

УДК 575.191:612.014.24

**А.Г. Гончаров¹, К.Ю. Попадъин¹, И.И. Козенков¹, А.Г. Михайлова¹,
В.В. Лобанова¹, М.А. Татаркина¹, Д.В. Ильющенко¹, И.В. Реверчук¹,
А.М. Тынтерова¹, А.А. Двирский², А.Х. Джигкаев³,
Е.В. Тимофеева¹, К.В. Гунбин¹**

МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ ДЕТЕРМИНАНТ СОМАТИЧЕСКОЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ГЕТЕРОПЛАЗМИИ ПОЖИЛЫХ ЛЮДЕЙ

¹ ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»,
г. Калининград, Российская Федерация;

² ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского»
Минобрнауки России, г. Симферополь, Российская Федерация;

³ Центр высоких медицинских технологий МЗ РФ,
г. Калининград, Российская Федерация

Резюме. В статье обосновывается алгоритм и методология исследования, нацеленного на поиск и анализ детерминант соматической митохондриальной гетероплазмы пожилых людей. Старение рассматривается как сложившийся в процессе эволюции процесс, характеризующийся снижением всех основных биологических функций и сопровождающийся постепенной деградацией органов, тканей и систем организма, приведена классификация основных гипотез и теорий старения. Отмечена необходимость разработки диагностических критериев и маркеров, позволяющих дифференцировать понятия «здоровое старение» от болезней пожилого возраста. Отдельно авторы анализируют роль митохондрий в развитии возрастных изменений, связанных с развитием нейродегенерации и мышечной дистрофии. Отмечено, что развитие старческих изменений в той или иной степени связаны с основной функцией митохондрий, а именно окислением питательных веществ и производством молекул АТФ — универсального источника энергии для большинства биологических процессов в клетках. Для митохондриального генома предложен движущий механизм, объясняющий, каким образом митохондриальные соматические мутации могут приводить к некоторым фенотипам старения — нейродегенерации и мышечной дистрофии. Для установления связи между митохондриальными соматическими делециями и возрастными изменениями разработан алгоритм и методология, базирующиеся на комплексном изучении анализ детерминант соматической митохондриальной гетероплазмы пожилых людей на когорте пожилых людей. Планируется проанализировать динамику митохондриальных соматических мутаций в мышечных тканях (биопсии) для 450 пожилых добровольцев. Авторами предлагается оригинальный подход к определению гетероплазмы мтДНК и выявлению *de-novo* мутаций, включающий обогащение фракций митохондрий и очистке мтДНК мышечной ткани, а также методика количественной оценки копийности мтДНК для нормировки количества геномного материала образцов. Полученный материал будет использован для подготовки библиотек для секвенирования на NGS-платформах. В последующем данные биоинформатического анализа будут сопоставлены с результатами невролого-психологических исследований, включающими оценку уровня когнитивных процессов, наличие астенических расстройств, оценку реабилитационного потенциала пациента. Предполагается, что этот блок позволит нам в дальнейшем выделить среди добровольцев как минимум три группы, а именно: лиц с нормальным старением (healthy aging), пациентов с ослаблением умственных и физических способностей, связанных с нейродегенеративными процессами или пациентов с сосудистыми патологиями. С целью поиска в иммунной системе информативных маркеров, позволяющих дифференцировать «здоровое старение» от болезней пожилого возраста, предполагается произвести корреляционный анализ результатов оценки иммунного и цитокинового статуса с данными клинических и биоинформационных исследований.

Ключевые слова: методология, здоровое старение, митохондриальная гетероплазмия, неврологический статус, психологическое тестирование, иммунный статус

Конфликт интересов отсутствует.

Контактная информация автора, ответственного за переписку:

Гончаров Андрей Геннадьевич

agoncharov59@mail.ru

Дата поступления 14.07.2022 г.

Образец цитирования:

Гончаров А.Г., Попадьян К.Ю., Козенков И.И., Михайлова А.Г., Лобанова В.В., Татаркина М.А., Ильющенко Д.В., Реверчук И.В., Тынтерова А.М., Двирский А.А., Джигкаев А.Х., Тимофеева Е.В., Гунбин К.В. Методологические подходы к изучению детерминант соматической митохондриальной гетероплазмии пожилых людей. Вестник уральской медицинской академической науки. 2022, Том 19, №3, с. 322–332, DOI: 10.22138/2500-0918-2022-19-3-322-332

