

*На правах рукописи*



АЛИПЕР АЛЕКСАНДР МИРОНОВИЧ

**ПОЛНОТРАНСКРИПТОМНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВАЦИИ  
СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ ПРИ СТАРЕНИИ И ДЕЙСТВИИ  
ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ,  
ПОИСК ГЕРО- И РАДИОПРОТЕКТОРОВ**

Специальность: 03.01.01 Радиобиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна».

**Научный руководитель:** Осипов Андрей Николаевич – доктор биологических наук, профессор РАН, заведующий отделом экспериментальной радиобиологии и радиационной медицины Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» ФМБА России.

**Научный консультант:** Жаворонков Александр Александрович - кандидат физико-математических наук, генеральный директор ООО «Инсилико».

**Официальные оппоненты:**

Петин Владислав Георгиевич – доктор биологических наук, профессор, заведующий отделом исследования комбинированных воздействий и биофизической лабораторией Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Васильев Станислав Анатольевич - доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории цитогенетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» Научно-исследовательский институт медицинской генетики

**Ведущая организация:**

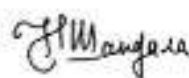
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Уральский научно-практический центр радиационной медицины» Федерального медико-биологического агентства России.

Защита диссертации состоится «27» июня 2019 года в 10 часов 00 минут на заседании Диссертационного совета Д 462.001.04 по адресу: 123182, Москва, ул. Живописная, д. 46, тел. +7(495)190-96-98.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» Федерального медико-биологического агентства России.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_ 2019 года.

Ученый секретарь Диссертационного совета  
Д 462.001.04, доктор медицинских наук



Н.К.Шандала

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### *Актуальность темы исследования и степень разработанности темы*

Влияние ионизирующего излучения (ИИ) на продолжительность жизни активно изучалось с конца 1940-х годов до 1960-х годов. Например, в работе Upton с соавт. исследовалось ускоренное старение и сокращение продолжительности жизни у мышей, облученных нелетальной дозой гамма-лучей в результате ядерных взрывов. Главный вопрос, которым задавались авторы: каковы биологические основы влияния радиации на продолжительность жизни? Однако в то время ответить на него было сложно из-за нехватки доказательств связи радиации и старения: ИИ в основном вызывает повреждения генетического аппарата, влияет на активно делящиеся клетки, и индуцирует развитие злокачественных новообразований.

Какова цель изучения взаимосвязи эффектов облучения и процессов старения? Во-первых, эпидемиологические исследования людей, выживших после облучения в результате взрыва атомной бомбы, показало, что отдаленные последствия воздействия ИИ могут быть связаны с ускоренным развитием возраст-зависимых заболеваний. Во-вторых, в настоящее время были достигнуты успехи в понимании молекулярных биологических механизмов, связанных с эффектами воздействия радиации на организм и старением. В-третьих, поиск эффективных геро-и/или радиопротекторов - актуальная задача, ввиду схожести процессов старения и последствий облучения.

На данный момент существует несколько основных эволюционных гипотез старения:

а) накопление вредных соматических мутаций в неделящихся клетках и снижение способности к репарации ДНК;

б) антагонистическая плейотропия, когда в организме существуют плейотропные гены, имеющие разный эффект на выживание организмов на протяжении разных периодов жизни, то есть полезные в молодом возрасте, когда эффект естественного отбора сильный, и вредные позднее, когда эффект естественного отбора слабый;

в) одноразовая сома, предполагающая, что индивидуумы должны инвестировать жизнеобеспечение и репарацию своей сомы в соответствии со своими ожиданиями относительно будущей продолжительности жизни и возможностей для размножения.

Процессы, лежащие в основе этих гипотез и приводящие к старению, можно условно разделить на две группы: 1) накопление ошибок с течением времени; 2) программируемое угасание функций организма. И хотя сложно понять, что является причиной, а что следствием в процессе старения организма, возможные механизмы старения включают окислительный стресс, мутации в соматической ДНК и укорочение теломер.

Защита от активных форм кислорода, репарация ДНК и функциональная активность теломераз уменьшают вредный эффект от перечисленных выше процессов. Harman в 1956 году сформулировал свободно-радикальную теорию старения, а позднее связал ее с образованием активных форм кислорода (АФК) в митохондриях. Эта выдающаяся теория имеет особое значение для изучения эффектов облучения, поскольку при воздействии ИИ на клетки и организм происходит радиолиз воды с образованием свободных радикалов. Показано, что воздействие ИИ приводит к эффектам, схожим со старением, в т.ч. к соматическим мутациям, которые провоцируют разнообразные возраст-зависимые заболевания.

Анализ данных экспрессии генов является одним из наиболее всеобъемлющих подходов для определения первичного ответа клетки на стресс, в том числе и на ионизирующее излучение со

старением. Таким образом, одно из новых, стремительно развивающихся направлений современной радиобиологии - анализ изменения транскриптома и сигнала клетки в ответ на облучение. В работе исследуются механизмы старения и клеточного отклика на воздействие ИИ, исследуются основные сигнальные пути, вовлеченные в оба процесса, а также способы их подавления или активации.

### ***Цели и задачи***

Цель настоящей работы - разработать подход для поиска эффективных геро- и радиопротекторов, основанный на анализе профилей генной экспрессии клеток человека в процессе старения и в результате воздействия ИИ.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Изучить влияние процессов старения на профиль генной экспрессии клеток человека;
- 2) Изучить эффекты воздействия ИИ на профиль генной экспрессии клеток человека;
- 3) Определить и сравнить основные регуляторные сигнальные пути и ключевые гены, активируемые в процессе старения и при воздействии ИИ;
- 4) Разработать и экспериментально валидировать метод оценки потенциальной эффективности химических соединений для защиты и предотвращения последствий воздействия ИИ и процессов старения.

### ***Научная новизна и практическая значимость работы***

Настоящая диссертация посвящена исследованию процессов старения и последствий воздействия ИИ в клетках человека. Основным отличием данной работы от ранее опубликованных по сходным тематикам является использование методов полногеномного анализа данных экспрессии генов и анализа сигнальных путей. В работе рассмотрены такие процессы как влияние воздействия ИИ на здоровые клетки человека, изменение репаративной способности ДНК с возрастом, а также ускоренное старение (синдром прогерии Хатчинсона-Гилфорда (СПХГ)). Показано, что процессы старения и эффекты воздействия ИИ сходны между собой на уровне экспрессии генов и метаболических путей, следовательно, и протекторные (геро- и радио-) вещества, направленные на предотвращение или замедление процессов старения, могут иметь сходную химическую природу и функции.

Проведенные исследования по сравнению культур фибробластов, полученных от пациентов разных возрастов и больных с прогерией Хатчинсона-Гилфорда показали, что состояния активации путей передачи сигналов в клетках, полученных от молодых пациентов с СПХГ сходны с сигнальными путями, полученными от здоровых людей среднего и пожилого возраста. Таким образом были определены пути-мишени, на которые могут быть направлены новые лекарства и комбинации лекарственных средств как для лечения СПХГ, так и для предотвращения нормального старения.

Приведенный в работе биоинформатический анализ действия ИИ на клетки человека может стать основой для создания новых биоиндикаторов, чувствительных к ИИ в окружающей среде, в частности, для создания РНК-микрочипов или наборов для ПЦР. Было показано, что в ответ на воздействие ИИ активируются пути p53, ATM и MAPK, а также повышается экспрессия генов дифференцировки клеток и генов, участвующих в апоптозе и ответе на повреждение ДНК, что вызывает индукцию белков теплового шока и клеточного старения. Было впервые показано, что

профиль генной экспрессии фибробластов, облученных в дозе 2 Гр, сходен с профилем репликативно состаренных фибробластов.

В диссертации описаны две вновь созданные открытые и курируемые базы данных (БД) геропротекторов и радиопротекторов с радиомитигаторами. При поиске геропротекторов был использован новый алгоритм GeroScore, который учитывает метаболический профиль “старых” и “молодых” клеток. Результаты поиска геропротекторов были валидированы экспериментально на фибробластах человека *in vitro*. Поскольку процессы старения и последствия воздействия ИИ схожи, часть веществ из БД пересекается. Все активные молекулы классифицированы и могут быть отсортированы по химико-биологическим свойствам.

### ***Положения, выносимые на защиту***

1. Воздействие ИИ в дозе 2 Гр влияет на профиль генной экспрессии фибробластов кожи человека линии AG01522 : повышает экспрессию генов дифференцировки клеток и генов, участвующих в процессах апоптоза, ответе на повреждение ДНК и клеточного старения.
2. В процессе репликативного старения фибробластов человека экспрессия генов апоптоза, репарации ДНК испытывает устойчивую повышающую регуляцию, как и в фибробластах, облученных в дозе 2 Гр.
3. Разработанный алгоритм GeroScore позволил идентифицировать 10 веществ-геропротекторов, которые были протестированы на культурах фибробластов человека.
4. 26 радиомодификаторов вызывают существенные изменения транскриптомного профиля облученных клеток: данные гены отвечают за регуляцию клеточного цикла, ответ на внеклеточные сигналы, отрицательную регуляцию процессов жизнедеятельности клетки и ответа на внеклеточные стимулы, регуляцию программируемой клеточной смерти, в частности, апоптоза, ответ на уровень питательных веществ, клеточный ответ на стресс.
5. Вещества, обладающие геро-, радиопротекторными свойствами, часто проявляют аналогичные эффекты (например, выступают в качестве антиоксидантов), а также воздействуют на одни и те же сигнальные пути, например p53, MAPK, пути, связанные с репарацией ДНК, а также с развитием сенесцентности.

### ***Личный вклад автора и апробация результатов по теме диссертации***

Автором диссертации был проведен биоинформатический анализ образцов стареющих клеток и клеток, подвергшихся облучению. В рамках диссертации был разработан уникальный алгоритм GeroScore, а также собраны базы данных геро- и радиопротекторов.

Результаты настоящей диссертации были доложены на международных конференциях: VIII Российский симпозиум: “Биологические основы терапии онкологических и гематологических заболеваний”, Москва, 2013; Molmed-2013, Haikou, China, 2013; FEBS/EMBO Conference, Paris, 2014; MirTec Life Sciences Week, Basel, 2014, 2016; Basel Life Sciences Week, Basel, 2015, 2017, 2018; Международная конференция «Биомедицинские инновации для здорового долголетия», St. Petersburg, 2016; EMBL Stanford Conference: Personalised Health, Heidelberg, 2015; 256th ACS National Meeting & Exposition, Boston, 2018. По материалам диссертации опубликовано 6 статей в высокорейтинговых журналах, входящих в список ВАК, один патент на изобретение.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа изложена на 172 страницах машинописного текста, содержит 16 рисунков и 19 таблиц, состоит из введения, трех глав (литературный обзор, основные методы и подходы, используемые в диссертации, результаты и обсуждение), выводов, списка сокращений и списка литературы, включающего 456 источников, а также приложения.

## **ГЛАВА 1. СРАВНЕНИЕ ПРОЦЕССОВ СТАРЕНИЯ И ПОСЛЕДСТВИЙ ВОЗДЕЙСТВИЯ ИИ НА ЖИВЫЕ ОРГАНИЗМЫ - ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР**

В обзоре проводится параллель между процессами старения и процессами, происходящими в живых организмах после облучения, сравнивается действие на репаративную функцию ДНК, длину теломер, клеточные апоптоз и пролиферацию, действие АФК на биомакромолекулы клетки. Кроме этого обсуждаются заболевания, развивающиеся в процессе старения организма и в результате действия ИИ, включая развитие злокачественных опухолей и нейродегенеративных заболеваний, а также облысение, изменение кожных покровов и состояния костного мозга.

