияющие на приспособленность в позднем возрасте, подвергаются ослабленному давлению естественного отбора: часть их носителей погибает от внешних причин до того, как проявятся соответствующие фенотипические признаки. В рамках популяционно-генетических теорий старения выделяют два механизма, связанных с ослаблением отбора с возрастом. Первый, накопление мутаций, был предложен Питером Медаваром и предполагает, что “вредные” мутации с поздним фенотипическим проявлением могут накапливаться в популяции с повышенной частотой вследствие ослабления естественного отбора [48]. Второй механизм, антагонистическая плейотропия, был сформулирован Джорджем Уильямсом и утверждает, что отбор может благоприятствовать аллелям, повышающим приспособленность на ранних этапах жизни, даже если они оказывают отрицательное действие в более позднем возрасте, когда давление отбора ослаблено [49].

Одним из следствий классических эволюционных моделей является предположение о влиянии внешней смертности на эволюцию темпов старения: при высокой внешней смертности

ожидается ослабление отбора против поздно проявляющихся неблагоприятных эффектов и, соответственно, более быстрое старение. Это предсказание получило экспериментальную поддержку в исследованиях плодовых мушек [50]. Вместе с тем современные исследования показывают, что влияние внешней смертности на эволюцию старения определяется не только ее общей интенсивностью, но и возрастной структурой [51].

Дальнейшим развитием представлений об эволюционных компромиссах стала теория “одноразовой сомы”, предложенная Томасом Кирквудом. Согласно этой концепции, ограниченность ресурсов организма обусловливает необходимость их распределения между поддержанием и восстановлением соматических тканей, ростом и размножением. Поскольку поддержание соматических тканей на уровне, необходимом для предотвращения возрастных изменений, требует значительных затрат, естественный отбор формирует оптимальный уровень затрат на механизмы поддержания и репарации. В результате их эффективность оказывается ограниченной, что создает условия для постепенного накопления повреждений и развития старения [52].

Классические эволюционные теории рассматривают старение преимущественно как следствие ослабления естественного отбора в позднем возрасте или результат эволюционных компромиссов между поддержанием организма и воспроизводством. Вместе с тем возможность адаптивного происхождения старения продолжает обсуждаться. Одну из современных гипотез такого рода выдвинули Петр Лидский и Рауль Андино. В своей модели контроля патогенов они предполагают, что защита от инфекционных заболеваний могла создавать отбор в пользу ограничения продолжительности жизни. С возрастом повышается вероятность накопления хронических инфекций, а ограничение продолжительности жизни инфицированных особей потенциально может снижать передачу патогенов другим членам родственной группы, тем самым повышая их совокупную приспособленность. Таким образом, в рамках данной гипотезы старение рассматривается как потенциально адаптивный процесс, связанный с ограничением распространения инфекционных заболеваний [53].

Классические популяционно-генетические теории связывают старение преимущественно с ослаблением естественного отбора в позднем возрасте, тогда как некоторые современные гипотезы допускают возможность адаптивного значения отдельных механизмов старения. Однако, несмотря на различия в темпах и проявлениях старения между видами, оно сопровождается рядом сходных молекулярных и клеточных изменений [54].

1.2.2. Молекулярные маркеры старения

Молекулярные маркеры старения – это совокупность признаков на уровне генома, эпигенома и клеточных процессов, которые изменяются с возрастом. Их изучение позволяет выявлять консервативные механизмы старения и оценивать степень выраженности возрастных изменений. Современные представления о молекулярной природе старения основаны на концепции взаимосвязанных признаков, включающих дестабилизацию генома, эпигенетические перестройки, потерю протеостаза, митохондриальную дисфункцию и другие процессы, ведущие к деградации клеточного гомеостаза [54,55].

Геномная нестабильность, обусловленная постепенным накоплением повреждений ДНК и прогрессирующим снижением эффективности систем репарации, является одним из фундаментальных признаков старения [54]. ДНК постоянно подвергается воздействию как эндогенных факторов (прежде всего, АФК – продуктов клеточного метаболизма), так и экзогенных генотоксических факторов. В результате в ДНК непрерывно возникают модификации азотистых оснований, одно- и двунитевые разрывы, а также межцепочечные сшивки [56]. Возрастное нарушение баланса между возникновением этих повреждений и скоростью их устранения приводит к их накоплению в генетическом материале. Хроническая активация ответа на генотоксический стресс инициирует остановку клеточного цикла, запуск апоптоза или индукцию клеточного старения (сенесценции) [56]. Вследствие репликативного укорочения теломер и снижения эффективности механизмов их защиты происходит утрата Т-петли, что воспринимается клеткой как двунитевой разрыв ДНК и служит провоцирующим фактором необратимого клеточного старения [57].

Эпигенетические перестройки включают метилирование ДНК, посттрансляционные модификации гистонов и реструктуризацию хроматина. С возрастом происходит глобальное снижение уровня метилирования ДНК, которое сопровождается потерей репрессивных меток H3K9me3 и H3K27me3 и постепенной деконденсацией гетерохроматина [58]. Дестабилизация взаимодействия хроматина с ядерной ламиной связана со снижением уровня белка Lamin B1 и дезорганизацией ламина-ассоциированных доменов. Кроме того, при старении нарушается пространственная организация генома: структура топологически ассоциированных доменов, стабильность их границ и взаимодействия между удаленными участками генома [59].

На основе закономерных возраст-ассоциированных изменений метилирования ДНК были разработаны эпигенетические часы – математические модели, позволяющие оценивать возраст по профилю метилирования определенных CpG-позиций. Одной из первых и наиболее известных моделей стала пан-тканевая модель Стива Хорвата, основанная на анализе 353

CpG-позиций и применимая к широкому спектру тканей и типов клеток [60]. В дальнейшем были разработаны модели, ориентированные не только на оценку хронологического возраста, но и на характеристики биологического старения и связанные с ним показатели здоровья. Разница между эпигенетическим и хронологическим возрастом, называемая эпигенетическим возрастным ускорением, рассматривается как показатель индивидуальных различий в темпе старения [61,62].

Клеточная сенесценция – один из фундаментальных признаков старения, представляющий собой состояние устойчивой остановки клеточного цикла в ответ на различные виды клеточного стресса, включая повреждение ДНК и репликативное истощение. Одними из основных молекулярных регуляторов сенесцентного состояния служат ингибиторы циклин-зависимых киназ p16INK4a и p21CIP1, активация которых способствует устойчивой остановке клеточного цикла. Для сенесцентных клеток также характерно повышение уровня ассоциированной со старением лизосомальной β-галактозидазы (SA-β-gal) и формирование секреторного фенотипа, ассоциированного со старением (SASP) [63]. С возрастом доля сенесцентных клеток в различных тканях в целом увеличивается, однако динамика их накопления и совокупность биомаркеров обладают выраженной тканевой и клеточной специфичностью [64].

Поддержание протеостаза обеспечивает стабильность клеточного протеома за счет скоординированного функционирования систем трансляции, фолдинга, контроля качества и деградации белков. В процессе старения эффективность этих регуляторных систем постепенно снижается, что приводит к накоплению неправильно свернутых белков и формированию белковых агрегатов. Ключевую роль в потере протеостаза играет дисфункция шаперонового аппарата, а также снижение эффективности двух основных систем деградации белков – убиквитин-протеасомной системы и аутофагии. Нарушение протеостаза является одним из фундаментальных признаков старения и способствует развитию широкого спектра возраст-ассоциированных патологий (например, БА, БП и катаракты) [65].

Митохондриальная дисфункция тесно связана с недостаточностью митофагии и нарушениями энергетического обмена клетки. С возрастом снижается эффективность окислительного фосфорилирования, нарушается работа дыхательной цепи и перестраивается метаболизм, что приводит к падению продукции АТФ. Накопление повреждений в мтДНК и сбои в регуляции биогенеза органелл ограничивают способность клеток поддерживать гомеостаз [66].

Таким образом, молекулярные маркеры старения отражают взаимосвязанные изменения на геномном, эпигеномном и клеточном уровнях. Эти нарушения формируются не

изолированно, а связаны с активностью сигнальных путей, регулирующих метаболизм, обновление клеток и адаптации к стрессу.

1.2.3. Основные молекулярные пути, связанные со старением

К ключевым молекулярным каскадам старения относятся сигнальные пути mTOR, AMPK и IIS (сигнальный путь инсулина/инсулиноподобного фактора роста 1, IGF-1). Благодаря высокой эволюционной консервативности эти сигнальные пути считаются фундаментальными регуляторами продолжительности жизни и перспективными мишенями для антивозрастной терапии [67].

Сигнальный путь инсулина/IGF-1 (IIS) регулирует клеточный метаболизм, рост, развитие и поддержание тканей в зависимости от доступности питательных веществ. Активация рецепторов инсулина и IGF-1 приводит к запуску внутриклеточного сигнального каскада с участием PI3K и AKT. Повышение активности IIS ингибирует транскрипционные факторы семейства FOXO, участвующие в регуляции стресс-ответа, антиоксидантной защиты и аутофагии. Подавление IIS, напротив, способствует активации FOXO-зависимой транскрипции и связано с увеличением продолжительности жизни у различных модельных организмов. Так, изменение активности IIS влияет на баланс между ростом и защитными ресурсами клетки и является одним из эволюционно консервативных механизмов регуляции старения [67,68].

В состав сигнального пути мишени рапамицина млекопитающих (mTOR) входят два комплекса – mTORC1 и mTORC2, которые участвуют в регуляции белкового синтеза, клеточного роста, метаболизма и выживания клеток. В контексте старения особое значение имеет комплекс mTORC1, активация которого стимулирует анаболические процессы и подавляет аутофагию. Хроническое повышение активности mTORC1 нарушает баланс между синтезом и утилизацией клеточных компонентов. Подавление mTORC1, в том числе через ограничение калорийности питания или фармакологические воздействия, приводит к увеличению продолжительности жизни и улучшению ряда возраст-ассоциированных показателей у модельных организмов [67,69].

Повышение соотношения АМФ/АТФ активирует сигнального пути АМФ-активируемой протеинкиназы (AMPK), переключая клеточный метаболизм в сторону процессов, обеспечивающих восстановление энергетического баланса, подавляя энергозатратные анаболические процессы. AMPK взаимодействует с другими регуляторными системами. Например, подавляет mTORC1, стимулируя аутофагию и антиоксидантную защиту клетки. С

возрастом дисрегуляция AMPK может ограничивать адаптацию клеток к энергетическому стрессу и приводить к дестабилизации обмена веществ. Активация AMPK рассматривается как потенциальный механизм, посредством которого ограничение калорийности и другие метаболические воздействия могут положительно влиять на продолжительность жизни [67,70].

Сигнальные пути IIS, mTOR и AMPK образуют взаимосвязанную систему контроля клеточного метаболизма, роста и поддержания гомеостаза, реагирующую на доступность питательных веществ и энергетическое состояние организма (Рисунок 1.1). При достаточном поступлении питательных веществ связывание инсулина или IGF-1 со своими рецепторами на клеточной мембране активирует каскад PI3K и протеинкиназу AKT. Активированная AKT выполняет двойную регуляторную функцию: она стимулирует белковый комплекс mTORC1, запускающий энергозатратные процессы синтеза белка, липидов, нуклеотидов и клеточную пролиферацию, и одновременно фосфорилирует транскрипционный фактор FOXO, что приводит к его исключению из ядра и блокированию экспрессии генов, отвечающих за адаптацию к стрессу. Дополнительно поступающие в клетку питательные вещества служат независимым стимулом для активации mTORC1. В этих условиях процессы клеточного очищения и защиты, такие как аутофагия и антиоксидантный ответ, подавляются.

Напротив, при снижении доступности энергии и росте соотношения АМФ/АТФ активируется AMPK, которая перестраивает метаболизм на режим энергосбережения, напрямую ингибируя комплекс mTORC1 и останавливая синтез макромолекул, параллельно стимулируя катаболические процессы – гликолиз и митохондриальное окисление жирных кислот для восстановления уровня АТФ. Одновременно с этим AMPK фосфорилирует FOXO, индуцируя его перемещение в ядро, где он запускает экспрессию генов антиоксидантной защиты, репарации ДНК и стресс-ответа. Подавление mTORC1 в сочетании с активацией AMPK и FOXO обеспечивает скоординированную утилизацию поврежденных органелл с помощью аутофагии. В итоге взаимодействие между этими путями определяет выбор клетки между ростом и поддержанием жизнеспособности в меняющихся условиях среды.

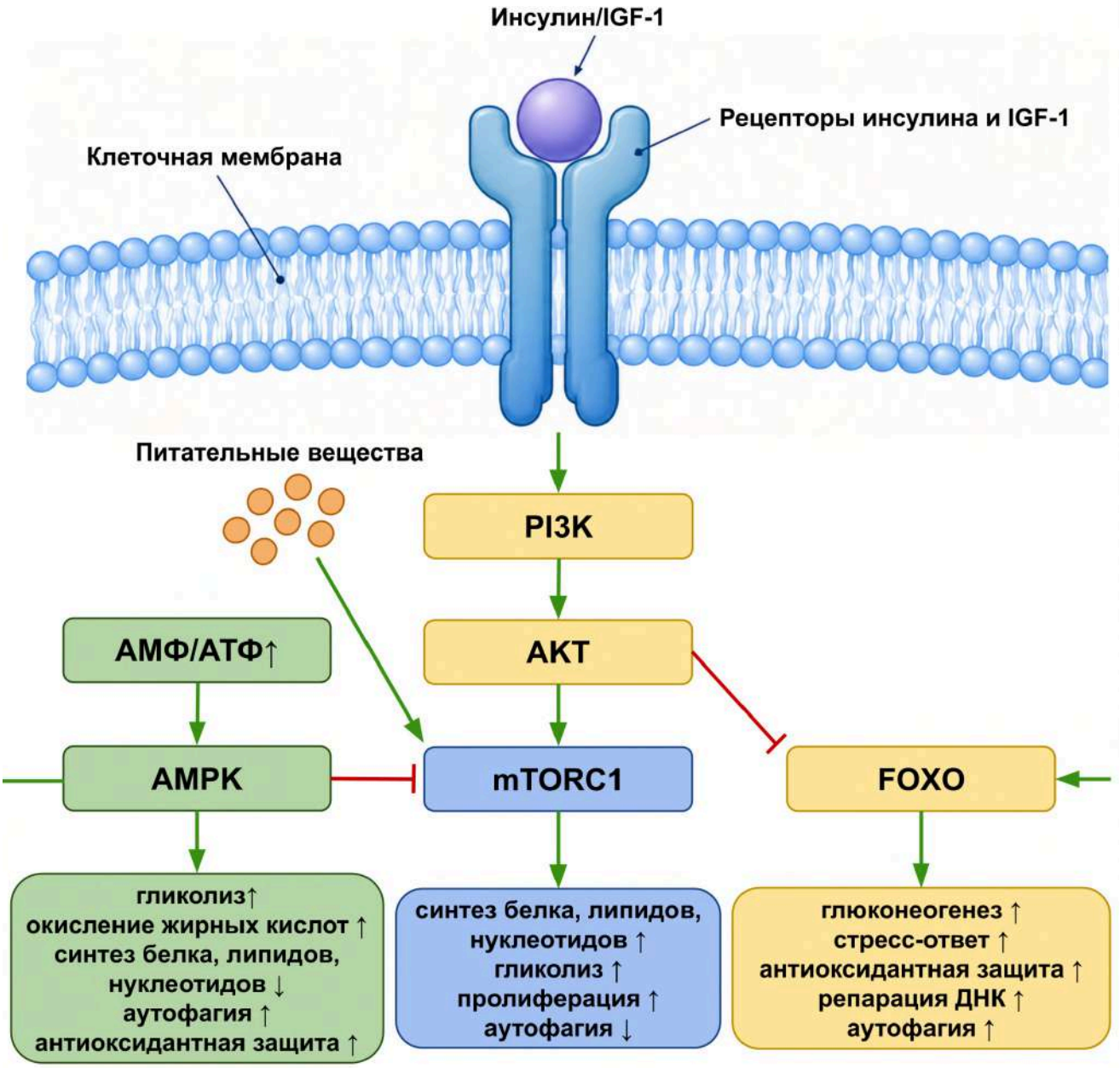


Рисунок 1.1 – Упрощенная схема взаимодействия сигнальных путей IIS (желтый), mTOR (синий) и AMPK (зеленый) в регуляции клеточного метаболизма

Одним из наиболее изученных воздействий, модифицирующих работу этих регуляторных систем, является ограничение калорийности питания – снижение потребления энергии при условии обеспечения организма необходимыми нутриентами. На различных модельных организмах показано, что данный подход увеличивает продолжительность жизни и улучшает ряд возраст-зависимых показателей. Предполагается, что ключевые эффекты такой диеты обусловлены согласованным изменением активности путей IIS, mTOR и AMPK [71].

1.3. Старение иммунной системы

Старение иммунной системы включает взаимосвязанные изменения гемопоэза, состава и функционального состояния популяций иммунных клеток. Эти процессы затрагивают как врожденный, так и адаптивный иммунитет, а также микроокружение костного мозга и тимуса, которые обеспечивают образование, дифференцировку и поддержание иммунных клеток [72].

1.3.1. Старение врожденного иммунитета

Старение гемопоэтической системы затрагивает как сами гемопоэтические стволовые клетки (ГСК), так и их нишу в костном мозге. ГСК теряют регенеративный и функциональный потенциал и способность к самообновлению [73]. Поскольку ГСК дают начало всем линиям клеток крови, изменения их свойств напрямую влияют на состав и функции зрелых иммунных популяций. С возрастом меняется клональный состав пула ГСК: происходит смещение их дифференцировочных программ в сторону миелоидной специализации. На молекулярном уровне миелоидный сдвиг сопровождается активацией транскрипционных программ, связанных с усилением воспалительного ответа и стрессовых реакций, при одновременном снижении лимфоидного потенциала [74]. Микроокружение костного мозга контролирует состояние ГСК. Старение компонентов гемопоэтической ниши сопровождается снижением продукции факторов, поддерживающих гомеостаз ГСК, включая CXCL12 и SCF, а также повышением уровня провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-1β и TNF-α) [75].

Возрастная дисрегуляция врожденного иммунитета имеет системный характер. Анализ цельной крови здоровых доноров разных возрастных групп после стимуляции агонистами Toll-подобных рецепторов 2 и 4 (TLR2 и TLR4) показал, что с возрастом повышается базовая продукция провоспалительного цитокина TNF-α, тогда как способность клеток отвечать на патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMP) снижается. Наиболее выраженное ослабление выработки TNF-α наблюдалось в ответ на липополисахарид, липотейхоевую кислоту и Pam3CysK. При этом уровень мРНК *TLR2*, *TLR4* и адаптера *MyD88* с возрастом не изменялся, что указывает на нарушение регуляции TLR-сигналинга на пострецепторном или внутриклеточном уровне [76].

Моноциты и тканевые макрофаги обеспечивают фагоцитоз, утилизацию поврежденного клеточного материала и координацию воспалительного ответа. При старении в крови

увеличивается доля промежуточных и неклассических моноцитов, экспрессирующих маркер CD16, при этом их способность к поглощению чужеродных агентов падает [77]. Стимуляция моноцитов пожилых людей агонистом TLR1/2 Pam3CSK4 индуцирует значительно меньшую продукцию TNF-α и IL-6, чем у молодых [78]. Параллельно у тканевых макрофагов может происходить смещение функционального профиля в сторону провоспалительной активности. В частности, у мышей показан возрастной сдвиг поляризации макрофагов мышечной оболочки кишечника от противовоспалительного фенотипа M2 к провоспалительному M1 [79].

Нейтрофилы – это наиболее многочисленная популяция циркулирующих миелоидных клеток, обеспечивающая быстрый ответ на инфекции и повреждения. С возрастом снижается точность их миграции в очаг воспаления, а также затрудняется выход из воспаленной ткани [80]. У здоровых пожилых людей показано ухудшение хемотаксиса при сохранении хемокинеза. Этот сбой ассоциирован с повышенной конститутивной активностью PI3K. Ингибирование PI3Kγ или PI3Kδ восстанавливало точность миграции нейтрофилов, полученных от пожилых доноров [81]. Процессы фагоцитоза и внутриклеточного уничтожения микроорганизмов также претерпевают изменения. У пожилых людей наблюдалось снижение поглощения опсонизированной *Escherichia coli* и падение продукции АФК после антигенной стимуляции [82]. Несмотря на ослабление ряда функциональных характеристик, у нейтрофилов при старении повышается базальный уровень активации, что поддерживает хронические воспалительные реакции и вызывает повреждение собственных тканей организма [80].

Естественные киллеры (NK-клетки) представляют собой популяцию врожденных лимфоцитов, обеспечивающих цитотоксический ответ против инфицированных и опухолевых клеток. При старении происходит перераспределение субпопуляций NK-клеток: увеличивается доля более зрелых клеток с низкой экспрессией CD56 (CD56-dim), тогда как доля клеток с высокой экспрессией CD56 (CD56-bright) уменьшается. Одновременно возрастает доля CD57+ клеток, характеризующихся высокой степенью дифференцировки и низким пролиферативным потенциалом, при сохранении высокой CD16-зависимой цитотоксической активности [83]. У пожилых доноров отмечалось падение экспрессии некоторых активирующих рецепторов NK-клеток, включая NKp30, NKp46 и DNAM-1. При этом снижение уровня NKp30 во многом предопределено хронической цитомегаловирусной инфекцией, а DNAM-1 напрямую связано с со старением организма [84].

Дендритные клетки обеспечивают презентацию антигенов для последующего запуска адаптивного иммунитета. У человека при старении описаны снижение эффективности захвата и процессинга антигенов, сбои в миграции, а также ослабление способности инициировать Т-клеточный ответ. Кроме того, изменяется профиль продукции цитокинов и других иммунорегуляторных медиаторов, что может влиять на последующую активацию клеток

адаптивного иммунитета. Для плазмоцитоидных дендритных клеток (pDC) человека отмечено падение выработки IFN-α в ответ на стимуляцию, что указывает на ослабление их противовирусной функции [85]. У старых мышей сокращалась численность и функциональная активность мигрирующих конвенциональных дендритных клеток 2-го типа (cDC2), что сопровождалось уменьшением их выхода в лимфатические узлы и ухудшением ответа на вакцинацию [86].

Таким образом, старение врожденного иммунитета характеризуется изменением гемопоэза и функционального состояния зрелых миелоидных и врожденных лимфоидных клеток. Наряду с нарушением отдельных механизмов распознавания, миграции и эффекторного ответа возрастает базальная провоспалительная активность клеток, что способствует формированию хронического низкоуровневого воспаления [87].

1.3.2. Старение адаптивного иммунитета

1.3.2.1. Инволюция тимуса и Т-клеточный компартмент

Тимус обеспечивает дифференцировку предшественников Т-лимфоцитов, мигрирующих из костного мозга, в функционально зрелые Т-клетки. После миграции в тимус предшественники проходят последовательные стадии развития в кортикальном и медуллярном компартментах, где их созревание определяется взаимодействием с тимическими эпителиальными клетками (ТЭК) и другими компонентами стромального микроокружения. В коре тимуса развивающиеся тимоциты проходят позитивную селекцию, в ходе которой сохраняются тимоциты, способные распознавать собственные молекулы МНС, тогда как в медуллярной зоне при негативной селекции удаляются клетки с высокой аффинностью к аутоантигенам. В результате формируется пул иммунокомпетентных и толерантных к собственным антигенам наивных Т-лимфоцитов, которые покидают тимус и пополняют периферический пул Т-клеток. Эффективность тимопоэза зависит как от притока предшественников, так и от сохранности эпителиального микроокружения, обеспечивающего их селекцию [88–90].

Функциональная активность тимуса начинает постепенно угасать после достижения максимума в пубертатном периоде. Возрастная инволюция сопровождается уменьшением массы, сокращением объема функциональной паренхимы и ее постепенным замещением жировой тканью. Одновременно перестраивается пространственная организация тимической стромы, включая структуру кортико-медуллярной зоны. Изменения затрагивают и

эпителиальный каркас: с возрастом уменьшается численность кортикальных и медуллярных ТЭК и меняются их свойства, что отражается на формировании микроокружения для развития и селекции тимоцитов [88,91]. При инволюции также ослабевает активность некоторых молекул, необходимых для поддержания дифференцировки и регенерации ТЭК: FOXN1, IL-7, IL-22, а также факторов роста FGF21, IGF-1 и KGF [92,93]. Работа ТЭК и поддержание тимопоэза регулируются рядом сигнальных путей, включая Notch, Wnt, NF-κB, mTOR [88,94]. Возрастная дисрегуляция этих регуляторных систем может ослаблять активность тимического эпителия и его взаимодействие с развивающимися тимоцитами.

В результате тимопоэз становится менее эффективным, а выход новых наивных Т-лимфоцитов сокращается, что постепенно уменьшает вклад тимуса в поддержание периферического наивного пула Т-клеток [92]. Это сопровождается возрастной перестройкой периферического Т-клеточного компартмента: уменьшается доля наивных CD4+ и CD8+ клеток и меняется соотношение между наивными и дифференцированными Т-клеточными популяциями. При этом наивные Т-клетки сохраняются преимущественно за счет гомеостатической пролиферации, которая частично компенсирует снижение поступления новых Т-клеток из тимуса [95,96].

При старении меняется и структура репертуара Т-клеточных рецепторов (TCR). Глубокое секвенирование TCRβ Т-хелперов (CD4+) и цитотоксических Т-клеток (CD8+) у людей среднего и пожилого возраста выявило увеличение клональности исследуемого репертуара, а также уменьшение средней длины гипервариабельного участка CDR3 и числа случайно добавленных N-нуклеотидов. Эти особенности возрастного TCR-репертуара сужают спектр распознаваемых антигенов [97]. При 20-летнем наблюдении за здоровыми донорами было показано постепенное увеличение доли крупных клональных популяций TCR, особенно выраженное среди CD8+ Т-клеток; при этом отдельные доминирующие клоны могли сохраняться в течение длительного времени [98]. В другом лонгитюдном исследовании, охватившем 9,2 года наблюдений, также было выявлено возрастное уменьшение разнообразия TCR-репертуара, наиболее выраженное в отдельных клеточных субпопуляциях, включая наивные CD8+ Т-клетки [99].

В периферической крови накапливаются клетки памяти и высокодифференцированные Т-лимфоциты, особенно в CD8+ компартменте. Для CD8+ Т-клеток характерно возрастное уменьшение доли CD28+CD57− клеток и увеличение CD28−CD57+ клеток, для которых описаны признаки терминальной дифференцировки, такие как снижение пролиферативного потенциала и укорочение теломер [100,101]. Накопление CD8+CD28− клональных популяций у пожилых людей ассоциировано с нарушением формирования антительного ответа после вакцинации против гриппа [102], а снижение доли антиген-специфических CD4+ и CD8+ Т-клеток, продуцирующих IFN-γ, показано после стимуляции вирусными антигенами [103].

В совокупности старение адаптивного иммунитета связано с сокращением вклада тимуса в пополнение пула наивных Т-лимфоцитов, перестройкой периферического Т-клеточного пула и изменением структуры TCR-репертуара. Наряду с сокращением наивных клеток происходит накопление накопление крупных клональных популяций и высокодифференцированных Т-клеток, преимущественно в CD8+ компартменте, что ограничивает разнообразие антигенного распознавания и эффективность ответа на новые антигенные стимулы.

1.3.2.2. В-клеточный компартмент и гуморальный иммунитет

Старение В-клеточной системы начинается на этапе образования клеток-предшественников в костном мозге. Экспериментальные исследования на мышах показали снижение частоты и абсолютного числа ранних предшественников В-клеточной линии при старении, включая мультипотентные В-лимфоидные предшественники и про-В-лимфоциты. Кроме того, предшественники В-клеток старых животных характеризовались пониженной чувствительностью к IL-7, что указывает на нарушение регуляции ранних этапов В-лимфопоэза [104]. Аналогичные процессы выявлены и у человека. При исследовании 662 образцов костного мозга методом проточной цитометрии выявлено уменьшение количества В-лимфоцитарных предшественников с возрастом [105]. В другом исследовании при сравнении костного мозга людей разных возрастных групп обнаружено снижение доли CD34+CD19+ В-лимфоидных предшественников у лиц старшего возраста [106]. Этот спад может быть обусловлен как старением самих стволовых клеток, так и возрастными изменениями стромального микроокружения костного мозга, сопровождающимися ухудшением доступности IL-7 [107].

С возрастом в периферической крови уменьшается абсолютное число наивных В-клеток. В лонгитюдном исследовании 165 людей разных возрастных групп выявлено уменьшение количества CD19+IgM+CD27− наивных В-клеток, при этом средняя скорость изменения составляла −5,5 клетки/мкл в год [108]. В исследовании 1427 человек также отмечалось возрастное сокращение общего числа В-лимфоцитов и доли наивных В-клеток, определяемых как CD23−CD27− [109]. В исследовании 83 здоровых доноров разных возрастных групп (включая когорту пожилых людей в возрасте 65–91 года), было показано, что абсолютное число наивных В-клеток значительно ниже в старшей возрастной группе, тогда как их относительная доля существенно не различалась между группами [110].

Секвенирование иммуноглобулинов показало снижение разнообразия репертуара В-клеточных рецепторов (BCR) в периферической крови и лимфатических узлах у пожилых

людей по сравнению с молодыми, при этом частота соматических мутаций в генах иммуноглобулинов существенно не различалась между возрастными группами [111]. При анализе репертуара тяжелых цепей иммуноглобулинов до и после вакцинации против гриппа у пожилых людей отмечались уменьшение доли наивных В-клеток, сокращение разнообразия BCR внутри отдельных клональных семейств и увеличение представленности отдельных клональных линий [112]. В исследовании 155 иммунологически здоровых людей 20–95 лет возрастные различия в репертуаре были наиболее выражены после 70 лет и проявлялись в изменении спектра генов вариабельного участка тяжелой цепи иммуноглобулина (*IGHV*), а также в повышении частоты встречаемости некоторых стереотипных BCR [113]. Лонгитюдный анализ 548 образцов крови 98 человек, наблюдавшихся на протяжении 30 лет, подтвердил увеличение клональности и снижение разнообразия BCR-репертуара после 60 лет. Увеличение клональности было преимущественно связано с В-клетками памяти с переключенным изотипом иммуноглобулина (sMB) и возраст-ассоциированными В-клетками, характеризующимися, в частности, экспрессией CD11c и транскрипционного фактора T-bet [114].

Герминативные центры – это специализированные структуры периферической лимфоидной ткани, в которых зрелые В-лимфоциты активно пролиферируют и проходят отбор клонов с повышенным сродством к антигену. У старых мышей после иммунизации наблюдалось менее выраженное увеличение численности антиген-специфических В-клеток в герминативных центрах, сопровождавшееся снижением титров антител [115]. Кроме того, при старении у мышей изменяется пространственное распределение фолликулярных Т-хелперных клеток (Tfh) внутри герминативных центров, что может ограничивать их взаимодействие с В-клетками [116]. У человека показано возрастное сокращение доли зрелых CXCL13+ Tfh-клеток в герминативных центрах миндалин и увеличение представленности их более ранних предшественников. Поскольку Tfh-клетки обеспечивают В-клеткам сигналы, необходимые для пролиферации, отбора и дифференцировки, нарушение их созревания может ограничивать формирование полноценного гуморального ответа. Так, уменьшение доли зрелых Tfh-клеток у пожилых доноров сопровождалось более слабым образованием грипп-специфических антител [117].

После стимуляции CpG-олигонуклеотидами В-лимфоциты пожилых доноров продуцировали значительно меньше IgM и IgA, что указывает на ухудшение их способности к дифференцировке и секреции иммуноглобулинов [110]. После вакцинации против сезонного гриппа с возрастом ослабевал сывороточный антительный ответ и уменьшалось образование sMB [118]. После пневмококковой вакцинации у людей 65–89 лет также отмечалось снижение специфического ответа IgM и IgA по сравнению с более молодыми взрослыми [119]. При этом возрастные различия могут затрагивать не только количественные показатели, но и свойства

формирующихся антител. В одном из исследований после вакцинации против гриппа у пожилых людей было выявлено меньшее накопление новых соматических мутаций в генах иммуноглобулинов и менее эффективное распознавание антигенных вариантов вируса гриппа [120]. Кроме того, у пожилых людей после вакцинации наблюдалось менее выраженное расширение антиген-специфических В-клеток памяти и ослабление их положительного отбора [121].

В целом старение гуморального иммунитета затрагивает как ранние этапы В-лимфопоэза, так и свойства периферических лимфоцитов. Возрастное уменьшение числа В-клеточных предшественников и наивных В-клеток сочетается с сокращением разнообразия BCR-репертуара, структурно-функциональной дезорганизацией герминативных центров и ослаблением гуморального ответа. Эти изменения ограничивают формирование эффективного антительного ответа на новые антигенные стимулы.

Таким образом, старение иммунной системы выражается в комплексной перестройке гемопоэза, а также изменении состава и функциональной активности различных популяций иммунных клеток (Рисунок 1.2). В костном мозге происходит угнетение основных функций ГСК и их микроокружения, что проявляется в снижении их регенеративного потенциала, миелоидном сдвиге и ослаблении лимфопоэза. Стареющий врожденный иммунитет характеризуется нарушением миграционных, фагоцитарных и эффекторных функций миелоидных и NK-клеток при одновременном повышении их базальной провоспалительной активности. Инволюция тимуса и снижение эффективности тимопоэза ограничивают приток новых наивных Т-клеток, что сопровождается увеличением клональности и снижением разнообразия TCR-репертуара, а также накоплением терминально дифференцированных Т-клеток. Возрастные изменения В-клеточного компартмента включают угнетение В-лимфопоэза, сокращение числа наивных В-клеток, сужение разнообразия BCR-репертуара, снижение эффективности образования антиген-специфических В-клеток в герминативных центрах и, как следствие, ослабление гуморального ответа. В совокупности данные процессы ухудшают способность иммунной системы поддерживать функциональный клеточный состав и эффективно формировать ответ на патогены.

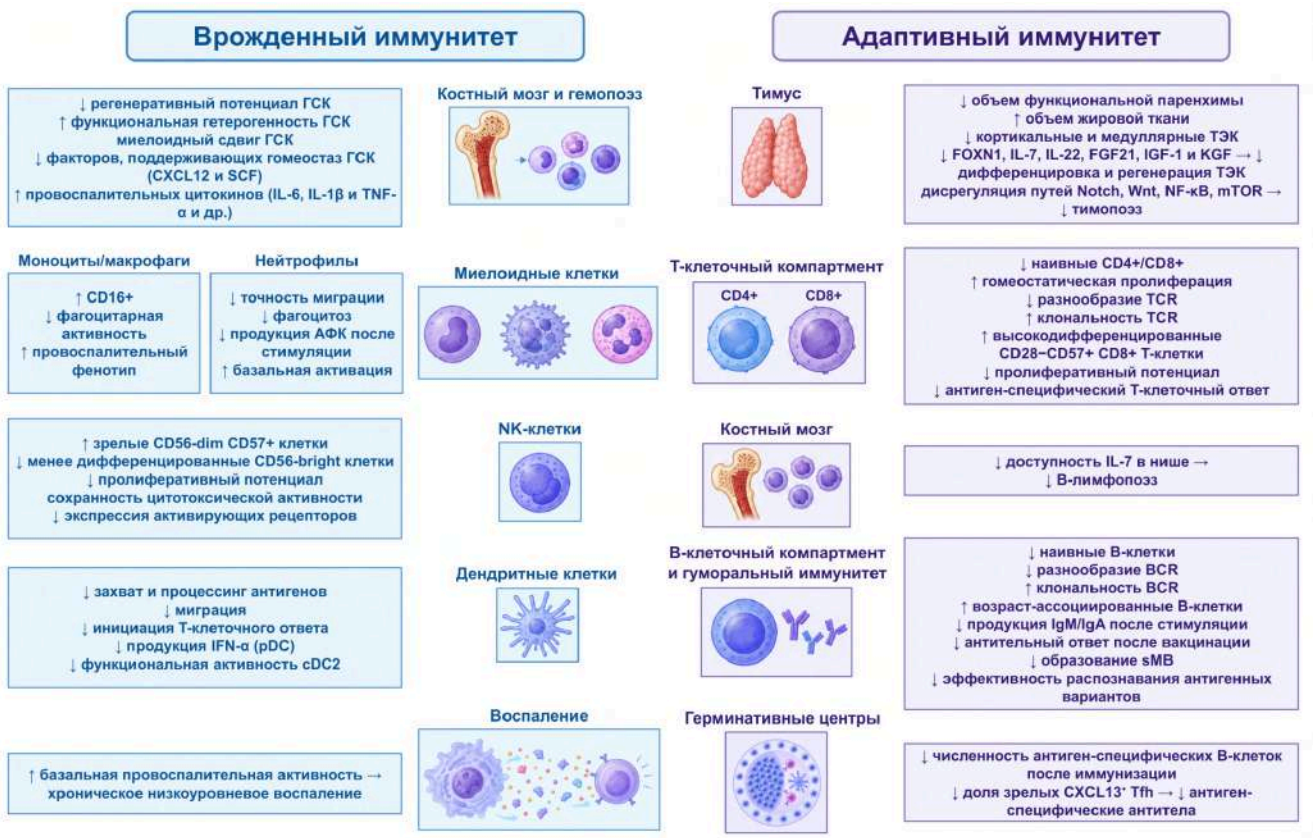


Рисунок 1.2 – Основные возрастные изменения врожденного и адаптивного иммунитета

1.4. Модельные организмы в исследованиях старения

Изучение механизмов старения требует экспериментальных моделей, позволяющих анализировать возрастные изменения на разных уровнях организации: от молекулярных и клеточных процессов до функций целых органов. Для этого используют как клеточные системы *in vitro*, так и модели целого организма *in vivo*. Первые позволяют рассматривать отдельные механизмы старения в контролируемых условиях, тогда как животные дают возможность оценивать системные изменения, их взаимосвязь и влияние различных факторов на организм в целом. Их преимущества в геронтологических исследованиях включают возможность контролировать условия содержания, проводить длительные наблюдения и отслеживать возрастную динамику физиологических показателей [3]. Выбор конкретного объекта определяется научной задачей, а также особенностями его физиологии и фенотипа старения.

1.4.1. Классические модельные объекты

Значительная часть современных представлений о биологии старения получена с использованием классических модельных организмов: круглого червя (*Caenorhabditis elegans*), плодовой мушки (*Drosophila melanogaster*), домовой мыши (*Mus musculus*) и серой крысы (*Rattus norvegicus*). Их широкое применение обусловлено практическими преимуществами экспериментальной работы: небольшими размерами, относительной простотой ухода, хорошей способностью размножаться в лабораторных условиях, невысокими затратами на содержание экспериментальных групп, а также обширными знаниями об их физиологии и геноме [6,122].

Для мышей и крыс создано большое разнообразие лабораторных линий, различающихся особенностями старения и спектром возраст-ассоциированных фенотипов. Стандартные инбредные и аутбредные линии применяются в основном для изучения естественного старения, тогда как селекционные и генетически модифицированные модели позволяют исследовать отдельные механизмы старения и связанные с ним патологии [3]. Например, стандартная линия мышей C57BL/6 широко используется для длительной оценки состояния здоровья и тестирования геропротекторных вмешательств [123]. Для изучения конкретных заболеваний разработаны специализированные модели, например, генетически модифицированные линии мышей 5xFAD и 3xTg-AD, применяемые при исследовании болезни Альцгеймера [124,125].

Крысы также широко используются в геронтологии благодаря ряду преимуществ перед мышами. Более крупные размеры тела обеспечивают получение большего количества тканей для биохимических, молекулярных и морфологических исследований, а также облегчают проведение хирургических вмешательств и оценку физиологических показателей. Кроме того, крысы хорошо подходят для анализа когнитивных и поведенческих функций, что позволяет выявлять возрастные нарушения нервной системы [126]. Для изучения отдельных патологических процессов, ассоциированных со старением, применяются специализированные линии крыс. БА моделируют, в частности, на крысах TgF344-AD, несущих трансгены человеческих генов *APP* и *PSEN1* с мутациями. У этих животных с возрастом развиваются основные признаки заболевания, включая амилоидные бляшки, нейрофибриллярные клубки, нейровоспаление и нейродегенерацию [127]. Спонтанно гипертензивные крысы SHR используются для изучения хронической гипертензии и связанных с ней патологических изменений [128]. Метаболические расстройства моделируют на крысах Zucker Fatty (ZF), у которых мутация гена рецептора лептина (*Lepr*) связана с развитием гиперфагии, ожирения, гиперинсулинемии и инсулинорезистентности. Производная линия Zucker Diabetic Fatty (ZDF)

характеризуется более выраженными нарушениями углеводного обмена, включая гипергликемию [129].

1.4.1.1. Линия крыс OXYS

Линия крыс OXYS (ИЦиГ СО РАН) представляет собой комплексную модель преждевременного старения [7]. Она была создана в 1970-х годах путем селекции крыс Wistar/Icgn по признаку раннего развития катаракты. В первых пяти поколениях развитие катаракты стимулировали диетой с высоким содержанием галактозы, после чего отбирали животных, чувствительных к ее катарактогенному эффекту. В дальнейшем селекцию продолжили по признаку спонтанного развития катаракты, скрещивая животных, у которых она возникала без дополнительной галактозной нагрузки [130].

В последующих поколениях у крыс OXYS вместе с катарактой стали проявляться другие возраст-ассоциированные патологии. На фоне умеренно повышенного артериального давления у них спонтанно развиваются гипертрофическая кардиомиопатия, саркопения, остеопороз и ретинопатия, сходная с ВМД у человека [7]. Кроме того, для этой линии характерна ускоренная инволюция тимуса, которая связана с уменьшением сети эпителиальных клеток коркового вещества и выраженными изменениями их ультраструктуры [131]. У крыс OXYS также наблюдаются характерные для БА нейродегенеративные изменения, включая гиперфосфорилирование тау-белка, потерю синапсов, гибель нейронов и возрастное накопление Aβ. При этом в генах *App*, *Psen1* и *Psen2* у этой линии не обнаружены несинонимичные варианты, характерные для семейной формы БА, что позволяет рассматривать крыс OXYS как модель спорадической формы заболевания [8,9].

Окислительный стресс – нарушение равновесия между прооксидантными и антиоксидантными системами – рассматривается как один из механизмов развития патологических изменений у крыс OXYS. У этих животных выявлены окислительная модификация белков, в частности образование карбонильных групп, и накопление 8-оксогуанина (8-oxoG) – маркера окислительного повреждения ДНК. Уже в возрасте 1–3 месяцев у крыс OXYS содержание 8-oxoG в ДНК нейронов и глиальных клеток фронтальной коры и гиппокампа было статистически значимо выше, чем у крыс Wistar [132]. Аналогичные межлинейные различия обнаружены в ДНК печени и легких: содержание 8-oxoG у крыс OXYS было повышено в обеих тканях в возрасте 2 и 18 месяцев [133]. В головном мозге крыс OXYS когнитивные нарушения проявлялись раньше, чем возникали статистически значимые

межлинейные различия по некоторым маркерам окислительного стресса. При этом длительное применение антиоксидантных добавок ослабляло эти нарушения и снижало выраженность окислительного стресса [134]. Эти результаты свидетельствуют об участии окислительных процессов в развитии патологии, но не позволяют считать окислительный стресс единственным инициирующим фактором преждевременного старения крыс OXYS.

Нарушения структуры и функции митохондрий у крыс OXYS описаны в печени [135], скелетных мышцах [136] и миокарде [137], структурах головного мозга [138] и сетчатке [139]. В печени крыс OXYS начиная с 12-месячного возраста выявлялись статистически значимые отличия от Wistar по структурным и функциональным характеристикам митохондрий, включая снижение скорости потребления кислорода и фосфорилирования, а также уменьшение мембранного потенциала [135]. Вместе с тем изолированные митохондрии печени этих животных характеризуются менее интенсивным восстановлением кислорода и продуцируют меньше супероксид-аниона и пероксида водорода, чем митохондрии крыс Wistar, что связано с функциональными нарушениями на уровне Комплекса III электрон-транспортной цепи [140]. В скелетных мышцах структурные изменения обнаруживались уже в возрасте 3 месяцев: увеличивался размер отдельных митохондрий и уменьшалось число крист. К 24 месяцам митохондриальная сеть была выраженно дезорганизована, а в мышечных волокнах накапливались аутофагосомы [136]. В миокарде у 3-месячных крыс OXYS площадь внутренней мембраны митохондрий в расчете на единицу их объема была меньше, чем у крыс Wistar; с возрастом этот показатель снижался у обеих линий [137]. В гиппокампе изменения митохондрий выявлялись до появления выраженных признаков патологии, сходной с БА. В ходе ее развития увеличивался размер митохондрий и снижалась активность дыхательных комплексов I, IV и V; на поздних стадиях уменьшалось количество митохондрий и усиливалась фрагментация митохондриальной сети. При этом на этапах выраженной патологии усиления продукции АФК обнаружено не было [138]. В сетчатке 6-месячных крыс OXYS количество митохондрий в нейронах было снижено по сравнению с крысами Wistar; также наблюдалось их набухание и разрушение крист. Применение ингибитора JNK IQ-1S частично восстанавливало ультраструктуру митохондрий и увеличивало их количество, хотя показатели не достигали уровня контрольных животных [139].

У крыс OXYS нарушения структуры и функции митохондрий выявляются сразу в нескольких тканях и затрагивают как организацию митохондриальных мембран и сети, так и процессы клеточного дыхания. Характер изменений зависит от ткани и стадии развития патологии, а выраженная митохондриальная дисфункция не обязательно сопровождается усилением продукции активных форм кислорода. Эти данные позволяют рассматривать

нарушения митохондрий как один из возможных механизмов развития возраст-ассоциированных патологий у данной линии животных.

Наследственный характер комплекса признаков преждевременного старения крыс OXYS послужил основанием для поиска генетических факторов, связанных с их развитием. Одним из первых направлений таких исследований стало картирование локусов количественных признаков (QTL). При скрещивании крыс OXYS с контрольной линией WAG у гибридов F_2 были выявлены два QTL на хромосоме 1, связанные с пассивным поведением и повышенной тревожностью [141]. В отдельном исследовании на этой хромосоме были картированы два QTL, связанные с ранним развитием катаракты и ВМД-подобной ретинопатии [142]. Для изучения вклада этих участков генома были созданы конгенные линии WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2, несущие фрагменты хромосомы 1 крыс OXYS на генетическом фоне WAG. Сравнение конгенных линий с родительскими показало, что перенос этих участков сопровождался развитием катаракты и ретинопатии, однако выраженность изменений сетчатки была ниже, чем у OXYS. При этом характерные для OXYS признаки нейродегенеративной патологии головного мозга у конгенных животных не воспроизводились [143]. Эти результаты свидетельствуют о сложной генетической основе фенотипа преждевременного старения крыс OXYS и указывают на то, что его различные проявления могут иметь частично независимую генетическую основу.

В дальнейшем поиск генетических факторов расширился за счет анализа полиморфизмов, выявляемых при сравнении последовательностей транскриптомов крыс OXYS с данными других линий. В одном из исследований анализировали варианты в генах, ассоциированных с риском развития БА, включая *App*, *Apoe*, *Bace1*, *Psen1*, *Psen2* и *Picalm*. Для поиска несинонимичных однонуклеотидных вариантов (ОНВ) использовали данные секвенирования РНК хориоретинального комплекса крыс OXYS и WAG. У OXYS были выявлены три несинонимичных ОНВ в двух генах: *Casp3* и *Sorl1*. Среди них только для варианта *Sorl1*, приводящего к замене R744W, алгоритм SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant) предсказал потенциально повреждающее (deleterious) влияние на белок. Два других варианта были классифицированы как нейтральные (tolerated) [9].

В другой работе поиск генетических вариантов был направлен на выявление потенциальных факторов развития гипертрофии миокарда. На основе данных секвенирования РНК авторы обнаружили ОНВ в митохондриально-ассоциированных генах *Fbxl4* и *Slc25a32*. Согласно биоинформатической аннотации вариантов, выявленные замены могли оказывать неблагоприятное влияние на функцию соответствующих белков. Также были исследованы изменения экспрессии этих генов в миокарде OXYS на разных стадиях развития патологии. На основании совокупности полученных данных авторы предложили *Fbxl4* и *Slc25a32* в качестве генов-кандидатов, потенциально связанных с развитием гипертрофии миокарда [10].

В следующем исследовании поиск генетических вариантов был расширен на основе данных РНК-секвенирования гиппокампа, префронтальной коры и сетчатки крыс OXYS. Авторы выявили ОНВ в генах *Rims2* и *Lemd2*, а также в двух аннотированных локусах *AABR07072639.2* и *AABR07045405.1*, которые, согласно аннотации, могли приводить к образованию укороченных белков. Кроме того, были обнаружены 33 варианта, вызывающих аминокислотные замены в белках, потенциально влияющие на их структуру или функцию. Некоторые из соответствующих генов были связаны со старением, нейродегенеративными и психическими заболеваниями [12]. В результате были предложены кандидатные генетические варианты, потенциально связанные с развитием БА-подобной патологии и ретинопатии у крыс OXYS. Те же авторы сопоставили варианты, выявленные по данным РНК-секвенирования гиппокампа, префронтальной коры и сетчатки крыс OXYS, с генотипами 45 линий и субпопуляций крыс, включая модели артериальной гипертензии. Было выявлено 725 ОНВ, общих для OXYS и одной или нескольких исследованных гипертензивных линий. Из них выделили 13 вариантов, приводящих к аминокислотным заменам и предположительно оказывающих неблагоприятное влияние на структуру или функцию белков, а также четыре варианта, связанные с потенциально значимыми изменениями структуры транскриптов. В качестве кандидатных генов, возможный вклад которых в сочетание гипертензии и признаков ускоренного старения требовал дальнейшего изучения, были выделены *Ephx1*, *Pla2r1* и *Ccdc28b* [11].

Предшествующие исследования позволили выявить хромосомные локусы и кандидатные ОНВ, потенциально связанные с различными проявлениями фенотипа преждевременного старения крыс OXYS. Анализ вариантов на основе транскриптомных данных охватывал преимущественно экспрессируемые в исследованных тканях участки генома и не позволял провести оценку генетических различий на уровне всего генома, включая варианты в некодирующих областях и структурные перестройки. В связи с этим полногеномное секвенирование представляет собой следующий этап изучения генетических особенностей крыс линии OXYS.

1.4.2. Неклассические модельные объекты

Тем не менее классические модельные организмы не отражают всего разнообразия закономерностей старения, наблюдаемых в животном мире [144]. Продолжительность жизни существенно различается между видами животных и в целом положительно коррелирует с их

массой тела: как правило, более крупные живут дольше. Однако отдельные виды отклоняются от этой зависимости, демонстрируя как существенно меньшую, так и большую продолжительность жизни по сравнению с ожидаемой для их массы тела [145]. Например, мыши и крысы характеризуются относительно коротким сроком жизни, тогда как голый землекоп, слоны и многие приматы, включая человека, значительно превышают предполагаемые для их массы тела значения (Рисунок 1.3).