Актуальность

Объявленное Организацией Объединенных Наций «Десятилетие здорового старения» (2021–2030 гг.) предполагает сотрудничество правительств, гражданского и научного сообществ, нацеленное на улучшение качества жизни людей пожилого и старческого возраста. Неуклонный рост доли лиц старческого возраста в населении планеты ставит перед исследователями вопросы о соотношении социальных детерминант этого явления и биологических факторов развития старости. С биологической точки зрения старение можно рассматривать как естественный, сформировавшийся в ходе эволюции процесс, характеризующийся снижением всех основных биологических функций и сопровождающийся постепенной деградацией органов, тканей и систем организма. Важнейшей чертой, сопутствующей старению человека, наряду со снижением адаптационных возможностей организма, является снижение когнитивных функций, что отсутствует у других видов животных. В специальной литературе отдельно выделяют понятие «нормальное старение» (МКБ 10 — Старость (R54)), как естественный процесс, который следует отличать от «патологического старения» и болезней старческого возраста. Важно отметить, что болезни пожилого возраста развиваются на фоне характерного для лиц пожилого возраста снижения функциональной активности ряда основных систем и органов. При этом сходная клиническая симптоматика отмечается и у «здоровых стариков», и у лиц с заболеваниями, которые мы относим к болезням пожилого возраста. Например, снижение когнитивных функций отмечается и у людей, страдающих болезнью Альцгеймера, и у пожилых лиц, однако количественная степень проявления этого признака отличается — падение когнитивных функций намного сильнее при болезни Альцгеймера по сравнению со здоровым старением. Таким образом, нормальное, или «здоровое старение», необходимо не только качественно, но и количественно дифференцировать от болезней старческого возраста, перечень которых достаточно обширен: атеросклероз и связанные с ним сердечно-сосудистые заболевания, опухолевые заболевания, болезни опорно-двигательного аппарата, катаракта, диабет 2 типа, болезнь Альцгеймера и др. [11]. Как видно из вышесказанного, если с представлениями о «болезнях старения» удалось более или менее сформировать их перечень и существенно продвинуться в представлениях об их патогенезе, то понятие «здоровое старение» до сих пор точно не обозначено и, по-видимому, пока можно ограничиться понятием в следующей формулировке: «здоровое старение — это состояние у лиц старше 80-ти лет, характеризующееся снижением функциональной активности организма при отсутствии острых и хронических заболеваний, в т.ч. «болезней старости». Еще более сложным является вопрос о причинах и механизмах развития старческих изменений.

Цель исследования

Разработать алгоритм и методологию исследования, нацеленного на поиск и анализ детерминант соматической митохондриальной гетероплазмии пожилых людей

Методология исследования

Теории старения

Старение является крайне сложным и комплексным процессом. С одной стороны, оно ассоциировано с множеством признаков, таких как укорочение теломер, изменение профиля экспрессии генов (например, падение уровня экспрессии генов, вовлеченных в иммунную систему и митохондриальный метаболизм), увеличение транскрипционного шума, накопление ошибок фолдинга белков, накопление соматических мутаций в ядерном и митохондриальном геномах и так далее. С другой стороны, среди всех этих признаков крайне сложно выделить главные (движущие) факторы, приводящие к старению, и второстепенные (сопутствующие) факторы, являющиеся лишь следствием старения (нейтральным следствием движущих факторов). К настоящему времени сформулировано, с той или иной степенью доказательности, более трехсот гипотез и теорий, посвященных этому явлению. В ряде случаев эти теории перекликаются и дополняют друг друга, и по-видимому каждая из них имеет право на жизнь. Все современные теории старения можно условно разбить на две большие группы [7]. Первая группа отводит ведущую роль повреждениям и ошибкам, которые накапливаются в организме в ходе онтогенеза. Сторонники второй группы ведущим фактором считают, что старение является запрограммированным, наследственно детерминированным процессом. Не вдаваясь в критическое изложение теорий старения, по-видимому, необходимо признать, что старение является многофакторным процессом, однако вклад того или иного явления (процесса) и их соотношение неравнозначны. Причем, у разных индивидуумов в популяции удельный вклад отдельных факторов, вызывающих старение, существенно различаются. Кроме того, по мнению Gilberto Levy, Bruce Levin (2022), проанализировавших на модели причинно-следственные связи развития старения, причины старческих возрастных изменений эволюционируют вместе с эволюцией человека [9]. Многообразие теорий старения только подчеркивает многогранность и многоуровневость этой важнейшей социальной проблемы.

