

ВОЗРАСТНЫЕ КОЛЕБАНИЯ СМЕРТНОСТИ У МЫШЕЙ С МУТАЦИЕЙ ЗАДЕРЖКИ РОСТА*

© 2013 г. А.Г. Малыгин

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН,
119071 Москва, Ленинский проспект, 33, корп. 2;
электронная почта: agmalygin@mail.ru

Поступила в редакцию 17.05.13

Изучена продолжительность жизни мышей в ряде последовательных поколений потомков самца с мутацией задержки роста. Мутантных и нормально развивавшихся (нормальных) мышей получали скрещиванием самцов-мутантов с нормальными самками из тех же пометов. Мутантные самки были бесплодны. Показано, что у мутантных и нормальных мышей наблюдаются возрастные колебания смертности. При этом кривая зависимости продолжительности жизни мышей от их порядкового номера в ряду увеличения продолжительности жизни (ранговая кривая смертности) имеет явно выраженный ступенчатый вид для мышей-мутантов и менее выраженный – для их нормальных сородичей. Ступенчатый вид кривой указывает на то, что в процессе развития мышей стадии низкой смертности поочередно сменяются стадиями повышенной смертности. Первая стадия устойчивого развития мутантных самцов и самок сменяется через месяц после рождения стадией аномально высокой смертности, совпадающей с периодом их максимального отставания в весе от нормальных сородичей. При этом выжившие мутанты в течение двух месяцев догоняют в весе нормальных сородичей и внешне становятся неотличимыми от них. Ступени закономерно воспроизводятся на ранговых кривых смертности у мутантов и нормальных мышей, как в разнополюх группах мышей, так и в параллельных однополюх группах. Обнаруженное явление интерпретировано в рамках гипотезы о реализации у мышей генетической программы старения, которая обеспечивает периодическую смену стадий большой жизнестойкости стадиями повышенной чувствительности к внешним факторам риска, вызывающим гибель. Показано, что слабая выраженность ступеней на ранговых кривых смертности нормальных самок может быть усилена удалением из выборки рожающих особей и особей с опухолями. Результаты исследования указывают на возможность обнаружения у людей запрограммированных в онтогенезе стадий высокой и низкой чувствительности к внешним воздействиям и перспективу разработки эффективных мер предупреждения рисков преждевременной смерти.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: продолжительность жизни, мыши, задержка роста, стадии развития, интенсивность смертности, уравнение Гомперца–Мейкема.

Решению задачи продления жизни, так или иначе, подчинены все биологические и медицинские исследования. Поскольку процессы жизнедеятельности представляются очень сложными по сравнению с явлениями неживой природы, то, руководствуясь принципом «от простого к сложному», многие биологи видят ключ к продлению жизни в раскрытии тайны ее происхождения. Однако длительные поиски механизмов происхождения жизни не увенчались успехом. Если бы биологам все же удалось искусственно воссоздать живую клетку, то оставалось бы неясным, как это может ускорить поиск способов продления человеческой жизни.

Поэтому более перспективной представляется попытка подойти к решению этой задачи с противоположной стороны, а именно, посредством изучения механизмов наступления смер-

ти. Этот подход выглядит более перспективным уже потому, что, в отличие от неуловимого самозарождения жизни, явление смерти доступно для непосредственного наблюдения, а разработка эффективных способов обращения этого явления (реанимации) непосредственно приводит к цели. Стоявший у истоков танатологии (науки о смерти) знаменитый французский физиолог Клод Бернар в «Лекциях по экспериментальной патологии» [1] писал: «...чтобы знать, как живут организмы животного и человека, необходимо видеть, как множество их умирает, ибо механизмы жизни могут быть вскрыты и обнаружены лишь знанием механизмов смерти». В дополнение можно привести слова И.П. Павлова: «...какое обширное и плодотворное поле раскрылось бы для физиологического исследования, если бы немедленно после вызванной болезни или ввиду неминуемой смерти экспериментатор искал с полным знанием дела способ победить ту и другую» [2].

* Приложение к статье опубликовано на сайте «Biochemistry» (Moscow), Vol. 78, issue 9, 2013.

Однако танатология в настоящее время настолько непопулярна у биологов, что, как выяснилось из опроса, значительная их часть с этим термином даже не знакома. Между тем, в медицине существует проблема установления непосредственных причин смерти. Патологоанатомы при вскрытии в качестве причин смерти часто указывают на несовместимость состояния тех или иных тканей или органов с жизнью. Однако у людей, умерших от несчастных случаев, иногда обнаруживают такое состояние тканей и органов, которое по принятым критериям должно было бы давно привести их к смерти. Этот парадокс достаточно известен и даже специально отмечен в статье «Танатология» в Большой медицинской энциклопедии [3]. Он ставит под сомнение практикуемые методы квалификации явных изменений в организме в качестве причин смерти и стимулирует поиски других, более глубоких причин.

В геронтологии противопоставляются две точки зрения на природу старения и смерти организма. Согласно одной из них приводящие к смерти процессы заложены в программе развития организма [4]. Согласно другой — причины старения и смерти состоят в накоплении нарушений в организме, вызываемых случайными (стохастическими) воздействиями внешней среды [5]. Сторонники каждой из них приводят в свою пользу неоспоримые аргументы. Теоретическое обоснование первой позиции сводится к тому, что старение и смерть являются такими же генетически запрограммированными во времени фазами развития, как рост, половое созревание, вынашивание плода и др. В качестве примеров приводятся: запрограммированная гибель некоторых видов растений после цветения и плодоношения, бабочек однодневок после кладки яиц, лососей после нереста и т.д. Убедительным обоснованием другой позиции является зависимость старения и смерти от случайно приобретенных болезней, систематического воздействия ядовитых веществ, ионизирующего излучения и прочих неблагоприятных условий среды обитания.

Однако все аргументы в пользу одной позиции недостаточны, чтобы опровергнуть противоположную позицию. Следовательно, вопрос может быть решен только согласованием обеих позиций в рамках объединяющей их концепции.

Трудности выявления истинных причин старения и смерти связаны и с тем, что само понятие причины неоднозначно, поскольку всякая причина является следствием другой причины. В простейшем случае цепочка причинно-следственных связей линейна, однако часто она бывает разветвленной, поскольку следствие может быть результатом совпадения двух и более причин.

Поиск причинно-следственных связей обычно предполагает демонстрацию обратимости явлений после устранения их причин. Трудности в обращении явления смерти указывают на то, что попытки оживления учитывают не все приводящие к смерти причины.

Предположение о том, что смерть является следствием совпадения некоторых запрограммированных критических стадий развития организма и неблагоприятных внешних воздействий, может служить предпосылкой для успешного разрешения обозначенного выше противопоставления двух точек зрения на природу старения и смерти.

Доказательством того, что одной из причин смерти является достижение организмом запрограммированных критических стадий развития, могло бы служить обнаружение закономерных неоднородностей на статистических кривых естественной смертности в популяциях животных и человека. Однако, поскольку поиск таких неоднородностей весьма трудоемок и требует многолетних наблюдений, статистические закономерности смертности до сих пор недостаточно изучены. Например, вопрос вызывает тот факт, что статистика данных по общей смертности и смертности от конкретных болезней, таких как гипертония, грижа, опухоли и т.д., описывается одним и тем же графиком Гомперца [6, 7]. Это может означать, что либо эти болезни не являются подлинной причиной смерти, либо в основе каждой из них и общей смертности лежит одна и та же причина [8].