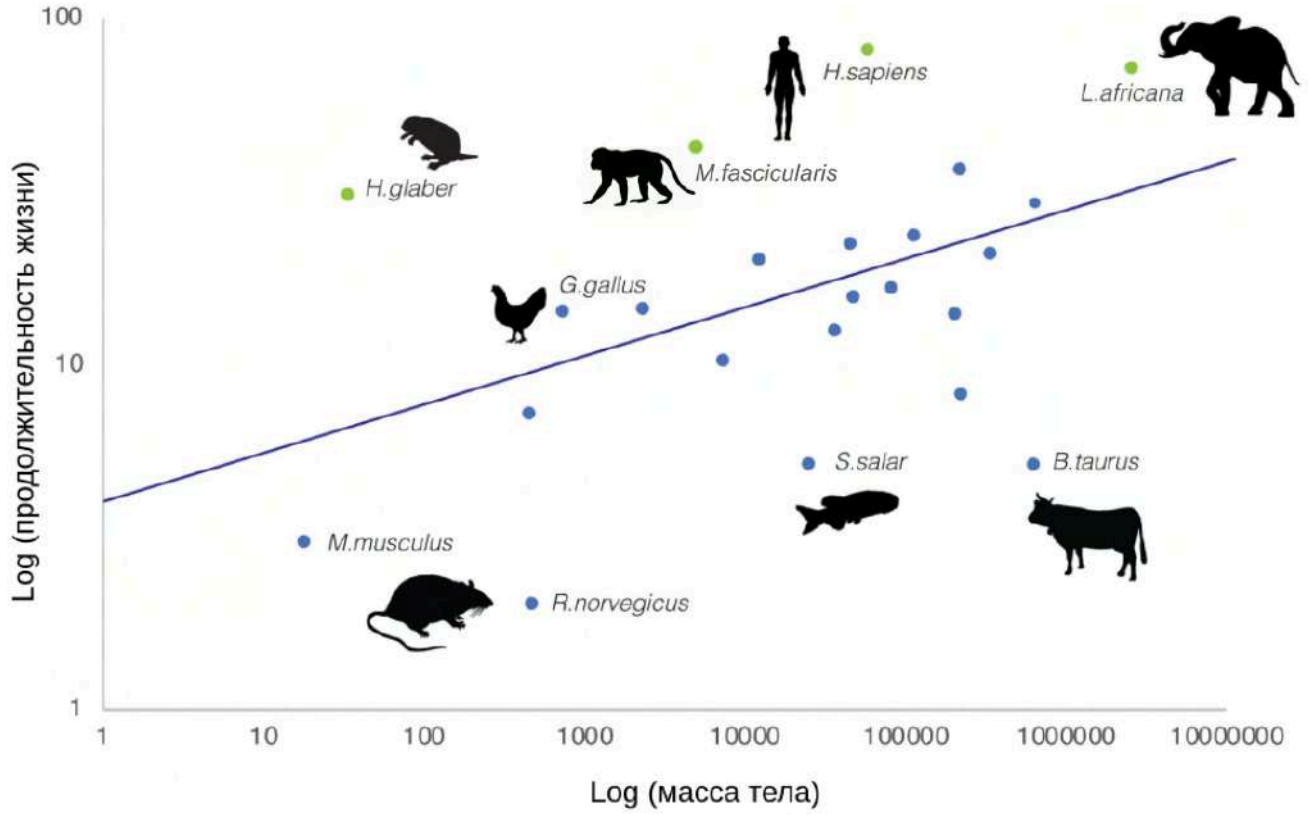


Рисунок 1.3 – Зависимость продолжительности жизни некоторых животных от их массы тела. Положительные выбросы (долгожители) обозначены зелеными точками. Адаптировано из [146]

Результаты исследований на короткоживущих животных не всегда позволяют объяснить механизмы, обеспечивающие длительное сохранение функций организма у долгоживущих видов. Экстраполяция таких результатов на человека требует учета межвидовых различий в продолжительности жизни, физиологии и особенностях старения. Поэтому наряду с традиционными лабораторными моделями большое значение приобретает изучение долгоживущих животных, относящихся к неклассическим модельным объектам.

Отдельную группу неклассических модельных организмов для изучения старения представляют нечеловеческие приматы (НЧП) – все виды отряда Приматы, кроме человека. Их

филогенетическая близость к человеку, сходство физиологических процессов и наличие многих общих возраст-ассоциированных патологий позволяют исследовать механизмы старения в условиях, более близких к человеческим, чем при использовании, например, грызунов. Вместе с тем виды НЧП существенно различаются по продолжительности жизни, размерам тела и особенностям содержания, что определяет преимущества и ограничения каждой модели [13] (Рисунок 1.4).

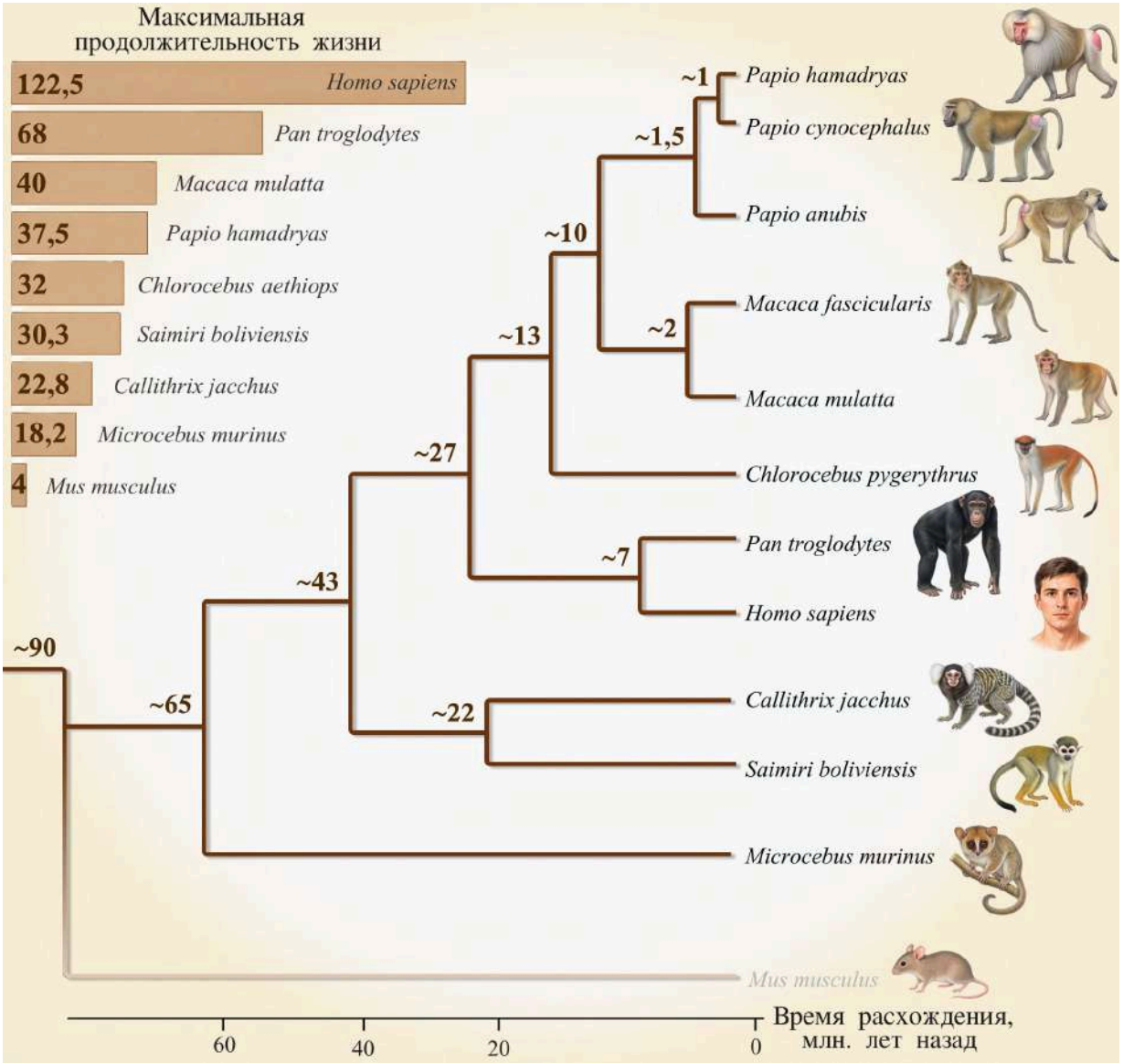


Рисунок 1.4 – Максимальная продолжительность жизни и филогенетические взаимоотношения приматов, используемых в исследованиях старения, в сравнении с человеком и мышью. Древо было построено с использованием полных митохондриальных геномов в программе MEGA X v11.0.13 [147]. Данные о максимальной продолжительности жизни получены из базы AnAge [148] и отражают показатели для животных в неволе

1.4.2.1. Старение иммунной системы на модели макак

Макаки широко используются для изучения иммунного старения благодаря сходству их иммунной системы с человеческой по клеточному составу, функциональным характеристикам и характеру возрастных изменений. В частности, у макак и человека с возрастом меняется соотношение субпопуляций Т- и В-лимфоцитов, функциональная активность NK-клеток и профиль продукции цитокинов [14]. Длительное применение этих приматов в биомедицинских исследованиях позволило накопить обширную базу данных о возрастных изменениях их иммунной системы.

Одним из проявлений возрастной перестройки адаптивного иммунитета у макак является изменение состава Т- и В-клеточных популяций в крови. В нескольких исследованиях на макаках-резусах показано снижение количества или относительной доли В-лимфоцитов. У китайских макак-резусов с возрастом уменьшалось количество В-клеток и изменялось соотношение их субпопуляций в сторону преобладания клеток памяти над наивными В-лимфоцитами [149]. Сходная тенденция к снижению количества CD20+ В-клеток была обнаружена у содержащихся в неволе макак-резусов [150], а у свободноживущих животных отмечалось уменьшение относительной доли этих клеток [151]. Изменения затрагивали и Т-клеточный компартмент: у макак-резусов с возрастом снижалось количество наивных CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов, тогда как количество CD8+ Т-клеток эффекторной памяти увеличивалось [150]. В другом исследовании также отмечены сокращение наивных Т-клеточных субпопуляций и увеличение доли эффекторных клеток памяти, сопровождавшиеся снижением соотношения CD4+/CD8+ [149]. У свободноживущих макак-резусов возрастное снижение этого соотношения сочеталось с увеличением относительной доли CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов. У этих животных также увеличивалась доля NK-клеток и промежуточных моноцитов, тогда как для классических моноцитов отмечалась тенденция к снижению [151].

Возрастные сдвиги клеточного состава сопровождаются изменениями цитокинового профиля крови, характерными для хронического возраст-ассоциированного воспаления. У макак-резусов концентрации ряда провоспалительных медиаторов (IFN-γ, IL-1β, IL-6, IL-12/23(p40), IL-15, TNF-α, MCP-1 и MIP-1α), а также противовоспалительных интерлейкинов (IL-1ra и IL-4) положительно коррелировали с возрастом. При этом для некоторых цитокинов, в частности IFN-γ и IL-6, несмотря на положительную корреляцию концентраций с возрастом, различия средних значений между молодыми и старыми животными не достигали статистической значимости, что связано с высокой межиндивидуальной вариабельностью показателей в старшей возрастной группе [150].

Одной из наиболее заметных закономерностей, выявленных при изучении транскриптомов крови макак, является изменение соотношения маркеров врожденного и адаптивного иммунного ответа. В частности, у яванских макак (*M. fascicularis*) повышение экспрессии генов, связанных с врожденным иммунитетом и цитотоксическими функциями иммунных клеток, сочеталось со снижением экспрессии генов, участвующих в поддержании и дифференцировке наивных Т-лимфоцитов (*FOXO1*, *LEF1*, *IL7R*), а также маркеров В-клеток (*CD79A*, *CD79B*, *CD19*, *CD22*, *PAX5*) [18]. Сходные возрастные изменения обнаружены у макак-резусов (*M. mulatta*): в старших возрастных группах повышалась экспрессия генов, связанных с врожденным иммунным ответом, тогда как снижение экспрессии генов адаптивного иммунитета затрагивало, в частности, процессы активации В-клеток и передачу сигналов через В-клеточный рецептор. Среди отдельных генов, экспрессия которых снижалась, авторы отметили *CCR7* и *NFATC1*, участвующие в регуляции иммунных реакций [15].

Изменения экспрессии генов иммунного ответа сопровождаются изменениями расчетной представленности отдельных клеточных популяций. Так, при анализе транскриптомов яванских макак с использованием вычислительной оценки клеточного состава были выявлены признаки снижения представленности В-клеток и некоторых субпопуляций Т-лимфоцитов на фоне повышения представленности нейтрофилов, макрофагов и NK-клеток [18]. Однако подобные оценки, основанные на профилях экспрессии цельной крови, не позволяют однозначно разграничить изменения численности клеток и изменения экспрессии генов внутри отдельных популяций.

Дополнительную информацию о клеточной основе иммуностарения дают исследования с применением секвенирования РНК единичных клеток (scRNA-seq). При анализе костного мозга, селезенки, мезентериальных лимфатических узлов и периферической крови макак-резусов у старых животных обнаружено повышение экспрессии *GZMB* в нескольких клеточных популяциях. В частности, увеличивалась представленность ряда субпопуляций CD8+ Т-лимфоцитов с признаками цитотоксической активности и клеточного старения. Анализ регуляторных сетей выявил транскрипционный фактор *BHLHE40*, потенциально участвующий в регуляции генов, связанных с воспалительными процессами и истощением Т-клеток. Наряду с этим в костном мозге снижалась представленность субпопуляции наивных В-клеток с низкой экспрессией *PDCD4*, тогда как среди CD8+ Т-лимфоцитов увеличивалась доля клеток центральной памяти с повышенной экспрессией *CCL5* и сниженной экспрессией *IL7R* [20]. Таким образом, анализ scRNA-seq позволяет уточнить, какие клеточные популяции могут вносить вклад в изменения экспрессии генов.

Транскриптомные исследования также указывают на то, что возрастные изменения иммунной системы затрагивают не только периферические иммунные клетки, но и процессы

кроветворения. При изучении костного мозга яванских макак было выявлено выраженное сокращение пула общих лимфоидных предшественников и смещение дифференцировки гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток в сторону миелоидного направления [19].

При этом транскриптомные изменения иммунной системы не обязательно развиваются линейно на протяжении жизни. Так, в исследовании на периферической крови тибетских макак (*M. thibetana*) показано, что экспрессия ряда генов и активность иммунных процессов изменяются на разных этапах онтогенеза неодинаково. Повышение экспрессии генов, связанных с активацией нейтрофилов и макрофагов, наблюдалось при переходе от ранних возрастных групп к взрослым животным, тогда как при сравнении старых и взрослых макак выявлено снижение экспрессии генов, связанных с врожденным иммунным ответом, в том числе компонентов сигнальных путей TNF и TLR [17].

Транскриптомные изменения крови рассматриваются и в качестве потенциального источника маркеров возрастных изменений других органов. При комплексном анализе экспрессии мРНК, длинных некодирующих и кольцевых РНК, а также белков внеклеточных везикул у макак-резусов были выявлены молекулы, синхронные изменения которых наблюдались как в периферической крови, так и в тканях головного мозга. Среди них – *CLU*, *ITSN1* и *PPM1A*, а также несколько некодирующих РНК [16].

Опубликованные исследования выявляют разнообразные молекулярные и клеточные проявления иммуностарения у макак, затрагивающие как периферические иммунные популяции, так и процессы кроветворения в костном мозге. Однако эти изменения преимущественно изучались раздельно, в разных группах животных и с использованием различных подходов. В связи с этим одновременный анализ транскриптомных профилей периферической крови и костного мозга одних и тех же животных позволяет оценить взаимосвязь молекулярных изменений в этих компартментах иммунной системы и выявить общие и тканеспецифичные особенности иммуностарения.

ГЛАВА 2. ГЕНОМНЫЕ ОСОБЕННОСТИ И ЛИНИЕСПЕЦИФИЧНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ КРЫС OXYS

2.1. Материалы и методы

2.1.1. Животные и сбор биоматериала

Для полногеномного секвенирования использовали самцов крыс линии OXYS (n = 3) и родительской линии Wistar/Icgn (n = 3) возрастом 3 месяца. Для генотипирования дополнительно были взяты 10 крыс линии OXYS и 10 – линии Wistar/Icgn разных возрастов (от 3 до 18 месяцев). Животные были предоставлены из центра коллективного пользования «Генофонды лабораторных животных» Института цитологии и генетики СО РАН. Крыс содержали в стандартных лабораторных условиях (+22 ± 2 °C и 12-часовой цикл свет/темнота) в клетках (57×36×20 см) при свободном доступе к воде и пище – стандартному гранулированному корму для лабораторных животных (БиоПро, Россия).

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

После эвтаназии животных углекислым газом проводили декапитацию и забор фрагментов мозжечка (для полногеномного секвенирования) и ушей (для генотипирования) массой 30–50 мг в пробирку объемом 1,5 мл. Биоматериал был заморожен в жидком азоте, а затем хранился при −80°C.

2.1.2. Экстракция ДНК

Геномная ДНК из вышеуказанных тканей была выделена с использованием набора QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Германия) по протоколу производителя. Фрагмент ткани инкубировали 3–4 часа в 180 мкл ATL буфера с добавлением 20 мкл протеиназы К при +56°C до полного лизиса. Затем к лизату добавляли 200 мкл AL буфера и инкубировали при +70°C 10 мин. После добавления 200 мкл этанола образец наносили на колонку с силикатной мембраной и центрифугировали 1 мин при 6000 g. Колонку дважды промывали: сначала 500 мкл буфера AW1 (центрифугирование 1 мин при 6000 g), затем 500 мкл буфера AW2 (центрифугирование 3

мин при 20 000 g). На последнем этапе ДНК элюировали с мембраны в 100 мкл AE буфера путем центрифугирования 1 мин при 6000 g. Концентрацию полученной ДНК измеряли на флуориметре Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США). Оценку количества примесей (A260/A280 и A260/A230) проводили с помощью микрообъемного УФ-спектрофотометра NanoDrop OneC (Thermo Fisher Scientific, США).

2.1.3. Приготовление геномных библиотек и секвенирование

Библиотеки для полногеномного секвенирования были приготовлены с использованием набора TruSeq DNA PCR-Free (Illumina, США). На приготовление библиотеки брали 1000 нг образца ДНК. Расщепление ДНК на фрагменты длиной 300–350 п.н. было выполнено на ультразвуковом соникаторе Covaris S220 (Covaris, LLC, США). Далее проводили репарацию концов фрагментов, очистку и отбор фрагментов по длине с помощью магнитных частиц AMPure XP (Beckman Coulter, США), аденилирование 3’-концов, лигирование адаптерных последовательностей и очистку готовых библиотек на магнитных частицах AMPure XP (Beckman Coulter, США). Качество полученных библиотек оценивали с помощью капиллярного гель-электрофореза на приборе TapeStation 4150 (Agilent Technologies, США), молярность определяли методом количественной ПЦР набором KAPA Library Quantification Kit (Roche Sequencing Solutions, США). Секвенирование проводили на приборе NovaSeq 6000 (Illumina, США) в режиме парноконцевых прочтений 2×151 п.н.

2.1.4. Анализ данных полногеномного секвенирования

Качество полученных прочтений оценивали с помощью программного обеспечения FastQC v0.11.9 [152]. Удаление адаптеров и фильтрация прочтений по качеству были выполнены с помощью программного обеспечения AdapterRemoval v2.3.3 с использованием параметров --minquality 20, --trimqualities и --minlength 50 [153]. Далее прочтения картировали на сборку генома *Rattus norvegicus* (mRatBN7.2) алгоритмом BWA-MEM из программного обеспечения BWA v0.7.17 [154]. Дубликаты прочтений маркировали командой MarkDuplicates из пакета программ Picard v2.26.11 [155]. Качество выравнивания анализировали с помощью набора

программ SAMtools v1.9 [156]. Глубину покрытия геномов оценивали с использованием утилиты CollectWgsMetrics из Picard v2.26.11 [155].

Поиск и отбор ОНВ и инсерций/делеций (инделов)

Позиции ОНВ и инделов, а также генотипы животных по найденным позициям определяли командой HaplotypeCaller из пакета программ GATK v4.2.2.0 [157]. Анализ главных компонент (PCA) проводили с использованием программного пакета PLINK v1.9 [158]. График был построен в программной среде R v4.5.3 при помощи пакета ggplot2 [159]. Отбор и фильтрацию генотипов выполняли с использованием скрипта на Python, который принимает на вход VCF-файл и отбирает варианты с минимальным покрытием 10×, гомозиготные по альтернативному аллелю у всех образцов тестовой группы (OXYS) и отсутствующие в гомозиготном состоянии у контрольной группы (Wistar/Icgn). Для аннотации и классификации каждого ОНВ и индела по функциональному воздействию использовали Ensembl Variant Effect Predictor (VEP) v113 [160]. Потенциальное функциональное воздействие миссенс-вариантов на белок оценивали алгоритмом SIFT из инструмента VEP v113. Анализ частот аллелей отобранных вариантов проводили среди 146 линий крыс из базы данных Rat Genome Database (RGD) [161]. Пересечение позиций ОНВ и инделов крыс OXYS и линий крыс из базы данных RGD выполняли инструментом BCFtools v1.15 [162]. Полный список линий крыс, с которыми проводили сравнение, представлен в приложении А. Все отобранные генетические варианты проходили визуальную верификацию в геномном браузере Integrative Genomics Viewer (IGV) [163].

Оценку консервативности аминокислотных остатков в позициях, затронутых заменами, осуществляли на основе множественных выравниваний ортологов эволюционно отдаленных видов животных, плацентарных млекопитающих, а также грызунов и родственных им видов. Множественные выравнивания ортологичных белков были собраны из базы данных Ensembl v115 [164]. Поиск паралогов также проводили по базе данных Ensembl v115. Визуализация множественных выравниваний была сделана в программе UGENE v45.0 [165]. Предсказание и визуализацию пространственных структур белков проводили с помощью AlphaFold 3 [166]. Доменную локализацию аминокислотных замен определяли на основании аннотации UniProt [167]. При отсутствии данных по доменам белка крысы использовался мышиный ортолог.

Поиск и отбор вариаций числа копий геномных регионов (CNV)

Поиск CNV осуществляли программой CNVpytor v1.3.1 [168]. Использовали размер окна поиска в 100 п.н., который рекомендован для покрытия 20–30× [169]. Для определения координат CNV и генотипирования образцов применяли программу smoove v0.2.8 [170]. Для повышения достоверности детекции проводили пересечение координат CNV, выявленных обеими программами, с помощью команды “bedtools intersect” из пакета BEDTools v2.30.0 [171] и исключали CNV размером более 20 т.п.н., а также CNV в регионах с артефактами выравнивания и низким качеством картирования. Отбор генотипов проводили с помощью инструмента BCFtools v1.15 [162]. Аннотация CNV была выполнена путем пересечения их координат с геномной аннотацией сборки mRatBN7.2 командой “bedtools intersect” из пакета BEDTools v2.30.0 [171].

Для анализа CNV в регуляторных областях генома использовали данные секвенирования после иммунопреципитации хроматина (ChIP-seq) по гистоновой метке H3K27ac из Sequence Read Archive (SRA), полученные для тканей мозга крыс аутбредной линии Long-Evans [172] (Таблица Б.1). Координаты пиков обогащения H3K27ac по сборке mRatBN7.2 получали с помощью программы MACS2 v2.2.6 [173]. Для пересечения координат CNV и пиков применяли команду “bedtools intersect” из BEDTools v2.30.0 [171]. Визуализация CNV была выполнена в IGV [163].

Стратегия отбора и приоритизации генетических вариантов схематично представлена на рисунке 2.1.

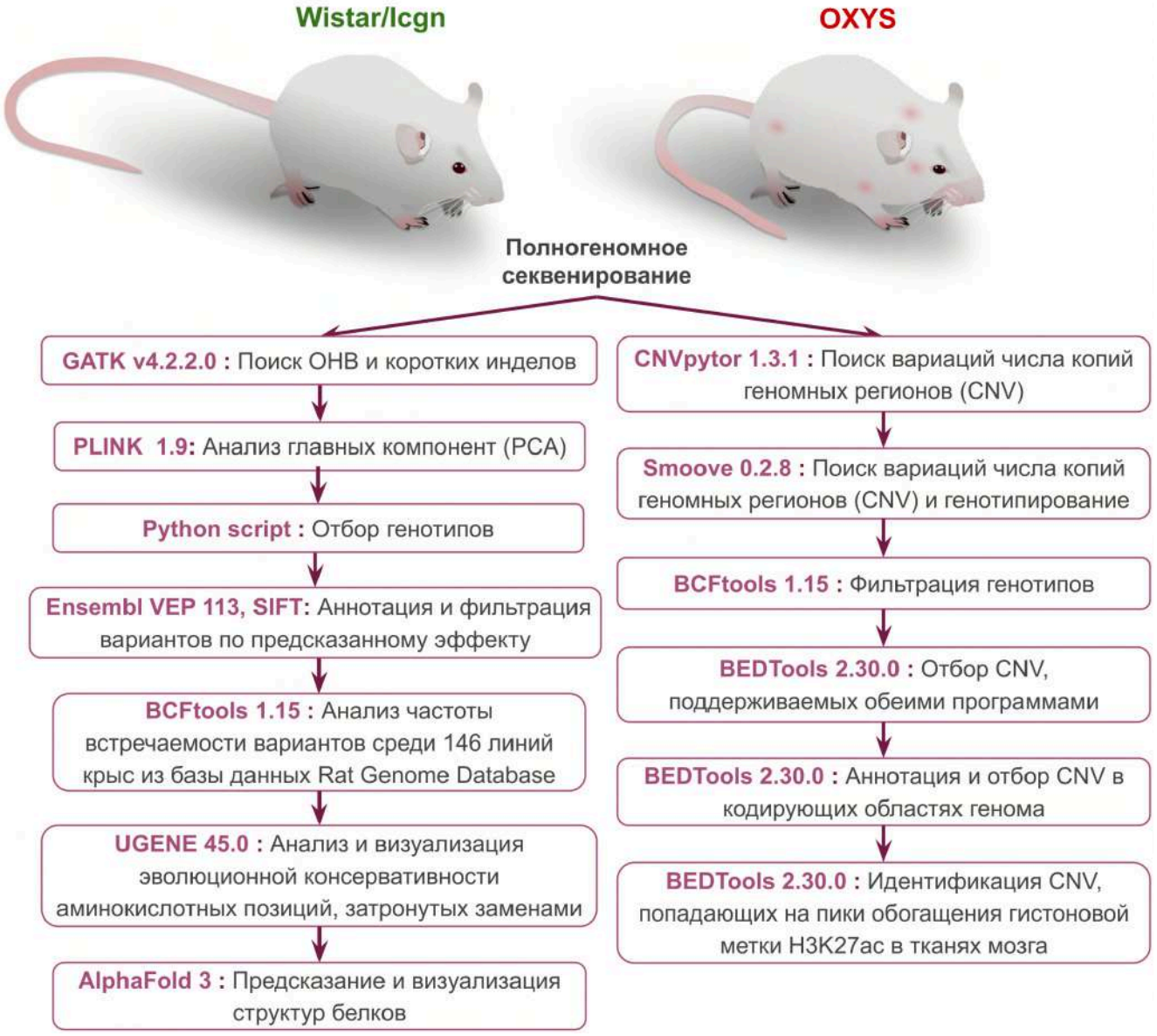


Рисунок 2.1 – Схема отбора и приоритизации генетических вариантов

2.1.5. Генотипирование методом секвенирования по Сэнгеру

На независимой выборке крыс (10 – OXYS, 10 – Wistar/Icgn) было проведено генотипирование по отобранным кандидатным генетическим вариантам. Фрагменты генов, содержащие миссенс-замены у крыс OXYS, амплифицировали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) набором реагентов GenPak PCR Master Mix Core (Isogene, Россия). Состав и условия проведения реакции представлены в таблице 2.1. Последовательности праймеров для каждого фрагмента и ожидаемые длины ампликонов приведены в таблице 2.2.

Подбор праймеров осуществляли с использованием веб-инструмента NCBI Primer-BLAST [174].

Таблица 2.1 – Состав реакционной смеси и условия проведения ПЦР

Реакционная смесь		**Условия амплификации**		
Isogene 2× Mix	25 мкл	Стадия 1	94°C	5 мин
Прямой праймер 10 мкМ	2 мкл	Стадия 2	94°C	20 сек
Обратный праймер 10 мкМ	2 мкл	Стадия 3	60°C	20 сек
ДНК	20 нг (2 мкл)	Стадия 4	72°C	40 сек
H_2O	до 50 мкл	Стадия 5	72°C	5 мин
Итого: 50 мкл		30 циклов (стадии 2–4)		

Таблица 2.2 – Последовательности праймеров и ожидаемые длины ПЦР-продуктов

Ген	**Прямой праймер**	**Обратный праймер**	**Длина ампликона, п.н.**
Cmya5	GTTCACTGGCAACGCTACA	**TGGACCCTCAACAACCATTCC**	654
Akap6	**GAAGGATTTCCAGCCAGGAGC**	ATCGTCACTTTAGAGAGCATGGG	636
Nqo2	**GCATAGTCAGCTCTACCCCTCT**	ATTCACCCTTGCTCAGTACCC	516
Cic	**GTAAGGAACGGGTGACCGAC**	TGACCAGACTCCTGCGTTTT	561
Cerkl	CTTGGGCTACAGTTTGTTTCAC	**CCACACTGAGTCATAGTTGGGC**	501
Bfsp1	**TGTGGAGGTGTGATGAGTTTCATA**	ACCGGTCTAGCTCGTTCCT	234
Csf2rb	**GGTGAAACAGACGAGGGACC**	GCCAGAAAGAGTTGGTGGGT	538
Pik3c2b	**AGGGAGAGCTACCCAATGGT**	AAACACCTGCCTCAGAAGGG	560
Notch4	CCTCTCTGCCCTTCTTCGAC	**TGTCAGTTTCCGTTGCTTGC**	627

Жирным шрифтом выделены праймеры, использованные для сиквенсной реакции

Электрофорез полученных ПЦР-продуктов проводили в 2% агарозном геле, приготовленном на 1× ТАЕ (трис-ацетат 40 мМ, ЭДТА 1 мМ, pH 7,6) буфере с добавлением бромистого этидия в конечной концентрации 0,5 мкг/мл, при напряжении 5 В/см с использованием источника питания Эльф-4 (ДНК-технология, Россия). Длина ПЦР-продуктов определялась с помощью ДНК-маркера 100+ bp (Евроген, Россия). Ампликоны визуализировали в системе гель-документирования Gel Doc XR+ (Bio-Rad, США) под УФ-излучением. Далее фрагменты очищали из реакционной смеси набором Cleanup Mini (Евроген, Россия) по протоколу производителя. Сиквенсную реакцию проводили в объеме 10 мкл с использованием

набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Продукты реакции очищали на колонках DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen, Германия). Капиллярный гель-электрофорез выполнялся на приборе 3730xl DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific, США). Полученные хроматограммы анализировали в программе UGENE v45.0 [165].

2.1.6. Оценка генетической дивергенции и анализ частот аллелей и генотипов

Оценку базовых статистических параметров выявленных на основе полногеномного секвенирования генетических вариантов проводили с использованием модуля vcfstats из программного пакета RTG Tools v3.12.1 [175]. Для каждого образца рассчитывали долю гетерозиготных позиций (Het, %) и суммарную долю гомозиготных позиций (Hom, %) среди всех информативных генотипированных позиций (исключая позиции с неполными или отсутствующими генотипами) по формулам: $Het = N_{0/1} / (N_{0/1} + N_{1/1} + N_{0/0}) \times 100\%$ и $Hom = (N_{1/1} + N_{0/0}) / (N_{0/1} + N_{1/1} + N_{0/0}) \times 100\%$, где $N_{0/1}$ – число гетерозиготных позиций, $N_{1/1}$ – число альтернативных гомозиготных позиций, $N_{0/0}$ – число референсных гомозиготных позиций. Для сравнения количественных показателей между группами применяли двухвыборочный t-критерий Стьюдента после проверки выборок на нормальность распределения критерием Шапиро-Уилка.

Для количественной оценки генетической дивергенции между группами крыс Wistar/Icgn и OXYS рассчитывали индекс фиксации Райта (F_{ST}) с использованием утилиты VCFtools v0.1.16 [176]. Расчет проводился по 10 042 702 информативным (исключая позиции с неполными или отсутствующими генотипами) биаллельным позициям.

Расчет частот аллелей и генотипов по девяти целевым локусам проводили на объединенной выборке животных (Wistar/Icgn, n = 13; OXYS, n = 13), включающей образцы полногеномного секвенирования и секвенирования по Сэнгеру.

Все расчеты выполняли в программной среде R v4.5.3.

2.2. Результаты и обсуждение

Для крыс OXYS средняя глубина покрытия генома составила 32,36×, для Wistar/Icgn – 28,88×. Глубина покрытия геномов каждого из образцов представлена в таблице 2.3.

Таблица 2.3 – Глубина покрытия генома каждого образца

Wistar 5	Wistar 22	Wistar 37	OXYS 17	OXYS 30	OXYS 34
28,88×	31,10×	26,69×	38,03×	30,23×	28,81×

В геномах крыс Wistar/Icgn и OXYS было найдено в общей сложности 12 412 404 генетических варианта, отличающих их от референсной сборки mRatBN7.2.

На основе генотипов образцов по совокупности этих вариантов был проведен PCA. Распределение образцов по двум главным компонентам (PC1 и PC2) показывает, что группы OXYS и Wistar/Icgn расходятся по PC1 (Рисунок 2.2). При этом образцы крыс OXYS плотно сгруппированы, что указывает на генетическую однородность группы. Такой результат на PCA согласуется с высокой степенью инбридинга данной линии крыс.

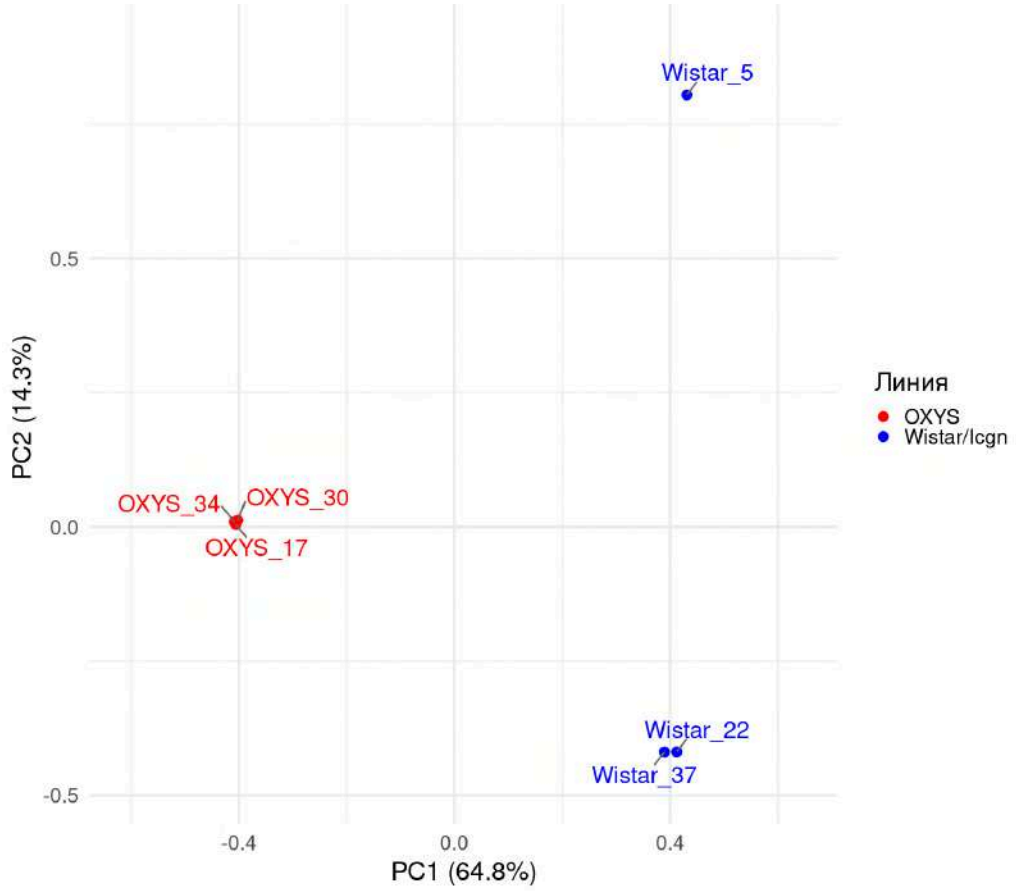


Рисунок 2.2 – Анализ главных компонент (PCA) на основе генотипов крыс линий Wistar/Icgn (синие точки) и OXYS (красные точки). Ось X: первая компонента (PC1), объясняющая 64,8% дисперсии данных. Ось Y: вторая компонента (PC2), объясняющая 14,3% дисперсии данных

Подсчет соотношения генотипов выявил повышение доли гомозиготных позиций в геномах группы крыс OXYS по сравнению с группой Wistar/Icgn (Таблица 2.4). В контрольной группе Wistar/Icgn доля гетерозиготных позиций (Het) составила в среднем 33,32 ± 1,38%, а суммарная доля гомозиготных позиций (Hom) – 66,68 ± 1,38%. В группе крыс OXYS доля гетерозиготных позиций оказалась статистически значимо ниже в сравнении с Wistar/Icgn и составила 14,26 ± 0,47% (p-value = 0,0006), тогда как доля гомозиготных позиций была статистически значимо выше и достигла 85,74 ± 0,47% (p-value = 0,0006). Данный сдвиг также проявлялся в снижении индекса гетерозиготности (соотношения гетерозигот и альтернативных гомозигот): с 0,88 ± 0,06 у Wistar/Icgn (для ОНВ – 0,92 ± 0,06) до 0,30 ± 0,01 у OXYS (p-value = 0,0030; для ОНВ – 0,34 ± 0,01, p-value = 0,0028), что свидетельствует о выраженном снижении внутрилинейного генетического разнообразия у крыс OXYS и отражает результат длительного инбридинга и фиксации аллелей.

Таблица 2.4 – Распределение гетеро- и гомозиготных генотипов у крыс OXYS и Wistar/Icgn

Образец	Гетерозиготы (0/1), шт.	Альтернативные гомозиготы (1/1), шт.	Референсные гомозиготы (0/0), шт.	Индекс гетерозиготности (общий)	Индекс гетерозиготности по ОНВ	Het, %	Hom, %
22w_rat	3 953 324	4 753 866	3 585 026	0,83	0,87	32,16	67,84
37w_rat	4 280 290	4 483 109	3 521 501	0,95	0,99	34,84	65,16
5w_rat	4 055 924	4 666 235	3 581 778	0,87	0,91	32,96	67,04
Wistar (M ± SD)	**4 096 513 ± 167 180**	**4 634 403 ± 138 148**	**3 562 768 ± 35 777**	**0,88 ± 0,06**	**0,92 ± 0,06**	**33,32 ± 1,38**	**66,68 ± 1,38**
OXYS_17	1 779 727	5 883 868	4 638 831	0,3	0,35	14,47	85,53
OXYS_30	1 792 229	5 842 402	4 645 706	0,31	0,35	14,59	85,41
OXYS_34	1 683 542	5 893 911	4 697 594	0,29	0,33	13,72	86,28
OXYS (M ± SD)	**1 751 833 ± 59 478**	**5 873 394 ± 27 291**	**4 660 710 ± 32 135**	**0,30 ± 0,01**	**0,34 ± 0,01**	**14,26 ± 0,47**	**85,74 ± 0,47**

Данные по группам представлены в виде M ± SD (среднее ± стандартное отклонение)
Индекс гетерозиготности – отношение числа гетерозиготных позиций (0/1) к числу альтернативных гомозиготных позиций (1/1); Het, % – доля гетерозиготных позиций; Hom, % – суммарная доля гомозиготных позиций (0/0 и 1/1)

Для оценки степени межгрупповых генетических различий был рассчитан F_{ST} по 10 042 702 информативным полиморфным позициям (из 12 412 404). Средневзвешенное

полногеномное значение (weighted F_{ST}) составило 0,475 (среднее невзвешенное F_{ST} – 0,312), что по классической шкале Райта соответствует крайне высокой степени генетических различий исследуемых групп. В 1 036 962 локусах (10,3%) отмечено полное расхождение групп по гомозиготным генотипам (F_{ST} = 1,0), а в 3 548 683 позициях (35,3%) значение индекса превысило порог $F_{ST} \geq 0{,}4$, соответствующий фиксации аллеля в одной из линий при сохранении гетерозиготности в другой. Полученные значения свидетельствуют о сильной генетической дивергенции крыс линии OXYS от родительской линии Wistar/Icgn.

2.2.1. Анализ однонуклеотидных вариантов (ОНВ) и инсерций/делеций (инделов)

Поскольку линия крыс OXYS является инбредной, ожидается, что генетические варианты, ассоциированные с ее фенотипом, зафиксированы у всех особей в гомозиготном состоянии. Исходя их этого из всех генетических вариантов были отобраны 1 363 823 позиции (с глубиной покрытия ≥ 10×), по которым все три OXYS крысы были гомозиготами по одному и тому же аллелю, а среди животных из контрольной линии Wistar/Icgn гомозиготные особи по этому аллелю отсутствовали. Затем проводили фильтрацию вариантов по предсказанному влиянию на структуру транскриптов и кодируемых белков. Были отобраны варианты с высоким предсказанным влиянием (vep filter “IMPACT is HIGH”), а также миссенс-варианты с умеренным предсказанным влиянием (vep filter “IMPACT is MODERATE”), классифицированные алгоритмом SIFT как повреждающие (категории deleterious или deleterious_low_confidence; далее по тексту – повреждающие варианты). Следующий этап фильтрации проходил путем пересечения позиций данных вариантов у крыс OXYS и 146 линий крыс из RGD с отбором вариантов, присутствующих только у OXYS. Из полученного списка генетических вариантов далее проводился отбор вариантов в генах, вовлеченных в ключевые молекулярные пути и биологические процессы, связанные со старением и возрастными патологиями, такими как окислительный стресс, нейродегенерация, когнитивные и зрительные нарушения, саркопения, кардиомиопатия и расстройства липидного обмена. Варианты, расположенные в регионах с низким качеством картирования или артефактами выравнивания, были исключены из дальнейшего анализа. В результате были отобраны миссенс-варианты в генах *Abca1*, *Apob*, *Cic*, *Nqo2*, *Akap6*, *Cmya5*, *Cerkl* и *Bfsp1* (Рисунок 2.3, Таблица 2.5).

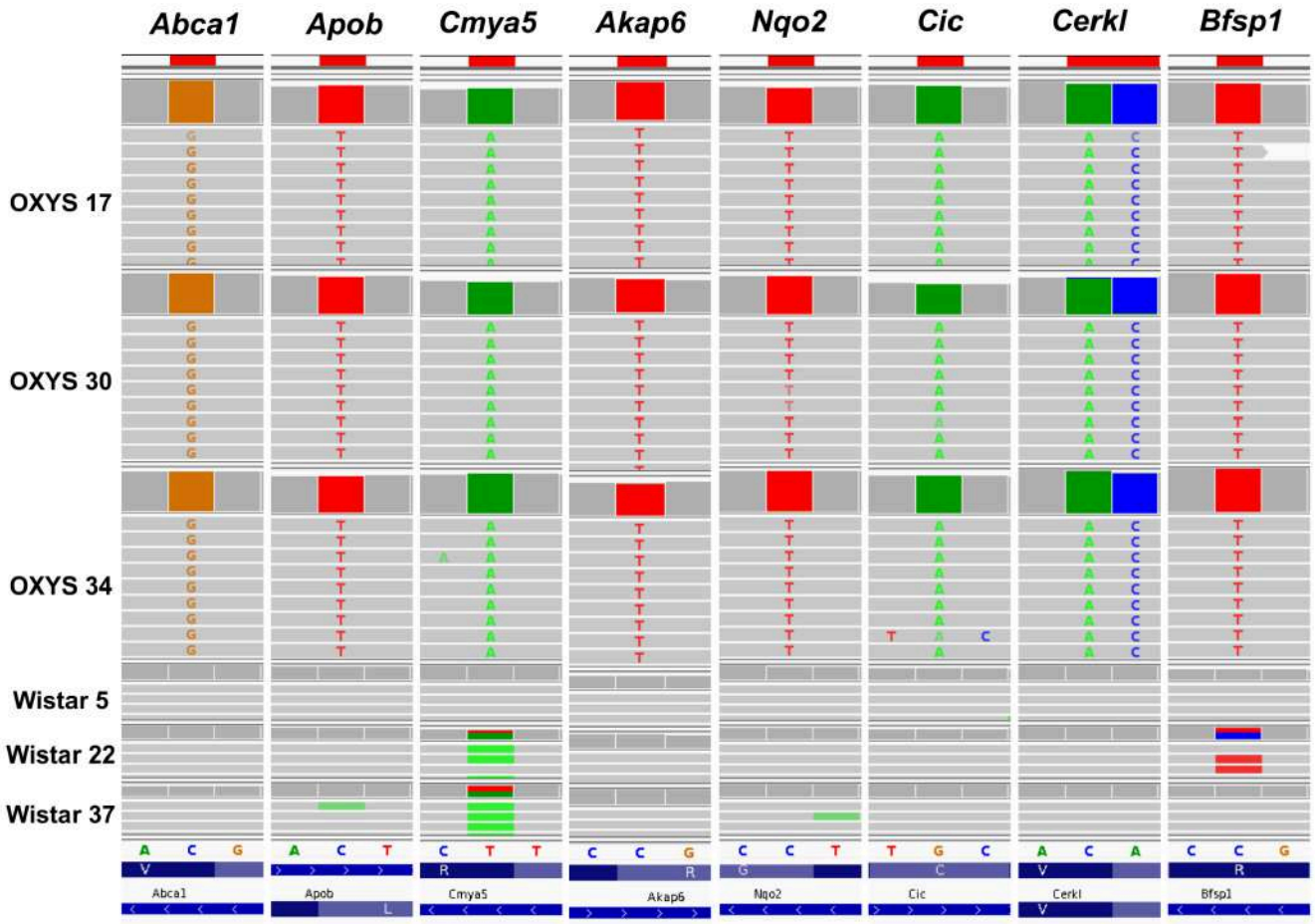


Рисунок 2.3 – Геномные регионы, содержащие миссенс-варианты крыс OXYS в генах *Abca1*, *Apob*, *Cic*, *Nqo2*, *Akap6*, *Cmya5*, *Cerkl* и *Bfsp1*. Визуализация выполнена в IGV

Таблица 2.5 – Миссенс-варианты крыс OXYS в генах-кандидатах и генотипы всех анализируемых образцов (0 – референсный аллель, 1 – альтернативный)

Геномные координаты	Референсный аллель	Альтернативный аллель	Ген	Замена в транскрипте	Аминокислотная замена	OXYS 17	OXYS 30	OXYS 34	Wistar 5	Wistar 22	Wistar 37
5:67 724 612	C	G	*Abca1*	ENSRNOT00000110113.1: c.2083G>C	ENSRNOP00000078596.1: p.Val695Leu	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	0/0
6:30 878 853	C	T	*Apob*	ENSRNOT00000046811.5: c.10237C>T	ENSRNOP00000039779.2: p.Leu3413Phe	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	0/0

Продолжение таблицы 2.5

2:24 306 965	T	A	*Cmya5*	ENSRNOT00000073710.4:c.11011A>T	ENSRNOP00000064514.2:p.Arg3671Trp	1/1	1/1	1/1	0/0	0/1	0/1
6:70 399 863	C	T	*Akap6*	ENSRNOT00000006562.4:c.2443C>T	ENSRNOP00000006562.2:p.Arg815Trp	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	0/0
17:30 913 758	C	T	*Nqo2*	ENSRNOT00000024141.6:c.370G>A	ENSRNOP00000024141.5:p.Gly124Arg	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	0/0
1:80 874 547	G	A	*Cic*	ENSRNOT00000101741.1:c.4235G>A	ENSRNOP00000094181.1:p.Cys1412Tyr	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	0/0
3:64 239 860	C	A	*Cerkl*	ENSRNOT00000057878.6:c.1345G>T	ENSRNOP00000054687.5:p.Val449Leu	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	0/0
3:64 239 861	A	C	*Cerkl*	ENSRNOT00000057878.6:c.1344T>G	ENSRNOP00000054687.5:p.Phe448Leu	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	0/0
3:131 199 280	C	T	*Bfsp1*	ENSRNOT00000007727.6:c.827G>A	ENSRNOP00000007727.4:p.Arg276Gln	1/1	1/1	1/1	0/0	0/1	0/0

2.2.1.1. Нарушения липидного обмена

Нарушения липидного обмена вносят существенный вклад в патогенез БА [177], поэтому повреждающие миссенс-варианты в генах, связанных с липидным метаболизмом, были рассмотрены как потенциальные кандидаты, определяющие развитие у крыс OXYS БА-подобной патологии. Несмотря на то, что в период активной манифестации признаков БА дислипидемия и окислительный стресс у крыс OXYS не выявляются, а уровень холестерина в крови даже снижен [178], замены в данных генах, вероятно, могут реализовываться на

локальном уровне. Известно, что сосудистая дисфункция вносит существенный вклад в развитие у крыс OXYS как признаков БА [179] и ВМД [139], так и гипертрофической кардиомиопатии [180]. Таким образом, локальные нарушения липидного обмена в сосудах могут провоцировать изменения, общие для этих патологий.

Ген *Abca1* кодирует АТФ-связывающий кассетный транспортер 1 и экспрессируется преимущественно в жировой ткани и печени, а также в различных типах иммунных клеток крыс [181,182]. Миссенс замена 5:67724612 C>G в *Abca1* приводит к замене валина на лейцин в позиции 695 (V695L) белка. Регион, в котором обнаружена замена, обогащен гидрофобными аминокислотными остатками. Валин (V) в гомологичной позиции находится у большинства проанализированных ортологов, однако встречаются и другие гидрофобные аминокислоты: метионин (M) у двух птиц (банкивский петух – *Gallus gallus*, беркут – *Aquila chrysaetos*) и изолейцин (I) у атлантического лосося – *Salmo salar* (Рисунок 2.4, А). Среди ортологов грызунов и родственных им видов у одного животного, арктического суслика (*Urocitellus parryii*), в позиции 695 – лейцин (L) (Рисунок В.1, А). По данным Ensembl v115 у белка Abca1 есть 15 древних паралогов. В гомологичной позиции кроме валина (V) у паралогов есть и другие гидрофобные аминокислоты: изолейцин (I), аланин (A), метионин (M) и лейцин (L) (Рисунок 2.4, Б). Анализ предсказанной пространственной структуры белка показал, что замена V695L расположена в одном из трансмембранных доменов Abca1 и не влияет на его упаковку и локальные аминокислотные взаимодействия (Рисунок 2.4, В).