Митохондриальные теории старения

Важно отметить, что при всем многообразии теорий и гипотез старения, ни одна из них не может отрицать вклад митохондрий в развитие этого процесса. Поскольку развитие старческих изменений в той или иной степени связаны с основной функцией митохондрий, а именно окислением питательных веществ и производством молекул АТФ — универсального источника энергии для большинства биологических процессов в клетках. Согласно одной из них считается, что вырабатываемые при окислительном фосфорилировании активные формы кислорода (АФК) вызывают повреждение митохондрий, повышенной частоте мутаций мтДНК, что в свою очередь приводит к нарушению энергетического баланса клетки и ее деградации [2]. Митохондриально-лизосомальная теория указывает, что повышенное образование в митохондриях АФК приводит к накоплению в лизосомах агрегатов неразлагаемого липофусцина, что, в свою очередь, по мере накопления этого пигмента, приводит к затуханию клеточной биоэнергетики [4]. По мнению Лобачева А.Н., старение клеток, особенно высокодифференцированных (мышечных, нервных, сердечных) связано с возрастным снижением продукции АТФ в результате накопления в митохондриях дефектных делеционных мтДНК [1]. Каждая из изложенных гипотез имеет не только теоретическое, но и экспериментальное обоснование. Таким образом, участие митохондрий, важнейших регуляторов внутриклеточного метаболизма, в процессах старения является неоспоримым.

Рабочая гипотеза

Для митохондриального генома предложен движущий механизм, объясняющий, каким образом митохондриальные соматические мутации могут приводить к некоторым фенотипам старения — нейродегенерации и мышечной дистрофии. Митохондриальный геном мутирует по крайней мере в 10 раз быстрее, чем ядро, и подвержен дополнительному отбору внутри хозяйской клетки. Сочетание высокого темпа мутирования и внутриклеточного отбора приводят к тому, что митохондриальный геном может становиться более «опасным» с возрастом, накапливая эгоистичные мутации; причем непролиферирующие (постмитотические) ткани наиболее уязвимы для таких эгоистичных мутантов — поскольку хозяйские клетки более не делятся, таким образом не конкурируют друг с другом. Например, на нейронах головного мозга человека было продемонстрировано появление первых митохондриальных соматических делеций в возрасте 40–50 лет, далее эти делеции могут

достигать высокого процента гетероплазмии внутри хозяйской клетки и таким образом приводить к деградации всего нейрона через несколько десятков лет. Схожий процесс накопления соматических митохондриальных делеций с возрастом был продемонстрирован на клетках скелетной мускулатуры [6]. Важно подчеркнуть, что митохондриальные соматические делеции в нейронах и клетках скелетной мускулатуры накапливаются с возрастом у всех людей (а не только у больных) и, таким образом, они ассоциированы с нормальным процессом старения (healthy aging), характеризующимся ослаблением умственных и физических способностей человека. Митохондриальные соматические делеции вредны, однако даже среди здоровой выборки населения существует колоссальная изменчивость в возрасте появления делеции и в скорости её экспансии: у кого-то первая делеция становится детектируемой в 20 лет, а у кого-то в 60 лет; у кого-то делеции размножаются крайне быстро и приводят к гибели хозяйской клетки за 10 лет, а у кого-то — за 50 лет. На вопросы, почему, каковы причины такой изменчивости, мы пока не можем ничего ответить. Нами было разработано несколько гипотез, объясняющих возможные причины этой изменчивости [12]. Однако до сих пор мы не могли их протестировать из-за отсутствия больших популяционных данных. Интересно, что все работы, цитируемые нами, были проведены на крайне маленьких выборках: девять образцов мозговой ткани человека [8], четыре образца мозговой ткани человека [5], что обусловлено сложностью получения образцов (особенно нейронов, для чего нужны постмортальные образцы), а также технической сложностью анализа митохондриальной гетероплазмии. Нами разработан экспериментальный подход, позволяющий решить обе эти проблемы, тормозящие прогресс в понимании митохондриальной компоненты старения, анализируя биопсии мышечной ткани (вместо нейронов) и используя методы секвенирования, недоступные научному сообществу ранее (5–10 лет назад). Мы планируем проанализировать динамику митохондриальных соматических мутаций в мышечных тканях (биопсии) для 450 пожилых добровольцев из разнородной этнической выборки.

Алгоритм исследования

Для установления связи между митохондриальными соматическими делециями и возрастными изменениями мы планируем провести анализ детерминант соматической митохондриальной гетероплазмии на когорте пожилых людей, проживающих в Калининградской области. В качестве источника биоматериала выбраны образцы мышечной ткани от 10 до 50 кубических миллиметров, получаемые во время выполнения операции по эндопротезированию тазобедренного или коленного суставов. Получение биоптатов такого объема безопасно, не наносит вреда здоровью пациента и никак не сказывается на дальнейшем процессе восстановления прооперированного больного. Получение биопсийного материала проводится в отделении травматологии и ортопедии ФГБУ Центра высоких медицинских технологий МЗ РФ. Все исследования проводятся в строгом соответствии биоэтическими нормами и правилами, получены заключения независимого этического комитета ФГАО ВО БФУ им. И. Канта и Этического комитета ФГБУ «ФЦВМТ» МЗ РФ.

