



















doi 10.18699/vjgb-26-39

Концепция природной реконструкции генома.

Часть 5. Анализ изменения продолжительности жизни старых животных после реинфузии клеток костного мозга старых животных, обработанных hDNA^{gr} и ангиогенином рекомбинантным человеческим

В.С. Рузанова ^{1*}, Л.Ю. Гривцова^{2*}, С.Г. Ошихмина ¹, А.С. Проскурина ¹, Г.С. Риттер ¹, Е.В. Долгова ¹, С.С. Кирикович ¹, Е.В. Левитес ¹, Я.Р. Ефремов ¹, Т.Д. Дубатолова ³, М.И. Мещанинова ⁴, А.А. Мамаев⁵, О.С. Таранов ⁶, С.В. Сидоров ^{7,8}, О.Ю. Леплина ⁹, А.А. Останин ⁹, Е.Р. Черных ⁹, Н.А. Колчанов ¹, А.С. Брюховецкий^{10#}, С.С. Богачев ^{10#} 

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Национальный медицинский исследовательский центр радиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Обнинск, Россия

³ Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

⁴ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

⁵ ООО «Лаборатория Ангиофарм», Новосибирск, Россия

⁶ Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

⁷ Новосибирский национальный государственный исследовательский университет, Новосибирск, Россия

⁸ Городская клиническая больница № 1, Новосибирск, Россия

⁹ Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

¹⁰ АО Клинический госпиталь «НейроВита», Москва, Россия

 labmolbiol@mail.ru

Аннотация. Проведены две серии тестов (на мышах и крысах) по оценке продолжительности жизни старых животных, которым были реинфузированы клетки костного мозга старых животных, обработанные фрагментированной ДНК человека (hDNA^{gr}), ангиогенином рекомбинантным человеческим и двумя препаратами совместно. В качестве групп сравнения использовались животные, которым реинфузировали необработанные клетки костного мозга старых животных или клетки костного мозга от молодых особей. В случае как аутбредных мышей, так и мышей линии CBA/Lac не выявлено достоверного увеличения продолжительности жизни животных при реинфузии клеток костного мозга, обработанных препаратом hDNA^{gr}, по сравнению с группой мышей, которым реинфузировали необработанные клетки костного мозга. При использовании линии CBA/Lac мыши, которым реинфузировали клетки костного мозга, обработанные ангиогенином, на 10-й месяц после обработки одновременно пали от характерного симптомокомплекса. Патоморфологический анализ предполагает, что одновременная гибель мышей произошла в результате патологических нарушений в выделительных системах животных. Реинфузия клеток костного мозга от старых животных, обработанных ангиогенином и hDNA^{gr}, и клеток костного мозга, взятых от молодых животных, значительно увеличивает продолжительность жизни мышей в группах. Совместное применение двух активаторов, ангиогенина и hDNA^{gr}, увеличивало среднюю продолжительность жизни 30 % экспериментальных мышей до 35 мес. при 28 мес. в контроле. При использовании в качестве модельных животных крыс линии Вистар в первом эксперименте было показано достоверное увеличение жизни крыс при реинфузии клеток костного мозга старых животных, обработанных препаратом hDNA^{gr}, до 28 мес. по сравнению с группой, получавшей необработанные клетки костного мозга старых животных, где средняя продолжительность жизни крыс составила 24 мес. Во втором аналогичном эксперименте достоверной разницы в продолжительности жизни крыс для указанных двух групп показано не было. Животные, которым вводили клетки костного мозга, обработанные ангиогенином, прожили достоверно дольше, чем крысы из контрольной группы. Проведенный анализ количества теломерной ДНК в клетках костного мозга крыс экспериментальных и контрольной групп через 12 мес. после обработки свидетельствовал, что достоверного увеличения теломерной ДНК не произошло. Рассматривается молекулярная/клеточная модель старения организма, связанная с концепцией «природной реконструкции генома».

Ключевые слова: длина теломеры; продолжительность жизни; препарат двуцепочечной ДНК (hDNA^{gr}); ангиогенин рекомбинантный человеческий; патоморфологический анализ; реинфузия клеток костного мозга

Для цитирования: Рузанова В.С., Гривцова Л.Ю., Ошихмина С.Г., Проскурина А.С., Риттер Г.С., Долгова Е.В., Кирикович С.С., Левитес Е.В., Ефремов Я.Р., Дубатолова Т.Д., Мещанинова М.И., Мамаев А.Л., Таранов О.С., Сидоров С.В., Леплина О.Ю., Останин А.А., Черных Е.Р., Колчанов Н.А., Брюховецкий А.С., Богачев С.С. Концепция природной реконструкции генома. Часть 5. Анализ изменения продолжительности жизни старых животных после реинфузии клеток костного мозга старых животных, обработанных hDNA^{gr} и ангиогенином рекомбинантным человеческим. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026;30(3):345-361. doi 10.18699/vjgb-26-39

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в Институте цитологии и генетики СО РАН (государственный бюджетный проект № FWNР-2026-0025) и при поддержке И.Н. Зайцевой, А.А. Пуртова и АО Клинический госпиталь «НейроВита».



















© Рузанова В.С., Гривцова Л.Ю., Ошихмина С.Г., Проскурина А.С., Риттер Г.С., Долгова Е.В., Кирикович С.С., Левитес Е.В., Ефремов Я.Р., Дубатолова Т.Д., Мещанинова М.И., Мамаев А.Л., Таранов О.С., Сидоров С.В., Леплина О.Ю., Останин А.А., Черных Е.Р., Колчанов Н.А., Брюховецкий А.С., Богачев С.С., 2026

*, # Авторы внесли равный вклад.

Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

Concept of natural genome reconstruction.

Part 5. Analysis of changes in the lifespan of old animals after reinfusion of bone marrow cells derived from old animals and treated with hDNA^{gr} in combination with recombinant human angiogenin

V.S. Ruzanova ^{1*}, L.U. Grivtsova^{2*}, S.G. Oshikhmina ¹, A.S. Proskurina ¹, G.S. Ritter ¹, E.V. Dolgova ¹, S.S. Kirikovich ¹, E.V. Levites ¹, Y.R. Efremov ¹, T.D. Dubatolova ³, M.I. Meschaninova ⁴, A.L. Mamaev⁵, O.S. Taranov ⁶, S.V. Sidorov ^{7, 8}, O.Y. Leplina ⁹, A.A. Ostanin ⁹, E.R. Chernykh ⁹, N.A. Kolchanov ¹, A.S. Bryukhovetskiy^{10#}, S.S. Bogachev ^{1#} 

¹ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia

³ Institute of Molecular and Cellular Biology of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

⁴ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

⁵ Laboratory Angiopharm LLC, Novosibirsk, Russia

⁶ State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector" of Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

⁷ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

⁸ City Clinical Hospital No. 1, Novosibirsk, Russia

⁹ Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia

¹⁰ Clinical Hospital "NeuroVita", Moscow, Russia

 labmolbiol@mail.ru

Abstract. Two series of tests were performed, on mice and rats, to assess the lifespan of old animals reinfused with bone marrow cells from old animals treated with fragmented human DNA (hDNA^{gr}), recombinant human angiogenin, and both preparations together. Animals reinfused with untreated bone marrow cells from old animals or bone marrow cells from young animals were used as comparison groups. Using both outbred mice and CBA/Lac mice, no significant increase in the lifespan of animals reinfused with bone marrow cells treated with the hDNA^{gr} was found compared with the group of mice reinfused with untreated bone marrow cells. Using the CBA/Lac line, mice reinfused with bone marrow cells treated with angiogenin simultaneously died of the characteristic symptom complex at 10 months after treatment. Pathomorphological analysis suggests that the simultaneous death of mice occurred as a result of pathological disorders in the excretory systems of animals. Reinfusion of bone marrow cells from old animals treated with angiogenin and hDNA^{gr} and bone marrow cells taken from young animals significantly increases the lifespan of mice in groups. The combined use of two activators, angiogenin and hDNA^{gr}, increased the average lifespan of 30 % of experimental mice to 35 months compared to 28 months in the control. Using Wistar rats as model animals in the first experiment, a reliable increase in the lifespan of rats with reinfusion of bone marrow cells from old animals treated with the hDNA^{gr} preparation to 28 months was shown compared to the group that received untreated bone marrow cells from old animals, where the average lifespan of rats was 24 months. In the second similar experiment, no reliable difference in the lifespan of rats for the two groups was shown. Animals injected with bone marrow cells treated with angiogenin lived significantly longer than rats from the control group. The analysis of the amount of telomeric DNA in bone marrow cells of rats from the experimental and control groups 12 months after treatment showed that there was no significant increase in telomeric DNA. A molecular/cellular model of aging of the organism associated with the concept of "natural reconstruction of the genome" is considered.

Key words: telomere length; life expectancy; double-stranded DNA preparation (hDNA^{gr}); recombinant human angiogenin; pathomorphological analysis; reinfusion of bone marrow cells

For citation: Ruzanova V.S., Grivtsova L.U., Oshikhmina S.G., Proskurina A.S., Ritter G.S., Dolgova E.V., Kirikovich S.S., Levites E.V., Efremov Y.R., Dubatolova T.D., Meschaninova M.I., Mamaev A.L., Taranov O.S., Sidorov S.V., Leplina O.Y., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Bryukhovetskiy A.S., Bogachev S.S. Concept of natural genome reconstruction. Part 5. Analysis of changes in the lifespan of old animals after reinfusion of bone marrow cells derived from old animals and treated with hDNA^{gr} in combination with recombinant human angiogenin. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(3):345-361. doi 10.18699/vjgb-26-39

Введение

В современной биологической науке доминирует проблема старения. Это связано с тем, что основным ориентиром научной мысли и практической науки является поиск возможностей остановить прогрессивное увеличение количества людей, страдающих так называемыми болезнями цивилизации, которые сопряжены именно с этим естественным биологическим процессом.

Старение и смерть – базовые, сущностные биологические свойства, отражающие функционирование и эволю-

цию всех живых организмов, включая человека. С точки зрения термодинамики старение представляет собой переломный момент времени между способностью организма уменьшать свою энтропию, что также является базовым сущностным свойством организма, и переходом к последовательному продвижению к необратимо стационарному, т. е. мертвому состоянию, которое характеризуется максимальной энтропией (Lefever, 2018; Tlidi et al., 2018a, b). В отношении живого организма старение – это динамический патофизиологический процесс накопле-

ния изменений на разных уровнях живого, приводящий к постепенному снижению жизненной активности и, как следствие, к смерти. Скорость этого универсального необратимого (в рамках традиционного существования) процесса определяется многими внешними и внутренними факторами, в основе которых, как нам видится, лежит «генетическое старение» репаративной машины организма в виде стволовых клеток различного генеза, поддерживающих скоординированные реакции, сохраняющие постоянство внутреннего состояния организма. Все остальные патологические процессы – это следствие несостоятельности стволовых клеток поддерживать гомеостаз (Bowen, Atwood, 2004; Михеев и др., 2023).

Существует множество теорий старения, которые, как правило, объединяют в две категории: «программные» (эволюционные) теории и теории «повреждения».

Согласно программным теориям, функционирование живого организма запрограммировано природой лишь на период его активной жизнедеятельности, включающей в себя развитие, а именно рост организма, и способность к репродукции, так называемой биологической полезности, что определяется видовой популяционной целесообразностью (da Costa et al., 2016). То есть изменения, связанные со старением, подконтрольны своего рода биологическому датчику, основная функция которого состоит в том, чтобы следить за «расписанием» развития биологического организма до тех пор, пока он не достигнет половой зрелости и способности размножения (Козлов, 1999).

Теории повреждения предполагают, что старение не является неизбежным результатом жизни организма, а представляет собой следствие накопления повреждений, или случайных ошибок, в системе хранения и передачи генетической информации, компенсация которых со временем становится невозможной, что и приводит к смерти (Kirkwood, 2005; Vijg, Campisi, 2008; Gems, Partridge, 2013; Михеев и др., 2023).

Представители теорий «программированного» старения исходят из положения, согласно которому процесс старения определяется генетическими механизмами, направляющими эволюцию живой природы. Однако в процессе изменений, связанных со старением, могут действовать и другие механизмы, не включенные в генетическую программу, которые оказывают «непрограммированное» воздействие на организм, тоже приводящее к завершению жизни. Такое воздействие может происходить в результате случайного повреждения клетки, меняющего ее структуру, функцию и метаболизм (в первую очередь структуру мембран). Эти воздействия могут затронуть и генетическую информацию в виде ДНК хромосом, содержащую, как считается, программу старения, модулируя ее активацию. Кроме того, в результате нормальных метаболических процессов в клетке образуются ядовитые побочные продукты и свободные радикалы, деструктивная активность которых компенсируется дезактивирующими системами клетки. При сбое в механизмах дезактивации, аналогично с внешними воздействиями, также могут возникнуть повреждения мембран и ДНК хромосом, что тоже будет сопровождаться активацией или модуляцией механизмов старения.