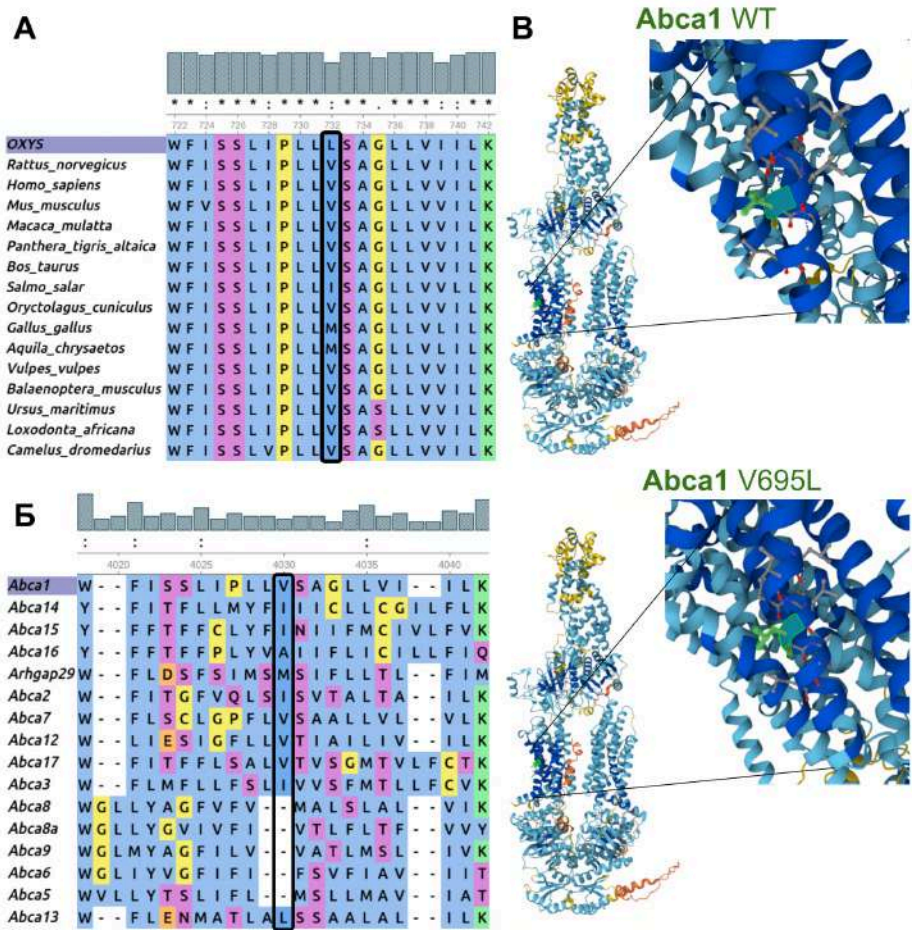


Рисунок 2.4 – **А.** Множественное выравнивание ортологов белка Abca1 среди эволюционно далеких видов животных. **Б.** Множественное выравнивание паралогов белка Abca1. Полярные незаряженные АК обозначены фиолетовым (S, T, N, Q), гидрофобные – голубым (A, V, I, L, M, F, Y, W), положительно заряженные – зеленым (R, H, K), отрицательно – оранжевым (D, E), другие – желтым (C, G, P). Высота столбца над АК соответствует степени ее эволюционной консервативности. **В.** Пространственная структура белка Abca1 дикого типа (WT) и с заменой V695L. Аминокислота в положении 695 подсвечена зеленым

ABCA1 играет ключевую роль в процессе транспортировки холестерина и фосфолипидов через клеточную мембрану, важном для формирования липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) в печени [183,184], а также участвует в метаболизме липидов головного мозга и выведении Aβ. Показано, что варианты гене *ABCA1* вносят значительный вклад в развитие БА [185]. Тем не менее, замена V695L, найденная у крыс OXYS, скорее функционально не значима, поскольку расположена в гидрофобном трансмембранном домене и не приводит к структурным изменениям в белке Abca1.

Ген *Apob* кодирует две изоформы аполипопротеина B: ApoB-100 – структурный белок липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), синтезируемый в печени, и ApoB-48 – компонет хиломикронов, липопротеиновых частиц клеток тонкого кишечника. В *Apob* у крыс OXYS найдена миссенс-замена 6:30 878 853 C>T, приводящая к L3413F в белке. По данным Ensembl

v115 паралоги у данного гена отсутствуют. Большинство анализируемых ортологов белка ApoB-100 также содержат лейцин (L) в гомологичной позиции. Однако у дикого кролика (*Oryctolagus cuniculus*) и атлантического лосося (*Salmo salar*) – фенилаланин (F) (Рисунок В.1, Б; Рисунок 2.5, А). Замена L3413F расположена в гепарин-связывающем домене, который опосредует связывание частиц ЛПНП с протеогликанами внеклеточного матрикса [186]. По анализу пространственной структуры белка данная замена не приводит к конформационным изменениям внутри домена (Рисунок 2.5, Б).

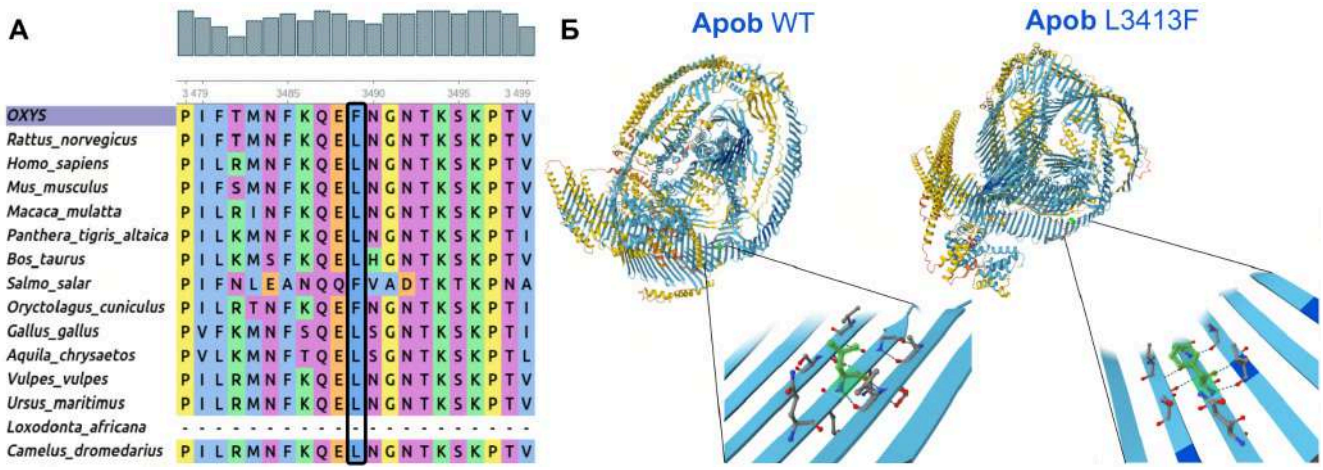


Рисунок 2.5 – **А.** Множественное выравнивание ортологов белка Apob среди эволюционно далеких видов животных. Полярные незаряженные АК обозначены фиолетовым (S, T, N, Q), гидрофобные – голубым (A, V, I, L, M, F, Y, W), положительно заряженные – зеленым (R, H, K), отрицательно – оранжевым (D, E), другие – желтым (C, G, P). Высота столбца над АК соответствует степени ее эволюционной консервативности. **Б.** Пространственная структура белка Apob дикого типа (WT) и с заменой L3413F. Аминокислота в положении 3413 подсвечена зеленым

ApoB-100 участвует в синтезе и секреции липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) – предшественников ЛПНП, необходимых для транспорта эндогенных триглицеридов и холестерина в кровь [187]. Гепарин-связывающий домен определяет эффективность взаимодействия ЛПНП с протеогликанами внеклеточного матрикса в субэндотелиальном слое сосудов. ЛПНП могут подвергаться различным модификациям (агрегации, окислению), что запускает воспалительные реакции и усиливает атерогенез [188]. Кроме того, ApoB-100 служит лигандом для рецепторов ЛПНП на гепатоцитах, опосредуя захват и выведение ApoB-содержащих частиц печенью [187]. Фенилаланин (F) в положении 3413 кроме крыс OXYS по анализу ортологов встречается также у дикого кролика и атлантического лосося, что свидетельствует в пользу отсутствия значимого влияния этой замены на функции белка Apob.

Несмотря на то, что аминокислоты лейцин (L) и фенилаланин (F) имеют разную структуру замена L3413F, вероятно, относится к вариантам с низким или отсутствующим функциональным воздействием.

2.2.1.2. Патологии мышечной ткани (саркопения и кардиомиопатия)

У крыс OXYS саркопения и гипертрофическая кардиомиопатия развиваются на фоне структурных нарушений митохондриального аппарата. В скелетных мышцах возрастные изменения затрагивают как общую структуру митохондриома мышечных волокон, так и внутреннюю структуру органелл, что рассматривается как одна из основных причин развития саркопении [136]. В миокарде данные процессы сопровождаются развитием гипертрофической кардиомиопатии, которая у крыс OXYS регистрируется к 12 месяцам на фоне артериальной гипертензии. Ключевым молекулярным механизмом при этом является возрастное увеличение фосфорилирования αB-кристаллина (по остатку Ser59) и его транслокация из растворимой фракции в нерастворимую, с накоплением в исчерченных саркомерах кардиомиоцитов. Этот процесс, протекающий у линии OXYS быстрее, чем у контрольных крыс Wistar, нарушает сократительную функцию и структуру миофибрилл, предшествуя развитию кардиомиопатии [180].

Ген Cmya5 кодирует миосприн – крупный цитоскелетный якорный белок, участвующий в поддержании структурной организации сократительного аппарата кардиомиоцитов и волокон скелетных мышц, а также в регуляции кальциевого обмена [189,190]. Найденная в нем миссенс-замена 2:24 306 965 T>A приводит к R3671W в белке. Аргинин (R) в гомологичном положении достаточно консервативен у проанализированных ортологов белка как у эволюционно далеких видов животных (Рисунок 2.6, А), так и среди грызунов и родственных им видов (Рисунок В.1, В). У банкивского петуха (*Gallus gallus*) в гомологичной позиции находится лизин (K), который структурно похож на аргинин и также относится к положительно заряженным аминокислотам (Рисунок 2.6, А). Белок Cmya5 имеет три эволюционно древних паралога: Fsd1, Fsd2 и Fsd1l, один из которых – Fsd2, также экспрессируется в мышечной ткани, где входит в комплекс с миосприном и взаимодействует с рецепторами RyR2, участвуя в регуляции кальциевого гомеостаза [190]. Все паралоги также содержат положительно заряженную аминокислоту в гомологичной позиции (R или H) (Рисунок 2.6, Б). Согласно аннотации R3671W локализована в первом домене фибронектина типа III (FN3-1), который принимает участие во взаимодействии с С-концом титина в М-линии саркомера и опосредует

его стабилизацию [191]. На пространственной модели белка видно, что замена аргинина (R) на триптофан (W) в положении 3671 влияет на локальные взаимодействия с соседними аминокислотами в β-складчатой структуре и может нарушить ее упаковку (Рисунок 2.6, В).

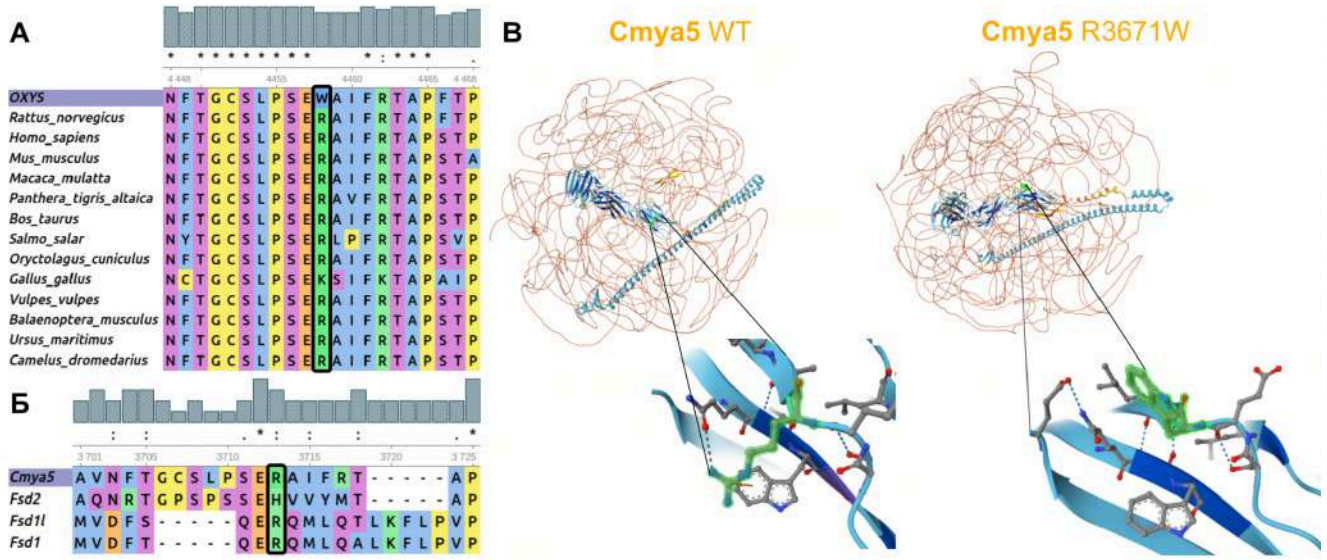


Рисунок 2.6 – **А.** Множественное выравнивание ортологов белка Cmya5 среди эволюционно далеких видов животных. **Б.** Множественное выравнивание паралогов белка Cmya5. Полярные незаряженные АК обозначены фиолетовым (S, T, N, Q), гидрофобные – голубым (A, V, I, L, M, F, Y, W), положительно заряженные – зеленым (R, H, K), отрицательно – оранжевым (D, E), другие – желтым (C, G, P). Высота столбца над АК соответствует степени ее эволюционной консервативности. **В.** Пространственная структура белка Cmya5 дикого типа (WT) и с заменой R3671W. Аминокислота в положении 3671 подсвечена зеленым

Нарушение функций миосприна вовлечено в патогенез мышечной дистрофии Дюшенна – наследственного заболевания, характеризующегося прогрессирующей дегенерацией скелетных мышц и нарастающей мышечной слабостью. У мышиной модели этого заболевания снижена экспрессия *Cmya5* и нарушена локализация кодируемого им белка в мышечных волокнах [192]. В гомологичной позиции 3671 как у ортологов, так и у паралогов Cmya5 обнаруживаются исключительно положительно заряженные аминокислоты, в то время как возникающий в результате замены триптофан (W) у крыс OXYS гидрофобен, имеет крупный ароматический радикал и не несет заряда. Замена R3671W способна нарушить локальные внутридоменные взаимодействия и ослабить взаимодействие миосприна с другими белками (в частности, с титином). Это может приводить к дестабилизации саркомеров как в скелетной, так и в сердечной мышечной ткани, способствуя развитию саркопении и гипертрофической кардиомиопатии у крыс OXYS.

Ген *Akap6* кодирует адаптерный белок, закрепляющий сигнальные комплексы в ядерной оболочке и саркоплазматическом ретикулуме [193,194]. У крыс он экспрессируется преимущественно в сердце, скелетной мускулатуре и головном мозге, включая гиппокамп и кору больших полушарий [181,182]. Миссенс-вариант 6:70 399 863 C>T влечет замену R815W в белке. Akap6 имеет только один паралог, Cep68, который не выравнивается с ним в области замены. Анализ множественного выравнивания ортологов показывает, что в гомологичной позиции у всех исследуемых видов животных присутствует либо аргинин (R), либо лизин (K) – положительнозаряженные аминокислотные остатки (Рисунок 2.7, А; Рисунок В.1, Г). Обнаруженная у крыс OXYS замена аргинина (R) на триптофан (W) в положении 815 (R815W) расположена в одной из α-спиралей первого спектринового повтора (SR1). Через спектриновые повторы AKAP6 обеспечивает сборку нецентросомального центра организации микротрубочек на ядерной оболочке кардиомиоцитов, выступая адаптером между несприном-1α, перицентрином и AKAP9 [194]. Анализ пространственной структуры белков не демонстрирует изменений в упаковке домена при замене R815W (Рисунок 2.7, Б).

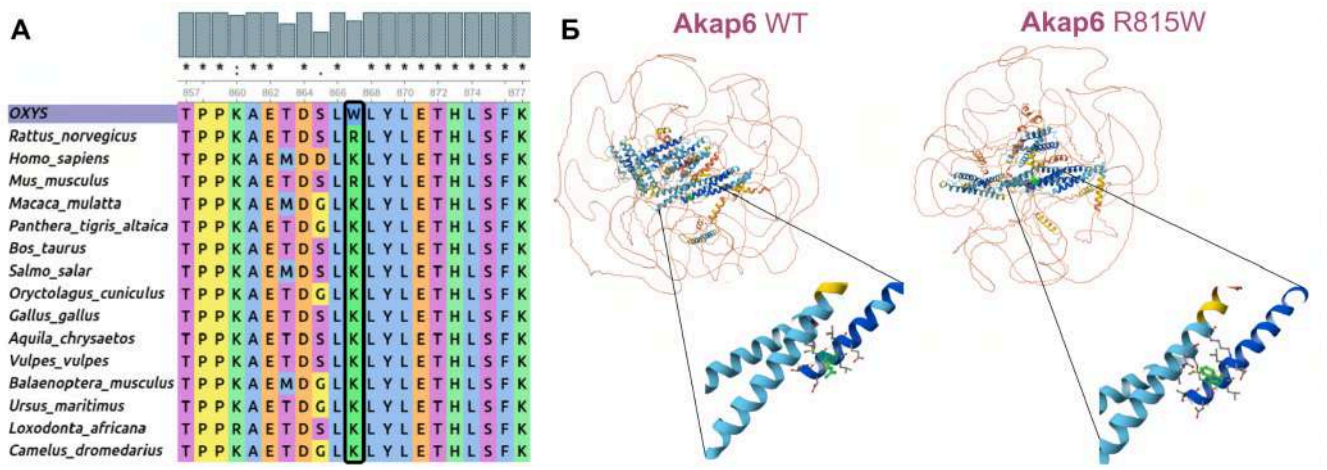


Рисунок 2.7 – **А.** Множественное выравнивание ортологов белка Akap6 среди эволюционно далеких видов животных. Полярные незаряженные АК обозначены фиолетовым (S, T, N, Q), гидрофобные – голубым (A, V, I, L, M, F, Y, W), положительно заряженные – зеленым (R, H, K), отрицательно – оранжевым (D, E), другие – желтым (C, G, P). Высота столбца над АК соответствует степени ее эволюционной консервативности. **Б.** Пространственная структура белка Akap6 дикого типа (WT) и с заменой R815W. Аминокислота в положении 815 подсвечена зеленым

Замена R815W является неконсервативной, поскольку пространственная структура и химические свойства аминокислотных остатков аргинина и триптофана существенно отличаются. Несмотря на показанное отсутствие влияния данной замены на глобальную

укладку SR1-домена Akap6, она способна привести к нарушению белок-белковых взаимодействий, которые он опосредует, за счет изменения локального заряда и стерических свойств поверхности домена. Помимо адапторной функции в кардиомиоцитах, AKAP6 участвует в регуляции дифференцировки миобластов и регенерации скелетных мышц. Показано, что подавление его экспрессии нарушает формирование миотрубок и восстановление мышечной ткани после повреждения, а также снижает двигательную активность у мышей [195]. Таким образом, замена R815W в SR1-домене Akap6 способна внести вклад в развитие патологий скелетных мышц и миокарда у крыс OXYS.

2.2.1.3. Когнитивные нарушения и нейродегенерация

Уже в раннем постнатальном периоде у крыс OXYS наблюдается задержка созревания мозга, связанная с изменением баланса пролиферации и гибели нейронных предшественников, что проявляется в сдвиге пиков нейрогенеза и апоптоза в гиппокампе [196]. Первые признаки поведенческих нарушений (снижение локомоторной и исследовательской активности, повышение тревожности), а также нарушения обучения и памяти выявляются у крыс OXYS в возрасте 3 месяцев, одновременно со снижением синаптической пластичности и первыми признаками нейродегенерации, а также появлением очагов демиелинизации. С возрастом нейродегенеративные изменения в мозге OXYS усиливаются на фоне гиперпродукции АβPP, накопления Аβ и гиперфосфорилирования тау-белка в гиппокампе и коре; при этом гиперфосфорилирование и повышение уровня тау-белка обнаруживаются уже в 3-месячном возрасте, тогда как значительное накопление Аβ происходит позже – к 13 месяцам [8]. К 12 месяцам когнитивные и нейродегенеративные изменения у крыс OXYS прогрессируют: в этом возрасте регистрируется снижение объема мозга на 4% по сравнению с 3-месячными животными [8], а также структурно-функциональные нарушения церебральных сосудов, характерные для хронической ишемии [179,197].

Ген *Nqo2* кодирует флавин-зависимый белок Nqo2, который структурно гомологичен хинон дегидрогеназе Nqo1, но отличается по кофакторной специфичности: Nqo2 крайне неэффективно связывается с физиологическими кофакторами НАД(Ф)Н и, вероятно, выполняет преимущественно регуляторную, а не каталитическую функцию [198]. *Nqo2* высоко экспрессируется в почках, печени, а также в различных структурах мозга [181,182]. Миссенс-замена 17:30 913 758 C>T, обнаруженная у крыс OXYS в *Nqo2* приводит к G124R в белковом продукте. Глицин (G) в гомологичном положении высококонсервативен как среди

эволюционно далеких животных (Рисунок 2.8, А), так и среди грызунов и родственных им видов (Рисунок В.1, Д). Nqo2 имеет два паралога: AABR07044714, который возник только у крыс и более древний Nqo1. Оба паралога также содержат глицин (G) в гомологичной позиции (Рисунок 2.8, Б). Замена локализована вблизи субстрат-связывающего кармана 127–129 FDV (фенилаланин–аспарагиновая кислота–валин) и из-за длинной боковой цепи аргинина нарушает связи между соседними аминокислотами (Рисунок 2.8, В), что может повлиять на белок-белковые взаимодействия, через которые осуществляется регуляторная функция Nqo2.

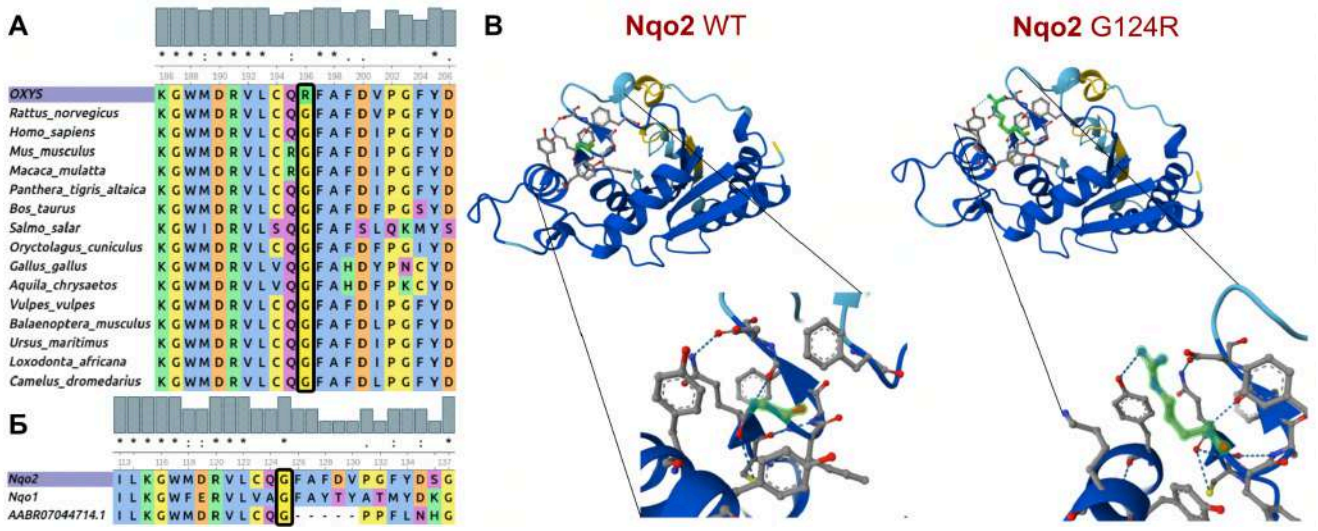


Рисунок 2.8 – **А.** Множественное выравнивание ортологов белка Nqo2 среди эволюционно далеких видов животных. **Б.** Множественное выравнивание паралогов белка Nqo2. Полярные незаряженные АК обозначены фиолетовым (S, T, N, Q), гидрофобные – голубым (A, V, I, L, M, F, Y, W), положительно заряженные – зеленым (R, H, K), отрицательно – оранжевым (D, E), другие – желтым (C, G, P). Высота столбца над АК соответствует степени ее эволюционной консервативности. **В.** Пространственная структура белка Nqo2 дикого типа (WT) и с заменой G124R. Аминокислота в положении 124 подсвечена зеленым

Описанная замена ранее была обнаружена в исследовании OHB на транскриптомных данных гиппокампа и префронтальной коры крыс OXYS и охарактеризована как предположительно связанная с нейродегенерацией и развитием БА [12]. Экспрессия *NQO*2 в мозге регистрируется в структурах, критически важных для когнитивных функций (включая гиппокамп и кору), и ее уровень повышается с возрастом и при развитии БА [199]. Роль NQO2 в процессах обучения и консолидации памяти может быть связана с его влиянием на клеточный метаболизм и продукцию АФК, в том числе генерируемых митохондриями [198]. NQO2 также вовлечен в регуляцию окислительного стресса, воспаления, аутофагии и апоптоза, а также способен взаимодействовать с рядом биоактивных соединений, включая некоторые

противоопухолевые препараты [198,199]. Таким образом, вариант в гене *Nqo2* выступает в качестве потенциального фактора, влияющего на развитие нейропатологий у крыс OXYS.

Ген *Cic* кодирует транскрипционный репрессор Capicua. Уровень его экспрессии наиболее высок в нервной ткани [181,182]. Выявленный у крыс OXYS вариант 1:80 874 547 G>A ведет к аминокислотной замене C1412Y, которая локализована в высоко консервативном регионе белка (Рисунок 2.9, А). У всех проанализированных ортологов в гомологичном положении расположен цистеин (C) (Рисунок 2.9, А; Рисунок В.1, Е). Cic имеет всего один древний паралог, Bbx, который не гомологичен ему в области замены. Большая часть смоделированной структуры белка не организовалась в упорядоченные регионы и была охарактеризована как предсказанная с низкой надежностью (pLDDT < 50), в том числе и область, в которой расположена замена (Рисунок 2.9, Б).

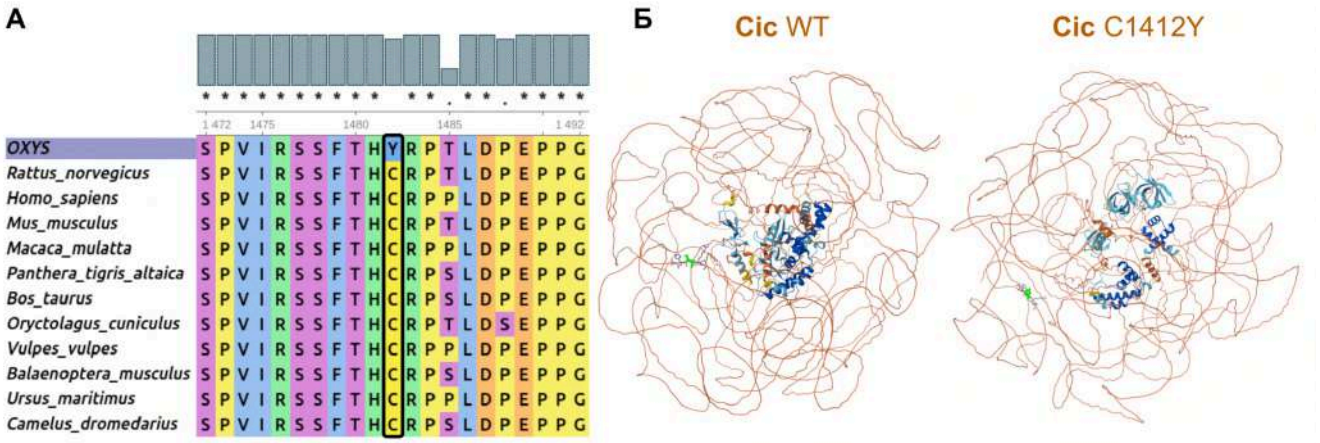


Рисунок 2.9 – А. Множественное выравнивание ортологов белка Cic среди эволюционно далеких видов животных. Полярные незаряженные АК обозначены фиолетовым (S, T, N, Q), гидрофобные – голубым (A, V, I, L, M, F, Y, W), положительно заряженные – зеленым (R, H, K), отрицательно – оранжевым (D, E), другие – желтым (C, G, P). Высота столбца над АК соответствует степени ее эволюционной консервативности. **Б.** Пространственная структура белка Cic дикого типа (WT) и с заменой C1412Y. Аминокислота в положении 1412 подсвечена зеленым

Capicua является ключевым эффектором сигнального пути RTK/RAS/MAPK, регулирующего нейрогенез, и в частности, баланс пролиферации и дифференцировки нейрональных предшественников в гиппокампе [200]. Он также выступает как супрессор для различных типов опухолей, ингибируя транскрипцию онкогенов семейства ETS [201]. Патогенные варианты в *CIC* описаны в человеческих олигодендроглиомах: снижение активности белка стимулирует пролиферацию глиальных клеток через активацию онкогенов

ETV1/4/5 [202]. Показано, что локальный нокаут *Cic* в гиппокампе мышей приводит к сокращению пула нейрональных предшественников, а также нарушению их дифференцировки, миграции и формирования дендритных ветвлений [200]. Исходя из этого можно предположить, что найденный миссенс-вариант в *Cic* может вносить вклад в выявленную у крыс OXYS задержку созревания мозга в ранний постнатальный период [196].

Описанная **в подразделе 2.2.1.2** замена R815W в SR1 домене Akap6 также может рассматриваться как ассоциированная с патологиями нервной системы. Как и замена в Nqo2, она ранее была найдена в исследовании OHB на транскриптомных данных гиппокампа и префронтальной коры крыс OXYS и охарактеризована как связанная с когнитивными нарушениями [12]. Исследования полногеномных ассоциаций выявили связь варианта *AKAP6* rs17522122 с нарушениями эпизодической памяти, скорости восприятия и других когнитивных функций у пожилых людей [203]. Кроме того, AKAP6 участвует в реализации нейропротекторных механизмов, обеспечивающих выживание ганглиозных клеток сетчатки после повреждения зрительного нерва [204]. AKAP6 обеспечивает пространственную организацию сигнального комплекса кальциневрина и транскрипционного фактора NFATc4, опосредующего нейропротекторное действие BDNF. Подавление экспрессии *Akap6* в гиппокампальных нейронах снижает BDNF-зависимую транскрипционную активность NFAT, а нарушение связывания кальциневрина с AKAP6 ослабляет нейропротекторный эффект BDNF в ганглиозных клетках сетчатки [205]. В связи с этим можно предположить, что наличие аминокислотной замены R815W в домене спектриновых повторов Akap6 способно нарушить целостность перинуклеарного комплекса, приводя к ослаблению про-выживательных сигналов и повышая уязвимость нейронов к стрессу и дегенерации.

2.2.1.4. Офтальмологические патологии (ретинопатия и катаракта)

Катаракта является признаком, по которому шла селекция крыс OXYS. После отбора чувствительных к катарактогенному эффекту галактозы крыс, проводили инбридинг, в результате которого этот признак стал развиваться спонтанно. Сцепленно с ним крысы OXYS унаследовали синдром преждевременного старения [7]. Уже в возрасте 2 месяцев у них наблюдаются первые изменения в хрусталике, а к 6 месяцам катаракта выявляется у 100% животных, прогрессируя к 12 месяцам до двухстороннего поражения. Морфологически процесс характеризуется дегенерацией эпителиальных клеток и деформацией волокон хрусталика, что сопровождается повышением уровня маркеров перекисного окисления липидов и

окислительного повреждения ДНК [206]. Метаболические нарушения в хрусталике предшествуют морфологическим проявлениям и включают дисбаланс аминокислот, а также снижение уровня глюкозы и ключевых метаболитов антиоксидантной защиты [207].

Клинические проявления ретинопатии, аналогичной сухой форме ВМД у людей, проявляются у крыс OXYS к возрасту 3 месяцев на фоне структурно-функциональных изменений клеток РПЭ и нарушения микроциркуляции в хориоидее [208]. Патологические изменения сетчатки прогрессируют: ультраструктурные изменения РПЭ и развернутые формы ретинопатии наблюдаются с 12 месяцев и сопровождаются усиленным накоплением Aβ и липофусцина в клетках пигментного эпителия, нарушением их морфологии и реактивным глиозом, а к 24 месяцам приводят к полной потере фоторецепторов [139,208].

Ген *Cerkl* участвует в регуляции аутофагии, динамики митохондрий и метаболизма, а также играет важную роль в защите мозга, фоторецепторов и РПЭ от окислительного стресса и апоптоза [209–211]. Он экспрессируется преимущественно в сетчатке глаза [181,182]. Выявленные у крыс OXYS в *Cerkl* две миссенс-замены 3:64 239 860 C>A и 3:64 239 861 A>C приводят к идущим подряд аминокислотным заменам F448L и V449L. Фенилаланин (F) в положении 448 консервативен среди всех ортологов Cerkl как у эволюционно далеких видов (Рисунок 2.10, А), так и у грызунов (Рисунок В.1, Ж). В то время как в положении 449 у грызунов кроме валина (V) встречается также изолейцин (I) и аланин (A) (Рисунок В.1, Ж). У белка Cerkl есть четыре эволюционно древних паралога (Cerk, Sphk1, Sphk2, Agk), которые демонстрируют низкое аминокислотное сходство в участке локализации замен, однако большинство из них содержат там гидрофобные аминокислотные остатки (Рисунок 2.10, Б). Обе замены локализуются в неупорядоченной С-концевой области белка, обогащенной гидрофобными аминокислотными остатками, и не влияют значительно на ее структуру (Рисунок 2.10, В).

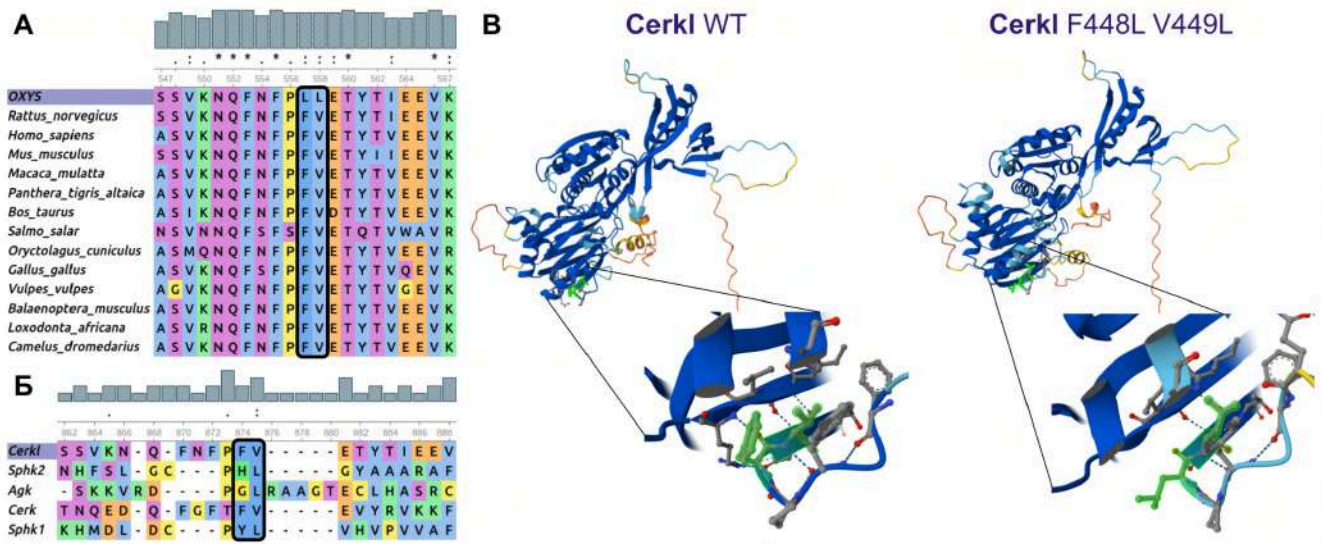


Рисунок 2.10 – **А.** Множественное выравнивание ортологов белка Cerkl среди эволюционно далеких видов животных. **Б.** Множественное выравнивание паралогов белка Cerkl. Полярные незаряженные АК обозначены фиолетовым (S, T, N, Q), гидрофобные – голубым (A, V, I, L, M, F, Y, W), положительно заряженные – зеленым (R, H, K), отрицательно – оранжевым (D, E), другие – желтым (C, G, P). Высота столбца над АК соответствует степени ее эволюционной консервативности. **В.** Пространственная структура белка Cerkl дикого типа (WT) и с заменами F448L и V449L. Аминокислоты в положениях 448 и 449 подсвечены зеленым

Cerkl является важным цитопротектором фоторецепторов и клеток РПЭ от окислительного стресса и апоптоза [211]. Мутации в *CERKL* у людей вызывают дистрофии сетчатки, характеризующиеся прогрессирующей дегенерацией нейронов, которая в конечном итоге приводит к потере зрения [212–214]. Подавление экспрессии *Cerkl* в сетчатке мышей сопровождалось повышением уровня АФК, нарушением метаболизма глутатиона и усилением клеточного стресс-ответа, что повышало уязвимость фоторецепторов к окислительному повреждению [215]. Две последовательные замены F448L и V449L в С-концевом регионе белка Cerkl, вероятно, не оказывают выраженного влияния на его функцию, поскольку являются консервативными по физико-химическим свойствам аминокислот и затрагивают участок, обогащенный гидрофобными остатками. Вместе с тем замена F448L затрагивает высококонсервативную позицию и приводит к уменьшению объема боковой цепи и утрате ароматического кольца, что позволяет предположить ее потенциально более существенное влияние на структурные свойства белка по сравнению с заменой V449L. Так, замена F448L, предположительно, связана с развитием признаков ВМД у крыс OXYS.

В гене *Bfsp1*, кодирующем структурный белок промежуточных филаментов хрусталика, найден вариант 3:131 199 280 C>T, который приводит к R276Q в белке. Аминокислота аргинин (R) в позиции 276 достаточно консервативна среди всех ортологов (Рисунок 2.11, А). Только у китайского хомячка (*Cricetulus griseus*), в гомологичной позиции находится триптофан (W)

(Рисунок В.1, 3). Белок Bfsp1 не имеет паралогов, что свидетельствует об уникальности его функции. Замена R276Q локализована в одном из α-спиральных доменов стержневой области, которая обеспечивает полимеризацию филаментов и их взаимодействие с Bfsp2 для формирования цитоскелета волокон хрусталика [216]. Анализ предсказанной структуры белка не выявил изменений в организации домена при замене R276Q (Рисунок 2.11, Б).

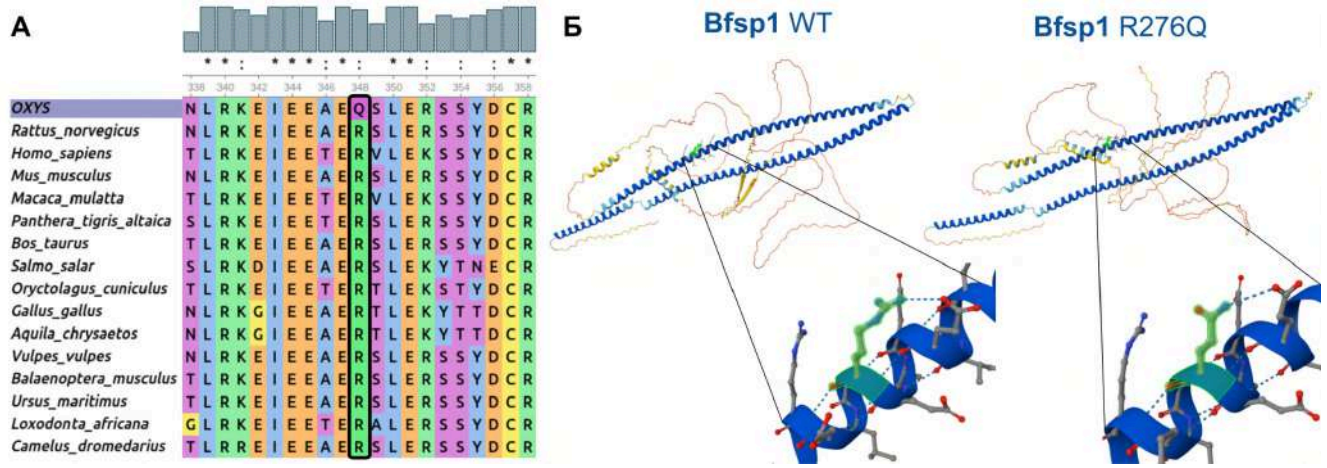


Рисунок 2.11 – **А.** Множественное выравнивание ортологов белка Bfsp1 среди эволюционно далеких видов животных. Полярные незаряженные АК обозначены фиолетовым (S, T, N, Q), гидрофобные – голубым (A, V, I, L, M, F, Y, W), положительно заряженные – зеленым (R, H, K), отрицательно – оранжевым (D, E), другие – желтым (C, G, P). Высота столбца над АК соответствует степени ее эволюционной консервативности. **Б.** Пространственная структура белка Bfsp1 дикого типа (WT) и с заменой R276Q. Аминокислота в положении 276 подсвечена зеленым

С нарушением функций BFSP1 связано развитие сенильной катаракты у человека [217]. Аминокислотная замена в BFSP1 с потерей заряда (D348N) описана как причина развития врожденной катаракты [218]. У *Bfsp1*-нокаутных мышей развивается прогрессирующая катаракта с потерей оптических свойств хрусталика [217]. Несмотря на сохранность общей укладки белка, потеря положительного заряда в результате замены аргинина (R) на глутамин (Q) в центре одного из α-спиральных доменов стержневой области может приводить к нарушению правильной сборки промежуточных филаментов хрусталика. Это повлечет за собой снижение их механической устойчивости, что приведет к деформации волокон и способно внести вклад в развитие катаракты у крыс OXYS.

2.2.1.5. Ускоренная инволюция тимуса

Инволюция тимуса – это процесс уменьшения объема вилочковой железы и угасания ее основных функций по созреванию Т-клеток. У крыс OXYS инволюция тимуса развивается значительно раньше и протекает интенсивнее, чем у контрольных крыс Wistar. Уже в 3-месячном возрасте у OXYS выявляются морфологические признаки инволюции: снижение плотности лимфоидных клеток в корковом и мозговом веществе, уменьшение числа бластов в субкапсулярной зоне, появление клеток с пикнотическими ядрами и макрофагов с фрагментами погибших лимфоцитов. Снижение активности Т-клеточного компартмента иммунной системы проявляется в 2,4-кратном ослаблении реакции гиперчувствительности замедленного типа [219]. Также с возраста 2-ух месяцев у OXYS наблюдается уменьшение количества CD3+, CD4+ и CD8+ клеток в тимусе по сравнению с крысами Wistar того же возраста [220]. В период с 2 до 14 месяцев объем тимуса у OXYS сокращается в 12,5 раз (против 6 раз у Wistar), объем коркового вещества – в 22 раза (против 10,7), мозгового – в 15 раз (против 6). На структурном уровне в ТЭК OXYS крыс выявлены выраженные изменения: уменьшение объема цитоплазмы, сокращение числа секреторных вакуолей, множественные аутофагосомы и фаголизосомы, что свидетельствует об усилении аутофагии как возможном механизме разрушения эпителиальной сети [131].

Для выявления потенциальных генетических детерминант ускоренной инволюции тимуса среди генов, несущих повреждающие варианты, был проведен анализ функциональной аннотации по биологическим процессам Gene Ontology (GO BP) [221] и молекулярным путям из базы данных Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) [222], связанным с функционированием иммунной системы, развитием эпителиальных клеток, регуляцией аутофагии, клеточным старением и апоптозом (Таблицы Г.1, Г.2). Для вариантов в генах, ассоциированных с указанными процессами и путями, определяли частоту встречаемости среди 146 линий крыс, представленных в RGD (AF) (Приложение А). Для дальнейшего анализа отбирали редкие варианты с AF < 0,05 (Таблица Д.1). Последующую приоритизацию генов-кандидатов проводили с учетом их функциональной роли, экспрессии в тимусе и консервативности участка белка, затронутого аминокислотной заменой. В результате были выделены гены (*Csf2rb*, *Pik3c2b, Tbc1d7* и *Notch4*), варианты в которых представляют интерес в контексте ускоренной инволюции тимуса у крыс OXYS (Рисунок 2.12, Таблица 2.6).

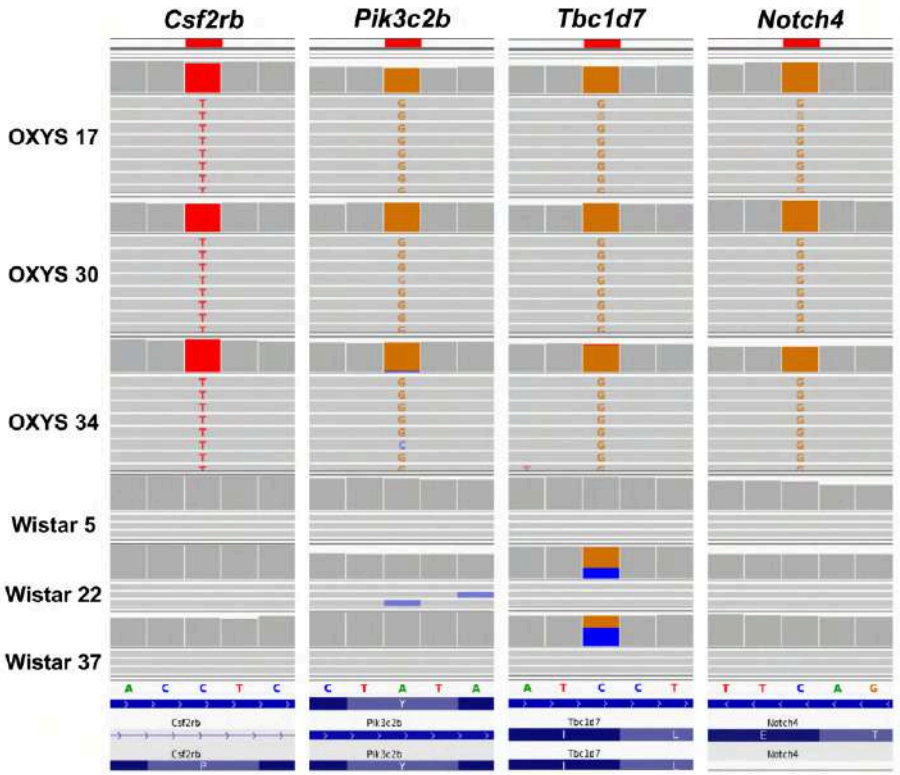


Рисунок 2.12 – Геномные регионы, содержащие приоритетные миссенс-варианты крыс OXYS в генах *Csf2rb*, *Pik3c2b*, *Tbc1d7* и *Notch4*. Визуализация выполнена в IGV

Таблица 2.6 – Редкие (AF < 0,05) миссенс-варианты крыс OXYS в генах-кандидатах (*Csf2rb*, *Pik3c2b*, *Tbc1d7*, *Notch4*) и генотипы всех анализируемых образцов (0 – референсный аллель, 1 – альтернативный)

Ген	Геномные координаты	Референсный аллель	Альтернативный аллель	Замена в транскрипте	Аминокислотная замена	OXYS 17	OXYS 30	OXYS 34	Wistar 5	Wistar 22	Wistar 37	AF
Csf2rb	7:109 899 157	C	T	ENSRNOT00000000203.6:c.1613C>T	ENSRNOP00000000203.6:p.Pro538Leu	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	0/0	0,027
Pik3c2b	13:44 514 982	A	G	ENSRNOT00000090170.2:c.863A>G	ENSRNOP00000071933.2:p.Tyr288Cys	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	0/0	0,007
Tbc1d7	17:21 546 569	C	G	ENSRNOT00000105011.1:c.741C>G	ENSRNOP00000083656.1:p.Ile247Met	1/1	1/1	1/1	0/0	0/1	0/1	0,021
Notch4	20:4 176 225	C	G	ENSRNOT00000000513.5:c.1756G>C	ENSRNOP00000000513.3:p.Glu586Gln	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	0/0	0

AF – частота встречаемости альтернативного аллеля среди линий крыс из RGD

Ген *Csf2rb* связан с рядом иммунных биологических процессов: GO:0002443 “leukocyte mediated immunity”, GO:0002250 “adaptive immune response”, GO:0002449 “lymphocyte mediated immunity”, GO:0002460 “adaptive immune response based on somatic recombination of immune receptors built from immunoglobulin superfamily domains” (Таблица Г.2) и входит в состав сигнального пути rno04210 “Apoptosis” (Таблица Г.1). В нем идентифицирован миссенс-вариант 7:109 899 157 C>T, приводящий к аминокислотной замене P538L. Среди линий крыс, представленных в RGD, данный вариант характеризуется низкой частотой встречаемости (AF = 0,027; Таблица 2.4). Экспрессия *Csf2rb* у крыс выявляется в том числе в тимусе [182]. Кроме того, по транскриптомным данным мышей *Csf2rb* относится к числу цитокиновых рецепторов, экспрессируемых на высоком уровне в медуллярных ТЭК, что указывает на потенциальную связь данного рецептора с функцией тимического эпителиального микроокружения [223]. У подавляющего большинства проанализированных ортологов белка Csf2rb в гомологичной позиции обнаружен пролин (P). Исключения составляют египетский тушканчик (*Jaculus jaculus*) и банкивский петух (*Gallus gallus*), у которых в данной позиции расположен серин (S) (Рисунок 2.13, А; Рисунок В.2, А). У Csf2rb имеются семь древних паралогов с низкой степенью сходства последовательностей (7,48–11,05%), в том числе в области, содержащей исследуемую аминокислотную замену. Замена P538L расположена в участке с низкой уверенностью структурного предсказания (pLDDT < 50), что ограничивает возможность оценки ее эффекта на основании моделирования пространственной структуры белка (Рисунок 2.13, Б).

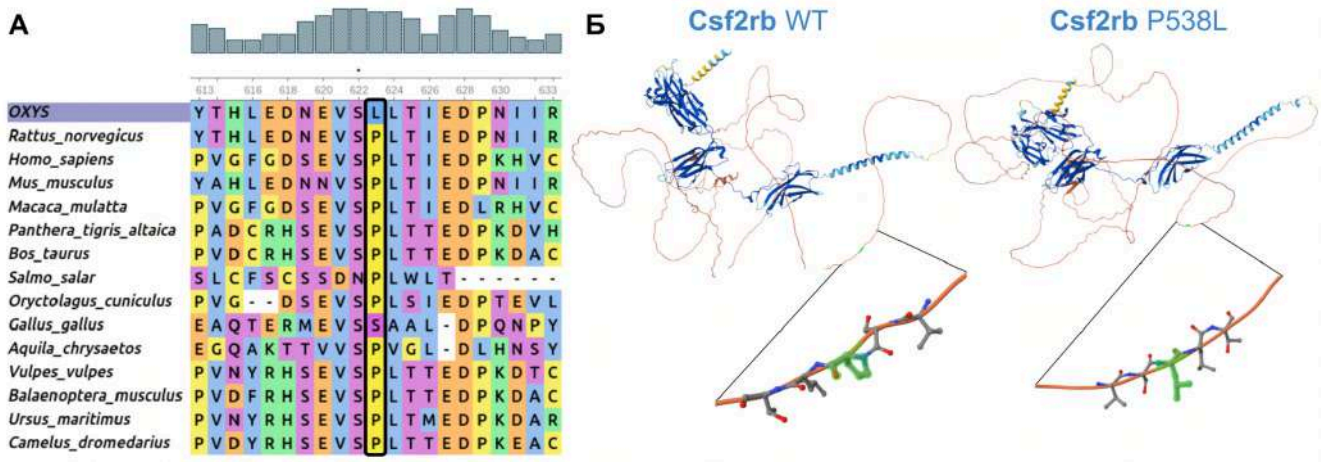


Рисунок 2.13 – **А.** Множественное выравнивание ортологов белка Csf2rb среди эволюционно далеких видов животных. Полярные незаряженные АК обозначены фиолетовым (S, T, N, Q), гидрофобные – голубым (A, V, I, L, M, F, Y, W), положительно заряженные – зеленым (R, H, K), отрицательно – оранжевым (D, E), другие – желтым (C, G, P). Высота столбца над АК соответствует степени ее эволюционной консервативности. **Б.** Пространственная структура белка Csf2rb дикого типа (WT) и с заменой P538L. Аминокислота в положении 538 подсвечена зеленым

Белок CSF2RB (CD131) представляет собой общую β-субъединицу рецепторов гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), интерлейкина-3 (IL-3) и интерлейкина-5 (IL-5) и участвует в передаче сигналов этих цитокинов [224,225]. Полный нокаут Csf2rb у мышей приводит к снижению количества эозинофилов и нарушению эозинофильного ответа на инфекцию [226]. В другой мышиной модели, характеризующейся дефицитом общей β-субъединицы рецептора GM-CSF и специфической β-субъединицы рецептора IL-3, выявлено нарушение формирования антигенспецифического ответа CD8+ Т-лимфоцитов, связанное со снижением выживаемости и нарушением поддержания популяции резидентных дендритных клеток в нелимфоидных тканях [227]. В контексте наблюдаемого у крыс OXYS снижения числа CD3+, CD4+ и CD8+ клеток и структурных изменений тимуса это позволяет рассматривать найденный в гене *Csf2rb* вариант как кандидатный генетический фактор ускоренной инволюции органа.