Формирование популяции добровольцев

Исследуемая популяция: в соответствии с задачами проекта исследуемую когорту составляют добровольцы в возрасте от 60 и более лет. В ходе исследования, нами принято решение о формировании небольшой (контрольной) группы пациентов (до 30 человек) в возрасте 30–45 лет.

Анализ генетического материала

В своей работе мы решили использовать подход по определению гетероплазмии мтДНК и выявлению *de-novo* мутаций, аналогичный использованному в работе В. Arberthuber. В случае исследования генетического материала клеточных органелл (митохондрии, хлоропласты или пластиды) дополнительно требуется очистка от фрагментов ядерного генома, который часто несет в себе транспонированные сегменты генома органелл, таких как, например, NUMT (NUclear-encoded Mitochondrial segments — ядерно-кодируемые участки мтДНК). Для задач по поиску редких аллелей с низкой частотой встречаемости все чаще используют метод подготовки библиотек без этапа амплификации (PCR-free). Такой метод требует подготовки больших количеств исходной ДНК высокой чистоты, порядка 200–1000 нг, но при этом позволяет избежать ошибок амплификации, вносимых полимеразой. Мы адаптировали несколько методик [3] по обогащению фракций ми-

тохондрий и очистке мтДНК так, что в результате становится возможным получать из 80–100 мг относительно бедных митохондриями мышечной и соединительной тканей до 500 нг мтДНК, свободной от примесей РНК и фрагментов ядерного генома. Для оценки степени чистоты фракции человеческой мтДНК от примесей ядерного генома мы адаптировали методику ПЦР-скрининга по участку гена бета-актина и Alu-повторам в человеческом геноме. Также мы разработали методику количественной оценки копийности мтДНК для нормировки количества геномного материала образцов, которые в дальнейшем используются для подготовки библиотек для секвенирования на NGS-платформах.

Нейропсихологическое обследование и оценка иммунного статуса добровольцев

Для последующего биоинформатического анализа данных, их ассоциации с клиническими (биологическими) проявлениями старения, к работе привлечены клинические психологи, неврологи и иммунологи. Мы полагаем, что невролого-психологические исследования позволят нам в дальнейшем выделить среди добровольцев как минимум три группы, а именно: лица с нормальным старением (healthy aging), пациенты с ослаблением умственных и физических способностей, связанными с нейродегенеративными процессами или пациенты с сосудистыми патологиями. В послеоперационный период, по согласованию с лечащим врачом и пациентом, психоневрологи проводят неврологическое обследование добровольцев и ряд психодиагностических тестов (все тесты неинвазивные), позволяющие оценить уровень когнитивных процессов, наличие астенических расстройств, оценить реабилитационный потенциал пациента, проводится анализ записей в истории болезней добровольца.

По мере формирования групп добровольцев с различными типами старения, мы планируем на базе Центра иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта провести оценку иммунного и цитокинового статуса наших волонтеров. В специальной литературе достаточно хорошо освещена тесная взаимосвязь между нервной и иммунной системами. [14]. Несомненным на сегодняшний день является участие клеток иммунной системы в патогенезе основных болезней пожилого возраста: атеросклероза, болезни Альцгеймера и др. [10]. Показано, что старение иммунной системы сопровождается снижением регенеративной способности стареющих мышц [15]. Возможно, что связанные со старением метаболические заболевания, хронические воспалительные состояния, аутоиммунная патология являются результатом нарушения в работе иммунной системы ввиду дисфункции важнейшего митохондриального редокс-регуляторного белка - никотинамид-нуклеотидтрансгидрогеназы [13]. Нами будет предпринята попытка выявить информативные маркеры в иммунной системе, позволяющие дифференцировать «здоровое старение» от болезней пожилого возраста. Предполагается произвести корреляционный анализ полученных результатов с данными клинических и биоинформационных исследований.

Результаты и обсуждение

В настоящее время обследовано более 200 добровольцев. Предварительно сформированы группы с различной степенью депрессии (мягкой, умеренной и высокой степени тяжести) и нарушением когнитивных функций (легкие и умеренные). Проводится оценка корреляционных связей между нейрофизиологическими и когнитивными параметрами в группах: с умеренными когнитивными нарушениями и с нормальными показателями по результатам тестирования. Расчет полученных результатов проводится с использованием пакета прикладных программ R-studio. Анализ качественных признаков осуществляется с помощью критерия χ^2 Пирсона. Две независимые группы сравниваются с помощью U-критерия Манна-Уитни. Анализ различия частот в двух независимых группах проводится при помощи точного критерия Фишера с двусторонней доверительной вероятностью, критерия χ^2 с поправкой Йетса. Уровень статистической значимости $p < 0,05$. Получены предварительные результаты по анализу абсолютной копийности мтДНК для 48 образцов методом цифровой капельной ПЦР, и копийности мтДНК относительно стандарта для еще 120 образцов.