Таким образом, подход, в основе которого лежит представление о старении как о процессе, запрограммированном эволюцией, и который является программой генетического кода (программируемое старение), и подход, согласно которому повреждения клеток не детерминируются генетически, но при этом или модулируют, или сами составляют механизм старения (непрограммированное старение), имеют общий биологический характер в объяснении причин инволюции, старости и окончания жизни.

В связи с вышесказанным, на наш взгляд, будет более корректным, анализируя вопросы старения организма, рассматривать не причины старения в их философском понимании, а уделить внимание изменениям в организме на уровне функций, клеток и молекулярных процессов, которые служат маркерами процесса старения (признаки старения). Каждое из этих изменений сопровождает процесс старения и является детектируемым «отражением» идущего инволюционного процесса. Мы сознательно уходим от термина «механизм старения», поскольку этот термин обозначает процесс запуска и развития событий, который определяется основополагающими причинами старения, в настоящий момент не поддающимися пониманию.

Известно много обзорных работ, классифицирующих выраженные, детектируемые признаки старения. В этих обзорах систематизированы данные, характеризующие признаки, сопровождающие старение организма. К ним относятся: нестабильность генома, истощение теломер, эпигенетические изменения, потеря протеостаза, нарушение макроаутофагии, дерегулирование восприятия питательных веществ, митохондриальная дисфункция, клеточное старение, истощение стволовых клеток, изменение межклеточной коммуникации, хроническое воспаление, дисбаланс микробиоты, нарушение нейроэндокринной регуляции. В рамках этих основных категорий находятся практически любые классифицируемые по определенному признаку молекулярные и биохимические процессы, которые затрагиваются процессами старения (Kenyon, 2010; López-Otín et al., 2013, 2023; Krauss, de Haan, 2016; Proshkina et al., 2020; Zhu et al., 2021; Михеев и др., 2023).

Одним из удивительных результатов настоящего исследования является тот факт, что фрагменты экстракционной двуцепочечной ДНК (дцДНК), доставленные в гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) естественным природным механизмом, индуцируют процессы, вследствие которых увеличивается количество теломерной ДНК без участия теломеразы и предположительно по механизму альтернативного удлинения теломер. В работе (Рузанова и др., 2025) дана характеристика структуры и функционирования теломер и охарактеризованы механизмы сохранения длины этой структуры хромосомы.

Кратко, теломеры – это участки генома на концах линейных хромосом. Теломерная ДНК позвоночных состоит из повторов TTAGGG, связанных с ними наборов белков, формирующих теломерный гетерохроматин, которые модулируют биологические функции теломеры. Терминальная часть одноцепочечной нити теломеры вместе с белками кэпинга образует комплекс, предохраняющий рекомбиногенную структуру от распознавания факторами, запускающими механизм репарации повреждения ДНК.

Общепризнано, что ДНК-полимераза в силу консервативного механизма репликации не в состоянии полностью реплицировать линейные ДНК-матрицы, что в случае с теломерами приводит к прогрессивному укорачиванию концов хромосом (Harley et al., 1990). При достижении критической длины теломеры становятся не способными связывать достаточное количество белков, что воспринимается как открытые двуцепочечные концы. Эта крайне рекомбиногенная структура запускает механизм репарации повреждения ДНК, который, в свою очередь, активирует ингибиторы циклин-зависимых киназ p21 и p16 и останавливает пролиферацию (Stein et al., 1999). Несмотря на критическое укорочение, такие теломеры сохраняют некоторое количество белков, что предотвращает слияние теломер разных хромосом, но при этом не останавливает активированный репаративный механизм. В этой ситуации пролиферативный арест становится перманентным. Иницируется и поддерживается основной триггер инволюции организма и множества возрастных заболеваний – клеточное старение-сенесценс (He, Sharpless, 2017). Одним из маркеров сенесценса являются ассоциированные с теломерами фокусы репарации повреждений, возникших в результате атаки репликативных вилок теломерной ДНК активированной молекулярной репаративной машиной.

Показано, что фокусы репарации, связанные с возникшими повреждениями, также возникают в теломерном гетерохроматине на длинных теломерах в терминально дифференцированных клетках (Di Micco et al., 2021). В этом случае механизм инициации старения неделящихся клеток может выглядеть следующим образом. В неделящихся клетках белки, связывающие теломеры, ингибируют репарацию ДНК *in cis*, что предотвращает слияние хромосом. Как следствие, нечувствительность к репарации повреждений ДНК, возникающих внутри теломерного гетерохроматина укорачивающихся хромосом неделящихся клеток, входит в конфликт с молекулярной репаративной машиной и репаративным процессом в целом, что вызывает межклеточное распространение сигнала механизма репарации повреждения ДНК и образование фокусов репарации в теломерном гетерохроматине длинных теломер терминально дифференцированных клеток. Фокусы репарации, образующиеся в теломерах таких клеток, не репарируются, накапливаются и индуцируют фенотип, подобный старению. Следуя указанной логике, стойкая активация механизма репарации повреждения ДНК является общепологающим событием как репликативного клеточного старения, вызванного критически короткими теломерами, так и состояния, подобного старению, вызванного поврежденными теломерами в нереплицирующихся клетках (Rossiello et al., 2022).

При выраженной дисфункции теломер индуцируется апоптотическая клеточная гибель или аутофагия со всеми сопровождающими эти процессы молекулярными событиями (Nassour et al., 2019). Стареющие клетки приобретают связанный со старением секреторный фенотип, секретируя набор провоспалительных цитокинов, негативно влияющий на структуру внеклеточного матрикса и жизнеспособность стволовых клеток (Tchkonia et al., 2013).

Таким образом, неспособность восстановить количество утраченного теломерного гетерохроматина является одной из причин клеточного старения и его распространения на весь организм. Конфликт нечувствительности к репарации поврежденных теломерной ДНК и репаративного механизма еще раз свидетельствует о доминирующей роли целостности ДНК хроматина в инициации процесса старения. Активация механизма репарации повреждения ДНК и накопление теломерных фокусов репарации, как предполагается, связаны и с другими процессами, ассоциированными со старением, такими как митохондриальная дисфункция, измененное восприятие питательных веществ, нарушенная аутофагия, потеря протеостаза и эпигенетическая дисрегуляция. Предлагается «теломероцентрическое» обоснование многих признаков старения (Chakravarti et al., 2021), среди которых уменьшение длины теломер – один из ключевых. Эрозия теломерного гетерохроматина является причиной многочисленных заболеваний, ассоциированных с возрастом (Rossiello et al., 2022).

В работе (Рузанова и др., 2025) показано, что при обработке ГСК в составе клеток костного мозга препаратом фрагментированной дцДНК (hDNA^{gr}) на трех модельных организмах в клетках потомков ГСК, в которые эти фрагменты интернализировались естественным природным механизмом, произошло значительное достоверное увеличение количества теломерной ДНК, ставшего соизмеримым с количеством теломерной ДНК юных животных. Также в цитируемой работе показано, что это увеличение не связано с теломеразной активностью.

В настоящем исследовании в свете «теломероцентрической» идеи процесса старения и его распространения на систему гемопозитических предшественников предложен экспериментальный подход, оценивающий связь продолжительности жизни экспериментальных животных и количества теломерной ДНК в ГСК и их потомках. Экспериментальный дизайн исследования включал реинфузию старым животным суспензии клеток костного мозга, обработанных *ex vivo* препаратами фрагментированной геномной ДНК (hDNA^{gr}), ангиогенином и двумя активаторами совместно. Ангиогенин рекомбинантный человеческий был выбран в качестве препарата сравнения, поскольку при его использовании тоже происходит увеличение количества теломерной ДНК в клетках потомков ГСК, но это увеличение, в отличие от действия препарата ДНК, связано с активацией гена теломеразы (Рузанова и др., 2025). Предполагалось, что в результате проведенных обработок будет детектироваться увеличение продолжительности жизни экспериментальных животных.

Материалы и методы

Экспериментальные животные. Для пилотных экспериментов были использованы половозрелые самцы крыс линии Wistar массой тела 400–450 г. Возраст крыс на начало работы с ними составлял 13.5 мес. В работу были также включены 18 аутбредных мышей-самок массой тела 50–60 г. Их возраст на начало экспериментов – 12 мес. Животные были получены из питомника Науч-

ного центра биомедицинских технологий ФМБА России, имеют ветеринарный сертификат. После прохождения двухнедельного карантина продолжали содержаться в виварии Медицинского радиологического научного центра им. А.Ф. Цыба, пока не достигли соответствующего возраста для проведения экспериментов. Животные находились в полипропиленовых клетках со свободным доступом к пище и воде, по 5 особей в каждой. Вся работа с лабораторными животными выполнялась в соответствии с ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики». Эвтаназию животных проводили под эфирным наркозом с последующей дислокацией шейных позвонков.

Для повторных экспериментов были использованы самцы мышей СВА/Лас в возрасте 14 мес. и самки крыс линии Wistar в возрасте 16 мес., выведенные в ЦКП «Виварий конвенциональных животных» Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия). Животных содержали группами по 6–10 мышей и по 3–4 крысы в клетке со свободным доступом к пище и воде. Все эксперименты были одобрены Комитетом по уходу и использованию животных Института цитологии и генетики СО РАН. Мышей умерщвляли методом цервикальной дислокации шейных позвонков, крыс – методом CO_2 -эвтаназии или декапитацией. Для выделения клеток костного мозга были использованы 14- и 2-месячные самцы мышей линии СВА/Лас, 15-месячные самцы и 2.5-месячная самка крыс линии Wistar.

Выделение клеток костного мозга. Для выделения костного мозга животных умерщвляли, выделяли бедренные и большеберцовые кости, отсекали эпифизы и промывали костномозговую полость DMEM+2 % FBS. Клеточную суспензию пропускали несколько раз через иглу 21-го калибра, чтобы избавиться от костномозговых розеток, фильтровали через 40 мкм. Клетки осаждали 10 мин при 400g и ресуспендировали в буфере со 130 мМ хлоридом аммония для лизиса эритроцитов на 3–5 мин. Затем буфер разбавляли в 10 раз PBS, клетки пересаждали, ресуспендировали в среде DMEM и подсчитывали в камере Горяева.

Обработка клеток костного мозга индукторами. В ходе пилотного эксперимента клетки костного мозга, выделенные из животных, инкубировали с hDNA^{gr} в течение 1 ч при комнатной температуре (20–22 °C). Количество hDNA^{gr} для экспозиции с 1×10^6 клеток костного мозга – 200 нг.

В ходе повторного эксперимента клетки костного мозга, выделенные из животных, инкубировали с индукторами в течение 1 ч в атмосфере 5 % CO_2 , влажности 95 %, 37 °C из расчета: на 3 млн клеток – 500 мкг hDNA^{gr}, либо 500 нг ангиогенина, либо 500 мкг hDNA^{gr} и 500 нг ангиогенина совместно в 1 мл среды DMEM без сыворотки.

Препарат hDNA^{gr}. Реконструктор ДНК генома человека (hDNA^{gr}) выделен из плацент здоровых женщин. ДНК была фрагментирована до 1–20 нуклеосомных мономеров (200–2000 п. н.) с помощью ультразвука, депротеинизирована с использованием протеиназы К и экстрагирована фенол-хлороформом.

Ангиогенин предоставлен ООО «Лаборатория Ангиофарм» (Новосибирск, Россия). Мечение ангиогенина Cu^{64} проводили согласно протоколу производителя, компании Lumiprobe (Германия).

Внутривенное введение препарата клеток костного мозга. В ходе пилотного эксперимента опытным мышам и крысам в хвостовую вену однократно вводили по 1×10^6 клеток костного мозга в 0.3 или 0.5 мл 0.9 % раствора хлористого натрия. Контрольным животным вводили внутривенно 0.3 и 0.5 мл 0.9 % раствора хлористого натрия соответственно.

В ходе повторного эксперимента мышам и крысам в хвостовую вену однократно вводили по 1×10^6 клеток костного мозга в 0.2 или 0.5 мл 0.9 % раствора хлористого натрия. Контрольным животным вводили по 1×10^6 необработанных клеток костного мозга, выделенных из старых и молодых животных.

Оценка влияния препарата клеток костного мозга. В течение всего исследования животных ежедневно осматривали. Отслеживали общее поведение и состояние животных. Оценивали экстерьер, который продемонстрирован на фотографиях. Измеряли массу тела. Проведены морфология спонтанно возникших опухолей и регистрация естественной гибели экспериментальных животных.