В настоящей работе была изучена статистика естественной гибели мышей со случайно полученной мутацией задержки роста и мышей с нормальным развитием. Обнаружение в начальном периоде развития мутантов стадии повышенной смертности стало основанием для того, чтобы критически отнестись к описанию динамики смертности в рамках общепринятой модели Гомперца—Мейкема [9]. Для выяснения возможности применения этой модели в нашем случае была прослежена продолжительность жизни мутантных и нормально развивавшихся (нормальных) мышей. С другой стороны, многочисленные данные из литературы о том, что продолжительность жизни животных-лилипутов часто превосходит продолжительность жизни их нормальных сородичей [10], побуждали выяснить, как долго будут жить мыши-мутанты, пережившие обнаруженную у них первую критическую стадию развития. Преимущество этого подхода состоит в том, что выводы о природе смерти делаются на основе изучения особенностей статистики самого неоспоримого факта смерти, а не из наблюдений за

сопутствующими смерти физиологическими процессами.

Цель настоящего исследования состоит в том, чтобы подтвердить ранее полученные результаты [11, 12] о несоответствии между экспериментальными и теоретически вычисленными по модели Гомперца–Мейкема кривыми зависимости продолжительности жизни мутантных мышей от их рангового распределения по продолжительности жизни (ранговые кривые смертности), продемонстрировать на вновь полученном материале возрастные колебания смертности мутантных мышей и их нормальных сородичей и, опираясь на полученный материал, сделать выводы относительно возможности согласования двух противопоставляемых точек зрения на природу старения и смерти посредством выработки общей концепции.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали потомков мышей, полученных от скрещивания нормальной самки гетерогенной лабораторной популяции с примесью линии Swiss Webster филиала «Андреевка» питомника ГУНЦБМТ РАМН и самца-мутанта с задержкой роста. Самец-мутант был случайно обнаружен в потомстве нормального самца той же линии, которого поили 0,01 М раствором азотнокислого серебра в течение 1,5 мес., начиная с 28-дневного возраста, и спустя месяц после окончания процедуры затравливания серебром скрестили с интактной самкой той же линии. Мышей содержали в виварии на стандартном лабораторном корме, сбалансированном по белкам, жирам и углеводам, с необходимым набором витаминов и микроэлементов.

Данные о рождении, смерти и продолжительности жизни мышей накапливали в течение пяти с небольшим лет. Они представлены в таблице в Приложении в порядке дат рождения пометов и разделены по четырем группам мышей: мутантные самцы, мутантные самки, нормальные самцы, нормальные самки. Продолжительность жизни мышей определяли по разности дат их рождения и естественной смерти. Графики строили на основании данных из таблицы. Построение и преобразование графиков осуществляли в компьютерной программе «Origin».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Общая характеристика мышей с мутацией задержки роста. Изменения в весе исходного самца мутанта и нормально развивавшихся (нор-

мальных) мышей из того же помета по мере их роста показаны на рис. 1, а. Было установлено, что мутантные самки с задержкой роста при скрещивании как с мутантными, так и с нормальными самцами либо не давали потомства, либо новорожденные умирали в течение одного–двух дней. Поэтому следующим поколениям мутация передавалась только через скрещивание мутантных самцов и нормальных самок. В пометах, полученных от скрещивания мутантных самцов и нормальных самок, количество мутантных особей колебалось в широких пределах и было представлено обоими полами (пример – рис. 1, б). Общее число мутантов в пометах составило около 30%. Это, с одной стороны, свидетельствует о нерецессивной природе мутации, а с другой – недостаточно, чтобы признать мутацию доминантной. Можно предполагать, что мутация имеет некую эпигенетическую природу.

При сравнении изменения веса мутантов и нормально развивавшихся особей было обнаружено, что мутанты отстают в росте только в первые два месяца развития. Как видно на рис. 1, максимальное различие в весе у мутантов и нормальных мышей наблюдается примерно через месяц после рождения. При этом в большинстве случаев к середине месяца вес мутантов перестает увеличиваться или даже начинает снижаться. Можно также заметить, что период торможения развития мутантов соответствует периоду быстрого увеличения веса на кривой роста нормально развивавшихся мышей, который приходится на возраст 15–30 сут.

Наиболее значимым для постановки настоящего исследования явилось то, что некоторые мутанты были не в состоянии преодолеть период задержки роста и погибали в возрасте 25–35 сут (рис. 1, б). Однозначно говорить о причинах их смерти трудно. Однако еще в пятидесятых годах прошлого века было показано (рис. 1 в Приложении), что этот возраст у нормальных мышей характеризуется максимальной чувствительностью к действию ионизирующего излучения [13]. Также было установлено, что на сходной стадии развития кроликов в сердечной мышце наблюдается максимальная скорость потребления кислорода при минимальной интенсивности гликолиза [14]. Можно предполагать, что повышенная смертность мышей на этой стадии обусловлена известным в радиобиологии эффектом усиления поражающего действия ионизирующего излучения при увеличении концентрации кислорода в тканях. То есть смерть мышей вызывается совпадением внутренней и внешней причин, а именно, генетически запрограммированными во времени изменениями метаболизма и воздействием иони-

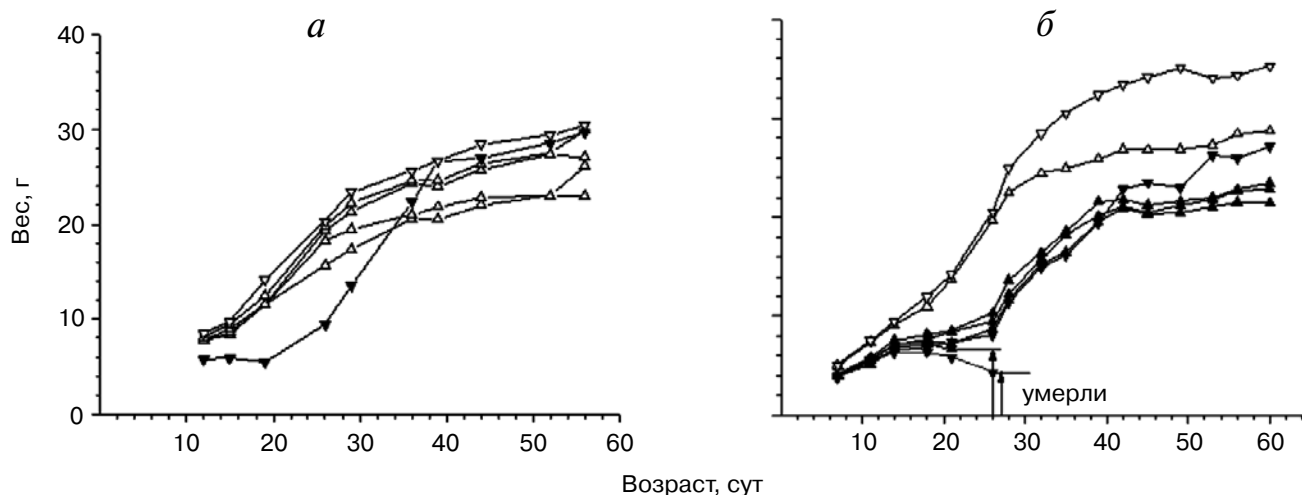


Рис. 1. Изменения веса мышей-мутантов и нормальных мышей в начальном периоде онтогенеза. Пометы: *а* – с одним нормальным самцом, с тремя нормальными самками и с одним самцом-мутантом – родоначальником всей популяции (дата рождения – 08.07.07); *б* – с одним нормальным самцом и одной нормальной самкой, с двумя самцами-мутантами, один из которых умер в возрасте 27 сут, и четырьмя самками-мутантами, одна из которых умерла в возрасте 26 сут (дата рождения – 11.02.10). Светлые треугольники с вершинами вниз – нормальные самцы, с вершинами вверх – нормальные самки. Темные треугольники с вершинами вниз – самцы-мутанты, с вершинами вверх – самки-мутанты