Ген *Pik3c2b* связан с биологическими процессами GO:1905037 “autophagosome organization” и GO:0016236 “macroautophagy” (Таблица Г.2). Он кодирует каталитическую субъединицу фосфатидилинозитол-4-фосфат-3-киназы класса IIβ (PI3K-C2β), участвующей в регуляции фосфоинозитидного метаболизма, внутриклеточного мембранного и везикулярного транспорта [228]. В *Pik3c2b* у крыс OXYS идентифицирован миссенс-вариант 13:44 514 982 A>G, приводящий к аминокислотной замене Y288C. Вариант характеризуется низкой частотой встречаемости среди линий крыс, представленных в RGD (AF = 0,007; Таблица 2.4). В гомологичной позиции у большинства проанализированных ортологов сохраняется тирозин (Y), что указывает на высокую консервативность данного аминокислотного остатка (Рисунок 2.14, А). Исключение среди грызунов и близкородственных видов составляет малайская тупайя (*Tupaia belangeri*), у которой в соответствующей позиции находится аспарагин (N) (Рисунок В.2, Б). Белок Pik3c2b имеет девять паралогов, при этом соответствующий исследуемой позиции регион на них не выравнивается, что ограничивает возможность использования паралогов для дополнительной оценки консервативности данного участка. Область белка, содержащая замену Y288C, предсказана с низкой уверенностью (pLDDT < 50), поэтому на основании моделирования невозможно оценить влияние замены на его пространственную структуру (Рисунок 2.14, Б).

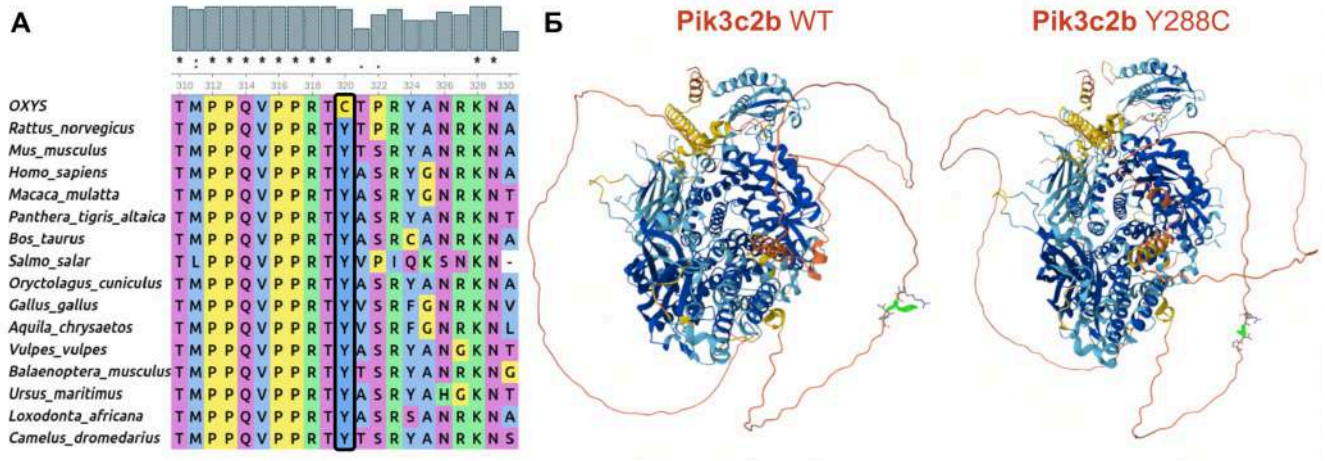


Рисунок 2.14 – **А.** Множественное выравнивание ортологов белка Pik3c2b среди эволюционно далеких видов животных. Полярные незаряженные АК обозначены фиолетовым (S, T, N, Q), гидрофобные – голубым (A, V, I, L, M, F, Y, W), положительно заряженные – зеленым (R, H, K), отрицательно – оранжевым (D, E), другие – желтым (C, G, P). Высота столбца над АК соответствует степени ее эволюционной консервативности. **Б.** Пространственная структура белка Pik3c2b дикого типа (WT) и с заменой Y288C. Аминокислота в положении 288 подсвечена зеленым

Киназы PI3K класса II, включая PI3K-C2β, вовлечены в регуляцию эндоцитоза и внутриклеточного везикулярного транспорта. Показано, что PI3K-C2β подавляет активность mTORC1 на мембранах поздних эндосом и лизосом в условиях дефицита питательных веществ [228,229]. В связи с этим выявленная замена в гене *Pik3c2b* может вносить вносить вклад в дисфункцию везикулярного транспорта и аутофагии, приводя к избыточному накоплению аутофагосом и фаголизосом и, как следствие, к деградации эпителиальной сети тимуса, наблюдаемой у крыс OXYS [131].

Ген *Tbc1d7* входит в состав пути rno04150 “mTOR signaling pathway” (Таблица Г.1). Белок TBC1D7 является третьим компонентом комплекса TSC1-TSC2-TBC1D7 и способствует его стабилизации. Этот комплекс выступает в роли негативного регулятора mTORC1 [230]. *Tbc1d7* экспрессируется в разных тканях крысы, включая тимус [182]. В нем выявлен миссенс-вариант 17:21 546 569 C>G, приводящий к аминокислотной замене I247M. Данный вариант характеризуется низкой частотой встречаемости среди линий крыс из RGD (AF = 0,021; Таблица 2.4). Паралоги у Tbc1d7 отсутствуют, а у всех проанализированных ортологов в гомологичной позиции встречается исключительно изолейцин (I) (Рисунок 2.15, А; Рисунок В.2, В), что указывает на высокую эволюционную консервативность данного остатка. Замена I247M относится к консервативному типу аминокислотных замен, поскольку обе аминокислоты являются неполярными и гидрофобными. Результаты структурного моделирования не выявили

существенного изменения общей пространственной организации белка в результате замены (Рисунок 2.15, Б).

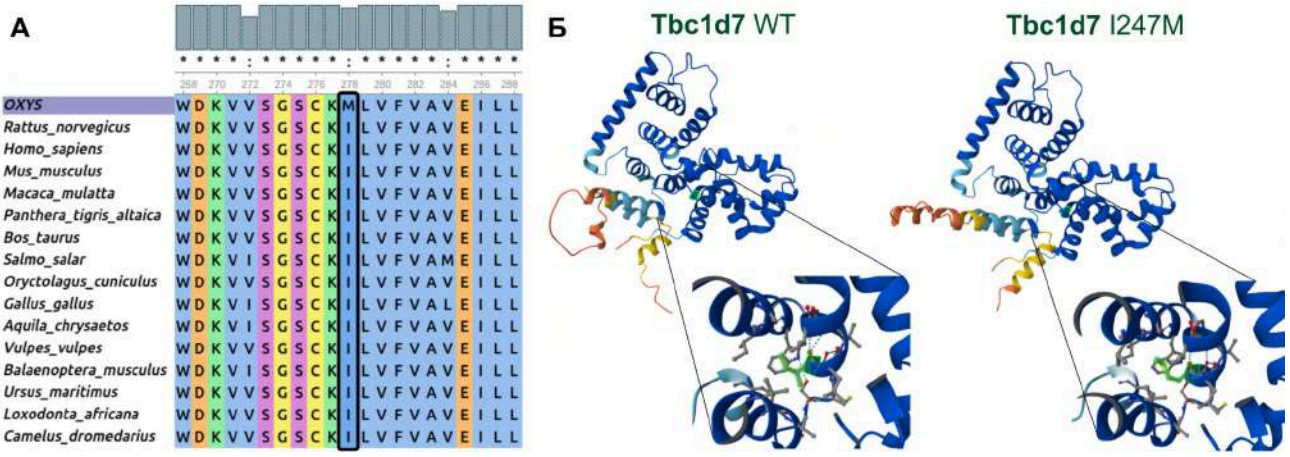


Рисунок 2.15 – **А.** Множественное выравнивание ортологов белка Tbc1d7 среди эволюционно далеких видов животных. Полярные незаряженные АК обозначены фиолетовым (S, T, N, Q), гидрофобные – голубым (A, V, I, L, M, F, Y, W), положительно заряженные – зеленым (R, H, K), отрицательно – оранжевым (D, E), другие – желтым (C, G, P). Высота столбца над АК соответствует степени ее эволюционной консервативности. **Б.** Пространственная структура белка Tbc1d7 дикого типа (WT) и с заменой I247M. Аминокислота в положении 247 подсвечена зеленым

Замена I247M в Tbc1d7, несмотря на высокую эволюционную консервативность затронутой позиции и низкую аллельную частоту варианта среди линий крыс из RGD, носит консервативный характер (сохраняется гидрофобность и объем боковой цепи остатка), что свидетельствует скорее в пользу незначительного или отсутствующего эффекта.

Ген *Notch4* представлен в сигнальном пути rno04610 “Complement and coagulation cascades” (Таблица Г.1) и биологических процессах GO:0002064 “epithelial cell development” и GO:000338 “epithelial cell morphogenesis” (Таблица Г.2). Он кодирует рецептор семейства Notch – эволюционно консервативного каскада, который обеспечивает взаимодействие между клетками и участвует в регуляции их дифференцировки [231]. Экспрессия *Notch4* у крыс отмечается во многих тканях, в том числе и в тимусе [182]. Вариант 20:4 176 225 C>G в данном гене приводит к замене E586Q, расположенной в 15-м EGF-like домене, связывающем Ca^{2+}. EGF-like повторы входят в состав внеклеточного домена рецепторов Notch и участвуют во взаимодействиях рецептора с лигандами [232]. При этом результаты структурного моделирования не выявили существенных изменений общей пространственной организации белка вследствие замены E586Q (Рисунок 2.16, Б). В гомологичной позиции у большинства

проанализированных ортологов сохраняется глутаминовая кислота (E) (Рисунок 2.16, А), тогда как у обыкновенной белки (*Sciurus vulgaris*) обнаружена аспарагиновая кислота (D), которая, как и глутаминовая кислота, несет отрицательный заряд (Рисунок В.2, Г). Замена E586Q меняет заряд аминокислоты с отрицательного на нейтральный. Notch4 имеет пять древних паралогов низкой степенью сходства последовательностей (от 9,04% до 17,41%), в том числе в регионе замены.

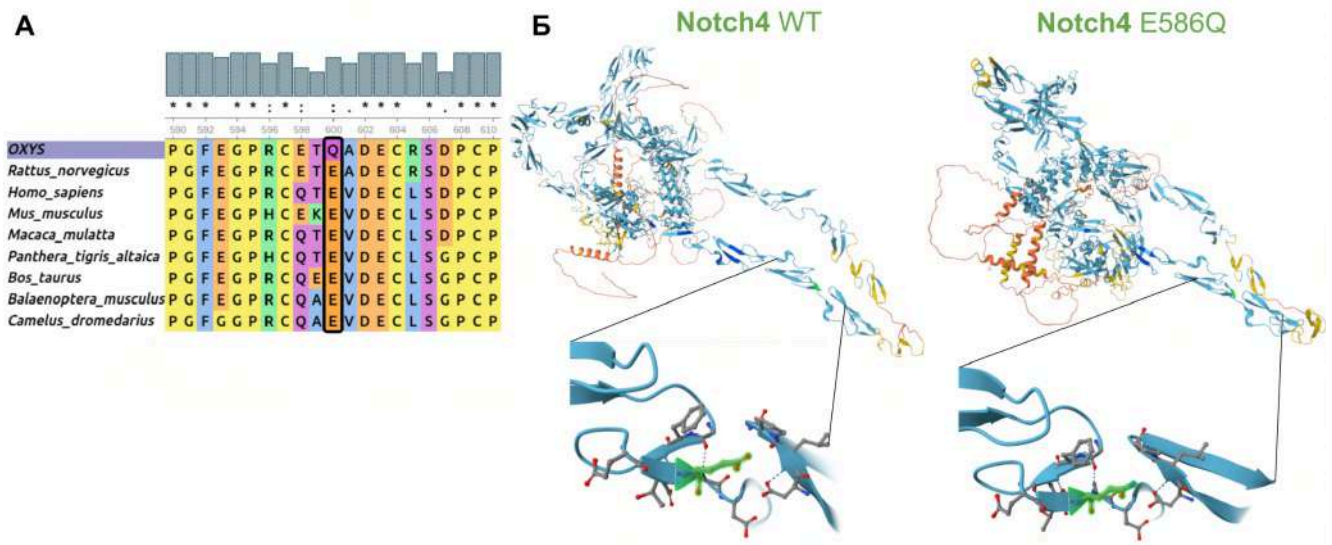


Рисунок 2.16 – А. Множественное выравнивание ортологов белка Notch4 среди эволюционно далеких видов животных. Полярные незаряженные АК обозначены фиолетовым (S, T, N, Q), гидрофобные – голубым (A, V, I, L, M, F, Y, W), положительно заряженные – зеленым (R, H, K), отрицательно – оранжевым (D, E), другие – желтым (C, G, P). Высота столбца над АК соответствует степени ее эволюционной консервативности. **Б.** Пространственная структура белка Notch4 дикого типа (WT) и с заменой E586Q. Аминокислота в положении 586 подсвечена зеленым

В тимусе Notch-сигналинг играет важную роль во взаимодействии ТЭК с развивающимися тимоцитами: лиганды Notch, экспрессируемые ТЭК, обеспечивают передачу сигналов, необходимых для ранних этапов развития Т-клеток [233,234]. Notch-сигналинг участвует в регуляции состояния ранних предшественников ТЭК и направляет их дифференцировку в медуллярную линию [94]. Нарушение регуляции этого сигнального пути может затрагивать как развитие тимического эпителия, так и развитие Т-клеток. С учетом расположения замены E586Q в консервативном EGF-like домене рецептора Notch4, выявленный вариант представляет интерес в контексте возможного влияния на регуляцию состояния тимического эпителия у крыс OXYS.

2.2.1.6. Митохондриальная дисфункция

Как описано **в подразделе 1.4.1.1**, структурно-функциональные изменения митохондрий наблюдаются у крыс OXYS уже в раннем возрасте сразу в нескольких тканях. В связи с этим митохондриальная дисфункция рассматривается как один из возможных механизмов формирования у них фенотипа преждевременного старения. Для поиска потенциальных генетических факторов митохондриальных нарушений были отдельно отобраны повреждающие варианты в генах, связанных с митохондриальными функциями согласно результатам функциональной аннотации по биологическим процессам GO и молекулярным путям KEGG (Таблица Е.1). Распространенность этих вариантов среди 146 линий крыс из RGD приведена в таблице Ж.1.

Большинство отобранных вариантов характеризовались высокой частотой встречаемости среди исследованных линий крыс. Только два миссенс-варианта в гене *Mcur1*, участвующем в регуляции митохондриального транспорта кальция, и один вариант в гене *Chchd2l3*, связанном с организацией митохондрий и положительной регуляцией транскрипции, имели AF < 0,05. Однако анализ множественного выравнивания последовательностей белков-ортологов показал, что аминокислотные позиции, затронутые этими заменами, не являются консервативными. Таким образом, в рамках проведенного анализа не удалось выявить редкие варианты в генах, связанных с митохондриальными функциями, которые можно было бы рассматривать в качестве приоритетных кандидатов на роль генетических факторов митохондриальной дисфункции у крыс OXYS.

2.2.1.7. Анализ частот аллелей и генотипов приоритетных вариантов на объединенной выборке крыс

Результаты генотипирования независимой выборки (Wistar/Icgn, n = 10; OXYS, n = 10) секвенированием по Сэнгеру показали, что у крыс группы OXYS во всех исследуемых позициях встречаются исключительно гомозиготы по альтернативному аллелю (1/1). В то же время животные контрольной группы Wistar/Icgn по семи из девяти исследованных позиций (*Cmya5, Akap6, Nqo2, Cic, Cerkl, Bfsp1, Notch4*) являлись исключительно гомозиготами по референсному аллелю (0/0). Исключение составили варианты в генах *Pik3c2b* (где наряду с референсными гомозиготами выявлены три гетерозиготы 0/1) и *Csf2rb*, для которого у крыс Wistar/Icgn

обнаружены все три возможных генотипа: три гомозиготы 0/0, пять гетерозигот 0/1 и две гомозиготы по альтернативному аллелю 1/1 (Таблица 2.7). Примеры хроматограмм, полученных в результате секвенирования по Сэнгеру, для каждого генотипа представлены на рисунках И.1 и И.2.

Таблица 2.7 – Распределение генотипов по кандидатным вариантам (0 – референсный аллель, 1 – альтернативный)

Образец/ Ген	***Cmya5***	***Akap6***	***Nqo2***	***Cic***	***Cerkl***	***Bfsp1***	***Csf2rb***	***Pik3c2b***	***Notch4***
Wistar/Icgn									
19w	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
30w	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/1	0/1	0/0
16w	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
20w	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/1	0/0	0/0
6w	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/1	0/0	0/0
8w	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0	0/0
29w	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
7w	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/1	0/0	0/0
26w	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	0/1	0/0
28w	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/1	0/1	0/0
Wistar 5*	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Wistar 22*	0/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/1	0/0	0/0	0/0
Wistar 37*	0/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
OXYS									
15ox	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
21ox	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
12ox	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
34ox	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
32ox	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
35ox	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
33ox	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
25ox	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1

***** Данные по полногеномному секвенированию

Продолжение таблицы 2.7

23ox	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
14ox	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
OXYS 17*	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
OXYS 30*	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
OXYS 34*	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1

Анализ объединенной выборки (n = 26) подтвердил присутствие альтернативного аллеля исключительно в гомозиготном состоянии (генотип 1/1) по всем девяти исследованным позициям у всех крыс группы OXYS (n = 13). В контрольной группе Wistar/Icgn (n = 13) по пяти генам (*Akap6, Nqo2, Cic, Cerkl, Notch4*) выявлялись исключительно референсные гомозиготы (0/0), то есть частота альтернативного аллеля составила 0%. В генах *Bfsp1, Cmya5* и *Pik3c2b* наряду с референсными гомозиготами обнаружены единичные гетерозиготы (0/1) – у одного, двух и трех животных соответственно (частота альтернативного аллеля 3,8%, 7,7% и 11,5%). В гене *Csf2rb* у контрольных крыс зафиксированы все три генотипа: шесть гомозигот 0/0, пять гетерозигот 0/1 и две альтернативные гомозиготы 1/1, что соответствует частоте альтернативного аллеля 34,6%.

2.2.2. Анализ вариаций числа копий геномных регионов (CNV)

Для поиска CNV использовали программы CNVpytor, алгоритм которой основан на анализе глубины прочтений геномных регионов, и smoove, алгоритм которой базируется на анализе расщепленных и дискордантных парных прочтений. На первом этапе в каждом из трех образцов крыс линии OXYS были идентифицированы CNV, после чего из них отобрали варианты, присутствующие одновременно у всех трех особей и отсутствующие в гомозиготном состоянии у контрольных крыс Wistar/Icgn. Далее было проведено пересечение CNV, обнаруженных обеими программами. Поскольку длинные CNV чаще выявлялись в регионах с низким качеством картирования прочтений и могли быть связаны с артефактами выравнивания, а различия в определении их границ затрудняли сопоставление результатов, полученных с помощью CNVpytor и smoove, из дальнейшего анализа были исключены CNV размером более 20 т.п.н. Большинство CNV, отличающих крыс OXYS от контрольной группы Wistar/Icgn, были локализованы в межгенных регионах и интронах, поэтому далее отбирали варианты,

затрагивающие экзоны или перекрывающиеся с областями активного хроматина, обогащенными гистоновой меткой H3K27ac.

2.2.2.1. CNV в кодирующих регионах

В таблице 2.8 перечислены делеции, пересекающиеся с кодирующими участками – экзонами. Некоторые из затрагиваемых генов при этом оказались полностью делетированы.

Таблица 2.8 – Делеции, затрагивающие кодирующие участки генов – экзоны, и генотипы всех образцов (0 – референсный аллель, 1 – делеция)

Геномные координаты	Длина (п.н.)	Ген	OXYS 17	OXYS 30	OXYS 34	Wistar 5	Wistar 22	Wistar 37
1:170 720 408–170 722 750	**2342**	***LOC100911093***	**1/1**	**1/1**	**1/1**	**0/0**	**0/1**	**0/1**
1:171 304 588–171 306 097	**1509**	***Ybx1l1***	**1/1**	**1/1**	**1/1**	**0/0**	**0/1**	**0/1**
2:26 561 742–26 563 146	1404	*LOC100912266*	1/1	1/1	1/1	0/1	0/0	0/0
3:20 633 822–20 637 787	3965	*Or1b1*	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	0/0
3:73 783 098–73 787 058	3960	*Or4p7*	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	0/0
6:27 489 900–27 492 572	2672	*ENSRNOG00000066171*	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	0/0
9:23 797 233–23 803 955	6722	*Gsta6*	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	0/1
3:20 633 822–20 637 787	3965	*Or1b1*	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	0/0
3:73 783 098–73 787 058	3960	*Or4p7*	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	0/0
6:27 489 900–27 492 572	2672	*ENSRNOG00000066171*	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	0/0
9:23 797 233–23 803 955	6722	*Gsta6*	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	0/1
11:82 278 290–82 280 180	**1890**	***Ppp2cal1***	**1/1**	**1/1**	**1/1**	**0/0**	**0/0**	**0/1**

Жирным шрифтом выделены делеции, которые приводят к полной потере гена

Продолжение таблицы 2.8

14:8 984 380–8 986 166	**1786**	***LOC100363472***	**1/1**	**1/1**	**1/1**	**0/0**	**0/0**	**0/0**
17:3 605 531–3 611 949	**6418**	***AABR07043347.1***	**1/1**	**1/1**	**1/1**	**0/0**	**0/0**	**0/0**
20:44 142 209–44 146 664	4455	*Mettl24*	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	0/0

LOC100911093 предположительно кодирует митохондриальную CCA-тРНК-нуклеотидилтрансферазу. Он имеет один паралог, *Trnt1*, с высоким сходством последовательностей (99,54%), который кодирует основной фермент, выполняющий ту же функцию и в цитоплазме клеток, и в митохондриях.

Ybx1l1 предположительно кодирует белок, способный связываться с нуклеиновыми кислотами и участвовать в регуляции экспрессии генов. *Ybx1l1* имеет 6 паралогов. Один из них, *Ybx1*, имеет высокий процент сходства последовательностей (94,48%) с *Ybx1l1*. Человеческий ортолог, *YBX1*, участвует в репарации ДНК при окислительных повреждениях [235].

Ppp2cal1 предположительно кодирует белок, подобный каталитической субъединице альфа протеинфосфатазы 2. Согласно Ensembl v115, данный ген имеет 14 паралогов, наиболее близким (сходство последовательностей – 96,76%) из которых является *Ppp2cb*, кодирующий β-изоформу каталитической субъединицы протеинфосфатазы 2. Человеческий ортолог, *PPP2CA*, кодирует субъединицу фермента PP2A, который участвует в регуляции роста и деления клеток. Снижение активности этого фермента у человека ассоциировано с патогенезом БА: накоплением Aβ и гиперфосфорилированием тау-белка [236].

LOC100363472 кодирует белок, предположительно входящий в состав комплекса фосфатидилинозитол-3-киназы класса III и участвующий в регуляции аутофагии. Он имеет 2 паралога, один из которых, *Nrbf2*, выполняет сходные функции. Человеческий ортолог *NRBF2* помимо аутофагии участвует в процессах обучения и формирования памяти [237].

AABR07043347.1 предположительно кодирует белок, участвующий в ретротранспозиции. Согласно Ensembl, этот ген имеет множество паралогов (81), большинство из которых представлено предсказанными генами без известных функций. Одним из его паралогов является ген *L1td1*, произошедший от ретротранспозона LINE-1.

Вышеперечисленные гены недостаточно изучены на модели крысы. Большинство из них имеют статус предсказанных и высокий процент сходства последовательностей с паралогами. Не исключено, что некоторые из них представляют собой нефункциональные копии своих паралогов, поэтому их отсутствие в геноме крыс OXYS может не иметь выраженных функциональных последствий.

2.2.2.2. CNV в регуляторных областях генома

H3K27ac – эпигенетическая модификация (ацетилирование) остатка 27-ого лизина на N-концевом участке гистона H3. Обогащение геномного региона этой меткой указывает на расположение в нем активных регуляторных элементов: промоторов и энхансеров. Развитие признаков БА у крыс OXYS, как и у людей, сопровождается нейродегенеративными изменениями прежде всего в гиппокампе и префронтальной коре [8]. В связи с этим была проведена оценка перекрытия CNV, отличающих крыс OXYS от контрольной группы крыс Wistar/Icgn, с участками, обогащенными H3K27ac, в вентральном и дорсальном гиппокампе и префронтальной коре *R. norvegicus*. Делеции в генах *Gsta6*, *Mettl24*, *Fat1*, *Babam2* и перед 5'-концом гена *Abcf1* затрагивают участки, обогащенные H3K27ac метками (Таблица 2.9, Рисунок 2.17).

Таблица 2.9 – Делеции, перекрывающиеся с пиками обогащения гистоновой метки H3K27ac в тканях префронтальной коры, дорсального и вентрального гиппокампа *R. norvegicus*, и генотипы всех анализируемых образцов (0 – референсный аллель, 1 – делеция)

Геномные координаты	**Длина (п.н.)**	**Ген**	**OXYS 17**	**OXYS 30**	**OXYS 34**	**Wistar 5**	**Wistar 22**	**Wistar 37**
9:23 797 233–23 803 955	6722	*Gsta6*	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	0/1
20:44 142 209–44 146 664	4455	*Mettl24*	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	0/0
16:47 224 153–47 236 087	11934	*Fat1*	1/1	1/1	1/1	0/0	0/1	0/1
6:24 707 559–24 708 619	1060	*Babam2*	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	0/0
20:2 800 714–2 802 114	1400	*Abcf1*	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	0/0

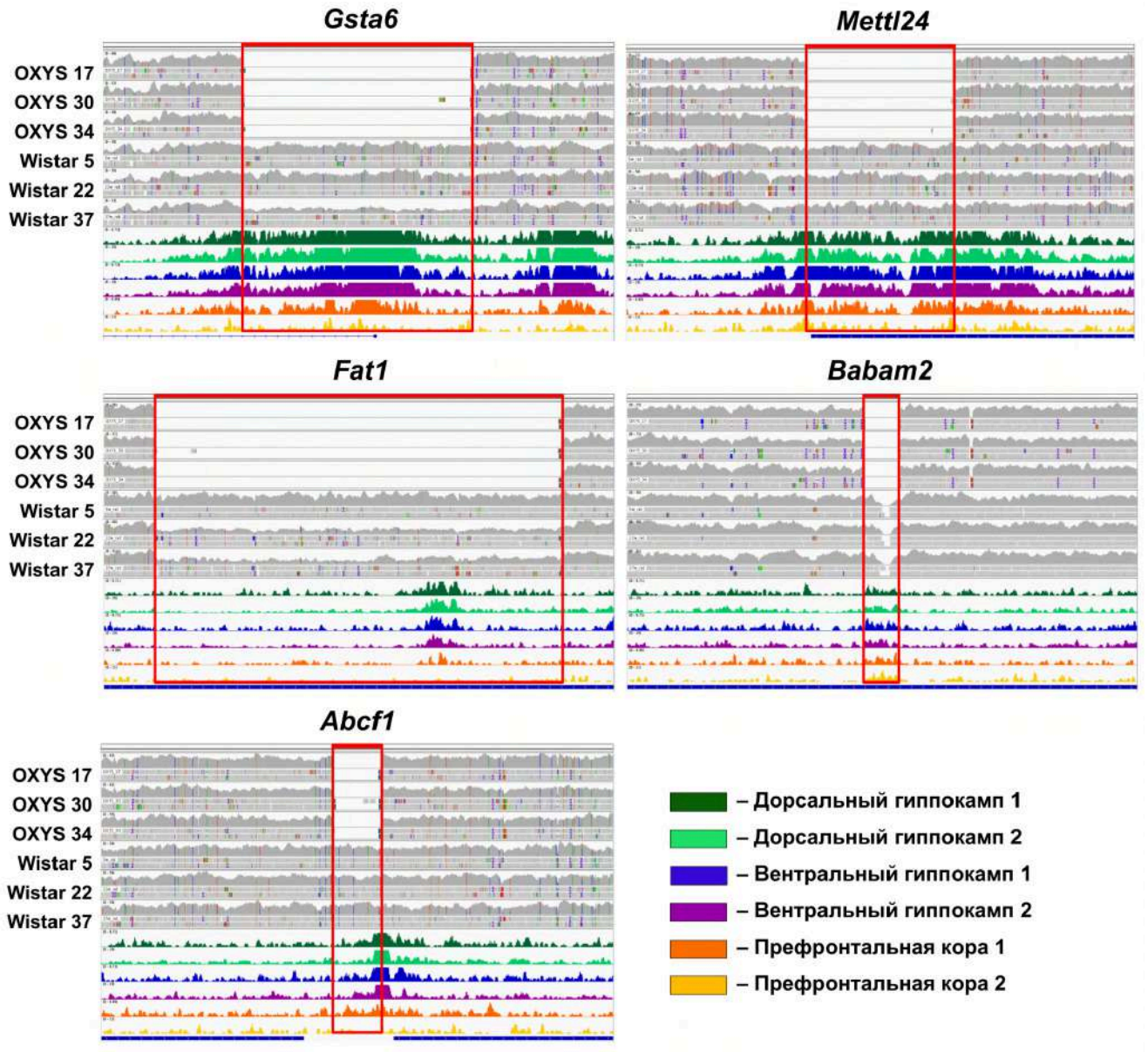


Рисунок 2.17 – Делеции в генах *Gsta6, Mettl24, Fat1, Babam2* и перед сайтом старта транскрипции гена *Abcf1*, попадающие на пики обогащения H3K27ac в тканях префронтальной коры, дорсального и вентрального гиппокампа *R. norvegicus*. Масштаб: 15 т.п.н. Красными рамками обозначены границы делеций

У генов *Gsta6* и *Mettl24* первый экзон попадает в область делеции. Белок, кодируемый геном *Gsta6*, относится к семейству α-глутатион-S-трансфераз, представители которого катализируют реакции конъюгации электрофильных соединений с восстановленным глутатионом – антиоксидантом, играющим важную роль в поддержании клеточного редокс-гомеостаза [238]. Некоторые ферменты из этого семейства также обладают глутатион-зависимой пероксидазной активностью и способны восстанавливать липидные гидроперекиси [239]. Ген *Gsta6* на данный момент малоизучен и имеет 19 паралогов, 5 из которых также относятся к семейству α-глутатион-S-трансфераз, что может обеспечить

частичную компенсацию функции *Gsta6* при нарушении его регуляции. Уровень экспрессии этого гена в префронтальной коре, гиппокампе и сетчатке OXYS крыс по сравнению с контрольными крысами Wistar был снижен в период постнатального завершения развития их мозга [240,241], что может быть обусловлено найденной делецией в его предполагаемом активном промоторе. Нарушение регуляции *Gsta6* вследствие делеции в его предполагаемом промоторном регионе может повышать уязвимость клеток нервной ткани к окислительному стрессу.

Mettl24 кодирует фермент с предсказанной метилтрансферазной активностью, однако на модели крыс он изучен слабо. Его ортолог, METTL24, у человека связан с иммунными функциями и ассоциирован с раком почки (KIRC) [242]. Ген *Mettl24* имеет два древних паралога (*Scara3* и *Cthrc1*) с низким уровнем сходства последовательностей (7,76% и 16,97%, соответственно), которые не относятся к метилтрансферазам.

Делеции внутри генов *Fat1* и *Babam2* расположены в интронах и, вероятно, затрагивают внутригенные цис-регуляторные элементы (потенциальные энхансеры), способные влиять на экспрессию как самих генов-хозяев, так и соседних локусов. *Fat1* кодирует белок из семейства атипичных кадгеринов, который участвует в межклеточной адгезии, развитии мышц и нейронов, а также положительной регуляции миграции различных клеток: нейронов, фибробрастов, астроцитарных предшественников и гладкомышечных клеток в сосудах [243,244]. У *Fat1* имеется семь палалогов, три из которых также относятся к семейству атипичных кадгеринов. У позвоночных, включая крыс, *Fat1* экспрессируется в развивающемся и взрослом мозге: уровень экспрессии особенно высок в областях, участвующих в нейрогенезе [245]. Его продукт, FAT1, вовлечен в ранние стадии дифференцировки нейронов, контролирует рост аксонов через сигнальный путь Hippo и способствует терминальной дифференцировке клеток, ингибируя их пролиферацию [245,246]. Найденная делеция может снижать экспрессию *Fat1* в зонах нейрогенеза в гиппокампе, нарушая регуляцию синаптической пластичности и миграции нейронов, усугубляя когнитивный дефицит у крыс OXYS.

Ген *Babam2* кодирует адаптерный белок, входящий в состав комплексов BRCA1-A и BRISC. Он играет важную роль в репарации двуцепочечных разрывов ДНК, поддержании клеточного цикла и предотвращении клеточного старения [247]. Отсутствие паралогов у *Babam2* исключает возможность генетической компенсации при потенциальном нарушении его регуляции. Во фронтальной коре и гиппокампе крыс OXYS наблюдается повышенный уровень оксидативных повреждений ДНК (8-oxoG) по сравнению с родительской линией Wistar [132]. Выявленная делеция в регуляторной области *Babam2* представляет интерес как потенциальный фактор геномной нестабильности. Хотя данных о накоплении двуцепочечных разрывов ДНК у крыс OXYS нет, снижение эффективности генов репарации может усугублять последствия

оксидативных повреждений в мозге. Антиапоптотическая функция BABAM2 реализуется через ингибирование митохондриального каскада апоптоза [248]. Учитывая раннее развитие митохондриальной дисфункции и нарушений регуляции апоптоза у крыс OXYS [8], возможное снижение экспрессии *Babam2* в гиппокампе и префронтальной коре вследствие делеции в предполагаемом цис-регуляторном элементе может ослаблять антиапоптотическую защиту и повышать уязвимость нейронов к апоптозу.

Делеция перед началом сайта старта транскрипции гена *Abcf1* может затрагивать его активный промотор. Продукт гена *Abcf1* является членом суперсемейства АТФ-связывающих кассетных ABC белков. Он участвует в инициации и элонгации синтеза белка и регулирует врожденный иммунный ответ [249]. Оба паралога *Abcf1* принадлежат к тому же подсемейству ABC белков F. ABCF1 участвует в поддержании гомеостаза сетчатки, регулируя фагоцитоз наружных сегментов фоторецепторов клетками РПЭ [250]. Обнаруженная делеция в области его активного промотора может понизить его экспрессию и, таким образом, внести вклад в развитие признаков ВМД у OXYS крыс.

2.3. Заключение по главе 2

На основе сравнительно-геномного анализа крыс линии OXYS с родительской линией Wistar/Icgn, а также выборкой из 146 лабораторных линий крыс базы данных RGD, охарактеризованы геномные особенности крыс OXYS и идентифицированы генетические варианты (ОНВ и протяженные делеции), присутствующие у них в гомозиготном состоянии. Оценка геномной вариабельности и расчет индекса F_{ST} показали значительную межлинейную генетическую дивергенцию между линиями OXYS и Wistar/Icgn (средневзвешенный F_{ST} = 0,475) и выраженное преобладание гомозиготных генотипов в геноме крыс OXYS (доля гетерозигот снижена до 14,26 ± 0,47% против 33,32 ± 1,38% у Wistar/Icgn, p-value < 0,001), что отражает высокую степень генетической однородности крыс OXYS в результате длительного инбридинга.

Функциональная аннотация генов, несущих выявленные в гомозиготном состоянии у крыс линии OXYS миссенс-варианты и протяженные делеции, показала их вовлеченность в ряд ключевых биологических процессов. В частности, гены *Fat1, Cic, Akap6* и *Babam2* участвуют в регуляции нейрогенеза, дифференцировки, гомеостаза и выживаемости нейронов; *Abcf1, Cerkl* и *Bfsp1* вовлечены в поддержание гомеостаза сетчатки, защиту фоторецепторов и структурную организацию промежуточных филаментов хрусталика; *Cmya5* и *Akap6* принимают участие в

стабилизации саркомеров и регенерации мышечной ткани; *Nqo2* и *Gsta6* обеспечивают клеточный редокс-гомеостаз и антиоксидантную защиту; а гены *Notch4, Csf2rb* и *Pik3c2b* связаны с иммунной регуляцией, функционированием эпителиального микроокружения тимуса, везикулярным транспортом и аутофагией.

Миссенс-варианты в пяти генах *Akap6, Nqo2, Cic, Cerkl, Notch4*) полностью отсутствовали в контрольной группе Wistar/Icgn (частота 0%), варианты в генах *Bfsp1*, *Cmya5* и *Pik3c2b* встречались у крыс Wistar/Icgn исключительно в виде редких гетерозигот (частота 3,8–11,5%), а вариант в гене *Csf2rb* характеризовался высокой частотой (34,6%) и присутствием гомозигот по альтернативному аллелю у контрольных животных.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о снижении генетического разнообразия у крыс инбредной линии OXYS и наличии у них в гомозиготном состоянии совокупности вариантов в генах, контролирующих развитие нервной и мышечной тканей, структурно-функциональную организацию глаза, клеточный редокс-гомеостаз, аутофагию и иммунную регуляцию.

Для подтверждения функциональной значимости выявленных миссенс-вариантов необходимы дальнейшие экспериментальные исследования, включающие оценку экспрессии генов-кандидатов на уровне мРНК и белка в соответствующих органах и тканях, а также функциональное тестирование на клеточных моделях с использованием направленного мутагенеза и геномного редактирования. Для уточнения последствий делеций, перекрывающихся с областями активного хроматина, целесообразно провести сравнительный ChIP-seq анализ обогащения гистоновой меткой H3K27ac у крыс линий OXYS и Wistar/Icgn. Это позволит установить, приводят ли данные перестройки к изменению эпигенетического профиля и регуляторной активности соответствующих геномных локусов непосредственно у исследуемых линий.

ГЛАВА 3. ВОЗРАСТНЫЕ МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ЯВАНСКИХ МАКАК

3.1. Материалы и методы

3.1.1. Животные

Для транскриптомного анализа были использованы самцы яванских макак (*M. fascicularis*) двух возрастных групп: 5 животных в возрасте от 3,8 до 5,5 лет, что соответствует примерно 13-18 годам биологического возраста человека, и 4 животных в возрасте от 19,9 до 27,3 лет, что соответствует примерно 66–90 годам биологического возраста человека (Таблица 3.1).

Таблица 3.1 – Характеристики яванских макак, у которых был взят биоматериал

Образец	Группа	Пол	Возраст*
46712	молодой	М	5,5
47044	молодой	М	5,2
47099	молодой	М	5,2
47100	молодой	М	5,2
48017	молодой	М	3,8
33202	пожилой	М	27,3
35777	пожилой	М	21,2
35908	пожилой	М	20,9
36435	пожилой	М	19,9

* на момент взятия образцов крови и костного мозга; М – мужской

Для анализа состава клеточных популяций в крови была использована независимая выборка яванских макак из 28 самцов от 3,2 до 7,1 лет – группа молодых и 17 самцов от 17,1 до 30,2 лет – группа пожилых (Таблица К.1).

Все животные были импортированы из Юго-Восточной Азии и несколько поколений разводились внутри Курчатовского центра медицинской приматологии. Макаки содержались семейными группами в открытых вольерах, соединенных с закрытыми помещениями, в условиях окружающей среды (температура +23–28 °C, относительная влажность ~70%) при естественном дневном свете. Животные получали сбалансированный рацион, содержащий достаточное количество белков, жиров, углеводов, витаминов, пищевых волокон (овощей, фруктов, брикетированного корма и печения), и имели неограниченный доступ к чистой

питьевой воде. За две недели до забора биоматериала макаки были отсажены в индивидуальные клетки для избежания социального стресса. Все экспериментальные процедуры проводились в соответствии с рекомендациями Международной ассоциации по оценке и аккредитации ухода за лабораторными животными. Все макаки, включенные в исследование, были здоровы, что подтверждалось рутинными ветеринарными осмотрами, отрицательными результатами анализов на туберкулез и вирус герпеса-В, а также анализом предыдущих медицинских записей.

3.1.2. Сбор биоматериала

Образцы периферической крови и костного мозга животных были отобраны опытными ветеринарными врачами из Курчатовского центра медицинской приматологии ФГБУ НИЦ “Курчатовский институт” согласно одобренному этическим комитетом экспериментальному протоколу. Процедуру отбора проб проводили под общей анестезией. Работа проводилась в соответствии с утвержденным этическим разрешением Курчатовского центра медицинской приматологии (№ 02-3пр от 21 марта 2024 г.). Кровь брали из поверхностной бедренной вены и собирали в пробирки с гепарином для предотвращения свертывания (BD Vacutainer, США). Костный мозг отбирали из верхней трети диафиза большеберцовой кости иглой Джамшиди. Клеточный материал помещали в пробирки с гепарином и фосфатно-солевым буфером (PBS).

Образцы крови и костного мозга осаждали центрифугированием 10 мин при 300 g, после чего к клеточному осадку добавляли 10 объемов лизирующего буфера BD Pharm Lyse™ (BD Biosciences, США), инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре, а затем однократно отмывали PBS центрифугированием в том же режиме. Подсчет клеток производили на приборе Countess 3FL (Thermo Fisher Scientific, США). Осадок клеток использовали для выделения РНК.

3.1.3. Экстракция РНК

Клеточной осадок гомогенизировали в 1 мл реагента ExtractRNA (Евроген, Россия) и инкубировали 10 минут при комнатной температуре для лизиса клеток. После инкубации образцы центрифугировали 15 мин при 12 000 g и +4°C, верхнюю водную фазу отбирали в отдельную пробирку. К верхней фазе добавляли 200 мкл хлороформа и повторяли этап

центрифугирования. Верхняя водная фаза отбиралась снова, после чего для осаждения РНК к ней добавляли 500 мкл изопропанола. Образцы инкубировали 10 мин, затем центрифугировали в том же режиме. Осадок РНК промывали 80% этанолом при помощи центрифугирования. Осадок РНК высушивали при комнатной температуре до полного испарения спирта (10–15 мин), а затем растворяли в 50 мкл деионизированной воды. Количество экстрагированной РНК оценивали с помощью микрообъемного УФ-спектрофотометра NanoDrop OneC (Thermo Fisher Scientific, США). Для удаления остатков геномной ДНК проводили обработку образцов РНК ДНКазой I, свободной от РНКаз (1 U/мкл) (Thermo Fisher Scientific, США): к 3000 нг РНК добавляли 3 мкл фермента (из расчета 1 U на 1000 нг РНК) и инкубировали 30 мин при +37°C, затем фермент инактивировали инкубацией образцов 10 мин при +65°C. Очистку образов РНК проводили с помощью набора RNeasy MinElute Cleanup Kit (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с протоколом производителя. Количество свободной от ДНК РНК измеряли на флуориметре Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США). Целостность РНК оценивали по показателю RIN (RNA integrity number) методом капиллярного гель-электрофореза на приборе TapeStation 4150 (Agilent Technologies, США).

3.1.4. Приготовление траснкриптомных библиотек и секвенирование

Все образцы РНК имели RIN > 7 (Таблица Л.1). Библиотеки для РНК-секвенирования были приготовлены с использованием набора NEBNext® Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module и NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs. Inc., США) в соответствии с протоколом производителя. На приготовление библиотеки брали 1000 нг очищенной РНК. мРНК-обогащение проводили с помощью олиго-d(T) магнитных частиц. Затем РНК фрагментировали инкубированием при температуре +94°C в течении 7,5 мин. Далее проводили синтез первой, а затем – второй цепи кДНК. Концы полученных двухцепочечных фрагментов проходили репарацию, после чего к ним лигировали адаптерные последовательности и проводили ПЦР-обогащение (8 циклов). Последним этапом библиотеки чистили на магнитных частицах AMPure XP (Beckman Coulter, США). Молярность готовых библиотек измеряли методом количественной ПЦР набором VAHTS Library Quantification Kit for Illumina 2.0 (Vazyme, Китай). Секвенирование проводили в режиме парноконцевых прочтений 2×151 п.н. на приборе NovaSeq 6000 (Illumina, США).

3.1.5. Анализ данных РНК-секвенирования

Для каждой библиотеки было получено > 30 млн прочтений (Таблица Л.1). Контроль качества прочтений проводили с помощью программы FastQC v0.11.9 [152]. Удаление адаптеров и фильтрация низкокачественных прочтений выполнялись при помощи инструмента AdapterRemoval 2.3.3 [153]. Далее прочтения картировали на референсный геном *M. fascicularis* (GCF_037993035.2) программой HISAT2 v2.2.1 [251]. Подсчет количества прочтений, картированных на экзоны, выполняли с помощью featureCounts v2.0.3 [252] на основе аннотации генома *M. fascicularis* (GCF_037993035.2). Контроль качества полученных данных проводился с использованием утилиты CollectRnaSeqMetrics из Picard v2.26.11 [155]. Основные параметры качества траснкриптомных данных представлены в таблице Л.1.

Дальнейший анализ осуществлялся в программной среде R v4.5.3. Для устранения возможной технической вариабельности между сериями библиотек использовали алгоритм ComBat_seq из пакета sva v3.58.0 [253]. Предварительно из анализа исключали низкоэкспрессирующиеся гены с суммарным количеством прочтений менее 10 по всем образцам. Нормализация прочтений, картированных на экзоны, и анализ дифференциальной экспрессии проводились с помощью пакета DESeq2 v1.50.2 [254]. Молодые макаки выступали контрольной группой. Анализ выполнялся отдельно для каждой ткани (костного мозга и периферической крови). Статистически значимыми считались различия в экспрессии генов при $|\log_2 FC| > 1$ и *p*-value с поправкой Бенджамини-Хохберга (padj) < 0,05. Гены, прошедшие данные статистические пороги, далее по тексту обозначены как дифференциально экспрессирующиеся (ДЭ гены).

Иерархическую кластеризацию образцов проводили с использованием евклидова расстояния и метода полной связи (complete linkage) на основе 500 генов с наибольшей общей дисперсией экспрессии без учета групповой принадлежности (наиболее вариабельные гены) отдельно для костного мозга и периферической крови при помощи функции hclust. Результаты визуализировали в виде тепловых карт с z-нормировкой по генам функцией pheatmap из пакета pheatmap v1.0.13 [255]. Статистическую значимость различий между возрастными группами оценивали отдельно для каждой ткани по экспрессии 500 наиболее вариабельных генов с помощью пермутационного многомерного дисперсионного анализа (PERMANOVA) на основе матрицы евклидовых расстояний (999 перестановок, функция adonis2, пакет vegan v2.7.6) [256]. Качество кластеризации оценивали с помощью silhouette-анализа (пакет cluster v2.1.6 [257]).

В анализе функционального обогащения использовались человеческие ортологи генов макаки яванской. Конвертацию идентификаторов генов выполняли с помощью пакета biomaRt

v2.66.2 [258]. Анализ обогащения биологических процессов GO BP [221] и молекулярных путей KEGG [222] проводился с использованием пакета clusterProfiler v4.18.4 [259]. Для анализа обогащения наборов генов (GSEA), сгруппированных по функциональным категориям, также использовали пакет clusterProfiler v4.18.4. Статистически значимыми считали обогащенные биологические процессы и пути, прошедшие пороги по скорректированному значению *p*-value (padj < 0,05, метод Бенджамини-Хохберга) и q-value < 0,05 (оценка доли ложноположительных результатов по методу Стори). Для выявления тканеспецифичных и общих паттернов экспрессии было проведено пересечение списков генов, повышающих экспрессию ($log_2FC > 1$, padj < 0,05) в крови и в костном мозге, а также списков генов, понижающих экспрессию ($log_2FC < -1$, padj < 0,05) в крови и в костном мозге. Анализ функционального обогащения всех выделенных наборов генов был выполнен с помощью онлайн-платформ Metascape [260] и STRING [261]. Для контроля доли ложноположительных результатов применяли поправку Бенджамини-Хохберга; статистически значимыми считали термины и молекулярные пути при скорректированном значении *p*-value (FDR / q-value) < 0,05.

3.1.6. Анализ состава клеточных популяций в периферической крови

На независимой выборке яванских макак (Таблица К.1) был проведен анализ состава клеточных популяций в крови. Гематологический анализ выполняли сотрудники Курчатовского центра медицинской приматологии. Общее количество лейкоцитов, моноцитов, нейтрофилов, эозинофилов, базофилов и лимфоцитов измеряли с помощью автоматического гематологического анализатора MEK-7300K (Nihon Kohden, Япония).

Иммунофенотипирование клеточных популяций в крови методом проточной цитометрии проводили сотрудники ресурсного центра клеточных технологий и иммунологии лабораторного комплекса научно-технологического университета “Сириус”. Для окрашивания клеток использовали моноклональные антитела, конъюгированные с флуорохромами FITC, PE, APC и PerCP-Cy5.5: CD45 APC (клон D058-1283, кат. № 561290), CD3 PerCP-Cy5.5 (клон SP34-2, кат. № 552852), CD20 FITC (клон 2H7, кат. № 556632), CD16 PE (клон 3G8, кат. № 556619), CD56 PE (клон MY31, кат. № 556647), CD4 FITC (клон L200, кат. № 550628) и CD8 PE (клон RPA-T8, кат. № 557086) (BD Biosciences, США).

Для удаления эритроцитов к 5 мл цельной крови добавляли 45 мл 1× лизирующего буфера (кат. № 349202, BD Biosciences, США) и инкубировали 15 мин при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Затем клетки осаждали центрифугированием при

300 g в течение 10 мин и однократно отмывали в Stain Buffer (0,2% BSA) (кат. № 554657, BD Biosciences, США). Количество клеток подсчитывали на автоматическом счетчике Countess 3FL (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием красителей AO/PI (акридиновый оранжевый/пропидий йодид). Аликвоты клеточной суспензии (1 × 10^6 клеток на образец) инкубировали с антителами в течение 30 мин при +4°C в темноте, после чего клетки отмывали в Stain Buffer (0,2% BSA). Окрашенные образцы анализировали на проточном цитометре BD LSRFortessa (BD Biosciences, США). Субпопуляции лимфоцитов идентифицировали по комбинациям поверхностных маркеров: B-клетки – CD45+CD3−CD20+, T-клетки – CD45+CD20−CD3+, цитотоксические T-клетки (T-киллеры) – CD45+CD20−CD3+CD8+, T-хелперы – CD45+CD20−CD3+CD4+ и NK-клетки – CD45+CD3−CD20−CD16+CD56+. Обработку данных выполняли с использованием программного обеспечения FlowJo v10.10.1 (FlowJo, LLC, США). Стратегия гейтирования для идентификации основных субпопуляций лимфоцитов представлена на рисунке 3.1.