Патоморфологический анализ органов мышей. Органы и опухоли были выделены из животных и фиксированы в 4 % нейтральном параформальдегиде. Образцы органов были дегидратированы в возрастающих концентрациях этанола, осветлены в ксилоле и залиты в парафин. Парафиновые срезы толщиной до 5 мкм были окрашены гематоксилином и эозином. Визуализацию препаратов и микрофотографирование осуществляли на световом микроскопе Axio Imager ZI (Carl Zeiss Microscopy, Германия).

Приготовление мазков крови. Для приготовления мазков использовали кровь, взятую из хвостовой вены. Мазки крови фиксировали метанолом (ОАО «Вектон», Россия) в течение 6–10 мин, промывали водой, высушивали и окрашивали по Гимзе–Романовскому, pH 7.4. Препараты просматривали с помощью микроскопа Leica DV 4000V (Германия) в проходящем свете с иммерсией, увеличение $\times 100$.

Приготовление мазков костного мозга. Подготовка препаратов костного мозга проводилась либо по стандартной методике приготовления мазка с использованием небольшого количества суспензии клеток костного мозга, либо простым отпечатыванием сечения грудной кости животных. Дальнейшая подготовка препарата костного мозга была выполнена аналогично приготовлению мазков крови.

Анализ изменения количества теломерной ДНК. Для оценки теломерной ДНК использовались клетки костного мозга, выделенные из животных, обработанных индукторами, через 12 мес. после реинфузии; клетки костного мозга человека через 15 сут культивирования на метилцеллюлозе после обработки индукторами. Клетки костного мозга заливали в блоки 1 % легкоплавкой агарозы из расчета 500 тыс. клеток на один блок. До проведения анализа блоки хранили в 0.5 М ЭДТА при 4 °C. Перед электрофорезом блоки споласкивали в ТЕ-буфере и

инкубировали с лизирующим буфером (50 мМ ЭДТА, 1 % саркозил (Serva, Германия), 1 мг/мл протеиназы К (Thermo Fisher Scientific, США)) в течение 20 мин при 50 °С. Затем блоки легкоплавкой агарозы фиксировали в карманах агарозного блока и подвергали электрофоретической разгонке в системе пульс-фореза в режиме: forward – 3 с, reverse – 1 с, RAM-фактор – 0.9.

После этого ДНК переносили на мембрану Hybond N с использованием капиллярного способа в 20×SSC (Маниатис и др., 1984). Образцы ДНК прижигали к мембране в течение 10 мин под ультрафиолетовой лампой и хранили до гибридизации.

Мембрану с пришитой к ней ДНК переносили в 50 мл предгибризационного буфера, содержащего 0.1 % SDS, 5×SSC, 5× раствор Денхарда, 100 мкг/мл суммарной РНК дрожжей, и инкубировали при 37 °С в течение 1–3 ч. Меченый образец ДНК (P³² олигонуклеотид G-зонд – (TTAGGG)₉, C-зонд – (CCCTAA)₉) денатурировали кипячением 10 мин и вносили в 50 мл гибридизационного буфера, содержащего 0.1 % SDS, 5×SSC, 5 % декстран сульфат 500000, 100 мкг/мл суммарной РНК дрожжей. Предгибризационный раствор сливали и к мембране после перемешивания приливали гибридизационный буфер, содержащий меченый материал. Гибридизацию вели при 37 °С на протяжении ночи при постоянном перемешивании. После гибридизации мембрану отмывали раствором, содержащим 0.1 % SDS и 0.1×SSC, три раза по 15 мин при 37 °С. Режим гибридизации (буферная система и количество отмывок) коротких олигонуклеотидов выбран эмпирически при проведении многочисленных экспериментов с радиоактивным фосфором (Dolgoва et al., 2012). Температура гибридизации находилась в пределах 37–42 °С.

Мембрану с перенесенными на нее образцами экспонировали на экран К-типа. Сканирование радиоизотопных образцов проводили при помощи системы PharosFX. Полученные изображения анализировали в программе Quantity One с использованием параметра плотности пятен (интенсивность/мм²) или программы GEL-Pro.

Статистический анализ проводили с программным обеспечением Statistica 8 (StatSoft, США) и GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad, США). Анализ выживаемости выполняли построением кривых Каплана–Мейера с применением логрангового теста (критерий Мантеля–Кокса). Достоверность различий оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни. Выявленные различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

Результаты

Влияние реинфузии клеток костного мозга (ГСК), обработанных hDNA^{gr}, на продолжительность жизни и общее состояние экспериментальных животных

На основании модели, характеризующей изменение количества теломерной ДНК, и результатов FISH показана возможность появления генетической информации, содержащейся в экстраклеточных ДНК фрагментах, в реципиентном геноме, как предполагается, в интегрированном состоянии или в форме колец. Результаты свидетельствуют,

что произошло увеличение количества теломерной ДНК и появились многочисленные сайты на хромосомах, гибридуемые с материалом ДНК исходно внехромосомной локализации (которые, как свидетельствуют эксперименты, могут представлять собой кольца, охватывающие нить ДНК хромосом и сосуществующие в такой форме определенное время (Рузанова и др., 2025)).

Известно, что количество теломерной ДНК является одним из маркеров продолжительности жизни (Rossiello et al., 2022). Была проведена серия экспериментов по оценке продолжительности жизни экспериментальных мышей и крыс. Мы использовали ксеногенную ДНК человека, которая стойко давала увеличение количества теломерной ДНК в клетках мышей и крыс в экспериментах по клонированию, что предполагало наличие условий увеличения продолжительности жизни животных. Однако мы четко понимали, что помимо удлинения теломер могут происходить неконтролируемые взаимоотношения на уровне ДНК между человеческими ДНК фрагментами и хромосомами грызунов, что будет негативно влиять на состояние подопытных животных. Более того, в наших работах и в настоящем исследовании установлено, что только около 1 % от генома может доставляться в клетку. Это означает, что результат интернализации такой ДНК будет в высшей мере вырожденным. В разные клетки попадут различные геномные ДНК, что будет только усугублять последствия возможных неконтролируемых взаимоотношений между ксеногенной экстраклеточной ДНК человека и ДНК хромосом грызунов. В совокупности высказанные соображения предполагали непредсказуемость результатов таких обработок и возможность проявления как искомого увеличения продолжительности жизни животных, так и противоположного отрицательного результата.

Влияние реинфузии клеток костного мозга (ГСК), обработанных активаторами, на продолжительность жизни и общее состояние мышей

Для пилотного исследования влияния реинфузии клеток костного мозга (ГСК), обработанных hDNA^{gr}, на продолжительность жизни животных были отобраны девять аутбредных мышей-самок с одинаковым весом без проявления спонтанно развивающихся подкожных опухолей. Контрольной группе, состоящей из пяти особей, вводили внутривенно 0.9 % раствор натрия хлорида, а опытной, состоящей из четырех особей, – клетки костного мозга, экспонированные с hDNA^{gr}. На начало работы возраст мышей составлял 12 мес. Средняя масса тела опытных и контрольных мышей – 42.1 ± 2.4 г.

Динамика гибели экспериментальных животных отражена на рис. 1, А. Средняя продолжительность жизни мышей составила 16 мес.: в контроле – 487 ± 30 дней, в опыте – 490 ± 31 дней. В группе опытных мышей через 2 мес. после начала эксперимента наблюдался прирост массы тела, тогда как в контрольной группе наблюдали потерю в весе в среднем на 20 % (см. рис. 1, В). Физическое состояние мышей в опытной группе существенно отличалось от состояния мышей в контрольной группе (см. рис. 1, С). Контрольные мыши в терминальной

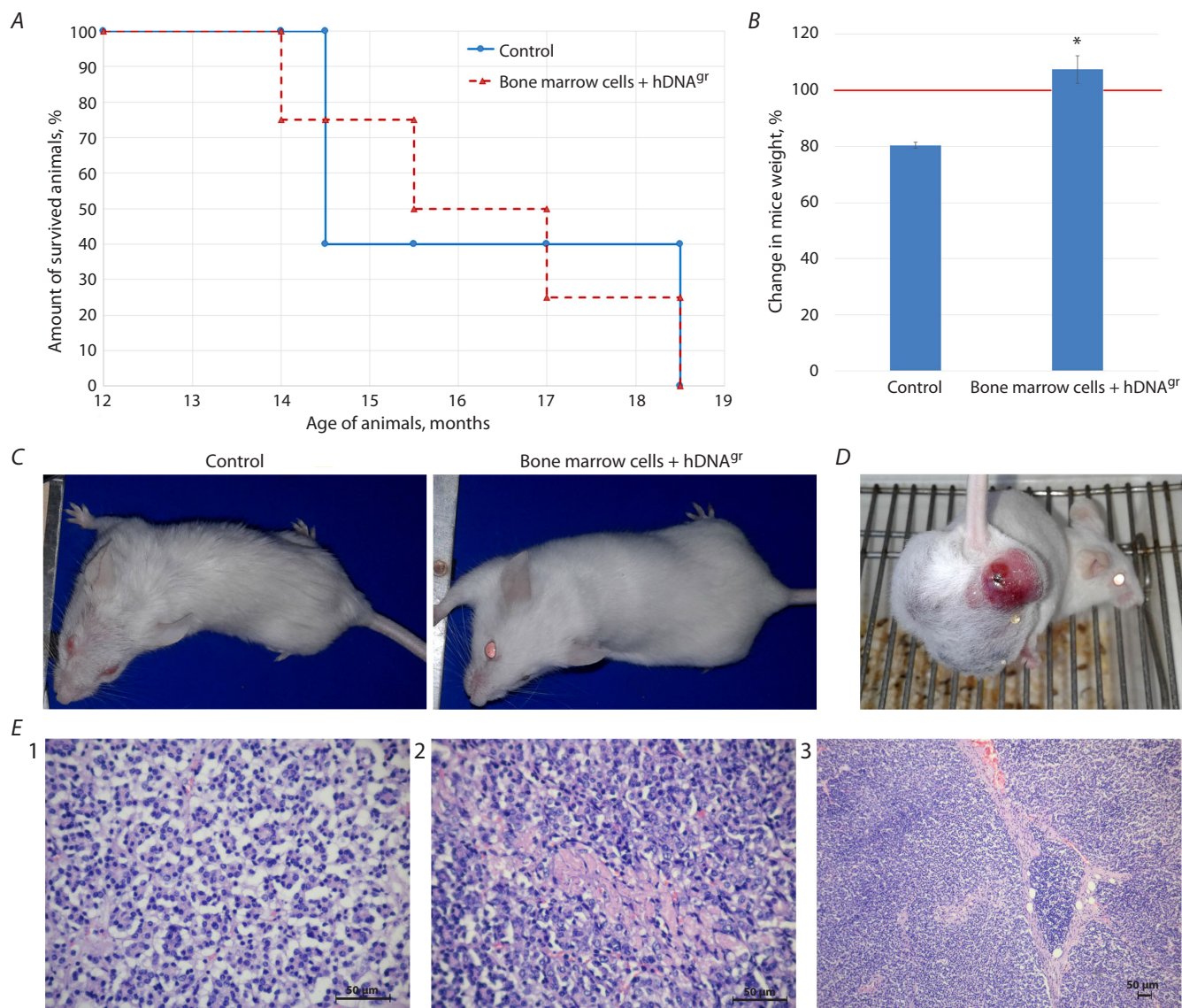


Рис. 1. Влияние hDNA^{gr} на продолжительность жизни мышей.

A – выживаемость животных; *B* – изменение массы тела мышей из контрольной и опытной групп в возрасте 14 мес. относительно исходного веса в 12 мес. в начале эксперимента, принятого за 100 % (обозначен красной линией). * Достоверные отличия по сравнению с контрольной группой, $p < 0.05$, критерий Манна–Уитни. *C* – сравнительный внешний вид особей из контрольной и опытной групп в возрасте 16 мес.; *D* – внешний вид мыши с опухолью из опытной группы в возрасте 16 мес.; *E* – патоморфологический анализ опухоли мыши из опытной группы в возрасте 16 мес.: 1 – гистоструктура карциномы молочной железы мыши, увеличение $\times 40$; 2 – микронекроз в толще паренхимы карциномы, увеличение $\times 40$; 3 – соединительнотканная септа в паренхиме карциномы, увеличение $\times 10$. Окраска гематоксилином и эозином.

стадии жизни были менее подвижны, волосяной покров неровный, с частичным отсутствием подшерстка. Мыши, которым вводили клетки костного мозга, обработанные hDNA^{gr}, сохраняли активность, пищевое поведение не отличалось от нормы, волосяной покров был ровным, с выраженным подшерстком.

