

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук

На правах рукописи

Каткова-Жукоцкая Ольга Александровна

**НЕМАТОДЫ *CAENORHABDITIS ELEGANS* КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ
ВЛИЯНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ МЕТАБОЛИЗМА
МИКРОБИОТЫ НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ ХОЗЯИНА**

Специальность 1.5.7 – Генетика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор
Миронов Александр Сергеевич

Москва – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	8
1.1 Нематоды <i>Caenorhabditis elegans</i> , общие сведения.....	8
1.2 <i>C. elegans</i> как модельный объект для биогеронтологических исследований	10
1.3 <i>C. elegans</i> как модельный объект для изучения взаимосвязи продолжительности жизни и стрессоустойчивости.....	17
1.4 <i>C. elegans</i> как модельный объект для изучения взаимодействия «хозяин-микробиота».....	19
Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	26
2.1 Штаммы бактерий и нематод <i>C. elegans</i>	26
2.2 Получение и культивирование микроорганизмов.....	28
2.3 Культивирование нематод <i>C. elegans</i>	34
2.4 Изучение влияния штаммов <i>B. subtilis</i> Δnos на термотолерантность нематод.....	37
2.5 Определение концентрации АИКАР.....	37
2.6 Определение воздействия NO на нематод	38
2.7 Методика постановки экспериментов с антисмысловыми РНК	39
2.8 Статистическая обработка данных	40
Глава 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	41
3.1 Продуцируемый бактериями оксид азота увеличивает продолжительность жизни и термотолерантность нематод <i>C. elegans</i>	41
3.2 Изучение влияния мутаций в генах, контролирующих аэробное дыхание микробиоты, на продолжительность жизни нематод.....	52
3.3 Влияние антиоксидантов на продолжительность жизни <i>C. elegans</i>	55
3.4 Изучение механизмов ингибирующего действия глюкозы на продолжительность жизни нематод.....	58
3.5 Изучение влияния АИКАР на продолжительность жизни <i>C. elegans</i>	67
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	84
ВЫВОДЫ.....	87
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	88
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	90
БЛАГОДАРНОСТИ.....	111
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	112

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*) – свободноживущие почвенные нематоды, питающиеся микроорганизмами.

Начало XXI века можно считать «эпохой *Caenorhabditis elegans*». Ряд открытий, совершенных при помощи *C. elegans*, были удостоены Нобелевских премий. Нематоды, геном которых был полностью секвенирован в 1998 году [*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998], стали традиционным модельным организмом для разнообразных генетических, биохимических, медицинских и биogerонтологических исследований. Благодаря биоинформационным подходам, выявлена высокая степень гомологии генов нематод с генами человека [Helmcke et al., 2010]. Наряду с линией *C. elegans* дикого типа N2 Bristol, являющейся стандартной для большинства исследований, существует большое количество мутантных по различным генам линий.

C. elegans – прекрасная модель для изучения различных биологических процессов, включая энергетический метаболизм [Jones et al., 2009], иммунитет [Schulenburg et al., 2004] и старение [Kenyon, 2010]. В лабораторных условиях нематоды растут, питаясь газоном бактериальной культуры, но ранее в исследованиях не учитывалось, что они используют активно метаболизирующие бактерии. В течение длительного периода бактериальной подложке не придавали значения и не рассматривали ее как важный фактор, влияющий на продолжительность жизни особей. Однако живые бактерии представляют собой как основной источник пищи, так и комменсальную кишечную микрофлору нематод в природных и лабораторных условиях, и могут существенно влиять на жизнедеятельность организма-хозяина [Larsen et al., 2002].

За последние десятилетия значительно расширился спектр исследований влияния метаболических процессов, протекающих в бактериях, на жизнедеятельность *C. elegans*. Сотрудники нашей лаборатории принимают активное участие в изучении влияния бактериального метаболизма на нематод. Одной из первых работ по данной тематике стало исследование положительного влияния оксида азота, синтезируемого бактериями, на продолжительность жизни и термотолерантность *C. elegans* [Gusarov et al., 2013]. Это исследование представляет собой пример межвидовой сигнализации с помощью небольшой молекулы и иллюстрирует важное значение комменсальных бактерий для организма-хозяина. В последующие годы различные аспекты взаимосвязи бактериального метаболизма и жизнедеятельности *C. elegans* стали предметом активного изучения.

Настоящая работа посвящена исследованию различных путей влияния метаболизма микробиоты на продолжительность жизни хозяина с использованием комбинированной межвидовой модели «*C. elegans* – бактерия», сочетающей в себе преимущества нематод и бактерий как модельных систем.

Цели и задачи исследования

Цель настоящей работы – изучение различных аспектов влияния метаболизма микробиоты на продолжительность жизни хозяина с использованием межвидовой модели «*C. elegans* – бактерия».

В соответствии с поставленной целью сформулированы следующие задачи:

1. Изучение влияния метаболизма *Bacillus subtilis* на продолжительность жизни и термотолерантность *C. elegans* через оксид азота.
2. Определение влияния антиоксидантов и мутаций в генах, контролирующих аэробное дыхание микробиоты, на жизнедеятельность организма-хозяина.
3. Изучение механизмов ингибирующего действия глюкозы на продолжительность жизни нематод.
4. Изучение влияния экзогенного АИКАР и эндогенного АИКАР, продуцируемого штаммом *B. subtilis*, на продолжительность жизни *C. elegans*.

Теоретическая значимость и научная новизна работы

Результаты проведенных исследований расширяют представление о молекулярных механизмах влияния бактериального метаболизма на жизнеспособность нематод. Продemonстрирована важная роль бактериального оксида азота в физиологии нематод, что представляет собой пример межвидовой сигнализации, а также подчеркивает большое значение комменсальных бактерий для организма-хозяина. Впервые установлено положительное влияние мутаций в генах, контролирующих аэробное дыхание микробиоты, на продолжительность жизни модельных организмов, связанное с эффектом митохондриального гормезиса. Показано, что постоянное употребление экзогенных антиоксидантных добавок, в том числе полученных естественным путем из микробиоты, приводит к сокращению продолжительности жизни нематод *C. elegans*, подтверждая важную роль наличия сбалансированного уровня антиоксидантов для поддержания нормальной жизнедеятельности организма. Продemonстрировано, что наряду с сокращением продолжительности жизни, глюкоза обуславливает устойчивость нематод к действию таких оксидантов, как диамид и паракват. В результате проведенной работы впервые показано, что гликоген ответственен за сокращение

продолжительности жизни нематод. Сделано заключение, что именно гликоген является ответственным за быстрое восстановление глутатиона и детоксикацию активных форм кислорода в присутствии высокой концентрации глюкозы. Полученные данные свидетельствуют о том, что умеренный окислительный стресс способствует мобилизации защитных сил организма, не функционирующих в обычных условиях. Установлено, что гликоген регулирует продолжительность жизни нематод независимо от DAF-16. Исследована роль АМФ-зависимой протеинкиназы (АМРК) в регуляции продолжительности жизни *C. elegans*. Впервые продемонстрировано, что регуляторный метаболит АИКАР увеличивает продолжительность жизни *C. elegans* и обладает геропротекторным эффектом. Полученный штамм-продуцент АИКАР *B. subtilis*, обладающий свойствами пробиотика, значительно увеличивает продолжительность жизни *C. elegans* АМРК-зависимым образом. Полученные результаты существенно углубляют знания о роли метаболической активности микробиоты в жизнедеятельности организма-хозяина.

Основные положения работы, выносимые на защиту

1. Оксид азота, продуцируемый бактериями *B. subtilis*, оказывает положительное влияние на жизнедеятельность нематод *C. elegans*, увеличивая термотолерантность и продолжительность жизни особей.
2. Инактивация генов *суoA* и *судA* бактерий *E. coli*, нарушающих активность терминальных оксидаз *bo'* и *bd-I*, способствует увеличению продолжительности жизни *C. elegans*.
3. Постоянное употребление экзогенных антиоксидантных добавок приводит к сокращению продолжительности жизни нематод *C. elegans*. Ограничение потребления диетических тиолов, включая те, которые получены естественным путем из микробиоты, увеличивает продолжительность жизни особей.
4. Гликоген ответственен за устойчивость к оксидантам и сокращение продолжительности жизни нематод в условиях высокого потребления глюкозы.
5. На модели *C. elegans* регуляторный экзогенный метаболит АИКАР обладает геропротекторным эффектом, увеличивая продолжительность жизни особей на 13%. Значительно большее увеличение продолжительности жизни нематод (на 62%) наблюдается при их культивировании на газоне штамма-пробиотика *B. subtilis*, продуцирующего АИКАР. Добавление экзогенного или эндогенного АИКАР не влияет на жизнедеятельность мутантной линии нематод с инактивированным геном *aak-2*, что свидетельствует об участии АМРК-зависимого пути в контроле продолжительности жизни.

Личное участие автора

Все основные результаты получены лично автором, либо при его участии в планировании и проведении экспериментов. Эксперименты по транскриптомике проводились совместно с сотрудниками лаборатории Е.А. Нудлера Медицинского Центра Нью-Йоркского университета (США). Автор лично участвовал в планировании и проведении всех экспериментов, обработке и интерпретации полученных результатов, формулировке выводов, подготовке публикаций и представлении результатов на конференциях. Работа по теме диссертации была поддержана грантом №14.Z50.31.0014 Минобрнауки РФ.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 7 работ, в том числе 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для опубликования материалов диссертационных исследований, 1 патент и 3 тезиса докладов.

Апробация результатов

Основные результаты работы были представлены на конференциях: International Conference «Biomedical Innovation for Healthy Longevity» (Санкт-Петербург, 2016 г.), 22-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2018 г.), Конгресс «VII съезд ВОГиС, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы» (Санкт-Петербург, 2019 г.).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ

1. Gusarov I., Pani B., Gautier L., Smolentseva O., Eremina S., Shamovsky I., Katkova-Zhukotskaya O., Mironov A., Nudler E. Glycogen controls *Caenorhabditis elegans* lifespan and resistance to oxidative stress // Nat. Commun. – 2017. – V. 8. – P. 15868.
2. Каткова-Жукоцкая О.А., Еремина С.Ю., Шакулов Р.С., Миронов А.С. Выращивание *Caenorhabditis elegans* на газоне бактерий *Escherichia coli*, дефектных по синтезу терминальных оксидаз *bo'* и *bd-I*, увеличивает продолжительность жизни нематод // Генетика. – 2019. – Т. 55, N 12. – С. 1487-1490.

3. Gusarov I., Shamovsky I., Pani B., Gautier L., Eremina S., Katkova-Zhukotskaya O., Mironov A., Makarov A.A., Nudler E. Dietary thiols accelerate aging of *C. elegans* // Nat. Commun. – 2021. – V. 12. – P. 4336.

Патенты

1. Еремина С.Ю., Шостак Н.Г., Зеленцова Е.С., Каткова-Жукоцкая О.А., Лобанов К.В., Шакулов Р.С., Фуников С.Ю., Миронов А.С., Евгеньев М.Б., Карпов В.Л., Нудлер Е.А. Геропротектор для модельных животных. Патент РФ №2639500 от 21.12.2017.

Материалы научных конференций

1. Katkova-Zhukotskaya O., Eremina S., Mironov A. The influence of purine metabolism damages in *Bacillus subtilis* on *Caenorhabditis elegans* lifespan // Proceedings of the International Conference «Biomedical Innovation for Healthy Longevity». – 2016. – P. 94.

2. Каткова-Жукоцкая О.А., Еремина С.Ю., Миронов А.С. Изучение геропротекторной активности 5-амино-имидазол-4-карбоксамид-рибофуранозида (АИКАР) на модельном организме *Caenorhabditis elegans* // 22-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века». – 2018. – С. 348.

3. Каткова-Жукоцкая О.А., Еремина С.Ю., Шакулов Р.С., Миронов А.С. Влияние антиоксидантов и мутаций в генах, контролирующих аэробное дыхание микробиоты, на продолжительность жизни нематод *Caenorhabditis elegans* // Конгресс «VII съезд ВОГиС, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы». – 2019. – С. 1050.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 117 страницах машинописного текста, содержит 35 рисунков, 12 таблиц и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения и обсуждения экспериментальных данных, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, а также списка цитируемой литературы, включающего 254 источник (из них – 243 на английском языке). Работа содержит Приложение, включающее 1 объемную таблицу.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Нематоды *Caenorhabditis elegans*, общие сведения

Caenorhabditis elegans — свободноживущие нематоды, предпочтительно обитающие в почве, богатой бактериями, которыми они питаются.

В качестве модельного объекта нематоды *C. elegans* впервые использовались Сидни Бреннером в 70-х годах XX века для проведения генетических и эмбриологических исследований. Был разработан метод культивирования нематод в лабораторных условиях на плотной питательной среде с бактериями *Escherichia coli* в качестве питательного субстрата [Brenner, 1974]. В настоящее время нематоды *C. elegans* являются удобной моделью для изучения многих процессов жизнедеятельности Metazoa — животных и человека, включая энергетический метаболизм [Jones, Ashrafi, 2009], иммунитет [Schulenburg et al., 2004.], нейрофизиологию [Link, 1995; Link, 2006; Dostal, Link, 2010; Chen et al., 2015] и старение [Kenyon, 2010]. Ряд открытий, сделанных с использованием *C. elegans*, были удостоены Нобелевских премий [Check, 2002].

Преимуществом нематод как модельного объекта являются следующие факторы:

- продолжительность жизни нематод составляет в среднем 18-21 день;
- малый размер особей (около 1 мм в длину, 80 мкм в диаметре) (Рисунок 1.1) позволяет выращивать их в больших количествах в стандартных условиях на чашках Петри или в жидкой культуре;



Рисунок 1.1 – *Caenorhabditis elegans*. Увеличение $\times 45$.

- цикл развития — около 3-х дней (Рисунок 1.2);

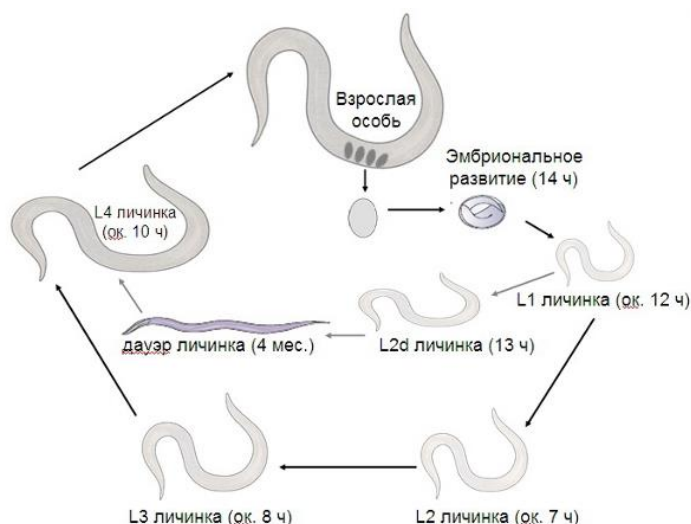


Рисунок 1.2 – Цикл развития *C. elegans* (при 25°C) (адаптировано из [Jorgensen, Mango, 2002]).

При благоприятных условиях по окончании эмбриогенеза из яйца выходит личинка первой стадии L1, которая затем проходит фазы L2, L3 и L4, после чего особь становится половозрелой. В неблагоприятных условиях (скученность, недостаток пищи и т. п.) личинки по окончании первой стадии останавливают развитие и переходят в особую резистентную долго длящееся состояние *дауэр* (*дауэровская личинка*) (Ld), в котором процессы жизнедеятельности практически прекращены. Программа *дауэр* включает замедление метаболизма и развития личинок, а также ограничение питания, полную остановку полового созревания. При улучшении условий *дауэры* способны возвратиться к прерванной стадии, возобновить развитие и превратиться во взрослых особи со стандартной продолжительностью жизни [Марчук, 2012].

- тело нематод прозрачно;
- популяции в основном состоят из гермафродитов, способных к самооплодотворению [Brenner, 1974; Jorgensen, Mango, 2002], что упрощает поддержание чистоты линий от случайных скрещиваний (доля самцов в популяции – не более 0.05-0.1%);
- в современных исследованиях чаще используется линия *C. elegans* дикого типа N2 Bristol, выделенная из садового компоста в г. Бристоль (Великобритания). При этом имеется большое количество мутантных линий *C. elegans* (коллекция находится в Генетическом центре *Caenorhabditis* (*Caenorhabditis* Genetic Center));
- модель обеспечивает широкие возможности для исследования молекулярно-генетических основ старения [Tissenbaum, 2015];
- в настоящее время известны основные клеточные и молекулярные механизмы большинства форм поведения, процессов размножения и развития *C. elegans* [Bargmann, 1993; Mori, 1999];

– *C. elegans* – первый многоклеточный организм, чей геном полностью секвенирован (1998 г.) [*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998; Vijg, 2007; Amrit, 2014]. Используя биоинформационные подходы, была выявлена высокая степень гомологии многих генов нематод с генами человека [Vijg, 2007; Helmcke, 2010];

– открытые интернет-ресурсы WormBase [www.wormbase.org], WormBook [www.wormbook.org.], WormAtlas [www.wormatlas.org.] представляют собой базы данных для всемирного накопления и интеграции информации о *C. elegans* [Yook, 2012];

– разработаны автоматизированные методы по визуализации и сортировке нематод [Baek, 2002; Burns, 2006; Hoshi, 2006; Pulak, 2006; Simonetta, 2007; Rohde, 2007];

– в лабораторных условиях культуру *C. elegans* легко поддерживать моноксенически.

Указанные выше преимущества *C. elegans* объясняют роль нематод как ценного модельного объекта в биогеронтологических исследованиях. Учитывая многогранный характер связи «нематоды-бактерии» [Cabreiro, 2013] разработаны различные способы манипулирования микробиотой с целью воздействия на метаболизм, иммунитет, здоровье и старение организма-хозяина; изучен многогранный характер связи «нематоды-бактерии». Понятие *микробиота* в данном случае подразумевает популяцию живых микроорганизмов, присутствующих в кишечнике; *микробиом* – коллективное геномное содержание микробиоты.

Универсальность механизмов центрального метаболизма и энергетических процессов у животных и человека предполагает возможность использования сведений, полученных при изучении нематод, применительно к человеку. При этом следует иметь ввиду и существенные различия в углеводном метаболизме: у человека ограничена возможность использовать жиры для глюконеогенеза вследствие отсутствия генов глиоксилатного шунта – процесса, ограничивающего активность цикла трикарбоновых кислот [Braeckman, Ineke, 2017]. Нематоды *C. elegans* являются редким исключением среди большинства Metazoa: они обладают глиоксилатным шунтом, что обеспечивает им возможность использования жирных кислот не только как источника энергии, но и как конструктивного материала при дефиците глюкозы. В связи с этим необходимо отметить, что нематоды-долгожители впервые были отобраны среди мутантов с ограниченной способностью к анабиозу, то есть с ограниченной функцией глиоксилатного шунта, точке бифуркации процессов энергообразования (в ЦТК) и глюконеогенеза из жирных кислот [Braeckman, Ineke, 2017; Seo, 2018; Zečić, Braeckman, 2020].

1.2 *C. elegans* как модельный объект для биогеронтологических исследований

Старение является сложным биологическим процессом, который регулируется многими генетическими и экологическими факторами. С понятием старения неразрывно связано понятие

продолжительность жизни (ПЖ). Под продолжительностью жизни, когда не указывается иное, имеется в виду средняя продолжительность жизни. Это статистический параметр, обозначающий отрезок времени, который в среднем проживают особи исследуемого поколения. Часто в работах приводятся значения медианной (срединной) продолжительности жизни (СПЖ), т. е. возраста, до которого доживает половина изучаемой когорты. Для нематод обычно приводятся значения срединной продолжительности жизни взрослых особей (без личиночных стадий).

Наряду с такими объектами, как дрожжи, дрозофилы и грызуны, нематоды внесли огромный вклад в выяснение роли генетических факторов в регуляции старения [Москалев, 2008]. Существуют три направления поиска факторов продления жизни у *C. elegans*, которые направлены на ограничение доступной для нематод энергии: ограничение передачи сигналов по системе инсулин/инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF-1), снижение калорийности рациона и снижение функции митохондрий [Johnson, 1990; Houthoofd et al., 2002; Longo, Finch, 2003; Sedensky, Morgan, 2006; Artal-Sanz, Tavernarakis, 2008].

Настоящий прорыв в исследованиях факторов долголетия и определении основного направления будущих работ произошел в конце 1980-х годов, когда были обнаружены мутации, увеличивающие продолжительность жизни нематод *C. elegans*. Впервые была выявлена долгоживущая линия нематод с мутацией в гене *age-1* [Friedman, Johnson, 1988], увеличивающей продолжительность жизни на 70%. Синтией Кеньон описана мутация в гене *daf-2*, которая удваивала время жизни особей [Kenyon et al., 1993]. Оказалось, что продукты этих генов принадлежат к чрезвычайно консервативному в эволюции эукариот пути передачи сигналов от рецепторов инсулина и/или инсулиноподобного фактора роста-1 [Tissenbaum, Guarente, 2001; Сергиев и др., 2015].

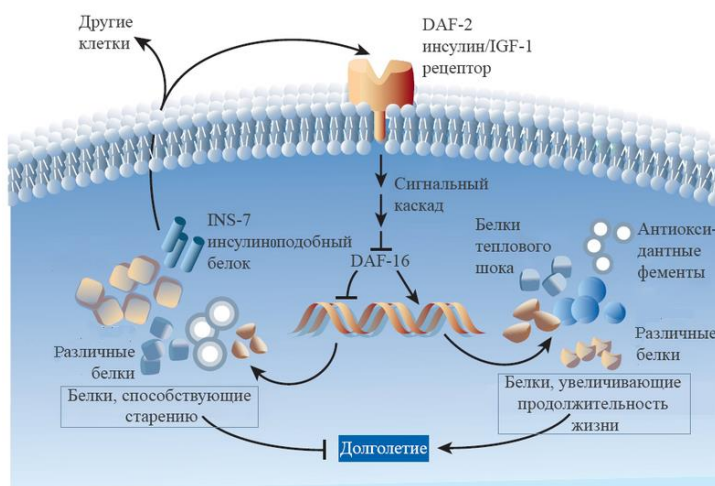


Рисунок 1.3 – Продукты *daf*-генов и долголетие *C. elegans* (адаптировано из [Gems, McElwee, 2003; Murphy et al., 2003]). Сигнальный путь инсулина/инсулиноподобного фактора

роста 1 (IGF-1), являясь эволюционно консервативной системой, регулирует различные физиологические процессы в жизненном цикле нематод и представляет собой один из наиболее полно охарактеризованных сигнальных каскадов, влияющих на продолжительность жизни *C. elegans*. Передача сигнала через путь рецептора DAF-2, кодируемого геном *daf-2*, снижает активность фактора транскрипции DAF-16 (гомолога транскрипционного фактора FOXO), ограничивая его накопление в ядре и препятствуя активации различных генов, влияющих на продолжительность жизни (включая гены, кодирующие антиоксидантные ферменты, белки теплового шока и др.). Инсулиноподобный белок INS-7, связываясь с рецептором DAF-2, может подавлять DAF-16, что предполагает наличие петли положительной обратной связи, которая регулирует активность DAF-2. Мутации в гене *daf-2* увеличивают продолжительность жизни особей, тогда как мутации в *daf-16* сокращают ее. Стрелки на рисунке указывают на активацию, Т-образные кривые – на ингибирование.

Транскрипционный фактор DAF16/FOXO (Рисунок 1.3) является основной мишенью пути DAF-2 и ключевым регулятором стрессоустойчивости, метаболизма, фертильности и развития. Его активация и транслокация в ядро клетки приводит к активации различных генов и способствует увеличению продолжительности жизни. Установлено, что определенные варианты гена, кодирующего транскрипционный фактор, ассоциированы с долгожительством человека [Willcox et al., 2008]. В ответ на стрессовое воздействие транскрипционный фактор DAF16/FOXO может быть активирован путем фосфорилирования различными киназами, среди которых АМФ-активируемая протеинкиназа и с-Jun N-15 концевая киназа [Van Heemst, 2010]. Кроме того, транскрипционный фактор может быть активирован NAD-зависимой деацетилазой SIRT1 [Kobayashi et al., 2005].

В последующих исследованиях были выявлены несколько десятков генов, модификации которых увеличивают продолжительность жизни [Анисимов, 2003; Khalyavkin, Yashin, 2003 (a); Khalyavkin, Yashin, 2003 (б); Hansen et. al., 2005; Hamilton et al., 2006]. С помощью крупномасштабной РНК-интерференции (внедрение в *C. elegans* вместе с пищей антисмысловых РНК) был проведен скрининг генов долголетия нематод и обнаружено, что инактивация 89 генов (контролирующих ILS, метаболизм, трансдукцию сигналов, экспрессию генов и др.) увеличивала продолжительность жизни нематод. Анализ генетического взаимодействия с новыми генами показал, что некоторые из них действуют выше фактора транскрипции *daf-16/FOXO* или протеиндеацетилазы *sir 2.1*, а другие функционируют независимо от *daf-16/FOXO* и *sir2.1* [Hamilton et al., 2006]. Исследователями идентифицированы 23 гена, инактивация которых увеличивала продолжительность жизни *C. elegans*, и сделаны следующие выводы: 1) диетические ограничения увеличивают продолжительность жизни

C. elegans за счет подавления экспрессии ключевых генов, включая ген, необходимый для метилирования многих макромолекул; 2) передача сигналов интегрин, вероятно, играет общую, эволюционно-консервативную роль в регуляции продолжительности жизни; 3) специфические липофильные гормоны могут влиять на продолжительность жизни в зависимости от DAF-16/FOXO [Hansen et al., 2005]. Выявление генетического контроля процесса старения является одним из значимых научных достижений [Apfeld, Kenyon, 1999; Hsin, Kenyon, 1999; Kenyon, 2005; Khalyavkin, Yashin, 2006; Москалев, 2008; Чистякова, 2008].

Высокий уровень гомологии между генами *C. elegans* и генами человека, а также большое сходство их метаболизмов указывают на то, что результаты, полученные на этой межвидовой модели, могут быть полезны для понимания влияния человеческой микробиоты на старение, физиологию и развитие болезней. Глубокое понимание молекулярных механизмов, управляющих различными типами взаимодействия человека с микробиотой, обеспечит важные шаги в направлении использования микробиоты для поддержания здоровья и лечения заболеваний. И тем ценнее для исследователей становится модель «*C. elegans* – бактерия».

Особый интерес представляет изучение микробиоты в качестве медиатора эффектов воздействия лекарств на организм хозяина, в частности, препаратов, направленных на коррекцию метаболических заболеваний. На примере изучения влияния метформина [Onken, Driscoll, 2010; Cabreiro, Gems, 2013; Pryor et al., 2019] проиллюстрировано, насколько важно рассматривать эффекты воздействия лекарственных веществ не только на нематодах, а именно на моделях «нематоды – бактерии». Показано увеличение продолжительности жизни нематод при воздействии антибиотиков, таких как ампициллин, канамицин, триметоприм и сульфаметоксазол, [Garigan et al., 2002; Virk et al., 2012; Cabreiro et al., 2013]. Эти эффекты показывают двунаправленное взаимодействие между микробиотой кишечника и лекарствами в организме хозяина. Таким образом, *C. elegans* может предоставить платформу для исследования роли вызванных лекарствами изменений в метаболизме кишечных бактерий, что, в свою очередь, влияет на их физиологию.

Бактерии составляют пищу *C. elegans*, обеспечивая поток микро- и макроэлементов, и тем самым поддерживая рост и размножение нематод, и в то же время бактерии являются кишечными симбионтами и оказывают влияние на физиологию и продолжительность жизни хозяина. Поэтому данная модель эффективна для широкомасштабного изучения взаимодействия и взаимовлияния «хозяин-микробиота», имеющего многогранный характер связей, охватывающий хищничество, комменсализм и патогенность [Cabreiro, Gems, 2013; Heintz, Mair, 2014; Yilmaz, Walhout, 2014; Neve et al., 2019; Shin et al., 2020].

Важными преимуществами данной межвидовой модели считается то, что нематоды *C. elegans* могут содержать определенную микробиоту, а бактериальное дыхание и метаболиты, продуцируемые бактериями, напрямую влияют на развитие *C. elegans*.

На различных этапах жизненного цикла наблюдается изменение взаимоотношений *C. elegans* – *E. coli*. Во время развития нематод бактерии в основном служат источником пищи, так как они почти полностью измельчаются в глотке (благодаря наличию группы взаимосвязанных зубоподобных структур), а живые колонии практически отсутствуют в просвете кишечника [Kurz et al., 2003]. По мере роста нематод бактерии, избежавшие измельчения, размножаются, образуют колонии в просвете кишечника [Portal-Celhay, Blaser, 2012] и существуют как комменсалы или симбионты. В процессе старения *C. elegans* бактерии, разрастающиеся в просвете кишечника и колонизирующие его [Garigan et al., 2002], становятся вредными для организма-хозяина [McGee et al., 2011; Portal-Celhay., Bradley, Blaser, 2012]. Воздействия, блокирующие пролиферацию бактерий, увеличивают продолжительность жизни нематод, предотвращая микробный дисбактериоз [Gems, Riddle, 2000; Garigan et al., 2002].

Основным источником энергии для Metazoa является глюкоза и ее производные, накапливаемые в организме, в первую очередь триглицериды жирных кислот и гликоген. Энергия этих источников реализуется в виде АТФ и восстановленных пиридиновых нуклеотидов NAD(P)H, которые используются в биосинтетических процессах. Регуляция соотношения между потребленной организмом энергией (глюкоза) и возможностью ее максимального использования (окисление) определяет общий характер жизнедеятельности организма. При ограниченной возможности окисления глюкозы организм выделяет в среду обитания продукты брожения (кислоты, спирты и другие соединения). Полное окисление глюкозы с образованием максимального количества энергии, CO₂ и воды локализовано в митохондриях клеток и доступно всем Metazoa только при наличии кислорода.

До недавнего времени основным вмешательством в жизнедеятельность организма, способным достоверно увеличить продолжительность жизни различных видов, снизить заболеваемость и/или замедлить возрастные патологии, было ограничение калорийности питания, определяемое как диета, при которой потребление пищи снижается по сравнению с уровнем *ad libitum*, но не приводит к голоданию. Нематоды *C. elegans* питаются бактериями, и снижение потребления пищи значительно увеличивает как среднюю, так и максимальную продолжительность жизни [Mair, Dillin, 2008]. Преимущества и недостатки использования *C. elegans* для изучения влияния диетических ограничений на старение и продолжительность жизни подробно описаны с учетом преимуществ данной модели для открытия новых механизмов, которые могут быть спроецированы на антивозрастные вмешательства у людей; изучены молекулярные механизмы и физиологические процессы, связанные с эффектами

ограничения питания [Zhang, Mair, 2017]. Исследователи стремятся найти соединения, которые могут имитировать эффекты ограничения калорий на продолжительность жизни и возрастные изменения. Разработка миметиков ограничения калорийности питания без реального снижения потребления калорий для продления жизни является одной из приоритетных задач [Марчук, 2012].

Подробно исследован молекулярный механизм ингибирующего действия глюкозы на продолжительность жизни нематод и устойчивость к окислительному стрессу [Gusarov et al. 2017]. Избыток глюкозы, транспортированной в клетку, может привести к избытку восстановленных NAD(P)H нуклеотидов (редуктивный стресс), преодоление которого возможно различными путями, в том числе и образованием активных форм кислорода (АФК). Супрессия редуктивного стресса путем образования АФК была убедительно показана при действии NADPH-оксидазы [Sahoo et al., 2016]. При этом избыток АФК, образующихся в организме нематод [Sulston, Horvitz, 1977; Kenyon, 1985], вызывает старение, что делает *C. elegans* удобной моделью для изучения физиологических эффектов окислительного повреждения метаболитов [Bazoroulou et al., 2019]. Интересно, что гликоген, накапливающийся при выращивании нематод на обогащенной глюкозой среде, стимулирует восстановление тиолов, то есть действует как антиоксидант. В условиях избытка глюкозы увеличение уровня содержания восстановленных тиолов защищает нематод и клетки гепатоцитов человека от окислительного стресса. Редуктивный стресс возникает не только при избытке глюкозы, но и при ограничении дыхания *C. elegans* [Larsen, Clarke, 2002; Saiki et al., 2008; Gomez et al., 2013; Yu et al., 2015; Han et al., 2017; Zhang, Holdorf, Walhout, 2017]. Обнаружено продление жизни нематод, растущих на газоне мутантов *E. coli* в генах терминальных цитохромных оксидоредуктаз *bo'* и *bd-I* [Tapia, 2006; Schulz et al., 2007; Ristow, Schmeisser et al., 2014; Yu et al., 2015; Govindan et al., 2015; Каткова-Жукоцкая и др., 2019]. АФК могут действовать как сигнальные молекулы.

С другой стороны, увеличение запаса гликогена в организме нематод приводит к сокращению продолжительности жизни. Было показано, что инактивация гликогенсинтазы или использование оксидантов, снижающих запасы гликогена, обеспечивают увеличение продолжительности жизни *C. elegans* [Gusarov et al., 2017]. Истощение гликогена окислителями или ингибирование его синтеза увеличивает продолжительность жизни нематод посредством АМРК-зависимого механизма (5'АМФ-активируемая протеинкиназа, англ. *AMP-activated protein kinase*, АМРК). Предполагается, что гликоген является не только инертной молекулой-накопителем глюкозы, но и активным регулятором энергетического баланса организма и его старения [Seo et al. 2018].

C. elegans – перспективный модельный организм для изучения сигналов AMPK. AMPK, играющая роль «датчика энергии», «основного метаболического переключателя» [Beale, 2008; Гайдай и др., 2018.] и зависящая от DAF-16, транскрипционного фактора FOXO, является одним из факторов, способствующих увеличению продолжительности жизни *C. elegans* при диетических ограничениях [Greer et al., 2007]. AMPK является основным консервативным сенсором и регулятором внутриклеточного энергетического гомеостаза [Pan, Hardie, 2002; Beale, 2008]. Совместно с ключевыми сигнальными путями (инсулин/IGF-1 и mTOR) AMPK участвует в восприятии и интерпретации уровней питательных веществ и, следовательно, в регулировании физиологических процессов размножения, роста или старения [Templeman, Murphy, 2018] (Рисунок 1.4).

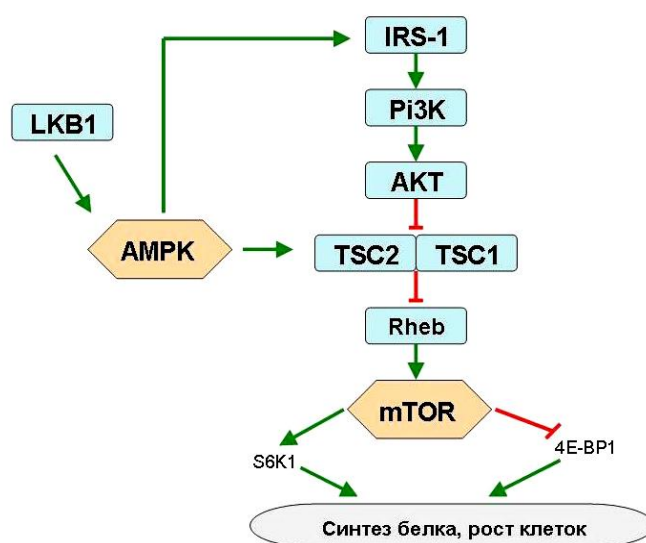


Рисунок 1.4 – Взаимосвязь компонентов сигнальных путей инсулина, AMPK и mTOR (адаптировано из [Clements et al., 2011; Nicole et al., 2018]). LKB1, киназа B1; AMPK, АМФ-зависимая протеинкиназа; IRS-1, субстрата инсулинового рецептора 1; Pi3K, фосфоинозитид-3-киназа; АКТ, протеинкиназа В; TSC1, туберозный склеротический комплекс 1; TSC2, туберозный склеротический комплекс 2; Rheb, ГТФ-связывающий белок; mTOR, серин/треониновая киназа; 4E-BP1, 4Е-связывающий белок 1; S6K1, S6 киназа1.

