

В. А. Чистяков, Ю. В. Денисенко

ИМИТАЦИОННОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ СТАРЕНИЯ
ДРОЗОФИЛЫ *IN SILICO**

НИИ биологии Южного федерального университета, 344104 Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1; e-mail: vladimirchi@yandex.ru

Выделение группы существенных для старения феноменов от сопровождающих их эпифеноменов является одной из основных задач современной геронтологии. Инструментом, пригодным для корректного проведения такого выделения, могут быть современные методы имитационного моделирования. Смысл их применения в том, чтобы добиться воспроизведения *in silico* «внешних» проявлений старения, в первую очередь стандартных кривых дожития, при помощи наиболее простого «внутреннего механизма». Такой механизм, по-видимому, и будет наиболее существенным двигателем старения. Созданная нами модель старения одного из наиболее популярных объектов экспериментальной биологии — плодовой мушки *Drosophila melanogaster* (<http://winmobile.biz/moton/moto.html>) — основана на предположении о том, что ключевым механизмом старения является потеря клеточности, скорость которой определяется параметрами генерации активных форм кислорода в мотонейронах.

Ключевые слова: имитационное моделирование, потеря клеточности, мотонейроны, апоптоз, *aging hit*

Старение — удивительный феномен, интерес к изучению которого по мере развития биологии только усиливается. Наиболее интригующий вопрос этой области знания можно сформулировать следующим образом: какой механизм обеспечивает постепенное снижение жизнеспособности многоклеточного организма? Развитие методов экспериментальной биологии вызвало естественное желание ответить на него, изучая молекулярные изменения, которыми сопровождается процесс старения.

Исследования выявили множество таких изменений — от накопления липофусцина до укорочения теломер [1]. Кроме того, была открыта и довольно подробно изучена система механизмов программируемой смерти соматических клеток, причастность которой к «самоликвидации» целого организма подтверждается рядом наблюдений [5, 14]. Успех в поиске процессов, характеристики которых коррелируют с возрастом, имел и обратную сторону. Появилось множество теорий старения, преувеличивающих значение тех или иных

изменений для его объяснения. Избыточность существующего пула гипотез старения бросается в глаза большинству авторов, пытающихся анализировать положение дел в геронтологии [1].

Многоклеточный организм — многоуровневая самоорганизующаяся система. Активность ее элементов координируется сложнейшей сетью обратных связей. Любое действие сопровождается шлейфом изменений экспрессии генов, синтеза гормонов, иммунных и электрофизиологических реакций и др. Большинство из них влияет на приспособленность. Тем не менее, для понимания процессов, происходящих, например, при переваривании пищи, достаточно иметь в виду не более десятка физиологических и биохимических реакций.

Диалектика процесса познания такова, что абстрагирование от большинства деталей позволяет строить концептуальные модели, которые становятся основой дальнейшей детализации, но уже без потери понимания сути изучаемого явления. Теоретик, занимающийся поиском главных закономерностей биологических процессов, может достичь успеха, только относя большинство сопровождающих их реакций к эпифеноменам.

Выделение группы существенных для старения феноменов от сопровождающих их эпифеноменов является одной из основных задач современной геронтологии. Мы полагаем, что инструментом, пригодным для корректного проведения такого выделения, могут быть современные методы математического моделирования. Смысл их применения в том, чтобы добиться воспроизведения *in silico* «внешних» проявлений старения, в первую очередь стандартных кривых дожития, при помощи наиболее простого «внутреннего механизма». Такой механизм, по-видимому, и будет наиболее существенным двигателем старения. Естественно, моделирование «внутреннего механизма» долж-

* Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ, грант «Развитие научного потенциала высшей школы (2009–2010 гг.)», № 2.1.1/5630; грант ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России», госконтракт № 14.740.11.0006.

но опираться на биологические факты, как минимум — не противоречить им.