## **ГЛАВА 2. ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ И ПОДХОДЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В РАБОТЕ**

Вторая глава диссертации содержит описание основных теоретических биоинформатических методов и подходов, используемых в диссертации, а также описание баз данных и программного обеспечения, используемого автором.

Анализ многомерных биологических данных – трудоемкая задача, так как количество измерений насчитывает десятки тысяч. С помощью компьютерного анализа данных микрочипов можно выделять группы генов, которые дифференциально экспрессируются в исследуемых тканях организма, а также анализировать связи генов друг с другом используя информацию из генных сетей и сигнальных путей, представленную в базах данных и научной литературе.

Сигнальный путь - это последовательность молекул, посредством которых информация в клетке передается от клеточного рецептора внутрь клетки. Основным преимуществом алгоритмов анализа сигнальных путей является снижение размерности больших данных RNA-seq, ДНК-микрочипов, метилирования ДНК, однонуклеотидных полиморфизмов, экспрессии малых некодирующих РНК и экспрессии белков, что облегчает возможность их дальнейшей интерпретации и использования в математических моделях. При анализе сигнальных путей используется не только информация, относящаяся к списку генов в пути и корреляции между генами, а также топология сетей взаимодействия генов или их продуктов в пути с использованием алгоритма DART.

Первичная информация о сигнальных путях представляется в этом алгоритме следующим образом. Пусть  $P$  – сигнальный путь, состоящий из числа сенситизированных (апрегулированных) генов в ответ на активацию пути и числа даунрегулированных генов. Гены будем считать сенситизированными, если они имеют положительное значение изменения экспрессии, и десенситизированными (даунрегулированными), если наоборот. Это значение рассчитывается следующим образом:

$$\logfc = \frac{m \sum_{i=1}^n tumor_i}{n \sum_{j=1}^m normal_j}, \quad (1),$$

где  $tumor_i$  отвечает значению экспрессии  $i$ -го образца в экспериментальной группе, а  $normal_j$  отвечает значению экспрессии  $j$ -го образца в контрольной группе.

На вход данный алгоритм принимает данные экспрессии генов  $X$  в виде таблицы, строки в котором отвечают числу генов  $G$ , а столбцы числу образцов  $n_s$ . Входной датасет никак не связан с первичной информацией о сигнальных путях. Цель данного алгоритма – оценить значения активации сигнальных путей во всех образцах. Первым шагом в данном алгоритме является оценка первичной информации в контексте входных данных. Данный шаг включает построение сети генной коэкспрессии на основе корреляции между значениями экспрессии всех генов, входящих в сигнальный путь  $P$ . В данном алгоритме в качестве меры используется коэффициент корреляции Пирсона. Для проверки гипотезы о значимости полученных значений корреляции над коэффициентами выполняется преобразование Фишера (трансформация Фишера). После чего выводится матрица значений  $p$ -значения для каждого значения. Далее производится оценка доли ложноположительных результатов с помощью пермутаций значений генной экспрессии. Парам генов со значением корреляции, прошедшим данный порог, впоследствии назначается ребро в строящейся сети.

Далее производится оценка значимости первичной информации о пути с помощью сравнения с полученной сетью коэкспрессии. Каждому ребру сети, полученной на первом этапе назначается бинарный вес (-1, 1) в зависимости от знака значения корреляции между парой генов. Также данной паре генов назначается бинарный знак -1, если поведение генов различно в ответ на активацию/ингибирование пути, и 1, если поведение одинаково. В дальнейшем ребро считается релевантным, если знаки в обеих операциях совпадают, нерелевантные ребра удаляются. Оценка релевантности данной сети выводится как доля релевантных ребер относительно общего числа ребер.

Метрика, оценивающая активацию сигнального пути выглядит следующим образом:

$$\vec{S}_{W_{AV}} = \frac{1}{\sqrt{\sum_{i \in N} k_i^2}} \sum_{i \in N} \sigma_i k_i \vec{z}_i \quad (2),$$

где  $\vec{z}_i$  – нормализованная  $z$ -оценка профиля экспрессии генов,  $\sigma_i$  – знак активации в пути,  $k_i$  – степень вершины, соответствующей гену  $i$  в коэкспрессионной сети.

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Глава 3 содержит три раздела, каждый из которых содержит краткие аннотацию и литературный обзор, а также методы с результатами, обсуждением и заключением.

#### 3.1. Активация сигнальных путей в процессе старения: фибробласты больных прогерией Хатчинсона-Гилфорда сопоставимы с клетками здоровых людей среднего и пожилого возраста

В первой части главы 3 изучаются процессы старения на уровне транскриптома. Сравниваются фибробласты, взятые из культуры клеток, а также от пациентов разных возрастов и больных с прогерией Хатчинсона-Гилфорда (СПХГ). Результаты сравнения показали, что состояния активации путей передачи сигналов в клетках, полученных от молодых пациентов с СПХГ сходны с сигнальными путями, полученными от здоровых людей среднего и пожилого возраста. Таким образом были определены пути-мишени, на которые могут быть направлены

новые лекарства и комбинации лекарственных средств как для лечения СПХГ, так и для предотвращения нормального старения. Эти результаты важны в свете описанных выше механизмов, связанных с облученными пациентами: эффекты от ИИ и механизмы его действия на клетки аналогичны эффектам, наблюдаемым в наследуемых прогероидных синдромах, и имеют сходства с преждевременным естественным старением.

### **Результаты и обсуждение**

На первом этапе анализа задача была определить разницу в активации сигнальных путей по мере старения клеток *in vitro*. Были проанализированы различия между здоровыми фибробластами, соответствующими различным клеточным генерациям *in vitro* из набора данных (датасета) E-MTAB-2086, который содержит 3 группы репликативно стареющих фибробластов (клеточная линия IMR90): 50 генераций (4 образца), 70 генераций (3 образца) и 80 генераций (2 образца). Три образца фибробластов, которые прошли лишь через 30 циклов пересева, использовали в качестве эталона.

Использование профилей активации путей позволило охарактеризовать каждую группу клеток по отдельности на уровне сигнальных путей, а также выявить специфические особенности, отличающие каждую группу в силу ее клеточного возраста. Примерами таких путей являются апоптоз и механизмы репарации ДНК, которые испытывают устойчивую понижающую регуляцию с увеличением номера клеточного поколения. С другой стороны, основные сигнальные пути, такие как mTOR, GSK3, TGF-бета, PAK, ILK, GPCR и ERK подвержены повышающей регуляции. Также, GPCR-, эстроген- и PPAR-пути претерпевают повышающую регуляцию в группах, которые прошли 50 и 70 циклов пересева, но затем, после 80 циклов, подвергаются понижающей регуляции.

Кроме того, была замечена одинаковая незначительная понижающая регуляция FLT3-пути во всех образцах, относящихся к группам 70 и 50 циклов, но, при этом, переменный характер изменений в группе, прошедшей 80 циклов пересева, в которой в одном образце наблюдалась понижающая, а в другом – незначительная повышающая регуляция. Похожим образом, SMAD-путь претерпевает умеренную повышающую регуляцию в одном образце из группы, прошедшей 80 циклов пересева и незначительную понижающую регуляцию в другом образце.

Та же картина проявляется и в группе, прошедшей 70 циклов, где первый образец проявляет умеренную повышающую регуляцию путей, в то время как остальные три образца демонстрируют умеренную понижающую регуляцию. Тем не менее, мягкая понижающая регуляция последовательно проявляется во всех четырех образцах группы, прошедшей 50 циклов пересева. Обнаруженная переменность достаточно последовательно проявляется в профилях активации и ингибирования зависимых от возраста сигнальных путей, что указывает на наличие дополнительных сигнальных под-путей, зависящих от определенных генов и окружающей среды, которые могут различным образом интерферировать и взаимодействовать по мере увеличения клеточного возраста.

Далее были сравнены профили активации сигнальных путей в фибробластах, полученных от страдающих СПХГ пациентов, и в фибробластах, полученных от здоровых людей разного возраста (рис.1,2, табл. 1). Взятые из 7 различных общедоступных баз данных, в зависимости от возраста донора, все образцы были разделены на четыре группы: "молодая", "средняя", "пожилая" и "СПХГ".



Таблица 1. Резюме по сигнальным путям, претерпевающим значительные изменения, для исследуемых образцов фибробластов.

Метаболический путь	Изменения в активации пути с возрастом/циклом деления
Каспазный каскад	<ul style="list-style-type: none"> <li>Клетки, прошедшие дополнительные циклы деления, обладают профилем экспрессии каспаз, схожим с прогеретическими клеткам;</li> <li>В процессе старения фибробластов наблюдается понижающее регулирование каспазного каскада.</li> </ul>
EGFR путь	<ul style="list-style-type: none"> <li>Количество пройденных циклов пересева снижает САП EGFR1 пути: клетки, соответствующие более старшему возрасту, обладают профилем, близким к СПХГ клеткам; та же тенденция наблюдается и в клетках, соответствующих среднему возрасту;</li> <li>Молодые клетки обладают противоположным профилем активации.</li> </ul>
ERK путь	<ul style="list-style-type: none"> <li>Клетки от людей среднего и пожилого возраста имеют тенденцию к активации ERK пути таким же образом, как и в СПХГ клетках;</li> <li>Молодые клетки обладают противоположным профилем активации.</li> </ul>
Гормоны роста и пути, ассоциированные с медиаторами	<ul style="list-style-type: none"> <li>IGF-1 активируется в СПХГ фибробластах и стареющих клетках в обоих, «средней» и «пожилой», возрастных группах показывают аналогичную, но более слабую тенденцию к активации этого пути;</li> <li>Аналогично проявляет себя и FLT3-путь.</li> </ul>
MAPK путь	<ul style="list-style-type: none"> <li>Изменение в MAPK пути в образцах из группы «среднего возраста» и в «пожилых» образцах напоминает профиль, характеризующий клетки СПХГ;</li> <li>Молодые клетки обладают противоположным профилем активации.</li> </ul>
Митохондриальная дисфункция и связанные с ней пути	<ul style="list-style-type: none"> <li>Как «пожилые», так и «среднего возраста» группы клеток демонстрируют активацию сигнальных путей, связанных с митохондриями, также как и в прогерических клетках;</li> <li>Общее воздействие «пожилых» и «среднего возраста» клеток мешышк, чем в прогерических</li> </ul>
mTOR путь	<ul style="list-style-type: none"> <li>Подобно прогерическим клеткам, клетки, соответствующие среднему и пожилому возрасту, показывают активацию mTOR-пути;</li> <li>Уровень активации больше в «пожилых» клетках, по сравнению с клетками «среднего возраста»;</li> <li>Профиль активации в «пожилых» клетках и клетками «среднего возраста» ниже, чем в клетках СПХГ.</li> </ul>
Путь, опосредованный рецепторами, активируемыми пероксисомным пролифератором (PPAR)	<ul style="list-style-type: none"> <li>СПХГ клетки показывают положительную регуляцию пути PPAR, как и группы клеток, прошедших большое количество циклов пересева и клетки, соответствующие среднему и пожилому возрасту;</li> <li>Молодые клетки обладают меньшей силой активации.</li> </ul>
Пути, ассоциированные со SMAD	<ul style="list-style-type: none"> <li>профиль активации группы Smad белков, обладает сходством у «пожилых» и «СПХГ» клеток;</li> <li>в клетках «среднего возраста», активация выражена слабее, и заметно отличается от профиля для молодых клеток.</li> </ul>
TGF- $\beta$ -ассоциированный путь	<ul style="list-style-type: none"> <li>Изменение в TGF-<math>\beta</math> пути в «пожилых» клетках напоминает изменения в прогерических клетках.</li> </ul>
Транскрипция и связанные с ней пути	<ul style="list-style-type: none"> <li>Для клеток, соответствующих «среднему» и «пожилому» возрасту, а также в клетках «СПХГ» наблюдается понижающая регуляция.</li> </ul>