зирующего излучения. Можно предположить, что обнаруженная мутация задержки роста способна понизить порог чувствительности к безопасному для нормальных животных фоновому воздействию неизвестной природы, сходному по результатам с ионизирующим излучением.

Из сравнения кривых увеличения веса мышей и полученной еще в первой половине прошлого века Шмальгаузенем [15] кривой изменения веса человека следует, что участку быстрого увеличения веса на кривых мышей (15–30 сут) соответствует участок быстрого увеличения веса на кривой человека (12–19 лет). При этом максимум на начальном участке кривой логарифма интенсивности смертности человека (рис. 2 в Приложении) [7], не описываемый уравнением Гомперца–Мейкема, соответствует 20 годам, то есть практически совпадает с концом периода быстрого увеличения веса у человека. Этот факт позволяет предполагать, что области максимального риска смерти в начальном периоде жизни соответствуют сходным стадиям развития мыши и человека.

Альтернативный способ графического представления данных о смертности мышей. При изучении статистики смертности геронтологи обычно пользуются методологией, разработанной в демографии. В демографических исследованиях существуют устойчивые традиции в отношении способов представления статистического материала. Эти традиции восходят к началу 19 века, когда служащий страховой компании

Гомперц [6] для характеристики смертности населения предложил использовать функцию интенсивности смертности:

$$\mu(x) = dl_m(x)/[l(x)dx]$$

и на большом статистическом материале показал, что для людей в возрасте 35–90 лет интенсивность смертности можно описать экспоненциальной зависимостью от продолжительности жизни:

$$dl_m(x)/[l(x)dx] = R \exp(\alpha x), \quad (1)$$

где $\mu(x)$ – функция интенсивности смертности; x – продолжительность жизни; $l_m(x)$ – функция смертности – число лиц, умерших к данному возрасту; $l(x)$ – функция дожития – число лиц, доживших до данного возраста; $dl_m(x)/dx$ – производная, выражающая скорость вымирания лиц данного возраста; R, α – значения параметров, характерных для изучаемой популяции.

Функции смертности (не путать с функцией интенсивности смертности) и дожития дополняют друг друга и связаны между собой соотношением:

$$l(x) = l_0 - l_m(x), \quad (2)$$

где l_0 – суммарное число умерших и доживающих лиц.

Функция Гомперца получила широкое распространение в демографических исследованиях,

поскольку позволяла при описании смертности ограничиваться двумя параметрами, а ее логарифмирование давало прямую линию:

$$\ln \mu(x) = \alpha x + R. \quad (3)$$

Чтобы уменьшить разброс точек на экспериментальной кривой интенсивности смертности, исходные статистические данные перед дифференцированием сглаживают путем усреднения по одинаковым временным интервалам.

В отличие от людей, данные о смертности в многочисленных однородных популяциях лабораторных животных иногда не описываются прямыми в соответствии с выражением (3) по модели Гомперца [16]. Достичь совпадения с прямыми часто не удается даже при использовании процедуры сглаживания. В качестве примера можно привести экспериментальные кривые интенсивности смертности человека и дрозофил, приводимых в книге М. Лэмба (рис. 2 в Приложении) [7]. Более того, даже для людей логарифмическая форма экспериментальной кривой интенсивности смертности в интервале до 30 лет имеет волнообразный вид. Имеются достоверные данные о том, что для возрастов старше 90 лет кривая также испытывает закономерные изгибы. В частности, в книге Гаврилова Л.А. и Гавриловой Н.С. [8] приведена зависимость логарифма интенсивности смертности мужчин Швеции в интервале 85–105 лет, которая имеет изгибы в возрастах 97, 100 и максимум в возрасте 104 лет [17]. На рис. 3 в Приложении представлена сходная кривая для женщин из тринадцати стран Западной Европы и Японии в возрасте 80–122 лет [18].

Однако волнообразные колебания интенсивности смертности в поздних возрастах мало изучены и их не принято связывать со сходными колебаниями в ранних возрастах. Отклонениями статистической кривой интенсивности смертности на ее начальном и конечном участках от теоретической кривой демографы обычно пренебрегают. Такое отношение можно объяснить тем, что суммарная доля умерших (исключая смертность до одного года) на этих участках экспериментальной кривой не превышает 3% от общей смертности. В отличие от демографов, геронтологи, относящиеся к смерти как к завершению старения, должны были бы быть заинтересованы в детальном изучении изгибов на экспериментальных кривых интенсивности смертности. Однако наблюдаемые отклонения экспериментальных значений от теоретических кривых до сих пор принято относить к случайным, и они мало интересуют специалистов.

Чтобы опустить нижнюю границу применимости функции Гомперца до возраста 25 лет, Мейкем в 1860 г. [9] ввел в формулу (1) дополнительный параметр A :

$$dl_m(x)/[l(x)dx] = A + R \exp(\alpha x). \quad (4)$$

Степень соответствия данных о продолжительности жизни мышей уравнению Гомперца–Мейкема, казалось бы, можно определить при сравнении экспериментальных кривых интенсивности смертности с теоретическими прямыми, вычисленными с использованием подобранных параметров A , R и α . Однако, как следует из уравнений (1) и (4), для построения экспериментальной кривой интенсивности смертности необходимо получить производную численным дифференцированием экспериментальной кривой смертности. Дифференцирование требует предварительного сглаживания кривой путем усреднения данных, которое оправдано лишь при больших объемах исходного статистического материала. Поскольку количество исследуемых мышей в нашем случае ограничено, соответствие между значениями экспериментально полученных данных и предсказываемых теорией имело смысл провести сравнением непосредственно экспериментальных и теоретических кривых смертности. Функция, описывающая теоретическую кривую смертности, имеет вид:

$$l_m(x) = l_0 \{1 - \exp[(1 - \exp(\alpha x))R/\alpha - Ax]\}. \quad (5)$$

Она выводится интегрированием уравнения Гомперца–Мейкема (4) при начальных условиях $x = 0$ и $l_m = 0$.

В отличие от функции интенсивности смертности Гомперца–Мейкема, функция смертности не содержит производной, и поэтому построение соответствующей ей экспериментальной кривой не требует обязательного проведения процедуры усреднения. Однако, поскольку усреднение и сглаживание данных широко применяется демографами при построении графиков смертности и дожития даже в том случае, когда их не используют для построения кривых интенсивности смертности, правомерность отказа от этой процедуры нуждается в обосновании.