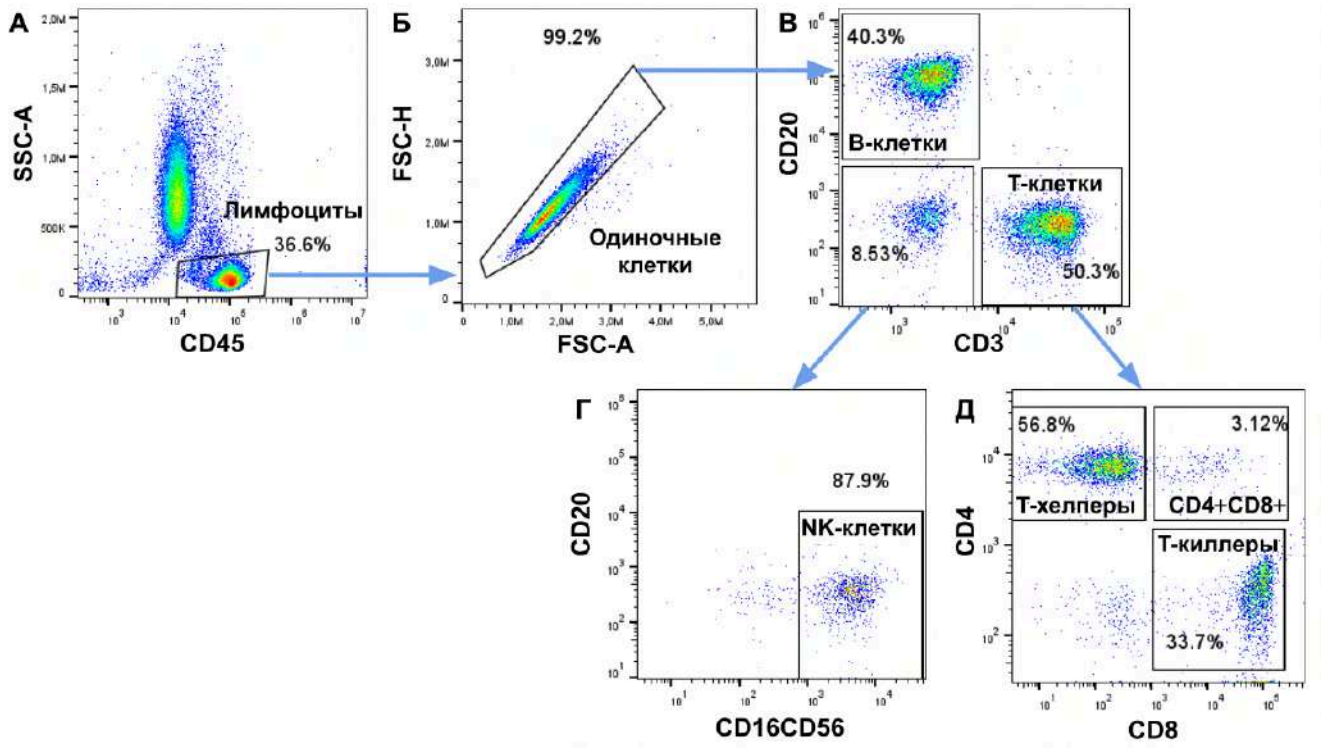


Рисунок 3.1 – Стратегия гейтирования для исследуемых субпопуляций лимфоцитов. На последовательных графиках флуоресценции и светорассеяния показано выделение популяции CD45+ клеток (лимфоциты) (**А**) с последующим исключением дуплетов (одиночные клетки) (**Б**). На графике **В** выделены популяции B-лимфоцитов (CD3−CD20+) и T-лимфоцитов (CD3+CD20−). На графике **Г** показана область для NK-клеток (CD20−CD16+CD56+). Из популяции T-лимфоцитов на графике **Д** выделены T-хелперы (CD4+CD8−), T-киллеры (CD4−CD8+) и дважды положительные T-лимфоциты (CD4+CD8+)

Статистический анализ данных был проведен в программной среде R v4.5.3. Для проверки выборок на нормальность распределения использовался критерий Шапиро-Уилка. Показатели, подчиняющиеся нормальному распределению, сравнивали с использованием параметрического t-критерия Стьюдента. В случае асимметричного распределения признаков анализ выполняли с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни (тест Уилкоксона). К полученным результатам применяли поправку на множественные сравнения методом Бенджамини-Хохберга. Различия считали статистически значимыми при скорректированном *p*-value (padj) < 0,05. Визуализация данных была выполнена при помощи пакета ggplot2 [159].

3.2. Результаты и обсуждение

3.2.1. Анализ транскриптомных профилей костного мозга и периферической крови

Анализ главных компонент (PCA), проведенный на основе 500 генов с наибольшей общей дисперсией экспрессии без учета групповой принадлежности (наиболее вариабельные гены), отдельно для костного мозга (Рисунок 3.2, А) и периферической крови (Рисунок 3.2, Б), демонстрирует разделение образцов по первой компоненте (PC1) в соответствии с возрастной группой. Это указывает на то, что возраст является одним из основных источников вариабельности транскриптома в исследуемых тканях.

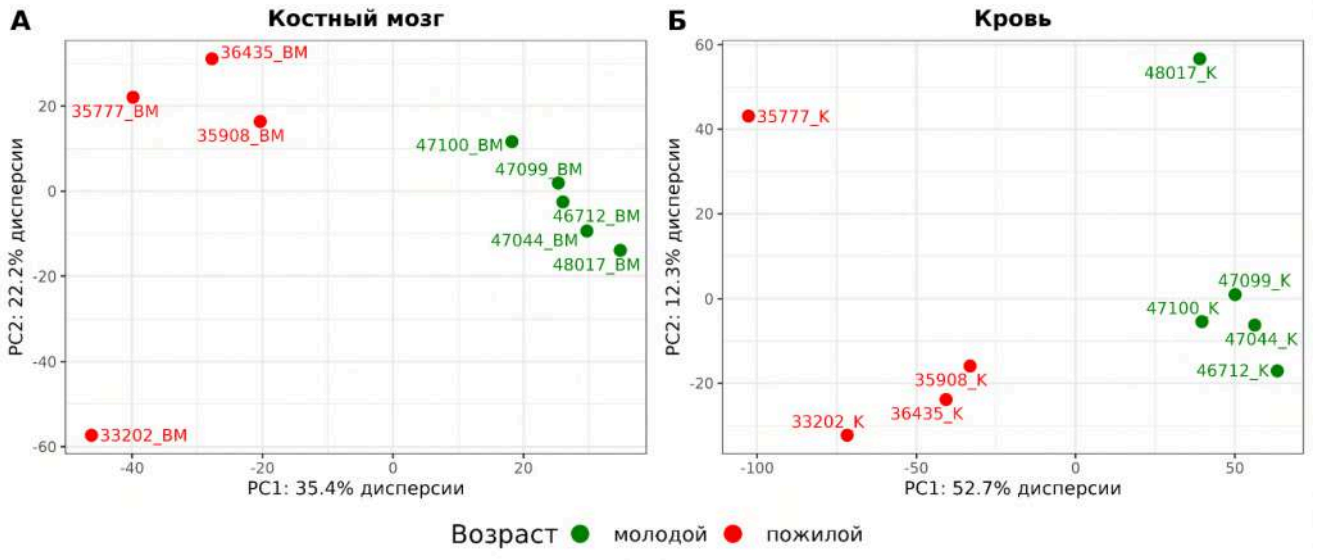


Рисунок 3.2 – Анализ главных компонент (PCA) для костного мозга (**А**) и крови (**Б**) яванских макак. Зеленым цветом обозначены образцы молодых животных, красным – пожилых. На осях обозначен процент объясняемой дисперсии для первой (PC1) и второй (PC2) главных компонент

Для оценки вклада возрастной группы в общую вариабельность транскриптома была проведена иерархическая кластеризация на основе 500 наиболее вариабельных генов отдельно для костного мозга (Рисунок 3.3, А) и периферической крови (Рисунок 3.3, Б). В обеих тканях образцы разделились на два кластера, соответствующих возрастным группам: 5 из 5 молодых животных попали в один кластер, 4 из 4 пожилых – в другой. Это указывает на более высокое сходство транскриптомных профилей внутри групп, чем между группами. Согласно результатам теста PERMANOVA, профили экспрессии 500 наиболее вариабельных генов статистически значимо различались между возрастными группами в обеих тканях: в костном мозге возрастная группа объясняла 41,6% дисперсии (R^2 = 0,416, F = 5,00, *p*-value = 0,009), в периферической крови – 58,5% (R^2 = 0,585, F = 9,86, *p*-value = 0,006). Silhouette-анализ выявил положительные значения силуэта для всех образцов (костный мозг: 0,127–0,457, среднее 0,300; кровь: 0,292–0,546, среднее 0,427). Это означает, что каждый образец был ближе к своему кластеру, чем к чужому.

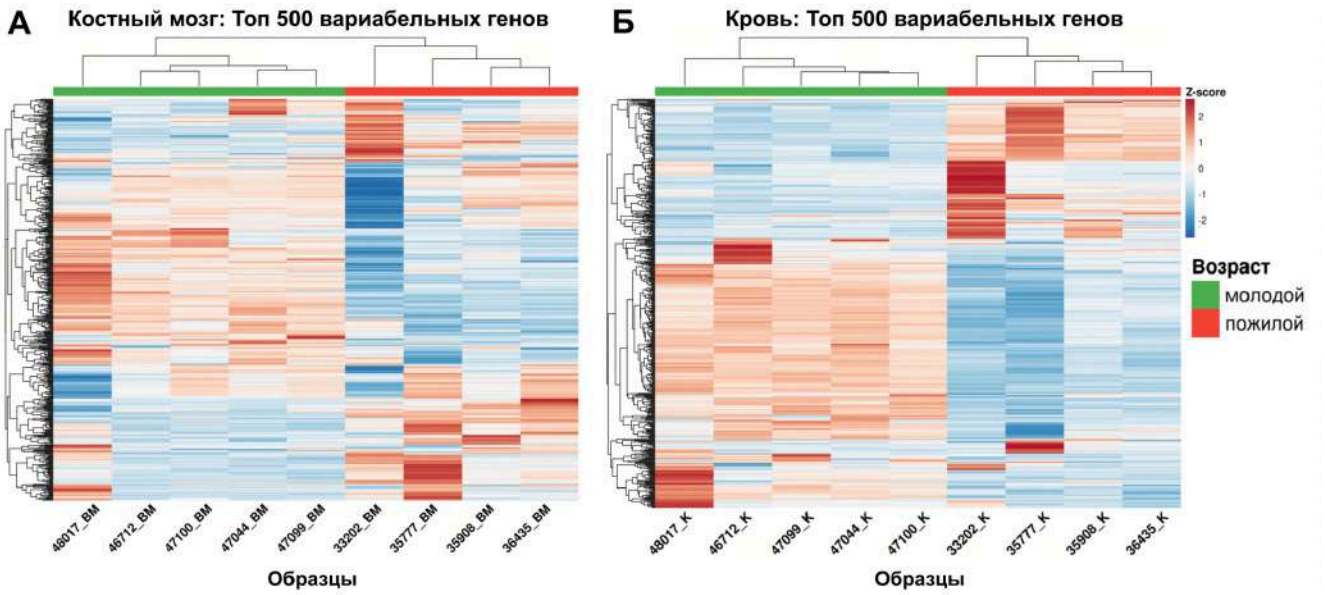


Рисунок 3.3 – Дендрограммы (сверху) отражают результаты кластеризации образцов костного мозга (**А**) и крови (**Б**). Тепловые карты демонстрируют z-нормированные уровни экспрессии генов (красный – выше среднего, синий – ниже среднего). Цветная кодировка над тепловыми картами указывает на принадлежность к возрастной группе: зеленый – молодые, красный – пожилые

Между молодой и пожилой группами макак было выявлено 1603 ДЭ гена. Из них в пожилом возрасте повышался уровень экспрессии 733 генов и снижался – 870 (Рисунок 3.4, А). В периферической крови количество ДЭ генов составило 4351, из которых 1958 гена

характеризовались повышенной экспрессией у пожилых животных, а 2393 – пониженной (Рисунок 3.4, Б).

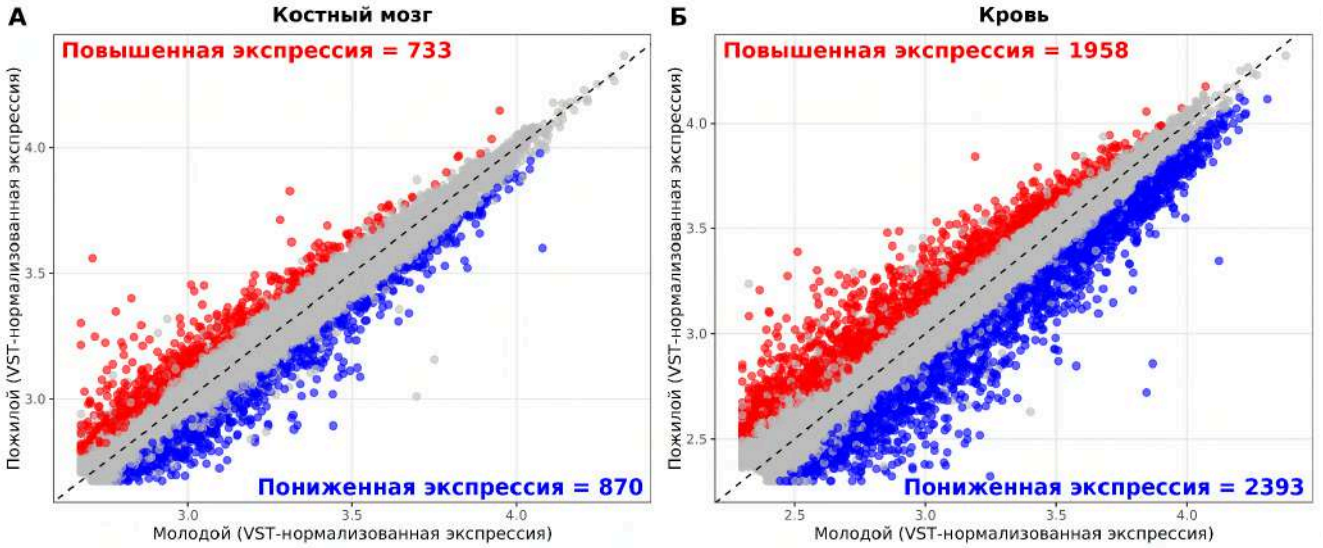


Рисунок 3.4 – Диаграмма рассеяния для дифференциально экспрессирующихся генов у пожилых яванских макак по сравнению с молодыми в костном мозге (**А**) и крови (**Б**). По оси X отложены средние значения VST-нормализованной экспрессии генов (variance stabilizing transformation, DESeq2) в группе молодых животных, по оси Y – в группе пожилых животных. Красными точками обозначены ДЭ гены, экспрессия которых повышена в группе пожилых макак, синими – понижена

Большее количество ДЭ генов в периферической крови (4351) по сравнению с костным мозгом (1603) может быть связано с тем, что транскриптом крови отражает не только изменения иммунных клеток, но и их реакцию на системные воспалительные и метаболические сигналы. В костном мозге характер возрастных изменений экспрессии генов может в большей степени определяться локальными взаимодействиями гемопоэтических клеток со стромальным микроокружением. Кроме того, на количество выявляемых ДЭ генов в обеих тканях может влиять возрастная динамика клеточного состава.

Для выявления биологических процессов, в которые вовлечены ДЭ гены в костном мозге и крови яванских макак, был выполнен анализ обогащения биологических процессов (GO BP). В обеих тканях были обогащены следующие процессы: миграция лейкоцитов (GO:0050900), хемотаксис (GO:0006935), регуляция иммунного ответа через поверхностные рецепторы (GO:0002768), регуляция эффекторных иммунных процессов (GO:0002697) и лейкоцит-опосредованная регуляция иммунного ответа (GO:0002703) (Рисунок 3.5). Однако в костном мозге в число наиболее значимых также вошли процессы, ассоциированные с

организацией внеклеточного матрикса (GO:0030198, GO:0043062), что может отражать возрастные изменения стромального микроокружения (Рисунок 3.5, А). В крови спектр обогащенных иммунных процессов оказался шире: помимо процессов миграции и регуляции лейкоцитов, в топ-15 вошли процессы дифференцировки лимфоцитов (GO:0030098), активации и дифференцировки Т-клеток (GO:0046631, GO:0030217), активации миелоидных клеток (GO:0002274), клеточного ответа на биотический стимул (GO:0071216), а также иммунного ответа, опосредованного миелоидными лейкоцитами (GO:0002444). Это может указывать на более выраженную перестройку как адаптивного, так и врожденного иммунного ответа в периферической крови (Рисунок 3.5, Б).

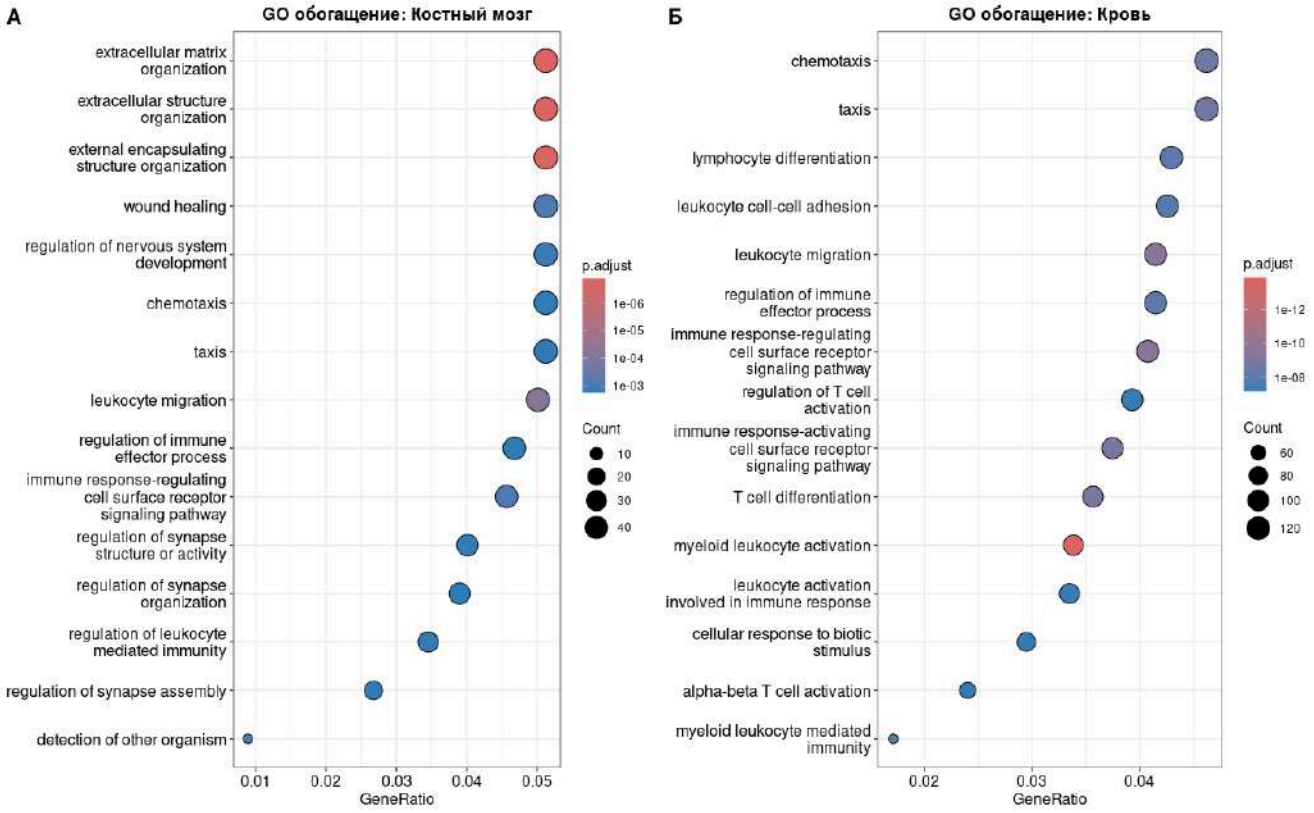


Рисунок 3.5 – Анализ обогащения биологических процессов (GO BP) для ДЭ генов в костном мозге (**А**) и крови (**Б**) яванских макак. По оси X отложена доля ДЭ генов, вовлеченных в данный процесс, от общего числа аннотированных генов в наборе (GeneRatio). Цветовая шкала отражает скорректированное значение *p*-value (padj), размер круга – количество ДЭ генов, участвующих в биологическом процессе

Для визуализации взаимосвязей между обогащенными биологическими процессами были построены сети обогащения (emapplot) на основе топ-20 наиболее значимых терминов для костного мозга и крови. Полученные сети демонстрируют функциональную кластеризацию

терминов в каждой из тканей. В костном мозге обогащенные термины организованы в четыре основных функциональных кластера: 1) процессы, связанные с нервной системой; 2) хемотаксис; 3) структура внеклеточного матрикса; 4) иммунные процессы, включающие регуляцию лейкоцит-опосредованного иммунного ответа, дифференцировку Т-клеток, регуляцию эффекторных процессов и регуляцию иммунного ответа через поверхностные рецепторы. Некоторые биологические процессы не объединились в кластеры: положительная регуляция MAPK-каскада, заживление ран и обнаружение чужеродных организмов (Рисунок 3.6, А). В крови большинство обогащенных терминов образовали единую крупную сеть, объединяющую процессы, связанные как с врожденным, так и с адаптивным иммунитетом, а также с миграцией иммунных клеток и хемотаксисом. Помимо основной сети, выявлены два отдельных кластера: процессы, связанные с ответом на внешний биотический стимул, и регуляция иммунного ответа через рецепторы на клеточной поверхности (Рисунок 3.6, Б).

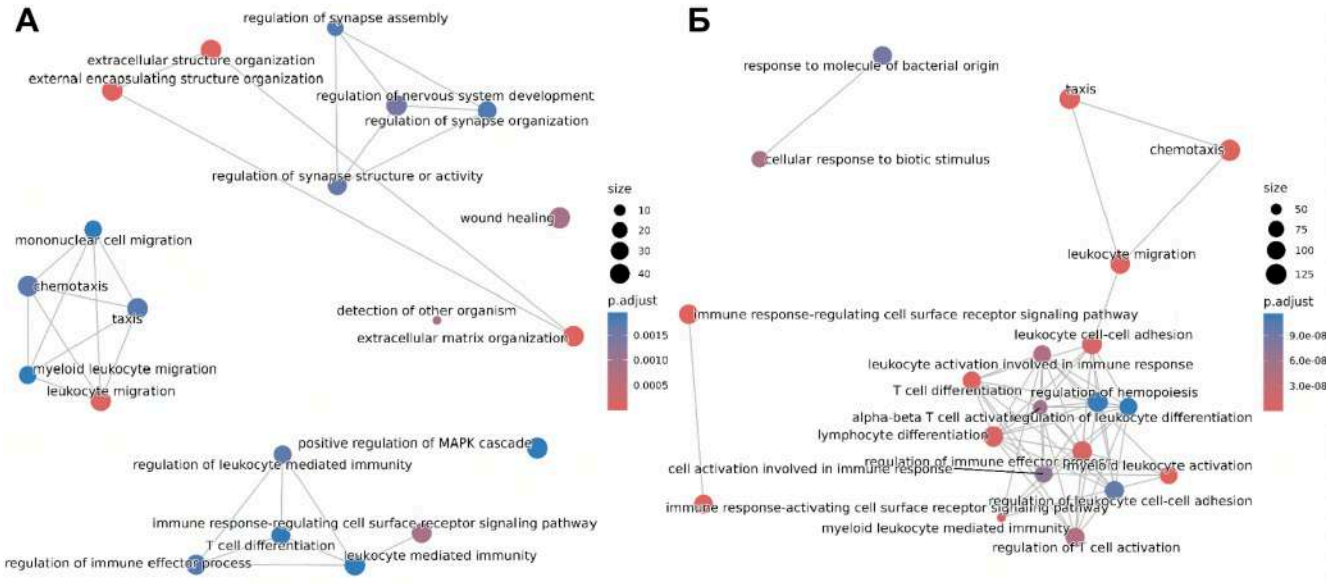


Рисунок 3.6 – Сеть обогащения (emapplot) по 20 наиболее значимым (padj) биологическим процессам GO в костном мозге (**А**) и крови (**Б**). Цветовая шкала показывает скорректированное значение *p*-value (padj). Размер круга отражает количество ДЭ генов, участвующих в биологическом процессе

Для поиска метаболических и сигнальных путей, в которые входят ДЭ гены каждой из анализируемых тканей, было проведено обогащение по базе данных KEGG. В обеих тканях были обогащены пути, связанные с передачей сигналов через Ras (hsa04014), Rap1 (hsa04015) и цитокиновые рецепторы (hsa04060), что отражает возрастные изменения клеточной сигнализации. В костном мозге наиболее значимыми оказались пути гемопоэтической линии

клеток (hsa04640) и PI3K-Akt сигнальный путь (hsa04151), что указывает на нарушение дифференцировки клеток крови и изменение сигналов выживания в строме (Рисунок 3.7, А). Кроме того, обогащение путей взаимодействия с внеклеточным матриксом (hsa04512) и фокальных контактов (hsa04510) указывает на возрастные изменения стромального микроокружения (Рисунок 3.7, А). В крови в число наиболее значимых вошли пути, связанные как с врожденным, так и с адаптивным иммунитетом: хемокиновая сигнализация (hsa04062), формирование фагосом (hsa04666), сигнальный путь FoxO (hsa04068), дифференцировка Th1 и Th2-клеток (hsa04658) и сигнальный путь NF-κB (hsa04064) (Рисунок 3.7, Б).

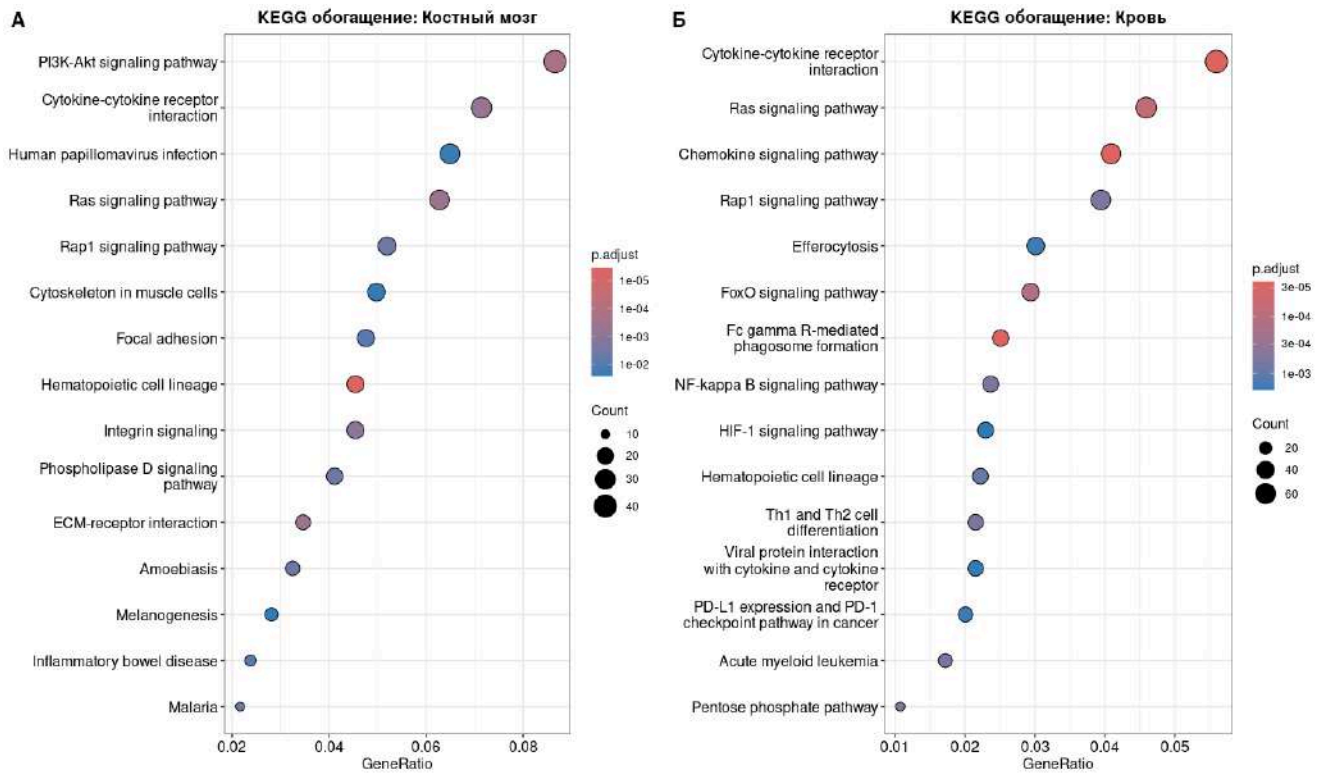


Рисунок 3.7 – Анализ обогащения молекулярных путей (KEGG) для ДЭ генов в костном мозге (**А**) и крови (**Б**) яванских макак. По оси X отложена доля ДЭ генов в данном молекулярном пути от общего числа аннотированных генов в наборе (GeneRatio). Цветовая шкала отражает скорректированное значение *p*-value (padj), размер круга – количество ДЭ генов, входящих в молекулярный путь

Для выявления системных транскрипционных изменений был выполнен GSEA с использованием баз данных биологических процессов GO и молекулярных путей KEGG. В костном мозге большинство биологических процессов, связанных с иммунными функциями, имели отрицательный нормализованный показатель обогащения (NES < 0), то есть ДЭ гены, вовлеченные в данные процессы, характеризуются преимущественно пониженной экспрессией

у пожилых животных. Среди таких процессов: детекция биотического стимула (NES = −1,97), сигнальный путь паттерн-распознающих рецепторов (NES = −1,52), дифференцировка остеобластов (NES = −1,83), интегрин-опосредованная сигнализация (NES = −1,75), фагоцитоз (NES = −1,65) и миграция лейкоцитов (NES = −1,62) (Рисунок 3.8, А). Среди иммунных процессов в крови также преобладали процессы с NES < 0, включая положительную регуляцию защитной реакции (NES = −1,91), иммунный ответ, опосредованный миелоидными клетками (NES = −1,82), активацию врожденного иммунного ответа (NES = −1,77), регуляцию воспалительного ответа (NES = −1,72) и сигнальный путь паттерн-распознающих рецепторов (NES = −1,59) (Рисунок 3.8, Б). Среди процессов с NES > 0 в крови был отмечен сигнальный путь Т-клеточных рецепторов (NES = 1,57), что может указывать на компенсаторно усиленную активность адаптивного Т-клеточного иммунитета в периферической крови (Рисунок 3.8, Б). Полученные результаты свидетельствуют о подавлении большинства иммунных функций с возрастом в обеих тканях, затрагивающих преимущественно механизмы врожденного иммунного ответа (фагоцитоз, распознавание паттернов патогенов, хемотаксис).

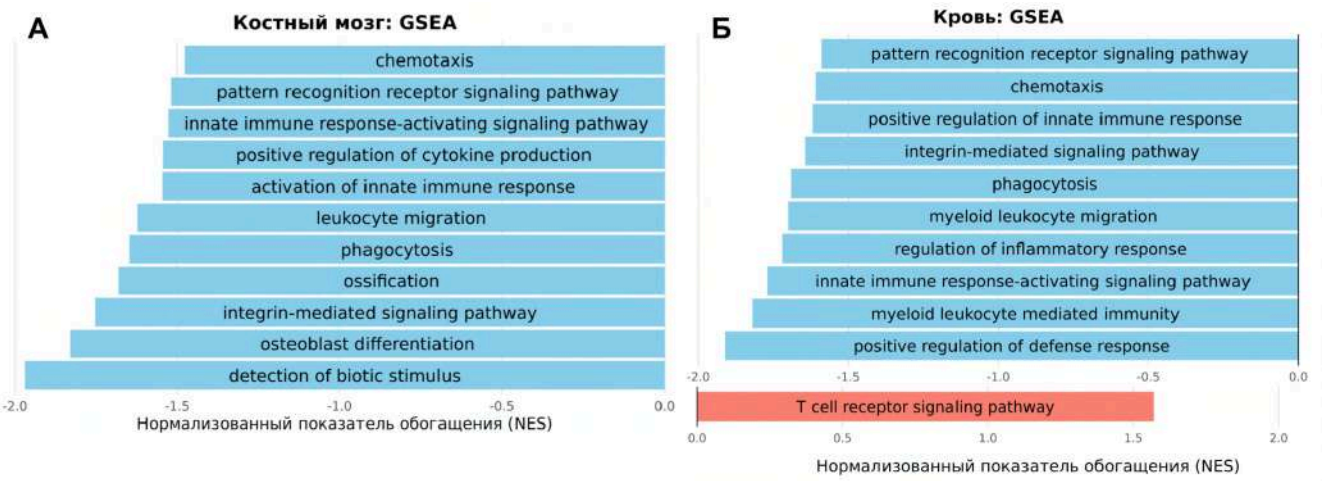


Рисунок 3.8 – Визуализация анализа обогащения наборов генов (GSEA) биологических процессов, преимущественно связанных с иммунной системой, в костном мозге (**А**) и крови (**Б**). Столбцы представляют нормализованные показатели обогащения (NES). Цвета: красный – положительное обогащение, голубой – отрицательное обогащение

3.2.2. Общие и тканеспецифичные паттерны экспрессии генов в костном мозге и периферической крови

Для выявления тканеспецифичных и общих транскриптомных изменений было проведено пересечение списков ДЭ генов с однонаправленным изменением экспрессии (повышение или понижение) у животных пожилой группы в периферической крови и в костном мозге. В результате было получено 564 общих гена с пониженным уровнем экспрессии (Рисунок 3.9, А) и 523 общих гена – с повышенным (Рисунок 3.9, Б).

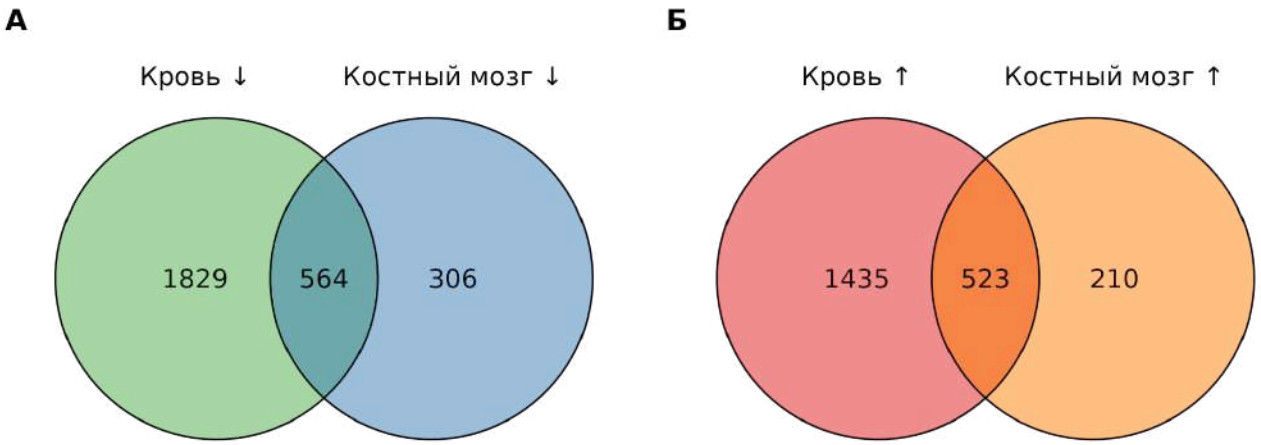


Рисунок 3.9 – Диаграммы Венна, показывающие пересечение списков ДЭ генов с пониженной (**А**) и повышенной (**Б**) экспрессией у пожилых яванских макак между тканями крови и костного мозга

На рисунке 3.10 представлены результаты функционального обогащения наборов ДЭ генов с пониженной и повышенной экспрессией, специфичных для крови. В наборе генов с пониженной экспрессией наиболее значимыми оказались биологические процессы и сигнальные пути, связанные с дегрануляцией нейтрофилов (R-HSA-6798695), внутриклеточными сигнальными каскадами (GO:0141124), эндоцитозом (GO:0006897), миграцией клеток (GO:0016477, GO:0030335), цитокиновым и хемокиновым сигналингом (GO:0034097, R-HSA-1280215, hsa04062, GO:0001819), а также ответом на бактериальные стимулы (GO:0009617). Данные результаты могут указывать на подавление процессов, связанных с активацией клеток врожденного иммунитета, их миграцией и ответом на внешние стимулы.

Среди генов с повышенной экспрессией значимое обогащение затронуло метаболические процессы: биосинтез производных углеводов (GO:1901137), метаболизм липидов (R-HSA-556833), а также ответ на повреждение ДНК (GO:0006974), регуляцию активации лейкоцитов (GO:0045321) и антиген-опосредованного сигналинга (GO:0050854, M34). Повышение экспрессии генов, связанных с вышеперечисленными процессами, может отражать изменения метаболического состояния и стрессовых реакций клеток крови, а также регуляции адаптивного иммунного ответа.

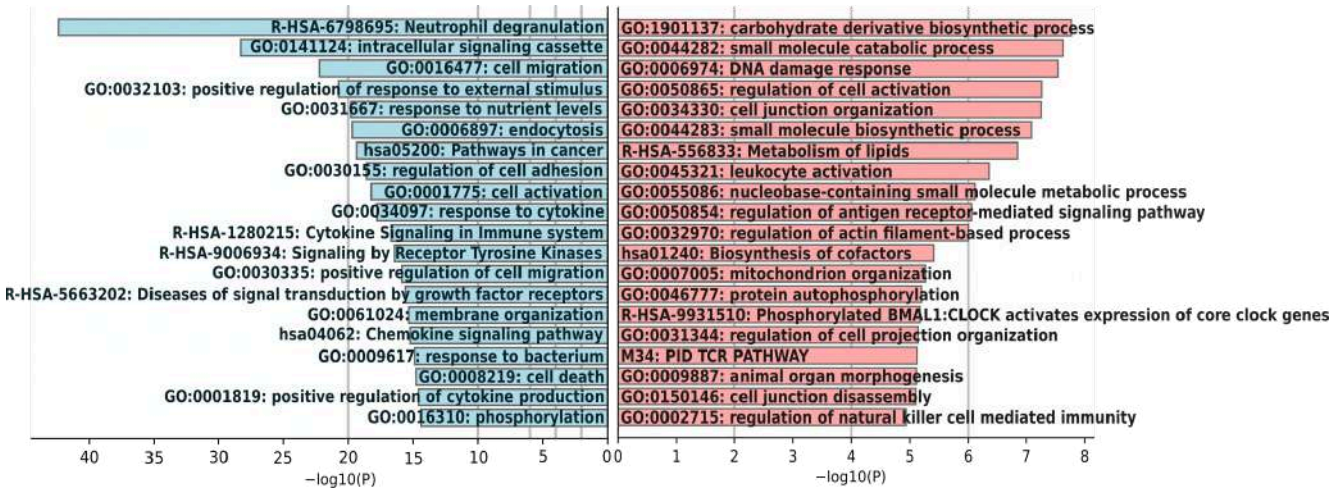


Рисунок 3.10 – Функциональное обогащение ДЭ генов, специфичных для крови (топ-20 кластеров, по данным Metascape). Голубой цвет – для генов с пониженной экспрессией, красный – повышенной. По оси X отложены отрицательные логарифмически преобразованные *p*-value (−log10(P))

На рисунке 3.11 представлены результаты функционального обогащения наборов ДЭ генов с пониженной и повышенной экспрессией, специфичных для костного мозга. Обогащение для генов с пониженной экспрессией показало биологические процессы и сигнальные пути, связанные со структурной перестройкой ткани, включая организацию внеклеточного матрикса (R-HSA-1474244, GO:0030198, M5884: NABA CORE MATRISOME) и актинового цитоскелета (GO:0030036), клеточную адгезию (GO:0098609, GO:0034329), развитие кровеносных сосудов (GO:0001568), биоминерализованных тканей (GO:0031214) и эпителия (GO:0060429). Наряду с этим снижение экспрессии затронуло регуляцию подвижности клеток (GO:0040017) и сигнальный путь Rap1 (hsa04015). Эти результаты могут указывать на изменения процессов поддержания костномозговой ниши, включая ремоделирование внеклеточного матрикса, межклеточные взаимодействия и регуляцию клеточной подвижности.

Среди генов с повышенной экспрессией обогащение было ассоциировано с ответом на повреждение ткани (GO:0009611), секретируемыми факторами старения (M5883: NABA SECRETED FACTORS), регуляцией острого воспалительного ответа (GO:0002673) и рекомбинации ДНК (GO:0000018). Это может отражать усиление стресс-ассоциированных ответов и регуляторных механизмов воспаления в костном мозге.

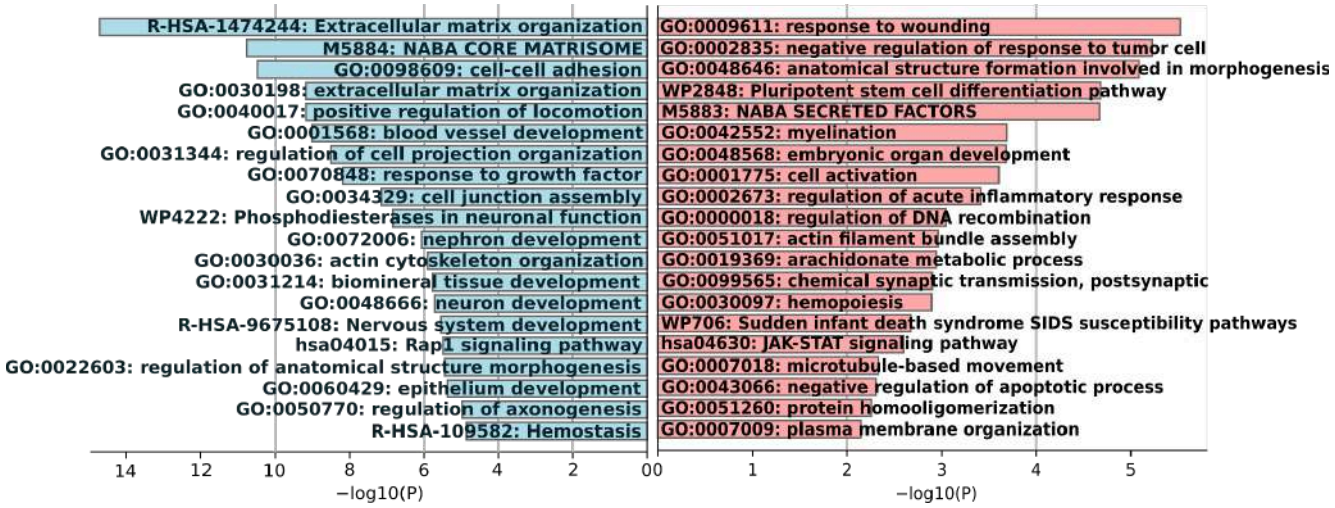


Рисунок 3.11 – Функциональное обогащение ДЭ генов, специфичных для костного мозга (топ-20 кластеров, по данным Metascape). Голубой цвет – для генов с пониженной экспрессией, красный – повышенной. По оси X отложены отрицательные логарифмически преобразованные *p*-value (−log10(P))

Для генов со сниженным уровнем экспрессии в костном мозге дополнительно была построена сеть белок-белковых взаимодействий, которая содержала 221 ген. Наиболее крупный кластер включал 116 генов. Центральные гены данного кластера были ассоциированы с такими биологическими процессами, как GO:0030199 “Collagen fibril organization”, GO:0007155 “Cell adhesion”, GO:0030198 “Extracellular matrix organization” и GO:0031214 “Biomineral tissue development” (Рисунок 3.12). Таким образом, анализ функционального обогащения кластера показал, что возрастные изменения транскриптомного профиля характеризуются выраженным снижением экспрессии генов, связанных с ремоделированием внеклеточного матрикса и межклеточной адгезией. Выявленное подавление экспрессии компонентов организации коллагеновых волокон и биоминерализации указывает на возможное нарушение структурной организации ткани и функционального состояния клеточных ниш в процессе старения костного мозга.

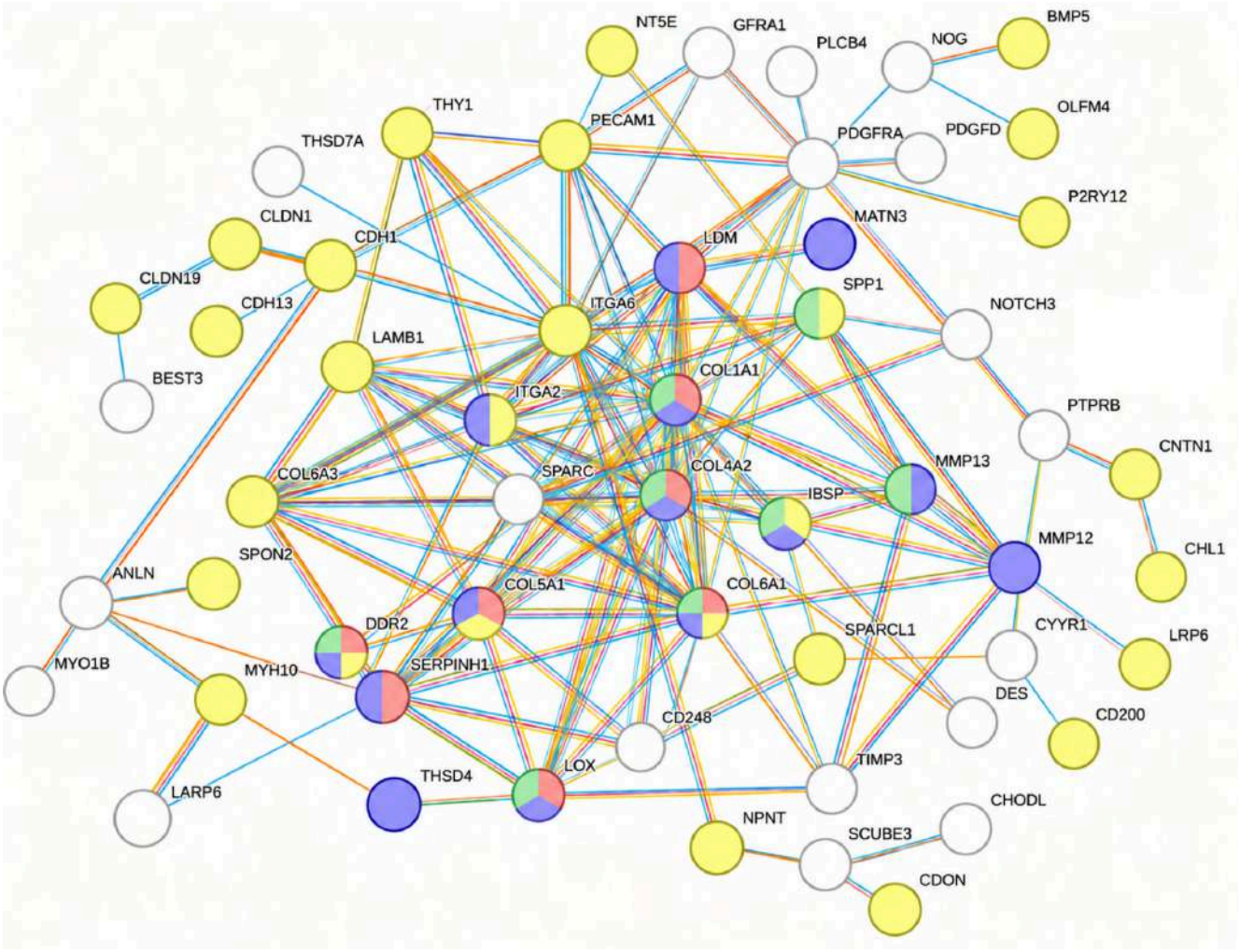


Рисунок 3.12 – Фрагмент наиболее крупного кластера сети белок-белковых взаимодействий для генов со сниженным уровнем экспрессии в костном мозге. Цветом выделены гены, ассоциированные со следующими биологическими процессами: красный – GO:0030199 “Collagen fibril organization”; желтый – GO:0007155 “Cell adhesion”; синий – GO:0030198 “Extracellular matrix organization”; зеленый – GO:0031214 “Biomineral tissue development”

На рисунке 3.13 представлены результаты функционального обогащения набора общих ДЭ генов с пониженной экспрессией. Наиболее значимыми оказались биологические процессы и сигнальные пути, связанные с воспалительным ответом (GO:0006954), Toll-рецепторными каскадами (R-HSA-168898), нейтрофильной активацией (R-HSA-6798695, hsa04613), активацией лейкоцитов в общем и макрофагов (GO:0045321, GO:0042116), а также хемотаксиса (GO:0006935). Данные результаты указывают на подавление процессов, в основном связанных с врожденным иммунным ответом, что также было выявлено на GSEA в обеих тканях. Кроме того, снижение экспрессии затронуло гены, кодирующие белки внеклеточного матрикса (M3008: NABA ECM GLYCOPROTEINS), что согласуется с негативным обогащением

интегрин-опосредованного сигнального пути, связанного с ремоделированием внеклеточного матрикса, в обеих тканях.

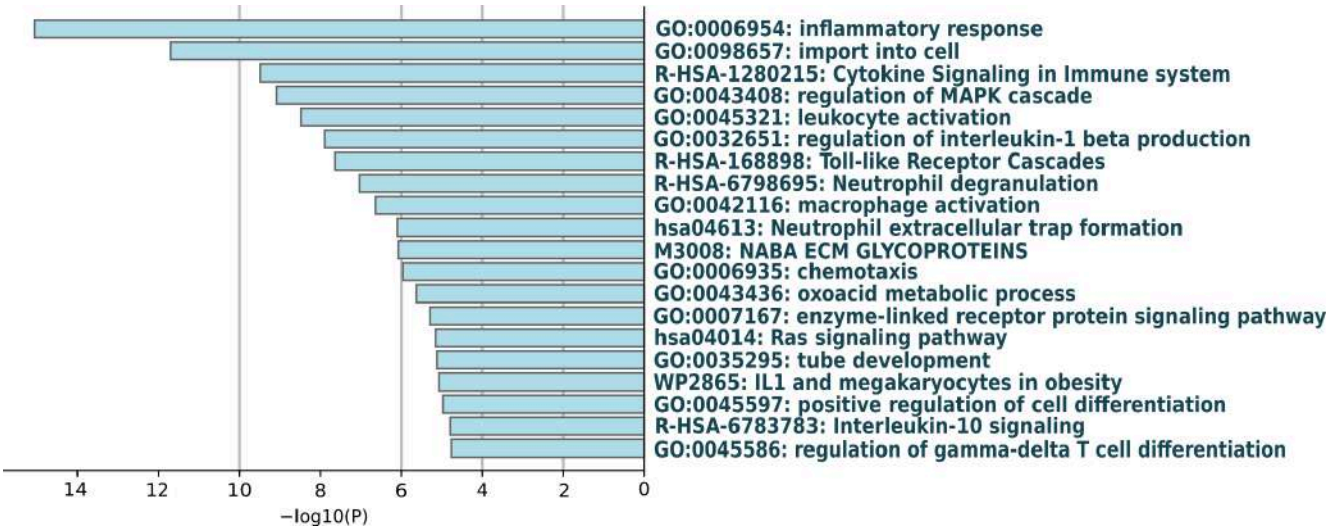


Рисунок 3.13 – Функциональное обогащение общих ДЭ генов с пониженной экспрессией (топ-20 кластеров, по данным Metascape). По оси X отложены отрицательные логарифмически преобразованные *p*-value (−log10(P))

В сети белок-белковых взаимодействий общих генов со сниженной экспрессией был выделен кластер, включающий 191 ген. Его функциональное обогащение было связано с сигнальными путями, опосредованными цитокинами и TLR (Рисунок 3.14). Центральные гены в этом кластере были вовлечены в сигнальные пути KEGG mcf04613 “Neutrophil extracellular trap formation” и mcf04060 “Cytokine-cytokine receptor interaction”, а также Reactome MAP-5602358 “Diseases associated with the TLR signaling cascade” (Рисунок 3.15).