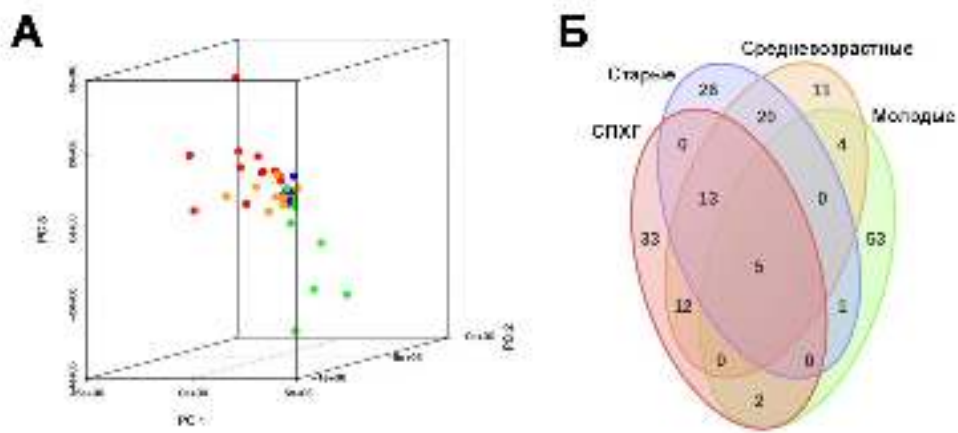


Рисунок 1. А. Значения САП для всех образцов были преобразованы в значения трех основных компонент, используя метод основных компонент (РСА). Образцы, относящиеся к «молодой», «средней» («средневозрастные»), «пожилой» и «СПХГ» группам, показаны зеленым, желтым, синим и красным цветом, соответственно. Б. Диаграмма Венна, показывающая число одинаково регулируемых (положительно и отрицательно) сигнальных путей между «молодой», «средней» и «пожилой», «СПХГ» группами. Сходство между распределениями значений САП различных сигнальных путей для двух данных групп определялось по t-критерию, для сравнения трех и четырех групп – используя F-тест.

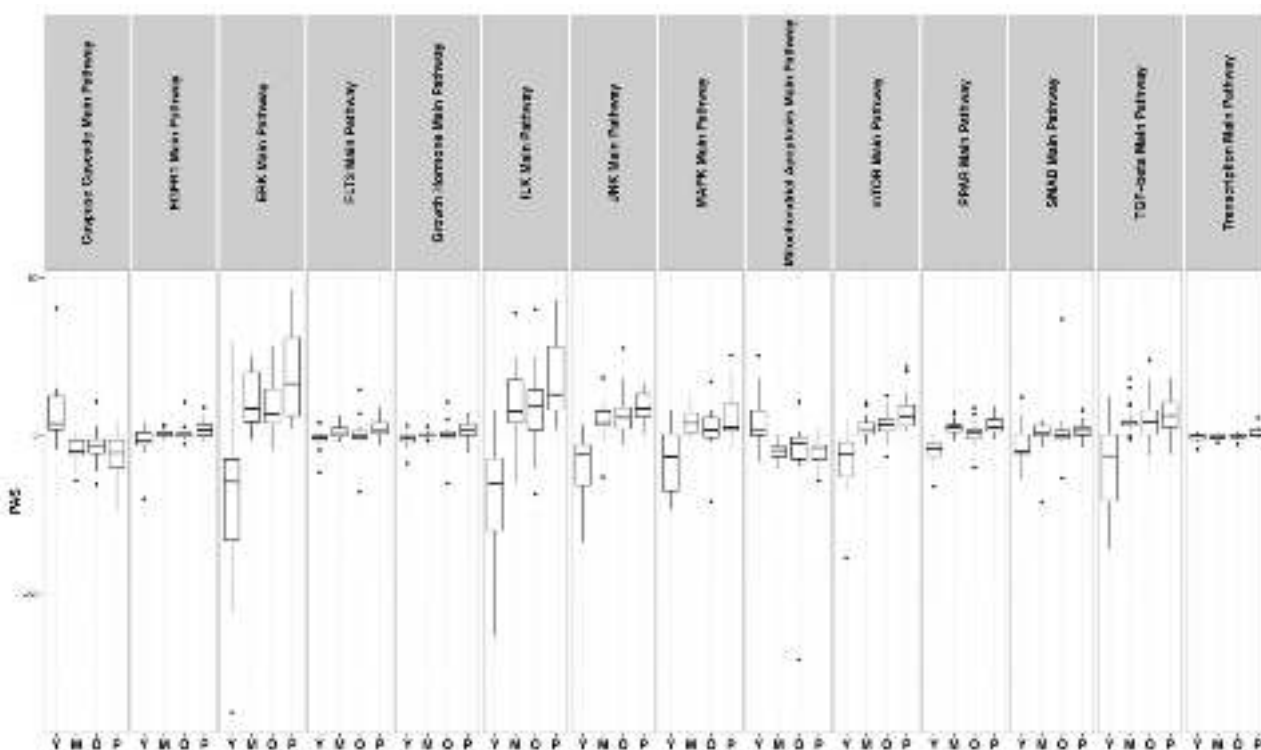


Рисунок 2. Распределение значений САП для 14 различных сигнальных путей в «Молодой» (Y), «Средней» (M), «Пожилой» (O) и «СПХГ» (P) группе.

Значения силы активации пути (САП) были получены для каждого образца каждой группы. Резюме по сигнальным путям, претерпевающим значительные изменения представлено в таблице 1 и рис. 2.

Анализ корреляций по Пирсону демонстрирует явное сходство между "СПХГ", "средней" и "пожилой" группами. Помимо нескольких выпадающих точек, образцы из этих трех групп плотно сгруппированы и положительно коррелируют друг с другом. С другой стороны, образцы из "молодой" группы показывают отрицательную корреляцию с тремя другими группами.

Анализ главных компонент также показывает, что "СПХГ", "средняя" и "пожилая" группы явным образом выделяются, хотя образцы группы "СПХГ" более вариабельны и в каком-то смысле они ближе к «средней» группе (см. рис. 1). Полученные из разных баз данных образцы, относящиеся к "пожилой" группе, образуют очень компактный кластер. В отличие от них, одна третья часть образцов из «молодой» группы обладают высокой изменчивостью САП и группируются отдельно от других образцов. Сходство распределений значений САП различных сигнальных путей для данных групп были вычислены с использованием t-теста для попарного сравнения и F-теста для сравнения трех и четырех групп. В соответствии с предыдущими выводами в "СПХГ", "средней" и "пожилой" группах 13 сигнальных путей имеют сходный характер активации. Среди них AR, IGF1R, HGF, HIF1A, IP3, PAK, SMAD, TNF и TGF-бета пути подвержены повышающей регуляции, тогда как путь митохондриального апоптоза ингибируется.

Попарное сравнение "СПХГ" и "средней" групп позволило дополнительно обнаружить еще 12 одинаковым образом активированных пути, еще раз указывая на близость этих двух групп на уровне сигнала. С другой стороны, большинство сигнальных путей в «молодой» группе не активируется аналогичным образом по сравнению с остальными исследованными группами. Следует отметить, что 5 сигнальных путей, в основном, связанные с репарацией ДНК, демонстрируют схожий профиль незначительной активации, колеблющийся около нуля, во всех четырех исследованных группах.

Анализ данных ясно показывает, что процесс старения и патофизиология синдрома преждевременного старения СПХГ являются биологическими процессами, которые регулируются через схожие сигнальные пути (см. рис. 2); оба процесса обладают сложными механизмами контроля, которые, несмотря на различия, связаны между собой. С возрастом проявляются изменения, связанные с репарацией ДНК и организацией хроматина. Основные результаты представлены в таблице 1.

### ***Заключение***

Обнаруженные изменения в различных сигнальных путях находятся в соответствии с ранее охарактеризованными изменениями экспрессии генов в различных клеточных линиях, первичных клеточных культурах, полученных от пациентов с СПХГ, а также от здоровых людей. Приведенные данные свидетельствуют о том, что старение клеток является необходимым предварительным условием для старения на анатомическом уровне, а общий фенотип, соответствующий состарившемуся организму, является конечным результатом клеточного старения, опосредованного старением на уровне тканей. Аналогичным образом анализ изменений сигнальных путей в фибробластах, полученных от больных СПХГ в сравнении со здоровыми фибробластами, представляющими две различные возрастные группы, указывает на более высокий уровень изменений для каждого из рассмотренных путей в СПХГ клетках. На основании

этих наблюдений можно сделать вывод о том, что СПХГ на самом деле представляет собой ускоренное старение.

Так как все подобные СПХГ болезни являются моногенными, то представляется возможным обнаружить общие пути, которые, наряду с факторами окружающей среды, вызывают универсальные фенотипы старения в результате постепенного нарушения регуляции по мере старения. Для многих препаратов известны их эффекты на уровни экспрессии генов в различных клетках и тканях, и эта информация может быть использована для *in silico* скрининга потенциальных геропротекторов и их комбинаций. Настоящее исследование также подкрепляет гипотезу о том, что рапамицин, еверолимус и их аналоги, действующие на mTOR-путь, могут выступать в качестве геропротекторов, эффективных как при СПХГ, так и при обычном старении.

### **3.2. Анализ данных генной экспрессии при воздействии ионизирующего излучения в малых и больших дозах: сравнение со старением**

Во второй части 3 главы обсуждается влияние ИИ в малых и больших дозах на клетки человека. По результатам литературного и биоинформатического анализа было показано, что в ответ на воздействие малых доз ИИ активируются пути p53, ATM и MAPK, а также гены, влияющие на регуляцию клеточного цикла и синтез провоспалительных цитокинов. Излучение повышает экспрессию генов дифференцировки клеток и генов, участвующих в апоптозе и ответе на повреждение ДНК, что вызывает индукцию белков теплового шока и клеточного старения. Было показано, что клетки фибробластов, облученные более высокой дозой (2 Гр, в сравнении с дозой 5 сГр) имеют фенотип, схожий с репликативно состаренными фибробластами, причем сходство заметно уже через 3 часа после облучения. Проведенный биоинформатический анализ активируемых генов и сигнальных путей может стать основой для новых сверхточных биосенсоров, чувствительных к загрязнениям в окружающей среде, в частности, для создания чипов-биосенсоров (РНК-микрочипов) или наборов для ПЦР.

#### ***Результаты и обсуждение***

По результатам биоинформатического и литературного анализа было показано, что ИИ активирует p53, ATM и MAPK пути в ответ на стресс, регулирующие апоптоз, клеточный цикл и производство цитокинов. Излучение в малых дозах повышает экспрессию генов дифференцировки клеток и генов, участвующих в апоптозе и ответе на повреждение ДНК. Это вызывает индукцию белков теплового шока и клеточного старения.