Процедуру усреднения данных обычно оправдывают тем, что, устраняя случайные отклонения, она, тем самым, выявляет истинный характер экспериментальных зависимостей. Однако этот аргумент несостоятелен, поскольку не опирается на объективные критерии оценки закономерности или случайности полученных результатов. Критерием закономерности наблю-

даемых изменений в данном случае может служить лишь их воспроизводимость в независимых опытах. Пренебрежение этим критерием превращает усреднение экспериментальных данных всего лишь в способ упрощения информации, оборотной стороной которого является ее потеря и искажение. Например, если каждая точка кривой получена усреднением десяти экспериментальных точек, то исходная информация сокращается в десять раз. При этом усредненное значение не представляет ни одного из реально полученных значений, и, следовательно, информация искажена.

В случаях обсчета кривых смертности человеческих популяций часто используют интервалы 1 или 5 лет. Как видно на рис. 2 в Приложении [7], используемый для усреднения кривой интенсивности смертности людей пятилетний интервал полностью исключает обнаружение в границах этого интервала каких-либо объективных закономерностей. В случае волнообразного характера экспериментальной кривой усреднение может устранять колебания с периодами, длина которых превышает используемые для усреднения интервалы. В результате тонкая структура экспериментальной кривой становится принципиально ненаблюдаемой.

Усреднение и сглаживание начали применять астрономы для экономного описания результатов астрономических наблюдений простыми аналитическими функциями. Это позволяло сжимать большие объемы информации до ограниченного набора входящих в функцию параметров. При этом частичное искажение и потерю информации они допускали осознанно [19]. Затем эти приемы проникли в другие области науки. Однако в наше время, благодаря доступности вычислительной техники, проблема экономной записи научной информации утратила остроту. Поэтому, если нет веских причин для усреднения информации, как в случае описания продолжительности жизни ограниченного числа животных, то применение этой процедуры следует исключать.

Сохраняющаяся приверженность демографов к усреднению данных на кривых дожития и смертности может быть объяснена причинами субъективного характера. В естественных науках задаваемые экспериментатором исходные значения независимой переменной обычно размещают равномерно на горизонтальной оси, в то время как полученные в эксперименте значения зависимой переменной отсчитывают на вертикальной оси. Демографы, в силу сложившейся традиции, поступают иначе.

Принятый в демографических исследованиях способ представления экспериментального

материала показан на примере кривых смертности и дожития самцов-мутантов на рис. 2. В соответствии с выражением (2) функции дожития и смертности выглядят на графике как зеркальные отражения друг друга в горизонтальной оси симметрии, проходящей через значение половины участвующих в эксперименте животных. На графиках значения зависимой переменной, выражающие продолжительность жизни мышей, размещены на горизонтальной оси, а значения независимой переменной — количества умерших особей, выражаемое числами натурального ряда в порядке увеличения продолжительности их жизни — отложено по вертикальной оси. В результате экспериментальные точки относительно горизонтальной оси размещаются неравномерно — с пробелами, которые производят впечатление небрежно выполненного исследования. Для равномерного распределения точек по горизонтальной оси, и, тем самым, исключения пробелов демографы пользуются обдуманной выше процедурой усреднения по дискретным временным интервалам. Она состоит в том, чтобы значения чисел умерших мышей, представленных в каждом из одинаковых возрастных интервалов, просуммировать и разделить на количества этих значений в интервале. В результате вместо нескольких точек каждый интервал представляет одна точка, обозначающая усредненное число умерших мышей. Вследствие этого полученные точки распределяются по горизонтальной оси равномерно. Однако одинаковые расстояния между точками при этом превосходят по размерам пробелы, а первоначальная равномерность размещения точек по вертикальной оси оказывается утраченной.

Между тем, стремление избавиться от пробелов на горизонтальной оси не имеет рационального обоснования. Пробелы отмечают периоды развития, соответствующие нулевой смертности и, следовательно, служат источником ценной для геронтологов информации о стадиях максимальной жизнестойкости организмов в онтогенезе.

Достичь общепринятой формы представления экспериментальных данных на графиках с тем, чтобы исключить появление пробелов на горизонтальной оси, можно и без усреднения данных по одинаковым временным интервалам. Для этого функцию смертности следует преобразовать в обратную ей ранговую функцию смертности. У этой функции в качестве независимой переменной на горизонтальной оси используют номер мышей в ряду увеличения продолжительности их жизни, а в качестве описывающей результаты опыта зависимой переменной на вертикальной оси — продолжительность

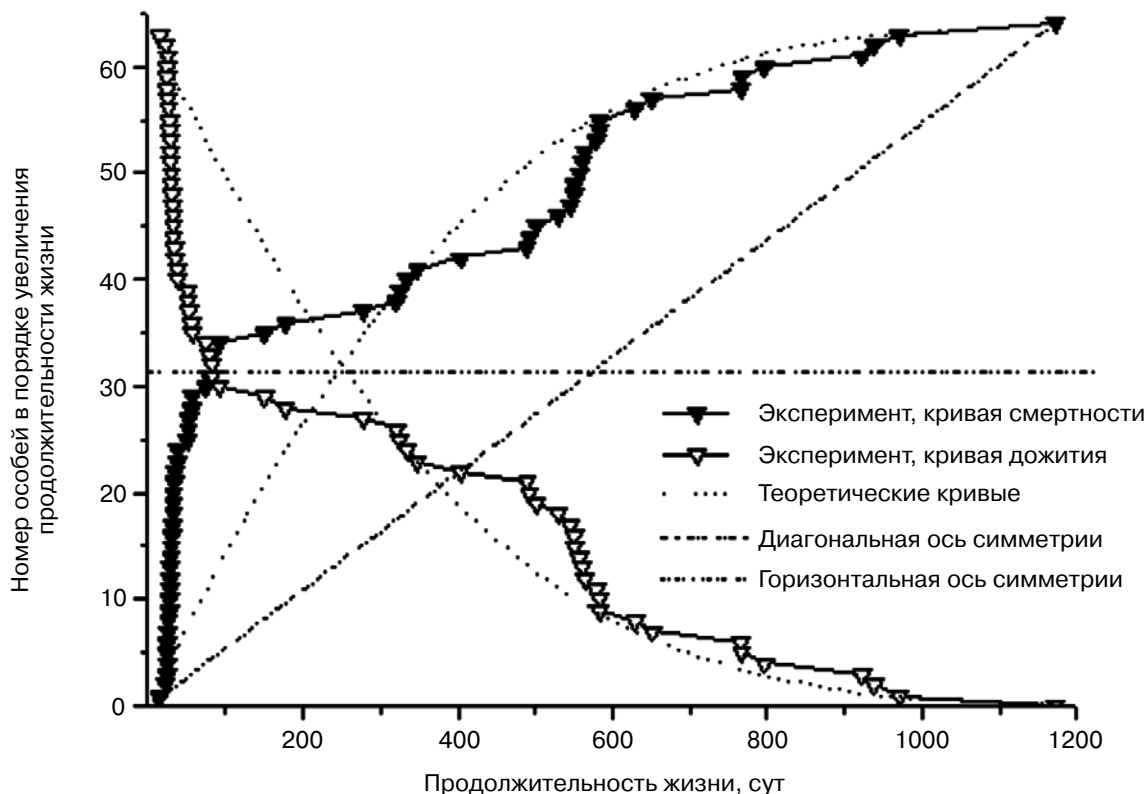


Рис. 2. Экспериментальные кривые смертности и дожития 64 самцов-мутантов и соответствующие им теоретические кривые, вычисленные с использованием уравнений (2) и (5) при значениях параметров: $A = 1,0 \cdot 10^{-4}$; $R = 2,3 \cdot 10^{-3}$; $\alpha = 1,2 \cdot 10^{-3}$; $l_0 = 64$