AMPK как сенсор низких уровней энергии активируется в ответ на недостаток питательных веществ и гипоксию. Активация AMPK вызывает ингибирование пути mTOR и, следовательно, снижение синтеза белка и клеточной пролиферации [Zhou et al., 2001]

На модели нематод продемонстрирована роль гена каталитической субъединицы AMPKα2 (*aak-2*) в определении продолжительности жизни [Curtis et al., 2006]. Этот эффект связан со взаимодействием AMPK и пути инсулиноподобной передачи сигналов (гены *daf*) [Beale, 2008; Buchter et al., 2013]. Активаторы AMPK увеличивают продолжительность жизни

[Cabreiro et al., 2013]. Продemonстрировано, как соотношение АМФ/АТФ влияет на продолжительность жизни *C. elegans*, а повышенная активность АМРК, которая может быть опосредована концентрациями производных аденозиновых нуклеотидов, задерживает старение [Apfeld et al., 2004; Curtis et al., 2006; Greer et al., 2007].

На биохимическом уровне энергетический стресс проявляется в уменьшении количества основного носителя энергии – АТФ – и возрастании АМФ. В ответ на увеличение соотношения АМФ/АТФ клетки усиливают энергообразующие процессы и ограничивают потребление энергии. АМРК способствует производству энергии из глюкозы и жирных кислот и подавляет потребление энергии для синтеза белков, липидов и гликогена [Hardie, 2004; Steinberg, Kemp 2009; Hardie, 2011; Mihaylova, Shaw, 2011;].

Известно, что ряд фармакологических соединений стимулирует АМРК [Zhou et al., 2009]. Большинство из них действуют косвенно, например, через ингибирование комплекса I дыхательной цепи митохондрий с целью увеличения соотношения АМФ/АТФ [Kim et al., 2016]. Первым прямым активатором АМРК, который был идентифицирован, является АМФ-миметик 5-аминоимидазол-4-карбоксамид рибонуклеотидмонофосфат (ZMP) - промежуточное соединение пути биосинтеза пуринов [Corton et al., 1995]. ZMP представляет собой продукт монофосфорилирования предшественника АИКАР (5-аминоимидазол-4-карбоксамидрибофуранозид). Исследования на млекопитающих показывают, что АИКАР (также известный как акадезин) улучшает когнитивные и двигательные функции, уменьшает воспаление, защищает от ишемического повреждения, уменьшает гипертонию и снижает массу тела, действуя через АМРК [Buhl et al., 2002; Kobil et al. 2014; Guerrieri et al., 2017].

Выявлено, что синтетический АИКАР, используемый как пищевая добавка, обладает определенным геропротекторным эффектом [Еремина и др., 2017].

АИКАР представляет собой естественный метаболит, синтезируемый большинством организмов на промежуточном этапе биосинтеза инозинмонофосфата (ИМР). Его внутриклеточный уровень низкий из-за быстрого превращения ZMP в инозинмонофосфат с помощью риботид трансформилазы АИКА/циклогидролазы ИМР (АТИС) и дальнейшего метаболизма избыточного инозинмонофосфата в мочевую кислоту [Dixon et al., 1991; Dixon et al., 1993]. Следовательно, фармакологические эффекты АИКАР могут быть достигнуты только при исключительно высоких концентрациях (1-2 мМ), как продемонстрировано в экспериментах на тканевых культурах [Pirkmajer et al., 2015]. Такая низкая биоактивность вместе с плохой абсорбцией и быстрым выведением делает АИКАР сложноприменимым для длительного использования и объясняет его незначительные фармакологические эффекты [Dixon et al., 1991; Blanco 2018] и неудачи в многочисленных клинических испытаниях [Goodyear, 2008].

Для потенциального исправления фармакодинамических недостатков АИКАР перспективной представляется идея о том, что по причине чрезвычайно быстрого метаболизма АИКАР гораздо более глубокое и устойчивое влияние на АМРК должно иметь непрерывное стабильное поступление АИКАР (а не спорадическое болюсное введение), что может быть достигнуто разработкой конститутивной системы доставки АИКАР.

1.3 *C. elegans* как модельный объект для изучения взаимосвязи продолжительности жизни и стрессоустойчивости

Известно, что продолжительность жизни коррелирует со стрессоустойчивостью организма [Johnson et al., 2001]. Одним из примеров влияния стрессора на продолжительность жизни является возрастание активности АМРК при снижении энергетического заряда клеток. Эта роль АМРК была убедительно продемонстрирована на модели геморрагического шока у мышей [Klingbeil et al., 2017; Matsiukevich et al., 2017]. При потере значительных объемов крови помимо волеметрического шока развивается энергетический дефицит, который обычно восполняется введением растворов глюкозы. Оказалось, что присутствие в растворе АИКАР (активатора АМРК и транспорта глюкозы) продлевает «золотой час», в течение которого физиологические параметры (частота сердечных сокращений, артериальное давление и др.) при потере 50% крови сохраняются на уровне, близком к норме, обеспечивая возможность реабилитации [Sonnenborn, Rutten, 2011].

Еще одним соединением, увеличивающим продолжительность жизни и термоустойчивость *C. elegans*, является газотрансмиттер сероводород [Miller, Roth, 2007]. Выяснение молекулярных механизмов его действия показало, что увеличение продолжительности жизни связано с активностью SIR-2.1 и генетически зависит от сигнального пути инсулина, митохондриальной дисфункции и ограничения калорийности питания.

Исследовано влияние вида бактериальной подложки (*E. coli* и *B. subtilis*) на жизнедеятельность и репродуктивную функцию организма-хозяина после интенсивного теплового стресса. Эксперименты показали, что в стандартных условиях нематоды обладают меньшей фертильностью при выращивании на *B. subtilis*, чем на *E. coli*. После теплового шока нематоды, питающиеся *B. subtilis*, демонстрировали более высокую смертность, однако производили больше потомства по сравнению с нематодами, выращенными на *E. coli* [Hoang et al., 2019]. Полученные результаты демонстрируют важность условий окружающей среды и времени взаимодействия в формировании защитных свойств, обеспечиваемых микробиотой для организма-хозяина.

1.4 *C. elegans* как модельный объект для изучения взаимодействия «хозяин-микробиота»

1.4.1 Изучение аспектов бактериальной патогенности

Подробно изучено влияние бактерий на продолжительность жизни нематод и описаны различные механизмы их взаимодействия: бактерии в качестве источника питательных веществ; бактерии в качестве потенциального патогена, который активирует врожденный иммунный и стрессовый отклик; бактерии в качестве сенсорного стимула, который модулирует нейрональные сигнальные пути, регулирующие долголетие [Kim, 2013]. Эти механизмы могут влиять на продолжительность жизни посредством выделения метаболитов бактериями, индукции стресса и иммунного ответа, а также модуляции нейронального сигнального пути [Komura et al., 2013; Clark, Hodgkin, 2014; Lee et al., 2015; Martinez et al., 2015; Kwon et al., 2016; Khan et al., 2018]. Кишечник является самым большим соматическим органом нематод, и обычно он заполнен бактериями [Garigan et al., 2002; McGee et al., 2011; Felix, Duveau, 2012]. Функционально кишечник представляет собой первую линию защиты от потенциально опасной окружающей среды (например, от патогенных микроорганизмов [Lievin-Le Moal, Servin, 2006; Ewbank, Zugasti, 2011]), но в то же время он обеспечивает расщепление, хранение и поглощение питательных веществ, а также удаление продуктов жизнедеятельности. Кроме того, кишечник играет важную роль в физиологическом состоянии нематод и действует как сигнальный центр, воздействующий на другие ткани и реагирующий на сигналы, связанные с жизнедеятельностью бактерий [Rera et al., 2013].

Исследования показали, что ряд бактерий (*Pseudomonas aeruginosa*, *Shewanella frigidimarina*, *Photobacterium luminescens* и др.) в естественной среде обитания являются патогенными для *C. elegans* [Couillault, Ewbank, 2002]. *C. elegans* широко используются для изучения взаимодействий хищник-жертва, способствуя расширению представлений о механизмах синтеза и секреции антимикробных молекул, иммунологических реакций, образования биопленок патогенными бактериями внутри организма-хозяина [Powell, Ausubel, 2008; King et al., 2016; Sorathia, Rajadhyaksha, 2016; Jiang, Wang, 2018;]. На модели нематод проводят оценку тропизма и вирулентности различных штаммов и их изолятов [Aubin et al., 2017].

Простота устройства организма *C. elegans* (кутикула, мышечная, пищеварительная, нервная и репродуктивная системы, отсутствие органа внешнего дыхания и циркуляторной системы) облегчает интерпретацию экспериментальных данных по воздействию на организм разнообразных веществ.

Нематоды *C. elegans*, наряду с *Drosophila melanogaster*, являются удобными моделями для изучения влияния летучих органических соединений (ЛОС) на эукариотические организмы. *C. elegans* обитает в почве и на границе водно-воздушного раздела, и, таким образом, может взаимодействовать как с растворимыми в воде, так и с летучими соединениями. ЛОС, выделяемые микроорганизмами, являются ценным источником новых химических соединений с полезными для человека свойствами (в биотехнологии, сельском хозяйстве, медицине). Показано ингибирующее и токсическое действие ЛОС, выделяемых штаммами *Pseudomonas* и *Serratia*, на рост и выживание модельных организмов, в том числе на нематод *C. elegans* [Popova et al., 2014]. Данные подтвердили роль бактериальных летучих веществ в качестве важных соединений, участвующих во взаимодействиях между организмами в естественных экологических условиях. Большое разнообразие экологических ниш, в которых могут обитать нематоды, отражено в широком разнообразии микроорганизмов, для которых они могут выступать в качестве организма-хозяина. Микроорганизмы варьируются от дрожжей, таких как *Candida*, до бактериальных модельных организмов, таких как *Pseudomonas* или *Enterococcus*, вплоть до недавно идентифицированных РНК-вирусов.

Генетические вариации ответов *C. elegans* на взаимодействие с патогенными бактериями, микроспоридиями и вирусами демонстрируют большое разнообразие [Huang, Kammenga, 2020]. Количественный генетический анализ выявил детальное понимание локусов, генетических вариантов и путей, лежащих в основе этого взаимодействия. Ожидается, что дальнейшие исследования *C. elegans* внесут значительный вклад в понимание генетических путей и функций генов микробиоты, а также помогут изучить, как микроорганизмы действуют на приспособляемость *C. elegans*, и как функциональные гены влияют на взаимодействие микробиоты и организма-хозяина.

1.4.2 Изучение влияния различных бактериальных штаммов с модифицированным метаболизмом на продолжительность жизни *C. elegans*

Одним из преимуществ межвидовой модели «*C. elegans* – бактерия» для изучения взаимодействия «хозяин – микробиота» является то, что оба объекта могут быть подвергнуты крупномасштабному и высокопроизводительному генетическому скринингу. Крайне полезной является возможность осуществления генетических манипуляций как с организмом-хозяином, так и с бактериальной подложкой [Cabreiro, Gems, 2013; Ezcurra, 2018].

Например, для выявления бактериальных путей, влияющих на старение *C. elegans*, используется коллекция штаммов *E. coli* Keio, содержащая приблизительно 4000 мутантов, охватывающих 93% генов *E. coli* [Baba et al., 2006; Virk et al., 2012; Han et al., 2017;]. Путем

скрининга 3983 мутантов *E. coli* обнаружены 29 бактериальных гена, удаление которых увеличивает продолжительность жизни организма-хозяина [Han et al., 2017]. Некоторые из этих бактериальных мутантов также защищают хозяина от возрастного прогрессирования роста опухолей и накопления β -амилоида. Показано, что пять бактериальных мутантов способствуют долголетию благодаря усиленной секреции колановой кислоты, которая регулирует митохондриальную динамику и контролирует белковый ответ в организме хозяина. Изменения митохондрий и эффекты долголетия, вызванные колановой кислотой, сохраняются у разных видов. В совокупности эти результаты выявляют молекулярные мишени для разработки пробиотиков, действующих на митохондрии хозяина, тем самым способствуя увеличению продолжительности жизни.

В естественной среде обитания *C. elegans* питаются различными микроорганизмами (главным образом, бактериями) [Coolon et al., 2009; Montalvo-Katz et al., 2013]. Но в стандартных лабораторных условиях в качестве источника пищи для нематод используется моноксеническая культура штамма *E. coli* OP50 (ауксотрофного по урацилу). Этот штамм был выбран в качестве универсального лабораторного источника пищи, так как он образует тонкие бактериальные газоны, что облегчает визуальный контроль нематод [Samuel et al., 2016]. Помимо *E. coli* OP50, для исследований используют другие линии *E. coli* (K-12, HT115 и др.) [Browning et al., 2013.]. Сочетание преимуществ *E. coli* и *C. elegans* дает мощную комбинированную модель. В геноме *E. coli* выявлен ряд мутаций, приводящих к увеличению продолжительности жизни организма-хозяина [Larsen, Clarke, 2002; Virk et al., 2012; Cabreiro et al., 2013]. Эти данные подчеркивают важность влияния микробиоты на процесс фармакологической терапии.

Методики исследований могут быть адаптированы для определения продолжительности жизни при различных условиях, включая изучение влияния различных бактериальных штаммов (помимо *E. coli*), используемых в качестве питания. Замена *E. coli* другими бактериальными монокультурами позволяет исследовать влияние, которое видоспецифичные питательные вещества могут оказывать на различные биологические процессы.

Подробно изучено взаимодействие нематод с предполагаемыми комменсальными и пробиотическими бактериями (под пробиотиками понимают бактерии, использование которых в рационе изменяет состав микробиоты в благоприятную сторону и приносит пользу здоровью организма-хозяина либо путем непосредственного взаимодействия с ним, либо посредством модуляции жизнедеятельности других членов микробиоты) [Fuller, 1989]. Эти исследования раскрывают новые механизмы, посредством которых бактерии или их метаболиты могут влиять на передачу сигналов, метаболизм и жизнедеятельность организма-хозяина [Clark, Hodgkin, 2014]. Модель *C. elegans* позволяет изучать воздействие пробиотических бактерий на

продолжительность жизни. Разработка генетически модифицированных пробиотиков имеет большие перспективы в качестве новой терапевтической парадигмы для содействия здоровому старению. Исследования демонстрируют благотворное влияние молочнокислых бактерий и их антиоксидантную активность [Nakagawa, Miyazaki, 2017]. Так, например, показано [Lee, Kwon et al., 2015] что классифицированные недавно молочнокислые бактерии *Weissella* способствуют увеличению продолжительности жизни нематод, активируя DAF-16 через путь терминальной киназы JNK, который связан с ответом на стресс, и путь AMPK, который в свою очередь активируется диетическим ограничением.

Помимо увеличения продолжительности жизни в условиях моноксенической культуры, пробиотики также являются потенциальным источником биологической защиты, в результате чего защитные силы организма-хозяина повышаются под воздействием непатогенных бактерий, что приводит к бóльшей устойчивости к последующей инфекции патогенами. Вещества, продуцируемые полезными бактериями, находящимися в кишечнике *C. elegans*, могут быть дополнительно биохимически охарактеризованы. Представляет большой интерес выяснение молекулярного механизма защиты. Таким образом, становится понятно, что механизмы, с помощью которых пробиотические бактерии влияют на организм хозяина, многочисленны и разнообразны, включая прямые эффекты (ограничение калорийности питания или содержания питательных веществ), эффекты популяции (конкуренция или ингибирование патогенных микроорганизмов) и косвенные эффекты (производство метаболитов) [Komura et al., 2010; Iatsenko et al., 2014; Watson et al., 2014; Lee, Choe et al., 2015; Azat et al., 2016; Nakagawa et al., 2016; Zhao et al., 2017].

В последние годы новые и мощные методы анализа дают представление о многочисленных и многогранных взаимодействиях, происходящих между организмами в изучаемой модели. Это иллюстрируется исследованиями горизонтального переноса генов между бактериями в кишечнике *C. elegans* [Portal-Celhay et al., 2013] и основополагающих эффектов бактериальной колонизации [Portal-Celhay, Blaser, 2012]. Метаанализ данных микрочипов *C. elegans* позволяет проводить анализ экспрессии дифференциальных генов во время заражения, колонизации или роста нематод на ряде бактериальных штаммов [Engelmann et al., 2011].

Однако немало вопросов в исследовании пробиотиков еще остается не решенными. В частности, вопрос о том, способны ли бактерии, такие, как например, *Lactobacillus* или *Bifidobacterium*, установить стабильную колонизацию кишечника, особенно при заражении другими бактериями [Clark, Hodgkin, 2014]. Модель «*C. elegans* – бактерия» остается востребованной для исследования различных путей взаимодействия, эффектов, а также диетических манипуляций с пробиотиками.

Существующие методики применимы также для определения продолжительности жизни при различных условиях, включая изучение влияния бактериальных штаммов, образующих биопленку [Donato et al., 2017], а также диетических ограничений и РНК-интерференции [Amrit et al., 2014]. Изучен механизм увеличения продолжительности жизни и устойчивости к стрессу у *C. elegans*, опосредованный биопленкой [Smolentseva et al., 2017]. Результаты показывают важность непатогенных биопленок для физиологии хозяина и обеспечивают основу для их изучения в высших организмах.

В одной из наших пионерских работ по исследованию влияния бактериального метаболизма *B. subtilis* на продолжительность жизни *C. elegans* была продемонстрирована роль оксида азота, продуцируемого бактериями в этом процессе [Gusarov et al., 2013]. Выяснилось, что бактериальный оксид азота увеличивает продолжительность *C. elegans* и устойчивость к стрессу посредством активации определенной группы генов, которые функционируют под двойным контролем факторов транскрипции HSF-1 и DAF-16. Этот процесс представляет собой пример межвидовой сигнализации с помощью небольшой молекулы и иллюстрирует важное значение комменсальных бактерий для организма-хозяина.

Следует отметить, что ряд факторов осложняет изучение механизмов, с помощью которых микробиота влияет на здоровье человека, особенно на системном уровне (из-за гетерогенности генома человека, сложности и неоднородности микробиоты кишечника, проблемы выращивания этих бактерий в лаборатории и недостаточной степени изученности бактериальной генетики у большинства видов). В то же время данное направление исследований является крайне актуальным, так как живые микроорганизмы, особенно микробиота кишечника, обеспечивают основные функции организма-хозяина и, следовательно, играют важную роль в поддержании здоровья человека. Диапазон и сложность взаимодействий между хозяином и микроорганизмами становится все более очевидным, поскольку крупномасштабные исследования показывают роль микробиоты в ожирении, метаболизме лекарств, устойчивости к болезнетворным микроорганизмам и множестве других процессов. Высокий уровень гомологии между генами *C. elegans* и генами человека [Lai et al., 2000], а также сходство их метаболитов дают надежду на то, что результаты, полученные для этой межвидовой модели, могут быть полезны для понимания влияния человеческой микробиоты на физиологию и развитие организма в норме и при различных патологиях. Глубокое понимание молекулярных механизмов, управляющих различными типами взаимодействия человека с микробиотой, обеспечит важные шаги в направлении использования микробиоты для поддержания здоровья и лечения заболеваний.

Модель «*C. elegans* – бактерия» играет важную роль для изучения взаимодействия «хозяин – микробиота» и поиска потенциальных медиаторов, обуславливающих состояние

ограничения калорийности питания. Как было отмечено выше, диетические ограничения вызывают увеличение продолжительности жизни и отсроченное проявление возрастных патологий почти у каждого изученного вида. Способы манипулирования микробиотой (через фармакологию, диету или манипуляции с генами) с целью воздействия на метаболизм, иммунитет, здоровье и старение в организме хозяина подробно описаны, также рассмотрен многогранный характер взаимодействия нематод и бактерий, включающий хищничество, комменсализм и патогенность [Cabreiro, Gems, 2013]. То есть в отношениях нематод и бактерий последние играют три роли: продукта питания, комменсала и патогена.

Обобщенные эффекты воздействия различных бактериальных штаммов на жизнедеятельность нематод *C. elegans* представлены в Таблице П-1 (Приложение 1). Результаты исследований, приведенные в таблице П-1, демонстрируют значимость комбинированной модели «*C. elegans* – бактерия» для понимания роли микробиоты в условиях нормальной жизнедеятельности организма, в процессах старения, в условиях диетических ограничений, а также для изучения механизмов влияния бактерий-пробиотиков [Ikeda et al., 2007; Wang et al., 2011; Lee et al., 2011; Kim, Mylonakis, 2012; Komura et al., 2013].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резюмируя все вышеизложенное, можно заключить, что межвидовая биологическая модель «*C. elegans* – бактерия» доказала свою эффективность для изучения механизмов взаимодействия между микробиотой и животными. Многие аспекты этого взаимодействия требуют дальнейших исследований. Важной задачей является выявление механизмов, с помощью которых бактериальные метаболические сети взаимодействуют с метаболическими и генорегуляторными сетями *C. elegans*. Понимание механизмов влияния бактерий на жизненный цикл, физиологию и продолжительность жизни *C. elegans* будет способствовать разработке новых стратегий лечения различных заболеваний у других организмов, включая людей, а также заложит основы для обеспечения процессов здорового старения. Настоящая работа предпринята с целью расширения представлений о молекулярных механизмах влияния бактериального метаболизма на продолжительность жизни нематод, поиска новых вариантов взаимодействия микробиота – хозяин, а также для выяснения роли метаболической активности микробиоты в жизнедеятельности организма-хозяина.

Отправной точкой наших исследований послужило обнаружение положительного влияния продуцируемого бактериями оксида азота (представляющего собой пример межвидовой сигнализации) на жизнеспособность и термотолерантность *C. elegans*. Полученные результаты позволяют объяснить более высокую продолжительности жизни нематод при культивировании

на газоне бактерий *B. subtilis* по сравнению с таковой при их выращивании на газоне *E. coli*. В ходе дальнейших исследований мы обнаружили позитивный эффект мутаций в генах бактерий, контролирующих аэробное дыхание, на продолжительность жизни *C. elegans*, а также довольно парадоксальный эффект сокращения жизни нематод под действием антиоксидантов глутатиона и N-ацетилцистеина. Значительное внимание в работе уделено исследованию известного феномена подавления жизнеспособности нематод под действием глюкозы и выявлению решающей роли в этом процессе внутриклеточного гликогена.

Особый интерес представляют полученные в работе данные по изучению метаболизма нуклеозида АИКАР и выяснению молекулярных основ АМРК-опосредованного продления жизни. Согласно полученным результатам, непрерывная активация АМРК штаммом-пробиотиком, производящим АИКАР, приводит к сложному метаболическому ответу, включающему различные эволюционно консервативные биохимические процессы, совместное действие которых обеспечивает геропротекторный эффект. Полученный в ходе работы штамм-пробиотик демонстрирует перспективность искусственно созданных бактерий для коррекции метаболических нарушений и замедления процесса старения.

Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Штаммы бактерий и нематод *C. elegans*

Использованные в работе штаммы бактерий и нематод *C. elegans*, а также их генетические характеристики представлены в Таблице 2.1.1.

Таблица 2.1.1 – Использованные в работе штаммы бактерий и нематод *C. elegans*.

Штамм	Генотип	Происхождение/ источник
1	2	3
Бактерии:		
<i>E. coli</i> :		
K-12 MG1655	F- λ - <i>ilvG</i> - <i>rfb</i> -50 <i>rph</i> -1	[Jensen, 1993]
MG1655 <i>cyoA::kan</i>	Как K-12 MG1655, но <i>cyoA</i> , Km ^R	Данная работа
MG1655 <i>cydA::kan</i>	Как K-12 MG1655, но <i>cydA</i> , Km ^R	Данная работа
MG1655 <i>cyoA::kan</i> <i>cydA::kan</i>	Как K-12 MG1655, но <i>cyoA</i> , <i>cydA</i> , Km ^R	Данная работа
OP50	<i>ura</i> ⁻	[Gusarov et al., 2013]
TG1	<i>thi supE hsd</i> Δ 5 Δ (<i>lac-proAB</i>)/F' <i>tra</i> Δ 36 <i>proAB</i> (+) <i>lacI</i> (q) <i>lacZ</i> Δ M15	[Лобанов и др., 2011]
HT 115	F-, <i>mcrA</i> , <i>mcrB</i> , IN(<i>rrnD-rrnE</i>)1, <i>rnc14::Tn10</i> (DE3 lysogen: <i>lacUV5</i> pT7pol. Tc ^R	Коллекция Thermo Scientific
HT 115 e.v.	Как HT 115, но содержит пустой векторный контроль плазмиды (pL4440)	Коллекция Thermo Scientific
HT 115 <i>gsy-1</i>	Как HT 115, но содержит плазмиду, экспрессирующую двухцепочечные фрагменты антисмысловых РНК против гена <i>gsy-1</i> <i>C. elegans</i>	Коллекция Thermo Scientific
HT 115 <i>pyg-1</i>	Как HT 115, но содержит плазмиду, экспрессирующую двухцепочечные фрагменты антисмысловых РНК против гена <i>pyg-1</i> <i>C. elegans</i>	Коллекция Thermo Scientific
<i>B. subtilis</i> :		
<i>B. subtilis</i> 168 wt	<i>trpC</i> (<i>trp</i> ⁻)	[Spizizen, 1958]

<i>B. subtilis</i> Δnos	<i>trpC2 nos::spc</i> , Spc^R	[Gusarov et al., 2013]
<i>B. subtilis</i> Mu8u5u6	<i>leu met purF</i>	[Yoshikawa, Sueoka, 1963]
<i>B. subtilis</i> AM1182	<i>purF</i> (получен как вариант Leu^+ Met^+ от Mu8u5u6 <i>leu met ade</i>)	Данная работа
<i>B. subtilis</i> AM815	<i>purR::neo ΔT-purE $\Delta purH$ amyE::[P_{rpsF}-prSE-purF_E]</i>	[Лобанов и др., 2011]
<i>B. subtilis</i> AM878	<i>purR::neo ΔT-purE $\Delta purH$ amyE::[P_{rpsF}-prSE-purF_E] P_{rpsF}::zwf</i>	Данная работа
<i>B. subtilis</i> AM890	<i>purR::neo ΔT-purE $\Delta purH$ amyE::[P_{rpsF}-prSE-purF_E-udhA_E] P_{rpsF}::zwf</i>	Данная работа
<i>B. subtilis</i> AM2020 АИКАР↑	<i>purR::neo ΔT-purE $\Delta purH$ amyE::[P_{rpsF}-prSE-purF_E-udhA_E] P_{rpsF}::zwf $\Delta sacB$</i>	Данная работа
Плазмиды:		
pLE1	Производная плазмиды pKS1. Репликон pG ⁺ , (EmR)	[Shatalin, Neyfakh, 2005]
pDG268	Интеграционный вектор, содержащий 5' и 3' области гена <i>amyE</i>	[Stragier et al., 1988]
Нематоды <i>C. elegans</i>:		
N2 Bristol	Дикий тип	Caenorhabditis Genetics Center
<i>aak-2</i>	TG38 (<i>aak-2(gt33)</i>) (делеция в гене <i>aak-2</i>); <i>aak-2(ok524)</i>	Caenorhabditis Genetics Center
<i>daf-2</i>	CB1370 (<i>daf-2(e1370)</i> III)	Caenorhabditis Genetics Center
<i>daf-16</i>	CF1038 (<i>daf-16(mu86)</i> I)	Caenorhabditis Genetics Center
<i>daf-2 daf-16</i>	HT1890 (<i>daf-16(mgDf50)</i> I; <i>daf-2(e1370)</i> III)	Caenorhabditis Genetics Center
<i>clk-1</i>	MQ130 (<i>clk-1(qm30)</i> III)	Caenorhabditis Genetics Center
<i>hsf-1</i>	PS3551 (<i>hsf-1</i> - (<i>sy441</i>) I)	Caenorhabditis Genetics Center

2.2 Получение и культивирование микроорганизмов

2.2.1 Среда

Культивирование бактериальных штаммов осуществляли в жидкой полноценной среде Лурия-Бертани (LB) [Sambrook et al., 1989] (pH 7.0): пептон – 1%; дрожжевой экстракт – 0.5%; NaCl – 0.5%. Либо на твердой среде LA (LB с добавлением 2% бакто-агара).

В качестве минимальной среды для выращивания *E. coli* использовали стандартную минимальную среду M9 с необходимыми добавками [Миллер, 1976].

Для обеспечения селективного роста клеток использовали антибиотики в следующих концентрациях: ампициллин (Amp) – 50 ÷ 120 мкг/мл, канамицин (Km) – 10, 40, 50 мкг/мл, хлорамфеникол (Cm) – 10 мкг/мл, эритромицин (Em) – 3, 300 мкг/мл, карбенициллин (Cb) – 100 мкг/мл, гентамицин (Gm) – 100 мкг/мл.

Для работы с фагами использовали среды следующего состава (г/л): 2хYT Бакто-триптон – 16 г; дрожжевой экстракт – 10 г; NaCl – 5 г (фирма «Difco») и 1хYT Бакто-триптон – 8 г; дрожжевой экстракт – 5 г; NaCl – 5 г (фирма «Difco»). Твердая 1хYT среда содержала 1% агара или 0.6% агара (верхний слой).

2.2.2 Манипуляции с плазмидной ДНК

Выделение ДНК, клонирование, трансформация в клетки *E. coli* и анализ рекомбинантных плазмид выполнялись стандартными методами [Maniatis et al., 1982]. Выделение ДНК *B. subtilis*, очистку и трансформацию *B. subtilis* и отбор проводили, как описано ранее [Anagnostopoulos, Spizizen, 1961; Saito, Miura, 1963].

2.2.3 Построение кривых роста бактериальных штаммов

Ночные культуры бактерий инокулировали в среду LB. Рост клеток контролировали в автоматической системе анализа роста Bioscreen C при 37°C. Все кривые роста были определены в трех повторностях и указано среднее значение.

2.2.4 Получение мутантных штаммов *E. coli* MG1655 *cyoA::kan*, *E. coli* MG1655 *cydA::kan*, *E. coli* MG1655 *cyoA::kan cydA::kan*

Для получения мутантных штаммов в геном штамма *E. coli* MG1655 с помощью трансдукции фагом P1 переносили инсерции *cyoA::kan* и *cydA::kan* из штаммов коллекции Keio [Baba et al., 2006]. Трансдукцию проводили по стандартной методике [Miller, 1972]. Культуру клеток *E. coli* растили в LB бульоне в течение 12 часов при температуре 37°C. Клетки осаждали, дважды промывали 0.025M CaCl₂. К полученному препарату клеток добавляли лизат фага P1

нужного разведения (10^9 фаговых частиц/мл), инкубировали в течение 20 мин при температуре 37°C и высевали на чашки с селективной средой. Отбор трансдуктантов проводили методом реплик.

2.2.5 Конструирование штаммов-продуцентов АИКАР

В качестве исходного материала для конструирования высокоактивного штамма-продуцента АИКАР использовали полученный ранее штамм *B. subtilis* AM815 [Лобанов и др., 2011]. Этот штамм содержит мутацию *purH::Em^R*, приводящую к нарушению экспрессии гена *purH*, мутацию в гене *purR*, кодирующем репрессор биосинтеза пуриновых нуклеотидов, делецию терминатора транскрипции в лидерной области *pur*-оперона и дополнительную копию гена *prs*, обеспечивающего синтез фосфорибозилипирофосфата под контролем промотора гена *rpsF* рибосомного белка S6. Кроме того, в геном этого штамма были интегрированы модифицированные гены *prs* и *purF* *E. coli*, кодирующие ключевые ферменты синтеза предшественников пуринов, под контролем сильного промотора P_{rpsF} , обеспечивающего высокий уровень их экспрессии в клетках *B. subtilis*.

2.2.5.1 Конструирование штамма *B. subtilis* AM878 путем введения в хромосому штамма-реципиента *Bacillus subtilis* AM815 гена *zwf* под контролем сильного промотора P_{rpsF}

Ген *zwf* в геноме штамма *B. subtilis* AM815 подставляли под контроль сильного промотора P_{rpsF} для усиления его экспрессии. Для этого на первом этапе проводили клонирование промоторной области гена *rpsF*, кодирующего синтез рибосомного белка S6, в экспрессионный вектор pLE1 (Рисунок 2.2.1), способный к репликации как в клетках *B. subtilis*, так и *E. coli* и содержащий ген устойчивости к эритромицину [Лобанов и др., 2011]. С этой целью с хромосомной ДНК штамма *B. subtilis*168 *trpC2* проводили ПЦР амплификацию с участием фланкирующих промотор гена *rpsF* праймеров R3, содержащего сайт рестрикции *Pst*I и R4, содержащего сайт рестрикции *Hind*III (Таблица 2.2.1). Полученный ПЦР-продукт размером 192 п.н. очищали в агарозном геле, обрабатывали рестриктазами *Pst*I и *Hind*III и клонировали в векторе pLE1 по сайтам *Pst*I и *Hind*III.

На следующем этапе с хромосомной ДНК штамма *B. subtilis*168 *trpC2* проводили ПЦР амплификацию промотор-проксимального участка гена *zwf* с помощью праймеров Z1, содержащего сайт *Sac*II и Z2, содержащего сайт *Pst*I (Таблица 2.2.1). Полученный ПЦР-продукт размером 427 п.н. очищали в агарозном геле, обрабатывали рестриктазами *Sac*II и *Pst*I и клонировали в векторе pLE1, содержащем промотор *rpsF*, по сайтам *Sac*II и *Pst*I.

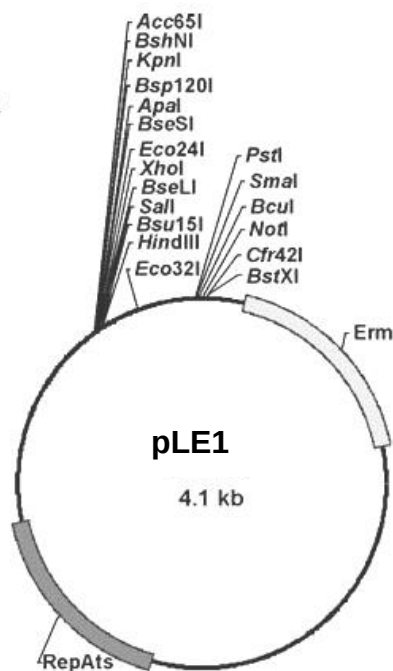


Рисунок 2.2.1 – Структура вектора pLE1. Показана локализация уникальных сайтов рестрикции на векторе. Erm – детерминант устойчивости к эритромицину.

Затем с хромосомной ДНК штамма *B. subtilis* 168 *trpC2* проводили ПЦР амплификацию фрагмента рамки считывания гена *zwf* с помощью праймеров Z3, содержащего сайт *Hind*III и Z4, содержащего сайт *Kpn*I (Таблица 2.2.1). Полученный ПЦР-продукт размером 403 п.н. очищали в агарозном геле, обрабатывали рестриктазами *Hind*III и *Kpn*I и клонировали по тем же сайтам в полученный на предыдущем этапе вектор pLE1, содержащий промотор *rpsF* и промотор-проксимальную область гена *zwf*. У полученной в результате проведенных манипуляций плазмидной конструкции pLE8 P_{rpsF} -*zwf* природный промотор гена *zwf* замещен на промотор P_{rpsF} .

Сконструированной таким образом плазмидой pLE8 проводили трансформацию штамма *E. coli* TG1 с отбором трансформантов Em^R на среде с эритромицином (300 мкг/мл) при 30°C. Полученные клоны проверяли с помощью ПЦР на присутствие в их клетках плазмиды pLE1 с клонированным в ее составе фрагментом *zwf'*- P_{rpsF} -'*zwf*'. Выделенными из проверенных клонов плазмидами pLE8 (*zwf'*- P_{rpsF} -'*zwf*') проводили трансформацию в родительский штамм AM815 с отбором трансформантов Em^R на среде с эритромицином (3 мкг/мл).

Таблица 2.2.1 – Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе.

Праймер	Ген	Нуклеотидная последовательность*
R3	<i>rpsF</i>	5'-ccc <u>ctgcag</u> ttgcttatgaggatcttctt-3' (<i>Pst</i> I)
R4	<i>rpsF</i>	5'-cgca <u>agc</u> ttataatgggcaaggagcaat-3' (<i>Hind</i> III)
Z1	<i>zwf</i>	5'-cgcccgcgggctccccagaagcccc-3' (<i>Sac</i> II)
Z2	<i>zwf</i>	5'-cg <u>cctgcag</u> tacaccccgatatatttcctt-3' (<i>Pst</i> I)
Z3	<i>zwf</i>	5'-cgca <u>agc</u> ttaaatgaaaacaaccaacaacaaaag-3' (<i>Hind</i> III)
Z4	<i>zwf</i>	5'-cgcggtaccctctgattttaatgtttttgc-3' (<i>Kpn</i> I)
U1	<i>udhA</i>	5'-cgcgga <u>tc</u> caggaggtgcaaacagatgggcctgggtaagcaagggt-3' (<i>Bam</i> HI)
U2	<i>udhA</i>	5'-cccgcggg <u>ccg</u> cttaaaacaggcggttaaacctgt-3' (<i>Not</i> I)
S4	<i>sacB</i>	5'-cgcccgcgggcaactttatgcccatgcaa-3' (<i>Sac</i> II)
S5	<i>sacB</i>	5'-cg <u>cctgcag</u> tgcggtagtaaagggttaat-3' (<i>Pst</i> I)
S6	<i>sacB</i>	5'-cg <u>cctgcag</u> catccttgaacaaggacaa-3' (<i>Pst</i> I)
S7	<i>sacB</i>	5'-cg <u>cctcgag</u> acggcatggcgccatt-3' (<i>Xho</i> I)

*Последовательность праймеров дана в ориентации 5'–3'. Подчеркнуты сайты узнавания рестриктаз, приведенных в скобках.