Нельзя однозначно сказать, является ли старение следствием накопления соматических мутаций только в ядерном геноме или только в митохондриальном геноме, либо старение проявляется как эффект тандемной и возрастающей аккумуляции мутаций в обоих геномах. На данный момент накоплены экспериментальные результаты и свидетельства, говорящие в пользу каждого из трех вари-

антов. По результатам нашей работы мы планируем описать основные факторы: генетические, средовые (образ жизни и состояние здоровья), нейропсихологические (в первую очередь когнитивные), ассоциированные с грузом митохондриальных соматических мутаций в мышечной ткани пожилых людей, оценить наличие связи между состоянием иммунной системы и вышеуказанными факторами. Разработанные нашим коллективом методология и алгоритм исследования, по нашему мнению, позволит решить поставленные перед нами задачи.

Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда (проект №21-75-20145)

ЛИТЕРАТУРА

1. Лобачев А.Н. Биогенез митохондрий при дифференциации и старении клеток. М., 1985. ВИНТИ 19.09.85, № 6756-В85 (28 с.) (Статья цитирована по Березина Т.Н. — Вероятностный подход к продолжительности жизни в современных теориях старения // Психолог. – 2016. – № 1. – С. 93 - 106. DOI: 10.7256/2409-8701.2016.1.18716
2. Amorim JA, Coppotelli G, Rolo AP, Palmeira CM, Ross JM, Sinclair DA. Mitochondrial and metabolic dysfunction in ageing and age-related diseases. *Nat Rev Endocrinol.* 2022 Apr;18(4):243-258 doi: 10.1038/s41574-021-00626-7.
3. Arbeithuber B, Hester J, Cremona MA, Stoler N, Zaidi A, Higgins B, Anthony K, Chiaromonte F, Diaz FJ, Makova KD. Age-related accumulation of de novo mitochondrial mutations in mammalian oocytes and somatic tissues. *PLoS Biol.* 2020 Jul 15;18(7):e3000745 doi: 10.1371/journal.pbio.3000745
4. Brunk UT, Terman A. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radic Biol Med.* 2002 Sep 1;33(5):611-9 doi: 10.1016/s0891-5849(02)00959-0
5. Guo X, Popadin KY, Markuzon N, Orlov YL, Kraysberg Y, Krishnan KJ, Zsurka G, Turnbull DM, Kunz WS, Khrapko K. Repeats, longevity and the sources of mtDNA deletions: evidence from 'deletional spectra'. *Trends Genet.* 2010 Aug;26(8):340-3. doi: 10.1016/j.tig.2010.05.006
6. Herbst A, Wanagat J, Cheema N, Widjaja K, McKenzie D, Aiken JM. Latent mitochondrial DNA deletion mutations drive muscle fiber loss at old age. *Aging Cell.* 2016 Dec;15(6):1132-1139 doi: 10.1016/j.arr.2019.100947
7. Johnson AA, Shokhirev MN, Shoshitaishvili B. Revamping the evolutionary theories of aging. *Ageing Res Rev.* 2019 Nov;55:100947 doi: 10.1016/j.arr.2019.100947
8. Kraysberg Y, Kudryavtseva E, McKee AC, Geula C, Kowall NW, Khrapko K. Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons. *Nat Genet.* 2006 May;38(5):518-20 doi: 10.1038/ng1778.
9. Levy G, Levin B. An Evolution-Based Model of Causation for Aging-Related Diseases and Intrinsic Mortality: Explanatory Properties and Implications for Healthy Aging. *Front Public Health.* 2022 Feb 18;10:774668 doi: 10.3389/fpubh.2022.774668.
10. Liu C, Zhang X, Chai H, Xu S, Liu Q, Luo Y, Li S. Identification of Immune Cells and Key Genes associated with Alzheimer's Disease. *Int J Med Sci.* 2022 Jan 1;19(1):112-125. doi: 10.7150/ijms.66422
11. Maresova P, Javanmardi E, Barakovic S, Barakovic Husic J, Tomsone S, Krejcar O, Kuca K. Consequences of chronic diseases and other limitations associated with old age - a scoping review. *BMC Public Health.* 2019 Nov 1;19(1):1431 doi: 10.1186/s12889-019-7762-5
12. Popadin K, Safdar A, Kraysberg Y, Khrapko K. When man got his mtDNA deletions? *Aging Cell.* 2014 Aug;13(4):579-82 doi: 10.1111/accel.12231
13. Regan T, Conway R, Bharath LP. Regulation of immune cell function by nicotinamide nucleotide transhydrogenase. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2022 Apr 1;322(4):C666-C673 doi: 10.1152/ajpcell.00607.2020.
14. Schiller M, Ben-Shaanan TL, Rolls A. Neuronal regulation of immunity: why, how and where? *Nat Rev Immunol.* 2021 Jan;21(1):20-36 doi: 10.1038/s41577-020-0387-1
15. Tidball JG, Flores I, Welc SS, Wehling-Henricks M, Ochi E. Aging of the immune system and impaired muscle regeneration: A failure of immunomodulation of adult myogenesis. *Exp Gerontol.* 2021 Mar;145:111200 doi: 10.1016/j.exger.2020.111200