Задачей данной работы было построение модели старения одного из наиболее популярных объектов экспериментальной биологии — плодовой мушки *Drosophila melanogaster*, — основанной на максимально простых исходных допущениях.

Продолжительность жизни *Drosophila melanogaster* измеряется десятками дней. Данный организм относится к насекомым с полным превращением. Все соматические клетки имаго являются постмитотическими. Тем не менее, «кривые дожития» дрозофилы имеют характерную для большинства животных S-образную форму [8, 12]. Моделирование старения данного объекта существенно облегчается тем, что, во-первых, достаточно надежно идентифицированы ответственные за этот процесс клетки, а во-вторых, наглядно продемонстрирована ключевая роль свободнорадикальных процессов в старении [12].

Как известно, основной источник активных форм кислорода в эукариотической клетке — дыхательная цепь митохондрий. Один из главных ферментов-антиоксидантов — супероксиддисмутаза (СОД), катализирующая превращение супероксид-аниона в пероксид водорода и кислород. Известно, что дрозофилы, неспособные синтезировать СОД, отличаются короткой продолжительностью жизни [16].

В начале 90-х гг. прошлого века у дрозофилы удалось получить линии, экспрессирующие заметные количества человеческой СОД, однако по продолжительности жизни они практически не отличались от дикого типа. Затем появилась техника, позволяющая при помощи дополнительной генетической конструкции «включать» экспрессию СОД только в нужных тканях. Оказалось, что прибавку продолжительности жизни дает специфическая экспрессия этого гена в мотонейронах. Более того, введение человеческой СОД только в мотонейроны, дефектных по этому ферменту мух, возвращало им характерную для дикого типа продолжительность жизни.

Мотонейроны удобны для моделирования тем, что их количество у одной мухи достаточно точно определено и составляет около 80 [11]. Можно предположить, что естественная смерть дрозофилы наступает в результате снижения числа мотонейронов до какого-то критического уровня.

Основой для создания модели старения дрозофилы послужила модель потери клеточности однородной популяции постмитотических клеток

<http://www.winmobile.biz/shou/demoApp.php>, описанная в нашей работе [7].

Ее логические предпосылки следующие.

- Постмитотические клетки способны генерировать ряд веществ, провоцирующих программируемую клеточную смерть [4], — например пероксид водорода. Обозначим общую концентрацию таких апоптозных сигналов как X .

- При увеличении количества X , выработанного в течение промежутка времени, который можно назвать «циклом» (в данном случае продолжительность цикла равна одним суткам), до какого-то предела, срабатывает механизм самоликвидации.

- Среднее количество X , вырабатываемое в клетках за цикл ниже «порога самоликвидации».

- Поскольку величины X для разных клеток взаимно слабозависимы, их распределение будет подчиняться нормальному закону (закону Гаусса). Наличие у распределения величины X асимметрии и эксцесса не меняет анализируемых закономерностей принципиально. Главное, чтобы функция распределения X при стремлении аргумента к бесконечности асимптотически приближалась к нулю. Поскольку такая кривая не пересекается с осью абсцисс, теоретически могут существовать сколь угодно большие отклонения от среднего значения X .

- В клеточной популяции, при среднем уровне выработки X ниже порога, постоянно будут существовать клетки, выработка X которыми будет превышать «порог самоликвидации».

- Доля клеток, «самоликвидирующихся» в течение одного цикла, а следовательно, и скорость потери клеточности зависят от средней величины и стандартного отклонения X и уровня «порога самоликвидации».

Модификация модели, созданная для моделирования старения дрозофилы, позволяет учитывать гибель мух по достижении некоторого критического уровня потери числа мотонейронов.

Материалы и методы

Для количественного анализа изложенной концепции была создана многоагентная имитационная модель популяции мух. Модель реализована на платформе Java 2. При реализации использованы алгоритмы, взятые из работы [3].

При создании модели, организмы (мухи) формируются как автономные агенты. В рассматриваемом простейшем случае такие агенты не взаимодействуют между собой и со средой. Каждая муха

содержит задаваемое экспериментатором количество мотонейронов.