Анализ взаимодействий между продуктами активированных радиацией генов показал, что при ИИ EGF рецептор может быть активирован с помощью белка амфирегулина. В свою очередь, рецептор EGF передает сигнал к рецепторам Fas, c-Raf-1 и ERK2. ERK2 может передавать сигнал на p53 и бета-ДНК-полимеразы посредством активации PARP-1. P53 выступает в качестве ключевого гена в этой группе. Он активирует другой транскрипционный фактор, egr1, который регулирует активность SOD1, Вах, TNF-альфа, EGFR, ERK2, EGR3 и P21. Egr1 является одним из наиболее важных элементов в сети и принимает активное участие в ответе на стресс. p53 в связке egr1 может служить спусковым механизмом в ответе на ионизирующее излучение.

Далее был проведен анализ по данным генной экспрессии фибробластов, облученных дозами 5 сГр и 2 Гр. В таблице 2 приведено количество дифференциально экспрессированных генов и метаболических путей для разных наборов данных. Сравнение результатов по анализу

дифференциальной экспрессии генов для доз 5 сГр и 2 Гр удобно приводить во временных сериях по промежутку времени после облучения (3, 6, 12 и 24 часа, см. рис. 3,4).

Таблица 2. Анализ дифференциально экспрессированных генов и метаболических путей для исследуемых наборов данных.

Исследование	Возрастные группы	Доза облучения, время после облучения	Дифференциально экспрессируемые гены, <i>p-value</i> < 0.01	Метаболические пути, <i>p-value</i> < 0.05
EMTAB2086 70 vs 30	70/30 циклов	-	1676	387
EMTAB2086 80 vs 30	80/30 циклов	-	4217	1328
GSE55118 middle vs young	30-50/<30 лет	-	603	29
GSE55118 old vs young	>50/<30 лет	-	442	24
GSE59861 12h 2Gy	-	12 ч., 2 Гр	485	24
GSE59861 12h 5cGy	-	12 ч., 5 сГр	359	11
GSE59861 24h 2Gy	-	24 ч., 2 Гр	1201	108
GSE59861 24h 5cGy	-	24 ч., 5 сГр	905	41
GSE59861 3h 2Gy	-	3 ч., 2 Гр	555	44
GSE59861 3h 5cGy	-	3 ч., 5 сГр	70	0
GSE59861 6h 2Gy	-	6 ч., 2Гр	166	2
GSE59861 6h 5cGy	-	6 ч., 5 сГр	150	4

Несмотря на то, что спустя 6 часов появляются сигналы об апоптозе и аресте клеточного цикла (рис. 3), далее, спустя 24 часа обнаруживается повышенная активация ряда сигнальных путей, связанных с синдеканами. Синдеканы опосредуют клеточную адгезию, организацию и перестройки цитоскелета, а также передачу сигнала в клетке, являясь ко-рецепторами для таких лигандов, как FGF, VEGF, TGF $\beta$  и фибронектин. В частности, синдеканы играют важную роль в ремоделировании межклеточного матрикса и заживлении ран. В согласии с этим, был также обнаружен повышенный уровень активации путей, связанных с рецепторами EGFR, VEGFR1 и VEGFR2, активация Hedgehog-пути, связанного с клеточной дифференцировкой, а также путей, связанных с положительной регуляцией клеточной адгезией и транспортом глюкозы внутрь клетки. Все это в целом свидетельствует в пользу того, что спустя 24 часа после облучения дозой в 5 сГр процессы клеточной деградации и регулируемой клеточной гибели сменяются клеточной регенерацией.

При облучении клеток фибробластов дозой в 2 Гр через 3 часа развивается классический ответ на облучение: одновременно экспрессируются белки, отвечающие за арест клеточного цикла и ДНК-репарацию. Анализ данных по путям показывает, что в ответ на облучение активируются p53-опосредованный путь в ответ на повреждение ДНК, BRCA1-опосредованный арест клеточного цикла, PI3K/Akt путь. В тоже время понижающую регуляцию испытывают пути, связанные с синдеканами и Catenin Beta 1, отвечающие за клеточную адгезию и пролиферацию.

Спустя 12 часов продолжает развиваться апоптоз. Параллельно идет процесс ответа на облучение, как и после 6 часов, активированы гены, отвечающие за репарацию двунитевых разрывов. При этом понижена экспрессия генов, отвечающих за репликацию ДНК, биосинтез белка и переход от G1 фазы клеточного цикла к S-фазе. Анализ активации сигнальных путей показал, что активированы пути Wnt/Notch, BRCA1 G1/S арест, p53-опосредованный ответ на повреждение ДНК, а также путь, отвечающий за деградацию белка AKAP1, участвующего в

регуляции активности протеинкиназы A и ее распределения внутри клетки. В частности, была показана роль AKAP1 в поддержании митохондриального гомеостаза и, через него, регуляции окислительного фосфорилирования и клеточного старения. При этом наблюдается понижающая регуляция развития пререпликативного комплекса через ингибирование CDC6/ORC пути. Также понижающую регуляцию претерпевают пути, отвечающие за репарацию однонитевых разрывов ДНК.

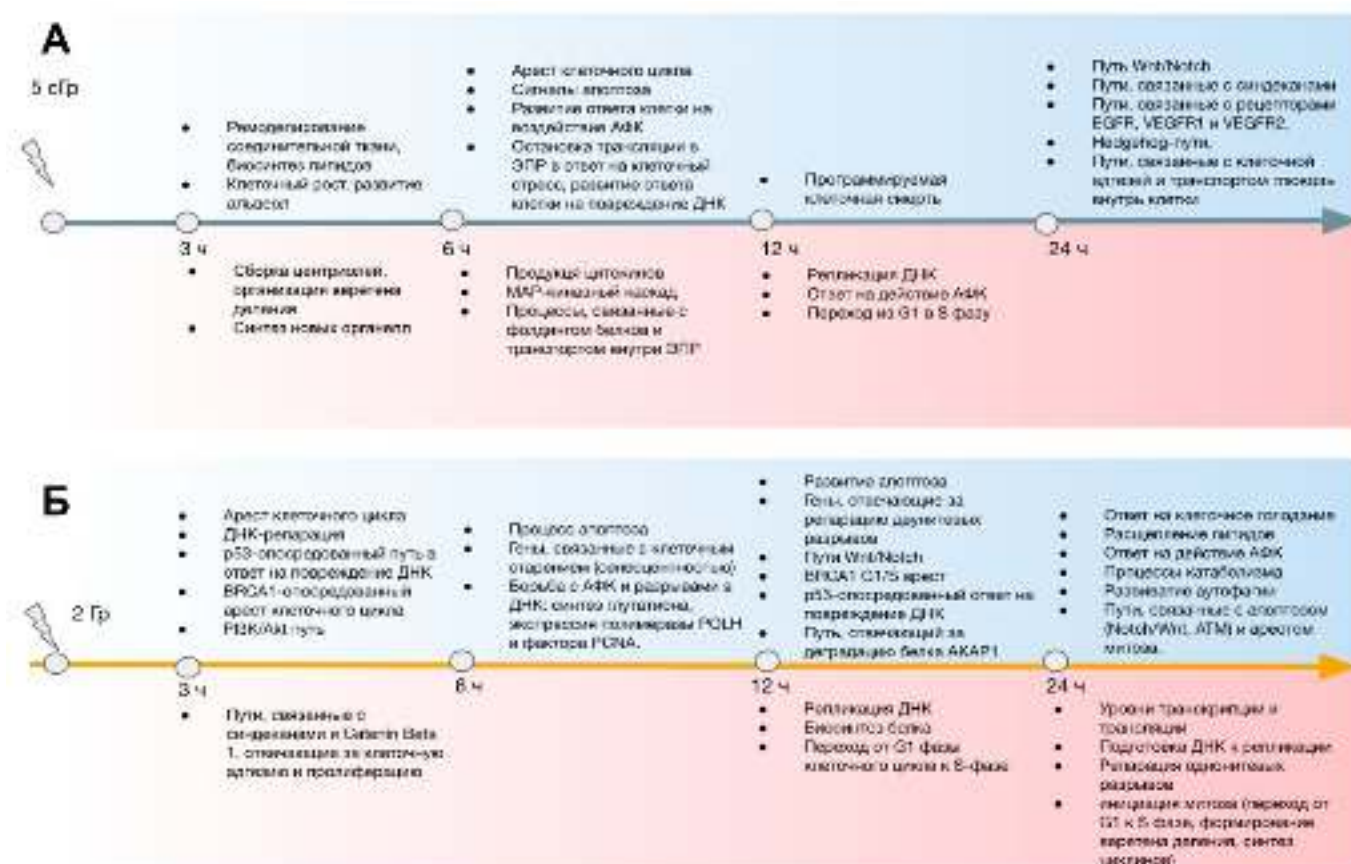


Рисунок 3. Временная шкала апрегуляции (голубой цвет) и даунрегуляции путей, участвующих в клеточном ответе на ИИ в дозе 5 cГр (А) и 2 Гр (Б).

Спустя 24 часа после облучения клеток дозой в 2 Гр развивается ответ на клеточное голодание, которое приводит к расщеплению липидов, ответ на действие АФК. В клетке развиваются процессы катаболизма, начинает развиваться аутофагия, понижаются уровни транскрипции и трансляции. На уровне сигнальных путей наблюдается также резкая (как и после 12 часов) понижающая регуляция подготовки ДНК к репликации, репарации однонитевых разрывов, инициации митоза (переход от G1 к S фазе, формирование веретена деления, синтез циклинов). В то же время сенситизированы пути, связанные с апоптозом (Notch/Wnt, ATM) и арестом митоза.

При сравнении генов, экспрессируемых в одинаковое время после облучения фибробластов двумя разными дозами можно заметить, что через 12 часов для обоих процессов наблюдается снижение активности репликации и транскрипции, и повышение активности путей p38-MAPK и Wnt, VEGF. Спустя 24 часа повышающую регуляцию имеют гены, отвечающие в основном за разложение перекиси водорода и синтез глутатиона (защита от АФК), понижающую регуляцию испытывают гены репликации ДНК, перехода клеток из фазы G1 в S и в целом генной экспрессии.

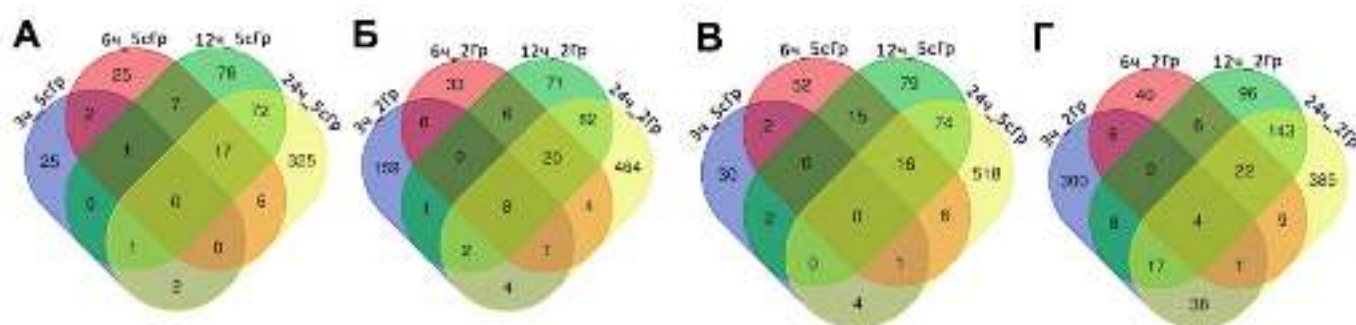


Рисунок 4. Диаграммы Венна, иллюстрирующие сравнение действия ИИ (экспрессию генов с повышенной регуляцией А, Б и с пониженной В, Г) через промежутки времени 3, 6, 12, 24 часа для доз в 5 сГр (А, В) и 2 Гр (Б, Г). Числа обозначают количество общих/уникальных дифференциально экспрессированных генов для исследованных групп.