жизни. Поскольку количество мышей, умерших к определенному возрасту, равнозначно их номеру в обозначенном выше ряду значений независимой переменной, то переход к новому графику сводится к перемене местами горизонтальной и вертикальной осей у графика смертности. То есть функция смертности самцов-мутантов $lm(x)$ (рис. 2) превращается в ранговую функцию их смертности $x(lm)$ (рис. 3) в результате зеркального отражения кривой смертности в диагональной оси симметрии. При этом ординаты экспериментальных точек распределяются равномерно по горизонтальной оси в соответствии с общепринятой формой построения графиков. В результате горизонтальные пробелы кривых смертности превращаются в вертикальные пробелы ранговых кривых смертности. Поскольку количество точек на кривых не меняется, преобразование графика, в отличие от процедуры усреднения, не уменьшает его информативность. На графиках для кривых, смещенных вправо относительно первой кривой, абсолютная нумерация мышей определяется градуировкой горизонтальной оси за вычетом величины смещения.

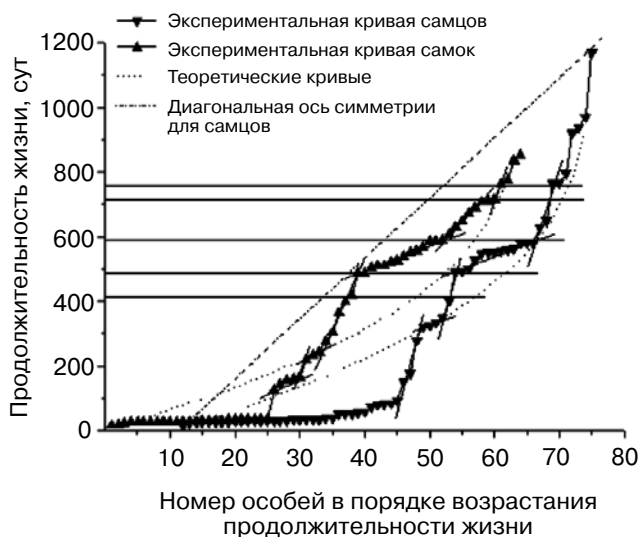


Рис. 3. Ранговые кривые смертности 64 самцов-мутантов и 64 самок-мутантов. Теоретические кривые вычислены с использованием уравнения (5) при значениях параметров для самцов: $A = 1,0 \cdot 10^{-4}$; $R = 2,3 \cdot 10^{-3}$; $\alpha = 1,2 \cdot 10^{-3}$; $l_0 = 64$ и для самок: $A = 7,0 \cdot 10^{-4}$; $R = 1,9 \cdot 10^{-3}$; $\alpha = 1,5 \cdot 10^{-3}$; $l_0 = 64$

Чтобы сравнивать экспериментальные ранговые кривые смертности с теоретическими, необходим способ построения последних. Поскольку формулу ранговой функции смертности невозможно получить в явном виде алгебраически из формулы (5), то теоретическую ранговую кривую смертности строили графическим обращением в программе «Origin» теоретической кривой функции смертности, построенной с использованием формулы (5). Входящие в формулу параметры уравнения Гомперца–Мейкема вычисляли по четырем экспериментальным значениям функции дожития (2) методом, описанным Гавриловым Л.А. и Гавриловой Н.С. [8].

Закономерности смертности мышей. На рис. 3 представлены ранговые кривые смертности мутантных самцов и мутантных самок. Видно, что построенные с использованием уравнения (5) по описанной выше методике теоретические кривые не содержат перегибов, в то время как на экспериментальных кривых четко выявляется ряд ступеней. Фрагменты кривых, образующих ступени, аппроксимированы отрезками прямых линий. Крутым участкам ступеней соответствуют стадии устойчивого развития, в то время как пологим — стадии повышенной смертности. Крутые участки содержат вертикальные пробелы, границы которых при малом количестве мышей в опыте часто совпадают с точками пересечения аппроксимирующих ступени отрезков. Точки пересечения аппроксимирующих отрезков и концы пробелов спроецированы на вертикальную ось горизонтальными линиями, указывающими границы соответствующих возрастных интервалов. Возрастные интервалы, соответствующие пробелам, можно рассматривать как зоны, в которых риск естественной смерти минимален.

На рис. 3 видно, что возрастные интервалы пологих участков ступеней, включающие наибольшее количество умерших животных, на кривых для мутантных самцов и самок практически совпадают. Это интервалы: 15–39 сут (24 самца), 490–583 сут (13 самцов) и, соответственно, 15–36 сут (24 самки), 485–589 сут (14 самок). Снизу к пологим участкам примыкают близкие по величине вертикальные пробелы, соответствующие 0–15 сут, 403–490 сут — для самцов и 0–15 сут, 419–485 сут — для самок. Таким образом, две самые выраженные ступени на каждой из кривых попарно соответствуют друг другу и определяют сходство кривых.

Кроме того, можно отметить возрастные интервалы 150–178 сут (2 самца) и 124–165 сут (5 самок), 321–350 сут (5 самцов) и 364–419 сут (3 самки), а также 766–797 сут (3 самца) и 761–775 сут (2 самки). Однако выделение ступеней в этих

случаях статистически менее достоверно из-за малого количества особей в соответствующих фрагментах кривых.

По структуре и интенсивности смертности мышей кривые отличаются друг от друга в возрастных интервалах 178–321 сут (2 самца) и 165–304 сут (4 самки), а также в интервалах 629–710 сут (2 самца) и 607–710 сут (8 самок). Как в первом, так и во втором случаях смертность самок в параллельных возрастных интервалах значительно превосходит смертность самцов. В возрастном интервале 710–770 сут у обеих кривых находится крутой участок ступени, большую часть которого составляет пробел.

Следует отметить, что пробелы, в отличие от отрезков прямых, аппроксимирующих участки ступеней, или соответствующих возрастных интервалов на вертикальной оси графиков, не могут служить стабильными характеристиками ступеней. Это связано с тем, что пробелы по мере увеличения количества особей в опыте сокращают свои размеры или исчезают совсем, превращаясь в заполненные точками линии крутых участков ступеней. Поэтому пробелы удобно использовать при небольшой статистике наблюдений на промежуточном этапе исследований лишь в качестве выявляющего ступени признака.

Чтобы доказать, что отклонения экспериментальных кривых от теоретических, построенных с использованием параметров уравнения Гомперца–Мейкема, воспроизводимы, а следовательно, наблюдаемые на экспериментальных кривых ступени не случайны, был использован следующий прием.