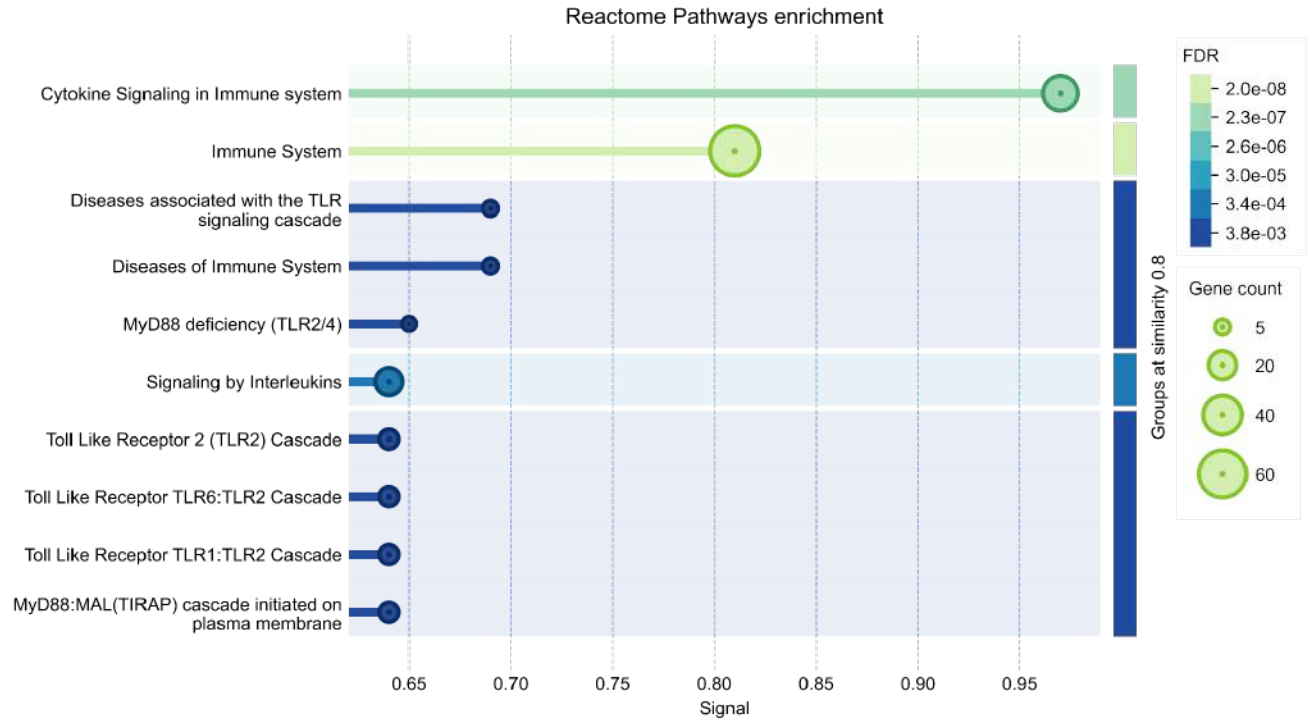


Рисунок 3.14 – Функциональное обогащение сигнальных путей (Reactome) кластера сети белок-белковых взаимодействий, выделенного среди общих для обеих тканей генов со сниженной экспрессией. По оси X отложен интегральный показатель силы обогащения (Signal), объединяющий величину обогащения и статистическую значимость. Размер кругов соответствует числу генов (Gene count), цвет отражает скорректированный *p*-value (FDR).

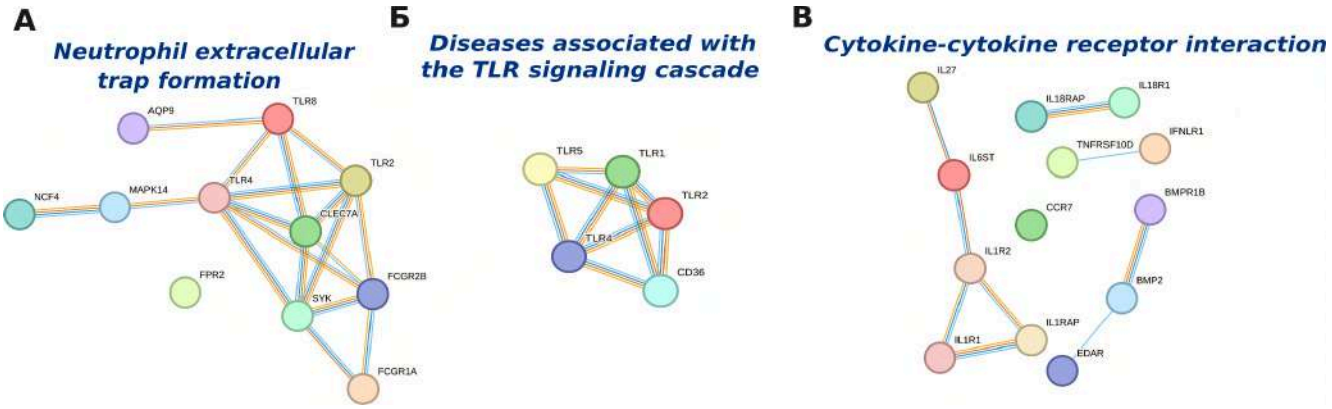


Рисунок 3.15 – Центральные гены кластера, ассоциированные с врожденным иммунным ответом и цитокиновой сигнализацией. **А** – гены сигнального пути KEGG mcf04613 “Neutrophil extracellular trap formation”, **Б** – гены сигнального пути Reactome MAP-5602358 “Diseases associated with the TLR signaling cascade”, **В** – гены сигнального пути KEGG mcf04060 “Cytokine-cytokine receptor interaction”

На рисунке 3.16 представлены результаты функционального обогащения набора общих ДЭ генов с повышенной экспрессией. Анализ определил их вовлеченность в следующие пути и

процессы, связанные с иммунными функциями: регуляция гемопоэза (GO:1903706), взаимодействие цитокинов с рецепторами (hsa04060), взаимодействие лимфоидных и миелоидных клеток (R-HSA-198933), активация NK- и Т-клеток и NK-клеточная цитотоксичность (GO:0051132, hsa04650).

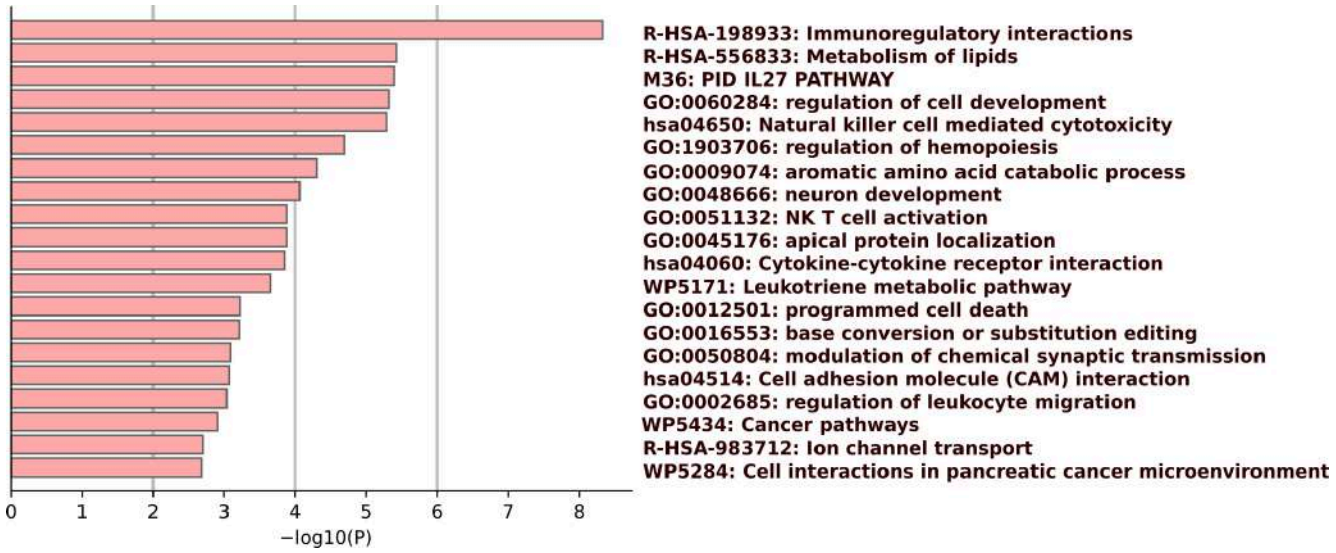


Рисунок 3.16 – Функциональное обогащение общих ДЭ генов с повышенной экспрессией (топ-20 кластеров, по данным Metascape). По оси X отложены отрицательные логарифмически преобразованные *p*-value (−log10(P))

Анализ сети белковых взаимодействий для генов с повышенной экспрессией в обеих тканях выявил несколько кластеров, крупнейший из которых объединял 84 гена. Функциональное обогащение этого кластера показало связь с NK-клеточной цитотоксичностью, адаптивным иммунным ответом, эффекторными процессами и активацией Т-клеток (Рисунок 3.17). Центральные гены данного кластера экспрессируются в Т-лимфоцитах (BTO:0000289) и NK-клетках (BTO:0000914), а также входят в сигнальный путь KEGG mcf04650 “Natural killer cell mediated cytotoxicity” (Рисунок 3.18).

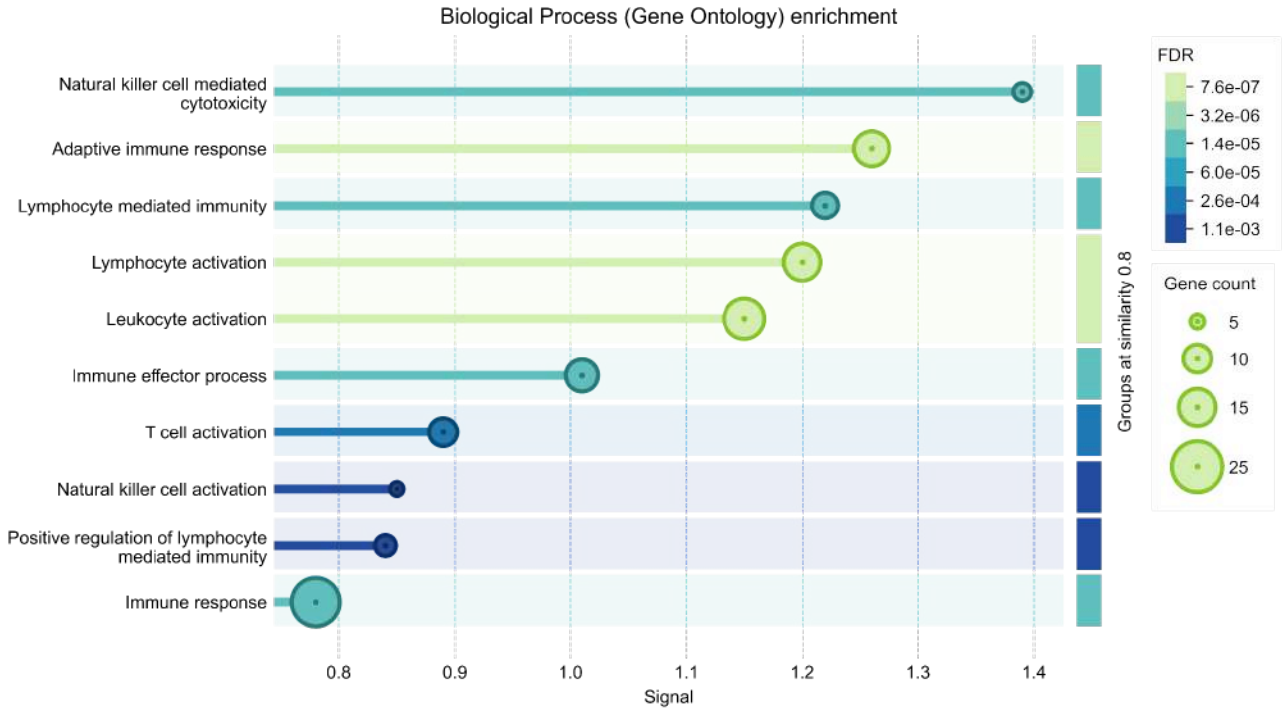


Рисунок 3.17 – Функциональное обогащение биологических процессов (GO BP) кластера сети белок-белковых взаимодействий, выделенного среди общих для обеих тканей генов с повышенной экспрессией. По оси X отложен интегральный показатель силы обогащения (Signal), объединяющий величину обогащения и статистическую значимость. Размер кругов соответствует числу генов (Gene count), цвет отражает скорректированный *p*-value (FDR).

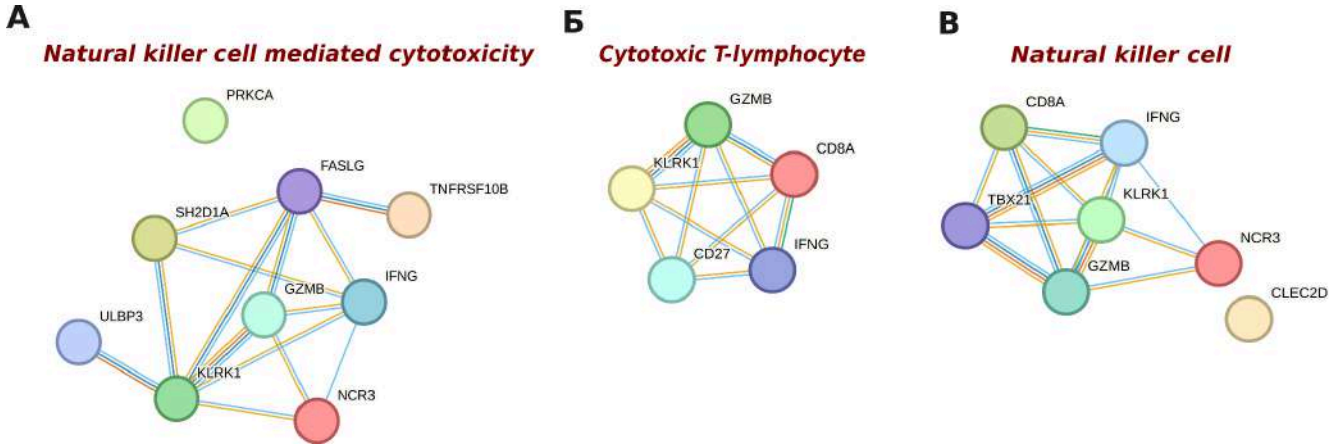


Рисунок 3.18 – Центральные гены кластера, ассоциированные с цитотоксическим ответом. **А** – гены сигнального пути KEGG mcf04650 “Natural killer cell mediated cytotoxicity”, **Б** – гены, экспрессирующиеся в цитотоксических Т-лимфоцитах, **В** – гены, экспрессирующиеся в NK-клетках

Среди генов с пониженной экспрессией у пожилых животных в обеих тканях оказались маркеры врожденного иммунного ответа. Например, *N4BP3* – положительный регулятор воспаления в ответ на вирусные и бактериальные инфекции и *CD177* – поверхностный маркер

нейтрофилов, отвечающий за их миграцию к очагам воспаления (Рисунок 3.19). Снижают экспрессию в группе пожилых макак также маркеры моноцитов: *CD14* – только в крови, *CD163* – и в крови, и в костном мозге. Пониженная экспрессия в пожилой группе детектируется и для генов *FPR1* и *FPR2*, кодирующих рецепторы, экспрессирующиеся на поверхности широкого спектра клеток врожденного иммунного ответа, преимущественно нейтрофилов, моноцитов, макрофагов, а также эозинофилов и NK-клеток, где они опосредуют хемотаксис и активацию воспалительного ответа в ответ на бактериальные стимулы (Рисунок 3.19). Кроме того, наблюдается снижение экспрессии *CXCR1*, хемокинового рецептора, критически важного для хемотаксиса нейтрофилов и их привлечения к очагам воспаления (Рисунок 3.19). Некоторые гены, ассоциированные с наивными Т-клетками, также снижают экспрессию: *CCR7*, *LEF1* и *SELL* – в обеих тканях и *FOXO1* – достигает значимости только в крови (Рисунок 3.19). Для крови также обнаружено повышение экспрессии регулятора клеточного цикла и одного из маркеров сенесентных клеток – *CDKN2A* (p16). При этом другой канонический маркер сенесцентности, *CDKN1A* (p21), не показал статистически значимых возрастных изменений ни в одной из тканей (Рисунок 3.19).

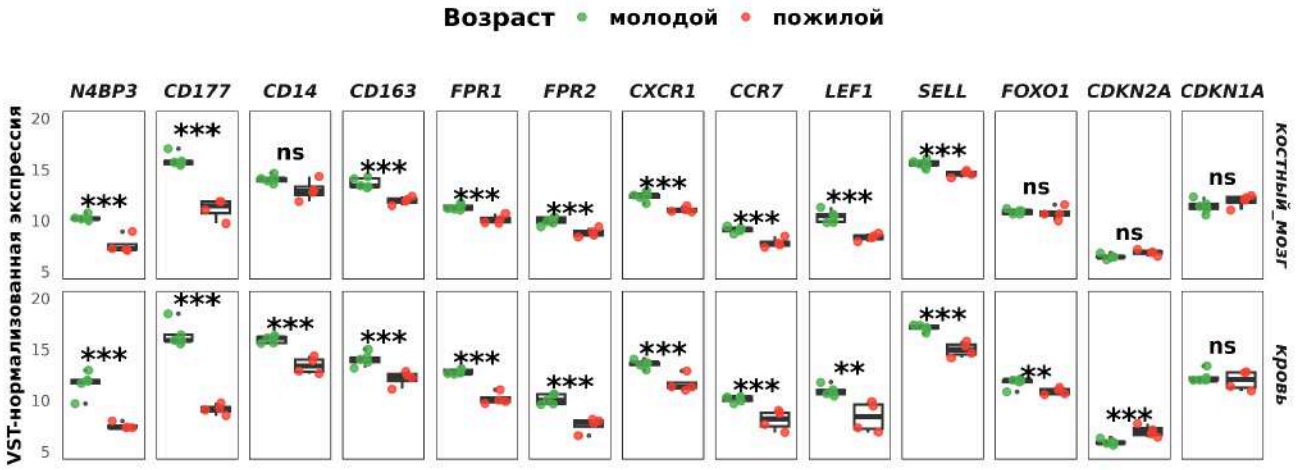


Рисунок 3.19 – Экспрессия генов, связанных с врожденным иммунным ответом, маркеров наивных Т-клеток, а также маркеров клеточного старения в костном мозге и крови молодых (n = 5) и пожилых (n = 4) яванских макак. По оси Y отложены уровни VST-нормализованной экспрессии генов (variance stabilizing transformation, DESeq2). Уровни значимости: * padj < 0,05; ** padj < 0,01; *** padj < 0,001; ns – не значимо (padj ≥ 0,05)

В ходе анализа генов, синхронно изменяющих экспрессию у пожилых макак в обеих тканях, было обнаружено снижение экспрессии генов из разных семейств паттерн-распознающих рецепторов (PRR). Среди Toll-подобных рецепторов (TLR) пониженная

экспрессия в обеих тканях наблюдалась для семи генов семейства: *TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR8* и *TLR10*. Экспрессия *TLR7* снижалась только в костном мозге, а *TLR3* – не менялась в обеих тканях (Рисунок 3.20). Что касается семейства RIG-1 подобных рецепторов (RLR), то экспрессия *RIGI* значимо снижалась и в крови, и в костном мозге, в то время как *IFIH1* (MDA5) – только в крови, а по экспрессии *DHX58* (LGP2) значимых различий не наблюдалось (Рисунок 3.20). Среди лектиновых рецепторов С-типа (CLR) *CLEC4E* и *CLEC7A* показали значимое снижение экспрессии как в крови, так и в костном мозге, *CLEC9A* – только в крови, экспрессия *CLEC6A* изменилась не значимо, а *CLEC4C* и *CLEC10A* повысилась в обеих тканях (Рисунок 3.20). Гены семейства NOD-подобных рецепторов (NLR) *NLRX1, NLRC4, NLRP12* и *NAIP* демонстрировали устойчивое снижение экспрессии как в крови, так и в костном мозге, тогда как снижение экспрессии *NOD2* достигло статистической значимости только в крови (Рисунок 3.20).



Рисунок 3.20 – Экспрессия генов разных семейств паттерн-распознающих рецепторов (PRR) в костном мозге и крови молодых (n = 5) и пожилых (n = 4) яванских макак. По оси Y отложены уровни VST-нормализованной экспрессии генов (variance stabilizing transformation, DESeq2). Уровни значимости: * padj < 0,05; ** padj < 0,01; *** padj < 0,001; ns – не значимо (padj ≥ 0,05)

Экспрессия генов, связанных с цитотоксической активностью лимфоцитов (*CD8A, GZMB, PRF1, KLRK1, FASLG, TBX21, CCR5, GNLY, IFNG, NCR3*), была выше у пожилых животных в обеих тканях. При этом статистически значимое повышение экспрессии *GNLY* выявлено только в крови, а *PRF1* – только в костном мозге (Рисунок 3.21).

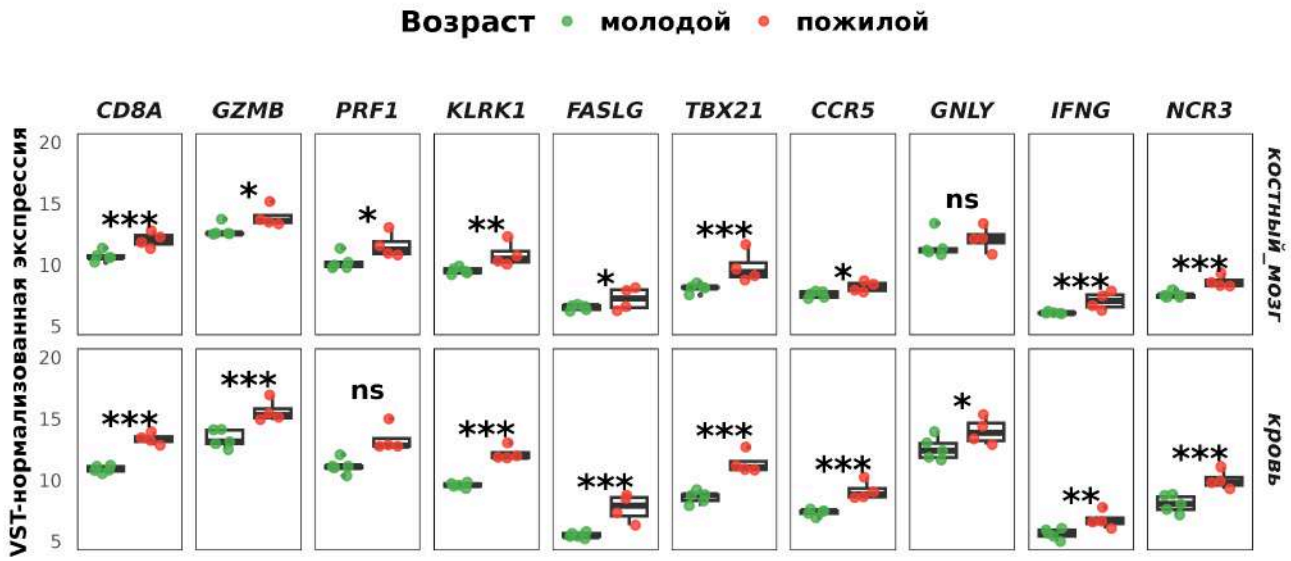


Рисунок 3.21 – Экспрессия основных маркеров цитотоксических лимфоцитов в костном мозге и крови молодых (n = 5) и пожилых (n = 4) яванских макак. По оси Y отложены уровни VST-нормализованной экспрессии генов (variance stabilizing transformation, DESeq2). Уровни значимости: * padj < 0,05; ** padj < 0,01; *** padj < 0,001; ns – не значимо (padj ≥ 0,05)

Также были проанализированы гены основных провоспалительных цитокинов и хемокинов SASP: *IL1A, IL1B, IL6, TNF, CXCL8, CCL2*. Экспрессия ни одного из этих генов у пожилых макак не повышалась. Более того, наблюдалось значимое снижение экспрессии *CXCL8* в крови (Рисунок 3.22).

Значения $\log_2$FC и padj для каждого из вышеперечисленных генов в костном мозге и периферической крови приведены в таблице М.1.

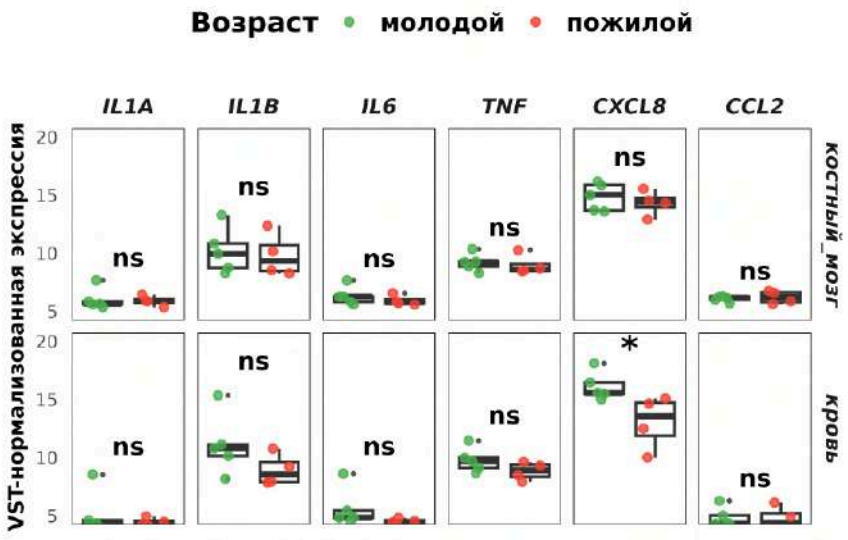


Рисунок 3.22 – Экспрессия основных маркеров провоспалительных цитокинов и хемокинов в костном мозге и крови молодых (n = 5) и пожилых (n = 4) яванских макак. По оси Y отложены уровни VST-нормализованной экспрессии генов (variance stabilizing transformation, DESeq2). Уровни значимости: * padj < 0,05; ** padj < 0,01; *** padj < 0,001; ns – не значимо (padj ≥ 0,05)

Таким образом, возрастные транскриптомные изменения иммунной системы яванских макак в костном мозге и в периферической крови имеют схожие закономерности. Так, в обеих тканях выявлено снижение экспрессии маркеров миелоидных клеток (*CD177, CD14, CD163, CXCR1, FPR1* и *FPR2*). Рецепторы *FPR1* и *FPR2* необходимы для распознавания бактериальных лигандов и совместно с *CD177* опосредуют активацию нейтрофилов и направленный хемотаксис. Уменьшение уровня экспрессии этих генов может указывать на возрастное снижение функциональной активности нейтрофилов и их чувствительности к патогенам [80,262]. Одновременное снижение экспрессии *CXCR1* и его лиганда *CXCL8* (IL-8) также свидетельствует о возрастном ослаблении хемотаксической способности нейтрофилов. Ранее в исследовании на группе из 70 здоровых людей разных возрастных групп было показано, что нейтрофилы пожилых людей характеризуются сниженной направленной миграцией в ответ на CXCL8 по сравнению с нейтрофилами молодых доноров [81]. В соответствии с этим результат GSEA в обеих тканях показал отрицательное обогащение биологических процессов, связанных с хемотаксисом и миграцией клеток, врожденным иммунным ответом, ответом на биотические стимулы, а также сигнальных путей паттерн-распознающих рецепторов. При этом среди сигнальных путей Reactome для кластера генов со сниженной экспрессией преобладали каскады Toll-подобных рецепторов и адаптерного белка MyD88, что согласуется со снижением экспрессии большинства представителей семейства TLR (*TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR8* и *TLR10*). Снижение экспрессии генов, связанных с врожденным иммунным ответом и

сигнальным путем TLR, также было показано на транскриптоме периферической крови тибетских макак [17]. Вместе со сниженной экспрессией классического маркера моноцитов *CD14* (корецептора TLR4) и противовоспалительного маркера макрофагов *CD163,* это отражает возрастную перестройку транскрипционных программ, связанных с распознаванием патогенных паттернов и функционированием миелоидных клеток. Возрастная дисрегуляция TLR-зависимого врожденного иммунного ответа описана и у человека [263]. Например, у пожилых людей показано снижение функционального ответа на стимуляцию TLR2 и TLR4, сопровождающееся повышенной базальной продукцией TNF-α, однако при этом возрастных различий в экспрессии *TLR2*, *TLR4* и *MYD88* на уровне мРНК выявлено не было [76].

Примечательно, что экспрессия основных маркеров SASP у яванских макак с возрастом повышена не была, что может показаться противоречащим устоявшейся парадигме возрастного хронического воспаления. Однако это не исключает наличия системного воспаления, поддерживаемого альтернативными механизмами. Одним из таких механизмов может быть хроническая цитотоксическая активность активированных Т-клеток и NK-клеток.

Анализ функционального обогащения общих генов с повышенной экспрессией выявил пути, связанные с активацией NK- и Т-клеток и NK-клеточной цитотоксичностью. Это позволяет предположить повышение активности цитотоксических лимфоцитов. В частности, экспрессия маркеров цитотоксических лимфоцитов (*CD8A*, *GZMB*, *PRF1*, *KLRK1*, *FASLG*, *TBX21*, *CCR5*, *GNLY, IFNG, NCR3*) была значимо повышена в группе пожилых макак. Сходный профиль возрастных изменений с ростом экспрессии генов, связанных с цитотоксической активностью NK- или Т-клеток, описан в транскриптомном исследовании крови яванских макак [18], а также в анализе scRNA-seq ряда иммунных тканей макак-резусов [20]. Полученные данные могут отражать усиление NK-подобных цитотоксических характеристик Т-лимфоцитов, в частности CD8+ Т-клеток. Накопление CD8+ Т-клеток с NK-подобным цитотоксическим фенотипом является одним из характерных признаков иммуностарения в крови приматов, включая человека [264,265]. Масштабные транскриптомные атласы иммунных клеток человека показывают, что возрастные изменения цитотоксических лимфоцитов развиваются на фоне более общего процесса утраты транскрипционной идентичности эффекторных и цитотоксических популяций, сопровождающегося увеличением их гетерогенности и усилением провоспалительных и эффекторных характеристик [266]. Наряду с этим снижение экспрессии некоторых маркеров наивных Т-клеток (*CCR7*, *LEF1, SELL* и *FOXO1*), обнаруженное у пожилых макак, может отражать возрастное истощение пула наивных Т-клеток, ранее описанное в периферической крови как у макак, так и у людей [267,268].

3.2.3. Возрастные изменения количественного состава клеточных популяций в периферической крови

Анализ количественного состава популяций иммунных клеток в периферической крови выявил статистически значимое снижение общего числа лейкоцитов в группе пожилых макак (Рисунок 3.23, А), что может указывать на системное угнетение гемопоэза. При этом соотношение миелоидных и лимфоидных клеток не различалось между между возрастными группами (Рисунок 3.23, Б), что расходится с представлением о возрастном миелоидном сдвиге, согласно которому с возрастом происходит усиление миелоидного кроветворения и угнетение лимфоидного [269,270]. В структуре миелоидного пула прослеживались разнонаправленные изменения. Общее количество нейтрофилов ($\times 10^9$/л) было значимо снижено у пожилых животных, тогда как наблюдаемая тенденция к снижению их доли (%) среди лейкоцитов не достигла статистической значимости (padj = 0,11, Рисунок 3.23, В). В то же время доля двух минорных миелоидных популяций (эозинофилов и базофилов) повышалась (Рисунок 3.23, Е–Ж), а уровень моноцитов значимо не отличался между группами (Рисунок 3.23, Д). Общее количество лимфоцитов (10^9/L), как и их доля среди лейкоцитов (%) не изменялись с возрастом (Рисунок 3.23, Г). Статистические показатели межгруппового сравнения представлены в таблице Н.1.

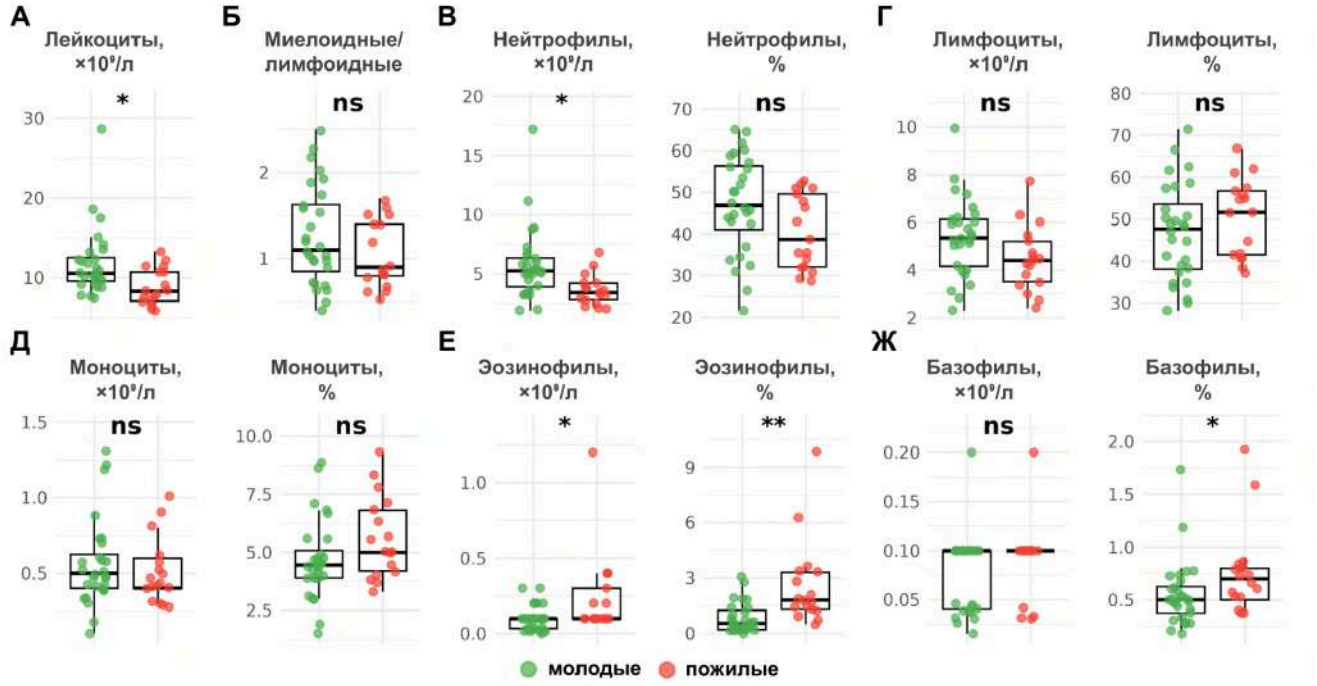


Рисунок 3.23 – Количественный состав популяций иммунных клеток в крови молодых (n = 28) и пожилых (n = 17) яванских макак по данным гематологического анализа. Уровни значимости: * padj < 0,05; ** padj < 0,01; *** padj < 0,001; ns – не значимо (padj ≥ 0,05)

Анализ количественного состава субпопуляций лимфоцитов показал значимое снижение у пожилых яванских макак числа В-клеток в пересчете на 100 000 лейкоцитов и их доли среди CD45+ лимфоцитов (Рисунок 3.24, А), а также снижение доли (%) Т-хелперов среди CD3+ Т-лимфоцитов (Рисунок 3.24, Б). При этом количество цитотоксических Т-клеток (Т-киллеры) в пересчете на 100 000 лейкоцитов, как их доля среди CD3+ лимфоцитов статистически значимо не различались между возрастными группами (Рисунок 3.24, В). Статистически значимых межгрупповых различий также не было выявлено ни по абсолютному числу NK-клеток на 100 000 лейкоцитов, ни по их доле в популяции лимфоцитов (Рисунок 3.24, Д). Возрастные изменения субпопуляционного состава лимфоцитов у китайских макак-резусов также включали снижение общего количества В-клеток. Дополнительно у них наблюдался сдвиг от наивного фенотипа к фенотипу В-клеток памяти. В Т-клеточном компартменте прослеживалось снижение доли наивных Т-клеток с увеличением доли эффекторных Т-клеток памяти [149].

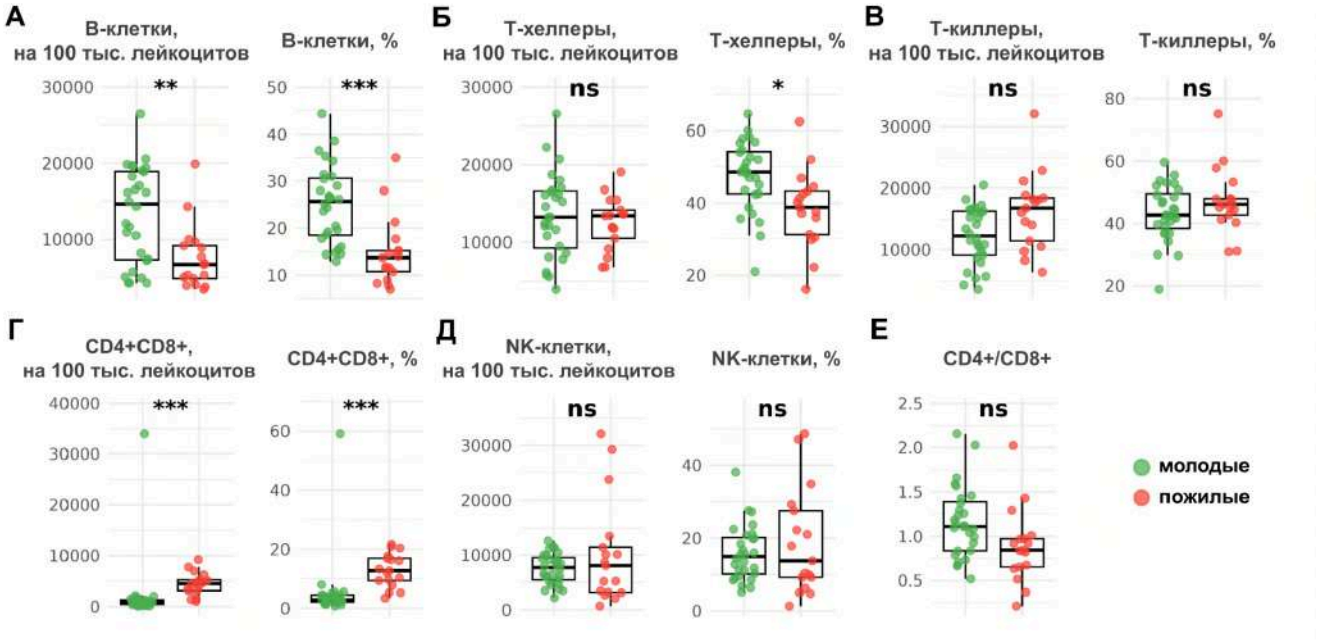


Рисунок 3.24 – Количественный состав субпопуляций лимфоцитов в крови молодых (n = 28) и пожилых (n = 17) яванских макак по данным проточной цитометрии. Уровни значимости: * padj < 0,05; ** padj < 0,01; *** padj < 0,001; ns – не значимо (padj ≥ 0,05)

У пожилых яванских макак выявлено статистически значимое повышение количества и доли (%) редкой популяции Т-лимфоцитов с двойной экспрессией CD4 и CD8 (CD4+CD8+) (Рисунок 3.24, Г). Возрастное увеличение этой популяции у яванских макак описано и в более ранних исследованиях [271,272]. В тимусе CD4+CD8+ Т-лимфоциты представляют собой незрелые клетки, тогда как в периферической крови эта популяция характеризуется фенотипом Т-клеток памяти. Возрастное накопление периферических CD4+CD8+ Т-лимфоцитов у яванских макак авторы одной из более ранних работ связывали с инволюцией тимуса и пролиферацией и клональной экспансией зрелых периферических Т-клеток (преимущественно CD4+ Т-лимфоцитов памяти), в том числе в ответ на повторную антигенную стимуляцию инфекционными агентами [272].

Низкое или инвертированное соотношение CD4+/CD8+ связывают с фенотипом иммунного риска: нарушением иммунных функций, старением иммунной системы и хроническим воспалением [273]. Возрастное снижение этого показателя было описано у китайских макак-резусов [149], где оно было ассоциировано не только с уменьшением количества Т-хелперных клеток, но и с повышением цитотоксических Т-клеток, в том числе расширением субпопуляции эффекторных клеток памяти CD8+CD28−CD95+. В исследовании свободноживущих макак-резусов аналогичная динамика сопровождалась повышением доли Т-киллеров и отдельных субпопуляций Т-лимфоцитов, экспрессирующих маркер активации

CD25 [151]. В данной работе соотношение CD4+/CD8+ у пожилых животных показывает тенденцию к снижению, однако не проходит порог значимости при поправке на множественные сравнения (padj = 0,062, Рисунок 3.24, E); вклад в снижение индекса при этом, по-видимому, вносит преимущественно уменьшение пула Т-хелперов. Статистические показатели межгруппового сравнения представлены в таблице Н.2.

Показанные в данной работе возрастные изменения клеточного состава крови у яванских макак во многом согласуются с результатами исследования макак-резусов, в котором также описано снижение общего количества лейкоцитов и В-клеток, тогда как значимых изменений общего количества Т- и NK-клеток не обнаружено. Среди Т-лимфоцитов при этом у них отмечалось увеличение количества CD4+CD8+ клеток и CD8+ эффекторных клеток памяти на фоне сокращения наивных CD4+ и CD8+ Т-клеток [150].

Таким образом, транскриптомные изменения, ассоциированные со снижением активности основных процессов врожденного иммунного ответа в пожилой группе животных, могут быть обусловлены как уменьшением количества нейтрофилов – наиболее многочисленной популяции клеток врожденного иммунитета, – так и перестройкой транскрипционной активности внутри отдельных клеточных популяций. Так, снижение экспрессии некоторых маркеров моноцитов (*CD163* и *CD14*) может отражать изменение транскрипционного профиля этих клеток. Отсутствие возрастных различий в общей численности моноцитов, выявленное при анализе клеточного состава, согласуется с такой интерпретацией. Аналогично, повышение экспрессии генов, связанных с цитотоксической активностью лимфоцитов (*CD8A, GZMB, PRF1, KLRK1, FASLG, TBX21, CCR5, GNLY, IFNG, NCR3*), вероятно, отражает изменение транскрипционного профиля цитотоксических клеток и/или соотношения их субпопуляций. В пользу этого предположения свидетельствует отсутствие статистически значимых возрастных различий в доле и абсолютной численности CD8+ и NK-клеток.

3.3. Заключение по главе 3

Проведен сравнительный анализ транскриптомных профилей костного мозга и крови у пожилых и молодых яванских макак. При этом обнаружены общие изменения экспрессии. Так, выявлено отрицательное обогащение процессов, связанных с врожденным иммунным ответом: миграции миелоидных клеток, фагоцитоза, путей ответа на биотические стимулы и распознавания патогенов через паттерн-распознающие рецепторы. Одновременно наблюдалось

повышение экспрессии маркеров цитотоксических лимфоцитов и снижение экспрессии маркеров наивных Т-клеток, что указывает на перестройку системы адаптивного иммунного ответа. При этом показательно, что не отмечалось повышения экспрессии классических цитокинов и хемокинов SASP. Наряду с общими изменениями обнаружены тканеспецифичные паттерны: в периферической крови повышалась экспрессия генов метаболических процессов и антиген-опосредованного сигналинга, тогда как в костном мозге наблюдалось снижение экспрессии генов организации внеклеточного матрикса, коллагеновых волокон, межклеточной адгезии и биоминерализации.

Анализ количественного состава популяций иммунных клеток в периферической крови выявил повышение содержания минорных популяций миелоидных клеток (эозинофилов и базофилов), стабильность количества моноцитов и снижение абсолютного числа нейтрофилов у пожилых животных. Возрастного увеличения соотношения миелоидных и лимфоидных клеток не наблюдалось. В лимфоидном пуле у группы пожилых макак отмечено снижение как количества, так и доли В-клеток, а также доли Т-хелперов и увеличение редкой популяции дважды положительных CD4+CD8+ клеток.

Полученные данные позволяют предположить, что возрастное угнетение функций врожденного иммунитета, наблюдаемое на транскриптомном уровне, может быть связано как со снижением числа нейтрофилов, наиболее многочисленной популяции клеток врожденного иммунного ответа, так и с внутриклеточными изменениями экспрессии генов. Цитотоксический фенотип, напротив, связан преимущественно с внутриклеточными транскрипционными изменениями: статистически значимых различий между возрастными группами на независимой выборке яванских макак в количестве NK-клеток и цитотоксических CD8+ Т-лимфоцитов выявлено не было.

Полученные результаты расширяют представления об особенностях старения иммунной системы в крови и костном мозге яванских макак. Для уточнения механизмов выявленных возрастных изменений и оценки возможности использования идентифицированных маркеров для характеристики иммуностарения необходимы дальнейшие исследования. Они могут включать количественную оценку содержания соответствующих белков, анализ функциональной активности иммунных клеток, а также детальное изучение отдельных популяций крови и костного мозга с применением клеточного сортинга и scRNA-seq. Увеличение объема выборки позволит повысить надежность полученных результатов, а включение самок в последующие исследования – оценить межполовые различия возрастных изменений иммунной системы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящее исследование было направлено на характеристику генетических особенностей крыс линии OXYS и возрастных молекулярно-клеточных изменений иммунной системы яванских макак.

В результате сравнительно-геномного анализа крыс линии OXYS с контрольной группой Wistar/Icgn установлены высокая степень межлинейной генетической дивергенции и снижение генетического разнообразия, выражающееся в снижении доли гетерозигот и повышении доли гомозигот в геноме крыс OXYS. При сопоставлении генетических вариантов с группой крыс Wistar/Icgn и 146 лабораторными линиями из Rat Genome Database у крыс OXYS идентифицированы присутствующие в гомозиготном состоянии миссенс-варианты и протяженные делеции в генах, вовлеченных в регуляцию нейрогенеза, структурно-функциональную организацию мышечной ткани и глаза, клеточный редокс-гомеостаз, аутофагию и иммунную регуляцию, включая функционирование эпителиального микроокружения тимуса.

Возрастные транскриптомные изменения в костном мозге и периферической крови яванских макак включают как общие для обеих тканей сдвиги, так и тканеспецифичные особенности. Общие изменения характеризуются снижением экспрессии генов врожденного иммунного ответа и повышением экспрессии маркеров цитотоксических лимфоцитов при отсутствии активации основных генов секреторного фенотипа, ассоциированного со старением (SASP). Тканеспецифичные особенности проявляются повышением экспрессии генов липидного и углеводного обмена и антиген-опосредованного сигналинга в крови, а также снижением экспрессии генов организации внеклеточного матрикса, межклеточной адгезии и биоминерализации в костном мозге. Сопоставление транскриптомных данных с результатами анализа клеточного состава крови показало, что снижение экспрессии генов врожденного иммунитета согласуется с уменьшением абсолютного количества нейтрофилов у пожилых животных, тогда как усиление экспрессии маркеров цитотоксических лимфоцитов наблюдается при отсутствии возрастных различий в численности NK-клеток и цитотоксических CD8+ Т-лимфоцитов.