При сравнении с датасетом по хронологическому старению фибробластов, GSE55118\_old(middle)\_vs\_young, существенных общих процессов на уровне генов выявлено не было. Анализ данных по экспрессии генов (рис. 5) в фибробластах после облучения в сравнении с датасетами по репликативному старению фибробластов выявил следующие закономерности (ниже будут описаны только те случаи, когда дифференциально экспрессированных генов было в пересечении более 10).

Через 3 часа после облучения дозой 2 Гр при сравнении с датасетами по репликативному старению EMTAB2086\_70\_vs\_30 и EMTAB2086\_80\_vs\_30 была показана повышенная регуляция генов, отвечающих за передачу сигнала о повреждении ДНК посредством p53, а также общий ответ на стресс, при этом понижающую регуляцию испытывают гены, отвечающие за митотический цикл, в то время как ген *TAOK2*, связанный с ответом на стресс, активируется.

Через 6 часов после облучения для дозы в 2 Гр при сравнении с репликативно состаренными датасетами были выявлены общие закономерности: изменение степени активности клеток из-за нехватки аминокислот, т.н. клеточное голодание, начало развития сигнала апоптоза в ответ на внешние/внутренние стимулы, сигналы о повреждении ДНК. При этом гены, обладающие пониженной экспрессией при 2 Гр - это гены, отвечающие за разрывы шивок внутри ДНК цепи и репарацию ДНК, для дозы 5 сГр понижающую регуляцию испытывают гены, отвечающие за клеточную пролиферацию.

Спустя 12 часов после облучения (2 Гр) при сравнении с репликативно состаренными фибробластами изменений (по сравнению с ответом через 6 часов) в клеточном ответе практически нет. Спустя 24 часа после облучения клеток дозой 2 Гр в сравнении с EMTAB2086\_70\_vs\_30 и EMTAB2086\_80\_vs\_30 обладают повышенной регуляцией гены, отвечающие за клеточную гибель, p53-опосредованный сигнал о повреждении ДНК, а также гены, отвечающие за развитие процессов ареста клеточного деления, и аутофагии. Понижающей регуляцией (2 Гр) обладают гены, связанные с митотическим делением клетки (включая репликацию, формирование веретена деления и т.д.), репарацией ДНК. Для меньшей дозы в 5 сГр ответ связан с развитием MAP-киназного сигнала, активацией других сигнальных каскадов, понижающая регуляция обнаружена для генов, связанных с репликацией ДНК, клеточным делением, восстановлением двуниевых разрывов ДНК.

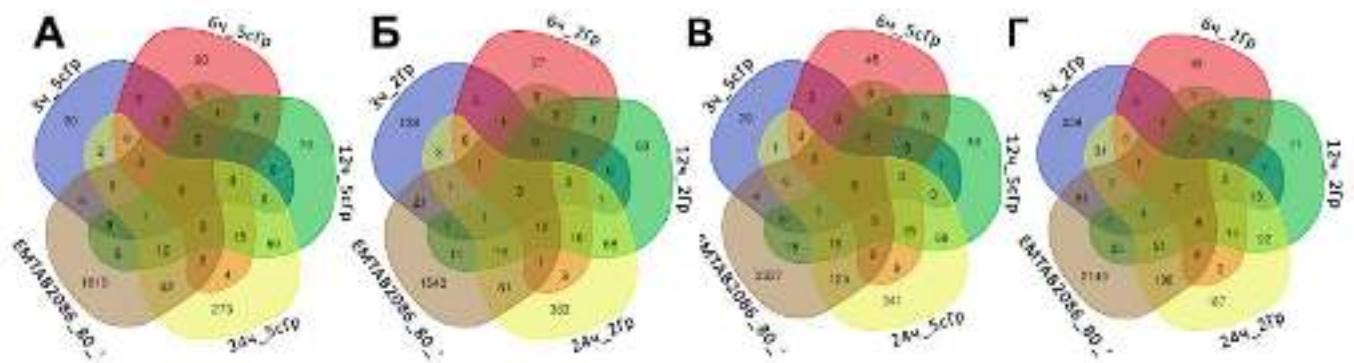


Рисунок 5. Диаграммы Венна, иллюстрирующие сравнение действия ИИ и репликативного старения, EMTAB2086\_80\_30, (на уровне экспрессии генов с повышенной регуляцией А и Б, и пониженной В и Г) через промежутки времени 3, 6, 12, 24 часа для доз в 5 сГр (А, В) и 2 Гр (Б, Г). Числа обозначают количество общих/уникальных дифференциально экспрессированных генов для исследованных групп.

Анализ сигнальных путей показал наиболее релевантные результаты при сравнении данных по дифференциальной экспрессии/активации сигнальных путей спустя 24 часа после облучения. При сравнении репликативного старения фибробластов и фибробластов после облучения дозой 5 сГр (24 часа после облучения) активируются пути, связанные с клеточным циклом и адсорбцией солей, однако после облучения дозой 2 Гр через 24 часа наблюдаются общие пути, связанные с G1/S блокировкой (арест митоза) и активация путей, связанных с ответом на повреждение ДНК (BRCA1/E2-путь).

При сравнении данных по активации сигнальных путей в фибробластах после действия ИИ с фибробластами из средневозрастной категории (GSE55118\_middle\_vs\_young) не наблюдается пересечения путей, однако при сравнении со “старыми” (GSE55118\_old\_vs\_young) фибробластами различия обнаруживаются. Понижающую регуляцию испытывают пути (при дозе 2 Гр), связанные с клеточным делением: разделения хромосом, разделения митотической centrosомы, образования веретена деления, а также транскрипции через GATA2. При дозе 5 сГр наблюдается повышенная регуляция упомянутого выше пути развития клеточной адгезии и понижающая регуляция транскрипции через GATA2.

### **Заключение**

В целом, на уровне генной экспрессии и регуляции сигнальных путей, фибробласты, облученные дозой 2 Гр, демонстрируют фенотип более схожий с репликативно состаренными фибробластами, чем облученные 5 сГр. Через 3 часа после облучения дозой 2 Гр фибробласты (в отличие от дозы 5 сГр) приобретают некоторые черты репликативно состаренных клеток (108 и 10 общих генов соответственно), а именно развивается p53-опосредованный ответ на повреждение ДНК, ответ на стресс, а также арест клеточного цикла, снижается митотическая активность клеток.

Через 6 и 12 часов фибробласты, облученные дозой 2 Гр, обнаруживают уже суммарно 186 общих со “старыми” фибробластами генов (в сравнении с 96 общими генами между “старыми” фибробластами и фибробластами, облученными дозой 5 сГр). Основные общие молекулярные функции (согласно ГО) для фибробластов, облученных дозой 2 Гр, и “старыми” фибробластами: развитие апоптоза, ответ на радиацию, повреждение ДНК, клеточное голодание, ответ на действие АФК, арест митоза, понижение уровня репликации и транскрипции. Для дозы в 5 сГр общими



молекулярными функциями по ГО в сравнении со “старыми” фибробластами является снижение пролиферативной (митотической) активности клеток.

Через 24 часа после облучения профиль генной экспрессии клеток, облученных дозой в 2 Гр, демонстрирует повышенный уровень экспрессии генов клеточной гибели, p53-опосредованного сигнала о повреждении ДНК, а также развития процессов ареста клеточного деления и аутофагии. Одновременно, пониженный уровень экспрессии обнаруживается у генов, связанных с митотическим делением клетки (включая репликацию, формирование веретена деления и т.д.), репарацией ДНК. Для меньшей дозы в 5 сГр ответ связан с развитием MAP-киназного сигнала, понижающая регуляция обнаружения для генов, связанных с репликацией ДНК, клеточным делением, восстановлением двунитевых разрывов ДНК.

Наблюдаемые закономерности изменения уровней экспрессии генов обеспечивают новое понимание механизмов повреждающего воздействия ионизирующего излучения.

### **3.3. В поисках геро- и радиопротекторов.**

#### **3.3.1. В поисках геропротекторов: *in silico* скрининг и *in vitro* проверка соединений-миметиков молодого здорового клеточного состояния на уровне сигнала**

В этой части диссертации обсуждается разработанный автором алгоритм GeroScore, который представляет собой вычислительный инструмент, помогающий предсказывать новые геропротекторы на основе существующих данных по экспрессии генов человека. GeroScore позволяет картировать различия в экспрессии между образцами от молодых и старых биологических объектов на связанные со старением сигнальные пути, а затем также осуществлять профилирование силы активации сигнальных путей для каждого из состояний. Известные вещества подвергаются скринингу и ранжируются с целью обнаружения тех соединений, которые с наибольшей вероятностью нацелены на дифференциальные пути и за счет этого имитируют "молодой" сигналом.

#### ***Результаты и обсуждение***

Вновь разработанный алгоритм GeroScore был применен к предварительно обработанным транскрипционным данным, полученным из 57 образцов гемопоэтических и мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека для того, чтобы получить список ассоциированных с возрастом сигнальных путей и отранжировать геропротекторные соединения-кандидаты.

Баллы активации сигнальных путей были рассчитаны для "старых" образцов (возраст доноров старше 60 лет) в сравнении с «молодыми» (возраст доноров от 15 до 30 лет). Далее были рассчитаны лекарственные баллы GeroScore с использованием баз данных известных геропротекторов и их мишеней. Первая десятка соединений-кандидатов, обладающих эффектами против старения, в соответствии с баллами, присвоенными GeroScore, была выбрана для дальнейшего тестирования; эти соединения приведены в таблице 3.

Далее соединения, отобранные программой, были инкубированы с нетрансформированными человеческими эмбриональными фибробластами легких на стадии старения (“старые” клетки) в концентрации 50 мкМ в течение 3-х дней. Более “молодые” (в смысле числа прошедших циклов деления) фибробласты, в состоянии, предвещающем стадию старения (“молодые” клетки), служили в качестве контроля. Условия экспериментов (клетки + соединения) были закодированы буквами от А до J (таблица 3). Из десяти перечисленных соединений, четыре были исключены из

дальнейшего анализа. НА-1004 было исключено, т.к. оказалось недоступным. Клетки с 7-циклопентил-5-(4-фенокси)-фенил-7Н-пирроло [2,3-D] пиримидин-4-иламином, стауроспорином и урсоловой кислотой погибли до начала основного эксперимента и, таким образом, также были исключены.

Таблица 3. Буквенные коды для различных экспериментов.