Несколько полученных клонов Em^R культивировали на жидкой среде LB с эритромицином (3 мкг/мл) при 37°C в течение ночи, а затем рассеивали на чашки со средой LB с эритромицином (3 мкг/мл) и инкубировали в течение 24 ч при 37°C. Полученные рекомбинанты Em^R формируются в результате интеграции плазмиды pLE8- (*zwf*^f-P_{*rpsF*}-*zwf*) в соответствующий хромосомный locus *zwf*, что подтверждали наработкой ПЦР-фрагмента размером 1002 п.н. при использовании праймеров Z1 и Z4. Несколько полученных клонов Em^R засевали в жидкую LB среду без антибиотика и инкубировали на качалке при 30°C в течение 48 часов, а затем рассеивали на чашки со средой LB без антибиотика и инкубировали 24 часа при 30°C.

Наконец, на последнем этапе работы выросшие клоны проверяли на выщепление интегрированной плазмиды pLE8, о чем судят по появлению эритромицин-чувствительных клонов. Выщепление плазмиды происходит либо с сохранением в составе хромосомы промотора дикого типа гена *zwf*, либо заменой промотора дикого типа на промотор P_{*rpsF*}. Интеграцию промотора P_{*rpsF*} перед геном *zwf* в хромосому штамма AM815 подтверждали наработкой ПЦР-фрагмента размером 595 п.н. с участием праймеров R1 и Z4. Один из вариантов штамма AM815, включивший ген *zwf* под контролем промотора P_{*rpsF*}, получивший наименование AM878, был использован в дальнейшей работе.

2.2.5.2 Конструирование штамма *B. subtilis* AM890 путем введения в геном штамма *B. subtilis* AM878 гетерологичного гена *udhA* *E. coli* под контролем промотора P_{rpsF}

Для клонирования структурной части гена *udhA* *E. coli* под контролем промотора P_{rpsF} использовали полученную ранее плазмиду pDG268 (Рисунок 2.2.2), содержащую в своем составе модифицированные гетерологичные гены *prs* и *purF* *E. coli* под контролем промотора P_{rpsF} [Лобанов и др., 2011].

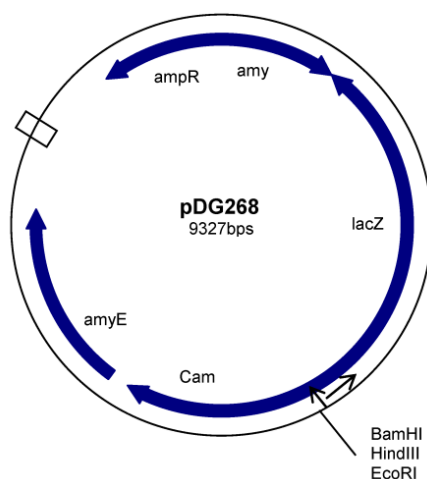


Рисунок 2.2.2 – Структура плазмиды pDG268. Показана локализация уникальных сайтов рестрикции на векторе, а также расположение участков гена *amyE*. AmpR и Cam – детерминанты устойчивости к ампициллину и хлорамфениколу, соответственно.

На первом этапе работы с хромосомной ДНК *E. coli* (штамм MG1655) проводили ПЦР амплификацию структурной области гена *udhA* с участием праймеров U1, содержащего сайт рестрикции *Bam*HI и U2, содержащего сайт рестрикции *Not*I (Таблица 2.2.1). Полученный ПЦР-продукт размером 1344 п.н. очищали в агарозном геле, обрабатывали рестриктазами *Bam*HI и *Not*I и клонировали по тем же сайтам в плазмиду pLE4, содержащую в своем составе модифицированные гетерологичные гены *prs* и *purF* *E. coli* под контролем промотора P_{rpsF} . Важно подчеркнуть, что в 5'-область праймера U1 включена оптимизированная для экспрессии в бациллах нуклеотидная последовательность сайта связывания рибосомы (SD). В результате была получена плазида pLE5, содержащая ген *udhA* под контролем промотора P_{rpsF} .

На заключительном этапе работы проводили интеграцию полученной плазмиды pLE5 в хромосомный локус *amyE* полученного на предыдущем этапе штамма-продуцента AM878. Полученный штамм AM890 был использован в дальнейшей работе.

2.2.5.3 Конструирование штамма *B. subtilis* AM2020 путем введения в геном штамма *B. subtilis* AM890 делеции гена *sacB*

Для получения делеции гена *sacB* использовали описанный выше вектор pLE1. На первом этапе работы проводили клонирование фрагмента хромосомы, расположенного перед рамкой считывания гена *sacB*. С этой целью с хромосомной ДНК штамма *B. subtilis* 168 *trpC2* проводили ПЦР амплификацию соответствующего фрагмента с участием праймера S4, содержащего сайт рестрикции *SacII* и праймера S5, содержащего сайт рестрикции *PstI* (Таблица 2.2.1). Полученный ПЦР-продукт размером 430 п.н. очищали в агарозном геле, обрабатывали рестриктазами *SacII* и *PstI* и клонировали в векторе по сайтам *PstI* и (*SacII*).

На втором этапе с хромосомной ДНК штамма *B. subtilis* 168 *trpC2* проводили ПЦР амплификацию фрагмента, расположенного сразу за рамкой считывания гена *sacB* с участием праймера S6, содержащего сайт рестрикции *PstI* и праймера S7, содержащего сайт рестрикции *XhoI* (Таблица 2.2.1). Полученный ПЦР-продукт размером 387 п.н. очищали в агарозном геле, обрабатывали рестриктазами *PstI* и *XhoI* и клонировали по сайтам *PstI* и *XhoI* в полученный на предыдущем этапе вектор pLE1, содержащий вставку фрагмента S4-S5.

Сконструированной таким образом плазмидой pLE6 проводили трансформацию в штамм *E. coli* TG1 с отбором трансформантов Em^R на среде с эритромицином (300 мкг/мл) при 30°C. Полученные клоны проверяли с помощью ПЦР на присутствие в клетках плазмиды pLE6 с клонированными в ее составе фрагментами S4-S5 и S6-S7. Выделенными из проверенных клонов плазмидами проводили трансформацию в описанный в примере штамм AM890 с отбором трансформантов Em^R на среде с эритромицином (3 мкг/мл). Несколько полученных клонов Em^R культивировали на жидкой среде LB с эритромицином (3 мкг/мл) при 37°C в течение ночи, а затем рассеивали на чашки со средой LB с эритромицином (3 мкг/мл) и инкубировали в течение 24 ч при 37°C. Полученные рекомбинанты Em^R сформированы в результате гомологичной рекомбинации между фланкирующими ген *sacB* последовательностями S4-S5 и S6-S7 и хромосомой. Несколько полученных клонов Em^R засеивали в жидкую LB среду без антибиотика и инкубировали на качалке при 30°C в течение 48 часов, а затем рассеивали на чашки со средой LB без антибиотика и инкубируют 24 часа при 30°C.

Выросшие клоны на последнем этапе работы проверяли на выщепление интегрированной плазмиды pLE6, о чем судили по появлению эритромицин-чувствительных клонов. Выщепление плазмиды происходит либо с сохранением в составе хромосомы дикого аллеля гена *sacB*, либо с включением делеции этого гена. Интеграцию делеции гена *sacB* в хромосому штамма AM890 подтверждали наработкой ПЦР-фрагмента размером 817 п.н. с

участием праймеров S4 и S7, тогда как в случае штамма дикого типа *sacB*⁺, получали ПЦР-фрагмент размером 1776 п.н. Один из вариантов штамма AM890, включивший делецию гена *sacB*, получивший наименование AM2020 АИКАР[↑] и обладающий максимальной продукцией АИКАР, использовали в дальнейшей работе.

2.3 Культивирование нематод *C. elegans*

2.3.1 Среда

Нематод *C. elegans* выращивали на стандартной агаризованной питательной среде NGM (Nematode Growth Media) по протоколу [Stiernagle, 2006], следующего состава (г/л или мл/л): NaCl – 3 г, пептон – 2.5 г, агар – 20 г, 1 мл 1М CaCl₂, 1 мл раствора холестерина в спирте (5 мг/мл), 1 мл 1М MgSO₄ и 25 мл 1М K₃PO₄ буфера (pH 6.0).

В зависимости от эксперимента в среду NGM добавляли гипоксантин – 20 мкг/мл, глюкозу 2%, аргинин 0.5 мМ (среда NGMga).

Для постановки опытов с «мертвыми» бактериями в среду NGM добавляли антибиотики в следующих концентрациях: канамицин – 50 мкг/мл, ампициллин – 100 мкг/мл.

В случае культивирования нематод на агаризованной полноценной среде LA в нее добавляли спиртовой раствор холестерина (в количестве, эквивалентном добавке в среду NGM).

Для постановки опытов с «мертвыми» бактериями в среду LA добавляли антибиотики в следующих концентрациях: карбенициллин – 100 мкг/мл, гентамицин – 100 мкг/мл.

2.3.2 Подготовка пищевого бактериального субстрата для нематод

Подготовка пищевого субстрата для нематод. В стандартных лабораторных условиях *C. elegans* культивируют совместно с моноксенической культурой *E. coli* OP50 [Stiernagle, 2006]. Микроорганизмы выращивали в жидкой среде LB с необходимыми добавками при температуре 37°C на качалке n=220 оборотов/мин. в течение 16-18 часов. Для обеспечения селективного роста клеток в LB добавляли соответствующие антибиотики. Ночную культуру микроорганизмов (40 мкл) высевали на чашки с NGM-средой и необходимыми добавками и выращивали в термостате при температуре 37°C в течение 16 часов. Перед посадкой нематод чашки с питательной подложкой охлаждали до 20°C.

Подготовка пищевого субстрата для нематод с «мертвыми» бактериями *E. coli* OP50. Выращенную ночную культуру бактерий *E. coli* OP50 концентрировали в 20 раз и по 50 мкл наносили на чашки со NGM-средой с добавлением канамицина (50 мкг/мл) и ампициллина (100 мкг/мл), далее чашки охлаждали до 20°C и использовали для посадки нематод.

Подготовка пищевого субстрата для нематод с бактериями *B. subtilis* AM1182 и *B. subtilis* AM2020 АИКАР↑. Штаммы выращивали в среде LB с добавлением канамицина (10 мкг/мл) для *B. subtilis* AM1182 и канамицина (10 мкг/мл) с хлорамфениколом (10 мкг/мл) для *B. subtilis* AM2020 АИКАР↑ в течение 18 часов при температуре 37°C на качалке со скоростью 250 оборотов/мин. При необходимости добавляли глюкозу (2%). Далее засевали по 40 мкл ночной культуры на чашки со средой NGM с гипоксантином (20 мкг/мл) или средой LA с добавлением холестерина и выращивали в термостате при температуре 37°C в течение 16 часов. Затем чашки охлаждали до 20°C и использовали для посадки нематод.

Подготовка пищевого субстрата для нематод с «мертвыми» бактериями *B. subtilis* AM1182 и *B. subtilis* AM2020 АИКАР↑. Штамм *B. subtilis* AM1182 выращивали в среде LB с добавлением канамицина (10 мкг/мл), штамм *B. subtilis* AM2020 АИКАР↑ – в среде LB с добавлением канамицина (10 мкг/мл) и хлорамфеникола (10 мкг/мл) в течение 18 часов при температуре 37°C на качалке со скоростью 250 оборотов/мин. Далее культуру концентрировали в 10 раз, отмывали буфером M9. Ресуспендировали в M9, раскапывали по 50 мкл на чашки со средой LA с добавлением холестерина и антибиотиков (карбенициллин – 100 мкг/мл, гентамицин – 100 мкг/мл). При необходимости в качестве источника углерода добавляли глюкозу (2%). Чашки охлаждали до 20°C и использовали для посадки нематод.

2.3.3 Определение продолжительности жизни нематод

Наблюдение с использованием стереомикроскопа и манипуляции с нематодами проводили с помощью стеклянной Пастеровской пипетки с закрепленной на конце платиновой проволокой толщиной 200 мкм. После каждого прикосновения проволоку обжигали пламенем для избегания контаминации. Все эксперименты с нематодами проводили при температуре 20°C, как описано ранее [Apfeld, Kenyon, 1999; Dillin et al., 2002] (если особо не указано иное). Штамм *daf-2* выращивали при 15°C до стадии L4, далее работали при 20°C.

Для устранения посторонней микрофлоры яйца нематод обрабатывали раствором 0.5% гипохлорита натрия и 0,5 N NaOH [Stiernagle, 2006].

Для экспериментов нематод выращивали в течение 2-х генераций из отмытых от посторонней микрофлоры яиц на среде NGM или LA с необходимыми добавками и определенным бактериальным газоном. [Stiernagle, 2006]. С целью установления возрастной синхронизации взрослых особей для откладывания яиц отсаживали на среды с соответствующим бактериальным газоном. После 3-4-х часов инкубации при температуре 20°C взрослых нематод убирали и выращивали личинки из яиц до возраста L4, далее особей использовали для проведения экспериментов. Во всех случаях за начальную точку $t=0$ принимали возраст нематод L4. Численность особей контролировали ежедневно.

Использованное количество нематод в опыте – не менее 100 особей на точку. Пересадку нематод осуществляли через день на аналогичные среды в течение всего эксперимента. Животные считались мертвыми, когда они прекращали глоточную перекачку и не реагировали на касание платиновой проволокой. Особей с внутренним вылуплением яиц удаляли из чашек и не включали в расчеты продолжительности жизни. Продолжительность жизни нематод оценивалась путем определения временного интервала, который соответствует выживаемости 50% популяции (средняя (срединная) продолжительность жизни – СПЖ). Все эксперименты повторяли как минимум три раза. Построение графиков и их обработка методом сигмоидальной аппроксимации экспериментальных данных проводились с использованием программы SciDAVis 0.2.1. СПЖ сравнивались в Microsoft Excel с использованием t-критерия Стьюдента (двустороннее распределение, парный) (если не указано иное). Все графики продолжительности жизни представляют собой совокупность всех независимых экспериментов.

2.3.4 Определение продолжительности жизни нематод при выращивании на бактериальных штаммах *E. coli* MG1655 *cyoA::kan*, *E. coli* MG1655 *cydA::kan*, *E. coli* MG1655 *cyoA::kan cydA::kan*

Нематод *C. elegans* выращивали из отмытых от посторонней микрофлоры яиц на среде NGM с соответствующим бактериальным газоном в течение 2-х генераций, затем инкубировали при температуре 20°C до возраста L4. В качестве питательного субстрата использовались штаммы *E. coli* MG1655 *cyoA::kan*, *E. coli* MG1655 *cydA::kan*, *E. coli* MG1655 *cyoA::kan cydA::kan*, выращенные по описанной выше методике. Далее проводили эксперименты по определению продолжительности жизни. Пересадку осуществляли через день на аналогичные среды в течение всего эксперимента.

2.3.5 Определение влияния экзогенного АИКАР на продолжительность жизни *C. elegans* при различных условиях

Определение влияния экзогенного АИКАР на продолжительность жизни *C. elegans* N2 при выращивании на живых бактериях *E. coli* OP50. Нематод выращивали из отмытых от посторонней микрофлоры яиц в течение 2-х генераций, затем инкубировали до возраста L4 на чашках Петри со средой NGM при температуре 20°C. Далее пересаживали на чашки для опыта NGM-средой с добавлением раствора АИКАР в концентрации 0.01 мМ, 0.05 мМ, 0.1 мМ и 1 мМ и чашки без добавления АИКАР как контрольные. В качестве питательного субстрата для нематод использовался штамм *E. coli* OP50. Штамм *E. coli* OP50 выращивали по методике, описанной выше. Пересадку осуществляли через день на аналогичные среды в течение всего эксперимента.

Определение влияния экзогенного АИКАР на продолжительность жизни *C. elegans* N2 при выращивании на «мертвых» *E. coli* OP50. Нематод выращивали из отмытых от посторонней микрофлоры яиц в течение 2-х генераций, затем инкубировали до возраста L4 на чашках Петри со средой NGM при температуре 20°C. Далее пересаживали на чашки для опыта с добавлением антибиотиков (канамицин – 50 мкг/мл, ампициллин – 100 мкг/мл) и 0.1 мМ раствора АИКАР (и чашки без добавления АИКАР – как контрольные). В качестве корма использовался штамм *E. coli* OP50, приготовленный по описанной выше методике работы с «мертвыми» бактериями. Пересадку осуществляли через день на аналогичные среды в течение всего эксперимента.

Определение влияния экзогенного АИКАР на продолжительность жизни *C. elegans* N2 при выращивании на различных штаммах *B. subtilis*. Нематод выращивали при температуре 20°C из отмытых от посторонней микрофлоры яиц в течение 2-х генераций, затем инкубировали до возраста L4 на чашках Петри со средой LA (с добавлением холестерина) или NGM с добавлением гипоксантина. Далее пересаживали на соответствующие чашки для опыта со средой LA (с добавлением холестерина) или NGM-средой с добавлением гипоксантина и раствора АИКАР (и чашки без добавления АИКАР – как контрольные). В качестве корма использовались различные штаммы *B. subtilis*, выращенные по описанным выше методикам. Пересадку осуществляли через день на аналогичные среды в течение всего эксперимента.

2.4 Изучение влияния штаммов *B. subtilis* Δnos на термотолерантность нематод

Анализ термотолерантности нематод выполнялся как описано ранее [McColl, 2010]. Нематоды выращивались при 20°C до возраста L4 на чашках со средой NGM или NGM с добавлением глюкозы (2%) и аргинина (0.5 мМ) (NGMga), засеянные штаммами *B. subtilis* wt или *B. subtilis* Δnos . Чтобы избежать смешивания с потомством, особей переносили на чашки со свежей средой на 2-й и 3-й дни. Затем чашки переносили на 32°C или 34°C и рассчитывали среднее время выживания. В стандартном эксперименте использовали от трех до четырех чашек с нематодами, содержащих примерно по 30-40 особей.

2.5 Определение концентрации АИКАР

2.5.1 Определение концентрации АИКАР в культуральной жидкости

Для определения АИКАР в культуральной жидкости бактериальные штаммы выращивали в LB $\pm$ глюкоза (2%) при температуре 37°C на качалке со скоростью 250 об/мин. Концентрация АИКАР определялась спектрофотометрическим экспресс-методом в

осветленном супернатанте бактериальных культур с использованием техники связывания диазотированием с N-(1-нафтил) этилендиамином [Fujitaki et al., 1994].

2.5.2 Ферментация АИКАР штаммами *B. subtilis* и количественная оценка

Штаммы *B. subtilis* выращивали в ферментере объемом 1 л при 37°C. Состав ферментационной среды (%): дрожжи – 0.5-1; сахароза – 13-13; соевый экстракт – 2.5-3.5; экстракт кукурузы – 3.0-5.0; мочевины – 0.6-0.8; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 0.8-1.6; пропанол (пеногаситель) – 0.4-0.5. Через 72 часа отбирали аликвоты, очищали центрифугированием (18000 оборотов/мин, 2 мин) и определяли количество АИКАР и других нуклеозидов путем сравнения с их стандартным временем удерживания на ВЭЖХ. Образцы разделяли при 30°C на колонке C18 (2.5% этанол в 5 мМ ацетате натрия) и анализировали с помощью блока разделения Waters Alliance 2695 с детектором фотодиодной матрицы 2996. Данные были проанализированы с помощью программного обеспечения Empower Pro.

2.5.3 Определение внутриклеточной концентрации АИКАР у нематод

Для определения внутриклеточного уровня АИКАР нематод выращивали на чашках с LA до стадии L4, переносили на чашки со средой LA + глюкоза (2%) и инкубировали при 20°C до стадии A3 (3-й день жизни взрослой особи). Около 100 особей смывали с чашек и обрабатывали три раза ледяным PBS+0.01% буфером Triton X-100 для удаления любых внеклеточных соединений АИКАР, быстро замораживали в жидком азоте. Затем разбавляли 50 мкл PBS, измельчали пестиком, лизировали с помощью двух циклов замораживания-оттаивания и обрабатывали ультразвуком в Bioruptor (Diagenode). Лизаты разбавляли 150 мкл PBS, фильтровали через фильтры 0.2 мкм и измеряли концентрацию АИКАР, используя метод диазотирования связывания с N-(1-нафтил) этилендиамином [Fujitaki et al., 1994]. Концентрацию белка в лизатах определяли методом Брэдфорда (BioRad). Концентрация АИКАР была приведена к концентрации белка в образцах. Калориметрический метод, который был использован, определяет кумулятивную концентрацию не фосфорилированных и фосфорилированных форм АИКАР, включая SAICAR фосфорилированных [Fujitaki et al., 1994].

2.6 Определение воздействия NO на нематод

Донор NO МАНМА NONOate имеет очень короткий период полураспада при pH = 6 (~1 мин). Поэтому для достижения оптимального воздействия NO на *C. elegans*, свежеприготовленные чашки с NGM-средой открывали в вытяжном шкафу на 30–40 мин, чтобы испарить избыток жидкости и обеспечить быстрое впитывание добавленных растворов.

Затем чашки переносили на 20°C и выдерживали в течение 2-х часов. Свежеприготовленный раствор донора NO в воде (250 мМ) наносили на чашки со средой NGM для достижения конечной концентрации 1 мМ. Сразу после этого на чашку наносили 50 мкл ночной бактериальной культуры, а затем быстро переносили около 40 нематод. Для контрольных экспериментов донор NO заменяли равным количеством дистиллированной воды. Для измерения влияния NO на продолжительность жизни особи подвергались воздействию NO на стадии A2 (2-й день взрослой жизни) и стадии A4 (4-й день взрослой жизни).

2.7 Методика постановки экспериментов с антисмысловыми РНК

В экспериментах с антисмысловыми РНК использовали штаммы *E. coli* HT115 *gsy-1* и *E. coli* HT115 *pyg-1*, несущие плазмиды, экспрессирующие двухцепочечные РНК против генов *gsy-1* и *pyg-1* *C. elegans*. В качестве контроля был взят штамм *E. coli* HT115 *e.v.* – штамм с пустым векторным контролем плазмиды PL4440. Все штаммы приобрели из коллекции Thermo Scientific (изоляты были очищены и секвенированы, чтобы доказать наличие правильной вставки).

Ночные культуры бактерий *E. coli* HT115 *e.v.*, *E. coli* HT115 *gsy-1* и *E. coli* HT115 *pyg-1* выращивали в LB (с добавлением 100 мкг/мл карбенициллина), концентрировали в 4 раза и по 50 мкл распределяли на чашки со средой NGM, с 100 мкг/мл карбенициллина и 1 мМ IPTG. Засеянные чашки инкубировали не менее 1 часа при 20°C перед посадкой на них нематод. При постановке опытов использовали две схемы эксперимента:

1. С целью установления возрастной синхронизации взрослых особей нематод, очищенных от посторонней микрофлоры, для откладывания яиц отсаживали на чашки Петри с бактериальным газоном штамма HT115 *e.v.* После 3-4 часов инкубации при температуре 20°C взрослых нематод убирали и выращивали личинки из яиц до возраста L4 и далее использовали для проведения экспериментов со штаммами HT115 *e.v.* или с антисмысловыми двухнитевыми фрагментами RNAi.
2. С целью установления возрастной синхронизации очищенных от посторонней микрофлоры взрослых особей для откладывания яиц отсаживали на чашки Петри с бактериальным газоном штамма HT115 *e.v.* или HT115 *gsy-1* или HT115 *pyg-1*. После 3-4 часов инкубации при температуре 20°C взрослых нематод убирали и выращивали личинки из яиц до возраста L4 и далее использовали для проведения экспериментов со штаммами HT115 с «пустым» вектором или с антисмысловыми двухнитевыми фрагментами RNAi соответственно.

2.8 Статистическая обработка данных

Построение графиков и их обработка методом сигмоидальной аппроксимации экспериментальных данных проводились с использованием программного пакета статистического анализа SciDAVis 0.2.1. Все графики продолжительности жизни представляют собой совокупность всех независимых экспериментов, результаты которых приведены в соответствующих таблицах. Результаты были представлены как средние значения СПЖ $\pm$ стандартное отклонение (SD). Значение р-критерия рассчитывали в Microsoft Excel по отношению к контрольным особям в том же эксперименте с использованием t-критерия Стьюдента (двустороннее распределение, парный) (если не указано иное) [Gusarov et al., 2021]. Значения $p < 0.05$ считались значимыми. Процент увеличения (+) или уменьшения (-) срединной продолжительности жизни (50% выживаемости) считается относительно контроля в том же эксперименте. Подробные результаты отдельных экспериментов указывались в соответствующих таблицах.

Глава 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Продуцируемый бактериями оксид азота увеличивает продолжительность жизни и термотолерантность нематод *C. elegans*

В многоклеточных организмах оксид азота (NO) является сигнальной молекулой и обладает множеством важных функций. Он модулирует активность различных белков (прямо или косвенно), а также защищает бактерии от окислительного стресса и антибиотиков [Shatalin et al., 2008; Gusarov et al., 2009]. Функции этой небольшой молекулы в сердечно-сосудистой, иммунной и нейрональной системах представляют собой наиболее изученные примеры NO-опосредованной передачи сигналов [Moncada, Higgs, 1991; MacMicking et al., 1997; Ignarro, 1999].

Большинство животных продуцируют оксид азота из L-аргинина под контролем семейства специализированных ферментов, известных как NO-синтазы (NOS). Нематоды *C. elegans* являются исключением и не имеют собственных NOS, однако в своей естественной среде они питаются бациллами, обладающими функциональными NOS.

Эукариоты, вероятно, приобрели NOS от бактерий [Gusarov et al., 2008] путем горизонтального переноса соответствующего гена, что приводит к его автономной экспрессии в различных тканях. Возможно, что *C. elegans* потеряли свою NOS из-за достаточного поступления оксида азота от бактерий.

Известно, что нематоды, культивируемые на газоне *B. subtilis*, характеризуются заметно большей продолжительностью жизни по сравнению с таковой при их выращивании на газоне *E. coli*. В отличие от *B. subtilis*, бактерии *E. coli*, как и нематоды, не имеют собственной активной NOS. Мы предположили, что более высокая продолжительность жизни нематод на газоне *B. subtilis* связана с позитивным действием выделяемого этими бактериями оксида азота на жизнеспособность особей.

Для проверки данного предположения был инактивирован ген *nos* в геноме *B. subtilis* (*B. subtilis* Δnos) и проведено сравнение продолжительности жизни нематод при их культивировании на этом мутанте и родительском штамме *B. subtilis* дикого типа (*B. subtilis* wt).

3.1.1 Изучение влияния штаммов *B. subtilis* Δnos на продолжительность жизни нематод

В экспериментах с использованием стандартной среды NGM мы не обнаружили различия в продолжительности жизни нематод при их выращивании на мутантном штамме *B. subtilis* Δnos и родительском диком штамме (Рисунок 3.1.1).

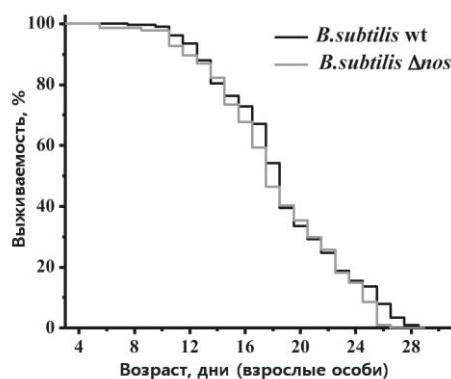


Рисунок 3.1.1 – Влияние бактериального оксида азота на продолжительность жизни *C. elegans* N2 (среда NGM). Инактивация гена *nos* у *B. subtilis* не влияет на продолжительность жизни нематод при их выращивании на среде NGM. Ночные культуры *B. subtilis* wt и *B. subtilis* Δnos высевали на NGM, инкубировали в течение ночи при 25°C, а затем 2 часа при 20°C. Продолжительность жизни нематод контролировали при 20°C. Показано среднее из четырех независимых экспериментов (см. также Таблицу 3.1.1).

Выяснилось, что при выращивании на среде NGM штаммы *B. subtilis* очень быстро образуют споры, которые метаболически не активны и не продуцируют оксид азота. Для подавления спорообразования и создания условий для оптимальной продукции NO в среду NGM добавляли глюкозу (2%) и аргинин (0.5 мМ) (NGMga). Культивирование нематод на газоне бактерий, выращенных на этой среде, выявило существенное различие в продолжительности жизни нематод – на мутантном штамме *B. subtilis* Δnos она сократилась на 14.74% (Рисунок 3.1.2, Таблица 3.1.1).

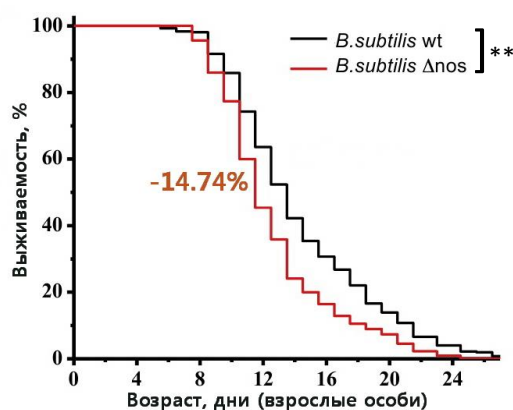


Рисунок 3.1.2 – Влияние бактериального NO на продолжительность жизни *C. elegans* N2 (среда NGMga). Отсутствие бактериального NO снижает продолжительность жизни *C. elegans*. Нематод выращивали на чашках со средой NGMga, засеянных штаммом *B. subtilis* Δnos или *B. subtilis* wt. На графике представлены средние значения из трех независимых экспериментов (см. также Таблицу 3.1.1). ** $p < 0.01$

Таблица 3.1.1 – Результаты анализа продолжительности жизни*.

Пов- торы	Штамм <i>C. ele- gans</i>	Бактери- альный штамм	Среда/ добавка	Коли- чество умерших особей/ общее коли- чество	50% выжива- емость, дни	Средняя выжива- емость, дни±SD	Р- значение	Увели- чение/ сниже- ние, %	Среднее увели- чение/ снижение, %±SEM
1	N2	<i>B. subtilis</i> 168	NGM	83/95	18.7	18.37±0.18			
2				87/97	18.1				
3				102/124	18.3				
1		<i>B. subtilis</i> <i>Δnos</i>		82/96	18.8	18.19±0.31	0.337566	0.53	-0.97±0.76
2				93/98	17.83			-1.5	
3				118/140	17.95			-1.95	
1	N2	<i>B. subtilis</i> 168	NGMga	85/94	13.69	13.75±0.21			
2				86/90	13.42				
3				85/90	14.13				
1		<i>B. subtilis</i> <i>Δnos</i>		80/90	11.7	11.98±0.14	0.00108	-17.01	-14.74±2.0
2				80/90	12.11			-10.82	
3				80/86	12.14			-16.39	

* Каждый набор данных (повтор) был аппроксимирован сигмовидной кривой Больцмана и рассчитано среднее время выживания. Проценты изменения продолжительности жизни выражены относительно контроля в том же повторе эксперимента. Независимые экспериментальные и контрольные опыты, которые проводились параллельно, обозначены одинаковыми цифрами в первом столбце. Указывается увеличение (+) или уменьшение (-) продолжительности жизни. Значения р были рассчитаны относительно контрольных нематод в том же эксперименте с использованием t-критерия Стьюдента (одностороннее распределение и равная дисперсия для двух выборок).

На газоне *E. coli* был продемонстрирован позитивный эффект оксида азота на жизнеспособность нематод при использовании синтетического донора NO (МАНМА NONOate), добавляемого в среду NGM (Рисунок 3.1.3). Примечательно, что позитивный эффект NO проявлялся независимо от известного негативного действия глюкозы на продолжительность жизни нематод.

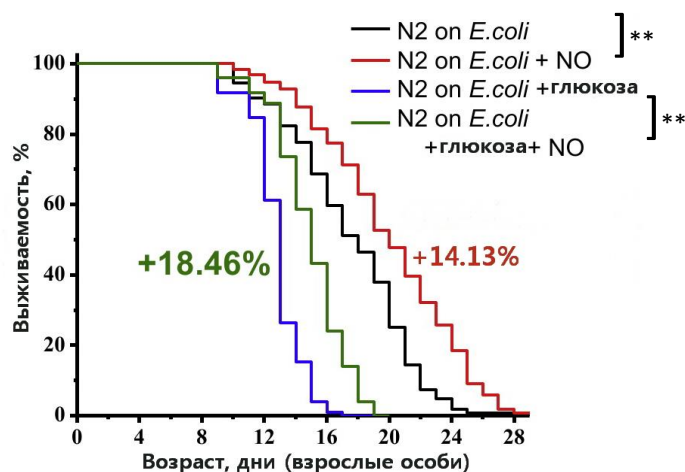


Рисунок 3.1.3 – Донор оксида азота увеличивает продолжительность жизни *C. elegans* N2. Нематод выращивали на подложке *E. coli* до возраста L4 и переносили на чашки с газоном *E. coli* с добавлением или без добавления 1 мМ МАНМА NONOate. Обработку NO повторяли через 2 и 4 дня. Эксперимент проводили на чашках с агаром NGM (черный и красный) и NGMga (синий и зеленый) (см. также Таблицу 3.1.2). ** $p < 0.01$

Таблица 3.1.2 – Результаты анализа продолжительности жизни.

Повторы	Штамм <i>C. elegans</i>	Бактериальный штамм	Среда/добавка	Количество умерших особей/общее количество	50% выживаемость, дни	Средняя выживаемость, дни±SD	Р-значение	Увеличение/снижение, %	Среднее увеличение/снижение, %±SEM
1	N2	<i>E. coli</i> OP50	NGM	44/50	17.27	17.18±0.21	0.00994		14.13±2.27
2				50/54	16.79				
3				42/55	17.49				
1			NGM+NO МАНМА	44/50	20.09	19.62±0.62		16.33	
2				66/74	18.4			9.6	
3				55/65	20.37			16.47	
1	N2	<i>E. coli</i> OP50	NGM+ глюкоза	98/105	12.29	12.1±0.2	0.00895		18.46±0.03
2				75/85	11.9				
1			NGM+ глюкоза+ NO	99/107	14.56	14.33±0.23		18.43	
2				73/85	14.1			18.49	

3.1.2 NO-зависимое увеличение продолжительности жизни нематод зависит от активности глобальных регуляторов *daf-16* и *hsf-1*

Продолжительность жизни нематод находится под контролем нескольких сигнальных путей и транскрипционных факторов, ответственных за реакцию особей на стрессы и доступность питания [Vijg, Campisi, 2008; Kenyon, 2010]. Ингибирование инсулин-подобной сигнальной системы (ILS) и нарушения метаболизма митохондрий являются наиболее изученными факторами, которые влияют на продолжительность жизни нематод [Lakowski, Hekimi, 1996; Mukhopadhyay et al., 2006; Kenyon, 2010]. Для того, чтобы определить, вовлечен ли эффект оксида азота в функционирование одной из этих регуляторных систем, мы изучили влияние NO на поведение мутантных линий нематод *C. elegans daf-16* и *clk-1*. DAF-16 представляет собой транскрипционный фактор FOXO, который необходим для поддержания нормальной продолжительности жизни под контролем ILS [Mukhopadhyay et al., 2006; Kenyon, 2010]. Мутация *clk-1* снижает содержание и уровень синтеза убихинона в митохондриях, в результате чего происходит увеличение продолжительности жизни, замедляется развитие и нарушается клеточный цикл [Lakowski, Hekimi, 1996].