ВЫВОДЫ

1. Сравнительно-геномный анализ крыс линий OXYS и Wistar/Icgn выявил высокую степень межлинейной генетической дивергенции (средневзвешенный индекс фиксации Райта, F_{ST} = 0,475) и повышение уровня геномной гомозиготности у крыс OXYS: суммарная доля гомозиготных позиций составила 85,74 ± 0,47% против 66,68 ± 1,38% у Wistar/Icgn (p-value < 0,001), а индекс гетерозиготности (отношение гетерозигот к альтернативным гомозиготам) снизился до 0,30 ± 0,01 в сравнении с 0,88 ± 0,06 у Wistar/Icgn (p-value = 0,003).
2. Сопоставление генетических вариантов, идентифицированных у крыс линии OXYS, с контрольной группой Wistar/Icgn и 146 лабораторными линиями из базы данных Rat Genome Database позволило выявить совокупность присутствующих в гомозиготном состоянии у крыс OXYS миссенс-вариантов и протяженных делеций, перекрывающихся с областями активного хроматина (H3K27ac), в генах, вовлеченных в регуляцию нейрогенеза, структурно-функциональную организацию мышечной ткани и глаза, клеточный редокс-гомеостаз, аутофагию и иммунную регуляцию.
3. Транскриптомный анализ клеток костного мозга и периферической крови яванских макак выявил общие для обеих тканей возрастные изменения: снижение экспрессии генов, вовлеченных в регуляцию врожденного иммунного ответа, хемотаксис, фагоцитоз и распознавание патогенов через паттерн-распознающие рецепторы, а также повышение экспрессии маркеров цитотоксических лимфоцитов при снижении маркеров наивных Т-клеток. При этом у пожилых животных не установлено повышения экспрессии генов основных провоспалительных цитокинов и хемокинов секреторного фенотипа, ассоциированного со старением (SASP).
4. Тканеспецифичные возрастные изменения транскриптома яванских макак включали: в периферической крови – повышение экспрессии генов, вовлеченных в метаболические процессы (липидный и углеводный обмен) и антиген-опосредованный сигналинг; в костном мозге – снижение экспрессии генов, связанных с организацией внеклеточного матрикса и коллагеновых волокон, а также межклеточной адгезией и биоминерализацией.
5. Анализ состава популяций иммунных клеток периферической крови пожилых яванских макак выявил снижение числа лейкоцитов, нейтрофилов, В-клеток и доли Т-хелперов при увеличении содержания дважды положительных CD4+CD8+ Т-лимфоцитов (padj ≤ 0,020), тогда как численность моноцитов, NK-клеток и цитотоксических CD8+ Т-лимфоцитов не изменялась. Сопоставление с транскриптомными данными показало, что снижение количества нейтрофилов согласуется с уменьшением экспрессии генов врожденного

иммунного ответа, тогда как повышение экспрессии генов, связанных с NK- и Т-клеточной цитотоксичностью, и снижение экспрессии маркеров моноцитов наблюдаются при отсутствии возрастных различий в численности этих популяций.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БА – болезнь Альцгеймера

БП – болезнь Паркинсона

АβРР – белок-предшественник β-амилоида

Аβ – β-амилоид

ВМД – возрастная макулярная дегенерация

РПЭ – пигментный эпителий сетчатки

АФК – активные формы кислорода

SASP – секреторный фенотип, ассоциированный со старением

SA-β-gal – ассоциированная со старением лизосомальная β-галактозидаза

АТФ – аденозинтрифосфат

мтДНК – митохондриальная ДНК

mTOR – мишень рапамицина млекопитающих

AMPK – АМФ-активируемая протеинкиназа

IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста 1

IIS – сигнальный путь инсулина/инсулиноподобного фактора роста 1

PI3K – фосфоинозитид-3-киназа

AKT – протеинкиназа B

АМФ – аденозинмонофосфат

ГСК – гемопоэтические стволовые клетки

TLR – Toll-подобные рецепторы

PAMP – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны

NK-клетки – естественные киллеры

pDC – плазмоцитоидные дендритные клетки

cDC2 – конвенциональные дендритные клетки 2-го типа

ТЭК – тимические эпителиальные клетки

TCR – Т-клеточный рецептор

BCR – В-клеточный рецептор

sMB – В-клетки памяти с переключенным изотипом иммуноглобулина

Tfh-клетки – фолликулярные Т-хелперы

CD4+ – Т-хелперы

CD8+ – цитотоксические Т-клетки, или Т-киллеры

8-oxoG – 8-оксогуанин

QTL – локус количественных признаков

ОНВ – однонуклеотидный вариант

индел – инсерция/делеция

SIFT – Sorting Intolerant From Tolerant

НЧП – нечеловеческие приматы (все виды приматов, исключая человека)

scRNA-seq – секвенирование РНК единичных клеток

п.н. – пар нуклеотидов

PCA – анализ главных компонент

VEP – Ensembl Variant Effect Predictor

F_{ST} – индекс фиксации Райта

RGD – Rat Genome Database

IGV – Integrative Genomics Viewer

CNV – вариации числа копий геномных регионов

ChIP-seq – секвенирование после иммунопреципитации хроматина

SRA – Sequence Read Archive

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ЛПВП – липопротеины высокой плотности

ЛПНП – липопротеины низкой плотности

ЛПОНП – липопротеины очень низкой плотности

GO BP – биологические процессы Gene Ontology

KEGG – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

AF – частота встречаемости альтернативного аллеля среди линий крыс из RGD

PBS – фосфатно-солевой буфер

RIN – RNA integrity number

padj – *p*-value с поправкой Бенджамини-Хохберга

ДЭ гены – дифференциально экспрессирующиеся гены

PERMANOVA – пермутационный многомерный дисперсионный анализ

GSEA – анализ обогащения наборов генов (Gene Set Enrichment Analysis)

NES – нормализованный показатель обогащения

PRR – паттерн-распознающие рецепторы

RLR – RIG-1 подобные рецепторы

CLR – лектиновые рецепторы С-типа

NLR – NOD-подобные рецепторы

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Khan S. S., Singer B. D., Vaughan D. E. Molecular and physiological manifestations and measurement of aging in humans // Aging Cell. 2017. Т. 16, № 4. С. 624–633.
2. Ajoolabady A. и др. Immunosenescence and inflammaging: Mechanisms and role in diseases // Ageing Res. Rev. 2024. Т. 101. С. 102540.
3. Mitchell S. J. и др. Animal Models of Aging Research: Implications for Human Aging and Age-Related Diseases // Annu. Rev. Anim. Biosci. 2015. Т. 3, № 1. С. 283–303.
4. Bartolomucci A. и др. Animal Models Relevant for Geroscience: Current Trends and Future Perspectives in Biomarkers, and Measures of Biological Aging // J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. / под ред. Duque G. 2024. Т. 79, № 9. С. glae135.
5. Mitchell S. J., MacArthur M. R., Kane A. E. Optimizing preclinical models of ageing for translation to clinical trials // Br. J. Clin. Pharmacol. 2025. Т. 91, № 1. С. 5–7.
6. Holtze S. и др. Alternative Animal Models of Aging Research // Front. Mol. Biosci. 2021. Т. 8. С. 660959.
7. Kolosova N. G. и др. Senescence-accelerated OXYS rats: A genetic model of premature aging and age-related diseases // Adv. Gerontol. 2014. Т. 4, № 4. С. 294–298.
8. Stefanova N. и др. Senescence-accelerated OXYS rats: A model of age-related cognitive decline with relevance to abnormalities in Alzheimer disease // Cell Cycle. 2014. Т. 13, № 6. С. 898–909.
9. Stefanova N. A. и др. Amyloid accumulation is a late event in sporadic Alzheimer’s disease-like pathology in nontransgenic rats // Oncotarget. 2015. Т. 6, № 3. С. 1396–1413.
10. Devyatkin V. A., Muraleva N. A., Kolosova N. G. Identification of Single-Nucleotide Polymorphisms in Mitochondria-Associated Genes Capable of Affecting the Development of Hypertrophic Cardiomyopathy in Senescence-Accelerated OXYS Rats // Adv. Gerontol. 2020. Т. 10, № 2. С. 121–127.
11. Devyatkin V. A. и др. Single-Nucleotide Polymorphisms (SNPs) Both Associated with Hypertension and Contributing to Accelerated-Senescence Traits in OXYS Rats // Int. J. Mol. Sci. 2020. Т. 21, № 10. С. 3542.
12. Devyatkin V. A. и др. Single-Nucleotide Polymorphisms Associated with the Senescence-Accelerated Phenotype of OXYS Rats: A Focus on Alzheimer’s Disease-Like and Age-Related-Macular-Degeneration-Like Pathologies // J. Alzheimer’s Dis. 2020. Т. 73, № 3. С. 1167–1183.
13. Colman R. J. Non-human primates as a model for aging // Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis. 2018. Т. 1864, № 9. С. 2733–2741.

14. Rivera A. и др. Nonhuman Primate Models of Immunosenescence // Handbook of Immunosenescence / под ред. Fulop T. и др. Cham: Springer International Publishing, 2018. С. 1–28.
15. Zhou M. и др. Age-related gene expression and DNA methylation changes in rhesus macaque // Genomics. 2020. Т. 112, № 6. С. 5147–5156.
16. Liu Y. и др. Analysis of the aging-related biomarker in a nonhuman primate model using multilayer omics // BMC Genomics. 2024. Т. 25, № 1. С. 639.
17. Xia Y. и др. Immune gene expression dynamics across the lifespan of Tibetan macaques (*Macaca thibetana*) // Curr. Zool. / под ред. Huang Z.-S. 2026. Т. 72, № 3. С. 371–382.
18. Cho H.-M. и др. Transcriptome analysis of cynomolgus macaques throughout their lifespan reveals age-related immune patterns // Npj Aging. 2024. Т. 10, № 1. С. 30.
19. Ye Y. и др. Vitamin C attenuates primate bone marrow aging at the molecular and progenitor level // Cell Stem Cell. 2026. Т. 33, № 8. С. 1379-1397.e8.
20. Wang S. и др. Single‐Cell Profiling Across Immune Tissues and Organs Reveals Immunosenescence Signatures in Male Rhesus Monkeys // Adv. Sci. 2026. Т. 13, № 17. С. e14353.
21. Li Z. и др. Aging and age‐related diseases: from mechanisms to therapeutic strategies // Biogerontology. 2021. Т. 22, № 2. С. 165–187.
22. Guo J. и др. Aging and aging-related diseases: from molecular mechanisms to interventions and treatments // Signal Transduct. Target. Ther. 2022. Т. 7, № 1. С. 391.
23. Hou Y. и др. Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease // Nat. Rev. Neurol. 2019. Т. 15, № 10. С. 565–581.
24. Congdon E. E. и др. Tau-targeting therapies for Alzheimer disease: current status and future directions // Nat. Rev. Neurol. 2023. Т. 19, № 12. С. 715–736.
25. Cacace R., Sleegers K., Van Broeckhoven C. Molecular genetics of early‐onset Alzheimer’s disease revisited // Alzheimers Dement. 2016. Т. 12, № 6. С. 733–748.
26. Yamazaki Y. и др. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies // Nat. Rev. Neurol. 2019. Т. 15, № 9. С. 501–518.
27. Choong C., Mochizuki H. Neuropathology of α‐synuclein in Parkinson’s disease // Neuropathology. 2022. Т. 42, № 2. С. 93–103.
28. Kalia L. V., Lang A. E. Parkinson’s disease // The Lancet. 2015. Т. 386, № 9996. С. 896–912.
29. Ungvari Z. и др. Mechanisms of Vascular Aging // Circ. Res. 2018. Т. 123, № 7. С. 849–867.
30. Tyrrell D. J., Goldstein D. R. Ageing and atherosclerosis: vascular intrinsic and extrinsic factors and potential role of IL-6 // Nat. Rev. Cardiol. 2021. Т. 18, № 1. С. 58–68.

31. Vakka A., Warren J. S., Drosatos K. Cardiovascular aging: from cellular and molecular changes to therapeutic interventions // J. Cardiovasc. Aging. 2023.
32. Sayer A. A. и др. Sarcopenia // Nat. Rev. Dis. Primer. 2024. Т. 10, № 1. С. 68.
33. Pignolo R. J. Aging and Bone Metabolism // Compr. Physiol. 2023. Т. 13, № 1. С. 4355–4386.
34. Montégut L., López-Otín C., Kroemer G. Aging and cancer // Mol. Cancer. 2024. Т. 23, № 1. С. 106.
35. Amorim J. A. и др. Mitochondrial and metabolic dysfunction in ageing and age-related diseases // Nat. Rev. Endocrinol. 2022. Т. 18, № 4. С. 243–258.
36. Ou M.-Y. и др. Adipose tissue aging: mechanisms and therapeutic implications // Cell Death Dis. 2022. Т. 13, № 4. С. 300.
37. Fleckenstein M., Schmitz-Valckenberg S., Chakravarthy U. Age-Related Macular Degeneration: A Review // JAMA. 2024. Т. 331, № 2. С. 147.
38. Ferrington D. A., Sinha D., Kaarniranta K. Defects in retinal pigment epithelial cell proteolysis and the pathology associated with age-related macular degeneration // Prog. Retin. Eye Res. 2016. Т. 51. С. 69–89.
39. Sharma K. K., Santhoshkumar P. Lens aging: Effects of crystallins // Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj. 2009. Т. 1790, № 10. С. 1095–1108.
40. Moreau K. L., King J. A. Protein misfolding and aggregation in cataract disease and prospects for prevention // Trends Mol. Med. 2012. Т. 18, № 5. С. 273–282.
41. Mc Auley M. T. The evolution of ageing: classic theories and emerging ideas // Biogerontology. 2025. Т. 26, № 1. С. 6.
42. Dönertaş H. M., Partridge L. Evolutionary genetics of ageing // Nat. Rev. Genet. 2026. Т. 27, № 9. С. 708–723.
43. Weismann A. Ueber die Dauer des Lebens; ein Vortrag. Jena: G. Fischer, 1882.
44. Kowald A., Kirkwood T. B. L. Can aging be programmed? A critical literature review // Aging Cell. 2016. Т. 15, № 6. С. 986–998.
45. Fisher R. A. The genetical theory of natural selection. Oxford: Clarendon Press, 1930.
46. Haldane J. B. S. New Paths in Genetics. London: George Allen & Unwin, 1941.
47. Hamilton W. D. The moulding of senescence by natural selection // J. Theor. Biol. 1966. Т. 12, № 1. С. 12–45.
48. Medawar P. B. An Unsolved Problem of Biology. London: H. K. Lewis, 1952.
49. Williams G. C. PLEIOTROPY, NATURAL SELECTION, AND THE EVOLUTION OF SENESCENCE // Evolution. 1957. Т. 11, № 4. С. 398–411.
50. Stearns S. C. и др. Experimental evolution of aging, growth, and reproduction in fruitflies // Proc. Natl. Acad. Sci. 2000. Т. 97, № 7. С. 3309–3313.

51. Moorad J., Promislow D., Silvertown J. Evolutionary Ecology of Senescence and a Reassessment of Williams' 'Extrinsic Mortality' Hypothesis // Trends Ecol. Evol. 2019. T. 34, № 6. C. 519–530.
52. Kirkwood T. B. L. Evolution of ageing // Nature. 1977. T. 270, № 5635. C. 301–304.
53. Lidsky P. V., Andino R. Could aging evolve as a pathogen control strategy? // Trends Ecol. Evol. 2022. T. 37, № 12. C. 1046–1057.
54. López-Otín C. и др. The Hallmarks of Aging // Cell. 2013. T. 153, № 6. C. 1194–1217.
55. López-Otín C. и др. Hallmarks of aging: An expanding universe // Cell. 2023. T. 186, № 2. C. 243–278.
56. Panier S., Wang S., Schumacher B. Genome Instability and DNA Repair in Somatic and Reproductive Aging // Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. 2024. T. 19, № 1. C. 261–290.
57. Rossiello F. и др. Telomere dysfunction in ageing and age-related diseases // Nat. Cell Biol. 2022. T. 24, № 2. C. 135–147.
58. Zhang W. и др. The ageing epigenome and its rejuvenation // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2020. T. 21, № 3. C. 137–150.
59. Yücel A. D., Gladyshev V. N. Systemic epigenetic dysregulation as a driver of ageing and a therapeutic target // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2026. T. 27, № 7. C. 528–542.
60. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types // Genome Biol. 2013. T. 14, № 10. C. 3156.
61. Horvath S., Raj K. DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing // Nat. Rev. Genet. 2018. T. 19, № 6. C. 371–384.
62. Noroozi R. и др. DNA methylation-based age clocks: From age prediction to age reversion // Ageing Res. Rev. 2021. T. 68. C. 101314.
63. Gorgoulis V. и др. Cellular Senescence: Defining a Path Forward // Cell. 2019. T. 179, № 4. C. 813–827.
64. Sharpless N. E., Sherr C. J. Forging a signature of in vivo senescence // Nat. Rev. Cancer. 2015. T. 15, № 7. C. 397–408.
65. Hipp M. S., Kasturi P., Hartl F. U. The proteostasis network and its decline in ageing // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2019. T. 20, № 7. C. 421–435.
66. Guo Y. и др. Mitochondrial dysfunction in aging // Ageing Res. Rev. 2023. T. 88. C. 101955.
67. Templeman N. M., Murphy C. T. Regulation of reproduction and longevity by nutrient-sensing pathways // J. Cell Biol. 2018. T. 217, № 1. C. 93–106.
68. Junnila R. K. и др. The GH/IGF-1 axis in ageing and longevity // Nat. Rev. Endocrinol. 2013. T. 9, № 6. C. 366–376.

69. Papadopoli D. и др. mTOR as a central regulator of lifespan and aging // F1000Research. 2019. Т. 8. С. 998.
70. Salminen A., Kaarniranta K. AMP-activated protein kinase (AMPK) controls the aging process via an integrated signaling network // Ageing Res. Rev. 2012. Т. 11, № 2. С. 230–241.
71. Green C. L., Lamming D. W., Fontana L. Molecular mechanisms of dietary restriction promoting health and longevity // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2022. Т. 23, № 1. С. 56–73.
72. Jang I. H. и др. The ageing immune system as a driver of systemic ageing // Nat. Rev. Immunol. 2026. Т. 26, № 7. С. 489–506.
73. Geiger H., De Haan G., Florian M. C. The ageing haematopoietic stem cell compartment // Nat. Rev. Immunol. 2013. Т. 13, № 5. С. 376–389.
74. Cho R. H., Sieburg H. B., Muller-Sieburg C. E. A new mechanism for the aging of hematopoietic stem cells: aging changes the clonal composition of the stem cell compartment but not individual stem cells // Blood. 2008. Т. 111, № 12. С. 5553–5561.
75. Ho Y.-H., Méndez-Ferrer S. Microenvironmental contributions to hematopoietic stem cell aging // Haematologica. 2020. Т. 105, № 1. С. 38–46.
76. Bailey K. L. и др. Aging leads to dysfunctional innate immune responses to TLR2 and TLR4 agonists // Aging Clin. Exp. Res. 2019. Т. 31, № 9. С. 1185–1193.
77. Hearps A. C. и др. Aging is associated with chronic innate immune activation and dysregulation of monocyte phenotype and function // Aging Cell. 2012. Т. 11, № 5. С. 867–875.
78. Van Duin D. и др. Age-Associated Defect in Human TLR-1/2 Function // J. Immunol. 2007. Т. 178, № 2. С. 970–975.
79. Becker L. и др. Age-dependent shift in macrophage polarisation causes inflammation-mediated degeneration of enteric nervous system // Gut. 2018. Т. 67, № 5. С. 827–836.
80. Van Avondt K. и др. Neutrophils in aging and aging‐related pathologies // Immunol. Rev. 2023. Т. 314, № 1. С. 357–375.
81. Sapey E. и др. Phosphoinositide 3-kinase inhibition restores neutrophil accuracy in the elderly: toward targeted treatments for immunosenescence // Blood. 2014. Т. 123, № 2. С. 239–248.
82. Sauce D. и др. Reduced Oxidative Burst by Primed Neutrophils in the Elderly Individuals Is Associated With Increased Levels of the $CD16^{bright}$ /$CD62L^{dim}$ Immunosuppressive Subset // J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. 2017. Т. 72, № 2. С. 163–172.
83. Gayoso I. и др. Immunosenescence of Human Natural Killer Cells // J. Innate Immun. 2011. Т. 3, № 4. С. 337–343.
84. Campos C. и др. Expression of NKp30, NKp46 and DNAM-1 activating receptors on resting and IL-2 activated NK cells from healthy donors according to CMV-serostatus and age // Biogerontology. 2015. Т. 16, № 5. С. 671–683.

85. Agrawal A., Gupta S. Impact of aging on dendritic cell functions in humans // Ageing Res. Rev. 2011. Т. 10, № 3. С. 336–345.
86. Dai H. и др. Attenuating age-related decline in dendritic cell migration improves vaccine efficacy via gut-immune crosstalk // Nat. Aging. 2026. Т. 6, № 4. С. 816–830.
87. Shaw A. C., Goldstein D. R., Montgomery R. R. Age-dependent dysregulation of innate immunity // Nat. Rev. Immunol. 2013. Т. 13, № 12. С. 875–887.
88. Wang H.-X. и др. Thymic Epithelial Cells Contribute to Thymopoiesis and T Cell Development // Front. Immunol. 2020. Т. 10. С. 3099.
89. Ma D., Wei Y., Liu F. Regulatory mechanisms of thymus and T cell development // Dev. Comp. Immunol. 2013. Т. 39, № 1–2. С. 91–102.
90. Ohigashi I., Kozai M., Takahama Y. Development and developmental potential of cortical thymic epithelial cells // Immunol. Rev. 2016. Т. 271, № 1. С. 10–22.
91. Fujimori S., Ohigashi I. The role of thymic epithelium in thymus development and age-related thymic involution // J. Med. Invest. 2024. Т. 71, № 1.2. С. 29–39.
92. Liang Z. и др. Age‐related thymic involution: Mechanisms and functional impact // Aging Cell. 2022. Т. 21, № 8. С. e13671.
93. Kousa A. I. и др. Age-related epithelial defects limit thymic function and regeneration // Nat. Immunol. 2024. Т. 25, № 9. С. 1593–1606.
94. Liu D. и др. Canonical Notch signaling controls the early thymic epithelial progenitor cell state and emergence of the medullary epithelial lineage in fetal thymus development // Development. 2020. С. dev.178582.
95. Goronzy J. J. и др. Naive T Cell Maintenance and Function in Human Aging // J. Immunol. 2015. Т. 194, № 9. С. 4073–4080.
96. Appay V., Sauce D. Naive T cells: The crux of cellular immune aging? // Exp. Gerontol. 2014. Т. 54. С. 90–93.
97. Egorov E. S. и др. The Changing Landscape of Naive T Cell Receptor Repertoire With Human Aging // Front. Immunol. 2018. Т. 9. С. 1618.
98. Yoshida K. и др. Aging-related changes in human T-cell repertoire over 20 years delineated by deep sequencing of peripheral T-cell receptors // Exp. Gerontol. 2017. Т. 96. С. 29–37.
99. Sun X. и др. Longitudinal analysis reveals age-related changes in the T cell receptor repertoire of human T cell subsets // J. Clin. Invest. 2022. Т. 132, № 17. С. e158122.
100. Pangrazzi L. и др. CD28 and CD57 define four populations with distinct phenotypic properties within human $CD8^+$ T cells // Eur. J. Immunol. 2020. Т. 50, № 3. С. 363–379.
101. Weng N., Akbar A. N., Goronzy J. CD28− T cells: their role in the age-associated decline of immune function // Trends Immunol. 2009. Т. 30, № 7. С. 306–312.

102. Saurwein-Teissl M. и др. Lack of Antibody Production Following Immunization in Old Age: Association with CD8+CD28− T Cell Clonal Expansions and an Imbalance in the Production of Th1 and Th2 Cytokines // J. Immunol. 2002. Т. 168, № 11. С. 5893–5899.
103. Deng Y. и др. Age-Related Impaired Type 1 T Cell Responses to Influenza: Reduced Activation Ex Vivo, Decreased Expansion in CTL Culture In Vitro, and Blunted Response to Influenza Vaccination In Vivo in the Elderly // J. Immunol. 2004. Т. 172, № 6. С. 3437–3446.
104. Miller J. P., Allman D. The Decline in B Lymphopoiesis in Aged Mice Reflects Loss of Very Early B-Lineage Precursors // J. Immunol. 2003. Т. 171, № 5. С. 2326–2330.
105. McKenna R. W. и др. Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) in 662 consecutive bone marrow specimens by 4-color flow cytometry // Blood. 2001. Т. 98, № 8. С. 2498–2507.
106. Kuranda K. и др. Age-related changes in human hematopoietic stem/progenitor cells: Aging of human HSC // Aging Cell. 2011. Т. 10, № 3. С. 542–546.
107. De Mol J. и др. The Dynamics of B Cell Aging in Health and Disease // Front. Immunol. 2021. Т. 12. С. 733566.
108. Lin Y. и др. Changes in blood lymphocyte numbers with age in vivo and their association with the levels of cytokines/cytokine receptors // Immun. Ageing. 2016. Т. 13, № 1. С. 24.
109. Veneri D. и др. Expression of CD27 and CD23 in peripheral blood B lymphocytes // Blood Transfus. IT: Edizioni SIMTI, 2008.
110. Ciocca M. и др. Evolution of Human Memory B Cells From Childhood to Old Age // Front. Immunol. 2021. Т. 12. С. 690534.
111. Tabibian‐Keissar H. и др. Aging affects B‐cell antigen receptor repertoire diversity in primary and secondary lymphoid tissues // Eur. J. Immunol. 2016. Т. 46, № 2. С. 480–492.
112. De Bourcy C. F. A. и др. Phylogenetic analysis of the human antibody repertoire reveals quantitative signatures of immune senescence and aging // Proc. Natl. Acad. Sci. 2017. Т. 114, № 5. С. 1105–1110.
113. Muggen A. F. и др. The presence of CLL-associated stereotypic B cell receptors in the normal BCR repertoire from healthy individuals increases with age // Immun. Ageing. 2019. Т. 16, № 1. С. 22.
114. Leenders L. и др. Longitudinal analysis of the B-cell receptor repertoire across 30 years of ageing // Immun. Ageing. 2026.
115. Fisher J. S. и др. The aged microenvironment impairs BCL6 and CD40L induction in $CD4^+$ T follicular helper cell differentiation // Aging Cell. 2024. Т. 23, № 6. С. e14140.
116. Silva-Cayetano A. и др. Spatial dysregulation of T follicular helper cells impairs vaccine responses in aging // Nat. Immunol. 2023. Т. 24, № 7. С. 1124–1137.

117. Bracey N. A. и др. Aging restricts maturation of CXCL13+ T follicular helper cells in human immunity // Cell Rep. 2026. Т. 45, № 6. С. 117423.
118. Frasca D. и др. Intrinsic defects in B cell response to seasonal influenza vaccination in elderly humans // Vaccine. 2010. Т. 28, № 51. С. 8077–8084.
119. Ademokun A. и др. Vaccination‐induced changes in human B‐cell repertoire and pneumococcal IgM and IgA antibody at different ages // Aging Cell. 2011. Т. 10, № 6. С. 922–930.
120. Henry C. и др. Influenza Virus Vaccination Elicits Poorly Adapted B Cell Responses in Elderly Individuals // Cell Host Microbe. 2019. Т. 25, № 3. С. 357-366.e6.
121. Burton A. R. и др. The memory B cell response to influenza vaccination is impaired in older persons // Cell Rep. 2022. Т. 41, № 6. С. 111613.
122. Buffenstein R., Edrey Y. H., Larsen P. L. Animal Models in Aging Research // Sourcebook of Models for Biomedical Research / под ред. Conn P. M. Totowa, NJ: Humana Press, 2008. С. 499–506.
123. Bellantuono I. и др. A toolbox for the longitudinal assessment of healthspan in aging mice // Nat. Protoc. 2020. Т. 15, № 2. С. 540–574.
124. Sasaguri H. и др. APP mouse models for Alzheimer’s disease preclinical studies // EMBO J. 2017. Т. 36, № 17. С. 2473–2487.
125. Pattanayak A., Firdous S. M. The 3xTg-AD Mouse Model: A Comprehensive Tool for Understanding Alzheimer’s Disease // Cell. Mol. Neurobiol. 2026. Т. 46, № 1. С. 41.
126. Carter C. S. и др. Bring Back the Rat! // J. Gerontol. Ser. A / под ред. Anderson R. 2020. Т. 75, № 3. С. 405–415.
127. Cohen R. M. и др. A Transgenic Alzheimer Rat with Plaques, Tau Pathology, Behavioral Impairment, Oligomeric Aβ, and Frank Neuronal Loss // J. Neurosci. 2013. Т. 33, № 15. С. 6245–6256.
128. Elmarakby A. A., Sullivan J. C. Sex differences in hypertension: lessons from spontaneously hypertensive rats (SHR) // Clin. Sci. 2021. Т. 135, № 15. С. 1791–1804.
129. Wong S. K. и др. Animal models of metabolic syndrome: a review // Nutr. Metab. 2016. Т. 13, № 1. С. 65.
130. Solov’eva N. A., Morozkova T. S., Salganik R. I. [Development of a rat subline with symptoms of hereditary galactosemia and study of its biochemical characteristics] // Genetika. 1975. Т. 11, № 5. С. 63–71.
131. Obukhova L. A. и др. Structural and functional basis of accelerated involution of the thymus in OXYS rats // Adv. Gerontol. 2014. Т. 4, № 1. С. 16–21.

132. Sattarova E. A. и др. Age-dependent guanine oxidation in DNA of different brain regions of Wistar rats and prematurely aging OXYS rats // Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj. 2013. Т. 1830, № 6. С. 3542–3552.
133. Kemeleva E. A. и др. Oxidation of guanine in liver and lung DNA of prematurely aging OXYS rats // Biochem. Mosc. 2006. Т. 71, № 6. С. 612–618.
134. Kolosova N. G. и др. Long-term antioxidant supplementation attenuates oxidative stress markers and cognitive deficits in senescent-accelerated OXYS rats // Neurobiol. Aging. 2006. Т. 27, № 9. С. 1289–1297.
135. Kolosova N. G. и др. Dynamics of Structural and Functional Changes in Hepatocyte Mitochondria of Senescence-Accelerated OXYS Rats // Bull. Exp. Biol. Med. 2001. Т. 132, № 2. С. 814–819.
136. Vays V. B. и др. Antioxidant SkQ1 delays sarcopenia-associated damage of mitochondrial ultrastructure // Aging. 2014. Т. 6, № 2. С. 140–148.
137. El'darov Ch. M. и др. Morphometric examination of mitochondrial ultrastructure in aging cardiomyocytes // Biochem. Mosc. 2015. Т. 80, № 5. С. 604–609.
138. Tyumentsev M. A. и др. Mitochondrial Dysfunction as a Predictor and Driver of Alzheimer's Disease-Like Pathology in OXYS Rats // J. Alzheimers Dis. 2018. Т. 63, № 3. С. 1075–1088.
139. Zhdankina A. A. и др. Suppression of Age-Related Macular Degeneration-like Pathology by c-Jun N-Terminal Kinase Inhibitor IQ-1S // Biomedicines. 2023. Т. 11, № 2. С. 395.
140. Men'shchikova E. B. и др. Generation of Reactive Oxygen Species by Mitochondria in Senescence-Accelerated OXYS Rats // Bull. Exp. Biol. Med. 2002. Т. 133, № 2. С. 175–177.
141. Oĭdopova O. S. и др. [A search for genetic determinants of premature aging in OXYS rats] // Adv. Gerontol. Uspekhi Gerontol. 2008. Т. 21, № 3. С. 499–500.
142. Korbolina E. E. и др. Quantitative trait loci on chromosome 1 for cataract and AMD-like retinopathy in senescence-accelerated OXYS rats // Aging. 2012. Т. 4, № 1. С. 49–59.
143. Korbolina E. E. и др. Genes of susceptibility to early neurodegenerative changes in the rat retina and brain: analysis by means of congenic strains // BMC Genet. 2016. Т. 17, № S3. С. 153.
144. Jones O. R. и др. Diversity of ageing across the tree of life // Nature. 2014. Т. 505, № 7482. С. 169–173.
145. Magalhães J. P. D., Costa J., Church G. M. An Analysis of the Relationship Between Metabolism, Developmental Schedules, and Longevity Using Phylogenetic Independent Contrasts // J. Gerontol. Ser. A. 2007. Т. 62, № 2. С. 149–160.
146. Yun M. H. Salamander Insights Into Ageing and Rejuvenation // Front. Cell Dev. Biol. 2021. Т. 9. С. 689062.

147. Kumar S. и др. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms // Mol. Biol. Evol. / под ред. Battistuzzi F. U. 2018. Т. 35, № 6. С. 1547–1549.
148. De Magalhães J. P., Costa J. A database of vertebrate longevity records and their relation to other life‐history traits // J. Evol. Biol. 2009. Т. 22, № 8. С. 1770–1774.
149. Zheng H.-Y. и др. Aged Chinese rhesus macaques suffer severe phenotypic T- and B-cell aging accompanied with sex differences // Exp. Gerontol. 2014. Т. 55. С. 113–119.
150. Didier E. S. и др. Immune correlates of aging in outdoor-housed captive rhesus macaques (Macaca mulatta) // Immun. Ageing. 2012. Т. 9, № 1. С. 25.
151. Rosado M. R. S. и др. Immune cell composition varies by age, sex and exposure to social adversity in free-ranging Rhesus Macaques // GeroScience. 2023. Т. 46, № 2. С. 2107–2122.
152. Andrews S. FastQC. Babraham Bioinformatics, 2010.
153. Schubert M., Lindgreen S., Orlando L. AdapterRemoval v2: rapid adapter trimming, identification, and read merging // BMC Res. Notes. 2016. Т. 9, № 1. С. 88.
154. Li H., Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform // Bioinformatics. 2009. Т. 25, № 14. С. 1754–1760.
155. Picard Toolkit. Cambridge, MA, USA: Broad Institute, 2022.
156. Li H. и др. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools // Bioinformatics. 2009. Т. 25, № 16. С. 2078–2079.
157. McKenna A. и др. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data // Genome Res. 2010. Т. 20, № 9. С. 1297–1303.
158. Purcell S. и др. PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses // Am. J. Hum. Genet. 2007. Т. 81, № 3. С. 559–575.
159. Wickham H. ggplot2. Cham: Springer International Publishing, 2016.
160. McLaren W. и др. The Ensembl Variant Effect Predictor // Genome Biol. 2016. Т. 17, № 1. С. 122.
161. De La Cruz N. The Rat Genome Database (RGD): developments towards a phenome database // Nucleic Acids Res. 2004. Т. 33, № Database issue. С. D485–D491.
162. Danecek P. и др. Twelve years of SAMtools and BCFtools // GigaScience. 2021. Т. 10, № 2. С. giab008.
163. Robinson J. T. и др. Integrative genomics viewer // Nat. Biotechnol. 2011. Т. 29, № 1. С. 24–26.
164. Dyer S. C. и др. Ensembl 2025 // Nucleic Acids Res. 2025. Т. 53, № D1. С. D948–D957.
165. Okonechnikov K. и др. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit // Bioinformatics. 2012. Т. 28, № 8. С. 1166–1167.
166. Abramson J. и др. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3 // Nature. 2024. Т. 630, № 8016. С. 493–500.

167. The UniProt Consortium и др. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2025 // Nucleic Acids Res. 2025. Т. 53, № D1. С. D609–D617.
168. Suvakov M. и др. CNVpytor: a tool for copy number variation detection and analysis from read depth and allele imbalance in whole-genome sequencing // GigaScience. 2021. Т. 10, № 11. С. giab074.
169. Abyzov A. и др. CNVnator: An approach to discover, genotype, and characterize typical and atypical CNVs from family and population genome sequencing // Genome Res. 2011. Т. 21, № 6. С. 974–984.
170. Pedersen B.S., Layer R., Quinlan A.R. smoove: structural-variant calling and genotyping with existing tools. 2020.
171. Quinlan A. R., Hall I. M. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features // Bioinformatics. 2010. Т. 26, № 6. С. 841–842.
172. Rayan N. A. и др. Integrative multi-omics landscape of fluoxetine action across 27 brain regions reveals global increase in energy metabolism and region-specific chromatin remodelling // Mol. Psychiatry. 2022. Т. 27, № 11. С. 4510–4525.
173. Zhang Y. и др. Model-based Analysis of ChIP-Seq (MACS) // Genome Biol. 2008. Т. 9, № 9. С. R137.
174. Ye J. и др. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction // BMC Bioinformatics. 2012. Т. 13, № 1. С. 134.
175. Cleary, John G.; Braithwaite, Ross; Gaastra, Kurt; et al. RTG Tools: Utilities for accurate VCF comparison and manipulation. Real Time Genomics, 2021.
176. Danecek P. и др. The variant call format and VCFtools // Bioinformatics. 2011. Т. 27, № 15. С. 2156–2158.
177. Di Paolo G., Kim T.-W. Linking lipids to Alzheimer’s disease: cholesterol and beyond // Nat. Rev. Neurosci. 2011. Т. 12, № 5. С. 284–296.
178. Tikhonova M. A. и др. Comparison of behavioral and biochemical deficits in rats with hereditary defined or d-galactose-induced accelerated senescence: Evaluating the protective effects of diosgenin // Pharmacol. Biochem. Behav. 2014. Т. 120. С. 7–16.
179. Stefanova N. A. и др. Association of cerebrovascular dysfunction with the development of Alzheimer’s disease-like pathology in OXYS rats // BMC Genomics. 2018. Т. 19, № S3. С. 75.
180. Muraleva N. A., Devyatkin V. A., Kolosova N. G. Phosphorylation of αB-crystallin in the myocardium: Analysis of relations with aging and cardiomyopathy // Exp. Gerontol. 2017. Т. 95. С. 26–33.
181. RatGTEx Consortium. RatGTEx Portal. 2021.

182. Wu C. и др. BioGPS: an extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources // Genome Biol. 2009. Т. 10, № 11. С. R130.
183. Oram J. F. HDL Apolipoproteins and ABCA1: Partners in the Removal of Excess Cellular Cholesterol // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2003. Т. 23, № 5. С. 720–727.
184. Ghanbari-Niaki A. и др. Treadmill exercise enhances ABCA1 expression in rat liver // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2007. Т. 361, № 4. С. 841–846.
185. Holstege H. и др. Exome sequencing identifies rare damaging variants in ATP8B4 and ABCA1 as risk factors for Alzheimer's disease // Nat. Genet. 2022. Т. 54, № 12. С. 1786–1794.
186. Flood C. и др. Molecular Mechanism for Changes in Proteoglycan Binding on Compositional Changes of the Core and the Surface of Low-Density Lipoprotein–Containing Human Apolipoprotein B100 // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2004. Т. 24, № 3. С. 564–570.
187. Davidson N. O., Shelness G. S. Apolipoprotein B: mRNA Editing, Lipoprotein Assembly, and Presecretory Degradation // Annu. Rev. Nutr. 2000. Т. 20, № 1. С. 169–193.
188. Öörni K., Lorey M. B. Beyond cholesterol: linking the conformation of apolipoprotein B to atherogenesis // Curr. Opin. Lipidol. 2025. Т. 36, № 5. С. 226–231.
189. Lu F. и др. CMYA5 establishes cardiac dyad architecture and positioning // Nat. Commun. 2022. Т. 13, № 1. С. 2185.
190. Benson M. A. и др. Ryanodine receptors are part of the myospryn complex in cardiac muscle // Sci. Rep. 2017. Т. 7, № 1. С. 6312.
191. Sarparanta J. и др. Interactions with M-band Titin and Calpain 3 Link Myospryn (CMYA5) to Tibial and Limb-girdle Muscular Dystrophies // J. Biol. Chem. 2010. Т. 285, № 39. С. 30304–30315.
192. Sarparanta J. Biology of myospryn: what's known? // J. Muscle Res. Cell Motil. 2008. Т. 29, № 6–8. С. 177–180.
193. Dodge-Kafka K. L. и др. The protein kinase A anchoring protein mAKAP coordinates two integrated cAMP effector pathways // Nature. 2005. Т. 437, № 7058. С. 574–578.
194. Vergarajauregui S. и др. AKAP6 orchestrates the nuclear envelope microtubule-organizing center by linking golgi and nucleus via AKAP9 // eLife. 2020. Т. 9. С. e61669.
195. Lee S.-W. и др. AKAP6 inhibition impairs myoblast differentiation and muscle regeneration: Positive loop between AKAP6 and myogenin // Sci. Rep. 2015. Т. 5, № 1. С. 16523.
196. Rudnitskaya E. A. и др. Features of Postnatal Hippocampal Development in a Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease // Front. Neurosci. 2020. Т. 14. С. 533.
197. Agafonova I. G. и др. Effect of histochrome on brain vessels and research and exploratory activity of senescence-accelerated OXYS rats // Bull. Exp. Biol. Med. 2007. Т. 143, № 4. С. 467–471.

198. Islam F., Shilton B. Insights into the cellular function and mechanism of action of quinone reductase 2 (NQO2) // Biochem. J. 2025. Т. 482, № 06. С. 309–324.
199. Janda E. и др. Polymorphisms and Pharmacogenomics of NQO2: The Past and the Future // Genes. 2024. Т. 15, № 1. С. 87.
200. Hourigan B. и др. Capicua regulates the development of adult-born neurons in the hippocampus // Sci. Rep. 2021. Т. 11, № 1. С. 11725.
201. Wong D., Yip S. Making heads or tails – the emergence of *capicua* (*CIC*) as an important multifunctional tumour suppressor // J. Pathol. 2020. Т. 250, № 5. С. 532–540.
202. Yip S. и др. Concurrent *CIC* mutations, *IDH* mutations, and 1p/19q loss distinguish oligodendrogliomas from other cancers // J. Pathol. 2012. Т. 226, № 1. С. 7–16.
203. Andrews S. J. и др. Association of *AKAP6* and *MIR2113* with cognitive performance in a population‐based sample of older adults // Genes Brain Behav. 2017. Т. 16, № 4. С. 472–478.
204. Tomczak J. и др. Exploring AKAPs in visual signaling // Front. Mol. Neurosci. 2024. Т. 17. С. 1412407.
205. Mackiewicz J. и др. AKAP6 controls NFATc4 activity for BDNF-mediated neuroprotection // Mol. Brain. 2024. Т. 17, № 1. С. 85.
206. Kolosova N. G. и др. OXYS Rats as a Model of Senile Cataract // Bull. Exp. Biol. Med. 2003. Т. 136, № 4. С. 415–419.
207. Snytnikova O. A. и др. Metabolomic Changes in the Rat Eye Lens During the Cataract Onset // Molecules. 2026. Т. 31, № 12. С. 2194.
208. Markovets A. M. и др. Alterations of retinal pigment epithelium cause AMD-like retinopathy in senescence-accelerated OXYS rats // Aging. 2010. Т. 3, № 1. С. 44–54.
209. Mirra S. и др. CERKL, a retinal dystrophy gene, regulates mitochondrial function and dynamics in the mammalian retina // Neurobiol. Dis. 2021. Т. 156. С. 105405.
210. García-Arroyo R., Marfany G., Mirra S. CERKL, a Retinal Dystrophy Gene, Regulates Mitochondrial Transport and Dynamics in Hippocampal Neurons // Int. J. Mol. Sci. 2022. Т. 23, № 19. С. 11593.
211. García-Arroyo R. и др. Overexpression of CERKL Protects Retinal Pigment Epithelium Mitochondria from Oxidative Stress Effects // Antioxidants. 2021. Т. 10, № 12. С. 2018.
212. Tuson M., Marfany G., Gonzàlez-Duarte R. Mutation of CERKL, a Novel Human Ceramide Kinase Gene, Causes Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa (RP26) // Am. J. Hum. Genet. 2004. Т. 74, № 1. С. 128–138.
213. Sen P. и др. CERKL mutation causing retinitis pigmentosa(RP) in Indian population – a genotype and phenotype correlation study // Ophthalmic Genet. 2020. Т. 41, № 6. С. 570–578.

214. Aleman T. S. и др. *CERKL* Mutations Cause an Autosomal Recessive Cone-Rod Dystrophy with Inner Retinopathy // Investig. Opthalmology Vis. Sci. 2009. Т. 50, № 12. С. 5944.
215. García-Arroyo R. и др. Exacerbated response to oxidative stress in the Retinitis Pigmentosa Cerkl mouse model triggers retinal degeneration pathways upon acute light stress // Redox Biol. 2023. Т. 66. С. 102862.
216. Perng M.-D., Zhang Q., Quinlan R. A. Insights into the beaded filament of the eye lens // Exp. Cell Res. 2007. Т. 313, № 10. С. 2180–2188.
217. Song S. и др. Functions of the intermediate filament cytoskeleton in the eye lens // J. Clin. Invest. 2009. Т. 119, № 7. С. 1837–1848.
218. Wang H., Ouyang G., Zhu Y. D348N Mutation of BFSP1 Gene in Congenital Cataract: it Does Matter // Cell Biochem. Biophys. 2023. Т. 81, № 4. С. 757–763.
219. Markova E. V., Obukhova L. A., Kolosova N. G. Parameters of Cell Immune Response in Wistar and OXYS Rats and Their Behavior in the Open Field Test // Bull. Exp. Biol. Med. 2003. Т. 136, № 6. С. 588–590.
220. Obukhova L. A., Skulachev V. P., Kolosova N. G. Mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 inhibits age-dependent involution of the thymus in normal and senescence-prone rats // Aging. 2009. Т. 1, № 4. С. 389–401.
221. The Gene Ontology Consortium и др. The Gene Ontology knowledgebase in 2026 // Nucleic Acids Res. 2026. Т. 54, № D1. С. D1779–D1792.
222. Kanehisa M. и др. KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes // Nucleic Acids Res. 2023. Т. 51, № D1. С. D587–D592.
223. Tao H. и др. Thymic Epithelial Cell-Derived IL-15 and IL-15 Receptor α Chain Foster Local Environment for Type 1 Innate Like T Cell Development // Front. Immunol. 2021. Т. 12. С. 623280.
224. Murphy J. M., Young I. G. IL‐3, IL‐5, and GM‐CSF Signaling: Crystal Structure of the Human Beta‐Common Receptor // Interleukins. Elsevier, 2006. Т. 74. С. 1–30.
225. Sakamaki K. и др. Critical cytoplasmic domains of the common beta subunit of the human GM‐CSF, IL‐3 and IL‐5 receptors for growth signal transduction and tyrosine phosphorylation. // EMBO J. 1992. Т. 11, № 10. С. 3541–3549.
226. Nishinakamura R. и др. Mice deficient for the IL-3/GM-CSF/IL-5 βc receptor exhibit lung pathology and impaired immune response, while βIL3 receptor-deficient mice are normal // Immunity. 1995. Т. 2, № 3. С. 211–222.
227. Greter M. и др. GM-CSF Controls Nonlymphoid Tissue Dendritic Cell Homeostasis but Is Dispensable for the Differentiation of Inflammatory Dendritic Cells // Immunity. 2012. Т. 36, № 6. С. 1031–1046.

228. Yoshioka K. Class II phosphatidylinositol 3-kinase isoforms in vesicular trafficking // Biochem. Soc. Trans. 2021. T. 49, № 2. C. 893–901.
229. Marat A. L. и др. mTORC1 activity repression by late endosomal phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate // Science. 2017. T. 356, № 6341. C. 968–972.
230. Dibble C. C. и др. TBC1D7 Is a Third Subunit of the TSC1-TSC2 Complex Upstream of mTORC1 // Mol. Cell. 2012. T. 47, № 4. C. 535–546.
231. Bray S. J. Notch signalling in context // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2016. T. 17, № 11. C. 722–735.
232. Wang M. M. Notch signaling and Notch signaling modifiers // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2011. T. 43, № 11. C. 1550–1562.
233. Hozumi K. и др. Delta-like 4 is indispensable in thymic environment specific for T cell development // J. Exp. Med. 2008. T. 205, № 11. C. 2507–2513.
234. Hirano K. и др. Delta‐like 4‐mediated Notch signaling is required for early T‐cell development in a three‐dimensional thymic structure // Eur. J. Immunol. 2015. T. 45, № 8. C. 2252–2262.
235. Zheng X. и др. YBX1 Modulates 8-Oxoguanine Recognition and Repair in DNA // ACS Chem. Biol. 2025. T. 20, № 2. C. 529–536.
236. Torrent L., Ferrer I. PP2A and Alzheimer Disease // Curr. Alzheimer Res. 2012. T. 9, № 2. C. 248–256.
237. Wu S. и др. NRBF2 plays a crucial role in the acquisition process of learning and memory, independent of the Vps34 complex // Front. Behav. Neurosci. 2025. T. 19. C. 1529522.
238. Forman H. J., Zhang H., Rinna A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis // Mol. Aspects Med. 2009. T. 30, № 1–2. C. 1–12.
239. Sharma R. и др. Antioxidant Role of Glutathione *S* -Transferases: Protection Against Oxidant Toxicity and Regulation of Stress-Mediated Apoptosis // Antioxid. Redox Signal. 2004. T. 6, № 2. C. 289–300.
240. Telegina D. V. и др. Identification of functional networks associated with cell death in the retina of OXYS rats during the development of retinopathy // Cell Cycle. 2015. T. 14, № 22. C. 3544–3556.
241. Stefanova N. A., Kolosova N. G. The Rat Brain Transcriptome: From Infancy to Aging and Sporadic Alzheimer’s Disease-like Pathology // Int. J. Mol. Sci. 2023. T. 24, № 2. C. 1462.
242. Jiang Z. и др. A comprehensive investigation discovered the novel methyltransferase METTL24 as one presumably prognostic gene for kidney renal clear cell carcinoma potentially modulating tumor immune microenvironment // Front. Immunol. 2022. T. 13. C. 926461.
243. Riascos-Bernal D. F. и др. The FAT1 Cadherin Drives Vascular Smooth Muscle Cell Migration // Cells. 2023. T. 12, № 12. C. 1621.

244. Helmbacher F. Tissue-specific activities of the Fat1 cadherin cooperate to control neuromuscular morphogenesis // PLOS Biol. / под ред. Hughes S. 2018. Т. 16, № 5. С. e2004734.
245. Peng Z., Gong Y., Liang X. Role of FAT1 in health and disease (Review) // Oncol. Lett. 2021. Т. 21, № 5. С. 398.
246. Ahmed A. F. и др. FAT1 cadherin acts upstream of Hippo signalling through TAZ to regulate neuronal differentiation // Cell. Mol. Life Sci. 2015. Т. 72, № 23. С. 4653–4669.
247. Chung C. Y. T., Lo P. H. Y., Lee K. K. H. Babam2 Regulates Cell Cycle Progression and Pluripotency in Mouse Embryonic Stem Cells as Revealed by Induced DNA Damage // Biomedicines. 2020. Т. 8, № 10. С. 397.
248. Li Q. и др. A Death Receptor-associated Anti-apoptotic Protein, BRE, Inhibits Mitochondrial Apoptotic Pathway // J. Biol. Chem. 2004. Т. 279, № 50. С. 52106–52116.
249. Wilcox S. M. и др. The role of the innate immune response regulatory gene ABCF1 in mammalian embryogenesis and development // PLOS ONE / под ред. Tian X. 2017. Т. 12, № 5. С. e0175918.
250. Guo F. и др. ABCF1 extrinsically regulates retinal pigment epithelial cell phagocytosis // Mol. Biol. Cell / под ред. Heldin C.-H. 2015. Т. 26, № 12. С. 2311–2320.
251. Kim D. и др. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype // Nat. Biotechnol. 2019. Т. 37, № 8. С. 907–915.
252. Liao Y., Smyth G. K., Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features // Bioinformatics. 2014. Т. 30, № 7. С. 923–930.
253. Leek J. T. и др. The sva package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments // Bioinformatics. 2012. Т. 28, № 6. С. 882–883.
254. Love M. I., Huber W., Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 // Genome Biol. 2014. Т. 15, № 12. С. 550.
255. Kolde R. pheatmap: Pretty Heatmaps. 2019.
256. Oksanen, Jari; Simpson, Gavin L.; Blanchet, F. Guillaume; Kindt, Roeland; Legendre, Pierre; Minchin, Peter R.; O'Hara, R.B.; Solymos, Peter; Stevens, M. Henry H.; Szoecs, Eduard; Wagner, Helene. vegan: Community Ecology Package. 2022.
257. Maechler, Martin; Rousseeuw, Peter; Struyf, Anja; Hubert, Mia; Hornik, Kurt. cluster: Cluster Analysis Basics and Extensions. 2023.
258. Durinck S. и др. Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt // Nat. Protoc. 2009. Т. 4, № 8. С. 1184–1191.
259. Yu G. и др. clusterProfiler: an R Package for Comparing Biological Themes Among Gene Clusters // OMICS J. Integr. Biol. 2012. Т. 16, № 5. С. 284–287.