Поведение мотонейронов подчиняется следующей логике: считается, что каждый мотонейрон вырабатывает субстанцию X, причем ее выработка за цикл подчиняется нормальному закону распределения с задаваемыми параметрами. Задается также пороговое значение количества X, превышение которого ведет к гибели мотонейрона.

При достижении доли гибели мотонейронов в каждом отдельном организме некоторой оговоренной величины муха гибнет. Таким образом, наблюдая за ансамблем агентов, сформированным согласно изложенным правилам, можно построить кривую дожития для популяции мух.

В процессе эксперимента формируются две популяции мух, одна из которых является контрольной, а вторая — основная — подвергается воздействию геропротектора, который изменяет выработку субстанции X. График введения геропротектора задается экспериментатором. Размер контрольной и экспериментальной популяций ограничен техническими возможностями вычислительной платформы.

Программная реализация модели снабжена дружественным интуитивно понятным интерфейсом и требует от потенциального экспериментатора минимальных навыков работы с компьютерной техникой. Есть возможность варьировать упомянутые

выше параметры либо проводить вычислительный эксперимент с параметрами по умолчанию.

С работой полнофункциональной версии модели можно ознакомиться в Интернете по адресу: <http://winmobile.biz/moton/moto.html>

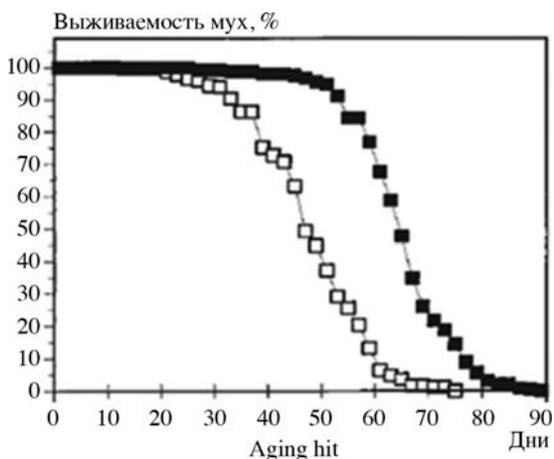
Результаты и обсуждение

На рис. 1, а представлены кривые дожития мух дикого типа и мух с дополнительной супероксиддисмутазной активностью в мотонейронах из работы [12].

Как видно на рисунках, несмотря на короткую продолжительность жизни, экспериментальные кривые дожития дрозофилы демонстрируют элементы, характерные для универсальной кривой дожития для многоклеточных организмов, в том числе и для человека — кривой Гомпертца—Мейкхема [10]. Это, во-первых, период «молодости» (0—30-й день), когда выживаемость существенно не падает с возрастом; «зрелости—старости» (30—60-й день), когда выживаемость начинает быстро падать; «глубокой старости» (60—80-й день), когда падение выживаемости замедляется.

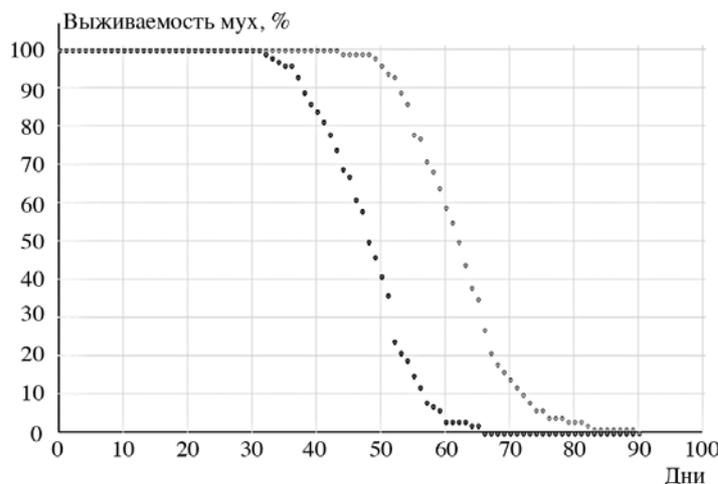
На рис. 1, б приведен типичный внешний вид экрана при проведении компьютерного моделирования с использованием разработанной модели.