Как следует из данных, представленных на рисунке 3.1.4, донор NO увеличивает продолжительность жизни мутанта *clk-1* примерно на 13%, но не оказывает позитивного влияния на мутанта *daf-16*.

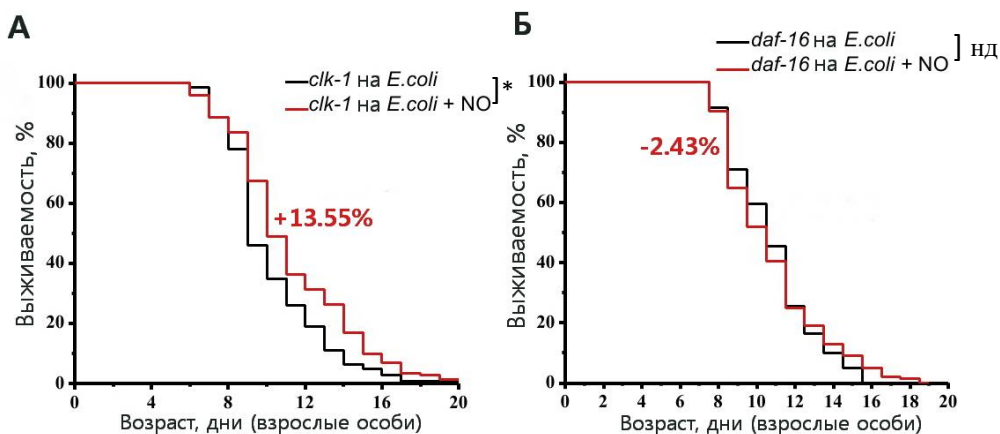


Рисунок 3.1.4 – (А) Донор NO увеличивает продолжительность жизни мутантного штамма *C. elegans clk-1*. На графике показана продолжительность взрослой жизни без длительного периода развития. Эксперимент проводился на среде NGM, как описано в подписи к рисунку 3.1.3. Представлено среднее из трех экспериментов. (Б) Экзогенный NO не увеличивает продолжительность жизни мутантного штамма *C. elegans daf-16*. Экспериментальные условия такие же, как описано для (А) (см. также Таблицу 3.1.3). * $p < 0.05$, нд – не достоверно.

Таблица 3.1.3 – Результаты анализа продолжительности жизни.

Повторы	Штамм <i>C. elegans</i>	Бактериальный штамм	Среда/добавка	Количество умерших особей/общее количество	50% выживаемость, дни	Средняя выживаемость, дни $\pm$ SD	Р-значение	Увеличение/снижение, %	Среднее увеличение/снижение, % $\pm$ SEM
1	<i>clk-1</i>	<i>E. coli</i> OP50	NGM	107/120	8.8	8.85 $\pm$ 0.05			
2				156/170	8.9				
1			NGM+	73/120	9.85	10.05 $\pm$ 0.2	0.014134	11.93	13.55 $\pm$ 1.62
2			NO	103/120	10.25			15.17	
1	<i>daf-16</i>	<i>E. coli</i> OP50	NGM	48/80	10.81	10.56 $\pm$ 0.2			
2				69/80	10.3	6			
1			NGM+	40/80	10.2	10.29 $\pm$ 0.0	0.215218	-5.64	-2.43 $\pm$ 3.21
2			NO	70/80	10.38	9		0.78	

Целая группа генов, ответственных за продолжительность жизни, находится под двойным контролем со стороны *daf-16* и транскрипционного фактора *hsf-1*. HSF-1 является ключевым активатором генов теплового шока (HS), кодирующих молекулярные шапероны и другие цитопротекторные молекулы [Morimoto, 2008; Anckar, Sistonen, 2011]. Ингибирование фактора HSF-1 у *C. elegans* приводит к снижению термотолерантности, протеотоксичности и увеличению скорости старения нематод [Garigan et al., 2002; Morley, Morimoto, 2004]. Увеличение активности гена *hsf-1*, напротив, вызывает увеличение продолжительности жизни и снижение токсичной агрегации белков [Hsu et al., 2003]. Тестирование эффекта экзогенного NO на жизнеспособность мутанта *C. elegans* с нарушенной экспрессией гена *hsf* не выявило изменения в продолжительности жизни нематод при их культивировании на газоне *E. coli* (Рисунок 3.1.5А). Также продолжительность жизни нематод на газоне *B. subtilis* wt и *B. subtilis* Δ nos оказалась одинаковой на фоне инактивированного гена *hsf* (Рисунок 3.1.5Б). Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что позитивное действие NO на жизнеспособность нематод зависит от активности глобальных регуляторов DAF-16 и HSF-1 и полностью нивелируется при их нарушении.

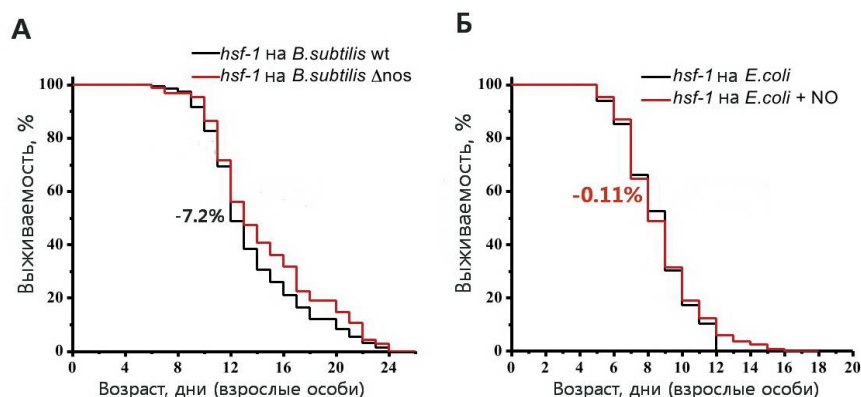


Рисунок 3.1.5 – Бактериально полученный или экзогенный NO не увеличивает продолжительность жизни мутантных штаммов *C. elegans hsf-1*. Экспериментальные условия для (А) и (Б) такие же, как описано на рисунках 3.1.2 и 3.1.3, соответственно (см. также Таблицу 3.1.4).

Таблица 3.1.4 – Результаты анализа продолжительности жизни.

Пов- торы	Штамм <i>C. ele- gans</i>	Бактери- альный штамм	Среда/ добавка	Количество умерших особей/ общее количество	50% выжива- емость, дни	Средняя выжива- емость, дни±SD	Р- значение	Увели- чение/ сни- жение, %	Среднее увели- чение/ сниже- ние, %±SEM
1	<i>hsf-1</i>	<i>B. subtilis</i> 168	NGMga	64/100	12.98	12.5±0.27	0.11926	-11.64	-7.2±2.69
2				39/80	12.48			-7.6	
3				87/150	12.05			-2.35	
1		<i>B. subtilis</i> <i>Δnos</i>		66/100	14.69	13.51±0.58			
2				41/80	13.51				
				81/150	13.34				
1	<i>hsf-1</i>	<i>E. coli</i> OP50	NGM	48/75	7.9	7.99±0.085			
2				57/75	8.07				
1			NGM+ NO	50/75	7.98	7.98±0.005	0.45862	1.01	-0.11±1.12
2				62/75	7.97			-1.24	

3.1.3 Изучение влияния штаммов *B. subtilis* Δnos на термотолерантность нематод

Известно, что продолжительность жизни часто коррелирует со стрессоустойчивостью организма [Johnson et al., 2001; Lithgow, Walker, 2002]. В ходе работы было показано, что оксид

азота играет важную роль в обеспечении термотолерантности *C. elegans*. Перед воздействием повышенных температур нематод культивировали на штаммах *B. subtilis* wt и *B. subtilis* Δ nos при 20°C до возраста A3 или A4 (3-й или 4-й день взрослой жизни, соответственно). При повышении температуры до 32°C или 34°C нематоды возраста A3, питавшиеся бактериями дикого типа, жили на 16.18% или 15.4% дольше (соответственно), чем особи, питавшиеся бактериями с дефицитом NOS (Рисунок 3.1.6А и 3.1.6Б). Примечательно, что разница во времени выживания увеличивалась с увеличением возраста животных (нематоды возраста A4, питавшиеся бактериями дикого типа, жили на 19% дольше, чем особи, питавшиеся бактериями с дефицитом NOS). Вероятно, данный эффект наблюдался из-за более длительного воздействия NO (Рисунок 3.1.6Б).

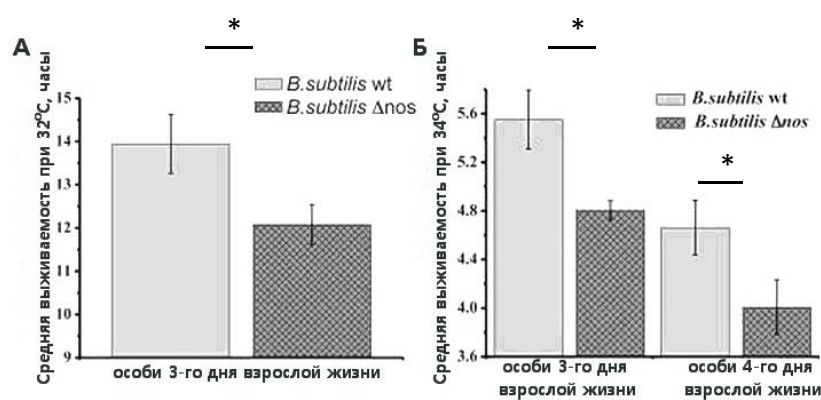


Рисунок 3.1.6 – Бактериальный оксид азота увеличивает термотолерантность нематод. Нематод в возрасте L4, питавшихся штаммами *B. subtilis* wt или *B. subtilis* Δ nos, переносили на чашки со средой NGMga и инкубировали в течение 3-х или 4-х дней при 20°C (пересадку нематод осуществляли на 2-й и 3-й дни). Затем чашки переносили на 32°C (А) или 34°C (Б) и рассчитывали среднюю выживаемость. В каждом случае на графике показана средняя выживаемость $\pm$ стандартная ошибка из более трех независимых экспериментов. * $p < 0.05$.

3.1.4 Выявление генов *C. elegans*, подверженных NO-зависимой экспрессии

Для выявления генов, являющихся мишенью для оксида азота, нашими коллегами проведен глобальный транскриптомный анализ уровня экспрессии генов *C. elegans* в ответ на добавление NO. В этих экспериментах нематоды на стадии L4 обрабатывались донором NO (1 mM МАНМА). В каждом опыте отбирали ~300 особей, отмывали в S-буфере и проводили выделение суммарной РНК. Для выделения 1 мкг суммарной РНК использовали TrueSeq® 524 RNA Sample Preparation Kit v2 (Illumina) и проводили РНК-секвенирование. В каждом опыте проводили выделение как минимум трех препаратов суммарной РНК. В качестве контроля использовали аннотированную базу данных *Caenorhabditis elegans*, расположенную на сайте

(ftp://igenome:G3nom3s4u@ussd-ftp.illumina.com/Caenorhabditis_elegans_Ensembl/WS220/Caenorhabditis_elegans_Ensembl_WS220.tar.gz). Для определения уровня экспрессии транскриптов в разных экспериментальных условиях использовали программу Tophat/Cufflinks/Cuffdiff pipeline.

Результаты проведенного транскриптомного анализа выявили в геноме нематод дикого типа 65 генов, индуцируемых в присутствии NO. Как и ожидалось, среди этих генов обнаружены те, которые регулируются с участием HSF-1. Кроме того, показан повышенный уровень экспрессии генов *mtl-1*, *ctl-2*, *gei-7*, *nlp-29* и T19B10.2, которые, как было показано ранее, вовлечены в контроль продолжительности жизни [Murphy et al., 2003; Halaschek-Wiener et al., 2005; Samuelson et al., 2007].

Транскриптомный анализ в ответ на добавление NO был проведен также на мутантных линиях *C. elegans daf-16* и *hsf-1*. Выяснилось, что у мутантов *daf-16* только 9 генов откликнулись на добавление NO, причем 8 из них одновременно индуцировались в нематодах дикого типа. Из этого следует, что 57 из 65 генов, индуцируемых NO в геноме особей дикого типа, проявляют зависимость от транскрипционного фактора DAF-16. Индукция под действием NO 32 из 65 генов устранялась в мутанте *hsf-1*, а экспрессия еще 14 генов снижалась более чем в два раза. Из этого следует, что индукция NO 46 из 65 генов требует присутствия активного фактора HSF-1.

3.1.5 Заключение

Нематоды *C. elegans* являются перспективным модельным организмом для изучения факторов, влияющих на жизнеспособность особей, однако в ранних исследованиях не учитывался тот факт, что пищей для нематод являются активно метаболизирующие бактерии, существенно влияющие на продолжительность жизни особей [Larsen, Clarke, 2002]. Механизм положительного влияния на продолжительность жизни *C. elegans* бактерий *B. subtilis* по сравнению с *E. coli* [Garsin et al., 2003] был неизвестен.

В настоящей работе мы показали важную роль бактериального метаболита NO для жизнедеятельности *C. elegans*. Оксид азота, синтезируемый бактериями, диффундирует в ткани нематод и инициирует сигнальный каскад, который приводит к специфической транскрипционной реакции. Это, в свою очередь, увеличивает термотолерантность и продолжительность жизни особей (Рисунок 3.1.7).

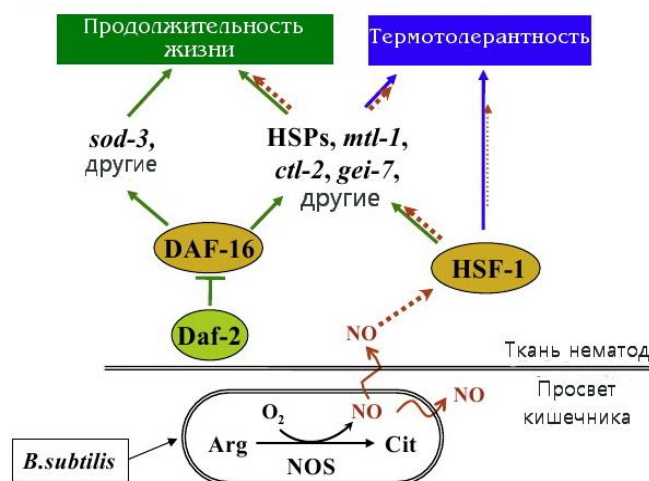


Рисунок 3.1.7 – Модель бактериальной передачи сигналов оксида азота у *C. elegans*. Находясь в кишечнике нематод, вегетативные *B. subtilis* продуцируют NO, индуцируя специфический ответ, зависящий от активности DAF-16 и HSF-1, и приводящий к индукции 65 генов, включая *hsps* и несколько других цитопротекторных генов (*mtl-1*, *ctl-2*, *gei-7* и T19B10.2), которые связаны с долголетием и стрессоустойчивостью [Murphy, et al., 2003; Halaschek-Wiener et al., 2005; Samuelson et al., 2007]. Предлагаемый NO-активируемый путь показан красным цветом.

Наши результаты доказывают преимущество «богатой NO» бактериальной диеты, которая повышает адаптационную способность нематод к суточным колебаниям тепла в их естественной среде обитания (Рисунок 3.1.6А и 3.1.6Б).

Сравнительный анализ генов демонстрирует основную роль *daf-16* и *hsf-1* в NO-опосредованном транскрипционном ответе. Хотя известно, что DAF-16 контролирует широкий спектр генов, влияющих на продолжительность жизни [Murphy et al., 2003; Kenyon, 2010], роль HSF-1 в этом аспекте в основном приписывается белкам теплового шока [Walker, Lithgow, 2003], часть из которых также находятся под контролем DAF-16 [Hsu et al., 2003; McColl et al., 2010]. Наши результаты указывают на несколько известных мишеней долголетия DAF-16 (*ctl-2*, *gei-7*, *nlp-29* и T19B10.2) [Murphy et al., 2003; Halaschek-Wiener et al., 2005; Samuelson et al., 2007] под контролем HSF-1 и, таким образом, расширяют роль *hsf-1* в контроле продолжительности жизни.

Фактически, *hsf-1* необходим для индукции по крайней мере 46 (из 65) генов в ответ на NO. Поскольку мы использовали мутантный штамм *C. elegans hsf-1* с частичной потерей функции для RNA-seq, можно было предположить, что большинство, если не все, NO-чувствительные гены нуждаются в функциональном HSF-1. Однако, поскольку большинство этих генов не охарактеризовано, их индивидуальный вклад в жизнедеятельность еще предстоит определить.

Известно, что глюкоза стимулирует активность IIS-пути и сокращает продолжительность жизни [Schulz et al., 2007; Lee et al., 2009]. В нашей работе показано, что оксид азота увеличивает продолжительность жизни независимо от добавления глюкозы, что позволяет предположить, что путь IIS как таковой не является прямой мишенью для передачи сигналов NO.

Являясь сигнальной молекулой, оксид азота способен свободно диффундировать через мембраны, изменяя активность множества клеточных и внеклеточных белков [Foster et al., 2003; Thomas et al., 2008]. Эти уникальные качества NO могут способствовать раннему эволюционному возникновению передачи сигналов от бактерий к нематодам. Эукариоты, вероятно, приобрели NOS от бактерий (у последних самая древняя версия NOS) [Gusarov, Starodubtseva et al., 2008] путем горизонтального переноса гена. Также возможно, что *C. elegans* потеряли NOS из-за достаточного поступления NO от бактерий. Принимая во внимание высокую эволюционную консервативность HSF-1 и FOXO (от нематод до человека), вполне вероятно, что NO также участвует в активации цитопротекторных белков теплового шока (БТШ) млекопитающих и других генов. Например, индукция гена металлотioneина с помощью NO была продемонстрирована в мезангиальных клетках клубочков [Datta, Lianos, 2006]. Наши результаты могут объяснить, почему индукция eNOS необходима для проявления эффекта замедления старения у мышей при ограничении калорий [Nisoli et al., 2005]. Более того, оксид азота, полученный из микробиоты человека и пробиотиков, может вызывать положительный ответ в желудочно-кишечном тракте, аналогичный тому, который наблюдается у *C. elegans*.

Таким образом, проведенные исследования демонстрируют роль небольшой молекулы в процессе межвидовой передачи сигналов и важность комменсальных бактерий для жизнедеятельности организма-хозяина.

3.2 Изучение влияния мутаций в генах, контролирующих аэробное дыхание микробиоты, на продолжительность жизни нематод

С точки зрения исследования взаимодействия между организмом-хозяином и микробиотой кишечный тракт нематод принципиально не отличается от человеческого и представляет собой первый эшелон защиты от неблагоприятных условий среды, а также играет важную роль в поддержании здоровья и продолжительности жизни [Clark, Hodgkin, 2014]. Кроме того, для других тканей он выполняет функцию сигнального центра, реагирующего на продукты бактериального метаболизма.

На протяжении многих лет считалось общепризнанным, что энергетический метаболизм, сопровождающийся формированием активных форм кислорода (АФК), играет ключевую роль в регуляции процесса старения [Artal-Sanz, Tavernarakis, 2008]. Однако в последнее время традиционный взгляд на АФК как агентов, ответственных за процесс старения, изменился [Back et al., 2012; Scudellari, 2015]. Получены доказательства, что некоторый уровень АФК необходим как для нормальной жизнедеятельности, так и для увеличения продолжительности жизни [Bjelakovic et al., 2007; Yang, Hekimi, 2010; Ristow, Zarse, 2010; Lee et al., 2010; Van Raamsdonk, Hekimi, 2012; Shore, Ruvkun, 2013; Schmeisser et al., 2013].

Нематоды *C. elegans* использовались в качестве модели для исследования эффекта мутаций в генах *E. coli*, нарушающих аэробное дыхание бактерий, на продолжительность жизни особей.

Для изучения влияния метаболизма бактерий на жизнедеятельность *C. elegans* были получены штаммы *E. coli* с мутациями в генах *cyoA* и *cydA*, нарушающих активность терминальных оксидаз *bo'* и *bd-I*, соответственно.

Геном *E. coli* содержит кластеры для трех цитохромоксидаз: цитохромоксидазы *bo'* (*CyoABCD*), цитохромоксидазы *bd-I* (*CydABX*) и цитохромоксидазы *bd-II* (*AppCD*). Эти три фермента являются основными участниками в аэробном дыхании *E. coli*. Гены цитохромоксидазы *bo'* (*cyoABCD*) экспрессируются при высоком уровне кислорода, в то время как *cydABX* работают при низких концентрациях кислорода. Оба фермента способствуют образованию «протон-движущей силы»; цитохромоксидаза *bo'* является переносчиком H^+ , а цитохромоксидаза *bd-I* содержит активный центр для окисления убихинона.

Цитохромоксидаза *bo'* состоит из 4-х субъединиц, кодируемых *cyoB*, *cyoA*, *cyoC* и *cyoD*. Все они необходимы для нормальной работы фермента. Анализы экспериментов по сборке цитохромоксидазы *bo'* показали, что сборка комплекса является упорядоченным процессом, в результате которого первыми собираются субъединицы III и IV, потом субъединица I,

завершает сборку субъединица II. СуоА является субъединицей II терминальной оксидазы цитохрома *bo'*. Она принимает непосредственное участие в связывании убихинона с цитохромом *bo'*. *CydA* кодирует I субъединицу цитохромоксидазы *bd-I*, включающую и гем558. Белок является гетеродимером, состоящим из субъединицы I (*CydA*) и субъединицы II (*CydB*). *CydX* субъединица образует комплекс с цитохромом *bd-I*. В цитохром *bd-1* входят три гема: гем *b₅₅₈*, гем *b₅₉₅* и *bd* в соотношении 1:1:1. Субъединица I (*CydA*) включает в себя гем *b₅₅₈*. Здесь происходит окисление убихинона. Компоненты гема *b₅₉₅* и *bd* образуют биядерный центр, где кислород восстанавливается до воды.

В качестве газона для выращивания нематод использовали бактерий *E. coli* – производных штамма MG1655 дикого типа. В геном этого штамма с помощью трансдукции фагом P1 переносили инсерции *суоА::kan* и *судА::kan* из штаммов коллекции Keio [Baba et al., 2006].

Известно, что из-за нарушения процесса аэробного дыхания у этих мутантов наблюдается повышенный уровень генерации АФК [Brynildsen et al., 2013].

Как показано на рисунке 3.2.1, выращивание *C. elegans* N2 на газоне исследуемых штаммов *E. coli* MG1655 дикого типа и мутантов *суоА::kan* и *судА::kan* (А) и *суоА::kan судА::kan* (Б) приводит к увеличению продолжительности жизни нематод.

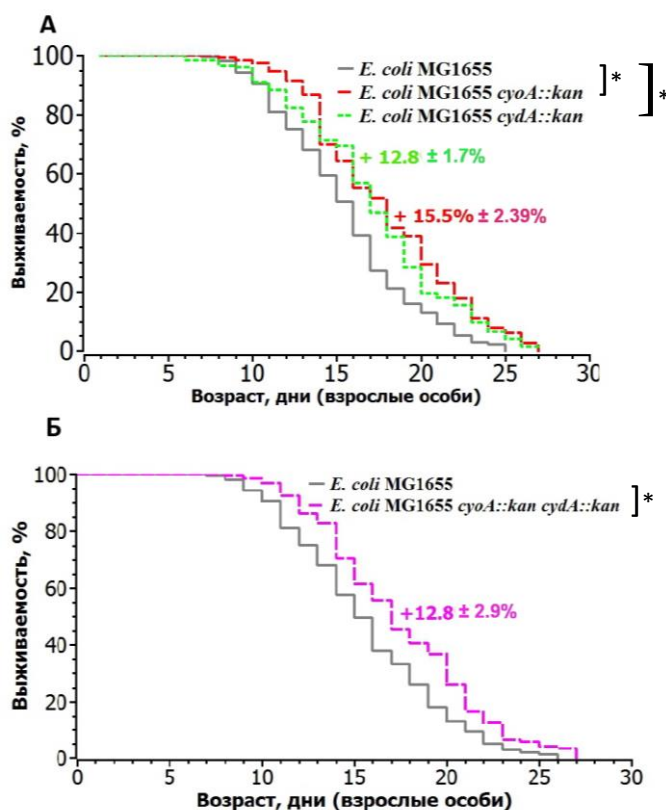


Рисунок 3.2.1 – Выращивание *C. elegans* на газоне штаммов *E. coli* MG1655 дикого типа и мутантов *суоА::kan* и *судА::kan* (А) и *суоА::kan судА::kan* (Б) увеличивает продолжительность

жизни нематод. *C. elegans* N2 на стадии L4 пересаживали на чашки для опыта с NGM-средой в количестве не менее 100 особей на точку. Численность нематод контролировали ежедневно. Пересадку осуществляли через день на аналогичные среды в течение всего эксперимента. Приведенные на рисунке цифровые значения отражают среднее процентное изменение $\pm$ стандартное отклонение продолжительности жизни нематод на мутантных бактериях относительно нематод, выращенных на штамме MG1655 дикого типа. * $p < 0.05$.

Результаты экспериментов показали, что, несмотря на задержку в развитии нематод до стадии L4, СПЖ взрослых особей на мутанте *суoA::kan* увеличивалась на 15.5% по сравнению с таковой на контрольном штамме MG1655 дикого типа (Рисунок 3.2.1А). Культивирование нематод на газоне мутанта *cydA::kan* также приводило к положительному эффекту: по сравнению с контрольным штаммом СПЖ возрастала на 12.8% (Рисунок 3.2.1А). Комбинация мутаций *суoA::kan* и *cydA::kan* в одном геноме не приводила к дальнейшему повышению СПЖ нематод (Рисунок 3.2.1Б). Отсутствие кумулятивного эффекта мутаций *суoA::kan* и *cydA::kan*, возможно, связано с существенным замедлением роста таких бактерий и, вследствие этого, снижением их способности служить эффективным источником питания для нематод.

Заключение

Полученные нами результаты подтверждают данные работы [Govindan et al., 2015], демонстрирующей существенную задержку развития личинок нематод, а также активацию генов, вовлеченных в митохондриальную защиту от окислительного стресса, при культивировании особей на мутантах *суo E. coli*. Однако эффект мутации *суo* на продолжительность жизни *C. elegans* в цитируемой работе не изучался.

Мы предполагаем, что увеличение продолжительности жизни нематод, наблюдаемое при их культивировании на газоне бактерий, дефектных по терминальным оксидазам, обусловлено повышенным уровнем генерации АФК в клетках этих мутантных штаммов. Таким образом, выявленный позитивный эффект культивирования нематод на мутантных штаммах *E. coli*, дефектных по синтезу терминальных оксидаз *bo'* и *bd-I*, может быть интерпретирован в рамках концепции «митохондриального гормезиса». Согласно этой концепции, умеренные дозы АФК приводят к усилению аэробного дыхания, индукции защитных механизмов организма от окислительного стресса и, в конечном счете, к увеличению продолжительности жизни [Taría, 2006; Schulz et al., 2007; Ristow, Schmeisser, 2014].

3.3 Влияние антиоксидантов на продолжительность жизни *C. elegans*

Известно, что антиоксиданты могут защищать от токсичности АФК. Однако, как показали эксперименты по изучению влияния антиоксидантных добавок на продолжительность жизни нематод, обработка *C. elegans* глутатионом и N-ацетилцистеином не приводила к увеличению жизнеспособности особей, а напротив – вызывала ее снижение (Рисунок 3.3.1).

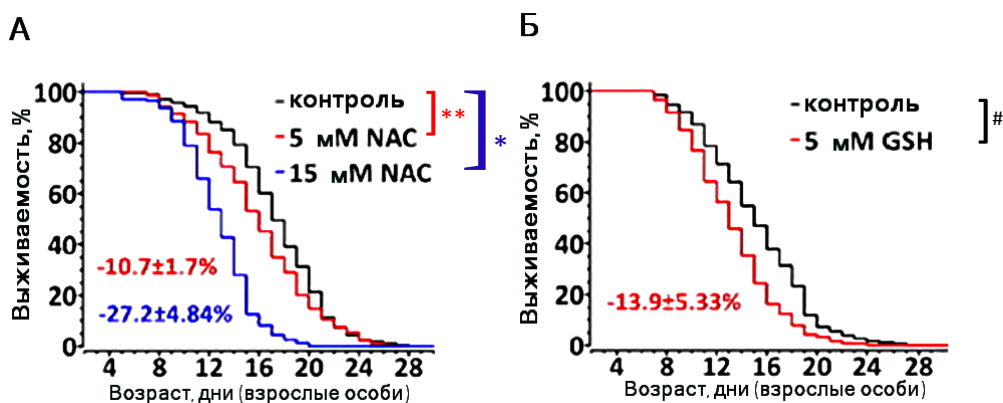


Рисунок 3.3.1 – Тиоловые антиоксиданты сокращают продолжительность жизни *C. elegans*. Хроническое добавление N-ацетилцистеина (NAC) (A) или глутатиона (GSH) (B) в среду NGM снижает продолжительность жизни *C. elegans* N2, выращенных на газоне живых бактерий *E. coli* OP50. На рисунке представлены графики средних значений из трех независимых экспериментов. Приведенные на рисунке цифровые значения в процентах отражают увеличение средней продолжительности жизни нематод по сравнению с необработанным контролем. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, # $p = 0.1714$.

Как следует из данных, представленных на рисунке 3.3.1, добавление NAC в концентрациях 5 и 15 mM приводит к уменьшению продолжительности жизни *C. elegans* на 10.7 и 27.2% соответственно. Добавление глутатиона (5 mM) снижает продолжительность жизни нематод на 13.9%.

Известно, что нематоды, культивируемые на газоне «мертвых» бактерий, живут дольше, чем на газоне с живыми бактериями. Мы предположили, что это различие обусловлено более высоким уровнем тиолов в живых бактериях.

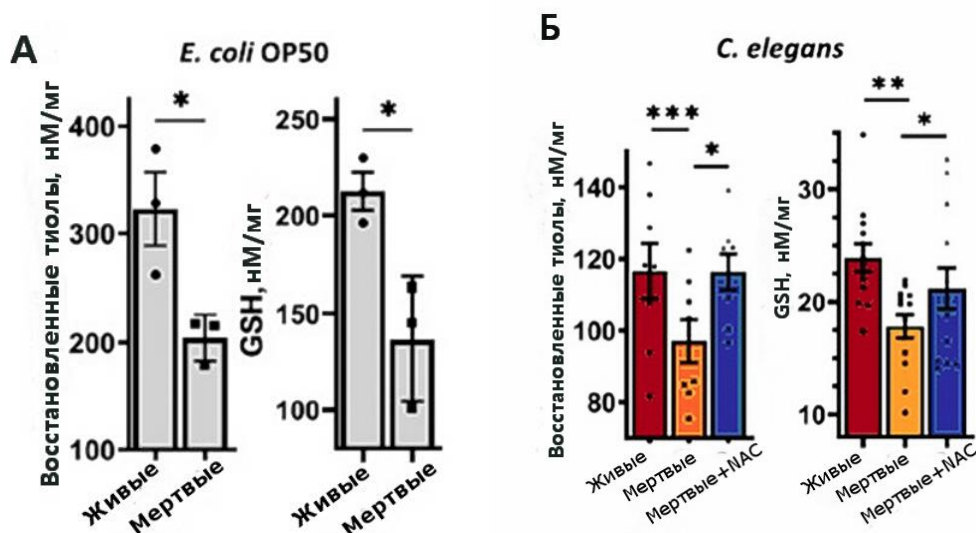


Рисунок 3.3.2 – Содержание восстановленных тиолов и глутатиона (GSH) в живых и «мертвых» клетках бактерий *E. coli* OP50 (А) и в организме *C. elegans*, выращенных на живых и «мертвых» бактериях, а также в присутствии N-ацетилцистеина (Б). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; двусторонний t-тест.

Действительно, проведенные эксперименты показали, что внутриклеточный уровень глутатиона и суммарный уровень восстановленных тиолов в клетках живых бактерий существенно выше, чем в «мертвых» (Рисунок 3.3.2А), причем концентрация тиолов в организме нематод в условиях их культивирования на «мертвых» бактериях увеличивается при добавлении N-ацетилцистеина (Рисунок 3.3.2Б).

Транскриптомный анализ обработанных антиоксидантами нематод, проведенный нашими коллегами, выявил около 1400 генов, экспрессия которых подавляется глутатионом и N-ацетилцистеином. Большинство этих генов относятся к двум основным группам, одна из которых находится под контролем глобального регулятора DAF-16 (38% генов), а другая – под контролем SKN-1 (40%).

Негативное действие глутатиона на продолжительность жизни нематод подтверждается результатами опытов с ацивицином, который является ингибитором его накопления. Как показано на рисунке 3.3.3, добавление ацивицина увеличивает продолжительность жизни нематод.

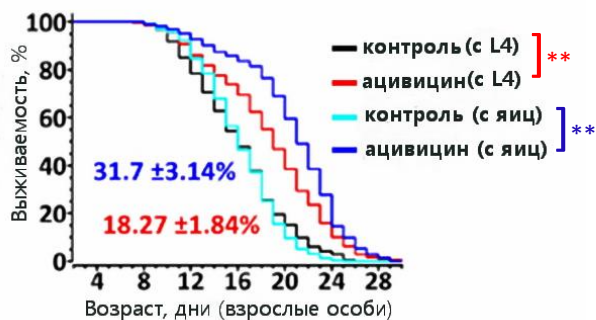


Рисунок 3.3.3 – Ограничение экзогенного глутатиона увеличивает продолжительность жизни *C. elegans*. Добавление ацивизина в среду NGM на стадии L4 или со стадии яиц увеличивает продолжительность жизни *C. elegans* N2 при выращивании на газоне *E. coli* OP50. На рисунке представлены графики средних значений из трех независимых экспериментов. Приведенные на рисунке цифровые значения в процентах отражают увеличение средней продолжительности жизни нематод по сравнению с необработанным контролем. $**p < 0.01$.

Как следует из представленных на рисунке 3.3.3 данных, добавление ацивизина как на стадии яиц, так и на стадии L4, приводит к существенному увеличению продолжительности жизни *C. elegans* (на 31.7% и 18.27% соответственно).

Заключение

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что, хотя антиоксиданты и защищают организмы от действия экзогенных активных форм кислорода, их добавление в избыточных концентрациях приводит к сокращению продолжительности жизни нематод *C. elegans* [Gusarov et al., 2021]. Напротив, ограничение потребления диетических тиолов, включая те, которые получены естественным путем из микробиоты, увеличивает продолжительность жизни особей.

Чрезмерное количество глутатиона, поступающего с пищей при выращивании нематод на газоне *E. coli*, приводит к накоплению более высокого уровня эндогенного глутатиона, который подавляет опосредованную SKN-1 экспрессию генов и снижает продолжительность жизни. Ацивизин ограничивает потребление глутатиона с пищей и в конечном итоге приводит к увеличению продолжительности жизни особей.

Наши результаты демонстрируют необходимость сбалансированности уровня глутатиона для поддержания гомеостатической передачи сигналов АФК. Таким образом, для обеспечения нормальной жизнедеятельности особей требуется ограничение употребления экзогенных антиоксидантов и поддержание собственного внутреннего биосинтеза глутатиона, настроенного в соответствии с окислительно-восстановительным статусом клеток.

3.4 Изучение механизмов ингибирующего действия глюкозы на продолжительность жизни нематод

Нематоды *C. elegans* являются хорошей моделью для исследования эффекта глюкозы на физиологию и старение [Schulz et al., 2007; Schlotterer et al., 2009; Wilkinson et al., 2012; Lee, Jeong et al., 2015]. Глюкоза играет очень важную роль в жизнедеятельности всех организмов, однако ее избыток приводит к серьезным патологиям и сокращению продолжительности жизни. Напротив, ограниченная по калориям диета увеличивает продолжительность жизни как нематод, так и млекопитающих [Colman et al., 2009; Libert, Guarente, 2013; Fontana, Partridge, 2015]. Несмотря на многочисленные исследования, фундаментальные механизмы негативного эффекта глюкозы на жизнедеятельность организмов до сих пор остаются неясными.

3.4.1 Глюкоза обеспечивает устойчивость *C. elegans* к окислительному стрессу

Глюкоза существенно сокращает продолжительность жизни нематод *C. elegans* N2 при их выращивании на стандартной среде NGM (Рисунок 3.4.1).