Группы мутантных самцов и самок были размещены в рядах в последовательности увеличения даты половины их жизни. Значения даты половины жизни определялось посредством сложения даты рождения и (или вычитания из даты смерти) половины продолжительности жизни особи. Далее, каждый ряд делили пополам и получали по две равные подгруппы мышей. Применявшееся ранее [11, 12] упорядочение по датам рождения смещало вероятность распределения долгоживущих особей в сторону первой подгруппы, а короткоживущих — в сторону второй, в то время как упорядочение по датам смерти, наоборот, смещало вероятность распределения долгоживущих особей в сторону второй подгруппы, а короткоживущих — в сторону первой. Упорядочение мышей в рядах по дате половины жизни устраняло эту асимметрию.

Ранговые кривые смертности для подгрупп мутантных самцов и мутантных самок представлены на рис. 4. Поскольку кривые для параллельных подгрупп можно толковать как резуль-

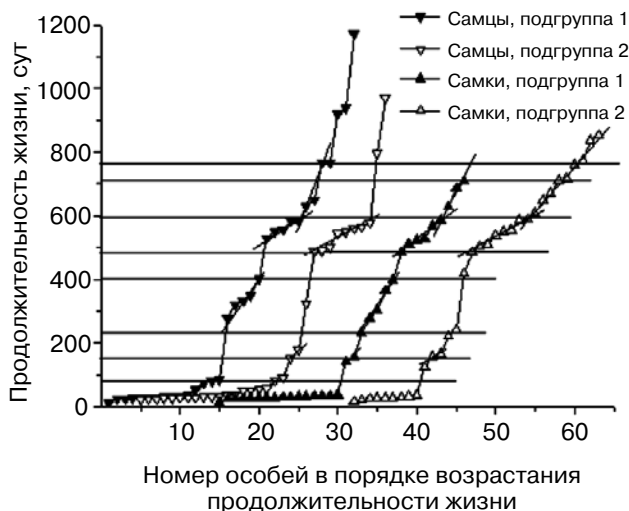


Рис. 4. Ранговые кривые смертности четырех подгрупп мутантных мышей, полученных разделением пополам ряда из 64 самцов-мутантов и ряда из 64 самок-мутантов, выстроенных по датам половины жизни

тат двух независимых опытов, то сходство положения и размеров возрастных интервалов повышенной смертности 25–35 сут, 485–600 сут и интервалов пониженной смертности 80–150 сут, 410–485 сут и 710–760 сут на ранговых кривых смертности подгрупп самцов и самок свидетельствует о том, что соответствующие ступени воспроизводимы, то есть имеют закономерный характер. В то же время, повышенная смертность у самцов и самок в интервале 200–400 сут в первых подгруппах указывает на отсутствие полной эквивалентности между ранними и поздними подгруппами.

Наблюдаемые различия можно не принимать во внимание, приписав их случайности, связанной с недостаточной статистикой наблюдений. Однако более продуктивным будет объяснение этих различий при помощи гипотез, допускающих возможность проверки. Например, различия можно отнести на счет процесса стабилизации генома, выведенного из равновесия исходной мутацией задержки роста, которая у первого самца-мутанта проявилась в аномально высокой продолжительности жизни (1172 сут). Для объяснения можно также привлечь одиннадцатилетние циклы солнечной активности. Как известно, магнитные бури заметно влияют на смертность, а общее время наблюдения за смертностью мышей в данном случае составляло половину цикла солнечной активности.

На рис. 5 представлены ранговые кривые смертности нормально развивавшихся самцов и

самок, которые, в отличие от экспериментальных ранговых кривых смертности мутантов, удовлетворительно описываются теоретическими кривыми. Расхождения наблюдаются лишь по концам кривых и в отношении тонкой структуры экспериментальной кривой самцов. Расхождения по концам кривых согласуются с тем, что уравнение Гомперца–Мейкема, как видно на рис. 2 и 3 в Приложении, также не в состоянии описать изменения на начальных и конечных участках экспериментальных кривых интенсивности смертности в человеческой популяции.

При сравнении рис. 3 и 5 видно, что возрастные интервалы 460–490 сут и 720–750 сут крутых участков ступеней на ранговой кривой смертности нормальных самцов перекрываются с возрастными интервалами 410–485 сут и 710–770 сут крутых участков соответствующих ступеней на ранговой кривой самцов и самок-мутантов. При этом на обеих кривых нормальных мышей закономерно отсутствует ступень с возрастным интервалом 0–30 сут, характерная исключительно для мутантных мышей.

Подтверждение закономерного характера отклонений экспериментальной кривой от теоретической получали для нормальных самцов тем же методом, что и для мышей мутантов. Ряд данных о продолжительности жизни самцов, составленный в последовательности увеличения даты половины жизни, разделяли на две части

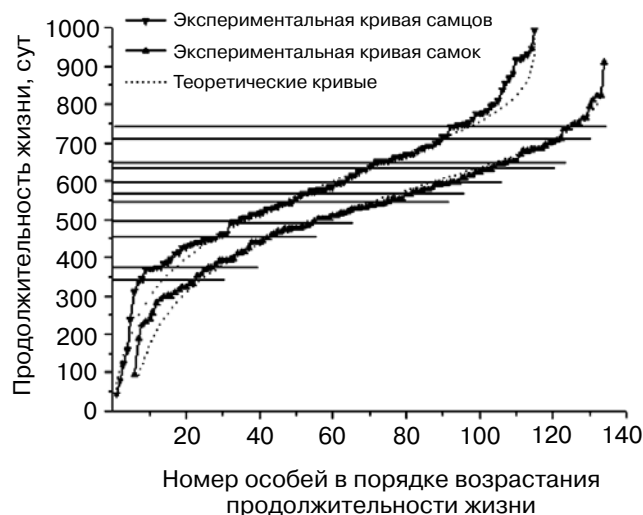


Рис. 5. Ранговые кривые смертности 115 нормальных самцов и 129 нормальных самок. Теоретические кривые вычислены с использованием уравнения (5) при значениях параметров для самцов: $A = 1,0 \cdot 10^{-5}$; $R = 9,8 \cdot 10^{-5}$; $\alpha = 6,5 \cdot 10^{-3}$; $l_0 = 115$ и для самок: $A = 1,0 \cdot 10^{-5}$; $R = 1,1 \cdot 10^{-4}$; $\alpha = 7,0 \cdot 10^{-3}$; $l_0 = 129$

так, чтобы соответствующие возрастные интервалы ступеней ранговых кривых смертности, построенных для образующихся подгрупп самцов, наилучшим образом совмещались между собой на рис. 6. Как видно, возрастные интервалы, соответствующие пологим и крутым участкам ступеней и разделяемые точками 370–460–500–540–580 сут, практически полностью совпадают по положению и размерам на обеих кривых. Интервалы на кривых в области 600–680 сут испытывают некоторое смещение относительно друг друга. Интервалы 680–710–740 сут крутого участка ступеней совпадают вновь.

Таким образом, повторяемость ступеней на ранговых кривых смертности для независимых подгрупп нормальных самцов свидетельствует об их закономерной природе. При сглаживании кривых все наблюдаемые ступени, ввиду их малых размеров, были бы с неизбежностью утрачены, что послужило бы основанием для ошибочного вывода о полном соответствии полученных данных закону Гомперца.