Размер популяции мух насчитывает в данном случае 100 особей в основной группе и в контрольной. Количество мотонейронов у одной



□ Мухи дикого типа
■ Мухи с дополнительной экспрессией СОД

а



● Мухи дикого типа
○ Мухи с дополнительной экспрессией СОД

б

Рис. 1. Кривые дожития мух: а — экспериментальные; б — компьютерное моделирование (основная группа — 0 выживших особей из 100 на 89-й день, средняя продолжительность жизни 61,6 дня; контрольная группа — 0 выживших особей из 100 на 65-й день, средняя продолжительность жизни 47,3 дня)

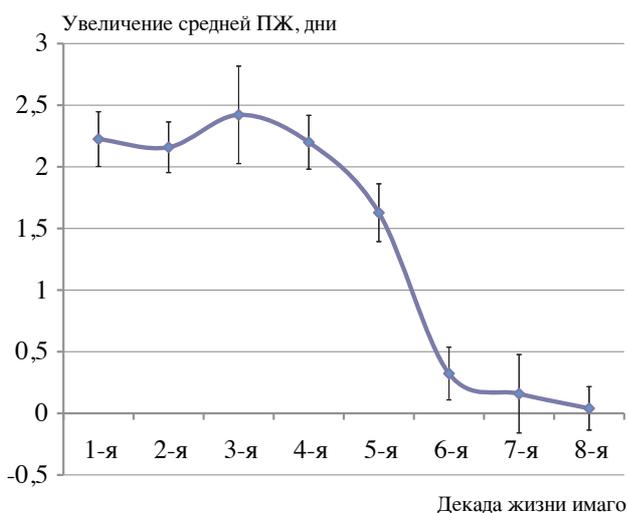


Рис. 2. Моделирование увеличения средней продолжительности жизни (ПЖ) дрозофилы при введении антиоксиданта, уменьшающего выработку индукторов апоптоза в мотонейронах на 2%, в разные декады жизни имаго (приведен 5% доверительный интервал); показаны средние из десяти повторностей

мухи — 80. Количество мотонейронов, достаточное для выживания, — 40% (32 мотонейрона). Средняя величина выработки X (индукторов апоптоза) составляет 99 ед., отклонение — 20 ед., пороговое значение — 141 ед., уменьшение среднего из-за применения препарата — 2 единицы.

Сопоставление *a* и *b* на рис. 1 показывает, что при таких параметрах наша модель позволяет практически идентично воспроизводить реальные экспериментальные зависимости *in silico*.

Интересно, что для увеличения продолжительности жизни дрозофилы, достигаемого за счет экспрессии дополнительной СОД, требуется незначительное, всего около 2%, снижение уровня генерации индукторов апоптоза. Это соответствует представлениям о СОД как о высокоспециализированном инструменте антиоксидантной защиты, эффективность которого вне комплексной системы с каталазой, глутатионпероксидазой и низкомолекулярными антиоксидантами достаточно низка.

Как уже упоминалось раньше, наша модель имитирует не только хроническое, но и кратковременное введение геропротекторов. Это позволяет пролить свет на причины разной эффективности введения антиоксидантов в разные периоды жизни дрозофилы. В опытах с ионами Скулачёва с антиоксидантной нагрузкой было показано, что эффективность этих препаратов максимальна при введении в первые дни жизни, а затем резко пада-

ет [2]. На рис. 2 приведена полученная для нашей модели зависимость увеличения продолжительности жизни дрозофилы от времени «введения препарата». Видно, что данная зависимость описывается S-симметричной кривой, с перегибом в районе 30–50 дней.