Клетки	Соединение (международное название/русское тривиальное название)	Код
молодые	-	Y
старые	-	O
старые	Nordihydroguaiaretic acid (NDGA)/Нордигидрогваяретовая кислота (НДГК)	A
старые	Mycicetin/Мирицетин	B
старые	НА-1004/-	C
старые	7-Cyclopentyl-5-(4-phenoxy)phenyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-ylamine/-	D
старые	Staurosporine/Стауроспорин	E
старые	Ursolic acid/Урсоловая кислота	F
старые	N-acetyl-L-cysteine (NAC)/N-ацетил-L-цистеин (НАЦ)	G
старые	Fasudil/Фасудил (НА-1077)	H
старые	PD-98059/-	I
старые	Epigallocatechin gallate (EGCG)/Галлат эпигаллокатехина	J

После 3-х дней инкубации с исследуемыми веществами, клетки были проанализированы с помощью проточного цитометра. Жизнеспособные клетки отфильтрованы в соответствии с параметрами прямого (FSC) и бокового рассеяния (SSC), а затем их концентрация, размер (FSC), зернистость (SSC) и флюоресценция (FL1) были измерены. Как видно из рис. 6А, культура фибробластов на стадии старения (состояние O) имела значительно меньше жизнеспособных клеток, чем культура более молодых фибробластов (Y). Большинство тестируемых соединений незначительно увеличивали жизнеспособность стареющих клеток, за исключением нордигидрогваяретовой кислоты (НДГК), которая снижала ее. Интересно отметить, что N-ацетил-L-цистеин (НАЦ) повысил жизнеспособность клеток почти до уровня "молодых" клеток. Как и ожидалось, клетки в стареющей культуре были, как правило, больше, чем в молодой, а также с большим разбросом размеров (см. Y и O на рис. 6).

Все тестируемые вещества снижали средний размер стареющих клеток, и большинство из них также уменьшало вариабельность размера клеток. Следует отметить, что PD-98059 и галлат эпигаллокатехина снижали средний размер стареющих клеток (SSC) значительно ниже размера клеток в контроле. Изменения в клеточной зернистости были сопоставимы с изменением размера клеток (рис. 6B), за исключением PD-98059, в случае которого имел место более сильный эффект, чем в случае галлат эпигаллокатехина (EGCG). Аутофлюоресценция стареющих клеток ведет себя аналогично клеточному размеру, за исключением того, что инкубация с фалудилом привела к неожиданно повышенной аутофлюоресценции (рис. 6Г).

Для измерения влияния соединений на клеточное старение, мы использовали традиционный способ определения клеточного старения, заключающийся в окрашивании стареющих клеток по бета-галактозидазе при pH 6. Результаты окрашивания представлены на Рис. 7А.

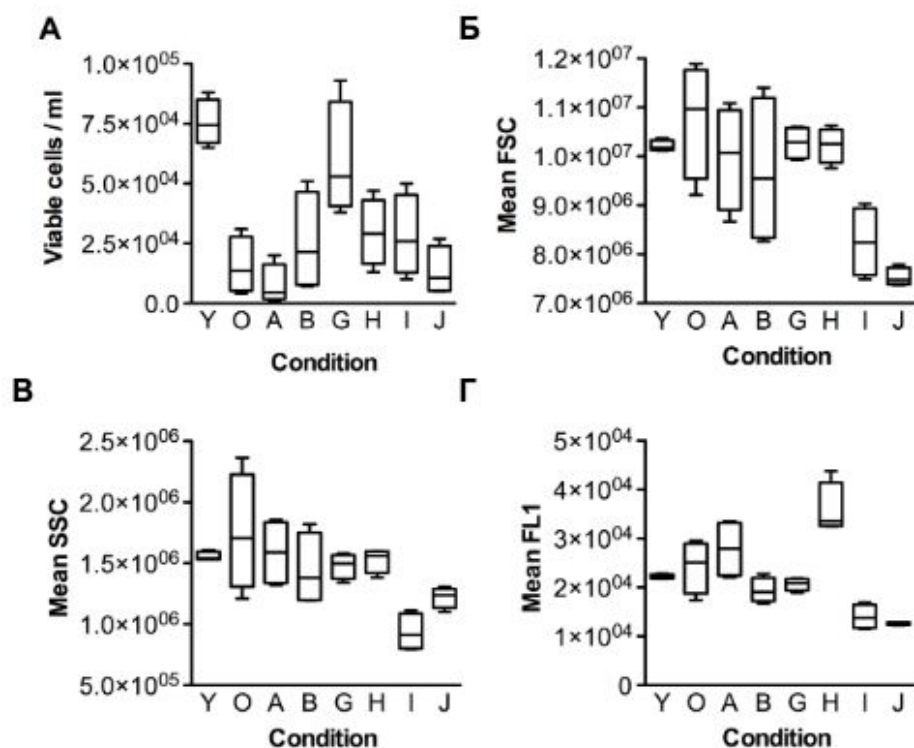


Рисунок 6. Цитометрические характеристики фибробластов, инкубированных с тестируемыми соединениями. (А) Жизнеспособность клеток, (Б) FSC (Прямое рассеяние света) - метрика для размера клеток (В) SSC (боковой рассеянный свет) - метрика зернистости, (Г) FL1 - метрика флуоресценции. Коды перечислены в таблице 3.

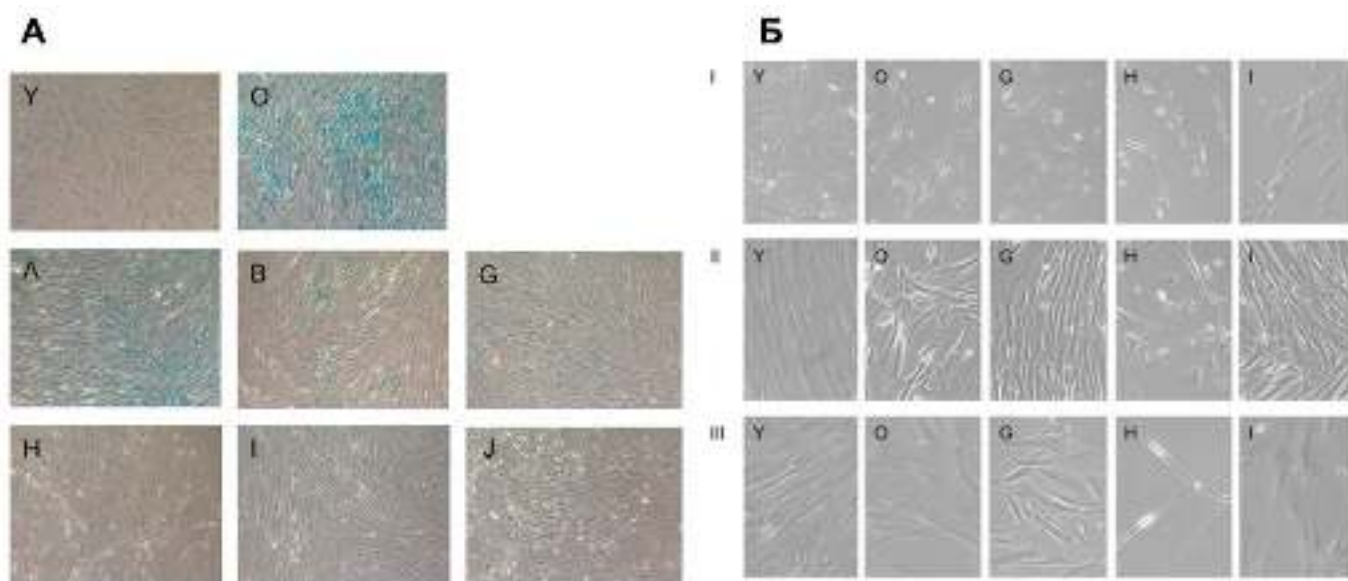


Рисунок 7. А. Окрашивание по бета-галактозидазе фибробластов после инкубации с тестируемыми соединениями. Синее окрашивание является маркером клеточного старения. Б. Долгосрочные культуры фибробластов, инкубированные с исследованными соединениями в течение дополнительных I, II и III пересевов. Изображения названы в соответствии с буквенным кодом соединения, представленным в таблице 3.

По сравнению с экспериментом О (стареющие клетки), все вещества, кроме НДГК, сильно уменьшают степень окрашивания стареющих фибробластов по бета-галактозидазе. PD-98059 имеет наиболее выраженный эффект. Интересно, что фасудил и галлат эпигаллокатехин вызывают также изменение морфологии клеток на нейроноподобную.

Для того, чтобы определить влияние исследуемых веществ на долгосрочное выживание и способность к делению стареющих фибробластов, клетки были инкубированы в течение дополнительных 3-х циклов пересева (18 дней). При каждой смене культуральной среды, тестируемые вещества добавлялись снова. Морфология и плотность клеток после 1-го, 2-го и 3-го цикла пересева можно увидеть на рисунке 6Б. Клетки в присутствии НДГК, мирицетина и галлат эпигаллокатехина погибли до 1-го цикла и не представлены.

Ко 2-ому пересеву стареющие клетки в присутствии веществ G и I делились, также как и молодые клетки (Y). В то же время, стареющие клетки в присутствии фасудила а также клетки без каких-либо добавок (O) делились плохо. Клетки в присутствии фасудила сохранили нейроноподобную морфологию. К 3-му пересеву у всех клеток замедлилась пролиферативная активность, а клетки, инкубированные в присутствии фасудила, стали нитевидными (рис. 7Б).

НДГК почти не влияет на фенотип стареющих фибробластов, но снижает как краткосрочное, так и долгосрочное выживание. Мирицетин судя по фенотипу клеток имеет небольшой омолаживающий эффект, но сильно снижает долгосрочное выживание. НАЦ дает очень мягкий омолаживающий эффект, но резко увеличивает краткосрочное и долгосрочное выживание. Фасудил также имеет очень мягкий омолаживающий эффект, но не влияет существенным образом на выживание клеток. Тем не менее, он индуцирует сильную аутофлюоресценцию и нейронную клеточную морфологию. PD-98059 обладает очень сильным омолаживающим эффектом и увеличивает как краткосрочное, так и долгосрочное выживание. И, наконец, галлат эпигаллокатехина также имеет очень сильный омолаживающий эффект, но индуцирует нейронную морфологию и резко сокращает долгосрочное выживание. В целом, эти результаты указывают на то, что PD-98059 обладает сильными омолаживающими и стимулирующими к выживанию свойствами среди всех испытанных веществ.

Для того, чтобы исследовать механизм действия этих соединений, был проведен анализ сигнальных путей. Для этого были использованы данные по транскрипционному ответу на них из базы данных LINCS1000. После обработки данных были получены оценки активации для 97 ассоциированных со старением сигнальных путей. Вещество EGCG показало сильную положительную регуляцию пути цАМФ и ингибирование митохондриального апоптоза и путей Ras. Для мирицетина была обнаружена повышающая регуляция путей ILK, репарации ДНК, цАМФ путей и пути гипоксии. С другой стороны, это соединение подавляло PAK, IL-6, MAPK пути, путь клеточного старения, p38, mTOR и ряд хемокиновых путей. NAC сильно ингибирует про-пролиферативных пути, такие как MAPK, AKT, p38 RAS, PAK, ERK и активирует p53 EGFR1, SMAD и каспазный пути. Наилучшим геропротектором с точки зрения увеличения жизнеспособности и омоложения был PD-98059, высоко селективный ингибитор MEK1 и MAP-киназного каскадов. Помимо PD-98059, большинство из изученных геропротекторов действовали на жизнеспособность клеток либо на их старение. Наиболее значимые эффекты потенциальной синергии наблюдались для НАЦ, мирицетина и галлата эпигаллокатехина.