Другая ситуация наблюдается с ранговой кривой смертности нормальных самок, представленной на рис. 5. Ранее было высказано предположение, что сглаженность ступеней на ранговой кривой смертности нормальных самок вызвана смещениями развития в результате нерегулярного осуществления ими репродуктивных функций [11, 12]. К настоящему времени накоплено достаточное количество данных о продолжительности жизни рожавших и неро-

жавших самок, чтобы проверить это предположение. Действительно, удаление данных о продолжительности жизни рожавших самок из ранговой кривой смертности привело к частичному проявлению характерных ступеней. Более выраженный результат был получен, когда из кривой, наряду с данными о продолжительности жизни рожавших самок, были удалены данные о продолжительности жизни самок с опухолями.

На рис. 7 представлены ранговая кривая смертности нерожавших самок без опухолей и аналогичная кривая, составленная из данных о продолжительности жизни рожавших или пораженных опухолями самок. Видно, что если на первой кривой ясно прослеживаются ступени, характерные для кривых мутантных мышей и нормальных самцов (соответствующие ступеням возрастные интервалы разделены точками 325–390–475–500–540–590–680–710–740 сут), то вторая кривая имеет гладкую форму с отсутствием каких-либо значительных отклонений на всем протяжении, за исключением интервалов 650–680 сут и 710–740 сут в конце кривой, совпадающих с соответствующими интервалами на кривой нерожавших и не имеющих опухолей самок. Это может быть объяснено тем, что продолжительность жизни в случае гладкой кривой не детерминирована жесткой программой развития организма, а определяется нерегулируемыми внешними причинами. С другой стороны, наличие ступеней на кривой не рожавших самок, качественно отличающих ее от гладкой

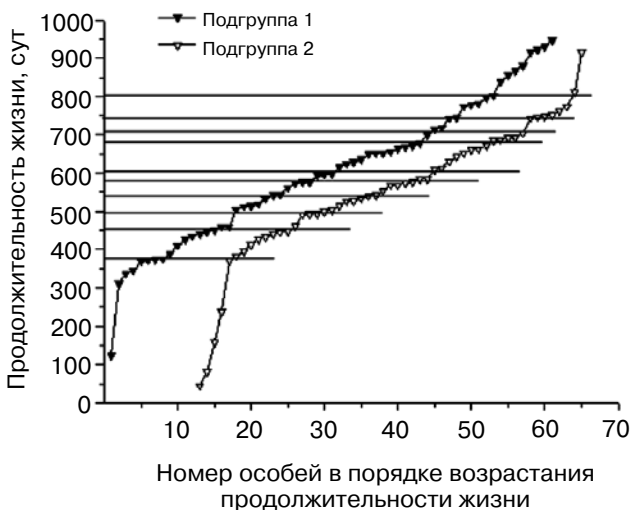


Рис. 6. Ранговые кривые смертности первой подгруппы из 62 самцов и второй подгруппы из 53 самцов, полученных разделением на две части ряда всех 115 нормальных самцов, выстроенного по датам половины их жизни

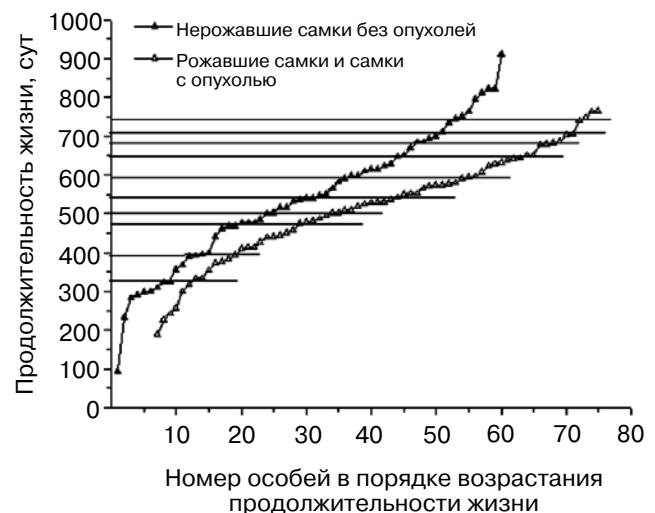


Рис. 7. Ранговые кривые смертности 60 нормальных нерожавших самок без опухолей и 69 нормальных рожавших самок и самок с опухолями

кривой рожавших самок и самок, пораженных опухолями, свидетельствует о закономерной обусловленности ступеней внутренней программой развития.

Высокая степень проявления ступеней на ранговой кривой смертности нормальных самок при одновременном удалении данных о продолжительности жизни рожавших самок и самок с опухолями указывает на то, что эти состояния вызывают в организме животных сопоставимые изменения. В связи с этим нельзя не вспомнить о рекомендациях онкологов лечить рак молочной железы или яичников беременностью. Известно также, что ветеринары используют кастрацию для предотвращения развития опухолей у нерожавших самок домашних животных. В нашем случае опухоли возникали чаще у нормальных нерожавших самок, чем у рожавших. Следует также отметить, что опухоли никогда не поражали нормальных самцов и самцов-мутантов и сравнительно редко – самок-мутантов.

Близость характеристик возрастных интервалов для ступеней ранговых кривых смертности мышей-мутантов и нормальных самцов старше 400 сут свидетельствует о том, что мутация задержки роста на дальнейшее развитие мышей существенно не влияет.

Воспроизводимость ступеней на ранговых кривых смертности позволяет сделать вывод, что наблюдаемые в виде ступеней отклонения формы экспериментальных кривых от теоретических, построенных с использованием параметров уравнения Гомперца–Мейкема, неслучайны и указывают на неадекватность соответствующей модели.

Поскольку ступени на ранговых кривых смертности нормальных мышей проявляются существенно слабее, чем у мышей-мутантов, последние могут служить удобной моделью для изучения природы стадий устойчивого развития и стадий повышенного риска смерти у нормальных мышей.

Для организмов свойственна видовая запрограммированность протекания во времени многих физиологических процессов. Примерами могут служить перестройки организма животных при переходе к половой зрелости, беременности, наступлении менопаузы. Такие стадии развития, как месячный цикл у женщин, линьки у представителей разных таксономических групп (личинки насекомых, пресмыкающие, некоторые виды млекопитающих и др.), смена зубов у некоторых животных, регулярно повторяются и строго определены во времени. На этом фоне наступление смерти можно рассматривать как этап в физиологическом развитии организма.

Однако смерть особей в популяции – не однозначно определенное во времени событие. Она допускает в качестве причины воздействие внешних случайных (стохастических) факторов, таких как возбудители болезней, неправильное питание или неблагоприятные для жизни условия среды. Плохая предсказуемость индивидуальной продолжительности жизни и практика статистического описания продолжительности жизни особей в популяции гладкими аналитическими функциями, монотонно изменяющимися во времени, хорошо согласуется с моделями стохастических механизмов старения [5, 8].

С другой стороны, имеющиеся статистические данные о суженных возрастных рамках заболеваемости и смертности у пар однояйцевых близнецов по сравнению с разнояйцевыми, примеры совпадения смерти с окончанием процессов оплодотворения или плодоношения (нерестящиеся лососи, бабочки однодневки, однолетние растения и т.д.) и описанная выше смена стадий устойчивого развития стадиями повышенного риска гибели у мышей побуждают видеть причину смерти в завершении внутренней программы развития организма.