Авторы

Гончаров Андрей Геннадьевич
ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»
Кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник Центра иммунологии и клеточных биотехнологий
Российская Федерация, 236010, г. Калининград, пр. Победы 189-15
agoncharov59@mail.ru

Попадьин Константин Юрьевич
ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»
Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Центра геномных исследований
Российская Федерация, 236010, г. Калининград, пр. Победы 189-15

Козенков Иван Иванович
ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»
Младший научный сотрудник Центра геномных исследований
Российская Федерация, 236010, г. Калининград, пр. Победы 189-15

Михайлова Алина Геннадьевна
ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»
Младший научный сотрудник Центра геномных исследований
Российская Федерация, 236010, г. Калининград, пр. Победы 189-15

Лобанова Валерия Вадимовна
ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»
Лаборант-исследователь Центра геномных исследований
Российская Федерация, 236010, г. Калининград, пр. Победы 189-15

Татаркина Мария Алексеевна
ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»
Лаборант-исследователь Центра геномных исследований
Российская Федерация, 236010, г. Калининград, пр. Победы 189-15

Ильющенко Дмитрий Владимирович
ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»
Лаборант-исследователь Центра геномных исследований
Российская Федерация, 236010, г. Калининград, пр. Победы 189-15

Реверчук Игорь Васильевич
ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»
Доктор медицинских наук, профессор медицинского института
Российская Федерация, 236010, г. Калининград, пр. Победы 189-15

Тынтерова Анастасия Михайловна
ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»
Кандидат медицинских наук, доцент медицинского института
Российская Федерация, 236010, г. Калининград, пр. Победы 189-15

Двирский Александр Анатольевич
ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», Минобрнауки России
Доктор медицинских наук, профессор, профессор медицинской академии им. С.И. Георгиевского
Российская Федерация, г. Симферополь, пр. Академика Вернадского, 4

Джигкаев Ахсарбек Хазбечирович,

Центр высоких медицинских технологий МЗ РФ
Кандидат медицинских наук, заведующий отделением травматологии и ортопедии
Российская Федерация, 238312 Калининградская обл., Гурьевский район, пос. Родники, Калининградское шоссе, д. 4

Тимофеева Елена Витальевна
ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»
Аспирант медицинского института
Российская Федерация, 236010, г. Калининград, пр. Победы 189-15

Гунбин Константин Владимирович
ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»
Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Центра геномных исследований
Российская Федерация, 236010, г. Калининград, пр. Победы 189-15

*A.G. Goncharov¹, K.Yu. Popad'in¹, I.I. Kozenkov¹, A.G. Mikhailova¹,
V.V. Lobanova¹, M.A. Tatarkina¹, D.V. Ilyushchenko¹, I.V. Reverchuk¹,
A.M. Tynterova¹, A.A. Dvirsky², A.K. Dzhigkaev³,
E.V. Timofeeva¹, K.V. Gunbin¹*

METHODOLOGICAL APPROACHES TO THE STUDY OF THE DETERMINANTS OF SOMATIC MITOCHONDRIAL HETEROPLASMY IN THE ELDERLY

¹ Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation;

² Crimean Federal University named after V.I. Vernadsky, Simferopol, Russian Federation;