EGCG является известным флавоноидным антиоксидантом с противораковой и антидиабетической активностью. На уровне сигнала он показывает сильную активацию цАМФ

пути, для которого недавно была показан “омолаживающий” эффект, сходный с эффектами ограничения калорийности через повышающую регуляцию сиртуинов. В настоящей работе показано, что галлат эпигаллокатехина уменьшает размеры клеток, зернистость и флуоресценцию репликативно стареющих фибробластов.

НАЦ, как известно, защищает клетки от стресса и подавляет воспаление через подавление NF- $\kappa$ B, COX-2 и ряда провоспалительных цитокиновых путей. Геропротекторное действие НАЦ, предсказанное и обнаруженное в работе, согласуется с несколькими другими исследованиями, показавшими его положительный эффект при старении на других клеточных моделях индуцированного старения. Анализ сигнальных путей, подтвердил его антисенесцентные свойства, т.к. он ингибирует про-пролиферативную сигнализацию: MAPK, p38, AKT, PAK, ERK. Среди тестируемых соединений НАЦ имеет наилучшие показатели с точки зрения жизнеспособности клеток, достигающей значений, характерных для молодых фибробластов.

Естественный флавоноид мирицетин считается очень сильным антиоксидантом, противовоспалительным и противоопухолевым агентом. Он непосредственно взаимодействует с тирозинкиназными рецепторами, в частности JAK1, он влияет на инсулиновый рецептор, сигнализацию через EGFR и AR. В настоящей работе впервые показаны геропротекторные свойства мирицетина на репликативно стареющие клетки человека. Было показано, что на уровне путей он сильно ингибирует Pак, MAPK, MPM, путь клеточного старения и ряд хемокиновых путей. Активация PAK пути была связана с преждевременным старением через вышеупомянутые p16INK4A и MAPK каскады, следовательно, его понижающая регуляция может оказаться очень полезным в геропротекторном плане. Мирицетин также активирует ILK, путь гипоксии и, подобно EGCG, цАМФ путь.

Каждое из этих трех исследованных соединений на уровне путей охватывает определенную сторону процесса старения и некоторые эффекты являются общими для соединений: галлат эпигаллокатехина и мирицетин активируют цАМФ путь; мирицетин и НАЦ ингибируют про-пролиферативную сигнализацию за счет MAPK, p38, PAK и AKT, причем эффект НАЦ на эти пути был сильнее. Сочетание этих соединений в правильной дозировке может обладать синергетическими эффектами и оказаться еще более выгодным, по сравнению с их индивидуальным использованием.

### **3.3.2. Базы данных geroprotectors.org и radioprotectors.org**

В заключительной части диссертации описаны две базы данных: geroprotectors.org и radioprotectors.org. БД содержат в себе списки веществ, способных предотвратить преждевременное старение и эффекты, связанные с ИИ. Поскольку процессы старения и ИИ схожи по транскриптомным профилям, часть веществ пересекается. Все активные молекулы классифицированы и могут быть отсортированы по свойствам: механизмы действия, токсичность, биодоступность, рекомендуемые дозы, происхождение, индикация по MESH, а также по одобрению FDA (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США).

#### ***Результаты и обсуждение***

База данных geroprotectors.org содержит результаты более чем 250 экспериментов с участием более чем 200 геропротекторных соединений. Каждое исследование было выбрано вручную из

существующей биомедицинской литературы путем поиска в БД PubMed с использованием ключевых слов, имеющих отношение к фармакологической активности в процессе старения. Затем из соответствующих источников были извлечены эффекты на продолжительность жизни и условия экспериментов (например, возраст, пол, питание, вид модельного организма). В параметр “продолжительность жизни” включали среднюю, медиану и максимальную продолжительность жизни, а также уровень снижения смертности.

Для поиска радиопротекторов и радиомитигаторов (далее - радиомодификаторов) был осуществлен поиск по соответствующим ключевым словам по базам данных Pubchem и Drugbank, а также текстовый поиск по базе Pubmed. Информация о химических и физико-химических свойствах радиомодификаторов была извлечена из базы Pubchem. В БД radioprotectors.org описано в общей сложности 150 соединений, также на сайте присутствует форма “submit” для пополнения списков вручную.

На рисунке 8 представлен визуальный обзор содержания, источников данных и возможных путей использования баз данных пользователем. Сходные архитектуры использовались для создания ресурса Radioprotectors и Geroprotectors.

Для ряда радиомодификаторов была также получена информация о пертурбациях генной экспрессии, вызванных инкубацией клеток с данными веществами. Эти данные были получены для 51 из более чем 150 обнаруженных соединений из базы данных LINCS L1000. Для некоторых соединений были доступны данные, полученные с использованием нескольких клеточных линий, в таких ситуациях предпочтение отдавалось наиболее представленной среди всех образцов клеточной линии A375 (злокачественная меланома человека). Время инкубации клеток с соединением (в концентрации 10 мкМ) для всех образцов составляло 6 часов. Дифференциально экспрессированными генами считались гены с FDR-скорректированным значением  $p < 0,05$ . Для определения молекулярных механизмов действия радиомодификаторов был также проведен анализ генной онтологии и анализ активации сигнальных путей.

Анализ главных компонент профилей генной экспрессии для этих веществ с последующей иерархической кластеризацией показал, что большая часть соединений (21 из 26) образуют один компактный кластер, что подразумевает, что они вызывают схожий клеточный ответ на транскриптомном уровне (рис. 9). Тем не менее, ряд соединений (метотрексат, трихостатин А, гликозид кверцетина, мизопростол и эллаговая кислота) выбиваются из центрального кластера (показан красным на рис. 9), что может свидетельствовать об особых молекулярных механизмах радиопротекторного действия в случае данных веществ. Например, трихостатин А - это ингибитор гистоновых ацетилаз, метотрексат - ингибитор JAK/STAT пути, кверцетин выступает в роли сенолитика в сочетании с доксорубицином, эллаговая кислота обладает множественным действием на клетку, в т.ч. антиоксидантным, а мизопростол - аналог простагландина E.

Из всех дифференциально экспрессированных генов 44 были идентифицированы для 3 и более радиомодификаторов, что позволяет говорить о схожих молекулярных механизмах их действия. Анализ генных онтологий показывает, что данные гены отвечают за регуляцию клеточного цикла, ответ на внеклеточные сигналы, отрицательную регуляцию биологических процессов и ответа на внеклеточные стимулы, регуляцию программируемой клеточной смерти, в частности, апоптоза, ответ на уровень питательных веществ и голодание, клеточный ответ на стресс. Кроме того, для 9 из этих генов была обнаружена прямая связь с радиорезистентностью на базе литературных данных.

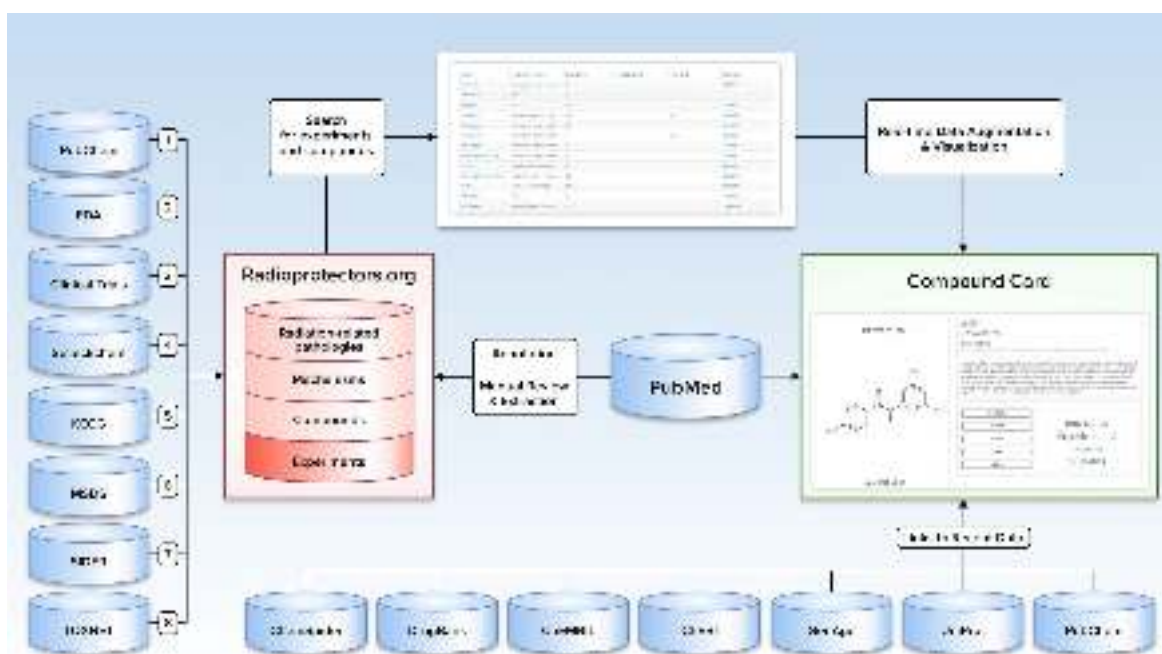


Рисунок 8. Содержание, источники данных и предполагаемый путь использования пользователем базами данных Geroprotectors.org и Radioprotectors.org.

Полученные результаты могут быть в дальнейшем использованы для предсказания новых еще не изученных в качестве радиопротекторов. Несколько веществ, такие как рапамицин, ресвератрол, куркумин и др. являются также геропротекторами. Это позволит сравнить действие веществ на уровне генной экспрессии и определять сходство механизмов действия радио- и геропротекторов на уровне сигнальных путей.

При анализе радиомодификаторов, вызывающих клеточный ответ на уровне генной экспрессии, были выявлены следующие закономерности (ниже будут учтены те вещества, у которых было обнаружено 10 и более дифференциально экспрессированных генов). Вещество карбонилцианид *m*-хлорфенил гидразон (СССР) является ингибитором окислительного фосфорилирования и вызывает у клеток ответ на стресс, а также индуцирует апоптоз. Трихостатин А, грибковый антибиотик, ингибитор клеточного деления и активатор апоптоза, также вызывает ответ на окислительный стресс и индуцирует аутофагию клетки. Pentoxifylline, ингибитор фосфодиэстеразы, на клеточном уровне вызывает замедление работы транскрипционных факторов и способствует замедлению процессов клеточного роста и развитию апоптотических процессов. Quercetin-3-O-Glucoside запускает анаболические процессы в клетке, транскрипцию, синтез АТФ и процессы репликации ДНК, при этом подавляются процессы, связанные с развитием сенесцентности. 16,16-dimethyl prostaglandin E2, ингибитор 15-гидрокси-PGDH, вызывает в клетках торможение пролиферативной активности. Cyclosporin A, иммуносупрессор, подавляет пролиферацию и процессы, связанные с митозом (организация веретена деления, репликацию и пр.). Rapamycin, также иммуносупрессор, ингибитор mTOR, как и циклоспорин А, вызывает арест клеточного цикла и торможение перехода клетки G1/S. Curcumin, природный антибиотик, ингибирует клеточное деление клеток меланомы, запускает процессы катаболизма. Ellagic acid, антиоксидант, вызывает реорганизацию актинового цитоскелета, активирует гены, связанные с

ответом на радиацию, в т.ч. и клеточного ареста, и ингибирует работу РНК-полимераз. Kanamycin, антибиотик, связывается с 30S субъединицей рибосомы, вызывает развитие сигнала TLR-рецепторов, апоптотического процесса, ответ на окислительный стресс. Misoprostol, синтетическое производное простагландина E1, вызывает активацию генов апоптоза. Morin, антиоксидант, влияет на процессы транскрипции, ответа клетки на внешние стимулы и провоцирует развитие катаболических процессов в клетке. Таким образом, большинство исследованных препаратов, продемонстрировавших радиомодификаторные свойства, являются индукторами апоптоза, могут приводить к развитию аутофагии и активировать гены, связанные с ответом клетки на внешние стимулы, продукцию АФК и катаболическими процессами в клетках.