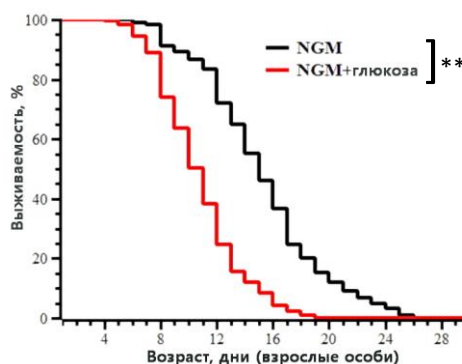


Рисунок 3.4.1 – Глюкоза сокращает продолжительность жизни *C. elegans* N2. Нематоды выращивались на чашках со средой NGM без добавления глюкозы или с глюкозой (2%) при 20°C. Приведены средние значения из трех независимых экспериментов. ** $p < 0.01$.

Было обнаружено, что глюкоза оказывает защитное действие при обработке нематод такими известными окислителями, как диамид и паракват, индуцирующими генерацию АФК (Рисунок 3.4.2А). Поскольку глюкоза проявляла защитный эффект в отношении диамида и в случае использования мутантных нематод *C. elegans daf-16*, было сделано заключение, что антиоксидантное действие глюкозы осуществляется независимо от IIS-зависимого транскрипционного фактора DAF-16. Более того, снижение продолжительности жизни нематод при их культивировании в присутствии диамида супрессируется глюкозой (Рисунок 3.4.2Б). Совокупность полученных данных позволила сделать заключение о том, что глюкоза защищает *C. elegans* от окислительного стресса.

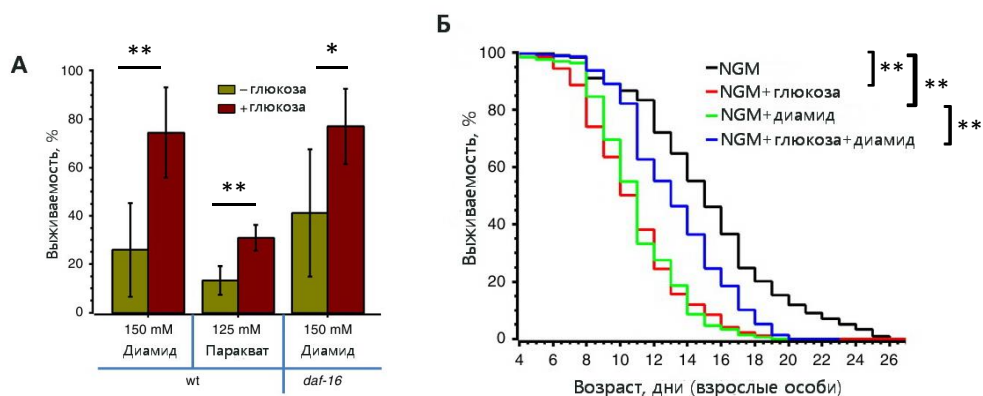


Рисунок 3.4.2 – Высокий уровень глюкозы в среде защищает нематод *C. elegans* дикого типа и мутантный штамм *daf-16* от действия диамида и параквата (А); негативный эффект диамида на продолжительность жизни нематод *C. elegans* wt и его супрессия в присутствии глюкозы (Б). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

3.4.2 В геноме *C. elegans* глюкоза не индуцирует гены, ответственные за защиту от окислительного стресса

Для изучения эффекта глюкозы на экспрессию генов, вовлеченных в защиту от окислительного стресса, нашими коллегами проведен глобальный транскриптомный анализ уровня экспрессии генов *C. elegans* в ответ на добавление глюкозы. В этих экспериментах нематод выращивали на агаризованной среде при 20°C до стадии L4, а затем переносили на среду NGM с глюкозой (2%) и без глюкозы и инкубировали ~20 часов при 20°C. В каждом опыте отбирали ~300 особей, отмывали в S-буфере и проводили выделение суммарной РНК. Для выделения 1 мкг суммарной РНК использовали TrueSeq® 524 RNA Sample Preparation Kit v2 (Illumina) и проводили РНК-секвенирование. В каждом опыте проводили выделение как минимум трех препаратов суммарной РНК. В качестве контроля использовали аннотированную базу данных *Caenorhabditis elegans*, расположенную на сайте (ftp://igenome.G3nom3s4u@ussd-ftp.illumina.com/Caenorhabditis_elegans_Ensembl/WS220/Caenorhabditis_elegans_Ense_mbl_WS220.tar.gz). Для определения уровня экспрессии транскриптов в разных экспериментальных условиях использовали программу Tophat/Cufflinks/Cuffdiff pipeline.

Результаты проведенного транскриптомного анализа выявили 168 генов с повышенной и 58 генов с пониженной экспрессией после инкубации бактерий в течение 1 дня на среде с глюкозой. Как и ожидалось, инкубация нематод в присутствии глюкозы приводила к существенным изменениям в метаболизме особей (Рисунок 3.4.3).

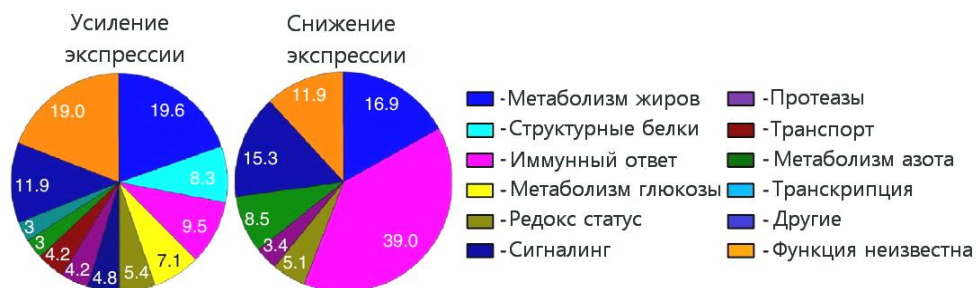


Рисунок 3.4.3 – Диаграмма распределения генов *C. elegans*, экспрессия которых усиливается или снижается при выращивании нематод на среде NGM с глюкозой (2%).

Примерно 20% генов с измененной экспрессией составляют гены, вовлеченные в метаболизм липидов. Большинство генов, ответственных за деградацию аминокислот и полиаминов, характеризовались сниженной экспрессией, тогда как экспрессия генов, контролирующих биосинтез глутамина, аспарагина, S-аденозилметионина и глицерин-3-фосфата, напротив, повышалась (Рисунок 3.4.3). Эти результаты показывают, что потребление сахаров повышает уровень биосинтеза аминокислот и метаболизм фосфолипидов, а также уровень запаса липидов в форме триглицеридов. Действительно, в соответствии с имеющимися в литературе данными [Schulz et al., 2007; Nomura et al., 2010; Pang et al., 2014; Lee, Jeong, 2015], нематоды, выращенные на обогащенной глюкозой среде, накапливают больше жиров по сравнению с особями, культивируемыми на стандартной среде. Большинство генов, характеризующихся низким уровнем экспрессии в присутствии глюкозы, относится к группе генов иммунного ответа клетки. Однако, поскольку глюкоза укорачивала продолжительность жизни нематод при их выращивании как на живых, так и на «мертвых» бактериях *E. coli*, а также на непатогенных бактериях *B. subtilis*, маловероятно, что ее токсичность связана с патогенностью.

Примечательно, что в присутствии глюкозы мы не наблюдали изменения экспрессии генов, вовлеченных в защиту от АФК и репарацию повреждений, обусловленных окислительным стрессом. Среди 115 генов, вовлеченных в ответ на окислительный стресс, обнаружен только один потенциальный тиоредоксин-подобный ген (W01B11.6), который незначительно индуцировался в присутствии глюкозы. В то же время обнаружен позитивный эффект глюкозы на активность ферментов, восстанавливающих глутатион – основной внутриклеточный антиоксидант.

Поскольку синтез де-ново ферментов, осуществляющих цитопротекторную функцию, не является необходимым условием для опосредованной глюкозой устойчивости к оксидантам, следовало ожидать, что одновременное добавление глюкозы и оксидантов должно обеспечивать защитный эффект.

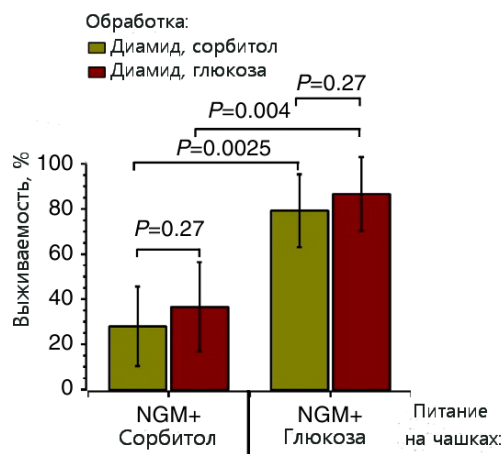


Рисунок 3.4.4 – Продукты метаболизма глюкозы необходимы для защитного действия глюкозы против окислительного стресса. Нематоды на стадии L4, выращенные на среде NGM с сорбитолом или глюкозой в течение 20 часов переносили на среды с сорбитолом и диамидом или с глюкозой и диамидом.

Однако, как следует из результатов, представленных на рисунке 3.4.4, этого не происходит: добавление той же концентрации глюкозы (2%), которая проявляла протективный эффект при предварительном добавлении к NGM-среде, не обеспечивает защиту при одновременном добавлении глюкозы и оксиданта диамида (Рисунок 3.4.4). Из этого следует, что не сама глюкоза, а продукт ее метаболизма оказывает защитный эффект против оксидантов.

3.4.3 Гликоген является универсальным антиоксидантом

У большинства организмов избыток глюкозы быстро накапливается в виде гликогена (Рисунок 3.4.5). Синтез и фосфорилиз гликогена регулируется путем фосфорилирования с участием соответствующих ферментов (гликогенсинтазы (Gsy-1) и гликогенфосфоорилазы (Pgy-1)) и не требует активации генов или синтеза ферментов *de novo*. Поэтому уровень глюкозы может быть быстро восстановлен путем ее высвобождения из гликогена.

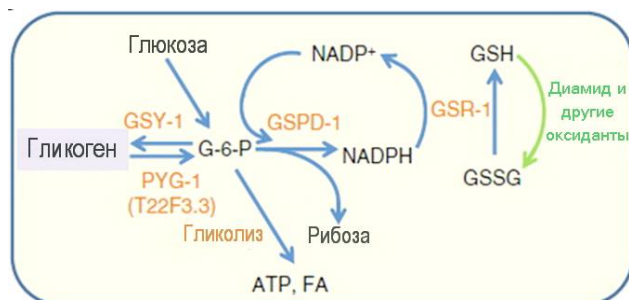


Рисунок 3.4.5 – Главные пути утилизации и запасаения глюкозы у *C. elegans*. После попадания в клетку глюкоза фосфорилируется и используется для генерации АТФ и биосинтеза

макромолекул. Избыток глюкозы запасается в клетке в виде гликогена и может превращаться в жирные кислоты. Существенная часть глюкозы используется для восстановления NADP^+ , который необходим для последующего восстановления окисленного глутатиона и тиоредоксина. Поэтому глюкоза действует как мощный (хотя и непрямой) антиоксидант. Блокирование глутатион-восстанавливающих ферментов резко повышает чувствительность нематод к окислительному стрессу. GSY-1 – гликогенсинтаза, PYG-1 – гликогенфосфорилаза, GSPD-1 – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, GSR-1 – глутатионредуктаза, GSH – глутатион восстановленный, GSSG – глутатион окисленный.

Инактивация гена *gsy-1* с помощью антисмысловой РНК (RNAi) блокирует накопление гликогена несмотря на избыток глюкозы. В отсутствии GSY-1 нематоды становятся очень чувствительными к диамиду, и глюкоза перестает эффективно защищать особей от окислительного стресса (Рисунок 3.4.6). В соответствии с этим, инактивация гена *pyg-1* приводит к увеличению накопления гликогена, однако не обеспечивает защиты от окислительного стресса.

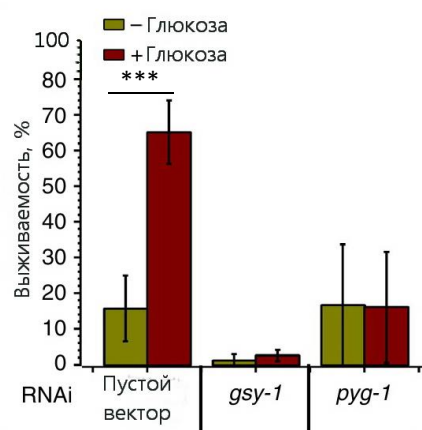


Рисунок 3.4.6 – Запасание гликогена необходимо для защитного действия против окислительного стресса. Нематод выращивали на среде NGM с газоном бактерий *E. coli*, содержащих пустой вектор или векторы, несущие антисмысловые РНК для генов *gsy-1* и *pyg-1*. На стадии L4 нематод переносили на NGM среду с сорбитолом или глюкозой на 20 часов, а затем обрабатывались диамидом (150 мкМ). *** $p < 0.001$.

Таким образом, увеличение содержания гликогена является движущей силой, обеспечивающей быстрое восстановление NADP^+ и глутатиона, что приводит к детоксикации оксидантов у нематод (Рисунок 3.4.6). Хотя жиры также накапливаются при избытке глюкозы [Schulz et al., 2007; Nomura et al., 2010; Lee, Jeong, 2015], их деградация происходит значительно

медленнее, чем фосфорилиз гликогена, и NADH и FADH₂ как результат процесса β -окисления жиров не в состоянии обеспечивать восстановление глутатиона [Mize, Langdon, 1962].

3.4.4 Гликоген регулирует продолжительность жизни независимо от DAF-16

Транскрипционный фактор FOXO/DAF-16 оказывает существенное влияние на продолжительность жизни *C. elegans* [Ogg et al., 1997]. Для уточнения роли *daf-16* в гликоген-опосредованном сокращении жизни мы инактивировали *gsy-1* в мутанте *C. elegans daf-16* и двойном мутанте *C. elegans daf-2 daf-16*. Как показано на рисунке 3.4.7, глюкоза снижала продолжительность жизни мутанта *daf-16* (Рисунок 3.4.7А), и, в меньшей степени, мутанта *daf-2 daf-16* (Рисунок 3.4.7Б).

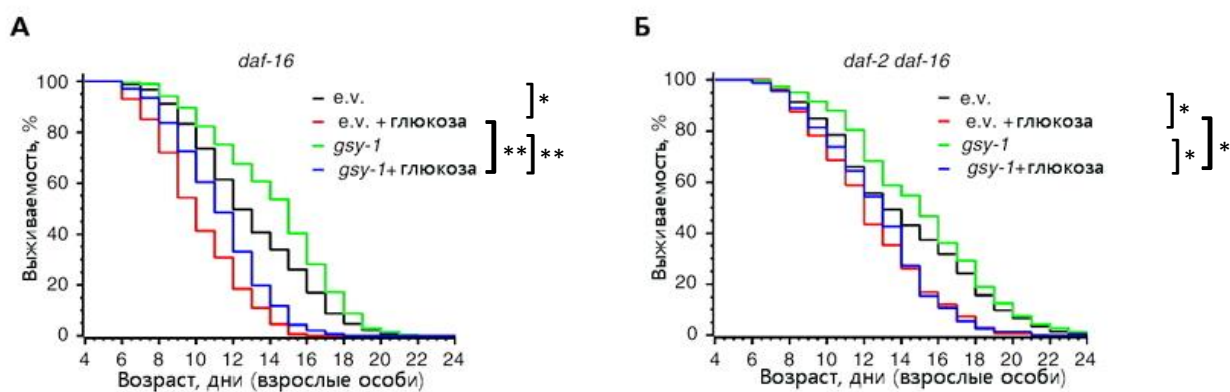


Рисунок 3.4.7 – Дефицит гликогена увеличивает продолжительность жизни мутантов *C. elegans daf-16* (А) и *C. elegans daf-2 daf-16* (Б). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Примечательно, что в присутствии антисмысловой РНК *gsy-1* продолжительность жизни у обоих мутантов увеличивалась независимо от содержания глюкозы в среде (Рисунок 3.4.7). Эти результаты показывают, что гликоген сокращает продолжительность жизни нематод независимо от *daf-16*.

3.4.5 Устойчивость дефектных по GSY-1 нематод к высокой концентрации глюкозы зависит от активности AMPK

Гликоген существенно сокращает продолжительность жизни мутантной линии нематод *C. elegans daf-2* в условиях выращивания на среде с высоким содержанием глюкозы, что указывает на перекрывание его действия с другими DAF-2 – регулируемыми процессами, обеспечивающими повышенную выживаемость. Известно, что для обеспечения максимальной продолжительности жизни мутанта *daf-2* необходимы как транскрипционный фактор DAF-16, так и активность фермента AMPK [Apfeld et al., 2004; Narbonne, Roy, 2006]. Более того, показано, что делеция гена каталитической субъединицы AMPK α 2 (*aak-2*) сокращает

продолжительность жизни мутантов *daf-2* и *daf-16* [Apfeld et al., 2004; Curtis et al., 2006; Samuelson et al., 2007], причем обработка особей паракватом не увеличивает продолжительность жизни мутантов *aak-2* [Hwang et al., 2014]. Показано, что в клетках человека гликоген прямо связывается и секвестрирует AMPK и снижает ее активность [McBride, 2009]. Совокупность этих данных позволяет предположить, что AMPK может являться мишенью гликоген-индуцируемой регуляции продолжительности жизни у нематод. Для проверки этого предположения мы инактивировали GSY-1 у мутантных нематод *C. elegans aak-2* и сравнили продолжительность жизни особей при их выращивании на среде с высоким содержанием глюкозы (Рисунок 3.4.8).

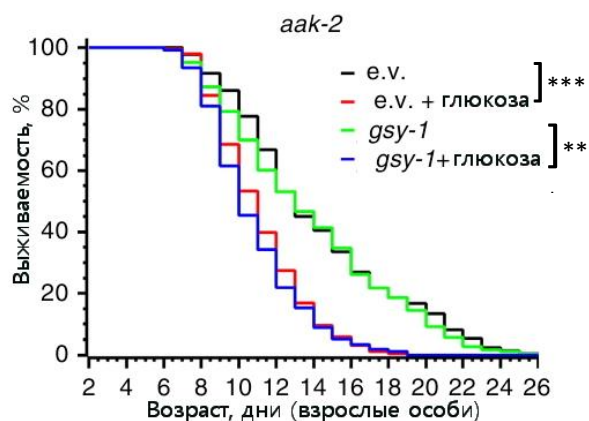


Рисунок 3.4.8 – Активность AMPK необходима для увеличения продолжительности жизни нематод, лишенных гликогена. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

В соответствии с опубликованными данными [Lee C.T., Murphy C., Kenyon C., 2009], глюкоза вызвала дальнейшее сокращение продолжительности жизни мутанта *C. elegans aak-2*, однако инактивация GSY-1 не увеличивала продолжительности жизни при высоком содержании глюкозы в среде (Рисунок 3.4.8). Из этого следует, что активность AMPK действительно необходима для увеличения продолжительности жизни нематод в отсутствии гликогена.

3.4.6 Заключение

На протяжении многих лет токсичность глюкозы связывали с ее негативным эффектом на IIS-зависимый сигнальный путь. Однако генетическая инактивация IIS-пути не снимает негативного эффекта глюкозы на продолжительность жизни. В настоящей работе мы показали, что накопление внутриклеточного гликогена играет принципиальную роль в сокращении продолжительности жизни в условиях высокого потребления глюкозы. На рисунке 3.4.9 представлена модель, объясняющая взаимосвязь между накоплением гликогена и

функционированием IIS-зависимого сигнального пути [Gusarov, 2017]. Согласно модели, гликоген и IIS являются двумя различными сигнальными путями, контролирующими продолжительность жизни. При высоком содержании глюкозы в пище IIS активируется и подавляет DAF-16-зависимую транскрипцию. Одновременно накопление гликогена ингибирует активность AMPK. В совокупности это приводит к существенному сокращению продолжительности жизни. Ингибирование синтеза гликогена с помощью антисмысловой РНК (*gsy-1* RNAi) снимает ингибирование AMPK и увеличивает продолжительность жизни нематод дикого типа и мутантов *daf-2* и *daf-16* на среде с высоким содержанием глюкозы. Из этого следует, что гликоген и DAF-16 являются независимыми факторами контроля продолжительности жизни.

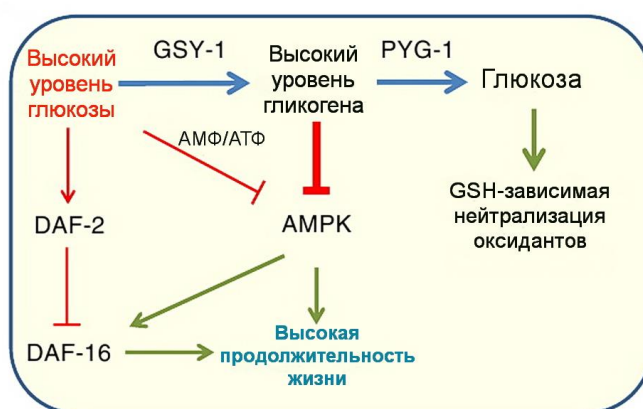


Рисунок 3.4.9 – Взаимосвязь между гликогеном и инсулиноподобным контролем продолжительности жизни у *C. elegans*. При выращивании нематод на средах с высоким содержанием глюкозы активируется инсулиноподобный сигнальный путь и одновременно индуцируется процесс запасаания гликогена. IIS супрессия DAF-16-опосредованной транскрипции и ингибирование AMPK гликогеном сокращает продолжительность жизни. Способствующая старению сигнальная функция гликогена преодолевает антивозрастной эффект ингибирования IIS (*daf-2*). Инактивация синтеза гликогена (*gsy-1*) предотвращает накопление гликогена, снимает ингибирование активности AMPK и увеличивает продолжительность жизни нематод дикого типа и мутантов *daf-2* и *daf-16* на среде с высоким содержанием глюкозы. Оксиданты стимулируют поток глюкозы через пентозофосфатный путь, что приводит к регенерации восстановленного глутатиона, снижают накопление гликогена и, тем самым, обеспечивают увеличение продолжительности жизни.

В нематодах, дефектных по GSY-1, растущих на среде с глюкозой, DAF-2 сигнальный путь подавляет экспрессию транскрипционного фактора DAF-16, однако этот эффект компенсируется низким содержанием гликогена, который снимает ингибирование AMPK и, тем самым, обеспечивает активацию DAF-16. Активация IIS глюкозой объясняет, почему

продолжительность жизни мутантов *gsy-1* на среде с высоким содержанием глюкозы короче, чем на стандартной среде. Напротив, у мутантов *daf-2*, у которых эффект глюкозы на продолжительность жизни устранен, инактивация *gsy-1* приводит к полному восстановлению продолжительности жизни. Вместе с тем, гликоген, накапливающийся в мутантах *daf-16*, сокращает продолжительность жизни через АМРК-зависимый путь, тогда как активация IIS глюкозой снижает продолжительность жизни у дефектных по АМРК нематод. Таким образом, главный вывод из наших исследований состоит в том, что высокое содержание глюкозы в пище не является вредным до тех пор, пока она не превращается в гликоген.

3.5 Изучение влияния АИКАР на продолжительность жизни *C. elegans*

C. elegans является перспективным модельным организмом для изучения сигналов АМРК, играющей роль «датчика энергии» и «основного метаболического переключателя». Известно, что активация АМРК увеличивает продолжительность жизни животных (от нематод до млекопитающих) и лежит в основе положительных эффектов тренировок, ограничения калорийности питания и широко применяемого противодиабетического препарата метформина [Garcia, Shaw, 2017]. Неудивительно, что АМРК рассматривается как привлекательная терапевтическая мишень для коррекции различных метаболических и возрастных заболеваний [Kim, Yang et al., 2016].

Большое внимание привлекает возможность замещения АМФ в реакциях активации АМРК его аналогами. Мощным активатором АМРК является нуклеозид 5-аминоимидазол-4-карбоксамидрибофуранозид (АИКАР), который в клетках быстро фосфорилируется с образованием АИКАР-Р – природного аналога АМФ. Таким образом, присутствие АИКАР имитирует накопление АМФ и провоцирует перестройку энергетических процессов, направленную на преодоление мнимого энергетического стресса. Структурная формула АИКАР и АМФ представлена на Рисунке 3.5.1.

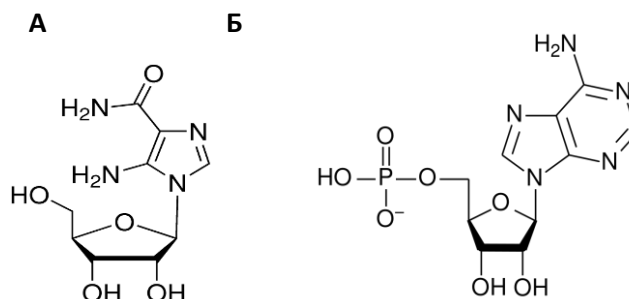


Рисунок 3.5.1 – Структурная формула АИКАР (А) и АМФ (Б).

Общепринятым считается представление о том, что продолжительность жизни различных организмов увеличивается при некотором ограничении калорийности питания, т.е. при умеренном энергетическом стрессе, и в связи с этим представляется логичным исследовать свойства АИКАР как вещества с геропротекторной активностью широкого спектра действия.

3.5.1 Влияние экзогенного АИКАР на продолжительность жизни *C. elegans* при выращивании на стандартной подложке *E. coli* OP50

В ходе работы было исследовано влияние различных концентраций экзогенного АИКАР на продолжительность жизни нематод, выращенных на стандартной подложке *E. coli* OP50

(среда NGM). Выявлен дозозависимый эффект экзогенного АИКАР, заключающийся в умеренном (хотя и статистически значимом) увеличении продолжительности жизни особей (Рисунок 3.5.2), при этом выяснилось, что экзогенный АИКАР становится токсичным при более высоких дозах: концентрация 1 мМ сокращала продолжительность жизни *C. elegans* на 6.3%.

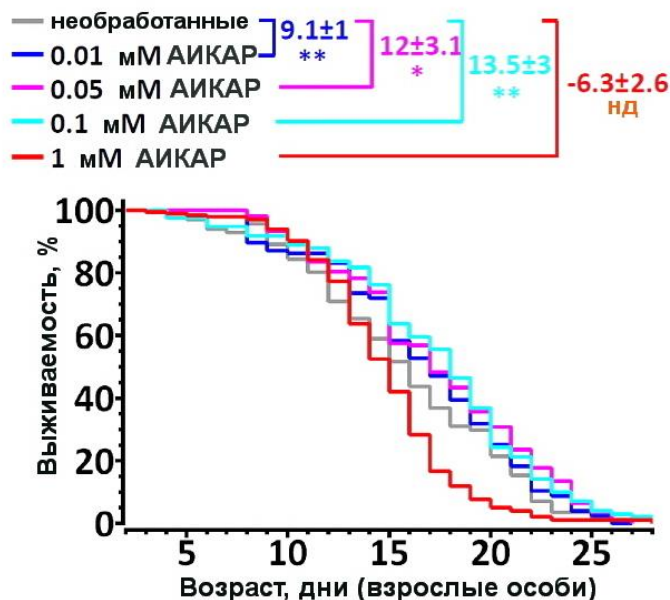


Рисунок 3.5.2 – Влияние экзогенного АИКАР на продолжительность жизни *C. elegans* N2 носит дозозависимый характер. Нематод в возрасте L4 переносили на чашки со средой NGM с указанной концентрацией АИКАР, засеянные *E. coli* OP50. Среднее процентное изменение $\pm$ стандартное отклонение продолжительности жизни по сравнению с необработанным контролем показано цветом, совпадающим с цветом соответствующей кривой (см. также таблицу 3.5.1). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, нд – не достоверно

Таблица 3.5.1 – Результаты анализа продолжительности жизни*.

Повторы	Штамм <i>C. elegans</i>	Бактериальный штамм	Среда/добавка	Количество умерших особей/общее количество	50% выживаемость, дни	Средняя выживаемость, дни $\pm$ SD	Р-значение, 2 1	Увеличение/снижение, %	Среднее увеличение/снижение, % $\pm$ SEM
1	N2	<i>E. coli</i> OP50	NGM	142/175	14.8	15.38 $\pm$ 0.56			
2				118/150	15.5				
3				137/170	16.1				
4				121/150	15.1				
1	N2	<i>E. coli</i>	NGM	138/175	16.3	16.87 $\pm$ 0.55	0.001696	10.1	9.07 $\pm$ 1.0

2		OP50	+АИКАР	129/150	16.9			9	
3			(0.01 mM)	141/175	17.4			8.1	
1	N2	<i>E. coli</i> OP50	NGM	146/175	16.2	17.33±1.21	0.029566	9.5	12.0±3.12
2			+АИКАР	127/150	17.2			11	
3			(0.05 mM)	152/170	18.6			15.5	
1	N2	<i>E. coli</i> OP50	NGM	148/175	17	17.45±0.84	0.003094	14.9	13.5±2.97
2			+АИКАР	126/150	18			16.1	
3			(0.1 mM)	143/170	18.3			13.7	
4				131/150	16.5			9.3	
1	N2	<i>E. coli</i> OP50	NGM	82/180	13.6	14.2±0.85	0.163817	-8.1	-6.3±2.55
2			+АИКАР (1 mM)	90/180	14.8			-4.5	

* Каждый набор данных (повтор) был аппроксимирован сигмовидной кривой Больцмана и рассчитано среднее время выживания. Проценты изменения продолжительности жизни выражены относительно контроля в том же повторе эксперимента. Независимые экспериментальные и контрольные опыты, которые проводились параллельно, обозначены одинаковыми цифрами в первом столбце. Указывается увеличение (+) или уменьшение (-) продолжительности жизни. Значения p были рассчитаны относительно контрольных нематод в том же эксперименте с использованием t -критерия Стьюдента (двухстороннее распределение, парный).

Чтобы подтвердить влияние экзогенного АИКАР непосредственно на нематод, а не его опосредованного действия через метаболизм бактерий, был проведен эксперимент, аналогичный предыдущему, но с «мертвыми» бактериями *E. coli* OP50 (Рисунок 3.5.3).

Как следует из данных, представленных на рисунке 3.5.3, добавление экзогенного АИКАР оказывает определенный положительный эффект на продолжительность жизни нематод при выращивании их на «мертвых» микроорганизмах, что доказывает эффект непосредственного влияния АИКАР на *C. elegans*.

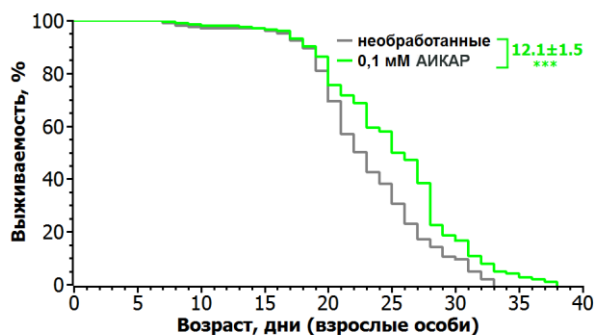


Рисунок 3.5.3 – Добавление экзогенного АИКАР увеличивает продолжительность жизни *C. elegans* N2 при выращивании на газоне «мертвых» бактерий *E. coli* OP50. Нематод выращивали из отмытых от посторонней микрофлоры яиц в течение двух генераций, затем инкубировали до возраста L4 на чашках со средой NGM. Далее пересаживали на чашки для опыта со средой NGM+Km₅₀+Amp₁₀₀ с добавлением или без добавления АИКАР (0.1 мМ). Показано среднее процентное изменение $\pm$ стандартное отклонение продолжительности жизни по сравнению с необработанным контролем (см. также Таблицу 3.5.2). *** $p < 0.001$

Таблица 3.5.2 – Результаты анализа продолжительности жизни

Пов- торы	Штамм <i>C. ele- gans</i>	Бактери- альный штамм	Среда/ добавка	Коли- чество умерших особей/ общее коли- чество	50% выжива- емость, дни	Средняя выжива- емость, дни±SD	Р- значение, 2 1	Увели- чение/ сниже- ние, %	Среднее увеличение / снижение, %±SEM
1	N2	<i>E. coli</i> OP50 «мертвые»	NGM	105/155	22.4	22.3±0.15	0.00001		12.1±1.45
2				109/156	22.3				
3				103/150	22.1				
1			+АИКАР (0.01 мМ)	102/153	24.8	25±0.15		10.7	
2				106/150	25			12.1	
3				110/155	25.1			13.6	

3.5.2 Изучение влияние глюкозы и экзогенного АИКАР на продолжительность жизни *C. elegans* при выращивании на подложке *B. subtilis*

Ранее было показано, что снижение продолжительности жизни *C. elegans*, вызванное диетой с высоким содержанием глюкозы, по крайней мере, частично связано с ингибированием АМРК в результате накопления гликогена [Gusarov et al., 2017; Gusarov, Nudler, 2018]. Мы предположили, что АИКАР может противодействовать гликоген-опосредованной инактивации

АМРК и обращать вспять негативный эффект глюкозы на продолжительность жизни *C. elegans*. С этой целью мы изучили влияние глюкозы и экзогенного АИКАР на продолжительность жизни *C. elegans* при выращивании на штамме дикого типа *B. subtilis* 168 (*B. subtilis* wt).

Действительно, как следует из результатов опытов, представленных на рисунке 3.5.4, экзогенный АИКАР, добавленный в чашки с NGM, засеянные штаммом *B. subtilis* wt, устраняет негативный эффект глюкозы на продолжительность жизни нематод.

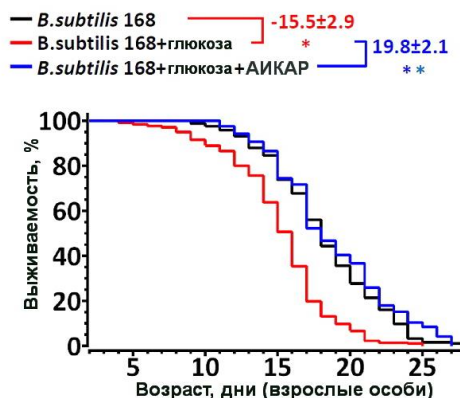


Рисунок 3.5.4 – Экзогенный АИКАР устраняет негативный эффект глюкозы на продолжительность жизни *C. elegans* N2. Нематод переносили на чашки со средой NGM, засеянные *B. subtilis* 168 wt, и добавляли глюкозу или глюкозу с 0.1 мМ АИКАР. Среднее процентное изменение $\pm$ стандартное отклонение продолжительности жизни по сравнению с необработанным контролем показано цветом, совпадающим с цветом соответствующей кривой (см. также таблицу 3.5.3А и 3.5.3Б). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Таблица 3.5.3А – Результаты анализа продолжительности жизни.

Повторы	Штамм <i>C. elegans</i>	Бактериальный штамм	Среда/добавка	Количество умерших особей/общее количество	50% выживаемость, дни	Средняя выживаемость, дни $\pm$ SD	Р-значение, 2 1	Увеличение/снижение, %	Среднее увеличение/снижение, % $\pm$ SEM
1	N2	<i>B. subtilis</i> 168	NGM	144/160	17.9	17.7 $\pm$ 0.28			
2				132/150	17.5				
1	N2	<i>B. subtilis</i> 168	NGM + Глюкоза	138/160	14.6	14.95 $\pm$ 0.49	0.020819	-18.44	-15.5 $\pm$ 4.16
2				133/150	15.3			-12.56	
1	N2	<i>B. subtilis</i> 168	NGM + АИКАР	129/150	17.8	17.9 $\pm$ 0.14	0.465478	-0.56	1.15 $\pm$ 2.42
2				136/150	18			2.86	

Таблица 3.5.3Б – Результаты анализа продолжительности жизни*.

Пов- торы	Штамм <i>C. ele- gans</i>	Бактери- альный штамм	Среда/ добавка	Коли- чество умерших особей/ общее коли- чество	50% выжива- емость, дни	Средняя выжива- емость, дни±SD	Р - значение, 2 1	Увели- чение/ сниже- ние, %	Среднее увели- чение/ снижение, %±SEM
1	N2	<i>B. subtilis</i> 168	NGM	144/160	17.9	17.7±0.28			
2				132/150	17.5				
1	N2	<i>B. subtilis</i> 168	NGM	138/160	14.6	14.95±0.49			
2			+Глюкоза	133/150	15.3				
1	N2	<i>B. subtilis</i> 168	NGM	129/150	17.8	17.9±0.14	0.00744	21,9	19.75±2.1
2			+АИКАР +Глюкоза	136/150	18			17,6	

*изменение продолжительности жизни и р-значение рассчитывалось для нематод, выращенных при добавлении глюкозы и АИКАР, относительно нематод, выращенных при добавлении только глюкозы.