Эффективность введения препарата в период «молодости» значительно выше, чем в последующие. Введение его в первую декаду жизни дает такой же прирост средней продолжительности жизни, как и введение с 35-го по 100-й день (рис. 3). Введение во второй половине жизни практически неэффективно. Сопоставление данных экспериментов *in vivo* и *in silico* позволяет утверждать, что обнаруженные в работе [2] феномены не связаны с возрастными изменениями в усвоении препарата или эффективности его на молекулярном уровне, а являются следствием статистических закономерностей.

Как мы уже упоминали выше, эксперименты, описанные в работе [12], достаточно надежно показали роль мотонейронов и важность процессов свободнорадикального окисления в старении дрозофилы. В самом грубом приближении, старение дрозофилы может обеспечиваться: во-первых, уменьшением числа мотонейронов, во-вторых — снижением эффективности их работы, в-третьих — комбинацией первого и второго механизмов. Результаты, полученные при помощи нашей модели, показали, что для воспроизведения реальных кривых дожития нормальных мух и мух с добавочной СОД, а также экспериментов с введением антиоксидантов в корм дрозофилы, достаточно учитывать только потерю клеточности.

Впервые определяющая роль потери клеточности посмитотических тканей в механизме старения была постулирована выдающимся физиком Лео Сциллардом [15]. Используя математический аппарат, разработанный им для задач ядерной физики, в частности для расчета критической массы, Сциллард показал, что гибель клеток за счет случайных внутренних событий может вызвать возрастное снижение жизнеспособности организма с динамикой, совпадающей с наблюдаемой в реальных условиях. Для события, приводящего к гибели клетки, Сциллардом было введено понятие «aging hit». Поскольку работа была написана в 1959 г., когда о программируемой клеточной смерти было практически ничего не известно, в качестве причины aging hit предполагалась инактивация необходимых для выживания клетки генов. Это уже тогда выглядело довольно спорным. В частности, на