Отечественные радиопротекторные препараты включают в себя ряд веществ (рассматриваются исключительно малые молекулы), для которых хоть и не получен профиль генной экспрессии, но известен механизм действия. Индралин, применяющийся при высоких дозах облучения, альфа-адреномиметик, вызывает спазм сосудов и циркуляторные изменения кровоснабжения в радиочувствительных органах и тканях, в результате чего развивается гипоксия, определяющая защиту этих тканей. Рибоксин, антиоксидант, применяющийся при низких дозах, активатор метаболизма и обновления тканей, его механизм действия схож с Quercetin-3-O-Glucoside. Аналогичным действием обладает дезоксинат, стимулирующий пролиферацию клеток, особенно лейкопоз и уменьшающий выраженность местных воспалительных реакций, активируя рост грануляций и эпителия.

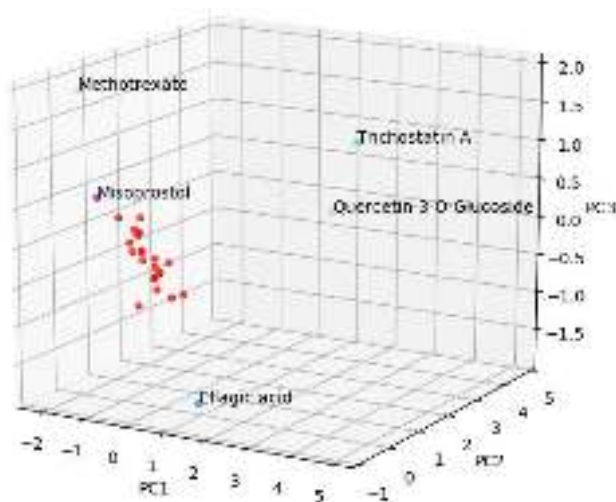


Рисунок 9. Проекция профилей генной экспрессии 26 радиомодификаторов, вызывающих клеточный ответ на транскриптомном уровне, на три первые главные компоненты.

Таким образом, на основании вышеописанных результатов анализа литературы и данных по анализу генной экспрессии, можно заключить, что радиомодификаторы, действующие сразу после облучения, должны стимулировать апоптоз в клетках, в которых нарушена структура ДНК, присутствует ответ на внешние абиотические стимулы, развиваются катаболические процессы вследствие облучения. Кроме того, препараты, приводящие к гипоксии в организме (радиопротекторы) способствуют угнетению митоза новых мутировавших клеток, которые могут спровоцировать развитие онкозаболеваний, а также к снижению концентрации АФК. Препараты, применяющиеся после облучения направлены на поддержание нормальной функции организма: обновление клеток, препятствие к развитию фиброза.



Для части соединений из БД Geroprotectors была показана радиопротекторная активность. Функциональное сходство между геропротекторами и радиопротекторами обусловлено, по крайней мере, частично, аналогичной природой негативных воздействий на ДНК. Повреждения генетического материала плавно накапливаются в течение жизни, по мере того как убывает эффективность систем репарации и способность клеток нейтрализовать генотоксичные факторы. Гибель и сенесцентное состояние клеток, приводящие к фиброзу и хроническим воспалительным процессам, а также уменьшение количества стволовых клеток и их злокачественное перерождение в условиях генотоксического стресса - ключевые события процесса старения.

Ультрафиолетовое излучение считается одним из ключевых факторов старения кожи и индуктором вышеописанных процессов. Ионизирующее облучение в кратчайшие сроки провоцирует многочисленные и часто нерепарируемые повреждения (разрывы в обеих цепях ДНК), приводящие к массовой гибели клеток в первую очередь, с высоким пролиферативным индексом. Критическим событием является практически полное угнетение гемопоэза и истощение ниши стволовых клеток в костном мозге. Радиация вызывает развитие сенесцентного фенотипа как защитного механизма от возможной злокачественной трансформации. Таким образом, процессы старения и радиочувствительности клеток тесно связаны.

Вещества, обладающие геро- и радиопротекторными свойствами могут проявлять аналогичные эффекты (например, выступать в качестве антиоксидантов и уменьшать количество свободных радикалов, образующихся как естественным путем в процессах метаболизма клетки, так и появившихся в результате радиолиза), а также воздействовать на одни и те же сигнальные пути, активация/деактивация которых может иметь положительный эффект.

### ***Заключение***

Таким образом, в данной части исследования были продемонстрированы геро, радиопротекторные эффекты нескольких известных веществ и сформулированы новые подходы к предсказанию и открытию геро и радиопротекторов, включающие оценку и скрининг, валидацию и оценку безопасности новых геропротекторов. Предложенный подход иллюстрирует потенциальную важность анализа сигнальных путей, методов, базирующихся на САП.

По результатам проведенных исследований были созданы открытые курируемые базы данных geroprotectors.org и radioprotectors.org, содержащие актуальную информацию по веществам, применяемых в качестве геро- и радиомодификаторов. БД geroprotectors.org содержит более 250 веществ, БД radioprotectors.org содержит более 150 веществ, более 70 веществ общие в обеих БД. Вещества, которые являются общими для двух баз данных, как правило, либо антиоксиданты, либо связываются с ДНК. Структура описанных баз данных интегрирует в себе сразу несколько открытых баз данных и таким образом облегчает пользователю работу с информацией.

## ВЫВОДЫ

1. Анализ профиля генной экспрессии показал, что в ответ на воздействие ИИ в клетках человека активируются пути p53, ATM и MAPK, а также гены, влияющие на регуляцию клеточного цикла и синтез провоспалительных цитокинов. В частности, EGF передает сигнал к рецепторам Fas, c-Raf-1 и ERK2. ERK2 передает сигнал на p53 и бета-ДНК-полимеразы посредством активации PARP-1. P53 активирует транскрипционный фактор egr1, который регулирует до SOD1, Вах, TNF-альфа, EGFR, ERK2, EGR3 и P21. Таким образом, излучение повышает экспрессию генов дифференцировки клеток и генов, участвующих в апоптозе и ответе на повреждение ДНК.
2. Обнаружены изменения профиля генной экспрессии фибробластов при репликативном старении. Транскрипция генов белков, участвующих в процессах апоптоза и репарации ДНК испытывает устойчивую понижающую регуляцию с увеличением номера клеточного поколения. С другой стороны, основные сигнальные пути, такие как mTOR, GSK3, TGF-бета, PAK, ILK, GPCR и ERK подвержены повышающей регуляции. Также, GPCR-, эстроген- и PPAR-пути претерпевают повышающую регуляцию в группах, которые прошли 50 и 70 циклов пересева, но затем, после 80 циклов, подвергаются понижающей регуляции.
3. Определены основные гены и пути, которые участвуют в развитии ответа фибробластов кожи человека на облучение в больших (2 Гр) и малых (5 сГр) дозах. Сравнение с репликативно состаренными фибробластами показало, что экспрессионный профиль фибробластов, облученных в дозе 2 Гр близок к профилю “старых” фибробластов. Таким образом были определены пути-мишени, на которые могут быть направлены новые лекарства и комбинации лекарственных средств для предотвращения нормального старения и последствий воздействия ИИ.
4. Анализ дифференциально экспрессированных генов клеток линии A375, инкубированных с 51 радиомодификатором, показал, что 26 веществ вызывают изменения транскриптомного профиля облученных клеток: данные гены отвечают за регуляцию клеточного цикла, ответ на внеклеточные сигналы, отрицательную регуляцию анаболических процессов и ответа на внеклеточные стимулы, регуляцию программируемой клеточной смерти, в частности, апоптоза, ответ на изменения уровня питательных веществ, т.е. запускает клеточный ответ на стресс.
5. Создана и валидирована методика поиска эффективных геропротекторов. Разработанный алгоритм GeroScore позволил идентифицировать 10 веществ-геропротекторов, которые были протестированы. Наиболее значимые эффекты с потенциальной синергией защиты от старения наблюдались для N-ацетилцистеина, мирицетина и галлата эпигаллокатехина. По результатам проведенных исследований были созданы открытые курируемые базы данных [geroprotectors.org](http://geroprotectors.org) и [radioprotectors.org](http://radioprotectors.org), содержащие актуальную информацию по веществам, потенциально применяемых в качестве геро- и радиопротекторов.

## СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Aliper, A.M., Csoka, A.B., Buzdin, A., Jetka, T., Roumiantsev, S., Moskalev, A. and Zhavoronkov, A., 2015. Signaling pathway activation drift during aging: Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome fibroblasts are comparable to normal middle-age and old-age cells. *Aging (Albany NY)*, 7(1), pp. 26–37. IF 5.179
2. Aliper, A., Belikov, A.V., Garazha, A., Jellen, L., Artemov, A., Suntsova, M., Ivanova, A., Venkova, L., Borisov, N., Buzdin, A. and Mamoshina, P., 2016. In search for geroprotectors: in silico screening and in vitro validation of signalome-level mimetics of young healthy state. *Aging (Albany NY)*, 8(9), pp. 2127–2141. IF 5.179
3. Aliper, A.M., Bozdaganyan, M.E., Orekhov, P.S. , Zhavoronkov A., Osipov A.N., 2019, Replicative and radiation-induced aging: a comparison of gene expression profiles. *Aging (Albany NY)*, принято к печати, doi: 10.18632/aging.101921. IF 5.179
4. Moskalev, A., Shaposhnikov, M., Plyusnina, E., Plyusnin, S., Shostal, O., Aliper, A. and Zhavoronkov, A., 2014. Exhaustive data mining comparison of the effects of low doses of ionizing radiation, formaldehyde and dioxins. *BMC genomics*, 15(12), p.S5. IF 3.729.
5. Moskalev, A., Chernyagina, E., [...] Aliper, A., [...] and Bronovitsky, E., 2015. Geroprotectors.org: a new, structured and curated database of current therapeutic interventions in aging and age-related disease. *Aging (Albany NY)*, 7(9), pp. 616–628. IF 5.179
6. Cortese, F., Klokov, D., Osipov, A., Stefaniak, J., Moskalev, A., Schastnaya, J., Cantor, C., Aliper, A., Mamoshina, P., Ushakov, I. and Sapetsky, A., 2018. Vive la radiorésistance!: converging research in radiobiology and biogerontology to enhance human radioresistance for deep space exploration and colonization. *Oncotarget*, 9(18), pp. 14692–14722. IF 5.168
7. Ozerov, I., Lezhnina, K., Zavoronkovs, A., Aliper, A., Artemov, A., Borisov, N., Buzdin, A., 2017. System, method and software for robust transcriptomic data analysis Патент № US20170277826,
8. Aliper, A.M., Bozdaganyan, M.E., Sarkisova, V.A., Orekhov, P.S., Moskalev, A.A, Zhavoronkov, A.A. and Osipov A.N. Radioprotectors.org: an open database of known and predicted radioprotectors. *Aging (Albany NY)*, на рецензии.