3.5.3 Конструирование штамма *B. subtilis*, продуцирующего АИКАР: штамм *B. subtilis* AM2020 АИКАР↑

Учитывая имеющиеся в литературе данные о высокой нестабильности АИКАР в живых организмах в результате его быстрого фосфорилирования в АИКАР-фосфат и последующего превращения в инозин-монофосфат, мы решили сконструировать на основе *B. subtilis* бактериальный штамм, продуцирующий повышенный уровень эндогенного АИКАР [Лобанов и др., 2011]. Такой штамм при выращивании на нем нематод мог бы обеспечить непрерывную наработку и поддержание достаточно высокого уровня АИКАР для достоверной оценки его влияния на жизнеспособность нематод. *B. subtilis* – признанный пробиотик [Cutting, 2011], а также естественный источник пищи для *C. elegans* [Felix, Braendle, 2010; Dirksen et al. 2016; Samuel, 2016]

Для увеличения продукции АИКАР-Ф необходимо было усилить экспрессию генов, вовлеченных в биосинтез пуриновых нуклеотидов, которые в геноме *B. subtilis* объединены в *pur*-оперон. Поэтому на первом этапе работы был инактивирован репрессор пуринового оперона (ген *purR*), а также удален аттенуатор рибопереклювателя, расположенный в лидерной

области *pur*-оперона. Затем был сконструирован синтетический оперон, содержащий гены *prs*, *purF* и *udhA* *E. coli* под контролем сильного рибосомного промотора P_{rpsF} . Усиление экспрессии этих генов необходимо, поскольку рибозофосфатпирофосфокиназа (*prs*) и глутаминфосфорибозил-дифосфатамидотрансфераза (*purF*) являются первыми ключевыми ферментами биосинтеза пуринов и увеличивают поток глюкозы на синтез пуринов. В свою очередь, растворимая пиридиннуклеотидтрансгидрогеназа (*udhA*) регенерирует NADP^+ , тем самым устраняя NADPH-опосредованную репрессию глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (G6PD), которая является ферментом, ограничивающим скорость пентозофосфатного пути. Для усиления экспрессии G6PD кодирующий ее ген *zwf* был подставлен под контроль сильного промотора P_{rpsF} . Кроме того, чтобы предотвратить расход глюкозы на путь биосинтеза левана, была проведена инактивация гена *sacB*. Наконец, было заблокировано преобразование АИКАР в IMP путем инактивации в составе *pur*-оперона гена *purH*, кодирующего фосфорибозиламиноимидазолкарбоксамид формилтрансферазу, что приводило к существенному накоплению АИКАР в культуральной жидкости при выращивании полученного штамма на полноценной среде с глюкозой. Последовательные этапы конструирования штамма-продуцента АИКАР (*B. subtilis* AM2020 АИКАР $\uparrow$) описаны в разделе «Материалы и методы». Продукция АИКАР у этого штамма-продуцента значительно превышала таковую у контрольного штамма ΔpurF (AM1182) и проявляла строгую зависимость от добавок глюкозы (Рисунок 3.5.5А и Б).

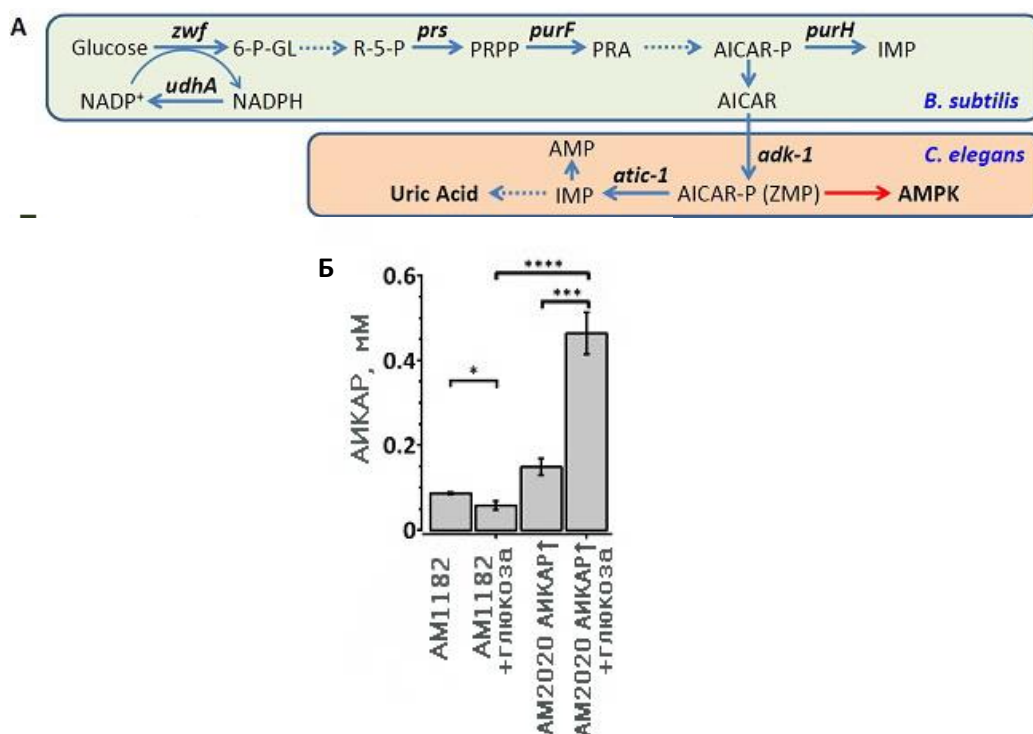


Рисунок 3.5.5 – Конструирование штамма AM2020 АИКАР $\uparrow$. (А) Биосинтез и метаболизм АИКАР у *B. subtilis* и *C. elegans*. Удаление *purH* в *B. subtilis* предотвращает

преобразование АИКАР в IMP. Активация АМРК показана красной стрелкой. *adk-1* – аденилаткиназа, *atic* – 1-5-аминоимидазол-4-карбоксамид рибонуклеотид формил-трансфераза/IMP-циклогидролаза, PRA – 5'-фосфорибозиламин. (Б) Глюкоза необходима для высокого уровня производства АИКАР. Штаммы AM1182 и AM2020 АИКАР[↑] выращивали в LB с глюкозой (2%) или без нее в течение 12 часов; концентрацию АИКАР измеряли с использованием метода диазотирования в осветленных супернатантах. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

3.5.4 Изучение влияния глюкозы и эндогенного АИКАР, продуцируемого штаммом AM2020 АИКАР[↑], на продолжительность жизни *C. elegans*

Модель *C. elegans* была использована для оценки положительных биологических эффектов полученного эндогенного препарата АИКАР на уровне организма.

Как упоминалось ранее, снижение продолжительности жизни *C. elegans* при высокоглюкозной диете частично связано с ингибированием АМРК за счет накопления гликогена [Gusarov et al., 2017; Gusarov, Nudler, 2018]. АИКАР предположительно может противодействовать гликоген-опосредованной инактивации АМРК и обращать вспять негативный эффект глюкозы.

Описанные ранее эксперименты показали, что экзогенный АИКАР, добавленный в чашки с NGM, засеянные диким штаммом *B. subtilis*, устраняет негативный эффект глюкозы. Кроме того, экзогенный АИКАР незначительно увеличивал продолжительность жизни нематод, выращенных на чашках NGM без глюкозы, засеянных штаммом *E. coli* OP50. В связи с этим представляло интерес сравнить продолжительность жизни нематод, выращенных на штамме AM2020 АИКАР[↑], продуцирующем АИКАР, и штамме AM1182 с нарушенной продукцией АИКАР (Рисунок 3.5.6А и В). Поскольку глюкоза необходима для надежного производства АИКАР, были использованы чашки с добавлением глюкозы и без нее.

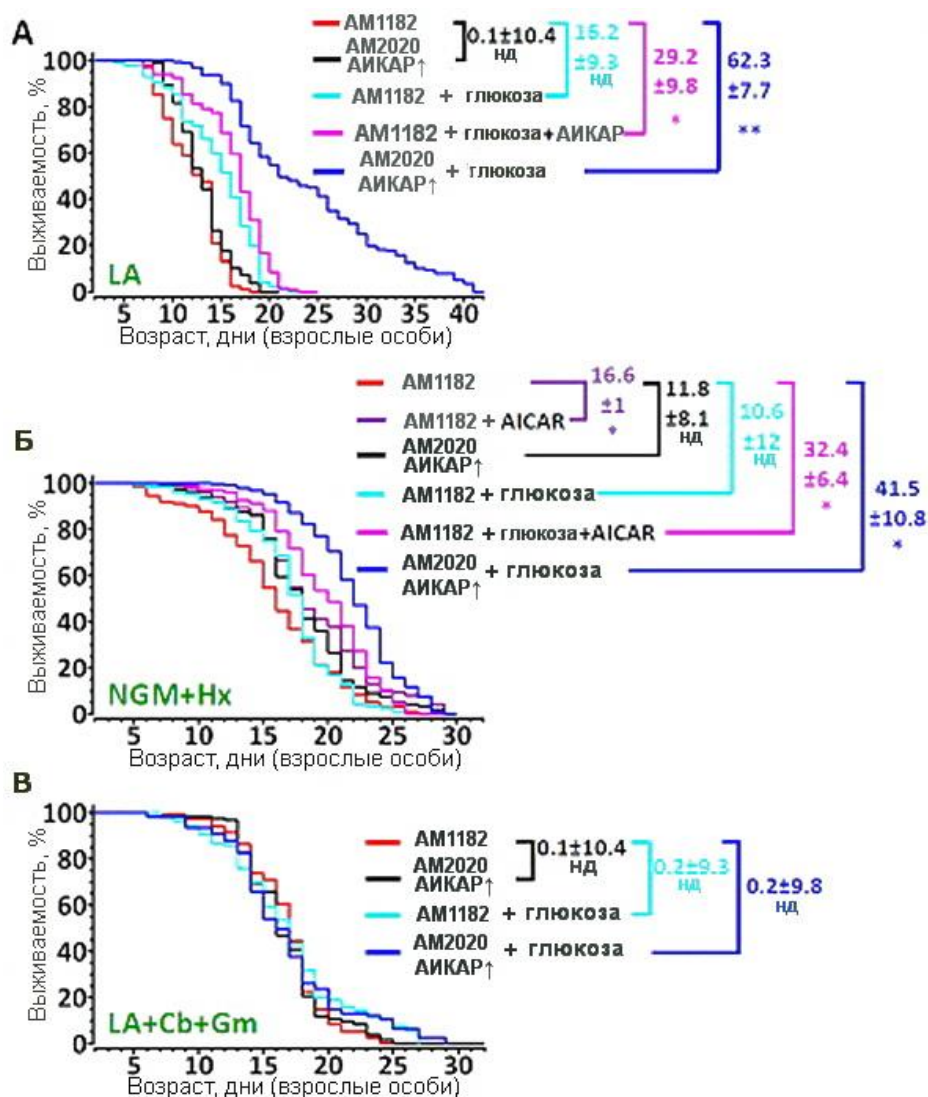


Рисунок 3.5.6 – Изучение влияния глюкозы и эндогенного АИКАР, продуцируемого штаммом AM2020 АИКАР⁺, на продолжительность жизни *C. elegans* N2. На каждом графике показаны результаты по крайней мере трех независимых экспериментов. Среднее процентное изменение $\pm$ стандартное отклонение продолжительности жизни относительно AM1182 указано цветом, совпадающим с соответствующей кривой. Продолжительность жизни *C. elegans*, выращенных на среде LA (А) или NGM с добавлением 20 мкМ гипоксантина (Нх) (Б) в чашках, засеянных бактериями AM2020 АИКАР⁺ или AM1182. Там, где указано, в чашки с агаром добавляли 2% глюкозы и/или 0.1 мМ АИКАР. (В) Бактерии, продуцирующие АИКАР, должны оставаться живыми, чтобы увеличить продолжительность жизни *C. elegans*. Бактерии были «убиты» антибиотиками (100 мкг/мл карбенициллина и гентамицина), добавленными в чашки со средой LA (см. также таблицу 3.5.4). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, нд – не достоверно.

Таблица 3.5.4 – Результаты анализа продолжительности жизни.

Повторы	Штамм <i>C. elegans</i>	Бактериальный штамм	Среда/добавка	Количество умерших особей/общее количество	50% выживаемость, дни	Средняя выживаемость, дни±SD	Р-значение, 2 1	Увеличение/снижение, %	Среднее увеличение/снижение, %±SEM
1	N2	AM1182	LA	141/150	14.3	13.25±1.1			
2				135/150	11.7				
3				137/150	13.6				
4				146/170	13.4				
1	N2	AM2020 АИКАР↑	LA	117/125	12.9	13.18±0.41	0.902771	-9.79	0.06±10.37
2				122/130	13.3			13.68	
3				164/175	12.8			-5.88	
4				128/140	13.7			2.23	
1	N2	AM1182	LA+ Глюкоза	144/150	15.9	15.58±1.48	0.156120	11.19	16.2±9.26
2				148/150	16.6			41.88	
3				139/150	15.5			13.97	
4				118/125	13.1			-2.24	
5				148/160	16.8				
1	N2	AM1182	LA+ АИКАР+ Глюкоза	149/150	16.8	16.9±0.46	0.0666995	17.48	29.17±9.83
2				140/148	17.4			48.72	
3				143/150	16.5			21.32	
1	N2	AM2020 АИКАР↑	LA +Глюкоза	120/125	20.9	21.46±0.53	0.001193	46.15	62.25±7.71
2				125/130	21.3			82.05	
3				161/175	21.1			55.14	
4				156/175	22.2			65.67	
5				117/125	21.8				
1	N2	AM1182	NGM+Hx	121/135	16.9	15.7±1.82			
2				130/140	16.3				
3				158/170	13				
4				142/160	16.6				
1	N2	AM1182	NGM+Hx			17.83±2.32	0.008882		16.57±0.98

2			+АИКАР	143/155	18.7			14.72	
3				160/175	15.2			16.92	
4				141/155	19.6			18.07	
1				127/135	17.4			2.96	
2	N2	AM2020	NGM+Hx	140/150	17	17.33±0.3	0.211337	4.29	11.76
3		АИКАР↑		132/150	17.7			36.15	±8.13
4				140/150	17.2			3.61	
1				124/135	14.1			-16.57	
2	N2	AM1182	NGM+Hx	115/135	17.9	17.05±2.01	0.489624	9.82	10.59
3			+Глюкоза	172/185	18.6			43.08	±12.3
4				160/149	17.6			6.02	
1									
2	N2	AM1182	NGM+Hx	139/150	19.7	20.13±1.79	0.021320	20.86	32.36±
3			+АИКАР	164/175	18.6			43.07	6.43
4			+Глюкоза	142/155	22.1			33.13	
1				129/140	21.7			28.4	
2	N2	AM2020	NGM+Hx	142/160	21.8	21.93±0.46	0.011910	33.74	41.53±
3		АИКАР↑	+Глюкоза	141/160	22.6			73.85	10.83
4				135/150	21.6			30.12	
1				141/150	16,8				
2	N2	AM1182	LA+Carb	119/150	15,8	16.4 ±0.53			
3			+Gent	139/150	16,6				
1				136/150	17,1			1.8	
2	N2	AM1182	+Gent	144/148	14,1	15.8±1.54	0.27897	-10.8	-3.8±6.42
3			+Глюкоза	140/150	16,2			-2.4	
1				136/150	16,2				
2	N2	AM2020	LA+	132/150	15,4	15.83±0.4			
3		АИКАР↑	Carb	141/150	15,9				
			+Gent						
1				121/150	16,2			0	
2	N2	AM2020	LA+	114/148	14,8	15.57±0.71	0.30092	-3.9	1.73±1.99
3		АИКАР↑	Carb	138/150	15,7			-1.3	
			+Gent + Глюкоза						

Как следует из данных, представленных на рисунке 3.5.6А, на чашках со средой LA без глюкозы нематоды, питавшиеся AM2020 АИКАР↑ и AM1182, имели аналогичную продолжительность жизни. Из этого следует, что небольшое увеличение продукции АИКАР штаммом AM2020 АИКАР↑ без глюкозы недостаточно для увеличения продолжительности жизни *C. elegans*. В то же время, добавление глюкозы увеличивало на ~62% продолжительность жизни особей, выращенных на штамме-продуценте AM2020 АИКАР↑, по сравнению с нематодами, выращенными на контрольном штамме AM1182 (Рисунок 3.5.6А). Величина эффекта означает, что высокий уровень АИКАР, продуцируемый бактериями, не только устраняет отрицательный эффект глюкозы, но и значительно увеличивает продолжительность жизни *C. elegans* (несмотря на диету с высоким содержанием глюкозы). Примечательно, что антивозрастной эффект AM2020 АИКАР↑ значительно превосходит эффект экзогенного АИКАР, добавленного в чашки, засеянные контрольным штаммом AM1182.

В приведенной серии экспериментов среда LA была использована как наиболее оптимизированная для продукции АИКАР. Следует отметить, что по сравнению с традиционной для культивирования нематод средой NGM использование полноценной среды LA приводит к некоторому снижению продолжительности жизни нематод. Поэтому мы повторили эксперименты по изучению эффекта продукции АИКАР на нематод при их выращивании на среде NGM. Штаммы AM2020 АИКАР↑ и AM1182 являются ауксотрофными по пуринам, поэтому в среду NGM добавляли гипоксантин. Как и в экспериментах на среде LA, продолжительность жизни нематод, выращенных на штаммах AM1182 и AM2020 АИКАР↑, существенно не отличалась в отсутствие глюкозы (Рисунок 3.5.6Б), тогда как добавление глюкозы резко увеличивало продолжительность жизни особей, питавшихся штаммом AM2020 АИКАР↑ (Рисунок 3.5.6Б). Как и в случае постановки экспериментов на среде LA, антивозрастной эффект AM2020 АИКАР↑ существенно превышал эффект экзогенного АИКАР, добавленного в чашки со средой NGM, засеянные штаммами AM1182 или *E. coli* OP50. В дополнительных экспериментах было продемонстрировано, что для увеличения продолжительности жизни, вызванного штаммом-продуцентом AM2020 АИКАР↑, требовались активно метаболизирующие бактерии, поскольку обработка бактериального газона антибиотиками полностью ослабляла влияние AM2020 АИКАР↑ на продолжительность жизни (Рисунок 3.5.6В).

Совокупность полученных результатов демонстрирует, что живой штамм-продуцент AM2020 АИКАР↑ эффективен для увеличения продолжительности жизни *C. elegans* независимо от используемых сред. Важно отметить, что этот эффект AM2020 АИКАР↑ не может быть полностью воспроизведен экзогенным АИКАР, который становится токсичным при более высоких дозах.

С целью получения более полного представления о механизме увеличения продолжительности жизни, индуцированном AM2020 АИКАР $\uparrow$, были проанализированы внутриклеточная концентрация АИКАР в тканях *C. elegans* (Рисунок 3.5.7).

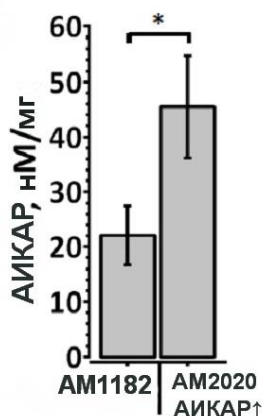


Рисунок 3.5.7 – Нормализованная концентрация АИКАР (3-й день взрослой жизни особей), выращенных на штаммах AM1182 или AM2020 АИКАР $\uparrow$.

Полученные данные подтверждают, что *C. elegans* использует АИКАР, полученный из живой культуры, более эффективно, чем экзогенный АИКАР. Таким образом, для достижения значительного физиологического эффекта АИКАР должен непрерывно и эффективно доставляться в ткани животных. Данные указывают на то, что живой пробиотик AM2020 АИКАР $\uparrow$ справляется с этой задачей.

3.5.5 Влияние штамма-продуцента AM2020 АИКАР $\uparrow$ на продолжительность жизни мутантов *C. elegans aak-2* и *daf-16*

Поскольку АМРК является основной внутриклеточной мишенью АИКАР, ее активация может объяснять эффекты положительного влияния штамма AM2020 АИКАР $\uparrow$ на продолжительность жизни [Riedinger et al., 2018]. Для проверки этого предположения было проведено сравнение продолжительности жизни АМРК-дефицитных мутантных линий нематод *C. elegans aak-2*, выращенных на штаммах AM2020 АИКАР $\uparrow$ или AM1182 (Рисунок 3.5.8А-Г, 3.5.9).

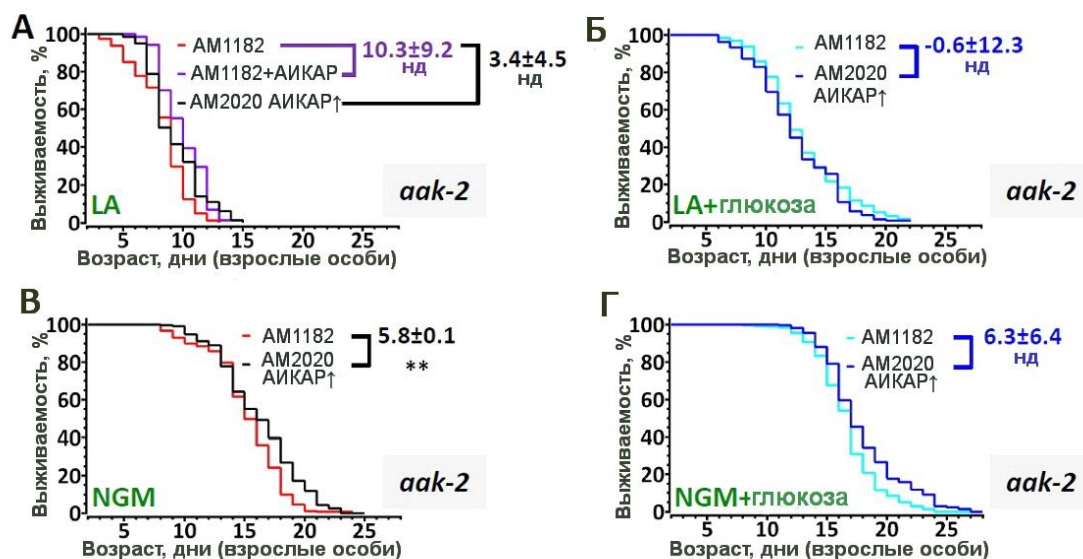


Рисунок 3.5.8 – Исследование АМРК-зависимого пути влияния штамма AM2020 АИКАР↑ на продолжительность жизни на модели АМРК-дефицитных нематод *C. elegans aak-2*. Продолжительность жизни нематод *aak-2*, выращенных на чашках с LA (А и Б) или NGM+гипоксантин (20 мкМ) (В и Г), засеянными AM1182 или AM2020 АИКАР↑. В чашки (Б и Г) добавляли глюкозу. На каждом графике показаны результаты по крайней мере трех независимых экспериментов. Среднее процентное изменение ± стандартное отклонение продолжительности жизни относительно AM1182 указано цветом, совпадающим с соответствующей кривой (см. также таблицу 3.5.5). ** $p < 0.01$, нд – не достоверно.

Таблица 3.5.5 – Результаты анализа продолжительности жизни.

Пов- торы	Штамм <i>C. ele- gans</i>	Бактери- альный штамм	Среда/ добавка	Коли- чество умерших особей/ общее коли- чество	50% выжива- емость, дни	Средняя выжива- емость, дни±SD	Р- значение, 2 1	Увели- чение/ сниже- ние, %	Среднее увели- чение/ снижение, %±SEM
1	<i>aak-2</i>	AM1182	NGM+Hx	134/150	14.3	15±0.62			
2				138/150	15.2				
3				130/150	15.5				
1	<i>aak-2</i>	AM2020 АИКАР↑	NGM+Hx	132/150	15.1	15.93±0.57	0.001476	5.59	5.77±0.1
2				136/150	16.1			5.92	
3				121/135	16.4			5.81	
4				140/150	16.1				

1	<i>aak-2</i>	AM1182	NGM+Hx +Глюкоза	139/150	15.8	16±0.35	0.072343		
2				138/150	16.4				
3				134/150	15.8				
1	<i>aak-2</i>	AM2020 АИКАР↑	NGM+Hx +Глюкоза	134/150	18.7	16.8±1.44	0.42329	18.35	6.28±6.35
2				128/135	17			3.66	
3				117/135	15.3			-3.16	
4				135/150	16.2				
1	<i>aak-2</i>	AM1182	LA	98/125	7.3	8.17±0.85			
2				81/125	8.2				
3				144/160	9				
2	<i>aak-2</i>	AM1182	LA+ АИКАР	143/150	9.8	9.45±0.49	0.460263	19.51	10.3±9.2
3				144/150	9.1			1.1	
1	<i>aak-2</i>	AM2020 АИКАР↑	LA	100/125	8.2	8.4±0.2	0.597861	12.33	3.44±4.87
2				99/125	8.4			2.44	
3				142/150	8.6			-4.44	
1	<i>aak-2</i>	AM1182	LA+ Глюкоза	98/125	10.8	12.03±1.64			
2				64/80	13.9				
3				127/150	11.4				
1	<i>aak-2</i>	AM2020 АИКАР↑	LA+ Глюкоза	100/125	11	11.77±1.59	0.881217	1.85	-0.6±12.3
2				98/125	10.7			-23.02	
3				140/150	13.6			19.3	

Как и ожидалось, продолжительность жизни мутантных нематод *aak-2* (как на чашках со средой LA, так и на чашках со средой NGM) существенно не отличалась, независимо от бактериального штамма, который они употребляли в пищу. Более того, как следует из данных, представленных на рисунке 3.5.8А, добавление экзогенного АИКАР не увеличивало продолжительность жизни *C. elegans aak-2*.

Связывание AMP или ZMP с γ -субъединицей AMPK вызывает конформационное изменение, которое способствует ключевому регуляторному фосфорилированию Thr и активации AMPK [Mihaylova, Shaw, 2011]. Действительно, в своих исследованиях коллеги наблюдали значительно более высокое фосфорилирование ААК-2 у нематод, получавших

AM2020 АИКАР↑, по сравнению с таковыми при выращивании особей на контрольном штамме AM1182.

Полученные результаты показывают, что штамм-продуцент AM2020 АИКАР↑ увеличивает продолжительность жизни *C. elegans* путем активации AMPK.

3.5.6 Исследование DAF-16-зависимого пути влияния штамма AM2020 АИКАР↑ на продолжительность жизни на модели *C. elegans daf-16*

Передача сигналов инсулина/инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1) (*IIS*, *Insulin/IGF-1 signaling*) – это эволюционно консервативный путь, который контролирует старение всех многоклеточных организмов [Barbieri et al., 2003]. Снижение сигналов *IIS* способствует долголетию за счет активации различных факторов транскрипции [Hesp et al., 2015; Kenyon, 2010]. DAF-2 – мембранный рецептор, управляющий передачей сигналов инсулина/IGF-1 у *C. elegans*. Подавление DAF-2 активирует фактор транскрипции FOXO DAF-16, что приводит к значительной задержке старения [Kenyon et al., 1993]. DAF-16 может также активироваться AMPK-зависимым фосфорилированием [Greer et al. 2007]. Сверхэкспрессия конститутивно активной AMPK увеличивает продолжительность жизни *C. elegans* дикого типа, но не мутантной линии *C. elegans daf-16* [Greer et al. 2007; Mair et al., 2011]. Это позволяет предположить, что AM2020 АИКАР↑ может действовать через путь DAF-16.

Действительно, результаты экспериментов, представленные на рисунке 3.5.9, показывают, что нематоды *daf-16*, питавшиеся штаммами AM2020 АИКАР↑ или AM1182, имели одинаковую продолжительность жизни независимо от наличия в среде глюкозы.

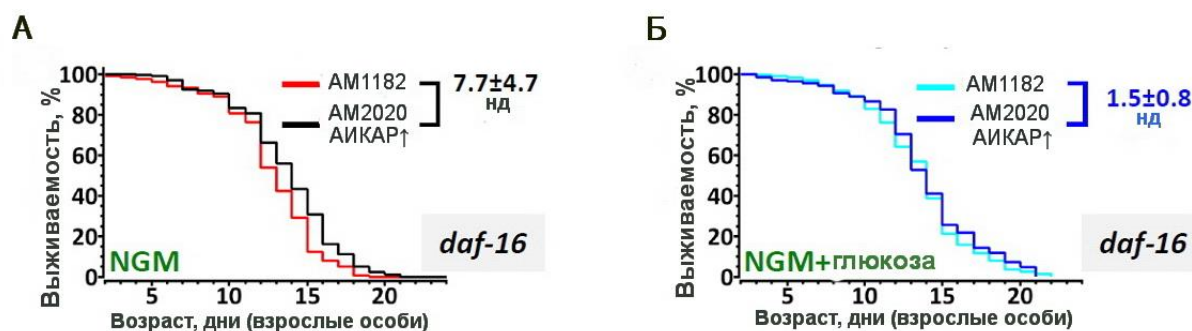


Рисунок 3.5.9 – Исследование DAF-16-зависимого пути влияния штамма AM2020 АИКАР↑ на продолжительность жизни на модели нематод *C. elegans daf-16*. Продолжительность жизни нематод *daf-16* (А и Б) на чашках NGM с гипоксантином (20 мкМ), засеянных AM1182 или AM2020 АИКАР↑. В чашки (Б) добавляли глюкозу. На каждом графике показаны результаты по крайней мере трех независимых экспериментов. Среднее процентное изменение ± стандартное отклонение продолжительности жизни относительно AM1182 указано цветом, совпадающим с соответствующей кривой (см. также таблицу 3.5.6). нд – не достоверно.

Таблица 3.5.6 – Результаты анализа продолжительности жизни.

Пов- торы	Штамм <i>C. ele- gans</i>	Бактери- альный штамм	Среда/ добавка	Коли- чество умерших особей/ общее коли- чество	50% выжива- емость, дни	Средняя выжива- емость, дни±SD	Р- значение, 2 1	Увели- чение/ сни- жение, %	Среднее увели- чение/ сни- жение, %±SEM
1	<i>daf-16</i>	AM1182	NGM+Нх	123/135	13.1	12.6±0.71			
2				137/150	12.1				
1	<i>daf-16</i>	AM2020	NGM+Нх	138/150	13.5	13.55±0.07	0.334095	3.05	7.73±4.67
2		АИКАР↑		136/150	13.6			12.4	
1	<i>daf-16</i>	AM1182	NGM+Нх	125/135	13.4	13.15±0.35			
2			+Глюкоза	137/150	12.9				
1	<i>daf-16</i>	AM2020	NGM+Нх	133/150	13.5	13.35±0.21	0.295167	0.75	1.54±0.79
2		АИКАР↑		143/150	13.2			2.33	

Эти результаты позволяют предположить, что AM2020 АИКАР↑ активизирует DAF-16 через AMPK для увеличения продолжительности жизни *C. elegans*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Идея коррекции метаболизма животных и человека, способствующей увеличению продолжительности жизни, возникла более 100 лет назад у российского ученого Ильи Ильича Мечникова, который предположил, что значительное количество долгожителей среди балканских крестьян можно объяснить потреблением йогурта, ферментированного бациллами. Эти представления послужили основой для современной концепции пробиотиков как компонента микробиоты, увеличивающего продолжительность жизни хозяина. Обычно пробиотики рассматриваются как источник неких полезных метаболитов, повышающих качество жизни хозяина. На практике, как правило, это сводится к идентификации и выделению активного метаболита пробиотика. В связи с этим одной из задач настоящей работы было сравнение эффективности действия изолированных метаболитов с их продукцией штаммами-пробиотиками.

Впервые влияние метаболизма микробиоты на организм хозяина было показано в нашей работе, демонстрирующей, что продуцируемая бактериями *Bacillus subtilis* окись азота (NO) продлевает жизнь хозяина *C. elegans*. Установлено, что позитивное действие NO на жизнеспособность нематод зависит от активности глобальных регуляторов DAF-16 и HSF-1 и полностью устраняется при их нарушении. Кроме того, было показано, что NO играет важную роль в обеспечении термотолерантности *C. elegans*. Так, было продемонстрировано, что при повышении температуры до 32°C или 34°C нематоды, питавшиеся бактериями дикого типа, жили на 17-15% дольше (соответственно), чем особи, питавшиеся бактериями, дефектными по NO-синтазе. Результаты проведенного транскриптомного анализа выявили в геноме нематод дикого типа группу генов, индуцируемых в присутствии NO. Важно отметить, что среди этих генов обнаружен повышенный уровень экспрессии генов *mtl-1*, *ctl-2*, *gei-7*, *nlp-29* и T19B10.2, которые уже были аннотированы как гены, вовлеченные в контроль долгожительства [Murphy et al., 2003; Halaschek-Wiener et al., 2005; Samuelson et al., 2007].

Мы показали, что не только активные формы азота (NO), но и активные формы кислорода (АФК), играют ключевую роль в регуляции процесса старения. Основным источником АФК в клетках бактерий является электрон-транспортная (дыхательная цепь), отдельные элементы которой способны восстанавливать кислород с образованием супероксида, предшественника перекиси водорода и гидроксил-иона в реакции Фентона. Продукция АФК зависит от насыщенности среды роста кислородом, точнее зависит от типа соответствующих терминальных оксидаз. Принимая во внимание этот факт, мы исследовали зависимость времени жизни нематод от двух терминальных оксидаз – *bo'* и *bd-I*, локализованных в клетках бактерий *E. coli*. С этой целью были получены мутанты *E. coli* дефектные по генам *суоА* (оксидаза *bo'*) и

cydA (оксидаза *bd-I*), которые использовались в качестве газона для культивирования нематод. СПЖ нематод при культивировании на этих мутантах *E. coli* возростала на 13-16%. Мы предполагаем, что увеличение продолжительности жизни особей, наблюдаемое при их культивировании на газоне бактерий, дефектных по терминальным оксидазам, обусловлено повышенным уровнем генерации АФК в клетках этих мутантов. Выявленный позитивный эффект культивирования нематод на мутантах *E. coli*, дефектных по синтезу терминальных оксидаз *bo'* и *bd-I*, на продолжительность их жизни может быть интерпретирован в рамках концепции «митохондриального гормезиса». Согласно этой концепции, умеренные дозы АФК приводят к усилению аэробного дыхания, индукции защитных механизмов организма от окислительного стресса и, в конечном счете, к увеличению продолжительности жизни [Taripa, 2006; Schulz et al., 2007; Ristow, Schmeisser, 2014].

Этой концепции соответствуют результаты наших исследований действия антиоксидантов на продолжительность жизни нематод. Так, обработка нематод *C. elegans* антиоксидантами глутатионом и N-ацетилцистеином не приводила к увеличению жизнеспособности особей, а напротив, вызывала сокращение продолжительности их жизни. Эти данные указывают на то, что продолжительность жизни *C. elegans* зависит от содержания АФК, тогда как антиоксиданты, очевидно, существенно снижают как уровень АФК, так и продолжительность жизни нематод.

Важное место в работе занимает исследование механизма негативного эффекта глюкозы на продолжительность жизни нематод. На протяжении многих лет токсичность глюкозы связывали с ее негативным эффектом на IIS-зависимый сигнальный путь. Однако генетическая инактивация IIS-пути не снимает негативного эффекта глюкозы на продолжительность жизни. В настоящей работе мы показали, что накопление внутриклеточного гликогена играет принципиальную роль в сокращении продолжительности жизни в условиях высокого потребления глюкозы. На основании полученных данных мы предполагаем, что синтез гликогена и IIS-путь являются двумя различными сигнальными путями, контролирующими продолжительность жизни. При высоком содержании глюкозы в пище IIS активируется и подавляет DAF-16 – зависимую транскрипцию. Одновременно накопление гликогена ингибирует активность AMPK. В совокупности это приводит к существенному сокращению продолжительности жизни. Ингибирование синтеза гликогена с помощью антисмысловой РНК (*gsy-1 RNAi*) снимает ингибирование AMPK и увеличивает продолжительность жизни нематод дикого типа и мутантов *daf-2* и *daf-16* на среде с высоким содержанием глюкозы. Из этого следует, что гликоген и DAF-16 являются независимыми факторами контроля продолжительности жизни. Таким образом, негативный эффект глюкозы на продолжительность жизни супрессируется отсутствием ее запасаения в форме гликогена, т. е. ее неограниченной

метаболизацией, которая приводит к активации дыхания и образования АФК. Как было отмечено выше, образование АФК является позитивным фактором продления жизни нематод.