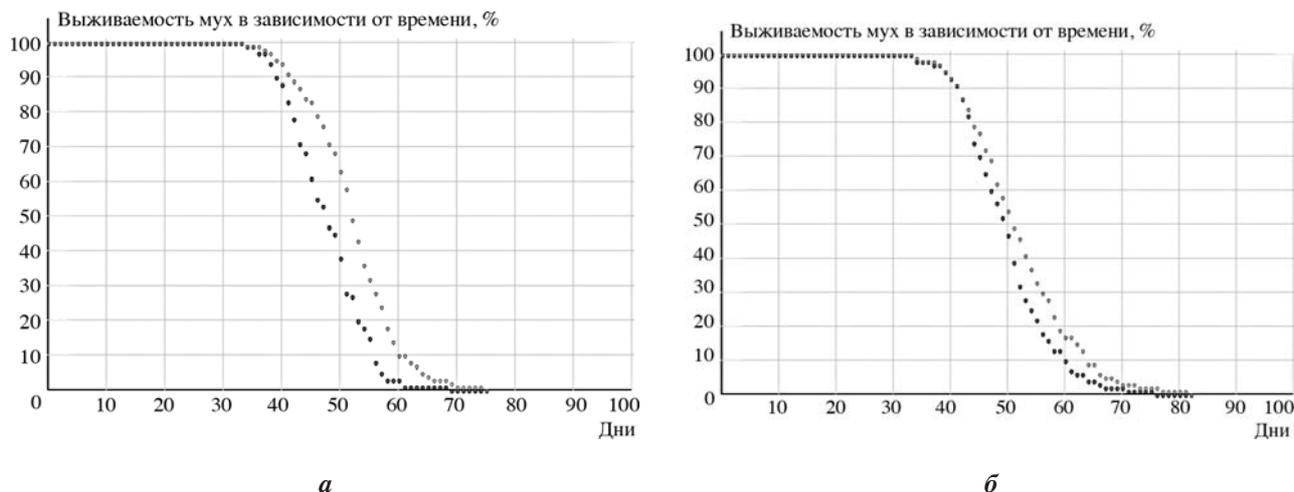


Рис. 3. Моделирование введения антиоксиданта с 1-го по 10-й (а) и с 35-го по 100-й (б) день жизни дрозофил; а — основная группа: 0 выживших особей из 100 на 74-й день, средняя продолжительность жизни 51,3 дня; контрольная — 0 выживших особей из 100 на 68-й день, средняя продолжительность жизни 47,0 дней; б — основная группа: 0 выживших особей из 100 на 81-й день, средняя продолжительность жизни 51,4 дня; контрольная — 0 выживших особей из 100 на 75-й день, средняя продолжительность жизни 49,2 дня

основе накопления генетических дефектов трудно объяснить, каким образом происходит «настройка» необходимой для выживания вида скорости старения. Существует множество примеров, убеждающих, что когда увеличение продолжительности жизни особей способствует процветанию вида, живые системы могут достаточно быстро (в эволюционном масштабе времени) его достигать, то есть отбор на увеличение продолжительности жизни может быть весьма эффективным. Известно, например, что средняя продолжительность жизни имеющих равную массу тела «индивидуальных» и «социальных» грызунов различается в десятки раз. Аналогичная картина характерна и для насекомых. Одиноким осы, от которых произошли муравьи, живут не более одного сезона, а максимальная зарегистрированная продолжительность жизни царицы рыжего лесного муравья около 18 лет. При 98% сходстве геномов средняя продолжительность жизни человека превышает таковую для шимпанзе (в щадящих условиях зоопарка) более чем в два раза. Таких примеров достаточно много. Однако, независимо от гипотетического механизма, сама идея «aging hit» является блестящим примером внедрения в биологию передовой квантово-физической методологии.

Предлагаемое нами представление об aging hit как результате ухода в апоптоз клеток с высокими значениями естественных флюктуаций выработки индукторов апоптоза лишено вышеназванных недостатков, для «настройки» нужного уровня антиоксидантной активности и порога апоптоза

достаточно локальных генетических изменений. Во всяком случае, эволюционно близкие домовый мышь грызуны-долгожители — белоногая мышь и голый землекоп отличаются повышенной устойчивостью клеток к пероксиду водорода [6, 9]. Наша модель показывает, что одно это позволяет гипотетически объяснить их более медленное старение.

Развиваемый нами подход позволяет сделать ряд выводов, необходимых для объяснения удивительного геронтологического феномена из жизни насекомых — чрезвычайно больших различий по продолжительности жизни между рабочими и плодовитыми особями общественных видов. Продолжительность жизни рабочих пчел составляет несколько недель, а пчелиной королевы — до 5 лет. При этом, с генетической точки зрения, рабочие пчелы и королева из одного улья являются сестрами-близнецами [13].

Как показывают вычислительные эксперименты, наиболее существенный параметр для скорости старения при работе смоделированного нами механизма — это соотношение величины порога запуска апоптоза, среднего значения уровня генерации индукторов апоптоза и стандартного отклонения, при этом влияние величины порога особенно впечатляет. Например, увеличение значения порога со 141 до 174,5 (менее чем на 24%) в эксперименте, результаты которого приведены на рис. 2, б (при неизменных прочих параметрах), приводит к увеличению средней продолжительности жизни особей до 10 тыс. дней (рис. 4). В работе [13] приведены факты, свидетельствующие о том, что