В экспериментальной группе мышей у одной из особей в возрасте 16 мес. было обнаружено новообразование в виде спонтанно развивающегося опухолевого узла в районе малого таза (см. рис. 1, *D*). Опухоль была быстрорастущей и через две недели от даты обнаружения имела объем 7.5 см³. Опухоленоситель был выведен из опыта для макроскопического и морфологического исследования.

Проведенный патоморфологический анализ показал, что паренхима опухоли мыши состояла из эпителиальных клеток кубической формы с базофильной цитоплазмой, содержащих умеренно полиморфные ядра, занимающие половину клеток и содержащие хорошо выраженные ядрышки. В некоторых местах эпителий имел вид железистого с тенденцией к образованию ацинарных или папиллярных структур (см. рис. 1, *E1*). Фигуры митоза и апоптотические тельца редкие. Микронекрозы присутствуют в небольшом количестве (см. рис. 1, *E2*). Распределение эпителиальных клеток хаотичное, в отдельных местах выявлялась слабо выраженная дольчатость ткани, ограниченная тонкими соединительнотканными септами, содержащими мелкие

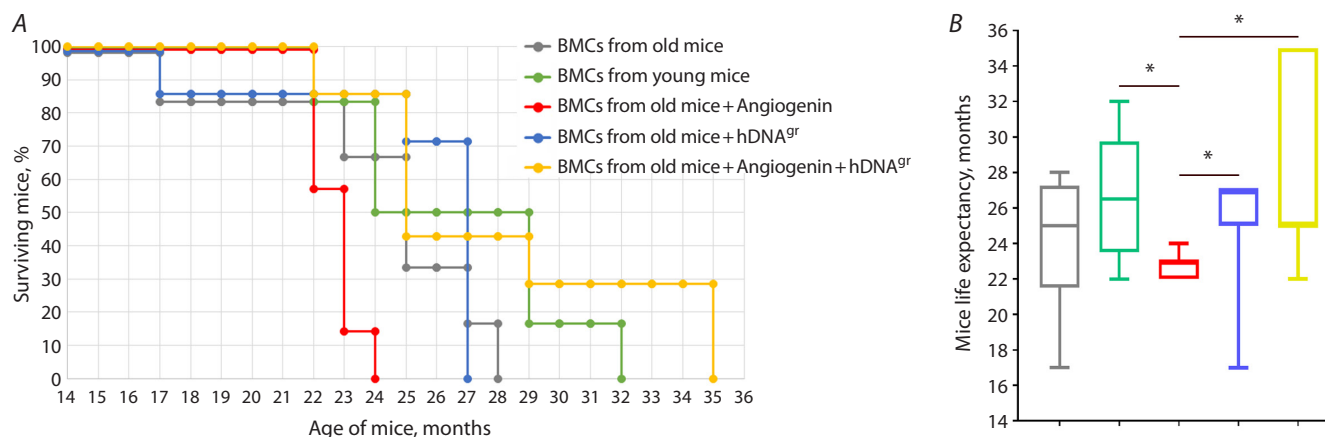


Рис. 2. Анализ продолжительности жизни экспериментальных мышей в группах.

A – кривая Каплана–Майера; B – продолжительность жизни мышей. * Достоверные отличия продолжительности жизни мышей между группами, $p < 0.05$, логранговый тест (критерий Мантеля–Кокса).

сосуды, в просвете которых находились эритроциты. Местами соединительнотканые перегородки утолщались, приобретая отростчатое строение (см. рис. 1, E3). Было сделано заключение, что произошло спонтанное развитие карциномы молочной железы.

В повторном эксперименте на мышах была выбрана линия СВА/Лас. Сформировано пять групп: 1) животные, которым вводили клетки костного мозга от старых животных; 2) животные, которым вводили клетки костного мозга от молодых животных; 3) животные, которым вводили клетки костного мозга от старых животных, обработанные ангиогенином; 4) животные, которым вводили клетки костного мозга от старых животных, обработанные hDNA^{9F}; 5) животные, которым вводили клетки костного мозга от старых животных, обработанные ангиогенином и hDNA^{9F}. Анализ продолжительности жизни мышей в группах представлен на рис. 2.

Реинфузия ГСК, обработанных hDNA^{9F}, не влияет на продолжительность жизни мышей в сравнении с группой животных, которым вводили клетки костного мозга от старых животных (см. рис. 2, B). Этот факт, как и в первом эксперименте, предполагает отсутствие влияния обработки препаратом hDNA^{9F} на продолжительность жизни мышей. У мышей, которым вводили клетки костного мозга от старых животных, обработанные ангиогенином, через 8 мес. после проведенной обработки начал стремительно развиваться симптомокомплекс, в результате которого мыши похудели до 17 г и в течение незначительного промежутка времени (1 мес.) последовательно пали (см. рис. 2).

Наибольшая продолжительность жизни была зафиксирована для групп мышей, которым вводили клетки костного мозга от молодых животных и клетки костного мозга от старых животных, обработанные ангиогенином совместно с препаратом hDNA^{9F}: до 32 и 35 мес. дожили одна и две мыши соответственно (17 и 30 % от общего количества мышей). По окончании исследования на мышинной модели были получены четыре принципиальных результата.

1. Обработка клеток костного мозга ксеногенной дцДНК (hDNA^{9F}) не влияет на продолжительность жизни мышей.

Причины, на наш взгляд, связаны со сложным, плейотропным влиянием фрагментов экзогенной гетерологичной дцДНК после ее интернализации в ГСК на основные метаболические константы, отвечающие за старение организма. Также следует учитывать тот факт, что в стволовую гемопоэтическую клетку попадает 0.1–1.0 % экстраклеточной ДНК, представляющей собой незначительную часть генома. Это означает, что всегда будет вероятность того, что в клетку не доставляется ДНК теломерных повторов или она доставляется в недостаточном для амплификации или сайт-специфической интеграции количестве.

2. Трансплантация старым животным клеток костного мозга молодых мышат приводит к существенному (до 32 мес.) увеличению продолжительности жизни мышей в группе.

3. Совместное применение двух препаратов, ангиогенина и hDNA^{9F}, интернализирующихся в ГСК (или в одну и ту же клетку, или в разные клетки, или в смешанном варианте), значительно увеличивает продолжительность жизни мышей (до 35 мес.) и превышает результаты, полученные на мышах, которым трансплантировали клетки костного мозга молодых мышат. Это свидетельствует о том, что два независимых активатора ГСК, относящихся к двум классам полимеров, синергично и положительно влияют на «основные метаболические константы» ГСК, отвечающие за старение клетки, что сопровождается увеличением продолжительности жизни экспериментальных мышей. Найденные феномены требуют дальнейшего экспериментального исследования.

4. Ангиогенин как монопрепарат инициировал у мышей развитие специфического симптомокомплекса, который послужил причиной гибели животных в группе. Для понимания произошедших событий в организме мышей при воздействии ангиогенина был проведен патоморфологический анализ (Приложения 1 и 2)¹. У одной мыши не детектировались патологические изменения в проанализированных тканях и органах. У двух других были

¹ Приложения 1–3 см. по адресу: <https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2026-30/appx20.pdf>

выявлены участки атипической ткани в печени и почках. Основные патологические нарушения были выражены в печени и почках. В печени детектировалась дистрофия гепатоцитов, сопровождавшаяся полиморфноклеточной инфильтрацией, соответствующей морфологической характеристике острого гепатита. В почках наблюдались выраженные дистрофические изменения эпителия канальцев и клубочков, что соответствует острой почечной недостаточности. Обе патологические деструкции обнаруживаются в важнейших выделительных системах организма и в принципе могли бы быть причиной гибели животных, связанной с влиянием ангиогенина. Однако патоморфологический анализ, проведенный с животным, которому вводили клетки костного мозга старых животных, показал практически аналогичные результаты. В печени и почках также выявлена атипическая ткань. В печени обнаруживаются изменения паренхимы воспалительного характера, как у мышей после обработки ангиогенином. В почках выявлены дистрофические изменения канальцев и клубочков. Это говорит о том, что все указанные изменения могут являться следствием старения животных. Для двух других групп, которым вводили клетки костного мозга молодых животных и клетки, обработанные hDNA^{gr}, показаны похожие изменения в паренхиме печени и почек, но при полном отсутствии воспаления. Этот факт также предполагает, что причиной гибели животных после обработки ангиогенином являются как обнаруженные патоморфологические деструкции в печени и почках, так и другие не выявленные причины (см. Приложение 1).

Параллельно с патоморфологическим анализом тканей и органов мышей были проанализированы кровь и костный мозг животных, выведенных из эксперимента в предсмертной стадии. Клетки костного мозга для всех экспериментальных групп находились в нормальном состоянии. Для групп, которым вводили клетки костного мозга старых животных и клетки, обработанные ангиогенином, в крови наблюдался сдвиг в сторону повышения количества лимфоцитов. В группе животных, которым вводили клетки костного мозга, обработанные ангиогенином и hDNA^{gr}, была обнаружена патологическая картина морфологии эритроцитов «ёжики», что в большей степени предполагало функциональные нарушения, приведшие к патологическому изменению формы эритроцитов (см. Приложение 2). При этом изменения не повлияли на продолжительность жизни животных в группе.

Влияние реинфузии клеток костного мозга (ГСК), обработанных активаторами, на продолжительность жизни крыс линии Вистар

В первом пилотном эксперименте (АО Клинический госпиталь «НейроВита», Москва) для исследования влияния hDNA^{gr} на продолжительность жизни крыс-самок линии Вистар было заложено 35 особей. Животных разделили на три группы: доноры костного мозга; контрольная группа, состоящей из 10 особей, которым вводили внутривенно 0.9 % раствор натрия хлорида; и опытная группа из 19 особей, которым вводили клетки костного мозга, обработанные hDNA^{gr}. На начало работы возраст крыс состав-

лял 13 мес. Средняя масса тела опытных и контрольных крыс – 460.0 ± 18.2 г.

Динамика гибели экспериментальных животных отражена на рис. 3, А. Средняя продолжительность жизни крыс популяции Вистар в контрольной группе составила 717 ± 38 дней, или 24 мес., а в группе с введением клеток костного мозга, обработанных hDNA^{gr}, – 842 ± 25 дней, или 28 мес., что было статистически значимо различимо ($p < 0.01$) (см. рис. 3, В). Средняя масса тела крыс в возрасте 24 мес. в опытной группе была достоверно выше, чем в контрольной ($p < 0.05$) (см. рис. 3, С).

Наблюдения за физическим состоянием животных на протяжении всего эксперимента показали, что опытные крысы уже в возрасте 18 мес. существенно отличались от контрольных такими показателями, как лучшее состояние кожного и волосяного покровов, повышенная двигательная активность (см. рис. 3, D). Пищевая активность у опытных крыс была выше, чем у контрольных особей. При достижении возраста 21 мес. (8 мес. после введения препарата) изменения в физическом состоянии животных становятся отчетливыми. Волосяной покров у контрольных крыс редкий, груминг нарушен, тонус мышц снижен. Опытные крысы на этом этапе были более подвижны, отличались исследовательским поведением, тонус мышц не изменен, состояние волос и кожного покрова в норме. В возрасте 25 мес. (12 мес. после введения препарата) у опытных крыс сохранены подвижность и исследовательское поведение, тонус мышц незначительно снижен, координация движения не нарушена. Отмечается незначительное выпадение подшерстка. Кожный покров чистый, груминг не нарушен. Контрольные крысы на этом этапе жизни малоподвижны, тонус мышц снижен, частично нарушена координация движения. Отмечено многочисленное выпадение волосяного покрова и нарушение груминга. Дожившая до возраста 27 мес. контрольная крыса имеет сниженную массу тела, редкий волосяной покров, малоподвижна и имеет нарушенную координацию движения. В опытной группе до этого периода дожили 11 крыс. Их масса тела незначительно снижена, волосяной покров редкий. Но крысы подвижны, координация движения не нарушена, и присутствует исследовательское поведение.

Было проведено морфологическое исследование тканей внутренних органов двух крыс после терапии клетками костного мозга, обработанными hDNA^{gr}, подвергшихся эвтаназии в возрасте 30 и 32 мес. У особи в возрасте 30 мес. детектировалось спонтанно возникшее новообразование в брюшной полости (см. рис. 3, E). При морфологическом обследовании в проекции верхнего полюса правой почки было обнаружено доброкачественное новообразование нейрального происхождения – шваннома, которое носит спорадический характер (см. рис. 3, E, F). Вторую крысу из этой же группы подвергли эвтаназии в возрасте 32 мес. Патоморфологический анализ ткани сердца, легкого, печени, почки, селезенки, головного мозга, спинного мозга и красного костного мозга свидетельствовал об отсутствии патологий.