260. Zhou Y. и др. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets // Nat. Commun. 2019. Т. 10, № 1. С. 1523.
261. Szklarczyk D. и др. The STRING database in 2025: protein networks with directionality of regulation // Nucleic Acids Res. 2025. Т. 53, № D1. С. D730–D737.
262. Lord J. M. и др. Neutrophil ageing and immunesenescence // Mech. Ageing Dev. 2001. Т. 122, № 14. С. 1521–1535.
263. Shaw A. C. и др. Dysregulation of human Toll-like receptor function in aging // Ageing Res. Rev. 2011. Т. 10, № 3. С. 346–353.
264. Wang Q. и др. NK-like CD8 T cell: one potential evolutionary continuum between adaptive memory and innate immunity // Clin. Exp. Immunol. 2024. Т. 217, № 2. С. 136–150.
265. Pereira B. I., Akbar A. N. Convergence of Innate and Adaptive Immunity during Human Aging // Front. Immunol. 2016. Т. 7.
266. Connolly E. и др. Loss of immune cell identity with age inferred from large atlases of single cell transcriptomes // Aging Cell. 2024. Т. 23, № 12. С. e14306.
267. Čičin-Šain L. и др. Loss of Naive T Cells and Repertoire Constriction Predict Poor Response to Vaccination in Old Primates // J. Immunol. 2010. Т. 184, № 12. С. 6739–6745.
268. Fraser C., Owen B. M. Naïve T-cell decline is a significant contributor to expression changes in ageing blood // Front. Aging. 2024. Т. 5. С. 1389789.
269. Bleve A. и др. Immunosenescence, Inflammaging, and Frailty: Role of Myeloid Cells in Age-Related Diseases // Clin. Rev. Allergy Immunol. 2022. Т. 64, № 2. С. 123–144.
270. Gao X., Zhang J., Tamplin O. J. The aging hematopoietic stem cell niche: a mini review // Front. Hematol. 2025. Т. 4. С. 1525132.
271. Nam K.-H. и др. Age-dependent remodeling of peripheral blood CD4+ CD8+ T lymphocytes in cynomolgus monkeys // Dev. Comp. Immunol. 1998. Т. 22, № 2. С. 239–248.
272. Lee W. и др. Age‐related increase of peripheral $CD4^+$ $CD8^+$ double‐positive T lymphocytes in cynomolgus monkeys: longitudinal study in relation to thymic involution // Immunology. 2003. Т. 109, № 2. С. 217–225.
273. McBride J. A., Striker R. Imbalance in the game of T cells: What can the CD4/CD8 T-cell ratio tell us about HIV and health? // PLOS Pathog. / под ред. Coyne C. B. 2017. Т. 13, № 11. С. e1006624.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Линии крыс из Rat Genome Database, среди которых проводился анализ частот аллелей повреждающих генетических вариантов, найденных у крыс OXYS

ACI_EurMcwi_2019, ACI_EurMcwi_2019NG, ACI_N_2020, BDIX_NemOdaMcwi_2022, BN_Crl_2021, BN_Lx_CubMcwi_2019, BN_Lx_CubMcwi_2019NG, BN_NHsdMcwi_2019, BN_NHsdMcwi_2019NG, BN_NHsdMcwi_2020, BN_NHsdMcwi_2021, BN_NHsdMcwi_2022, BN_NHsdMcwi_2023, BN_NHsdMcwi_2024L, BN_NHsdMcwi_2024S, BN_RijHsd_2021, BN_SsN_2020, BUF_MnaMcwi_2022, BUF_N_2020, BXH10_CubMcwi_2024, BXH12-1_CubMcwi_2024, BXH13_CubMcwi_2024, BXH2_CubMcwi_2020, BXH2_IpcvMcwi_2023, BXH3_CubMcwi_2020, BXH6_CubMcwi_2021, COP_HsdUwmRrrc_2024, DA_OlaHsd_2019, DA_OlaHsd_2019NG, F344_DuCrl_2019, F344_DuCrl_2019NG, F344_DuCrl_2021, F344_NCrl_2019, F344_NCrl_2019NG, F344_NHsd_2021, F344_N_2020, F344_StmMcwi_2019, FHH_EurMcwi_2019, FHH_EurMcwi_2019NG, FXLE12_StmMcwi_2021, FXLE12_StmMcwi_2023, FXLE12_Stm_2019NG, FXLE13_StmMcwi_2023, FXLE13_Stm_2019NG, FXLE14_StmMcwi_2023, FXLE14_Stm_2019NG, FXLE15_StmMcwi_2021, FXLE15_StmMcwi_2023, FXLE15_Stm_2019NG, FXLE16_StmMcwi_2024, FXLE16_Stm_2020, FXLE17_StmMcwi_2023, FXLE17_Stm_2019NG, FXLE18_StmMcwi_2024, FXLE18_Stm_2020, FXLE19_StmMcwi_2022, FXLE20_StmMcwi_2023, FXLE20_Stm_2019NG, FXLE21_StmMcwi_2023, FXLE22_StmMcwi_2023, FXLE23_StmMcwi_2023, FXLE23_Stm_2022, FXLE24_StmMcwi_2024, FXLE25_StmMcwi_2023, FXLE25_Stm_2022, FXLE26_StmMcwi_2023, FXLE26_Stm_2022, GK_FarMcwi_2019, GK_FarMcwi_2019NG, HTX_KyoMcwi_2024, HXB10_IpcvMcwi_2019, HXB13_lpcvMcwi_2024, HXB17_IpcvMcwi_2021, HXB18_IpcvMcwi_2021, HXB1_lpcvMcwi_2024, HXB20_IpcvMcwi_2020, HXB23_IpcvMcwi_2021, HXB2_IpcvMcwi_2019, HXB31_IpcvMcwi_2019, HXB4_IpcvMcwi_2020, HXB5_IpcvMcwi_2024, HXB7_lpcvMcwi_2024, LEW_Crl_2019, LEW_Crl_2019NG, LEXF10A_StmMcwi_2020, LEXF10B_StmMcwi_2022, LEXF10C_StmMcwi_2023, LEXF10C_Stm_2022, LEXF11_Stm_2020, LEXF1A_Stm_2019, LEXF1A_Stm_2024, LEXF1C_StmMcwi_2021, LEXF1C_Stm_2019, LEXF2A_StmMcwi_2023, LEXF2A_Stm_2022, LEXF2B_Stm_2019, LEXF2C_StmMcwi_2022, LEXF3_StmMcwi_2024, LEXF3_Stm_2020, LEXF4_Stm_2020, LEXF5_StmMcwi_2023, LEXF5_Stm_2019NG, LEXF6B_StmMcwi_2023, LEXF6B_Stm_2019NG, LEXF7A_Stm_2019NG, LEXF7B_StmMcwi_2022, LEXF7C_StmMcwi_2022, LEXF8A_StmMcwi_2021, LEXF8D_StmMcwi_2023, LEXF8D_Stm_2022, LEXF9_StmMcwi_2022, LE_StmMcwi_2024, LE_Stm_2019, LH_MavRrrcAek_2020, LH_MavRrrcAek_2024, LL_MavRrrcAek_2020,

LN_MavRrrcAek_2020, M520_NRrrcMcwi_2019, M520_NRrrcMcwi_2019NG, M520_N_2020, MNS_NMcwi_2024, MR_NRrrc_2022, MR_N_2020, MWF_SimwMcwi_2019, MWF_SimwMcwi_2019NG, PVG_SeacMcwi_2024, PVG_Seac_2019, RCS_LavRrrcMcwi_2021, SHRSP_A3NCrl_2019, SHRSP_A3NCrl_2019NG, SHR_NCrl_2021, SHR_NHsd_2021, SHR_OlalpcvMcwi_2019, SHR_OlalpcvMcwi_2019NG, SR_JrHsd_2020, SS_HsdMcwiCrl_2021, SS_JrHsdMcwi_2019, SS_JrHsdMcwi_2019NG, SS_JrHsd_2021, WAG_RijCrl_2020, WAG_RijCrl_2024, WKY_NCrl_2019, WKY_NCrl_2019NG, WKY_NHsd_2022, WKY_N_2020, WN_N_2020

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Данные ChIP-seq по гистоновой метке H3K27ac, использованные для получения пиков обогащения и анализа их перекрытия с CNV крыс OXYS

Таблица Б.1 – Данные ChIP-seq по метке H3K27ac, использованные для анализа

SRA идентификатор	Образец	Ткань
SRR17431546	Sham-dorCA1-Rep1	Дорсальный гиппокамп (поле CA1), повтор 1
SRR17431489	Sham-dorCA1-Rep2	Дорсальный гиппокамп (поле CA1), повтор 2
SRR17431543	Sham-venCA1-Rep1	Вентральный гиппокамп (поле CA1), повтор 1
SRR17431487	Sham-venCA1-Rep2	Вентральный гиппокамп (поле CA1), повтор 2
SRR17431589	Sham-PLC-Rep1	Префронтальная кора (прелимбическая часть), повтор 1
SRR17431505	Sham-PLC-Rep2	Префронтальная кора (прелимбическая часть), повтор 2

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Анализ эволюционной консервативности аминокислотных позиций с заменами у крыс OXYS среди белков-ортологов грызунов и родственных им видов

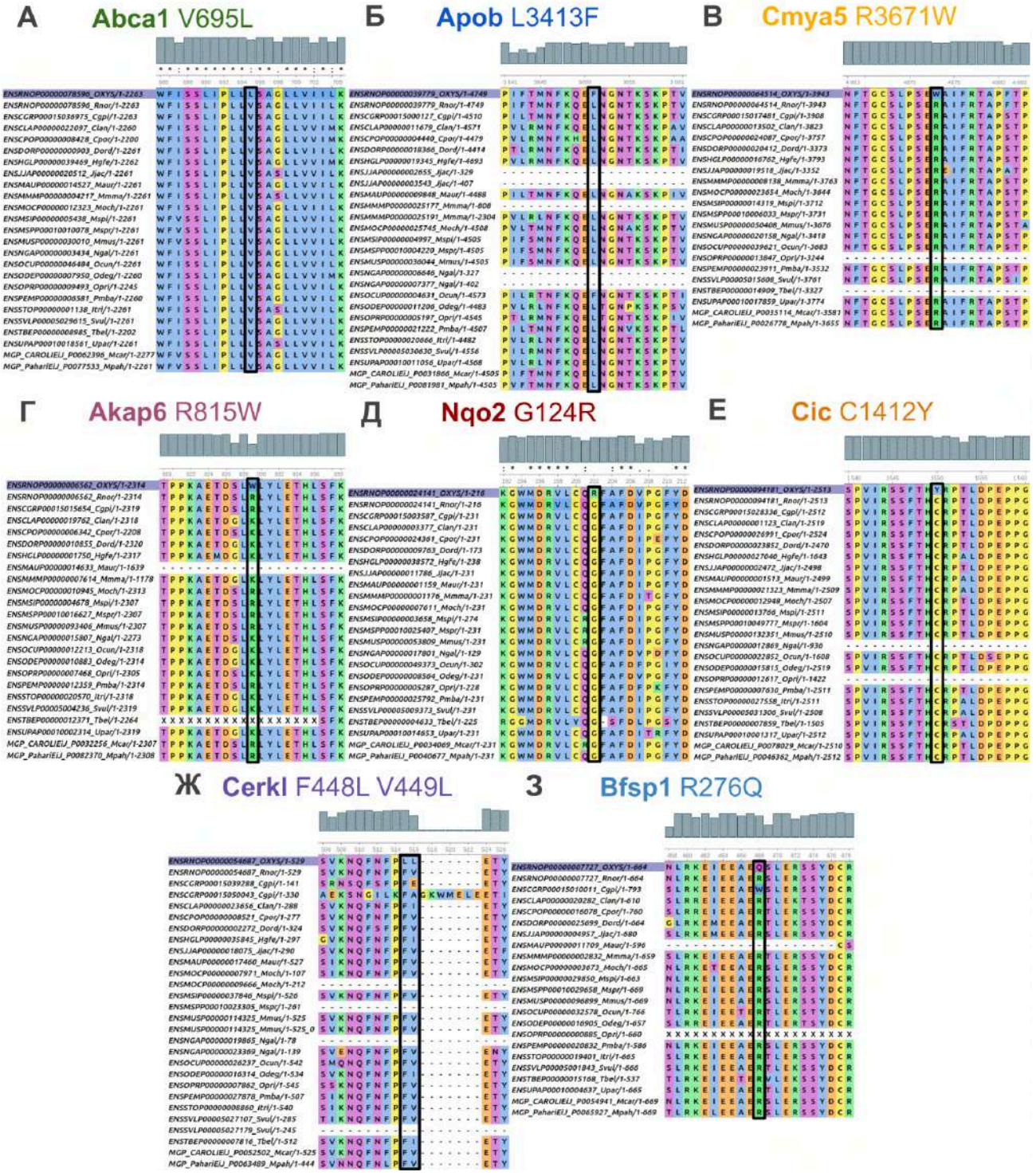


Рисунок В.1 – Аминокислотные (АК) замены в белках OXYS крыс (сверху на каждой картинке), и гомологичная позиция (выделена черной рамкой) у ортологичных белков грызунов и родственных им видов. Полярные незаряженные АК обозначены фиолетовым (S, T, N, Q), гидрофобные – голубым (A, V, I, L, M, F, Y, W), положительно заряженные – зеленым (R, H, K), отрицательно – оранжевым (D, E), другие – желтым (C, G, P). Высота столбца над АК соответствует степени ее эволюционной консервативности

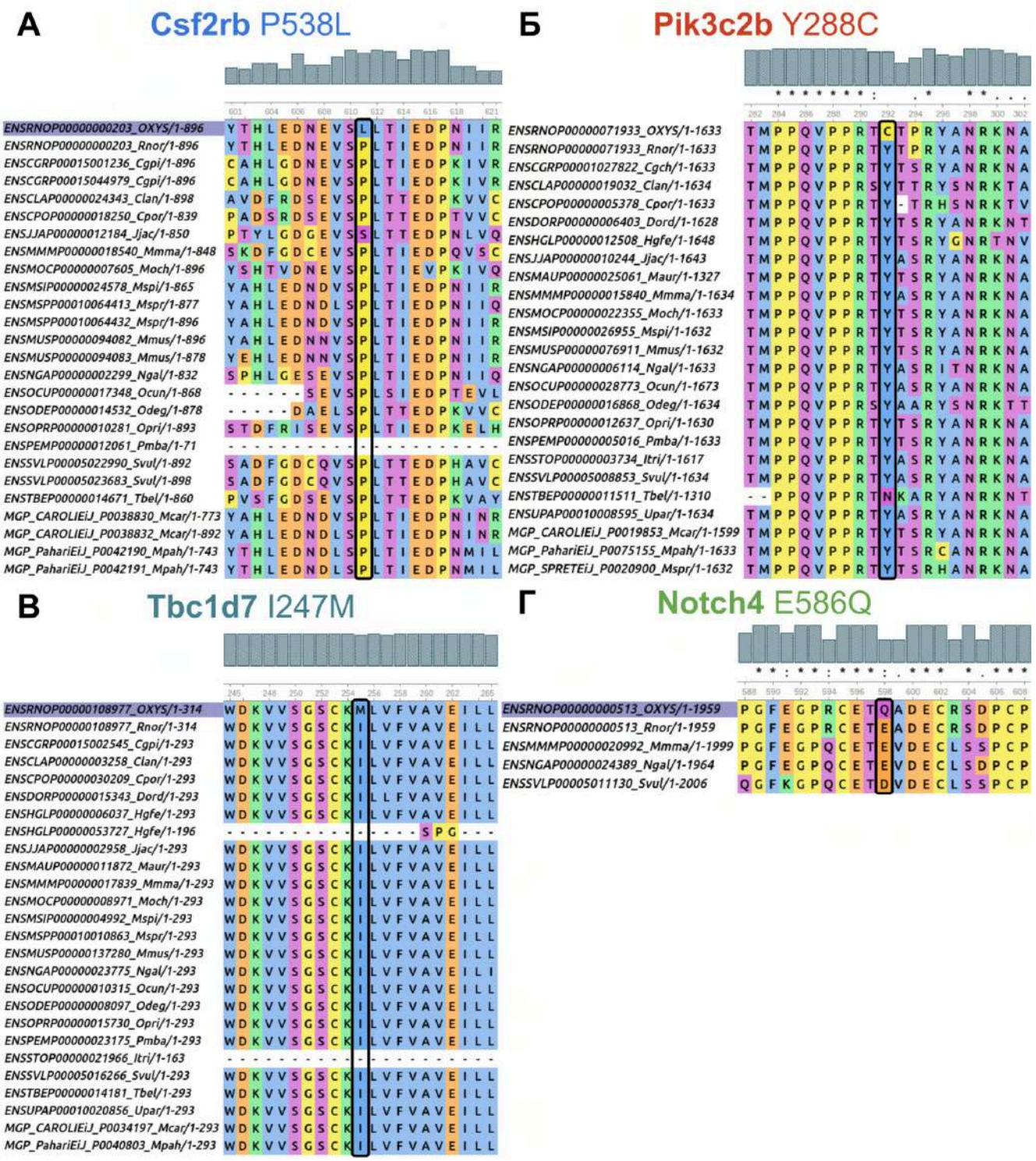


Рисунок В.2 – Аминокислотные (АК) замены в белках OXYS крыс (сверху на каждой картинке), и гомологичная позиция (выделена черной рамкой) у ортологичных белков грызунов и родственных им видов. Полярные незаряженные АК обозначены фиолетовым (S, T, N, Q), гидрофобные – голубым (A, V, I, L, M, F, Y, W), положительно заряженные – зеленым (R, H, K), отрицательно – оранжевым (D, E), другие – желтым (C, G, P). Высота столбца над АК соответствует степени ее эволюционной консервативности

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Анализ функциональной аннотации генов с повреждающими генетическими вариантами у крыс OXYS по молекулярным путям KEGG и биологическим процессам GO

Таблица Г.1 – Молекулярные пути KEGG, связанные с иммунными функциями, аутофагией и клеточным старением

KEGG ID	Категория	Описание	Гены	Количество
rno04610	Immune system	Complement and coagulation cascades	*Itgax/F3/C5/F2/Serpina5/Cd55/C4bpa/C4bpb/Notch4/C1r/Gabarapl1/Tnn*	12
rno04672	Immune system	Intestinal immune network for IgA production	*Itga4/Tnfrsf13c/Tnfrsf17/Pigr*	4
rno04512	Signaling molecules and interaction	ECM-receptor interaction	*Itga4/Tnc/Itga9/Mepe/Fras1/Tnn*	6
rno04640	Immune system	Hematopoietic cell lineage	*Siglech/Cd1d1/Itga4/Cd55*	4
rno04061	Signaling molecules and interaction	Viral protein interaction with cytokine and cytokine receptor	*Tnfrsf1a/Ccr5/Il10rb*	3
rno04650	Immune system	Natural killer cell mediated cytotoxicity	*Klrd1/Klrc1/Ppp3r2*	3
rno04662	Immune system	B cell receptor signaling pathway	*Ifitm1/Ppp3r2*	2
rno04658	Immune system	Th1 and Th2 cell differentiation	*Ppp3r2/Notch3*	2
rno04612	Immune system	Antigen processing and presentation	*Klrd1/Klrc1*	2
rno04060	Signaling molecules and interaction	Cytokine-cytokine receptor interaction	*Tnfrsf1a/Csf2rb/Tnfrsf13c/Ccr5/Tnfrsf17/Il10rb*	6
rno04064	Signal transduction	NF-kappa B signaling pathway	*Tnfrsf1a/Tnfrsf13c*	2
rno04625	Immune system	C-type lectin receptor signaling pathway	*Ppp3r2/Irf1*	2
rno04668	Signal transduction	TNF signaling pathway	*Tnfrsf1a/Irf1*	2
rno04621	Immune system	NOD-like receptor signaling pathway	*Gbp3/Trpv2/Gabarapl1*	3
rno04613	Immune system	Neutrophil extracellular trap formation	*C5/Hdac1l/H2az2l2*	3
rno04620	Immune system	Toll-like receptor signaling pathway	*Tlr3*	1
rno04659	Immune system	Th17 cell differentiation	*Ppp3r2*	1

Продолжение таблицы Г.1

rno04218	Cell growth and death	Cellular senescence	*Ccna1/Ppp3r2*	2
rno04660	Immune system	T cell receptor signaling pathway	*Ppp3r2*	1
rno04062	Immune system	Chemokine signaling pathway	*Ccr5*	1
rno04150	Signal transduction	mTOR signaling pathway	*Tnfrsf1a/Telo2/Atp6v1g3/Tbc1d7*	4
rno04140	Transport and catabolism	Autophagy - animal	*Ctsd/Gabarapl1/Lamp1*	3
rno04068	Signal transduction	FoxO signaling pathway	*Gabarapl1/Csnk1e*	2
rno04210	Cell growth and death	Apoptosis	*Ctsd/Tnfrsf1a/Csf2rb/Ptpn13*	4
rno04151	Signal transduction	PI3K-Akt signaling pathway	*Fgfr2/Itga4/Tnc/Itga9/Tnn*	5

Таблица Г.2 – Биологические процессы GO, связанные с иммунными функциями, развитием эпителиальных клеток и аутофагией

GO ID	Биологический процесс	Гены	Количество
GO:0006958	complement activation, classical pathway	*C5/C1rl/Cd55/C4bpa/C4bpb/C4b/C1r/C1s*	8
GO:0002455	humoral immune response mediated by circulating immunoglobulin	*Zp2/C5/C1rl/Cd55/C4bpa/C4bpb/C4b/C1r/C1s*	9
GO:0006910	phagocytosis, recognition	*Myo18a/C4bpa/C4bpb/C4b/C1r/C1s*	6
GO:0034341	response to type II interferon	*Ifitm1/Gbp3/Kif16b/Serpina3n/Sp100/Irf1/Myo18a/Cldn1/Gbp6/Epsti1/Tlr3*	11
GO:0002223	stimulatory C-type lectin receptor signaling pathway	*Klre1/Klrd1/Klrc1*	3
GO:0071356	cellular response to tumor necrosis factor	*Muc2/Gbp3/Cpne1/Abcb1b/Tnfrsf1a/Apob/Tnfrsf13c/Ccr5/Tnfrsf17/Irf1/Trpv1/Cldn1/Chi3l1/Pid1*	14
GO:0002443	leukocyte mediated immunity	*Zp2/Ms4a2/Cd1d1/C5/C1rl/Klre1/Klrd1/Klrc1/Csf2rb/Atad5/Cd55/C4bpa/C4bpb/Cd84/C4b/C1r/C1s/Milr1/Tlr3/Lamp1*	20
GO:0002250	adaptive immune response	*Nlrp10/Zp2/Cd1d1/C5/C1rl/Klrd1/Klrc1/Sit1/Csf2rb/Tnfrsf13c/Tnfrsf17/Atad5/Cd55/C4bpa/C4bpb/Lax1/Cd84/C4b/Otub1/C1r/C1s*	21
GO:0034612	response to tumor necrosis factor	*Muc2/Gbp3/Cpne1/Abcb1b/Tnfrsf1a/Apob/Tnfrsf13c/Ccr5/Tnfrsf17/Irf1/Trpv1/Cldn1/Chi3l1/Pid1*	14
GO:0007229	integrin-mediated signaling pathway	*Itgax/Itgad/Pcsk5/Itga4/Tln1/Itga9/Diaph3*	7
GO:0002449	lymphocyte mediated immunity	*Zp2/Cd1d1/C5/C1rl/Klre1/Klrd1/Klrc1/Csf2rb/Atad5/Cd55/C4bpa/C4bpb/C4b/C1r/C1s/Lamp1*	16
GO:0042116	macrophage activation	*Cd1d1/Dysf/Trpv1/Myo18a/Cd84/Epsti1/Tlr3*	7
GO:0002064	epithelial cell development	*Fgfr2/Muc2/Wt1/Bfsp1/Cst3/Abcb1b/Tnfrsf1a/Plec/Pkhd1/Tmigd1/Cldn1/Fat1/Hydin/Notch4*	14
GO:0036037	CD8-positive, alpha-beta T cell activation	*Mapk8ip1/Irf1/Pax1*	3
GO:0006909	phagocytosis	*Dysf/Abca1/Prtn3/Myo18a/C4bpa/C4bpb/Arhgap12/C4b/C1r/C1s/Cnn2/Cd300lf*	12
GO:0002460	adaptive immune response based on somatic recombination of immune receptors built from immunoglobulin superfamily domains	*Nlrp10/Zp2/Cd1d1/C5/C1rl/Klrd1/Klrc1/Csf2rb/Tnfrsf13c/Atad5/Cd55/C4bpa/C4bpb/C4b/C1r/C1s*	16
GO:0001915	negative regulation of T cell mediated cytotoxicity	*Klrd1/Klrc1*	2

Продолжение таблицы Г.2

GO:0034599	cellular response to oxidative stress	*H19/Pex2/F3/Pla2r1/Cst3/Zfp277/Tmigd1*	7
GO:0007040	lysosome organization	*Tpp1/Abca1/Zfyve26/Lamp1*	4
GO:0032418	lysosome localization	*Ms4a2/Cd84/Milr1*	3
GO:0010669	epithelial structure maintenance	*Muc2/Crocc/Muc13*	3
GO:0003382	epithelial cell morphogenesis	*Pkhd1/Fat1/Notch4*	3
GO:0030198	extracellular matrix organization	*Pbxip1/Wt1/Cst3/Tnfrsf1a/Nphp3/Tpsab1/Itih1/Phldb2/Hmcn1*	9
GO:1905037	autophagosome organization	*Ctsd/Synpo2/Zfyve26/Pik3c2b/Rnf5/Gabarapl1*	6
GO:0016236	macroautophagy	*Ctsd/Cttn/Pex2/Synpo2/Fbxl4/Zfyve26/Tmem74/Pik3c2b/Rubcnl/Diaph3/Rnf5/Gabarapl1*	12
GO:0000423	mitophagy	*Cttn/Fbxl4/Gabarapl1*	3

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Анализ частот аллелей повреждающих вариантов крыс OXYS в генах, входящих в пути KEGG и биологические процессы GO из таблиц Г1, Г2, среди 146 линий крыс из RGD

Таблица Д.1 – Повреждающие варианты крыс OXYS с аллельной частотой (AF) < 0,05 среди линий крыс, представленных в RGD

Ген	Геномные координаты	Референсный аллель	Альтернативный аллель	AF
Apob	6:30878853	C	T	0
Bfsp1	3:131199280	C	T	0
Cd55	13:41871197	G	A	0
Chi3l1	13:45643464	G	A	0
Csf2rb	7:109899157	C	T	0,027
Diaph3	15:62850739	T	A	0
Fras1	14:12904320	C	T	0,041
Hdac11	9:80453352	T	G	0
Hdac11	9:80453442	C	G	0
Hydin	19:38413466	C	T	0
Itga4	3:64195598	T	A	0,014
Kif16b	3:130058914	C	T	0
Mapk8ip1	3:78360402	T	A	0,014
Ms4a2	1:208442211	G	A	0,041
Muc2	1:196813335	C	CCACATTT	0
Notch4	20:4176225	C	G	0
Pax1	3:134790069	A	C	0
Pcsk5	1:215024173	C	T	0,006849
Pigr	13:42324224	A	AC	0,006849
Pigr	13:42324225	A	ACACACACACAC	0
Pkhd1	9:22959578	G	C	0
Ppp3r2	5:64028041	G	A	0
Serpina3n	6:123311314	C	T	0,006849
Serpina3n	6:123311233	CGCGAGACGTTGGGT	C	0,006849
Serpina5	6:123025534	C	A	0,027

AF – частота встречаемости альтернативного аллеля среди линий крыс из RGD

Продолжение таблицы Д.1

Sit1	5:57740880	G	A	0,034
Sp100	9:86321241	A	G	0,034
Tbc1d7	17:21546569	C	G	0,021
Telo2	10:14133336	G	A	0,021
Tnfrsf17	10:4301401	C	T	0,048
Tnfrsf1a	4:158162492	C	A	0,048
Abca1	5:67724612	C	G	0
Csnk1e	7:110984052	T	C	0
Synpo2	2:211217764	G	A	0
Pik3c2b	13:44514982	A	G	0,006849
Rnf5	20:4147585	C	T	0
Pbxip1	2:174865053	G	A	0,034

ПРИЛОЖЕНИЕ Е

Анализ функциональной аннотации генов с повреждающими генетическими вариантами у крыс OXYS по молекулярным путям KEGG и биологическим процессам GO, связанным с митохондриальными функциями

Таблица Е.1 – Молекулярные пути KEGG и биологические процессы GO, ассоциированные с митохондриальными функциями

ID	Молекулярный путь/биологический процесс	Гены	Количество
rno00190	Oxidative phosphorylation	*Atp6v1g3*	1
rno04137	Mitophagy - animal	*Gabarapl1*	1
GO:0034599	cellular response to oxidative stress	*H19/Pex2/F3/Pla2r1/Cst3/Zfp277 /Tmigd1*	7
GO:0051560	mitochondrial calcium ion homeostasis	*Mcur1/Disc1*	2
GO:0051561	positive regulation of mitochondrial calcium ion concentration	*Mcur1*	1
GO:1903147	negative regulation of autophagy of mitochondrion	*Fbxl4*	1
GO:0034982	mitochondrial protein processing	*Afg3l1*	1
GO:0010917	negative regulation of mitochondrial membrane potential	*Trpv1*	1
GO:1903146	regulation of autophagy of mitochondrion	*Cttn/Fbxl4*	2
GO:0036444	calcium import into the mitochondrion	*Mcur1*	1
GO:0006390	mitochondrial transcription	*Mrpl12*	1
GO:0006851	mitochondrial calcium ion transmembrane transport	*Mcur1*	1
GO:1990542	mitochondrial transmembrane transport	*Sfxn4*	1
GO:0000423	mitophagy	*Cttn/Fbxl4/Gabarapl1*	3
GO:0008053	mitochondrial fusion	*Afg3l1*	1
GO:0007007	inner mitochondrial membrane organization	*Afg3l1*	1
GO:0051881	regulation of mitochondrial membrane potential	*Trpv1/Pid1*	2
GO:0140053	mitochondrial gene expression	*Ptcd1/Mrpl12*	2
GO:0000959	mitochondrial RNA metabolic process	*Mrpl12*	1
GO:0032543	mitochondrial translation	*Ptcd1*	1
GO:0006839	mitochondrial transport	*Sfxn4*	1
GO:0007006	mitochondrial membrane organization	*Afg3l1*	1
GO:0007005	mitochondrion organization	*Adgrg6/Plec/Chchd2l3/Afg3l1/Pid 1*	5

ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

Анализ частот аллелей повреждающих вариантов крыс OXYS в генах, входящих в пути KEGG и биологические процессы GO из таблицы E1, среди 146 линий крыс из RGD

Таблица Ж.1 – Частоты аллелей повреждающих генетических вариантов крыс OXYS среди линий крыс, представленных в RGD

Ген	Геномные координаты	Референсный аллель	Альтернативный аллель	AF
Adgrg6	1:8829753	C	T	0,497
Afg3l1	19:51517768	G	A	0,253
Atp6v1g3	13:49810751	G	A	0,096
Chchd2l3	**9:94501071**	**G**	**T**	**0,034**
Cst3	3:136340409	G	A	0,349
Cst3	3:136340457	G	T	0,349
Cttn	1:199616099	G	A	0,062
Disc1	19:53210740	G	A	0,397
F3	2:209833204	G	A	0,565
Fbxl4	5:35968850	C	T	0,116
Gabarapl1	4:162988547	CTGTG	C	0,082
H19	1:197731409	G	A	0,336
Mcur1	**17:21142737**	**C**	**A**	**0,021**
Mcur1	**17:21142844**	**G**	**A**	**0,021**
Mrpl12	10:105758502	CAG	C	0,534
Pex2	2:96065800	C	T	0,164
Pid1	9:85494132	TC	T	0,144
Pla2r1	3:44991494	C	T	0,130
Plec	7:107904329	T	C	0,247
Plec	7:107905358	C	T	0,226
Ptcd1	12:9456881	G	A	0,603
Sfxn4	1:259982080	C	T	0,719
Tmigd1	10:61736494	C	T	0,452
Trpv1	10:57855429	G	T	0,226
Zfp277	6:57475418	C	T	0,082
Zfp277	6:57475457	C	T	0,082
Zfp277	6:57512567	T	A	0,082

AF – частота встречаемости альтернативного аллеля среди линий крыс из RGD
Жирным шрифтом выделены варианты с AF < 0,05

ПРИЛОЖЕНИЕ И

Хроматограммы секвенирования по Сэнгеру кандидатных вариантов в исследуемых генах

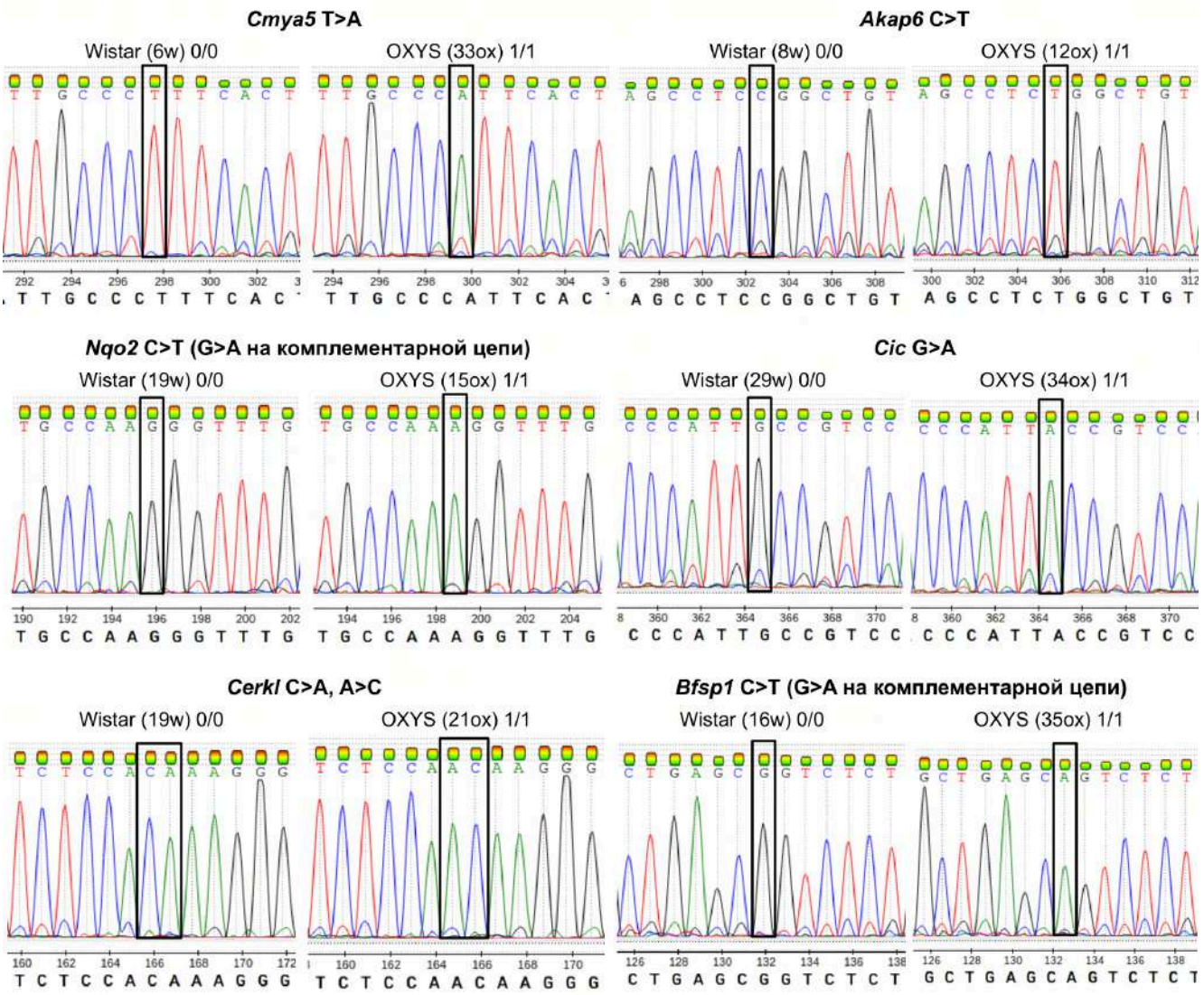


Рисунок И.1 – Фрагменты хроматограмм секвенирования по Сэнгеру кандидатных вариантов в генах *Cmya5*, *Akap6*, *Nqo2*, *Cic*, *Cerkl* и *Bfsp1*. Черными рамками выделены исследуемые позиции

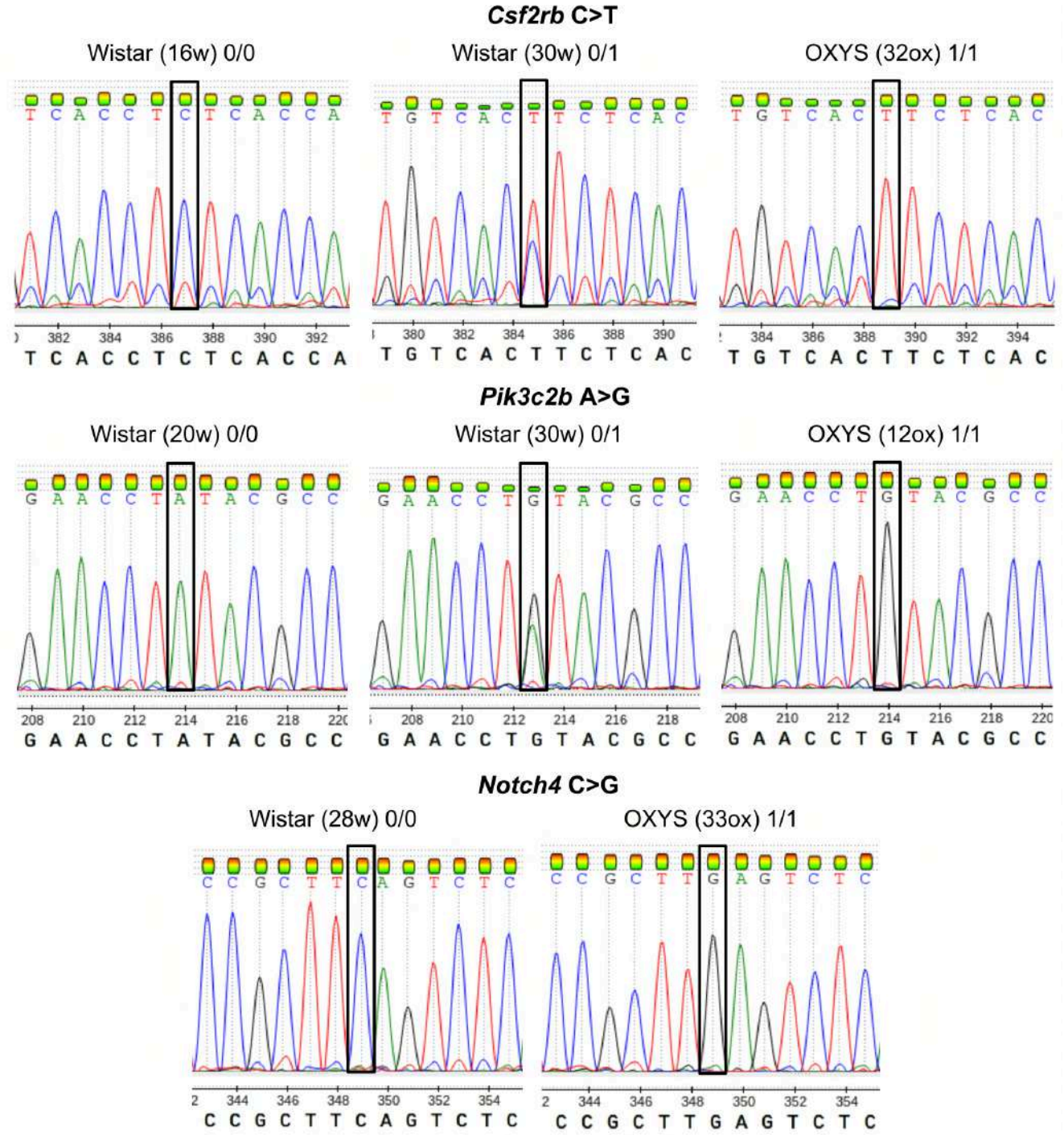


Рисунок И.2 – Фрагменты хроматограмм секвенирования по Сэнгеру кандидатных вариантов в генах *Csf2rb, Pik3c2b и Notch4.* Черными рамками выделены исследуемые позиции

ПРИЛОЖЕНИЕ К

Выборка яванских макак, на которой был выполнен анализ состава клеточных популяций в периферической крови

Таблица К.1 – Характеристики яванских макак, для которых был выполнен анализ состава клеточных популяций в крови

Образец	Группа	Пол	Возраст*
45779	молодой	М	3,1
45267	молодой	М	3,3
45241	молодой	М	3,3
45243	молодой	М	3,3
45176	молодой	М	3,4
45173	молодой	М	3,4
45122	молодой	М	3,4
45100	молодой	М	3,5
45086	молодой	М	3,5
45038	молодой	М	3,5
45002	молодой	М	3,5
45004	молодой	М	3,5
44930	молодой	М	3,5
44932	молодой	М	3,5
44910	молодой	М	3,6
44905	молодой	М	3,6
44861	молодой	М	3,6
44857	молодой	М	3,6
44767	молодой	М	3,6
45271	молодой	М	3,8
45043	молодой	М	4,0
44527	молодой	М	4,5
44506	молодой	М	4,5
44425	молодой	М	4,7
44086	молодой	М	5,0
43925	молодой	М	5,1
43665	молодой	М	5,3
44872	молодой	М	7,1

* на момент взятия образцов крови; М – мужской

Продолжение таблицы К.1

36147	пожилой	М	17,1
35861	пожилой	М	17,7
35108	пожилой	М	18,1
34920	пожилой	М	19,7
34855	пожилой	М	19,8
36157	пожилой	М	20,4
34260	пожилой	М	21,2
33260	пожилой	М	24,1
33217	пожилой	М	24,1
32985	пожилой	М	24,8
32809	пожилой	М	25,1
32474	пожилой	М	25,9
32379	пожилой	М	26,0
32230	пожилой	М	26,2
31912	пожилой	М	27,0
31738	пожилой	М	28,5
31150	пожилой	М	30,2

ПРИЛОЖЕНИЕ Л

Основные метрики качества транскриптомных данных

Таблица Л.1 – Метрики качества транскриптомных библиотек яванских макак, расчитанные утилитой CollectRnaSeqMetrics из Picard v2.26.11

Образец	RIN	Кол-во прочтений	Доля рРНК-оснований (%)	Доля мРНК-оснований (%)	Доля кодирующих оснований (%)	Доля оснований в НТО (%)	Доля интронных оснований (%)	Доля межгенных оснований (%)	Доля прочтений на правильной цепи (%)
35777_BM	7,8	71 813 183	1,37	83,6	65,9	17,7	12,0	3,1	98,4
35777_K	9,1	93 987 287	2,25	83,8	68,7	15,1	11,0	2,9	98,6
35908_BM	8,2	58 210 120	2,15	82,2	65,2	17,0	12,7	2,9	98,6
35908_K	9,1	66 111 394	1,53	80,0	61,6	18,4	15,0	3,5	98,4
36435_BM	7,7	74 298 886	0,74	84,2	64,5	19,7	11,9	3,2	98,3
36435_K	8,7	87 431 540	1,99	78,7	61,1	17,6	15,6	3,7	98,8
33202_BM	7,8	46 695 978	0,15	78,3	54,6	23,7	15,7	5,8	99,4
33202_K	7,5	63 404 195	0,32	83,1	59,9	23,2	10,9	5,6	99,4
46712_BM	8,6	31 528 146	0,30	83,4	62,0	21,4	12,1	4,2	98,9
46712_K	8,9	44 602 187	0,20	76,2	53,3	22,9	18,9	4,7	99,0
47044_BM	9,0	38 527 654	0,20	85,0	62,2	22,7	11,0	3,9	98,9
47044_K	9,1	45 524 140	0,08	78,5	55,3	23,2	17,1	4,3	99,0
47099_BM	9,0	38 874 314	0,47	85,3	64,2	21,2	10,6	3,6	98,3
47099_K	8,2	49 238 463	0,28	80,7	57,1	23,6	14,7	4,3	97,6
47100_BM	8,6	41 183 358	0,42	84,0	63,5	20,4	11,4	4,3	98,8
47100_K	8,8	39 694 906	0,19	78,7	56,1	22,6	16,3	4,8	99,0
48017_BM	8,4	53 071 006	0,12	78,6	53,9	24,8	15,6	5,7	99,4
48017_K	7,1	37 448 486	0,08	81,8	55,3	26,5	12,5	5,6	99,5

RIN – RNA integrity number; НТО – нетранслируемая область РНК

ПРИЛОЖЕНИЕ М

Результаты анализа дифференциальной экспрессии генов

Таблица М.1 – Показатели дифференциальной экспрессии (log_2FC и padj) для обсуждаемых **в подразделе 3.2.2** генов в костном мозге и периферической крови

Ген	Костный мозг		Кровь	
	log_2FC	**padj**	**log_2FC**	**padj**
N4BP3	−2,856	< 0,001	−4,623	< 0,001
CD177	−4,733	< 0,001	−7,769	< 0,001
CD14	−0,863	0,163	−2,360	< 0,001
CD163	−1,789	< 0,001	−1,899	< 0,001
FPR1	−1,240	< 0,001	−2,594	< 0,001
FPR2	−1,276	< 0,001	−2,556	< 0,001
CXCR1	−1,372	< 0,001	−1,787	< 0,001
TLR1	−1,956	< 0,001	−2,308	< 0,001
TLR2	−1,376	0,005	−2,115	< 0,001
TLR3	−0,483	0,625	0,246	0,745
TLR4	−1,743	0,002	−2,601	< 0,001
TLR5	−1,284	0,001	−1,974	< 0,001
TLR6	−1,632	< 0,001	−1,777	< 0,001
TLR7	−1,461	0,027	−0,356	0,519
TLR8	−1,303	0,002	−1,456	0,003
TLR10	−0,783	0,004	−0,950	0,001
IFIH1	−0,410	0,237	−0,825	0,005
RIGI	−1,188	0,011	−0,959	0,040
DHX58	−0,460	0,200	−0,779	0,145
CLEC4E	−1,392	0,011	−3,498	< 0,001
CLEC6A	−0,952	0,425	−1,154	0,231
CLEC7A	−1,449	0,016	−1,031	0,047
CLEC9A	−1,030	0,059	-1,465	0,002
CLEC4C	1,678	0,001	2,314	0,001
CLEC10A	2,030	< 0,001	1,753	0,006
NOD2	−0,525	0,227	−1,947	< 0,001
NLRC4	−1,385	0,001	−3,748	< 0,001

Продолжение таблицы М.1

NLRP12	−1,494	0,005	−2,504	< 0,001
NLRX1	−1,126	0,002	−2,771	< 0,001
NAIP	−1,631	0,002	−2,490	< 0,001
CCR7	−1,577	< 0,001	−1,925	< 0,001
LEF1	−2,382	< 0,001	−2,190	0,001
SELL	−0,995	0,001	−2,003	< 0,001
FOXO1	−0,075	0,906	−0,898	0,009
CD8A	1,450	< 0,001	2,502	< 0,001
GZMB	1,276	0,025	2,353	< 0,001
PRF1	1,582	0,019	2,494	NA
KLRK1	1,687	0,003	2,681	< 0,001
FASLG	1,833	0,042	3,513	< 0,001
TBX21	2,482	< 0,001	3,021	< 0,001
CCR5	0,935	0,030	2,127	< 0,001
GNLY	0,463	0,662	1,470	0,031
IFNG	2,903	< 0,001	1,881	0,003
NCR3	1,531	< 0,001	2,029	< 0,001
CDKN2A	0,937	0,116	1,640	0,001
CDKN1A	0,509	0,406	−0,262	0,689
IL1A	−1,658	NA	−4,576	NA
IL1B	−0,632	0,786	−3,815	NA
IL6	−1,833	0,298	−4,724	NA
TNF	−0,199	0,846	−1,209	0,078
CXCL8	−0,635	0,510	−2,590	0,025
CCL2	0,760	0,611	−0,003	NA

$\log_2$FC – логарифм по основанию 2 от кратности изменения экспрессии (отрицательные значения соответствуют снижению экспрессии у пожилых животных, положительные – повышению); padj – *p*-value с поправкой Бенджамини-Хохберга; NA – значение не рассчитано из-за низкой экспрессии и/или выбросов

ПРИЛОЖЕНИЕ Н

Статистические показатели межгруппового сравнения состава клеточных популяций в периферической крови яванских макак

Таблица Н.1 – Результаты межгруппового сравнения по данным гематологического анализа

Параметр	Критерий сравнения	*p*-value	Молодые	Пожилые	padj	Значимость
Лейкоциты, $\times 10^9$/л	Манна-Уитни	0,007	10,55 [9,57; 12,53]	8,30 [7,10; 10,70]	0,020	*
Миелоидные/лимфоидные	t-критерий Стьюдента	0,139	1,26 ± 0,58	1,04 ± 0,40	0,186	ns
Нейтрофилы, $\times 10^9$/л	Манна-Уитни	0,003	5,25 [3,90; 6,35]	3,40 [2,80; 4,20]	0,020	*
Нейтрофилы, %	Манна-Уитни	0,063	46,85 [41,02; 56,38]	38,70 [32,10; 49,60]	0,108	ns
Лимфоциты, $\times 10^9$/л	t-критерий Стьюдента	0,054	5,38 ± 1,63	4,48 ± 1,37	0,108	ns
Лимфоциты, %	t-критерий Стьюдента	0,250	46,78 ± 11,49	50,44 ± 9,27	0,299	ns
Моноциты, $\times 10^9$/л	Манна-Уитни	0,476	0,50 [0,40; 0,62]	0,40 [0,40; 0,60]	0,476	ns
Моноциты, %	Манна-Уитни	0,092	4,45 [3,90; 5,08]	5,00 [4,20; 6,80]	0,137	ns
Эозинофилы, $\times 10^9$/л	Манна-Уитни	0,005	0,10 [0,03; 0,10]	0,10 [0,10; 0,30]	0,020	*
Эозинофилы, %	Манна-Уитни	<0,001	0,55 [0,20; 1,25]	1,80 [1,30; 3,30]	0,002	**
Базофилы, $\times 10^9$/л	Манна-Уитни	0,361	0,10 [0,04; 0,10]	0,10 [0,10; 0,10]	0,394	ns
Базофилы, %	Манна-Уитни	0,015	0,50 [0,38; 0,62]	0,70 [0,50; 0,80]	0,037	*

Данные представлены в виде M ± SD (среднее ± стандартное отклонение) для t-критерия Стьюдента и Me [Q1; Q3] (медиана и межквартильный размах) для критерия Манна-Уитни; padj – *p*-value с поправкой Бенджамини-Хохберга

Таблица Н.2 – Результаты межгруппового сравнения по данным проточной цитометрии

Параметр	**Критерий сравнения**	***p*-value**	**Молодые**	**Пожилые**	**padj**	**Значимость**
В-клетки, на 100 тыс. лейкоцитов	Манна-Уитни	0,003	14 662,50 [7 371,50; 18 905,50]	6 733,00 [4 888,00; 9 174,00]	0,007	**
В-клетки, %	Манна-Уитни	<0,001	25,69 [18,46; 30,62]	13,70 [10,80; 15,20]	<0,001	***
Т-хелперы, на 100 тыс. лейкоцитов	t-критерий Стьюдента	0,475	13 420,25 ± 5 389,40	12 474,65 ± 3 418,23	0,523	ns
Т-хелперы, %	t-критерий Стьюдента	0,008	47,42 ± 9,73	38,36 ± 10,85	0,018	*
Т-киллеры, на 100 тыс. лейкоцитов	t-критерий Стьюдента	0,028	12 203,75 ± 4 595,37	16 196,88 ± 6 141,37	0,052	ns
Т-киллеры, %	t-критерий Стьюдента	0,198	43,25 ± 8,92	47,25 ± 10,42	0,273	ns
CD4+CD8+, на 100 тыс. лейкоцитов	Манна-Уитни	<0,001	940,50 [482,50; 1 298,50]	4 464,00 [3 117,00; 5 228,00]	<0,001	***
CD4+CD8+, %	Манна-Уитни	<0,001	2,88 [2,13; 4,46]	12,70 [9,35; 16,90]	<0,001	***
NK-клетки, на 100 тыс. лейкоцитов	Манна-Уитни	0,935	7 733,00 [5 453,75; 9 510,50]	8 062,00 [3 216,00; 11 432,00]	0,935	ns
NK-клетки, %	t-критерий Стьюдента	0,448	15,76 ± 7,56	18,69 ± 14,46	0,523	ns
CD4+/CD8+	t-критерий Стьюдента	0,039	1,16 ± 0,40	0,89 ± 0,42	0,062	ns

Данные представлены в виде M ± SD (среднее ± стандартное отклонение) для t-критерия Стьюдента и Me [Q1; Q3] (медиана и межквартильный размах) для критерия Манна-Уитни;
padj – *p*-value с поправкой Бенджамини-Хохберга