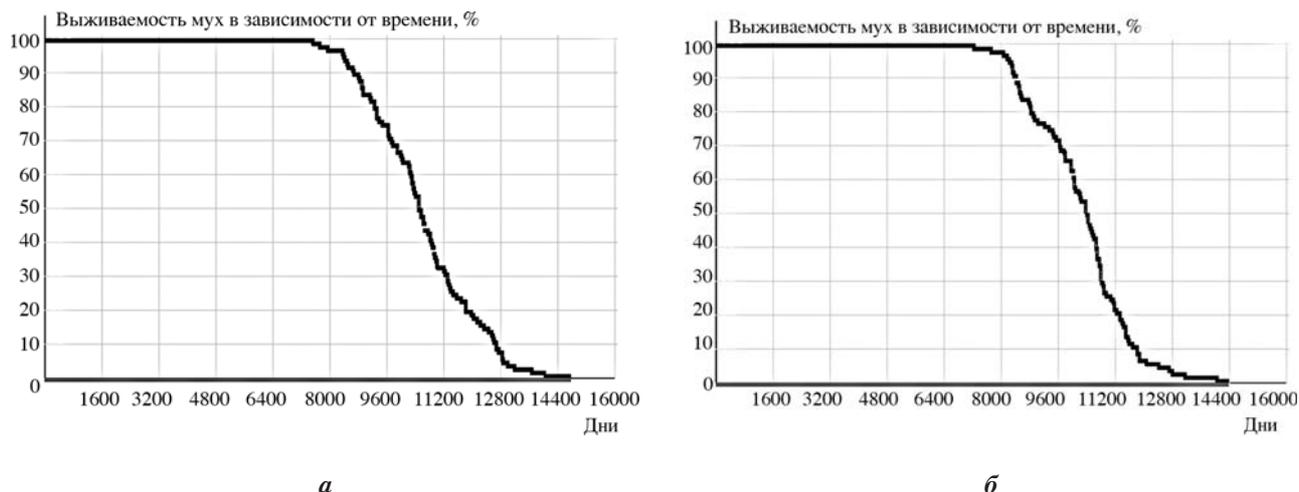


Рис. 4. Моделирование старения дрозофилы при увеличении значения порога апоптоза на 24% (а) или при снижении стандартного отклонения выработки апоптозных сигналов на 44% (б); исходные параметры модели аналогичны рис. 1, б; а — контрольная группа: 0 выживших особей из 100 на 14715-й день, средняя продолжительность жизни 10594,2 дня; б — контрольная группа: 0 выживших особей из 100 на 14316-й день, средняя продолжительность жизни 10258,8 дня

пчелиные королевы значительно устойчивее рабочих пчел к летальному действию внутриклеточного генератора супероксид-аниона параквата, что может быть связано как с большей активностью антиоксидантных механизмов, так и с повышением порога ухода клеток в апоптоз.

Эта величина зависит от чувствительности и концентрации клеточных детекторов АФК, наиболее известный из которых — белок $p53$. Известно, однако, что потеря чувствительности белка $p53$ к АФК чревата усилением канцерогенеза [14]. В ходе эволюционного процесса этот побочный эффект может быть преодолен развитием независимых от апоптоза механизмов защиты от рака. Для медицины путь замедления старения, обусловленный снижением чувствительности к апоптозным сигналам, является, по-видимому, тупиковым. Моделирование показывает, что значительного снижения скорости старения можно добиться и за счет снижения межклеточных вариаций уровня апоптозных сигналов, без изменения их среднего уровня и величины порога ухода в апоптоз. Какими системами определяется уровень варьирования выработки АФК отдельными клетками, в настоящее время неизвестно. Вполне вероятно, что этот показатель, как один из ключевых для взаимодействия клеток многоклеточного организма, находится под биологическим (генетическим?) контролем. Изучение этого вопроса имеет большое теоретическое значение, а для задач практической геронтологии он является, по-видимому, одним из ключевых.