В повторном эксперименте на крысах той же линии (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск) было сравнительно оце-

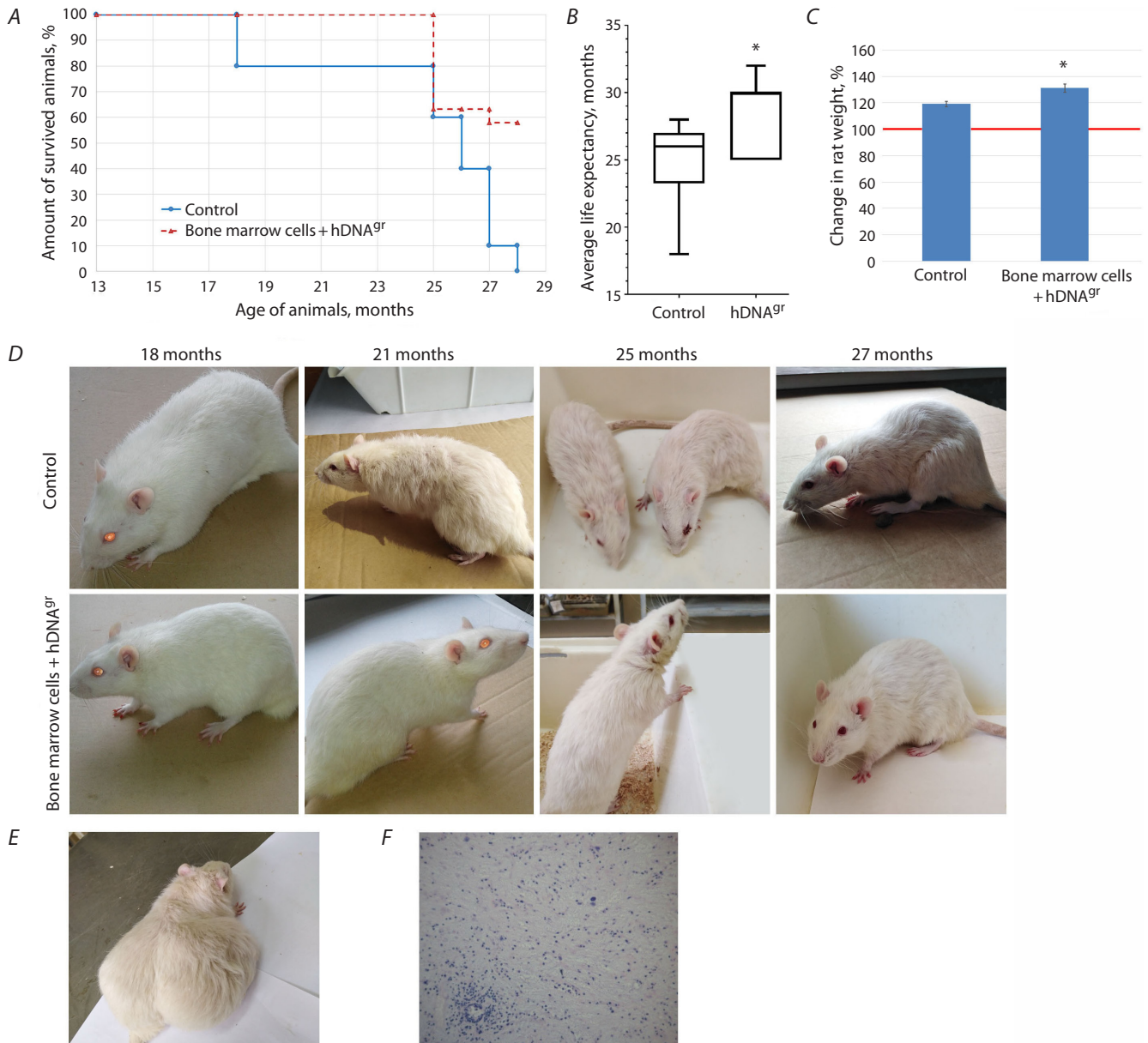


Рис. 3. Влияние hDNA^{gr} на продолжительность жизни крыс линии Вистар.

A – выживаемость животных; *B* – средняя продолжительность жизни животных. * Достоверные отличия по сравнению с контрольной группой, $p < 0.01$, логранговый тест (критерий Мантеля–Кокса). *C* – изменение массы тела крыс из контрольной и опытной групп в возрасте 24 мес. относительно исходного веса в 13 мес. в начале эксперимента, принятого за 100 % (обозначен красной линией). * Достоверные отличия по сравнению с контрольной группой, $p < 0.05$, критерий Манна–Уитни. *D* – сравнительный внешний вид особей из контрольной и опытной групп в различном возрасте; *E* – внешний вид крысы с опухолью из опытной группы в возрасте 30 мес.; *F* – патоморфологический анализ опухоли крысы из опытной группы в возрасте 30 мес. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 20$.

нено влияние реинфузии клеток костного мозга (ГСК) старых животных, обработанных ангиогенином и hDNA^{gr} и совместно обоими препаратами. В качестве контрольных групп были взяты крысы, обработанные клетками костного мозга от молодых и старых животных (рис. 4). В этом исследовании было проанализировано изменение в количестве теломерной ДНК в костном мозге крыс в группах после инъекции клеток костного мозга от старых и молодых животных и клеток костного мозга, обработанных hDNA^{gr}, ангиогенином и ангиогенином + hDNA^{gr}, через 12 мес. после реинфузии методом саузерн-блот ги-

бридизации. Также в этой части исследования на крысиной и человеческой моделях проанализировано, какая из цепей (G или C) теломеры амплифицирована.

По результатам экспериментов сделаны следующие выводы. 1. Реинфузия клеток костного мозга от старых животных, обработанных препаратом hDNA^{gr}, не влияет на увеличение продолжительности жизни животных по сравнению с контролем (клетки костного мозга от старых животных без обработки) (см. рис. 4). Средняя продолжительность жизни составила 25 мес. 2. Реинфузия клеток костного мозга молодых животных, клеток костного мозга,

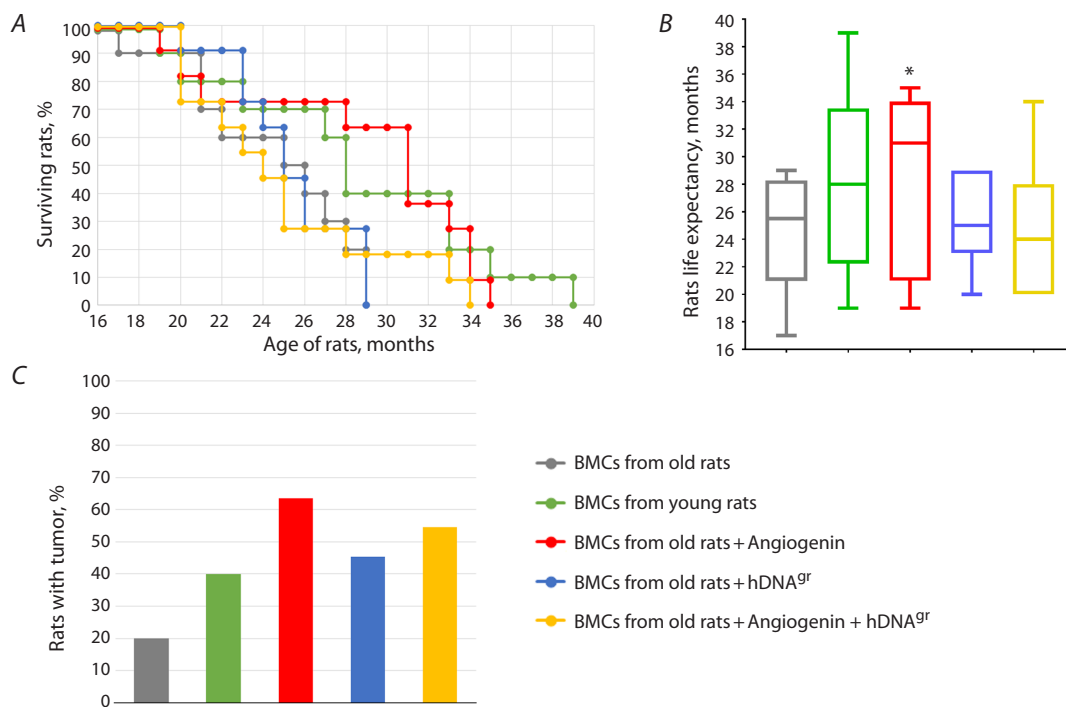


Рис. 4. Анализ продолжительности жизни экспериментальных крыс в группах.

A – кривая Каплана–Майера; B – продолжительность жизни крыс; C – количество крыс с опухолями. * Достоверные отличия продолжительности жизни крыс по сравнению с контрольной группой, которой вводили клетки костного мозга старых животных, $p < 0.01$, логранговый тест (критерий Мантеля–Кокса).

обработанных ангиогенином и ангиогенином + hDNA^{gr}, увеличивает продолжительность жизни крыс в группах (см. рис. 4, A, B). Во всех экспериментальных группах у 40–60 % животных развилась спонтанная опухоль (см. рис. 4, C). В контрольных группах этот показатель составил 20–40 %. Для группы, которой вводили клетки, обработанные ангиогенином и ангиогенином + hDNA^{gr}, этот факт можно объяснить большей продолжительностью жизни и, как следствие, появлением новообразования у большего числа животных. В Приложении 3 представлены результаты патоморфологического исследования опухолей крыс из различных экспериментальных групп. Полученные данные свидетельствуют, что во всех группах были индуцированы или спонтанные солидные эпителиальные опухоли, или плоскоклеточные карциномы, или железистые опухоли, в некоторых случаях определяющиеся как опухоль молочной железы. Все опухоли имели низкую пролиферативную активность. Мы полагаем, что возникшие новообразования являются следствием содержания животных, а не индукции туморогенеза стволовыми клетками крови. ГСК могут дифференцироваться в клетки крови, но не в эпителиальные клетки, которые в результате спонтанной неотрансформации развились в опухоли. Тем не менее полученный результат настораживает и требует тщательной проверки.

Также следует отметить высокую долю животных с пневмонией, что связано с условиями содержания и в целом снижает ценность результатов. Полученные данные пионерных исследований позволяют более осмысленно определить следующий уровень задач.

Анализ некоторых деталей структуры теломер и сравнительный анализ количества теломерной ДНК в клетках костного мозга экспериментальных крыс и в образце клеток костного мозга человека

Используя специфические зонды, меченные P³², на G- и C-теломерный «хвост», мы проанализировали некоторые детали структуры теломер в клетках костного мозга экспериментальных крыс и в образце клеток костного мозга человека. Также проведен сравнительный анализ: 1) изменения количества теломерной ДНК в клетках костного мозга крыс, которым вводили клетки костного мозга старых животных без обработки (контроль), клетки костного мозга старых животных, обработанные hDNA^{gr}, ангиогенином и препаратами совместно, через 12 мес. после терапии; 2) изменения количества теломерной ДНК в клетках костного мозга человека в контроле и в образце после обработки hDNA^{gr} через 15 сут культивирования на метилцеллюлозе.

Были выполнены два независимых эксперимента по оценке количества теломерных ДНК в образцах клеток, полученных от крыс, которым реинфузировали клетки костного мозга старых крыс, обработанные в первом эксперименте hDNA^{gr} и во втором эксперименте ангиогенином и ангиогенином + hDNA^{gr}. В первом эксперименте в тех же методических условиях, что и для крыс, анализировались также клетки костного мозга человека.