Наиболее важным практическим результатом настоящей работы является демонстрация преимущества использования пробиотиков на модели нематод *C. elegans* по сравнению с использованием выделенных из них активных метаболитов для продления жизни хозяина. Было проведено сравнение эффективности действия препарата АИКАР и штамма-продуцента АИКАР, используемого в качестве газона для культивирования нематод, на продолжительность их жизни. Совокупность полученных результатов позволяет заключить, что сконструированный нами продуцент АИКАР обнаруживает свойства пробиотика и существенно увеличивает продолжительность жизни особей по сравнению с действием очищенного препарата АИКАР [Mlekusch et al., 1996; Aston, 2006; Venn, Green, 2007; McBride et al., 2009; Ruff et al., 2013; Gusarov et al., 2017]. Показано, что увеличение продолжительности жизни нематод при их культивировании на газоне штамма-пробиотика опосредовано активацией АМРК нематод. Действительно, при выращивании *C. elegans* на газоне штамма-пробиотика содержание активной формы АМРК в организме особей возрастает в несколько раз. Кроме того, показано, что инактивация гена *aak-2*, кодирующего одну из субъединиц АМРК нематод, препятствует проявлению позитивного эффекта пробиотика.

Важной характеристикой нематод, выращиваемых на газоне штамма-пробиотика, является их устойчивость к репрессирующему действию глюкозы. Известно, что АМРК является важным компонентом системы передачи сигналов инсулиноподобного фактора роста (ILS-путь), который контролирует старение всех многоклеточных организмов. Мы показали, что сверхэкспрессия конститутивно активной АМРК в штамме-пробиотике увеличивает продолжительность жизни *C. elegans* дикого типа, но не мутантной линии *C. elegans daf-16*. Эти данные позволяют предположить, что супрессия негативного действия высоких концентраций глюкозы пробиотиком обусловлена снижением активности ILS-системы, ответственной за утилизацию глюкозы нематодами. Полученный пробиотик служит примером перспективности использования искусственно созданных бактерий в качестве микробиоты для коррекции метаболических нарушений и замедления процесса старения организма хозяина.

ВЫВОДЫ

В результате проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. Бактериальный оксид азота как сигнальная молекула играет важную роль в физиологии нематод, увеличивает термотолерантность и продолжительность жизни особей, индуцируя специфический ответ, зависящий от активности DAF-16 и HSF-1.
2. Инактивация генов *сuoA* и *сydA*, контролирующих аэробное дыхание микробиоты, демонстрирует положительное влияние на продолжительность жизни *C. elegans*, связанное с эффектом митохондриального гормезиса.
3. Постоянное употребление экзогенных антиоксидантных добавок приводит к сокращению продолжительности жизни нематод *C. elegans*, подтверждая важную роль наличия сбалансированного уровня антиоксидантов для поддержания нормальной жизнедеятельности организма.
4. Гликоген ответственен за устойчивость к оксидантам и сокращение продолжительности жизни нематод в условиях высокого потребления глюкозы.
5. Регуляторный экзогенный метаболит АИКАР обладает геропротекторным эффектом на модели *C. elegans*, увеличивая продолжительность жизни особей на 13%. Полученный штамм-продуцент АИКАР *B. subtilis*, обладающий свойствами пробиотика, значительно увеличивает продолжительность жизни особей (на 62%). Отсутствие влияния экзогенного и эндогенного АИКАР на жизнедеятельность АМРК-дефицитных нематод с инактивированным геном *aak-2* свидетельствует об участии АМРК-зависимого пути в контроле продолжительности жизни.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АДФ – аденозиндифосфат

АИКАР – 5-аминоимидазол-4-карбоксамид-1-β-D-рибофуранозид (англ., *5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide, AICAR*)

АИКАР-Ф – АИКАР-фосфат (англ., *AICAR-phosphate, AICAR-P*)

АМФ – аденозинмонофосфат

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

БТШ – белки теплового шока (англ., *Heat shock proteins, HSP*)

ВКПМ – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ИМФ – инозинмонофосфат

ЛОС – летучие органические соединения

НАД – никотинамидадениндинуклеотид

НАДН – восстановленная форма НАД

ОКП – ограничение калорийности питания

ПЖ – продолжительность жизни

п.н. – пара нуклеотидов

СПЖ – средняя (срединная, медианная) продолжительность жизни

СОД – супероксид-дисмутаза

ЦТК – цикл трикарбоновых кислот

G6P – глюкозо-6-фосфат (англ., *glucose-6-phosphate*)

ААК – α-каталитическая субъединица АМРК

Amp – ампициллин (англ., *ampicillin*)

АМРК – 5'АМФ-активируемая протеинкиназа (англ., *AMP-activated protein kinase*)

АТИС – АИКАР-трансформилаза/ИМФ-циклогидролаза (англ., *AICAR transformylase/IMP cyclohydrolase*)

Сb – карбенициллин (англ., *carbenicillin*)

Сm – хлорамфеникол (англ., *chloramphenicol*)

CoQ – кофермент Q (англ., *Coenzyme Q*)

DAF-2 – (англ., *Abnormal dauer formation family protein 2*)

DAF-16 – (англ., *Abnormal dauer formation family protein 16*)

Em – эритромицин (англ., *Erythromycin*)

IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста-1 (англ., *Insulin-like growth factor-1*)

IIS/ILS - передача сигналов инсулина/инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1) (англ., *Insulin/IGF-1 signaling*)/ инсулиноподобный сигнальный путь (англ., *Insulin-like signaling*)

IPTG – изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (англ., *Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*)

ФААН – 4-амид-гидролаза жирных кислот 4 (англ., *Fatty acid amide hydrolase 4*)

FAICAR – 5'-фосфорибозил-5-формамидо-4-имидазолкарбоксамид (англ., *5'-phosphoribosyl-5-formamido-4-imidazolecarboxamide*)

FOXO – (англ., *Forkhead box O*)

Gm – гентамицин (англ., *gentamicin*)

GFP – зелёный флуоресцентный белок (англ., *Green fluorescent protein*)

HIF-1 – транскрипционный фактор, индуцируемый гипоксией (англ., *Hypoxia-inducible factor*)

HSF-1 – фактор теплового шока-1 (англ., *Heat shock factor-1*)

HSP – белки теплового шока (англ., *Heat shock proteins*)

Hx – гипоксантин (англ., *hypoxanthine*)

Km – канамицин (англ., *kanamycin*)

LB – среда Лурия-Бертани (англ., *Luria-Bertani/Lysogeny broth*)

Leu – лейцин (англ., *Leucine*)

MAGL – моноацилглицериновая липаза (англ., *Monoacylglycerol lipase*)

МАРК – митоген-активируемая протеинкиназа (англ., *Mitogen-activated protein kinases*)

Met – метионин (англ., *Methionine*)

NAC - N-ацетилцистеин (англ., *N-acetyl-L-cysteine*)

NGM – твердая агаризованная среда для выращивания нематод (англ., *Nematode growth media*)

NOS – NO-синтазы (англ., *Nitric oxide synthases*)

Nrf – (англ., *Nuclear respiratory factor*)

PAR – (англ., *Phytochrome rapidly regulated, PAR*)

PRA – 5-фосфорибозиламин (англ., *5-phosphoribosylamine*)

PRPP – 5-фосфорибозил-1-пирофосфат (англ., *5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate*)

R5P – рибозо-5-фосфат (англ., *Ribose-5-phosphate*)

RNAi – РНК-интерференция (англ. *RNA interference*)

SAICAR – 5'-фосфорибозил-4-(N-сукцинокарбоксамид)-5-аминоимидазол (англ., *phosphoribosyl-4-(N-succinocarboxamide)-5-aminoimidazole*)

SIRT – сиртуины (англ. *sirtuins* или *silent information regulator 2 (Sir2) proteins*)

SKN-1 – (англ., *SKiNhead protein 1*)

Spc – спектиномицин (англ., *spectinomycin*)

TGF – трансформирующий фактор роста (англ., *Transforming growth factor*)

TOR – мишень рапамицина (англ., *Target of rapamycin*)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анисимов В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения. – СПб.: Наука, 2003. – 468 с.
2. Гайдай Е.А., Матичин А.А., Гайдай Д.С., Макарова М.Н. *Caenorhabditis elegans* как модельный объект для биомедицинских исследований // Лабораторные животные для научных исследований. – 2018. – N 4. – С. 15-25.
3. Еремина С.Ю., Шостак Н.Г., Зеленцова Е.С., Каткова-Жукоцкая О.А., Лобанов К.В., Шакулов Р.С., Фуников С.Ю., Миронов А.С., Евгеньев М.Б., Карпов В.Л., Нудлер Е.А. Геропротектор для модельных животных. Патент РФ №2639500 от 21.12.2017.
4. Каткова-Жукоцкая О.А., Еремина С.Ю., Шакулов Р.С., Миронов А.С. Выращивание *Caenorhabditis elegans* на газоне бактерий *Escherichia coli*, дефектных по синтезу терминальных оксидаз *bo'* и *bd-I*, увеличивает продолжительность жизни нематод // Генетика. – 2019. – Т. 55. N 12. – С. 1487-1490.
5. Лобанов К.В., Эрраис Лопес Л., Королькова Н.В., Тяглов Б.В., Глазунов А.В., Шакулов Р. С., Миронов А.С. Реконструкция пуринового метаболизма у *Bacillus subtilis* с целью получения штамма-продуцента AICAR – нового препарата широкого терапевтического применения // Acta Naturae. – 2011. – Т. 3. N 2(9). – С. 83-93.
6. Марчук Г.И. Геронтология in Silico: становление новой дисциплины. Математические модели, анализ данных и вычислительные эксперименты. – БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. – 535 с.
7. Миллер Д. Эксперименты в молекулярной генетике. – М.: Издательство «Мир», 1976. – 436 с.
8. Москалев А.А. Старение и гены. – СПб.: Наука, 2008. – 358 с.
9. Москалев А.А. К вопросу о генетической обусловленности процессов старения // Успехи геронтологии. – 2008. – Т. 21, N 3. – С. 463-469.
10. Сергиев П.В., Донцова О.А., Березкин Г.В. Теории старения. Неустаревающая тема // Acta Naturae. – 2015. – Т. 7. N 1 (24). – С. 9-20.
11. Чистякова О.В. Сигнальный путь инсулина и инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР-1) как потенциальный регулятор продолжительности жизни // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2008. – Т. 44, N 1. – С. 3-11.

12. Abada E.A., Sung H., Dwivedi M., Park B.J., Lee S.K., Ahnn J. *C. elegans* behavior of preference choice on bacterial food // *Mol. Cells.* – 2009. – V. 28. – P. 209-213.
13. Amrit F.R., Ratnappan R., Keith S.A., Ghazi A. *C. elegans* lifespan assay toolkit // *Methods.* – 2014. – V. 68. – P. 465-475.
14. Anagnostopoulos C., Spizizen J. Requirements for Transformation in *Bacillus Subtilis* // *Journal of bacteriology.* – 1961. – V. 81. – P. 741-746.
15. Anckar J., Sistonen L. Regulation of HSF1 function in the heat stress response: implications in aging and disease // *Annu. Rev. Biochem.* – 2011. – V. 80. – P. 1089-1115.
16. Apfeld J., Kenyon C. Regulation of lifespan by sensory perception in *Caenorhabditis elegans* // *Nature.* – 1999. – V. 402. – P. 804–809.
17. Apfeld J., O'Connor G., McDonagh T., DiStefano P.S., Curtis R. The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in *C. elegans* // *Genes Dev.* – 2004. – V. 18. N 24. – P. 3004–3009.
18. Artal-Sanz M., Tavernarakis N. Mechanisms of aging and energy metabolism in *Caenorhabditis elegans* // *IUBMB Life.* – 2008. – V. 60. – P. 315–322.
19. Aston L.M. Glycaemic index and metabolic disease risk // *Proc. Nutr. Soc.* – 2006. – V. 65. – P. 125-134.
20. Aubin G., Lavigne J.-P., Foucher Y., Delliére S., Lepelletier D., Gouin F., Corvec S. Tropism and virulence of *Cutibacterium* (formerly *Propionibacterium*) *acnes* involved in implant-associated infection // *Anaerobe.* – 2017. – V. 47. – P. 73–78.
21. Azat R., Liu Y., Li W., Kayir A., Lin D.B., Zhou W.W., Zheng X.D. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented Xinjiang cheese // *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* – 2016. – V. 17. – P. 597–609.
22. Baba T., Ara T., Hasegawa M., Takai Y., Okumura Y., Baba M., Datsenko K.A., Tomita M., Wanner B.L., Mori H. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: The Keio collection // *Molecular Systems Biology.* – 2006. – V. 2. – P. 2006.
23. Back P., Braeckman B.P., Matthijssens F. ROS in aging *Caenorhabditis elegans*: damage or signaling? // *Oxid. Med. Cell Longev.* – 2012. – V. 2012. – P. 608478.
24. Baek, J.-H., Cosman P., Feng Z., Silver J., Schafer W. Using Machine Vision to analyze and classify *Caenorhabditis elegans* behavioral phenotypes quantitatively // *Journal of neuroscience methods.* – 2002. – V. 118. – P. 9-21.

25. Barbieri M., Bonafe M., Franceschi C., Paolisso G. Insulin/IGF-I-signaling pathway: an evolutionarily conserved mechanism of longevity from yeast to humans // *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism.* – 2003. – V. 285. – P. E1064-1071.
26. Bargmann C.I. Genetic and cellular analysis of behavior in *C.elegans* // *Annu. Rev. Neurosci.* – 1993. – V. 16. – P. 47-71.
27. Bazopoulou D., Knoefler D., Zheng Y., Ulrich K., Oleson B. J., Xie L., Kim M., Kaufmann A., Lee Y.-T., Dou Y. et al. Developmental ROS individualizes organismal stress resistance and lifespan // *Nature.* – 2019. – V. 576. – P. 301–305.
28. Beale E.G. 5'-AMP-activated protein kinase signaling in *Caenorhabditis elegans* // *Exp. Biol. Med. (Maywood).* – 2008. – V. 233 – P. 12–20.
29. Bjelakovic G., Nikolova D., Gluudet L.L. et al. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis // *JAMA.* – 2007. – V. 297. – P. 842–857.
30. Braeckman B.P. and Ineke D. Lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* insulin/IGF-1 signalling mutants is supported by non-vertebrate physiological traits // *Nematology.* – 2017. – V. 19. – P. 499–508.
31. Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans* // *Genetics.* – 1974. – V. 77. – P. 71-94.
32. Brooks K.K., Liang B., Watts J.L. The influence of bacterial diet on fat storage in *C. elegans* // *PLoS ONE.* 2009. – V. 4. – P. 7545.
33. Browning D.F., Wells T.J., Franca F.L.S., Morris F.C., Sevastyanovich Y.R., Bryant J.A., Johnson M.D., Lund P.A., Cunningham A.F., Hobman J.L., May R.C., Webber M.A., Henderson I.R. Laboratory adapted *Escherichia coli* K-12 becomes a pathogen of *Caenorhabditis elegans* upon restoration of O antigen biosynthesis // *Molecular Microbiology.* – 2013. – V. 87. – P. 939–950.
34. Brynildsen M.P., Winkler J.A., Spina C.S. et al. Potentiating antibacterial activity by predictably enhancing endogenous microbial ROS production // *Nat. Biotechnol.* – 2013. – V. 31. – P.160-165.
35. Buchter C., Ackermann D., Havermann S., Honnen S., Chovolou Y., Fritz G., Kampkotter A., Watjen W. Myricetin-mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* is modulated by DAF-16 // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – V. 14. – P. 11895–11914.

36. Buhl E.S. et al. Long-term AICAR administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in rats displaying features of the insulin resistance syndrome // *Diabetes*. – 2002. – V. 51. – P. 2199-2206.
37. Burns A.R., Kwok T.C., Howard A., Houston E., Johanson K., Chan A., Cutler S.R., McCourt P., Roy P. J. High-throughput screening of small molecules for bioactivity and target identification in *Caenorhabditis elegans* // *Nature*. – 2006. – Protocols. V. 1. – P. 1906-1914.
38. Cabreiro F., Au C., Leung K.Y., Vergara-Irigaray N., Cocheme H.M., Noori T., Weinkove D., Schuster E., Greene N.D., Gems D. Metformin retards aging in *C. elegans* by altering microbial folate and methionine metabolism // *Cell*. – 2013. – V. 153. – P. 228–239.
39. Cabreiro F., Gems D. Worms need microbes too: microbiota, health and aging in *Caenorhabditis elegans* // *EMBO Mol. Med*. – 2013. – V. 5. – P. 1300–1310.
40. Check E. Worm cast in starring role for Nobel prize // *Nature*. – 2002. – V. 419. – P. 548-549.
41. Chen X., Barclay J.W., Burgoyne R.D., Morgan A. Using *C. elegans* to discover therapeutic compounds for ageing-associated neurodegenerative diseases // *Chem. Cent. J.* – 2015 – V. 9. – P. 65.
42. Clark L.C., Hodgkin J. Commensals in the *C. elegans* model // *Cell Microbiol*. – 2014 – V. 16. – P. 27–38.
43. Clements A., Gao B., Yeap S.H., Wong M.K., Ali S.S., Gurney H. Metformin in prostate cancer: two for the price of one // *Annals of Oncology*. – 2011. – V. 22(12). – P. 2556-2560.
44. Colman R.J. et al. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys // *Science*. – 2009. – V. 325. – P. 201-204.
45. Coolon J.D., Jones K.L., Todd T.C., Carr B.C., Herman M.A. *Caenorhabditis elegans* genomic response to soil bacteria predicts environment-specific genetic effects on life history traits // *PLoS Genet*. – 2009. – V. 5. – P. 1000503.
46. Consortium (The *C. elegans* Sequencing Consortium) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology // *Science*. – 1998. – V. 282. – P. 2012-2018.
47. Corton J.M., Gillespie J.G., Hawley S.A., Hardie D.G. 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? // *European journal of biochemistry*. –1995. – V. 229. – P. 558-565.
48. Couillault C., Ewbank J.J. Diverse bacteria are pathogens of *Caenorhabditis elegans* // *Infect. Immun*. – 2002. – V. 70 – P. 4705–4707.

49. Curtis R., O'Connor G., DiStefano P.S. Aging networks in *Caenorhabditis elegans*: AMP-activated protein kinase (aak-2) links multiple aging and metabolism pathways // *Aging Cell*. – 2006. – V. 5 – P. 119–126.
50. Cutting S.M. *Bacillus* probiotics // *Food microbiology*. – 2011. – V. 28. – P. 214-220.
51. Datta P.K., Lianos E.A. Nitric oxide induces metallothionein-I gene expression in mesangial cells // *Transl. Res.* – 2006. – V. 148. – P. 180-187.
52. Dillin A., Crawford D.K., Kenyon C. Timing requirements for insulin/IGF-1 signaling in *C. elegans* // *Science*. – 2002. – V. 298. – P. 830-834.
53. Dirksen P., Marsh S.A., Braker I., Heitland N., Wagner S., Nakad R., Mader S., Petersen C., Kowallik V., Rosenstiel P. et al. The native microbiome of the nematode *Caenorhabditis elegans*: gateway to a new host-microbiome model // *BMC biology*. – 2016. – V. 14 – P. 38.
54. Dixon R. et al. AICA-riboside: safety, tolerance, and pharmacokinetics of a novel adenosine-regulating agent // *Journal of clinical pharmacology*. – 1991. – V. 31. – P. 342-347.
55. Dixon R., Fujitaki J., Sandoval T., Kisicki J. Acadesine (AICA-riboside): disposition and metabolism of an adenosine-regulating agent // *Journal of clinical pharmacology*. – 1993. – V. 33. – P. 955-958.
56. Donato V., Ayala F.R., Cogliati S., Bauman C., Costa J. G., Lenini C., Grau R. *Bacillus subtilis* biofilm extends *Caenorhabditis elegans* longevity through downregulation of the insulin-like signalling pathway // *Nat. Commun.* – 2017. – V. 8. – P. 14332.
57. Dostal V., Link C.D. Assaying β -amyloid toxicity using a transgenic *C. elegans* model // *J. Vis. Exp.* – 2010. – V. 44. – P. 2252.
58. Felix M.A., Braendle C. The natural history of *Caenorhabditis elegans* // *Current biology*. – 2010. – V. 20 (22). – P. R965-969.
59. Engelmann I., Griffon A., Tichit L., Montanana-Sanchis F., Wang G., Reinke V., Waterston R.H., Hillier L.D.W., Ewbank J.J. A comprehensive analysis of gene expression changes provoked by bacterial and fungal infection in *C. elegans* // *PLoS ONE*. – 2011. – V. 6. – P. 19055.
60. Ewbank J.J., Zugasti O. *C. elegans*: model host and tool for antimicrobial drug discovery // *Dis. Models Mech.* – 2011. – V. 4 – P. 300–304.
61. Ezcurra M. Dissecting cause and effect in host-microbiome interactions using the combined worm-bug model system // *Biogerontology*. – 2018. – V. 19. – P. 567.

62. Felix M.A., Duveau F. Population dynamics and habitat sharing of natural populations of *Caenorhabditis elegans* and *C. briggsae* // BMC Biol. – 2012. – V. 10. – P. 59.
63. Fontana L., Partridge L. Promoting health and longevity through diet: from model organisms to humans // Cell. – 2015. – V. 161. – P. 106–118.
64. Foster M.W., McMahon T.J., Stamler J.S. S-nitrosylation in health and disease // Trends Mol. Med. – 2003. – V. 9. – P. 160-168.
65. Friedman D.B., Johnson T.E. A mutation in the *age-1* gene in *Caenorhabditis elegans* lengthens life and reduces hermaphrodite fertility // Genetics. – 1988. – V. 118. – P. 75–86.
66. Fuller R. Probiotics in man and animals // J. Appl. Bacteriol. 1989. V. 66. P. 365–378.
67. Fujitaki J.M., Sandoval T.M., L.A. Lembach, Dixon R. Spectrophotometric determination of acadesine (AICARiboside) in plasma using a diazotization coupling technique with N-(1-naphthyl)ethylenediamine// J. Biochem. Biophys. Methods. – 1994. – V. 29. – P. 143–148.
68. Garcia D., Shaw R. J. AMPK: Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance. // Molecular cell. – 2017. – V. 66. – P. 789-800.
69. Garigan D., Hsu A.L., Fraser A.G, Kamath R.S., Ahringer J., Kenyon C. Genetic analysis of tissue aging in *Caenorhabditis elegans*: a role for heat-shock factor and bacterial proliferation // Genetics. – 2002. – V. 161 – P. 1101–1112.
70. Garsin D.A., Villanueva J.M., Begun J., Kim D.H., Sifri C.D., Calderwood S.B., Ruvkun G., Ausubel F.M. Long-lived *C. elegans daf-2* mutants are resistant to bacterial pathogens // Science. – 2003. – V. 300. – P. 1921.
71. Gems D., McElwee J.J. Ageing: Microarraying mortality // Nature. 2003. – V. – 424. – P. 259–261.
72. Gems D., Riddle D.L. Genetic, behavioral and environmental determinants of male longevity in *Caenorhabditis elegans* // Genetics. – 2000. – V. 154. – P. 1597–1610.
73. Gomez F., Monsalve G.C., Tse V., Saiki R., Weng E., Lee L., Srinivasan C., Frand A.R., Clarke C.F. Delayed accumulation of intestinal coliform bacteria enhances life span and stress resistance in *Caenorhabditis elegans* fed respiratory deficient *E. coli* // BMC Microbiol. – 2012 – V. 12. – P. 300.
74. Goodyear L.J. The exercise pill-too good to be true? // The New England journal of medicine. – 2008. – V. 359. – P. 1842-1844.

75. Govindan J.A., Jayamani E., Zhang X. Mylonakis E, Ruvkun G. Dialogue between *E. coli* free radical pathways and the mitochondria of *C. elegans* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2015. – V. 112. – P. 12456–12461.
76. Greer E.L., Dowlathshahi D., Banko M.R., Villen J., Hoang K., Blanchard D., Gygi S.P., Brunet A. An AMPK-FOXO pathway mediates longevity induced by a novel method of dietary restriction in *C. elegans* // Curr. Biol. – 2007. – V. 17 – P. 1646–1656.
77. Grompone G., Martorell P., Llopis S., Gonzalez N., Genoves S., Mulet A.P., Fernandez-Calero T., Tiscornia I., Bollati-Fogolin M., Chambaud I. et al. Anti-inflammatory *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690 strain protects against oxidative stress and increases lifespan in *Caenorhabditis elegans* // PLoS One. – 2012. – V. 7. – P. 52493.
78. Guerrieri D., Moon H.Y., van Praag H. Exercise in a Pill: The Latest on Exercise-Mimetics // Brain plasticity. – 2017. – V. 2. – P. 153-169.
79. Gusarov I., Gautier L., Smolentseva O., Shamovsky I., Eremina S., Mironov A., Nudler E. Bacterial nitric oxide extends the lifespan of *C. elegans* // Cell. – 2013. – V. 152. – P. 818-830.
80. Gusarov I., Nudler E. Glycogen at the Crossroad of Stress Resistance, Energy Maintenance, and Pathophysiology of Aging // Bioessays. – 2018. – V. 40. – P. 1800033.
81. Gusarov I., Shatalin K., Starodubtseva M., Nudler E. Endogenous nitric oxide protects bacteria against a wide spectrum of antibiotics // Science. – 2009. – V. 325. – P. 1380–1384.
82. Gusarov I., Shamovsky I., Pani B., Gautier L., Eremina S., Katkova-Zhukotskaya O., Mironov A., Makarov A.A., Nudler E. Dietary thiols accelerate aging of *C. elegans* // Nat. Commun. – 2021. – V. 12. – P. 4336.
83. Gusarov I., Starodubtseva M., Wang Z.Q., McQuade L., Lippard S.J., Stuehr D.J., Nudler, E. Bacterial nitric-oxide synthases operate without a dedicated redox partner // J. Biol. Chem. – 2008. – V. 283. – P. 13140–13147.
84. Gusarov I., Pani B., Gautier L., Smolentseva O., Eremina S., Shamovsky I., Katkova-Zhukotskaya O., Mironov A., Nudler E. Glycogen controls *Caenorhabditis elegans* lifespan and resistance to oxidative stress // Nat. Commun. – 2017. – V. 8. – P. 15868.
85. Han B., Lin C.-C., Neve I., He J., Tay L., Sowa J., Sizovs A., Du G., Wang J., Herman C., Wang M. genetic composition tunes host longevity // Cell. – 2017. – V. 169. – P. 1249–1262.

86. Halaschek-Wiener J., Khattri J.S., McKay S., Pouzyrev A., Stott J.M., Yang G.S., Holt R.A., Jones S.J., Marra M.A., Brooks-Wilson A.R., Riddle D.L. Analysis of long-lived *C. elegans daf-2* mutants using serial analysis of gene expression // *Genome Res.* – 2005. – V. 15. – P. 603-615.
87. Hardie D.G. The AMP-activated protein kinase pathway – new players upstream and downstream // *J. Cell Sci.* – 2004. – V. 117. – P. 5479–5487.
88. Hamilton B., Dong Y., Shindo M., Liu W., Odell I., Ruvkun G., Lee S.S. A systematic RNAi screen for longevity genes in *C. elegans* // *Genes and Develop.* – 2006. – V. 19. – P. 1544–1555.
89. Hansen M., Hsu A.-L., Dillin A., Kenyon C. New genes tied to endocrine, metabolic, and dietary regulation of lifespan from a *Caenorhabditis elegans* genomic RNAi screen // *PLoS Biol.* – 2005. – V. 1, N 1. – P. 119–128.
90. Hardie D.G. AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function // *Genes & development.* – 2011. – V. 25. – P. 1895-1908.
91. Heintz C., Mair W. You are what you host: microbiome modulation of the aging process // *Cell.* – 2014. – V. 156. – P. 408–411.
92. Helmcke K.J., Avila D.S., Aschner M. Utility of *Caenorhabditis elegans* in high throughput neurotoxicological research // *Neurotoxicol. Teratol.* – 2010. – V. 32(1). – P. 62-67.
93. Hesp K., Smant G., Kammenga J. E. *Caenorhabditis elegans* DAF-16/FOXO transcription factor and its mammalian homologs associate with age-related disease // *Experimental gerontology.* – 2015. – V. 72. – P. 1-7.
94. Hoang K.L., Gerardo N.M., Morran L.T. The effects of *Bacillus subtilis* on *Caenorhabditis elegans* fitness after heat stress // *Ecol. Evol.* – 2019. – V. 9. – P. 3491–3499.
95. Hoshi K., Shingai R. Computer-driven automatic identification of. Locomotion states in *Caenorhabditis elegans* // *J. Neurosci. Methods.* – 2006. – V. 157. – P. 355-363.
96. Houthoofd K., Braeckman B.P., Lenaerts I., Brys K., De Vreese A., Van Eygen S., Vanfleteren J.R. Axenic growth up-regulates mass-specific metabolic rate, stress resistance, and extends life span in *Caenorhabditis elegans* // *Exp. Gerontol.* – 2002. – V. 37. – P. 1371–1378.
97. Hsin H., Kenyon C. Signals from the reproductive system regulate the lifespan of *C. elegans* // *Nature.* – 1999. – V. 399. – P. 362–366.
98. Hsu A.L., Murphy C.T., Kenyon C. Regulation of aging and age- related disease by DAF-16 and heat-shock factor // *Science.* – 2003. – V. 300. – P. 1142-1145.

99. Huang Y., Kammenga J.E. Genetic Variation in *Caenorhabditis elegans* Responses to Pathogenic Microbiota // Microorganisms. – 2020. – V. 8(4). – P. 618.
100. Hwang A.B. et al. Feedback regulation via AMPK and HIF-1 mediates ROS-dependent longevity in *Caenorhabditis elegans* // Proc.Natl Acad. Sci USA. – 2014. – V. 111. – P. E4458-4467.
101. Iatsenko I., Yim J.J., Schroeder F.C., Sommer R.J. *B. subtilis* GS67 protects *C. elegans* from Gram-positive pathogens via fengycin-mediated microbial antagonism // Curr. Biol. – 2014. – V. 24 – P. 2720–2727.
102. Ignarro L.J. Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology // Biosci Rep. 1999 – V. 19(2) – P. 51-71.
103. Ikeda T., Yasui C., Hoshino K., Arikawa K., Nishikawa Y. Influence of lactic acid bacteria on longevity of *Caenorhabditis elegans* and host defense against *Salmonella enterica* serovar enteritidis // Appl. Environ. Microbiol. – 2007. – V. 73. – P. 6404–6409.
104. Jensen K.F. The *Escherichia coli* K-12 "wild types" W3110 and MG1655 have an *rph* frameshift mutation that leads to pyrimidine starvation due to low *pyrE* expression levels // J Bacteriol. – 1993. – V. 175(11). – P. 3401-3407.
105. Jiang H., Wang D. The microbial zoo in the *C. elegans* intestine: bacteria, fungi and viruses // Viruses. – 2018. – V. 10. – P. 85.
106. Johnson T.E. Increased lifespan of age-1 mutants in *Caenorhabditis elegans* and lower Gompertz rate of aging // Science. – 1990. – V. 249. – P. 908–912.
107. Johnson T.E., de Castro E., Hegi de Castro S., Cypser J., Henderson S., Tedesco P. Relationship between increased longevity and stress resistance as assessed through gerontogene mutations in *Caenorhabditis elegans* // Experimental gerontology. – 2001. – V. 36. N 10. – P. 1609–1617.
108. Jones K.T., Ashrafi K. *Caenorhabditis elegans* as an emerging model for studying the basic biology of obesity // Dis Models Mech. – 2009. – V. 2. – P. 224-229.
109. Jorgensen E., Mango S. The art and design of genetic screens: *Caenorhabditis elegans* // Nature Reviews Genetics. – 2002. – V. 3. – P. 356-369.
110. Kenyon C. Cell Lineage and the Control of *Caenorhabditis elegans* Development // Biological Sciences. – 1985. – V. 312 – P. 21–38.
111. Kenyon C. The plasticity of aging: insights from long-lived mutants // Cell. – 2005. – V. 120. – P. 449–460.
112. Kenyon C.J. The genetics of ageing // Nature. – 2010. – V. 464. – P. 504-512.

113. Kenyon C., Chang J., Gensch E., Rudner A., Tabtiang R. *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type // Nature. – 1993. – V. 366. N 6454. – P. 461–464.
114. Khalyavkin A., Yashin A. Inadequate Intensity of Various Components of Total Environmental Signals Can Lead to Natural Aging // Annals of the New York Acad. Sci. – 2006. – V. 1067. – P. 45–46.
115. Khalyavkin A.V., Yashin A.I. How the analysis of genetic mutations can help us to solve basic problems in gerontology? I. Life-extending genetic modifications in round worm *C. elegans* // Adv. Gerontol. – 2003. – V. 11. – P. 34–42 (a).
116. Khalyavkin A.V., Yashin A.I. How the analysis of genetic mutations can help us to solve basic problems in gerontology? II. Life extending genetic modifications in budding yeast *S. cerevisiae*, fruit fly *D. melanogaster* and laboratory mice *M. musculus* // Adv. Gerontol. – 2003. – V. 12. – P. 45–54 (6).
117. Kim Y., Mylonakis E. *Caenorhabditis elegans* immune conditioning with the probiotic bacterium *Lactobacillus acidophilus* strain NCFM enhances gram-positive immune responses // Infect. Immun. – 2012. – V. 80. – P. 2500–2508.
118. Klingbeil L.R., Kim P., Piraino G., O'Connor M., Hake P. W., Wolfe V., Zingarelli B. Age-Dependent Changes in AMPK Metabolic Pathways in the Lung in a Mouse Model of Hemorrhagic Shock // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. – 2017. – V. 56. – P. 585–596
119. Kobayashi Y., Furukawa-Hibi Y., Chen C., Horio Y., Isobe K., Ikeda K., Motoyama N. SIRT1 is critical regulator of FOXO-mediated transcription in response to oxidative stress // International journal of molecular medicine. – 2005. – V. 16, N 2. – P. 237-43
120. Kurz C.L., Chauvet S., Andres E., Aurouze M., Vallet I., Michel G.P., Uh M., Celli J., Filloux A., De Bentzmann S. et al. Virulence factors of the human opportunistic pathogen *Serratia marcescens* identified by in vivo screening // EMBO J. – 2003. – V. 22. – P. 1451–1460.
121. Kwon G., Lee J., Lim Y.H. Dairy *Propionibacterium* extends the mean lifespan of *Caenorhabditis elegans* via activation of the innate immune system // Sci. Rep. – 2016. – V. 6 – P. 31713.
122. Kim D.H. Bacteria and the aging and longevity of *Caenorhabditis elegans* // Annu. Rev. Genet. – 2013. – V. 47. – P. 233–246.
123. Komura T., Ikeda T., Yasui C., Saeki S., Nishikawa Y. Mechanism underlying prolongevity induced by bifidobacteria in *Caenorhabditis elegans* // Biogerontology. – 2013. – V. 14. – P. 73-87.

124. Khan F., Jain S., Oloketuyi S.F. Bacteria and bacterial products: foe and friends to *Caenorhabditis elegans* // Microbiol. Res. – 2018. – V. 215. – P. 102–113.
125. Kim J., Yang G., Kim Y., Kim J., Ha J. AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities // Experimental & molecular medicine. – 2016. – V. 48. – P. e224.
126. King K.C., Brockhurst M.A., Vasieva O., Paterson S., Betts A., Ford S.A., Frost C.L., Horsburgh M.J., Haldenby S., Hurst G.D. Rapid evolution of microbe-mediated protection against pathogens in a worm host // ISME J. – 2016. – V. 10. – P. 1915–1924.
127. Klingbeil L.R., Kim P., Piraino G., O'Connor M., Hake P. W., Wolfe V., Zingarelli B. Age-Dependent Changes in AMPK Metabolic Pathways in the Lung in a Mouse Model of Hemorrhagic Shock // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2017. – V. 56. – P. 585–596.
128. Kobil T. et al. AMPK agonist AICAR improves cognition and motor coordination in young and aged mice // Learning & memory. – 2014. – V. 21. – P. 119–126.
129. Komura T., Yasui C., Miyamoto H., Nishikawa Y. *Caenorhabditis elegans* as an alternative model host for *Legionella pneumophila*, and protective effects of *Bifidobacterium infantis* // Appl. Environ. Microbiol. – 2010. – V. 76. – P. 4105–4108.
130. Lai C.-H. et al. Identification of novel human genes evolutionarily conserved in *Caenorhabditis elegans* by comparative proteomics // Genome Res. – 2000. – V. 10(5). – P. 703–713.
131. Lakowski B., Hekimi S. Determination of lifespan in *Caenorhabditis elegans* by four clock genes // Science. – 1996. – V. 272. – P. 1010–1013.
132. Larsen P.L., Clarke C.F. Extension of lifespan in *Caenorhabditis elegans* by a diet lacking coenzyme Q // Science. – 2002. – V. 295(5552). – P. 120–123.
133. Lee J., Choe J., Kim J., Oh S., Park S., Kim S., Kim Y. Heat-killed *Lactobacillus* spp. cells enhance survivals of *Caenorhabditis elegans* against *Salmonella* and *Yersinia* infections // Lett. Appl. Microbiol. – 2015. – V. 61. – P. 523–530.
134. Lee S.J., Hwang A.B., Kenyon C. Inhibition of respiration extends *C. elegans* lifespan via reactive oxygen species that increase HIF-1 activity // Curr Biol. – 2010. – V. 20(23). – P. 2131–2136.
135. Lee D., Jeong D.E., Son H.G., Yamaoka Y., Kim H., Seo K., Khan A.A., Roh T.Y., Moon D.W., Lee Y., Lee S.J. SREBP and MDT-15 protect *C. elegans* from glucose-induced accelerated aging by preventing accumulation of saturated fat // Genes Dev. – 2015. – V. 29. – P. 2490–2503.