Литература

1. Анисимов В. Н. Можно ли получить однозначный ответ на вопрос: существует ли программа старения? // Рос. хим. журн. 2009. Т. 53. № 3. С. 10–19.
2. Анисимов В. Н., Бакеева Л. Е., Егормин П. А. и др. Производное пластохинона, адресованное в митохондрии, как средство, прерывающее программу старения. 5. SKQ1 увеличивает продолжительность жизни и предотвращает развитие признаков старения // Биохимия. 2008. Т. 73. № 12. С. 1665–1670.
3. Кнут Д. Искусство программирования (пер. с англ.). М.–СПб.–Киев: Вильямс, 2000. Т. 2. С. 146–157.
4. Манских В. Н. Пути гибели клетки и их биологическое значение // Цитология. 2007. Т. 49. № 11. С. 909–915.
5. Северин Ф. Ф., Скулачев В. П. Запрограммированная клеточная смерть как мишень для борьбы со старением организма // Успехи геронтол. 2009. Т. 22. № 1. С. 37–48.
6. Скулачев В. П. Попытка биохимиков атаковать проблему старения: «Мегапроект» по проникающим ионам. Первые итоги и перспективы // Биохимия. 2007. Т. 72. № 12. С. 1572–1586.
7. Чистяков В. А., Денисенко Ю. В. Возрастная потеря клеточности: исследование *in silico* // Рос. хим. журн. 2009. Т. 53. № 3. С. 105–110.
8. Bahadorani S., Bahadorani P., Phillips J. P., Hilliker A. J. The effects of vitamin supplementation on Drosophila life span under normoxia and under oxidative stress // J. Geront. A Biol. Sci. Med. Sci. 2008. Vol. 63. № 1. P. 35–42.
9. Csiszar N., Labinskyy N., Zhao X. et al. Vascular superoxide and hydrogen peroxide production and oxidative stress resistance in two closely related rodent species with disparate longevity // Aging Cell. 2007. Vol. 6. № 6. P. 783–797.
10. Gavrilov L. A., Gavrilova N. S. The biology of life span: a quantitative approach. New York: Harwood Academic Publisher, 1991.
11. Landgraf M., Thor S. Development of Drosophila motoneurons: specification and morphology // Semin. Cell Dev. Biol. 2006. Vol. 17. № 1 P. 3–11.
12. Parkes T. L., Elia A. J., Dickinson D. et al. Extension of Drosophila lifespan by overexpression of human SOD1 in motoneurons // Nat. Genet. 1998. № 2. P. 171–174.

13. Remolina S. C., Hughes K. A. Evolution and mechanisms of long life and high fertility in queen honey bees // AGE. 2008. Vol. 30. № (2–3). P. 177–185.

14. Rodier F., Campisi J., Bhaumik D. Two faces of p53: aging and tumor suppression // Nucleic Acids Res. 2007. Vol. 35. № 22. P. 7475–7484.

15. Scillard L. On the nature of the aging process // Proc. nat. Acad. Sci. USA. 1959 Vol. 45. P. 30–45.

16. Wicks S., Bain N., Duttaroy A. et al. Hypoxia rescues early mortality conferred by superoxide dismutase deficiency // Free Radic. Biol. Med. 2009 Vol. 46. № 2. P. 176–181.

Adv. gerontol. 2010. Vol. 23, № 4. P. 557–563

V. A. Chistyakov, Yu. V. Denisenko

SIMULATION OF DROSOPHILA AGING IN SILICO

The Research Institute of Biology, Southern Federal University, 194/1 pr. Stachki, Rostov-on-Don 344104;
e-mail: vladimirchi@yandex.ru

One of the main tasks of modern gerontology is isolation of the group of phenomena essential for aging from epiphenomena accompanying them. The modern methods of simulation modeling may be the proper tool for correct isolation. The point of their application is reproduction of external aging manifestations *in silico*, and, in the first place, of standard survival curves with the help of the simplest internal mechanism. Such a mechanism seems to be the prime mover of aging. The aging model of one the most popular objects of experimental biology, a fruit fly *Drosophila melanogaster* created by us (<http://winmobile.biz/moton/moto.html>), is based on the assumption that the key mechanism of aging is cellularity loss, the speed of which is determined by the parameters of active oxygen forms generation in motoneurons.

Key words: simulation modeling, age cellularity loss, motoneuron, apoptosis, aging hit