Анализ количества теломерной ДНК. Проанализировано количество теломерной ДНК в клетках костного мозга, полученных от крыс контрольной группы и крыс, которым реинфузировали клетки костного мозга, обработанные

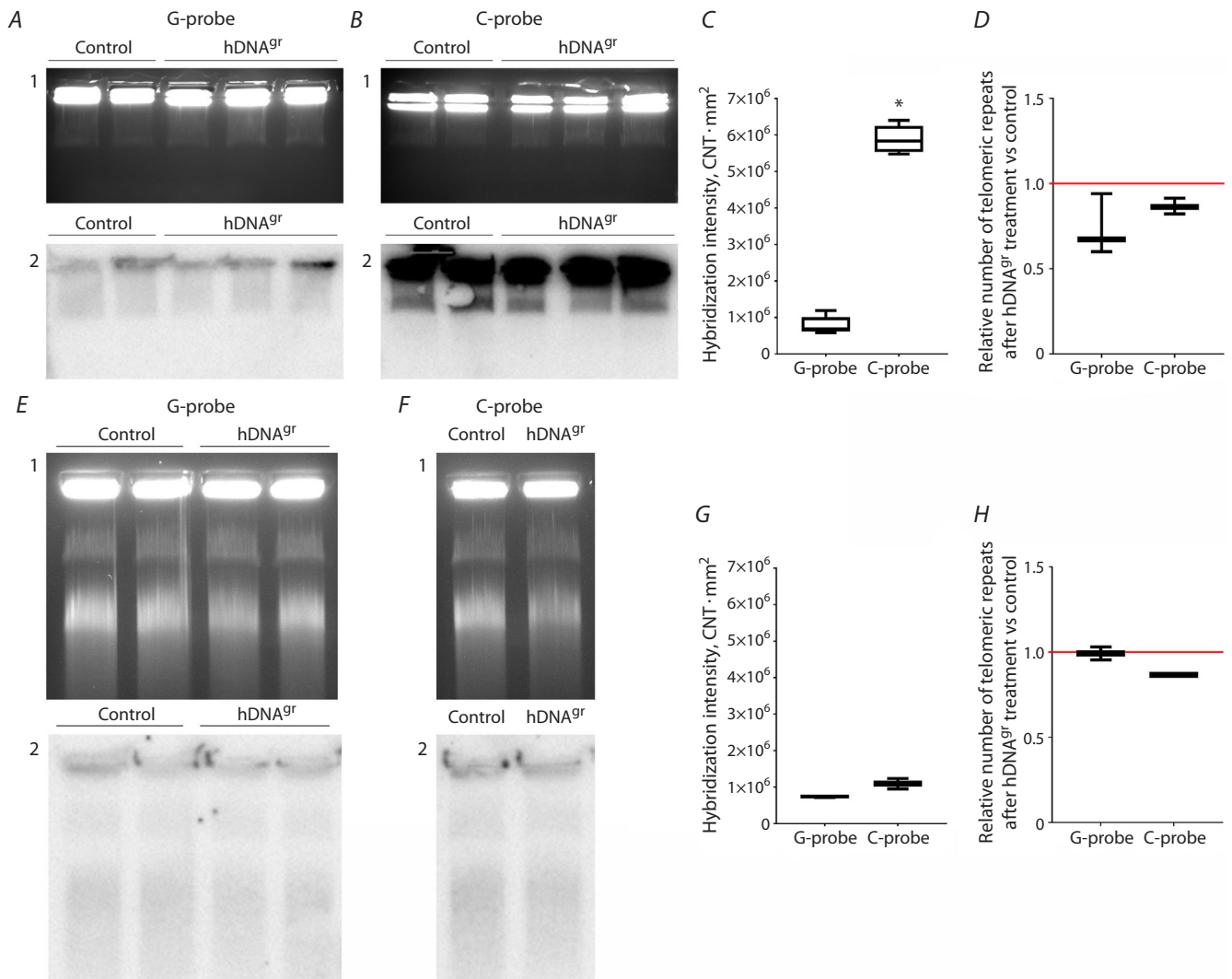


Рис. 5. Анализ некоторых деталей структуры теломер в клетках костного мозга экспериментальных крыс и в образце клеток костного мозга человека: *A–D* – крысиная модель; *E–H* – человеческая модель.

A, B, E, F – гель-электрофорез (1) и саузерн-блот (2) образцов ДНК после разгонки лизированных и депротенинированных клеток костного мозга, залитых в блоки легкоплавкой агарозы. Гибридизацию проводили на P^{32} -меченые комплементарные олигонуклеотиды, содержащие девять повторяющихся теломерных гексануклеотидов, соответствующих G и C теломерным цепям (G-probe, C-probe). *C, G* – оценка разницы количества теломерных повторов G- и C-цепей в клетках костного мозга суммарно в контрольной и экспериментальной группах. Сравнивались значения (CNT · mm²) с использованием программы GEL-Pro. * Достоверные отличия при гибридизации с C-зондом относительно интенсивности гибридизации с G-зондом, $p < 0.01$, критерий Манна–Уитни. *D, H* – оценка количества теломерных повторов в образцах, обработанных hDNA^{9r}, относительно контрольных образцов. Сравнивались относительные цифры, полученные в результате деления значений светимости радиоактивной засветки на светимость этидиума бромиды для каждой дорожки, выраженных в условных единицах с использованием программы GEL-Pro.

hDNA^{9r}, через 12 мес. после обработки, и в образцах клеток костного мозга человека также контрольных и обработанных hDNA^{9r} на 15-е сутки культивирования на метилцеллюлозе.

Литературные данные свидетельствуют, что теломера имеет протяженный G-хвост. Это означает, что при гибридизации с зондами на разные цепи более сильный сигнал гибридизации будет наблюдаться при использовании C-зонда.

Полученный результат в случае крыс полностью подтвердил имеющиеся сведения (рис. 5, *A–D*). Однако для клеток костного мозга человека эффективность гибридизации на разные зонды (G/C, P^{32} -удельная активность и количество ДНК зондов для гибридизации идентичны) до-

стоверно не различалась. Это означало, что в анализируемой системе обе цепи имеют одинаковую протяженность и что произошла терминальная редукция теломерного гетерохроматина и теломеры достигли критической длины. На наш взгляд, скорее всего, это связано с заболеванием пациента (были взяты криоконсервированные клетки костного мозга больного множественной миеломой, возраст 59 лет) (см. рис. 5, *E–H*).

В этом же эксперименте было проведено сравнение изменения количества теломерной ДНК в образцах клеток контрольных и экспериментальных образцов для обеих моделей (см. рис. 5, *D, H*).

Показано, что у крыс, которым перевели клетки костного мозга, обработанные hDNA^{9r}, через 12 мес. после

реинфузии увеличения количества теломерной ДНК (а значит, и длины теломер) не произошло. Эти данные совпадают с данными по средней продолжительности жизни, где тоже показано отсутствие достоверной разницы в анализируемых группах. Это означает, что в данном конкретном эксперименте препарат hDNA^{gr} или не индуцировал в клетках костного мозга увеличение теломеры, или такие клетки были элиминированы в течение 12 мес. наблюдения. К сожалению, в случае первого пилотного эксперимента количественный анализ с использованием радиоактивно меченного зонда не был проведен, что связано с техническими проблемами.

Аналогичный результат (отсутствие увеличения количества теломерной ДНК) получен для человеческой модели (см. рис. 5, H). В данном случае мы объясняем эффект следующим образом. Для контрольных образцов для амплификации по механизму альтернативного удлинения теломер необходимо присутствие свободно расположенных колец теломерной ДНК. Такие кольца (t-кольца) формируются после отсоединения t-петли, которая находится на конце протяженного G-хвоста теломеры. Как свидетельствуют полученные результаты по гибридизации, в клетках костного мозга анализируемого образца, по всей видимости, такая протяженная цепь отсутствует и формирование t-колец ограничено (редуцировано). Этим и объясняется отсутствие разницы в количестве теломерной ДНК.

В случае активатора hDNA^{gr}, как было сказано ранее, основным механизмом увеличения длины теломер является альтернативное удлинение теломер, при котором на кольцах теломерных повторов, сформированных экстраклеточными фрагментами, происходит амплификация теломерной ДНК по механизму катящегося кольца. Мы полагаем, что отсутствие увеличения количества теломерной ДНК, так же как и в случае с мышинной моделью, связано с неоднозначностью процесса интернализации. Показано, что в стволовую гемопоэтическую клетку попадает 0.1–1.0 % экстраклеточной ДНК, представляющей собой незначительную часть генома. Это означает, что всегда будет вероятность того, что в клетку не доставляется ДНК теломерных повторов или она доставляется в недостаточном для амплификации или сайт-специфической интеграции количестве. Возможны другие объяснения феномена, связанные с биологией ГСК, что требует дальнейших глубоких исследований (например, конкурентная элиминация из пространства костного мозга модифицированной стволовой клетки клонами, приобретшими клональные характеристики в ходе возрастных изменений).

Таким образом, в первом пилотном эксперименте клетки костного мозга, экспонированные с hDNA^{gr} и введенные экспериментальным животным, существенно изменяли качество их жизни в терминальном периоде, а также увеличивали среднюю продолжительность жизни крыс. Проведенный эксперимент свидетельствовал об обоснованности предложенной концепции. Наблюдались оба предполагаемых биологических эффекта: положительная динамика в общем состоянии старых животных по ходу дожития; существенное и достоверное увеличение продолжительности жизни экспериментальных крыс.

В повторном эксперименте эффект увеличения продолжительности жизни как в случае мышинной модели, так и у крыс в группах, где клетки костного мозга экспонировались с hDNA^{gr}, отмечен не был. Более того, молекулярный анализ свидетельствовал, что отсутствуют и изменения в количестве теломерной ДНК. То есть можно констатировать сопряженность этих двух показателей.

Различия в конечных точках двух аналогичных экспериментов, как говорилось в начале статьи, могут определяться неоднозначностью поведения анализируемой системы ГСК vs hDNA^{gr}, что связано с последствиями возможных неконтролируемых взаимоотношений между ксеногенной экстраклеточной ДНК человека и ДНК хромосом грызунов.

Во второй серии гибридизаций было выполнено сравнение количества теломерной ДНК в клетках контрольных крыс и крыс, которым реинфузировали клетки костного мозга старых крыс, обработанных ангиогенином и ангиогенином совместно с hDNA^{gr} через 12 мес. после терапии (рис. 6). Необходимость такого анализа была вызвана полученным результатом, свидетельствующим, что продолжительность жизни крыс после обработки клеток ангиогенином и ангиогенином совместно с hDNA^{gr} достоверно превышает продолжительность жизни как контрольных животных, так и животных после обработки hDNA^{gr}.

Был проведен сравнительный анализ силы сигналов свечения красителя бромистого этидия и радиоактивной засветки. Важно отметить, что в эксперименте все условия как электрофореза, так и гибридизации были идентичны. Это позволяет сделать определенную количественную оценку. Во всех образцах G-цепь теломерных повторов (С-зонд) доминирует над С-цепью (G-зонд) (количество ДНК зонда и удельная активность обоих зондов практически одинаковы). Это находится в согласии с имеющимися литературными данными (см. рис. 6, A2, C).

В предыдущей гибридизации было показано, что обработка клеток старых крыс препаратом hDNA^{gr} не влияет на увеличение количества теломерной ДНК в клетках костного мозга подопытных животных, а средняя продолжительность жизни в группе не отличается от контроля. В этой связи мы предположили, что после обработки ангиогенином совместно с hDNA^{gr} основной эффект обусловлен действием ангиогенина, но не hDNA^{gr}, и можно объединить значения групп «Ангиогенин» и «Ангиогенин + hDNA^{gr}». Анализ показал, что относительное содержание теломерных повторов С- и G-цепи в общей массе ДНК в выделенных группах достоверно не изменилось по сравнению с контролем. При этом количество повторов G-цепи достоверно превышает количество повторов С-цепи (см. рис. 6, C). Полученные данные по гибридизации теломерной ДНК свидетельствуют, что существенное увеличение продолжительности жизни крыс после обработки ангиогенином и ангиогенином совместно с hDNA^{gr} не связано с увеличением количества теломерной ДНК (теломерных повторов), а значит, или не зависит от способности ангиогенина активировать эндогенную теломеразную активность (Рузанова и др., 2025), или имеет другие причины (например, конкурентная элими-

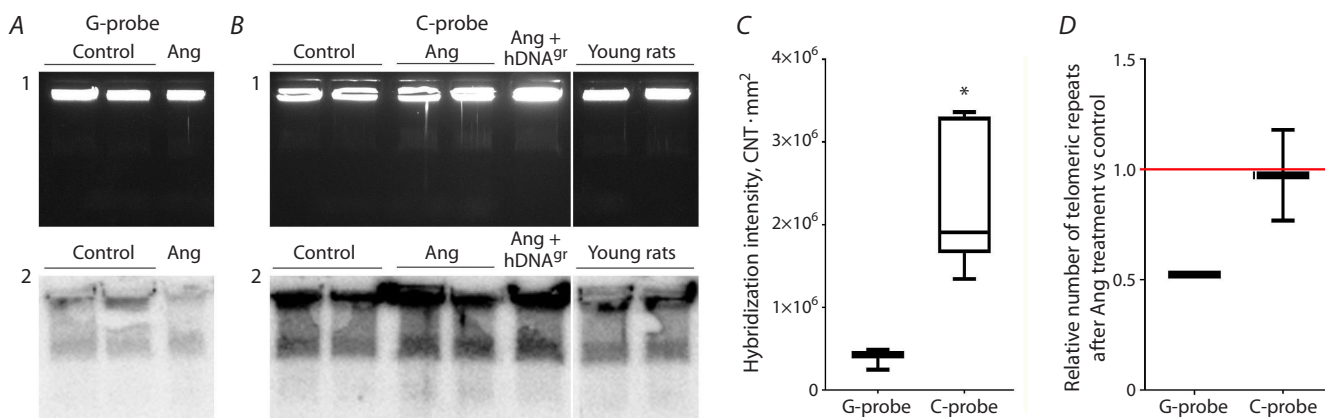


Рис. 6. Анализ некоторых деталей структуры теломер в клетках костного мозга экспериментальных крыс через 12 мес. после проведенной обработки.