³ Center for High Medical Technologies, Kaliningrad, Russian Federation

Abstract. The article substantiates the algorithm and methodology of the study aimed at search and analysis of the determinants of somatic mitochondrial heteroplasmy in the elderly people. Aging is considered as a process that has developed in the process of evolution, characterized by a decrease in all basic biological functions and accompanied by a gradual degradation of organs, tissues and systems of the body, a classification of the main hypotheses and theories of aging is given. The need to develop diagnostic criteria and markers to differentiate the concept of «healthy aging» from diseases of the elderly is noted. Separately, the authors analyze the role of mitochondria in the development of age-related changes associated with the development of neurodegeneration and muscular dystrophy. It has been noted that the development of senile changes is to some extent associated with the main function of mitochondria, namely the oxidation of nutrients and the production of ATP molecules, a universal energy source for most biological processes in cells. For the mitochondrial genome, a driving mechanism has been proposed to explain how mitochondrial somatic mutations can lead to certain aging phenotypes — neurodegeneration and muscular dystrophy. To establish the relationship between mitochondrial somatic deletions and age-related changes, an algorithm and methodology have been developed based on a comprehensive study of the determinants of somatic mitochondrial heteroplasmy in a cohort of elderly people. It is planned to analyze the dynamics of mitochondrial somatic mutations in muscle tissues (biopsies) for 450 elderly volunteers. The authors propose an original approach to the determination of mtDNA heteroplasmy and the detection of de-novo mutations, including the enrichment of mitochondrial fractions and the purification of mtDNA from muscle tissues, as well as a method for quantifying mtDNA copy number to normalize the amount of genomic material in the samples. The resulting material will be used to prepare libraries for sequencing on NGS platforms. Subsequently, the data after bioinformatic analysis will be compared with the results of neurological and psychological studies, including an assessment of the level of cognitive processes, the presence of asthenic disorders, and an assessment of the patient's rehabilitation

potential. It is assumed that this psychoneurological block will allow us to further distinguish at least three groups among volunteers, namely: persons with normal aging (healthy aging), patients with a weakening of mental and physical abilities associated with neurodegenerative or with vascular pathologies. In order to search for informative markers in the immune system that allow differentiating «healthy aging» from diseases of the elderly, it is proposed to perform a correlation analysis between the assessment of immune and cytokine status and the data of clinical and bioinformatic studies.

Keywords: methodology, healthy aging, mitochondrial heteroplasmy, neurological status, psychological testing, immune status

There is no conflict of interest.

Contact details of the corresponding author:

Andrey G. Goncharov

agoncharov59@mail.ru

Received 13.07.2022

For citation:

Goncharov A.G., Popad'in K.Yu., Kozenkov I.I., Mikhailova A.G., Lobanova V.V., Tatarkina M.A., Ilyushchenko D.V., Reverchuk I.V., Tynterova A.M., Dvirsky A.A., Dzhigkaev A.K., Timofeeva E.V., Gunbin K.V. Methodological approaches to the study of the determinants of somatic mitochondrial heteroplasmy in the elderly. *Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki. = Journal of Ural Medical Academic Science.* 2022, Vol. 19, no. 3, pp. 322–332. DOI: 10.22138/2500-0918-2022-19-3-322-332 (In Russ)

REFERENCES

1. Lobachev A.N. Mitochondrial biogenesis during cell differentiation and aging. *M.*, 1985. VINITI 19.09.85, No. 6756-B85 (28 p.) (The article is cited after Berezina T.N. - A probabilistic approach to life expectancy in modern theories of aging // *Psychologist.* - 2016. - No. 1. - pp. 93 - 106. doi: 10.7256/2409-8701.2016.1.18716 (in Russ))
2. Amorim JA, Coppotelli G, Rolo AP, Palmeira CM, Ross JM, Sinclair DA. Mitochondrial and metabolic dysfunction in ageing and age-related diseases. *Nat Rev Endocrinol.* 2022 Apr;18(4):243-258 doi: 10.1038/s41574-021-00626-7.
3. Arbeithuber B, Hester J, Cremona MA, Stoler N, Zaidi A, Higgins B, Anthony K, Chiaromonte F, Diaz FJ, Makova KD. Age-related accumulation of de novo mitochondrial mutations in mammalian oocytes and somatic tissues. *PLoS Biol.* 2020 Jul 15;18(7):e3000745 doi: 10.1371/journal.pbio.3000745
4. Brunk UT, Terman A. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radic Biol Med.* 2002 Sep 1;33(5):611-9 doi: 10.1016/s0891-5849(02)00959-0
5. Guo X, Popadin KY, Markuzon N, Orlov YL, Kraytsberg Y, Krishnan KJ, Zsurka G, Turnbull DM, Kunz WS, Khrapko K. Repeats, longevity and the sources of mtDNA deletions: evidence from 'deletional spectra'. *Trends Genet.* 2010 Aug;26(8):340-3. doi: 10.1016/j.tig.2010.05.006
6. Herbst A, Wanagat J, Cheema N, Widjaja K, McKenzie D, Aiken JM. Latent mitochondrial DNA deletion mutations drive muscle fiber loss at old age. *Aging Cell.* 2016 Dec;15(6):1132-1139 doi: 10.1016/j.arr.2019.100947
7. Johnson AA, Shokhirev MN, Shoshitaishvili B. Revamping the evolutionary theories of aging. *Ageing Res Rev.* 2019 Nov;55:100947 doi: 10.1016/j.arr.2019.100947
8. Kraytsberg Y, Kudryavtseva E, McKee AC, Geula C, Kowall NW, Khrapko K. Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons. *Nat Genet.* 2006 May;38(5):518-20 doi: 10.1038/ng1778.
9. Levy G, Levin B. An Evolution-Based Model of Causation for Aging-Related Diseases and Intrinsic Mortality: Explanatory Properties and Implications for Healthy Aging. *Front Public Health.* 2022 Feb 18;10:774668 doi: 10.3389/fpubh.2022.774668.
10. Liu C, Zhang X, Chai H, Xu S, Liu Q, Luo Y, Li S. Identification of Immune Cells and Key Genes associated with Alzheimer's Disease. *Int J Med Sci.* 2022 Jan 1;19(1):112-125. doi: 10.7150/ijms.66422
11. Maresova P, Javanmardi E, Barakovic S, Barakovic Husic J, Tomsone S, Krejcar O, Kuca K. Consequences of chronic diseases and other limitations associated with old age - a scoping review. *BMC*