136. Lee J., Kwon G., Lim Y.H. Elucidating the Mechanism of *Weissella*-dependent Lifespan Extension in *Caenorhabditis elegans* // Sci. Rep. – 2015. – V. 5. – P. 17128
137. Lee C.T., Murphy C., Kenyon C. Glucose shortens the life span of *C. elegans* by downregulating DAF-16/FOXO activity and aquaporin gene expression // Cell Metab. – 2009. – V. 10. – P. 379–386.
138. Libert S., Guarente L. Metabolic and neuropsychiatric effects of calorie restriction and sirtuins // Annu. Rev. Physiol. – 2013. – V. 75. – P. 669–684.
139. Lievin-Le Moal V., Servin A.L. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota // Clin. Microbiol. Rev. – 2006. – V. 19. – P. 315–337.
140. Link C.D. Expression of human beta-amyloid peptide in transgenic *Caenorhabditis elegans* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1995. – V. 92 – P. 9368–9372.
141. Link C.D. *C. elegans* models of age-associated neurodegenerative diseases: lessons from transgenic worm models of Alzheimer's disease // Exp. Gerontol. – 2006. – V. 41 – P. 1007–1013.
142. Lithgow G.J., Walker G.A. Stress resistance as a determinate of *C. elegans* lifespan // Mech. Ageing Dev. – 2002. – V. 123. – P. 765–771.
143. Liu H., Wang X., Wang H.D., Wu J., Ren J., Meng L., Wu Q., Dong H., Kao T.Y., Ge Q., Wu Z.X., Yuh C.H., Shan G. *Escherichia coli* noncoding RNAs can affect gene expression and physiology of *Caenorhabditis elegans* // Nat. Commun. – 2012. – V. 3. – P. 1073.
144. Longo V.D., Finch C.E. Evolutionary medicine: from dwarf model systems to healthy centenarians? // Science. – 2003. – V. 299 – P. 1342–1346.
145. Mair W., Dillin A. Aging and survival: the genetics of life span extension by dietary restriction // Annu. Rev. Biochem. – 2008. – V. 77. – P. 727–754.
146. Maniatis T., Fritsch E.F. and Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1982. – 2230 p.
147. MacMicking J., Xie Q.W., Nathan C. Nitric oxide and macrophage function // Annu. Rev. Immunol. – 1997. – V. 15. – P. 323–350.
148. MacNeil L.T., Watson E., Arda H.E., Zhu L.J., Walhout A.J.M. Diet-induced developmental acceleration independent of TOR and insulin in *C. elegans* // Cell. – 2013. – V. 153. – P. 240–252.

149. Mair W. et al. Lifespan extension induced by AMPK and calcineurin is mediated by CRTC-1 and CREB // *Nature*. – 2011. – V. 470. – P. 404-408.
150. Martinez B.A., Kim H., Ray A., Caldwell G.A., Caldwell K.A. A bacterial metabolite induces glutathione-tractable proteostatic damage, proteasomal disturbances, and PINK1-dependent autophagy in *C. elegans* // *Cell Death. Dis.* – 2015. – V. 6 – P. 1908.
151. Matsiukevich D., Piraino G., Klingbeil L. R., Hake P. W., Wolfe V., O'Connor M., Zingarelli B. The AMPK Activator Aicar Ameliorates Age-Dependent Myocardial Injury in Murine Hemorrhagic Shock // *Shock (Augusta, Ga.)*. – 2017. – V. 47. – P. 70–78.
152. McBride A., Ghilagaber S., Nikolaev A., Hardie D.G. The glycogen-binding domain on the AMPK beta subunit allows the kinase to act as a glycogen sensor // *Cell metabolism*. – 2009. – V. 9. – P. 23-34.
153. McColl G., Rogers A.N., Alavez S., Hubbard A.E., Melov S., Link C.D., Bush A.I., Kapahi P., Lithgow G.J. Insulin-like signaling determines survival during stress via posttranscriptional mechanisms in *C. elegans* // *Cell Metab.* – 2010. – V. 12(3). – P. 260-272.
154. McGee M.D., Weber D., Day N., Vitelli C., Crippen D., Herndon L.A., Hall D.H., Melov S. Loss of intestinal nuclei and intestinal integrity in aging *C. elegans* // *Aging Cell*. – 2011. – V. 10. – P. 699–710.
155. Mihaylova M.M., Shaw R.J. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism // *Nature cell biology*. – V. 13. – P. 1016-1023.
156. Miller J.H. *Experiments in Molecular Genetics* – Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Lab., 1972. – 466 p.
157. Miller D.L., Roth M.B. Hydrogen sulfide increases thermotolerance and lifespan in *Caenorhabditis elegans* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2007. – V. 104(51). – P. 20618–20622.
158. Mize C.E., Langdon R.G. Hepatic glutathione reductase. I. Purification and general kinetic properties // *The Journal of biological chemistry*. – 1962. – V. 237. – P. 1589-1595.
159. Mlekusch W., Lamprecht M., Ottl K., Tillian M., Reibnegger G. A glucose-rich diet shortens longevity of mice // *Mechanisms of ageing and development*. – 1996. – V. 92. – P. 43-51.
160. Moncada S., Higgs E.A. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance // *Eur. J. Clin. Invest.* – 1991. – V. 21. – P. 361-374.

161. Montalvo-Katz S., Huang H., Appel M.D., Berg M., Shapira M. Association with soil bacteria enhances p38-dependent infection resistance in *Caenorhabditis elegans* // Infect. Immun. – 2013. – V. 81. – P. 514–520.
162. Mori I. Genetics of chemotaxis and thermotaxis in the nematode *Caenorhabditis elegans* // Annu. Rev. Genet. – 1999. – V. 33. – P. 399-422.
163. Morimoto R.I. Proteotoxic stress andinducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging // Genes Dev. – 2008. – V. 22. – P.1427-1438.
164. Morley J.F., Morimoto R.I. Regulation of longevity in *Caenorhabditis elegans* by heat shock factor and molecular chaperones // Mol. Biol. Cell. – 2004. – V. 15. – P. 657-664.
165. Mukhopadhyay A., Oh S.W., Tissenbaum H.A. Worming pathways to and from DAF-16/FOXO // Exp. Gerontol. – 2006. – V. 41. – P. 928-934
166. Murphy C.T., McCarroll S.A., Bargmann C.I., Fraser A., Kamath R.S., Ahringer J., Li H., and Kenyon, C. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans* // Nature. – 2003. – V. 424. – P. 277-283.
167. Nakagawa H., Miyazaki T. Beneficial effects of antioxidative lactic acid bacteria // AIMS Microbiol. – 2017. – V. 3. – P. 1–7.
168. Nakagawa H., Shiozaki T., Kobatake E., Hosoya T., Moriya T., Sakai F., Taru H., Miyazaki T. Effects and mechanisms of pro- longevity induced by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 in *Caenorhabditis elegans* // Aging Cell. – 2016. – V. 15. – P. 227–236.
169. Narbonne P., Roy R. Inhibition of germline proliferation during *C. elegans* dauer development requires PTEN, LKB1 and AMPK signalling // Development. – 2006. – V. 133. – P. 611-619.
170. Neuhaus K., Lamparter M.C., Zolch B., Landstorfer R., Simon S., Spanier B., Ehrmann M.A., Vogel R.F. Probiotic *Enterococcus faecalis* Symbioflor® down regulates virulence genes of EHEC in vitro and decrease pathogenicity in a *Caenorhabditis elegans* model // Arch. Microbiol. – 2017. – V. 199. –P. 203–213.
171. Neve I.A., Sowa J.N., Lin C.J., Sivaramakrishnan P., Herman C., Ye Y., Han L., Wang M.C. Escherichia coli Metabolite Profiling Leads to the Development of an RNA Interference Strain for *Caenorhabditis elegans* // G3: Genes|Genomes|Genetics. – 2019. – V. 10. – P. 189-198.
172. Nisoli E., Tonello C., Cardile A., Cozzi V., Bracale R., Tedesco L., Falcone S., Valerio A., Cantoni O., Clementi E., et al. Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS // Science. – 2005. – V. 310. – P. 314-317.

173. Nomura T. et al. Fat accumulation in *Caenorhabditis elegans* is mediated by SREBP homolog SBP-1 // Genes & nutrition. – 2010. – V. 5. – P. 17-27.
174. Ogg S. et al. The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans* // Nature. –1997. – V. 389. – P. 994-999.
175. Onken B., Driscoll M. Metformin induces a dietary restriction-like state and the oxidative stress response to extend *C. elegans* Healthspan via AMPK, LKB1, and SKN-1 // PLoS ONE. – 2010. – V. 24. – P. 753–770.
176. Pan D.A., Hardie D.G. A homologue of AMP-activated protein kinase in *Drosophila melanogaster* is sensitive to AMP and is activated by ATP depletion // Biochem. J. – 2002. – V. 367 – P. 179–186.
177. Pang S. et al. SKN-1 and Nrf2 couples proline catabolism with lipid metabolism during nutrient deprivation // Nature communications. – 2014. – V. 5. – P. 5048.
178. Pirkmajer S. et al. Methotrexate promotes glucose uptake and lipid oxidation in skeletal muscle via AMPK activation // Diabetes. – 2015. – V. 64. – P. 360-369.
179. Podshivalova K., Kerr R.A., Kenyon C. How a mutation that slows aging can also disproportionately extend end-of-life decrepitude // Cell Rep. – 2017. – V. 19. – P. 441-450.
180. Popova A.A., Koksharova O.A., Lipasova V.A., Zaitseva J.V., Katkova-Zhukotskaya O.A., Eremina S.I., Mironov A.S., Chernin L.S., Khmel I.A. Inhibitory and toxic effects of volatiles emitted by strains of *Pseudomonas* and *Serratia* on growth and survival of selected microorganisms, *Caenorhabditis elegans*, and *Drosophila melanogaster* // Biomed Res Int. – 2014. – V. 2014. – P. 125704.
181. Portal-Celhay C., Bradley E.R., Blaser M.J. Control of intestinal bacterial proliferation in regulation of lifespan in *Caenorhabditis elegans* // BMC Microbiol. 2012. V. 12. P. 49.
182. Portal-Celhay C., Blaser M.J. Competition and resilience between founder and introduced bacteria in the *Caenorhabditis elegans* gut // Infect. Immun. – 2012. – V. 80. – P. 1288–1299.
183. Portal-Celhay C., Nehrke K., and Blaser M.J. Effect of *Caenorhabditis elegans* age and genotype on horizontal gene transfer in intestinal bacteria // FASEB J. – 2013. – V. 27. – P. 760–768.
184. Powell J.R. and Ausubel F.M. Models of *Caenorhabditis elegans* infection by bacterial and fungal pathogens // In: Methods in Molecular Biology. – 2008. – V. 415. – P. 403–427.
185. Pryor et al. Host-Microbe-Drug-Nutrient Screen Identifies // Cell. – 2019. – V. 178. – P. 1299–1312.

186. Pulak R. Techniques for Analysis, Sorting, and Dispensing of *C. elegans* on the COPAS™ Flow-Sorting System // Methods in molecular biology. – 2006. – V. 351. – P. 275-86.
187. Reinke S.N., Hu X., Sykes B.D., Lemire B.D. *Caenorhabditis elegans* diet significantly affects metabolic profile, mitochondrial DNA levels, lifespan and brood size // Mol. Genet. Metabol. – 2010. – V. 100. – P. 274-282.
188. Rera M., Azizi M.J., Walker D.W. Organ-specific mediation of lifespan extension: more than a gut feeling? // Ageing Res. Rev. – 2013. – V. 12. – P. 436–444.
189. Riedinger C. et al. High-glucose toxicity is mediated by АИКАР-transformylase/IMP cyclohydrolase and mitigated by AMP-activated protein kinase in *Caenorhabditis elegans* // J. Biol. Chem. – 2018. – V. 293. – P. 4845-4859.
190. Rohde C., Zeng F., Gonzalez-Rubio R., Angel M., Yanik M. Microfluidic system for on-chip high-throughput whole-animal sorting and screening at subcellular resolution // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2007. – V. 104. – P. 13891-13895.
191. Ristow M., Schmeisser K. Mitohormesis: promoting health and lifespan by increased level of reactive gene species (ROS) // Dose-Response. – 2014. – V. 12. – P. 288–341.
192. Ristow M., Zarse K. How increased oxidative stress promotes longevity and metabolic health: the concept of mitochondrial hormesis (mitohormesis) // Exp. Gerontol. – 2010. – V. 45. – P. 410–418.
193. Ruff J.S. et al. Human-relevant levels of added sugar consumption increase female mortality and lower male fitness in mice // Nature communications. – 2013. – V. 4. – P. 2245.
194. Saiki R., Lunceford A.L., Bixler T., Dang P., Lee W., Furukawa S., Larsen P.L., Clarke C.F. Altered bacterial metabolism, not coenzyme Q content, is responsible for the lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* fed an *Escherichia coli* diet lacking coenzyme Q // Aging Cell. – 2008. – V. 7. – P. 291–304.
195. Saito H., Miura K.I. Preparation of Transforming Deoxyribonucleic Acid by Phenol Treatment // Biochimica et biophysica acta. – 1963. – V. 72. – P. 619-629.
196. Sambrook J., Fritsch E.R., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.). – Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. – 426 p.

197. Samuel B.S., Rowedder H., Braendle C., Felix M.A., Ruvkun G. *Caenorhabditis elegans* responses to bacteria from its natural habitats // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2016. – V. 113. – P. 3941–3949.
198. Samuelson A.V., Carr C.E., Ruvkun G. Gene activities that mediate increased lifespan of *C. elegans* insulin-like signaling mutants // Genes Dev. – 2007. – V. 21. – P. 2976-2994.
199. Sahoo S., Meijles D.N., Pagano, P.J. NADPH oxidases: key modulators in aging and age-related cardiovascular diseases? // Clinical science. – 2016. V. 130(5). – P. 317-35.
200. Schmeisser S., Schmeisser K., Weimer S. et al. Mitochondrial hormesis links low-dose arsenite exposure to lifespan extension // Aging Cell. – 2013. – V. 12. – P.508–517.
201. Schlotterer A. et al. *C. elegans* as model for the study of high glucose- mediated life span reduction // Diabetes. – 2009. – V. 58. – P. 2450-2456.
202. Scudellari M. The science myths that will not die // Nature. – 2015. – V. 528. – P. 322-325.
203. Schulenburg H., Kurz C.L., Ewbank J.J. Evolution of the innate immune system: the worm perspective // Immunol Rev. – 2004. – V. 198. – P. 36-58.
204. Schulz T.J., Zarse K., Voigt A., Urban N., Birringer M., Ristow M. Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress // Cell Metab. – 2007. – V. 6. – P. 280–293.
205. Sedensky M.M., Morgan P.G. Mitochondrial respiration and reactive oxygen species in *C. elegans* // Exp. Gerontol. – 2006. – V. 41. – P. 957–967.
206. Seo Y., Kingsley S., Walker G., Mondoux M.A., Tissenbaum H.A. Metabolic shift from glycogen to trehalose promotes lifespan and healthspan in *Caenorhabditis elegans* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2018. – V. 115. – P. 2791–2800.
207. Shatalin K., Gusarov I., Avetisova E., Shatalina Y., McQuade L.E., Lippard S.J., Nudler E. *Bacillus anthracis*-derived nitric oxide is essential for pathogen virulence and survival in macrophages // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2008. – V. 105. – P. 1009-1013.
208. Shatalin K.Y., Neyfakh A.A. Efficient gene inactivation in *Bacillus anthracis* // FEMS Microbiol. Lett. – 2005. – V. 15. – P. 315-319.
209. Shin M., Lee J., Han J., Lee B., Jeong J., Park S., Kim J., Jang S., Park M., Kim S., Kim S., Yang Y.R., Kim J., Hoe K., Park C., Lee K., Kwon K., Kwon E. Bacteria-derived metabolite, methylglyoxal, modulates the longevity of *C. elegans* through TORC2/SGK-1/DAF-16 signaling // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2020. – V. 117. – P. 17142-17150.

210. Shore D.E., Ruvkun G. A cytoprotective perspective on longevity regulation // Trends Cell Biol. –2013. – V. 23. – P. 409–420.
211. Simonetta S.H., Golombek D.A. An automated tracking system for *Caenorhabditis elegans* locomotor behavior and circadian studies application // J. Neurosci. Methods. – 2007. – V. 161. – P. 273-280.
212. Smolentseva O., Gusarov I., Gautier L., Shamovsky I., DeFrancesco A.S., Losick R., Nudler E. Mechanism of biofilm-mediated stress resistance and lifespan extension in *C. elegans* // Sci. Rep. – 2017. – V. 7. – P. 7137.
213. Sonneborn J.S., Rutten M. Acute therapeutic use of 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside extends survival interval in response to severe hemorrhagic shock // Shock. – 2011. – V. 36. – P. 191-195.
214. Sorathia N., Rajadhyaksha M.S. *Caenorhabditis elegans*: a model for studying human pathogen biology // Recent Pat. Biotechnol. – 2016. – V. 10. – P. 217–225.
215. Spizizen J. Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1958. – V. 44(10). – P. 1072-1078.
216. Steinberg G.R., Kemp B.E. AMPK in Health and Disease // Physiological reviews. – 2009. – V. 89. – P. 1025-1078.
217. Stiernagle T. Maintenance of *C. elegans* // WormBook : the online review of *C. elegans* biology. – 2006. –WormBook 11:1-11.
218. Stragier P., Bonamy C., Karmazyn-Campelli C. Processing of a sporulation sigma factor in *Bacillus subtilis*: how morphological structure could control gene expression // Cell. – 1988. – V. 52. – P. 697-704.
219. Sulston J.E., Horvitz H.R. Post-Embryonic Cell Lineages of the Nematode, *Caenorhabditis elegans* // Developmental Biology. – 1977. – V. 56. – P. 110-156.
220. Tapia P.C. Sublethal mitochondrial stress with an attendant stoichiometric augmentation of reactive oxygen species may precipitate many of the beneficial alterations in cellular physiology produced by caloric restriction, intermittent fasting, exercise and dietary phytonutrients: «Mitohormesis» for health and vitality // Med. Hypotheses. – 2006. – V. 66. – P. 832–843.
221. Templeman N.M., Murphy C.T. Regulation of reproduction and longevity by nutrient-sensing pathways // J. Cell Biol. – 2018. – V. 217 (1). – P. 93–106.

222. Thomas D.D., Ridnour L.A., Isenberg J.S., Flores-Santana W., Switzer C.H., Donzelli S., Hussain P., Vecoli C., Paolocci N., Ambs S., Colton C.A., Harris C.C., Roberts D.D., Wink D.A. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling // *Free Radic Biol Med.* – 2008 – V. 45(1). – P. 18-31.
223. Tissenbaum H.A. Using *C. elegans* for aging research // *Invertebr. Reprod. Dev.* – 2015. – V. 59. – P. 59-63.
224. Tissenbaum H.A., Guarente L. Increased dosage of a *sir-2* gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans* // *Nature.* – 2001. – V. 410. – P. 227–230.
225. Van Heemst D. Insulin, IGF-1 and longevity // *Aging Dis.* – 2010. – V. 1, N 2. – P. 147-57.
226. Van Raamsdonk J. M., Hekimi S. Superoxide dismutase is dispensable for normal animal lifespan // *Proc. Natl Acad. Sci. (USA).* – 2012. – V.109. – P. 5785–5790.
227. Venn B.J., Green T.J. Glycemic index and glycemic load: measurement issues and their effect on diet-disease relationships // *Eur. J. Clin. Nutr.* – 2007. – V. 61(Suppl. 1). – P. 122-131.
228. Vijg J. Aging of the genome. The dual role of DNA in life and death // Oxford: Oxford Univ. Press, 2007. – 384 p.
229. Vijg J., Campisi J. Puzzles, promises and a cure for ageing // *Nature.* – 2008. – V. 454. – P. 1065-1071.
230. Virk B., Correia G., Dixon D.P., Feyst I., Jia J., Oberleitner N., Briggs Z., Hodge E., Edwards R., Ward J., Gems D., Weinkove D. Excessive folate synthesis limits lifespan in the *C. elegans* *E. coli* aging model // *BMC Biol.* – 2012. – V. 10. – P. 67.
231. Walker G.A., Lithgow G.J. Lifespan extension in *C. elegans* by a molecular chaperone dependent upon insulin-like signals // *Aging Cell.* – 2003. – V. 2. – P. 131-139.
232. Wang C., Wang J., Gong J., Yu H., Pacan J.C., Niu Z., Si W., Sabour P.M. Use of *Caenorhabditis elegans* for preselecting *Lactobacillus* isolates to control *Salmonella typhimurium* // *J. Food Prot.* – 2011. – V. 74. P. – 86–93.
233. Watson E., MacNeil L.T., Arda H.E., Zhu L.J., Walhout A.J.M. Integration of metabolic and gene regulatory networks modulates the *C. elegans* dietary response // *Cell.* – 2013. – V. 153. – P. 253–266.
234. Watson E., MacNeil L.T., Ritter A.D., Yilmaz L.S., Rosebrock A.P., Caudy A.A., Walhout A.J.M. Interspecies systems biology uncovers metabolites affecting *C. elegans* gene expression and life history traits // *Cell.* – 2014. – V. 156. – P. 759–770.

235. Watson E., Olin-Sandoval V., Hoy M.J., Li C.-H., Louisse T., Yao V., Mori A., Holdorf A.D., Troyanskaya O.G., Ralser M. et al. Metabolic network rewiring of propionate flux compensates vitamin B12 deficiency in *C. elegans* // *Elife*. – 2016. – V. 5. – P. 17670.
236. Wilkinson D.S., Taylor R.C., Dillin A. Analysis of aging in *Caenorhabditis elegans* // *Methods Cell Biol.* – 2012. – V. 107. – P. 353-381.
237. Willcox B.J., Donlon T.A., He Q., Chen R., Grove J.S., Yano K., Masaki K. H., Willcox D.C., Rodriguez B., Curb J.D. FOXO3A genotype is strongly associated with human longevity // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2008. – T. 105, N 37. – C. 13987-92.
238. Yang W., Hekimi S. A mitochondrial superoxide signal triggers increased longevity in *Caenorhabditis elegans* // *PLoS Biol.* – 2010. – V.8. – P. e1000556.
239. Yilmaz S., Walhout A.J.M. Worms, bacteria, and micronutrients: an elegant model of our diet // *Trends in Genetics*. – 2014. – V. 30. – P. 496–503.
240. Yook K., Harris T.W., Bieri T., Cabunoc A., Chan J., Chen W.J., Davis P., de la Cruz N., Duong A., Fang R. *et al.* WormBase 2012: more genomes, more data, new website // *Nucleic Acids Res.* – 2012. – V. 40 (Database issue). – D735–D741.
241. Yoshikawa H., Sueoka N. Sequential replication of *Bacillus subtilis* chromosome I. Comparison of markers frequencies in exponential and stationary growth phases // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. – 1963. – V. 49. – P. 559-566.
242. Youngman M.J., Rogers Z.N., Kim D.H. A decline in p38 MAPK signaling underlies immunosenescence in *Caenorhabditis elegans* // *PLOS Genetics*. – 2011. – V. 7. – P. 1002082.
243. Yu L., Yan X., Ye C., Zhao H., Chen X., Hu F. Li H. Bacterial Respiration and Growth Rates Affect the Feeding Preferences, Brood Size and Lifespan of *Caenorhabditis elegans* // *PLoS ONE*. – 2015. – V. 10. – P. 0134401.
244. Yun H.S., Heo J.H., Son S.J., Park M.R., Oh S., Song M.H., Kim J.N., Go G.W., Cho H.S., Choi N.J. et al. *Bacillus licheniformis* isolated from Korean traditional food sources enhances the resistance of *Caenorhabditis elegans* to infection by *Staphylococcus aureus* // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2014. – V. 24. – P. 1105-1108.
245. Zečić A. Braeckman B.P. DAF-16/FoxO in *Caenorhabditis elegans* and Its Role in Metabolic Remodeling // *Cells*. – 2020. – V. 9. – P. 109.

246. Zhao L., Zhao Y., Liu R., Zheng X., Zhang M., Guo H., Zhang H., Ren F. The transcription factor DAF-16 is essential for increased longevity in *C. elegans* exposed to *Bifidobacterium longum* BB68 // Sci. Rep. – 2017. – V. 7. – P. 7408.
247. Zhao Y., Yu X., Jia R., Yang R., Rui Q., Wang D. Lactic acid bacteria protects *Caenorhabditis elegans* from toxicity of graphene oxide by maintaining normal intestinal permeability under different genetic backgrounds // Sci. Rep. – 2015. – V. 5. – P. 17233.
248. Zhang J., Holdorf A.D., Walhout A.J. *C. elegans* and its bacterial diet as a model for systems-level understanding of host-microbiota interactions // Curr. Opin. Biotechnol. – 2017. – V. 46. – P. 74–80.
249. Zhang Y., Mair W.B. Dietary Restriction in *C. elegans* // In: Olsen A., Gill M. (eds) Ageing: Lessons from *C. elegans*. Healthy Ageing and Longevity. – 2017. – Springer, Cham. – P. 355–391.
250. Zhou G., Myers R., Li Y. et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. // J. Clin. Invest. – 2001. – V. 108. – P. 1167–1174.
251. Zhou G., Sebhat I.K., Zhang B.B. AMPK activators-potential therapeutics for metabolic and other diseases // Acta physiologica. – 2009. – 196. V. – 175-190.
252. WormAtlas [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.wormatlas.org.
253. WormBase [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.wormbase.org.
254. WormBook [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.wormbook.org.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубочайшую благодарность своему научному руководителю д.б.н., профессору Миронову Александру Сергеевичу за внимательное и чуткое руководство, терпение, неоценимый вклад в формирование научного мышления и всестороннюю помощь в работе над диссертацией. Автор от всего сердца благодарит д.б.н., профессора Шакулова Рустэма Саидовича за поддержку, помощь, ценные советы и комментарии при обсуждении результатов диссертации. Автор искренне признателен профессору Нудлеру Евгению Александровичу за внимание к работе, консультации и помощь.

За искреннюю поддержку, разноплановую помощь, комфортную и дружескую атмосферу автор благодарит сотрудников лаборатории. Особые слова благодарности к.б.н. Ереминой Светлане Юрьевне за важные навыки и знания, колоссальную поддержку, понимание, неоценимую помощь на всех этапах работы и за доброе отношение. Автор выражает искреннюю благодарность всем коллегам, в сотрудничестве с которыми была выполнена данная работа.

За терпение, понимание и моральную поддержку автор от души благодарит свою семью и друзей.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Приложение 1

Таблица П-1 – Эффекты воздействия различных бактериальных штаммов на жизнедеятельность нематод *C. elegans* [Clark, Hodgkin, 2014; Walhout, 2017; Khan et al., 2018; Zhang, Holdorf, Ezcurra, 2018].

Бактерии	Физиологические эффекты/способ действия/пути-мишени	Примечания	Публикации
<i>E. coli</i> OP50	Большие липидные капли, повышенное содержание триацилглицеринов относительно <i>E. coli</i> HB101.	Стандартный источник пищи для нематод в лабораторных условиях. Ауксотроф по урацилу.	[Brenner, 1974; Brooks et al., 2009.]
<i>E. coli</i> OP50	Пролиферирующие в кишечнике бактерии как причина смерти нематод (микробный дисбактериоз). Блокирование пролиферации увеличивает продолжительность жизни.	Бактерии, обработанные УФ.	[Gems, Riddle, 2000]
<i>E. coli</i> OP50	Пролиферирующие в кишечнике бактерии как причина смерти нематод (микробный дисбактериоз). Блокирование пролиферации увеличивает продолжительность жизни.	Бактерии, обработанные антибиотиками.	[Garigan et al., 2002]
<i>E. coli</i> OP50 <i>Salmonella</i>	Бактериальная колонизация кишечника. Затронуты пути DAF-16, DBL-1.		[Portal-Celhay, Bradley, Blaser, 2012]
<i>E. coli</i> OP50	Бактериальная колонизация кишечника.		[Podshivalova et al., 2017]
<i>E. coli</i> OP50	Затронут путь p38 MAPK,		[Youngman et

	врожденный иммунитет.		al., 2011]
<i>E. coli</i> OP50 <i>cyoA</i>	Замедленный рост.		[Govindan et al., 2015]
<i>E. coli</i> MG1655 <i>cyoA::kan</i> <i>E. coli</i> MG1655 <i>cydA::kan</i> <i>E. coli</i> MG1655 <i>cyoA::kan</i> <i>cydA::kan</i>	Увеличение продолжительности жизни нематод как результат умеренного окислительного стресса.	Повышенная генерация АФК мутантными бактериями с нарушенной активностью терминальных оксидаз.	[Каткова-Жукоцкая и др., 2019]
<i>E. coli</i> DA837	Большие липидные капли, повышенное содержание триацилглицеринов (относительно <i>E. coli</i> HB101).	Производные <i>E. coli</i> OP50. Стрептомицин-устойчив.	[Brooks et al., 2009]
<i>E. coli</i> HB101	Быстрое развитие. Меньшие липидные капли, уменьшенное содержание триацилглицеринов относительно <i>E. coli</i> OP50 или DA837.	<i>E. coli</i> K12/ <i>E. coli</i> гибрид. Лабораторный источник пищи для выращивания <i>C. elegans</i> в жидкой культуре.	[MacNeil et al., 2013; Brooks et al., 2009]
<i>E. coli</i> HT115	Измененный метаболический профиль, увеличенная способность воспринимать больше сигнальных аминокислот и увеличенная продолжительность жизни по сравнению с нематодами, питавшимися <i>E. coli</i> OP50.	Производные <i>E. coli</i> K12. РНК-интерференция.	[Reinke et al., 2010]
<i>E. coli aroD</i>	Увеличение продолжительности жизни по сравнению с нематодами, питавшимися <i>E. coli</i> HT115.	Производные <i>E. coli</i> HT115. Мутация в <i>aroD</i> . Изменения в фолиевом цикле бактерий.	[Virk et al., 2012]
<i>E. coli</i> GD1	Дозозависимое увеличение	Производные	[Gomez et al.,

	продолжительности жизни относительно <i>E. coli</i> OP50.	<i>E. coli</i> HW272. Введение транспозонов в <i>ubiG</i> . Коэнзим Q10.	[2012]
<i>E. coli</i> NM6003	Некодирующие РНК <i>E. coli</i> влияют на экспрессию генов и физиологию <i>C. elegans</i> .		[Liu et al., 2012]
<i>E. coli</i> BW25113	Изменение митохондриальной динамики, подавление накопления β -амилоида.	Производство колановой кислоты бактериями.	[Han et al., 2017]
<i>B. subtilis</i> <i>B. subtilis</i> Δ nos	Оксид азота, продуцируемый <i>B. subtilis</i> , способствует увеличению продолжительности жизни и стрессоустойчивости у <i>C. elegans</i> . Затронуты пути DAF-16, HSF-1.		[Gusarov et al., 2013]
<i>B. subtilis</i>	Бактериальная кишечная колонизация, стрессоустойчивость. Затронут путь DAF-16.	Спорообразующие формы. Формирование биопленки бактериями.	[Donato et al., 2017]
<i>B. subtilis</i>	Стрессоустойчивость. Затронут путь MTL-1 (регулируется DAF-16).	Формирование биопленки бактериями.	[Smolentseva et al., 2017]
<i>B. subtilis</i> GS67	Защита <i>C. elegans</i> от грамположительного патогена за счет опосредованного фенгицином микробного антагонизма.		[Iatsenko et al., 2014]
<i>B. licheniformis</i>	Защита <i>C. elegans</i> от инфекции, вызванной <i>Staphylococcus aureus</i> .		[Yun et al., 2014]
<i>B. mycoides</i> <i>B. soli</i>	Увеличение продолжительности жизни <i>C. elegans</i> путем активации		[Abada et al., 2009]

	процесса аутофагии.		
<i>B. megaterium</i>	Увеличение продолжительности жизни нематод путем повышения активности защитных генов.		[Coolon et al., 2009]
<i>B. megaterium</i>	Увеличение устойчивости <i>C. elegans</i> к патогенам; штамм приводит к повышенной устойчивости как вторичному следствию нарушенного процесса размножения.		[Montalvo-Katz et al., 2013]
<i>Pseudomonas mendocina</i>	Защита нематод путем повышения их устойчивости к патогенам через р38-зависимую инфекционную устойчивость.		[Montalvo-Katz et al., 2013]
<i>Pseudomonas</i> MYb11	Противогрибковый эффект.		[Dirksen et al., 2016]
<i>Enterococcus faecalis</i>	Колонизация кишечника и защита <i>C. elegans</i> от заражения <i>Staphylococcus aureus</i> путем производства антимикробного супероксида.		[King et al., 2016]
<i>Enterococcus faecalis</i> Symbioflor <i>Escherichia coli</i> O157: H7	Подавление активности генов микроорганизмов, патогенных для <i>C. elegans</i> .		[Neuhaus et al., 2017]
<i>Comamonas aquatica</i>	Ускоренный рост.	Витамин B12.	[Watson et al., 2016; MacNeil et al., 2013; Watson, MacNeil et al., 2013; Watson,

			MacNeil, Ritter et al., 2014]
Lactic acid bacteria	Защита <i>C. elegans</i> от токсичности оксида графена путем поддержания нормальной кишечной проницаемости.		[Zhao et al., 2015]
<i>Lactobacillus</i> и <i>Bifidobacterium</i>	Увеличение продолжительности жизни нематод через путь MAPK p38, усиление механизмов защиты организма и повышение устойчивости к патогенным бактериям.		[Ikeda et al., 2007; Komura et al., 2013]
<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp. защищает и повышает устойчивость <i>C. elegans</i> к <i>Salmonella</i> и <i>Yersinia</i> .		[Lee, Choe et al., 2015]
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> R4	Увеличение продолжительности жизни нематод путем антиоксидантной и антимикробной активности молочнокислых бактерий.		[Azat et al., 2016.]
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CNCM I-3690	Увеличение продолжительности жизни нематод и экспрессия DAF-16/инсулиноподобного пути.		[Grompone et al., 2012]
<i>Lactobacillus</i> LG 2055	Подвижность, стрессоустойчивость, митохондриальная функция. Затронут путь SKN-1 p38 MAPK		[Nakagawa et al., 2016]
<i>Lactobacillus</i>	Защитный эффект связан с		[Kim,

<i>acidophilus</i>	сигнальными путями p38 МАРК и β -катенин.		[Mylonakis, 2012]
<i>Bifidobacteria</i>	Компонент клеточной стенки <i>Bidobacteria</i> увеличивает продолжительность жизни <i>C. elegans</i> посредством активации гена <i>skn-1</i> , который регулируется путем p38 МАРК.		[Komura et al., 2013]
<i>Bifidobacterium longum</i> BB60	Затронут путь DAF-16.	Компонент клеточной стенки бактерий.	[Zhao et al., 2017]
<i>Bifidobacterium infantis</i>	Механизм, вероятно, обусловлен активацией защитных путей организма- хозяина, а не продукцией бактериальных метаболитов или колонизацией кишечника.		[Komura et al., 2010]