A, B – гель электрофорез (1) и саузерн-блот (2) образцов ДНК после разгонки лизированных и депротенинизированных клеток костного мозга, залитых в блоки легкоплавкой агарозы. Гибридизацию проводили на ³²P-меченые комплементарные олигонуклеотиды, содержащие девять повторяющихся теломерных гексануклеотидов, соответствующих G и C теломерным цепям (G-probe, C-probe). C – оценка разницы количества теломерных повторов G- и C-цепей в клетках костного мозга суммарно в контрольной и экспериментальной группах. Сравнивались значения (CNT·mm²) с использованием программы GEL-Pro. * Достоверные отличия при гибридизации с C-зондом относительно интенсивности гибридизации с G-зондом, $p < 0.01$, критерий Манна–Уитни. D – оценка относительного количества теломерных повторов в образцах, обработанных ангиогенином, относительно контрольных образцов. Сравнивались относительные цифры, полученные в результате деления значений светимости радиоактивной засветки на светимость этидиума бромид для каждой дорожки, выраженных в условных единицах с использованием программы GEL-Pro.

нация реинфузированного модифицированного клона гемопоэтическими предшественниками костного мозга с клональными характеристиками).

Обсуждение

Попытки продлить жизнь сопровождают человечество на протяжении всего существования цивилизации. В настоящее время сформировано представление о маркерах, характерных для процесса старения и присущих старому организму, и применяются различные противозрастные интервенции (López-Otín et al., 2013, 2023; Proshkina et al., 2020; Zhu et al., 2021). Тем не менее современные противозрастные подходы и разнообразные препараты, разработанные на основании знаний молекулярных процессов, протекающих в клетке и организме, редко позволяют преодолеть заветный столетний рубеж. На наш взгляд, это связано с тем, что старение – это не ответ конкретной функциональной системы на продолжительность существования, которую можно «поправить» терапевтическими процедурными и какими угодно интервенциями, а инволюционирующее интегральное состояние организма, причины деградации которого неизвестны. В этой связи здоровый образ жизни обеспечивает как минимум половину успеха долгой жизни. Генетический фактор также является главенствующим при разработке противозрастных подходов, и именно на него направлены усилия современной науки о старости. К таким терапиям относятся, например, перепрограммирование стареющих клеток с использованием факторов Яманаки (Takahashi, Yamanaka, 2006; Ocampo et al., 2016; Gowing et al., 2017; Brooks, Robbins, 2018; Sogabe et al., 2018), использование микроРНК, имеющих множество мишеней в генных сетях и регулирующих интегральные пути старения (Vaiserman et al., 2016), генная комплексная терапия (*FGF21+αKloho+sTGFβR2*)

(Davidsohn et al., 2019), терапия, связанная с увеличением длины теломер, и в первую очередь с активацией эндогенной теломеразы или трансдукцией теломеразного гена (Aubert, Lansdorp, 2008; Bernardes de Jesus et al., 2012; Li et al., 2017; Hong, Yun, 2019).

Как было сказано выше, длина теломер – один из основополагающих факторов, определяющий клеточное старение и развитие многих болезней цивилизации, особенно если события, связанные с укорочением теломер, происходят со стволовой клеткой (Rossiello et al., 2022). Поэтому понимание подходов, позволяющих увеличить длину теломер с проекцией на весь организм (а не на клетки, растущие в культуре), является нетривиальной задачей биологии и клинической медицины. Практически все найденные подходы к увеличению длины теломер основаны на воздействии на теломеразный комплекс и определяющие его гены (Aubert, Lansdorp, 2008). Нами не найдены клинические подходы, позволяющие увеличить длину теломер за счет другого, не менее важного механизма – альтернативного удлинения теломер (Lundblad, 2002; Hande, 2004; Pickett et al., 2009; Nabetani, Ishikawa, 2011; Rovatsos et al., 2011; Doksan, 2019; Loe et al., 2020).

Настоящее исследование было направлено на оценку возможности увеличения продолжительности жизни с использованием технологии, заложенной в новой концепции природной реконструкции генома и связанной с возможностью увеличения длины теломер *in vivo* в гемопоэтических стволовых клетках.

Проведенные тесты на животных свидетельствуют об относительной безопасности введения клеток костного мозга, обработанных активаторами. Ярко выраженных немедленных патологических изменений у экспериментальных животных обеих моделей не обнаружено.

Полученные результаты по характеристике продолжительности жизни крыс, которым реинфузировали клетки костного мозга (ГСК), активированные фрагментированной ДНК человека, свидетельствуют, что существует принципиальная возможность увеличения продолжительности жизни старых животных. Эффект пластичен: в одних случаях наблюдалось достоверное увеличение продолжительности жизни, в других обработка не влияла на продолжительность жизни экспериментальных животных.

В случае, когда эффект не наблюдался, количество детектируемой теломерной ДНК в клетках костного мозга крыс через 12 мес. после обработки не отличалось от показателей контрольного образца. Предположительным механизмом отсутствия увеличения количества теломерной ДНК в клетках костного мозга через год после обработки препаратом hDNA^{gr} может быть клональная конкуренция. В этом случае обновленный клон с увеличенным количеством теломерной ДНК, который появляется в результате проведенной обработки, как показано в работе (Рузанова и др., 2025), вытесняется приобретенными клонными характеристиками доминантными клонами, расположенными в костном мозге. Если это соответствует действительности, то это важнейшее наблюдение, которое предполагает многократные начальные интервенции модифицированными клетками костного мозга для противостояния конкурентной экспансии доминантных клонов и стабильной фиксации признака в костном мозге.

Ангиогенин рекомбинантный человеческий может проявлять токсичность на уровне организма (мышинная модель), которая нивелируется при его сочетании с препаратом hDNA^{gr}. Синергичное использование ангиогенина и hDNA^{gr} приводит к увеличению продолжительности жизни мышей в группе.

Увеличение продолжительности жизни крыс в группах после обработки ангиогенином не связано с увеличением длины теломер, а определяется другими свойствами фактора, или клональной конкуренцией в костном мозге, или и тем и другим.

Концепция механизма «запрограммированного клонального гемопоэза» и механизма «запрограммированной старости»

В работе (Proshkina et al., 2020) сформировано представление о том, что старение является квазипрограммой, регуляторные элементы которой первоначально не предназначены для ее реализации, а отвечают за другие процессы (клеточный рост, регенерацию, стрессовый ответ, иммунологическую защиту). На основании этого делается вывод о том, что не существует программы старения, поскольку отсутствуют специфические молекулярные и клеточные подпрограммы, берущие на себя функцию управления дезинтеграцией элементов системы целого организма с возрастом. Это как раз и означает, что причины старения неизвестны и можно рассуждать только о маркерах старения.

Тем не менее мы сформулировали, на наш взгляд, достаточно адекватную концепцию, доказывающую, что ста-

рание организма – это программа, заложенная в диалектическом единстве определенных элементов его функционирования и непрерывного контакта с агрессивной средой существования и связанная с развитием клонального гемопоэза (возможно, такое представление характерно для любых систем стволовых клеток организма). Эта концепция объединяет все найденные биологические явления и события, с ними связанные. Также мы предлагаем способ, позволяющий преодолеть последствия укорочения теломер, фиксации патологических мутаций и их доминирования в ГСК (и в стволовых клетках другого генеза), что может составить основу будущей противозрастной терапии и терапии болезней цивилизации.

Предполагаемый механизм «запрограммированного клонального гемопоэза» и механизм «запрограммированной старости». При рождении у человека есть две принципиальные самонастраивающиеся относительно друг друга системы: это ГСК (возможно, все другие типы стволовых клеток, участвующих в репарации в организме) и вся совокупность клеток организма.

- ГСК отвечают за репарацию в теле. Спрятаны в самом потаенном месте, в костном мозге.
- Клетки тела контактируют с агрессивной окружающей средой.

Популяция ГСК в момент рождения характеризуется поликлональностью с представительством всей совокупности аллельных форм, требующихся для осуществления репаративной функции и поддержания многообразия возможностей иммунитета.

Следующие особенности являются основой механизма запрограммированного клонального гемопоэза и механизма запрограммированной старости:

- ГСК захватывают фрагменты экстраклеточной дцДНК, 0.02–1.0 % от гаплоидного генома.
- При терминальной дифференцировке ГСК перестраивают архитектуру хроматина за счет индукции одноцепочечных разрывов и релаксации нитей ДНК хромосом. Тем самым индуцируется «рекомбиногенная ситуация», во время которой возможна интеграция фрагментов дцДНК, находящихся во внутренних компартментах клетки, доставленных в клетку в результате различных обстоятельств.
- Попав в примитивную гемопоэтическую клетку, фрагменты дцДНК сами индуцируют терминальную дифференцировку этой клетки. И, таким образом, фрагменты дцДНК, доставленные в клетку, индуцируют «рекомбиногенную ситуацию» и одновременно становятся участниками репаративно-рекомбинационного процесса, который сами и активировали.
- В плазме крови всегда циркулируют фрагменты дцДНК, оставшиеся от апоптотированных клеток, хроматин которых в конце концов гидролизует до 1–20 нуклеосомных мономеров в результате вторичного некроза апоптотических телец.

Суть механизма. Клетки организма со всей совокупностью мутаций, накопленных в ходе существования, после естественной смерти – апоптоза, доведенного до вторичного некроза, поставляют в кровотока свою фрагмен-

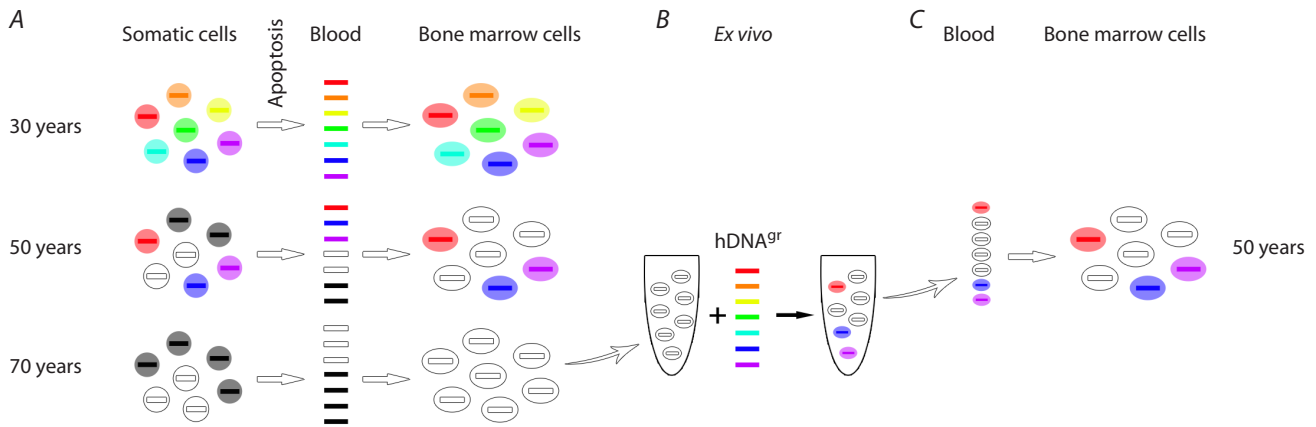


Рис. 7. Механистическая схема возникновения клонального гемопоэза и возможности его исправления.

A – появление мутаций в клетках сомы, их выход в периферическую кровь и фиксация в клетках костного мозга. Формирование олигоклонального гемопоэза. *B* – изменение генома ГСК фрагментами экстраклеточной дцДНК в системе *ex vivo*; *C* – реинфузия клеток с реконструированным геномом в периферическое русло и их фиксация в костном мозге. Восстановление поликлонального гемопоэза.

тированную дцДНК, с многочисленными генетическими нарушениями в структуре различных генов.

Эта экстраклеточная дцДНК постоянно транзитно попадает в ГСК, где в определенные моменты времени (например, при увеличении концентрации ДНК плазмы крови в связи с травмой или ишемией) индуцирует коммитирование и стохастически интегрирует в геном, по-видимому, по гомологичным участкам. Происходит генная конверсия, и ГСК меняют генетику, лишаясь своего статуса, и приобретают черты генетики клеток сомы, отреагировавших на воздействие агрессивной окружающей среды. Последовательно популяция ГСК как система стволовых клеток истощается, исчерпывается плюрипотентный ресурс, и система ГСК приобретает олигоклональные черты (рис. 7).