Согласовать данные, свидетельствующие в пользу внутренней запрограммированности продолжительности жизни или в пользу ее изменения под влиянием внешних случайных факторов, можно в рамках гипотезы о том, что запрограммированной является не сама смерть, а ее вероятность, обусловленная периодическим изменением чувствительности организма к неблагоприятным воздействиям среды. Приводимый в начале статьи факт совпадения по времени максимальной чувствительности нормальных мышей к ионизирующему излучению [13] и первой ступени гибели мутантных мышей на кривых рангового распределения является прямым подтверждением этой гипотезы. То, что при эпидемиях, которые обусловлены внешним фактором, как правило, вымирает лишь небольшая часть популяции, также согласуется с этой гипотезой. Уже само разделение на болезни детского, зрелого и преклонного возрастов и выделение условий, которые их провоцируют, свидетельствует о наличии критических и устойчивых стадий развития организмов по отношению к специфическим воздействиям внешней среды.

Из гипотезы запрограммированной вероятности смерти следует, что, используя информацию об угрозе совпадения критической стадии развития и неблагоприятных условий среды, можно избежать преждевременной смерти созданием условий, исключающих разрушающее воздействие среды, или повышением порога

чувствительности организма к внешним воздействиям медикаментозными методами. Преодоление этими способами барьера критической стадии развития открывает переход к очередной стадии устойчивого развития.

Таким образом, доказательство наличия критических стадий развития в онтогенезе людей и разработка способов их диагностики и преодоления открыли бы перспективу решения проблемы продления жизни до видового максимума (около 105 лет) у ныне живущих индивидов. Обсуждавшееся выше сходство положения на кривых логарифма интенсивности смертности людей явно выраженных колебаний в возрасте до 25 лет (рис. 2 в Приложении) и после 90 лет (рис. 3 в Приложении), наблюдаемое разными исследователями [7, 17, 18], позволяет предполагать, что в промежутке между этими возрастными возрастными возможны менее выраженные колебания, которые занимают на оси времени столь же оп-

ределенное положение. Попытки найти доказательства существования критических стадий развития в популяциях промежуточных возрастов на основе обсчета имеющихся статистических данных предпринимаются [20]. Наблюдаемая массовая смертность мужчин от инфарктов в возрасте 60 лет с позиций этой гипотезы может быть истолкована как результат достижения ими критической стадии возрастной физиологической перестройки, которую в сложившихся социально-экономических условиях они не в состоянии преодолеть.

Автор выражает благодарность заведующей вивариумом ИНБИ РАН Л.А. Денисовой за всестороннюю помощь в осуществлении технической части эксперимента.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 11-04-01615а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бернар К. (1937) *Лекции по экспериментальной патологии*, Гос. изд-во биол. и мед. лит-ры, Москва–Ленинград, 512 с.
2. Павлов И.П. (1951) *Полное собрание сочинений*, 1, 2-е изд., Изд-во Академии наук СССР, Москва–Ленинград, 595 с.
3. *Большая медицинская энциклопедия* (1985) **24**, *Танатология*, Советская энциклопедия, Москва, 499 с.
4. Skulachev, V.P., and Longo, V.D. (2005) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1054**, 145–164.
5. Халявкин А.В. (1998) *Успехи геронтологии*, **2**, 43–48.
6. Gompertz, B. (1825) *Philos. Trans. Roy. Soc. London A*, **115**, 513–583.
7. Лэмб М. (1980) *Биология старения* (пер. с англ.), Мир, Москва, 208 с.
8. Гаврилов Л.А., Гаврилова Н.С. (1991) *Биология продолжительности жизни*, Наука, Москва, 280 с.
9. Makeham, W.M. (1860) *J. Inst. Actuaries*, **8**, 301–310.
10. Москалев А.А. (2008) *Старение и гены*, Наука, Санкт-Петербург, 360 с.
11. Малыгин А.Г. (2012) *Вариации продолжительности жизни мышей в процессе их роста и старения в Доклады МОИП Секция Геронтологии*, **50**, 56–65.
12. Малыгин А.Г. (2013) *Онтогенез*, **44**, 57–65.
13. Grosfill, M.L., Lindop, P.J., and Rotblat, J. (1959) *Nature*, **183**, 1729–1730.
14. Фролькис В.В. (1969) *Природа старения*, Наука, Москва, 184 с.
15. Шмальгаузен И.И. (1984) *Рост и дифференцировка*, 1, Наукова думка, Киев, 176 с.
16. Анисимов В.Н. (2008) *Молекулярные и физиологические механизмы старения*, 2, Наука, Санкт-Петербург, 424 с.
17. Depoid, F. (1973) *Population*, **28**, 755–792.
18. Vaupel, J.W., Carey, J.R., Christeansen, K., Johnson, T.E., Yashin, A.I., Holm, N.V., Iachint, I.A., Kannisto V., Khazaeli, A.A., Liedo P., Longo, V.D., Zeng, Y., Manton, K.G., Curtsinger, J.W. (1998) *Science*, **280**, 855–860.
19. *Математическая энциклопедия* (1984) **4**, Советская энциклопедия, Москва, с. 134.
20. Frank, S.A. (2004) *BMC Biology*, **2**, 16. Doi: 10.1186/1741-7007-2-16, <http://www.biomedcentral.com/1741-7007/2/16>.

AGE FLUCTUATIONS OF DEATH RATE AT MICE WITH THE MUTATION OF THE GROWTH INHIBITION

A. G. Malygin

*A. N. Bach Institute of Biochemistry of the Russian
Academy of Sciences, Leninsky prosp. 33, korp. 2,
Moscow 119071, Russia; E-mail: agmalygin@mail.ru*

Received May 17, 2013

Life expectancy of mice in a number of consecutive generations of descendants of a male with a mutation of growth delay was investigated. Mutant mice and mice with normal development (normal mice) were generated by inbreeding of male mutants with normal females from the same brood. Mutant females were sterile. It was shown that the mutant and normal mice have fluctuations of death rate. Thus, a curve of dependence of life expectancy of mice from their serial number in a series of increase of life expectancy (the rank curve of death rate) has the form of evident steps for mutant mice that are less-expressed for their normal relatives. The form of the steps of a curve specifies that in development of mice, stages with low death rate are serially replaced by stages with high death rate. The first stage of steady development of male mutants and female mutants is replaced in a month after a birth by a stage with unusually high death rate conterminous with the period of their maximal backlog in weight from normal relatives. Thus, the surviving mutants within two months catch up in weight of normally developing mice and externally become indistinguishable from them. The steps are reproduced on rank curves of death rate in mutant and normal mice, both in groups of mice with different sex, and in parallel groups with identical sex. The revealed phenomenon is interpreted by means of a hypothesis about realization in mice of a genetic program of aging that provides periodic change of stages of great vitality by stages of high sensitivity to external risk factors causing destruction. It was shown that weak expressiveness of steps on rank curves of death rate of normal females can be intensified by removal from the sample of individuals that experienced pregnancy and individuals with tumors. The results of the research reveal an opportunity to detect in people stages of high and low sensitivity to external influences programmed in ontogenesis and give a prospect for elaboration of effective measures for prevention of risks of premature death.

Key words: life expectancy, mice, growth inhibition, stages of development, intensity of death rate, Gompertz-Makeham equation