Public Health. 2019 Nov 1;19(1):1431 doi: 10.1186/s12889-019-7762-5

12. Popadin K, Safdar A, Kraysberg Y, Khrapko K. When man got his mtDNA deletions? *Aging Cell*. 2014 Aug;13(4):579-82 doi: 10.1111/accel.12231

13. Regan T, Conway R, Bharath LP. Regulation of immune cell function by nicotinamide nucleotide transhydrogenase. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2022 Apr 1;322(4):C666-C673 doi: 10.1152/ajpcell.00607.2020.

14. Schiller M, Ben-Shaanan TL, Rolls A. Neuronal regulation of immunity: why, how and where? *Nat Rev Immunol*. 2021 Jan;21(1):20-36 doi: 10.1038/s41577-020-0387-1

15. Tidball JG, Flores I, Welc SS, Wehling-Henricks M, Ochi E. Aging of the immune system and impaired muscle regeneration: A failure of immunomodulation of adult myogenesis. *Exp Gerontol*. 2021 Mar;145:111200 doi: 10.1016/j.exger.2020.111200

Authors

Andrey G. Goncharov

Immanuel Kant Baltic Federal University

Candidate of Medical Sciences, Senior Researcher, Center for Immunology and Cellular Biotechnologies

189-15 Pobedy av. Kaliningrad Russian Federation 236010

agoncharov59@mail.ru

Konstantin Yu. Popad'in

Immanuel Kant Baltic Federal University

Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Center for Genomic Research

189-15 Pobedy av. Kaliningrad Russian Federation 236010

Ivan I. Kozenkov

Immanuel Kant Baltic Federal University

Junior Researcher, Center for Genomic Research

189-15 Pobedy av. Kaliningrad Russian Federation 236010

Alina G. Mikhailova

Immanuel Kant Baltic Federal University

Junior Researcher, Center for Genomic Research

189-15 Pobedy av. Kaliningrad Russian Federation 236010

Valeria V. Lobanova

Immanuel Kant Baltic Federal University

Research Laboratory Assistant, Center for Genomic Research

189-15 Pobedy av. Kaliningrad Russian Federation 236010

Maria A. Tatarkina

Immanuel Kant Baltic Federal University

Research Laboratory Assistant, Center for Genomic Research

189-15 Pobedy av. Kaliningrad Russian Federation 236010

Dmitry V. Ilyushchenko

Immanuel Kant Baltic Federal University

Laboratory Researcher, Center for Genomic Research

189-15 Pobedy av. Kaliningrad Russian Federation 236010

Igor V. Reverchuk

Immanuel Kant Baltic Federal University

Doctor of Medical Sciences, Professor of the Medical Institute

189-15 Pobedy av. Kaliningrad Russian Federation 236010

Anastasia M. Tynterova
Immanuel Kant Baltic Federal University
Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Medical Institute
189-15 Pobedy av. Kaliningrad Russian Federation 236010

Alexander A. Dvirsky
Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Crimean Federal University
named after V.I. Vernadsky, Russian Ministry of Education and Science
Doctor of Medical Sciences, Professor, Professor of the Medical Academy. S.I. Georgievsky
4 Academician Vernadsky av. Simferopol Russian Federation

Akhsarbek Kh. Dzhigkaev
Center for High Medical Technologies of the Ministry of Health of the Russian Federation
Candidate of Medical Sciences, Head of the Department of Traumatology and Orthopedics
4 Kaliningradskoye shosse pos. Rodniki Gur'yevskiy rayon Kaliningradskaya obl. 238312

Elena V. Timofeeva
Immanuel Kant Baltic Federal University
PhD student of the Medical Institute
189-15 Pobedy av. Kaliningrad Russian Federation 236010

Konstantin V. Gunbin
Immanuel Kant Baltic Federal University
Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Center for Genomic Research
189-15 Pobedy av. Kaliningrad Russian Federation 236010