Отсюда теряются репаративные возможности ГСК и, главное, исчезает исходное многообразие возможностей иммунитета. Наступает физическая старость организма.

Существует возможность преодоления механизма запрограммированного клонального гемопоэза и механизма запрограммированной старости. Необходимо использовать то же самое «оружие», а именно: регулярно давать ГСК экстраклеточный дцДНК субстрат, полученный от молодых здоровых людей. Таким субстратом является препарат hDNA^{gr}. Здоровые аллели будут вытеснять накапливающиеся мутантные, и ГСК будет сохранять свой плюрипотентный статус.

Список литературы / References

Козлов А.А. Старость: социальная разобщенность или целостность? Теории и традиции западной социальной психологии. *Мир психологии: научно-методический журнал*. 1999;2:80-96 [Kozlov A.A. Old age: social disunity or integrity? Theories and traditions of Western social psychology. *Mir Psikhologii: Nauchno-Metodicheskiy Zhurnal = World of Psychology: Research and Methodological Journal*. 1999;2:80-96 (in Russian)]
Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984 [Maniatis T., Fritch E., Sambrook D. Methods of Genetic Engineering. Molecular Cloning. Moscow: Mir Publ., 1984 (in Russian)]

Михеев Р.К., Андреева Е.Н., Григорян О.Р., Шереметьева Е.В., Абсаратова Ю.С., Одарченко А.С., Оплетаяева О.Н. Молекулярные и клеточные механизмы старения: современные представления (обзор литературы). *Проблемы эндокринологии*. 2023;69(5):45-54. doi 10.14341/probl13278 [Mikheev R.K., Andreeva E.N., Grigoryan O.R., Sheremetyeva E.V., Absatarova Y.S., Odarchenko A.S., Opletaeva O.N. Molecular and cellular mechanisms of ageing: modern knowledge (literature review). *Problems of Endocrinology*. 2023;69(5):45-54. doi 10.14341/probl13278 (in Russian)]
Рузанова В.С., Ошихмина С.Г., Риттер Г.С., Долгова Е.В., Кирикович С.С., Левитес Е.В., Ефремов Я.Р., Карамышева Т.В., Богомолов А.Г., Мещанинова М.И., Мамаев А.Л., Таранов О.С., Сидоров С.В., Никонов С.Д., Леплина О.Ю., Останин А.А., Черных Е.Р., Колчанов Н.А., Проскурина А.С., Богачев С.С. Концепция природной реконструкции генома. Часть 3. Анализ изменения количества теломерной ДНК в клетках колоний как нового амплифицированного признака, возникшего при обработке гемопоэтических стволовых клеток костного мозга. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(4):479-495. doi 10.18699/vjgb-25-52 [Ruzanova V.S., Oshikhmina S.G., Ritter G.S., Dolgova E.V., Kirikovich S.S., Levites E.V., Efremov Y.R., Karamysheva T.V., Bogomolov A.G., Meschaninova M.I., Mamaev A.L., Taranov O.S., Sidorov S.V., Nikonov S.D., Leplina O.Y., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Proskurina A.S., Bogachev S.S. Concept of natural genome reconstruction. Part 3. Analysis of changes in the amount of telomeric DNA in colony cells as a new amplified feature that arose during the processing of hematopoietic bone marrow stem cells. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed*. 2025;29(4):479-495. doi 10.18699/vjgb-25-52]
Aubert G., Lansdorp P.M. Telomeres and aging. *Physiol Rev*. 2008; 88(2):557-579. doi 10.1152/physrev.00026.2007
Bernardes de Jesus B., Vera E., Schneeberger K., Tejera A.M., Ayuso E., Bosch F., Blasco M.A. Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer. *EMBO Mol Med*. 2012;4(8):691-704. doi 10.1002/emmm.201200245
Bowen R.L., Atwood C.S. Living and dying for sex. A theory of aging based on the modulation of cell cycle signaling by reproductive hormones. *Gerontology*. 2004;50(5):265-290. doi 10.1159/000079125
Brooks R.W., Robbins P.D. Treating age-related diseases with somatic stem cells. In: Mettinger K., Rameshwar P., Kumar V. (Eds) *Exosomes, Stem Cells and MicroRNA*. Advances in Experimental Medi-

- cine and Biology. Vol. 1056. Springer, 2018;29-45. doi 10.1007/978-3-319-74470-4_3
- Chakravarti D., LaBella K.A., DePinho R.A. Telomeres: history, health, and hallmarks of aging. *Cell*. 2021;184(2):306-322. doi 10.1016/j.cell.2020.12.028
- da Costa J.P., Vitorino R., Silva G.M., Vogel C., Duarte A.C., Rocha-Santos T. A synopsis on aging – theories, mechanisms and future prospects. *Ageing Res Rev*. 2016;29:90-112. doi 10.1016/j.arr.2016.06.005
- Davidsohn N., Pezzone M., Vernet A., Graveline A., Oliver D., Slomovic S., Punthambaker S., Sun X., Liao R., Bonventre J.V., Church G.M. A single combination gene therapy treats multiple age-related diseases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019;116(47):23505-23511. doi 10.1073/pnas.1910073116
- Di Micco R., Krizhanovsky V., Baker D., d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021;22(2):75-95. doi 10.1038/S41580-020-00314-w
- Doksani Y. The response to DNA damage at telomeric repeats and its consequences for telomere function. *Genes*. 2019;10(4):318. doi 10.3390/genes10040318
- Dolgova E.V., Nikolin V.P., Popova N.A., Proskurina A.S., Orishenko K.E., Alyamkina E.A., Efremov Y.R., ... Taranov O.S., Rogachev V.A., Sidorov S.V., Bogachev S.S., Shurlov M.A. Internalization of exogenous DNA into internal compartments of murine bone marrow cells. *Russ J Genet Appl Res*. 2012;2:440-452. doi 10.1134/S2079059712060056
- Gems D., Partridge L. Genetics of longevity in model organisms: debates and paradigm shifts. *Annu Rev Physiol*. 2013;75:621-644. doi 10.1146/annurev-physiol-030212-183712
- Gowing G., Svendsen S., Svendsen C.N. Ex vivo gene therapy for the treatment of neurological disorders. *Prog Brain Res*. 2017;230:99-132. doi 10.1016/bs.pbr.2016.11.003
- Hande M.P. DNA repair factors and telomere-chromosome integrity in mammalian cells. *Cytogenet Genome Res*. 2004;104(1-4):116-122. doi 10.1159/000077475
- Harley C.B., Futcher A.B., Greider C.W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*. 1990;345(6274):458-460. doi 10.1038/345458a0
- He S., Sharpless N.E. Senescence in health and disease. *Cell*. 2017;169(6):1000-1011. doi 10.1016/j.cell.2017.05.015
- Hong J., Yun C.O. Telomere gene therapy: polarizing therapeutic goals for treatment of various diseases. *Cells*. 2019;8(5):392. doi 10.3390/cells8050392
- Kenyon C.J. The genetics of ageing. *Nature*. 2010;464(7288):504-512. doi 10.1038/nature08980
- Kirkwood T.B.L. Understanding the odd science of aging. *Cell*. 2005;120(4):437-447. doi 10.1016/j.cell.2005.01.027
- Krauss S.R., de Haan G. Epigenetic perturbations in aging stem cells. *Mamm Genome*. 2016;27(7-8):396-406. doi 10.1007/s00335-016-9645-8
- Lefever R. The rehabilitation of irreversible processes and dissipative structures' 50th anniversary. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*. 2018;376(2124):20170365. doi 10.1098/rsta.2017.0365
- Li Y., Zhou G., Bruno I.G., Cooke J.P. Telomerase mRNA reverses senescence in progeria cells. *J Am Coll Cardiol*. 2017;70(6):804-805. doi 10.1016/j.jacc.2017.06.017
- Loe T.K., Li J.S.Z., Zhang Y., Azeroglu B., Boddy M.N., Denchi E.L. Telomere length heterogeneity in ALT cells is maintained by PML-dependent localization of the BTR complex to telomeres. *Genes Dev*. 2020;34(9-10):650-662. doi 10.1101/gad.333963.119
- López-Otín C., Blasco M.A., Partridge L., Serrano M., Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013;153(6):1194-1217. doi 10.1016/j.cell.2013.05.039
- López-Otín C., Blasco M.A., Partridge L., Serrano M., Kroemer G. Hallmarks of aging: an expanding universe. *Cell*. 2023;186(2):243-278. doi 10.1016/j.cell.2022.11.001
- Lundblad V. Telomere maintenance without telomerase. *Oncogene*. 2002;21(4):522-531. doi 10.1038/sj.onc.1205079
- Nabetani A., Ishikawa F. Alternative lengthening of telomeres pathway: recombination-mediated telomere maintenance mechanism in human cells. *J Biochem*. 2011;149(1):5-14. doi 10.1093/jb/mvq119
- Nassour J., Radford R., Correia A., Fusté J.M., Schoell B., Jauch A., Shaw R.J., Karlseder J. Autophagic cell death restricts chromosomal instability during replicative crisis. *Nature*. 2019;565:659-663. doi 10.1038/S41586-019-0885-0
- Ocampo A., Reddy P., Martínez-Redondo P., Platero-Luengo A., Hatanaka F., Hishida T., Li M., ... Nuñez Delicado E., Campistol J.M., Guillen I., Guillen P., Izpisua Belmonte J.C. In vivo amelioration of age-associated hallmarks by partial reprogramming. *Cell*. 2016;167(7):1719-1733.e12. doi 10.1016/j.cell.2016.11.052
- Pickett H.A., Cesare A.J., Johnston R.L., Neumann A.A., Reddel R.R. Control of telomere length by a trimming mechanism that involves generation of t-circles. *EMBO J*. 2009;28(7):799-809. doi 10.1038/emboj.2009.42
- Proshkina E.N., Solovov I.A., Shaposhnikov M.V., Moskalev A.A. Key molecular mechanisms of aging, biomarkers, and potential interventions. *Mol Biol*. 2020;54(6):777-811. doi 10.1134/S0026893320060096
- Rossiello F., Jurk D., Passos J.F., d'Adda di Fagagna F. Telomere dysfunction in ageing and age-related diseases. *Nat Cell Biol*. 2022;24(2):135-147. doi 10.1038/s41556-022-00842-x
- Rovatsos M.T., Marchal J.A., Romero-Fernández I., Fernández F.J., Giagia-Athanosopoulou E.B., Sánchez A. Rapid, independent, and extensive amplification of telomeric repeats in pericentromeric regions in karyotypes of arvicoline rodents. *Chromosome Res*. 2011;19(7):869-882. doi 10.1007/S10577-011-9242-3
- Sogabe Y., Seno H., Yamamoto T., Yamada Y. Unveiling epigenetic regulation in cancer, aging, and rejuvenation with in vivo reprogramming technology. *Cancer Sci*. 2018;109(9):2641-2650. doi 10.1111/cas.13731
- Stein G.H., Drullinger L.F., Soulard A., Dulić V. Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol Cell Biol*. 1999;19(3):2109-2117. doi 10.1128/mcb.19.3.2109
- Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-676. doi 10.1016/j.cell.2006.07.024
- Tchkonina T., Zhu Y., van Deursen J., Campisi J., Kirkland J.L. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *J Clin Invest*. 2013;123(3):966-972. doi 10.1172/jci64098
- Tlidi M., Clerc M.G., Panajotov K. Dissipative structures in matter out of equilibrium: from chemistry, photonics and biology, the legacy of Ilya Prigogine (part 1). *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*. 2018a;376(2124):20180114. doi 10.1098/rsta.2018.0114
- Tlidi M., Clerc M.G., Panajotov K. Dissipative structures in matter out of equilibrium: from chemistry, photonics and biology, the legacy of Ilya Prigogine (part 2). *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*. 2018b;376(2135):20180276. doi 10.1098/rsta.2018.0276
- Vaiserman A.M., Lushchak O.V., Koliada A.K. Anti-aging pharmacology: promises and pitfalls. *Ageing Res Rev*. 2016;31:9-35. doi 10.1016/j.arr.2016.08.004
- Vijg J., Campisi J. Puzzles, promises and a cure for ageing. *Nature*. 2008;454(7208):1065-1071. doi 10.1038/nature07216
- Zhu X., Chen Z., Shen W., Huang G., Sedivy J.M., Wang H., Ju Z. Inflammation, epigenetics, and metabolism converge to cell senescence and ageing: the regulation and intervention. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1):245. doi 10.1038/S41392-021-00646-9

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 05.07.2024. После доработки 12.03.2025. Принята к публикации 23.06.2025.