

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ГЕНЕТИКА ДОЛГОЛЕТИЯ: ДЛИНА ТЕЛОМЕР ЛЕЙКОЦИТОВ КАК МАРКЕР СТАРЕНИЯ И ФАКТОР РИСКА РАЗВИТИЯ ВОЗРАСТ-ЗАВИСИМЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У ЧЕЛОВЕКА

В.Н. Максимов¹, Е.Н. Воропаева¹, М. Бобак², С.К. Малютина¹, М.И. Воевода¹¹ФГБУ «НИИ терапии и профилактической медицины» СО РАМН
630089, г. Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175/1²Университетский колледж Лондона 1–19 Торрингтон Плейс WC1EGBT
Лондон, Соединенное Королевство

Статья посвящена обзору исследований в области генетики долголетия (современное состояние), в частности использованию измерения длины теломер лейкоцитов в качестве маркера старения и индикатора риска развития возраст-зависимых заболеваний у человека. Представлен обзор современных лабораторных методов оценки длины теломер. В рамках пилотного этапа проекта по изучению биомаркеров «биологического» возраста в российской популяции (грант РНФ) выполнено тестирование метода с помощью количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени на основе методики Sawthorn (2002 г.). Результаты тестирования методики удовлетворительные, воспроизводимость методики составила 95,5 %, отработанный подход будет использован для анализа в настоящем исследовании.

Ключевые слова: генетика долголетия, длина теломер, маркер старения, фактор риска, полимеразная цепная реакция, возраст-зависимые заболевания.

В целом подходы к изучению генетики долголетия претерпели ту же эволюцию, что и исследования других фенотипов: от отдельных ассоциаций однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) с долгожительством к полногеномным ассоциативным исследованиям (GWAS – Genome Wide Association Study), а теперь уже к секвенированию экзонов долгожителей [1] и даже целых геномов [2]. Эти методы не являются альтернативными, они взаимно дополняют друг друга. Мы находимся на этапе накопления знаний, и пока даже с привлечением всех методов не удается добиться качественного прорыва в понимании процессов старения. Создаются специализированные базы данных, например LongevityMap: гены, ассоциированные с долго-

летием у человека (755), генетические варианты (2005), исследования (255) [3].

Di Vona D. и соавт. в метаанализе (2013 г.) суммировали результаты 11 ассоциативных исследований долгожительства с полиморфизмом генов *IGF-1*, *IGF-1R*, *FOXO3A*, *SIRT1* и показали значимую ассоциацию А аллеля rs2229765 (*IGF-1R*), С аллеля rs2764264 (*FOXO3A*) у мужчин, а также rs2802292 (G аллель), rs9400239 (T аллель) и rs479744 (A аллель). Ассоциация полиморфизма гена *SIRT1* с долгожительством не подтвердилась. Авторы отмечают высокую степень неоднородности между исследованиями и небольшое количество имеющихся публикаций, что, по их мнению, подчеркивает необходимость проведения в дальнейшем методологичес-

Максимов Владимир Николаевич – д-р мед. наук, зав. лабораторией молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний, e-mail: medik11@mail.ru

Воропаева Елена Николаевна – научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний, e-mail: vena.81@mail.ru

Бобак Мартин – д-р философии, проф. эпидемиологии, зам. руководителя отдела эпидемиологии и здоровья, e-mail: m.bobak@ucl.ac.uk

Малютина Софья Константиновна – д-р мед. наук, проф., зав. лабораторией этиопатогенеза и клиники внутренних заболеваний, e-mail: smalyutina@hotmail.com

Воевода Михаил Иванович – д-р мед. наук, проф., член-корр. РАН, директор, e-mail: mvovoda@ya.ru

ки адекватных анализов для подтверждения этих результатов [4]. В другом метаанализе (2014 г.) собрали 5241 геронта и 5724 человека, которые составили контрольную группу. Два ОНП rs2802292 и rs2764264 гена *FOXO3A* также показали ассоциацию с долгожительством у мужчин [5]. Новый локус был обнаружен J. Deelen и соавт. (2014 г.) на 5-й хромосоме rs2149954 и подтвержден rs4420638 на хромосоме 19 (q13.32). На первом этапе в анализ были включены 7729 жителей Европы 85 лет и старше и 16 121 лицо контрольной группы до 65 лет, на втором этапе результаты были реплицированы на 13 060 долгожителях и 61 156 лицах контрольной группы, с выполнением анализа на подгруппе геронтов 90 лет и старше [6].

J. Nan и соавт. (2013 г.) выполнили таргетное секвенирование 988 генов у 6 долгожителей старше 105 лет [7]. Затем результаты анализа проверялись генотипированием найденных ОНП на большой группе геронтов и контроля (390 и 410 человек соответственно). Обнаружены два новых ОНП: Y318C – в гене *PMS2*, V465A – в гене *GABRR3*.

Результаты первого и пока, наверное, единственного полногеномного анализа «супергеронтов» опубликованы в 2012 году [2]. Отсеквенированы два человека (мужчина и женщина) в возрасте старше 114 лет. Авторы пришли к следующим выводам: 1) спектр вариантов последовательности ДНК этих «супергеронтов» во многом сопоставим со спектром обычных людей; 2) у них не обнаружено носительства большинства известных в настоящее время вариантов, ассоциированных с долголетием по данным литературы; 3) они имели сопоставимое число известных ассоциированных с заболеваниями вариантов генома; 4) примерно 1 % замен были у этих индивидуумов новыми и могут указывать на новые гены, способствующие исключительной долговечности; 5) у обоих индивидуумов были несинонимичные полиморфизмы связанных с долголетием вариантов генома, обнаруженных в больших полногеномных ассоциативных исследованиях. Эти анализы позволяют предположить, что есть и общие, и редкие связанные с долголетием варианты, которые могут противостоять эффектам вариантов, предрасполагающих к болезни, и увеличивать продолжительность жизни. Продолжающийся анализ геномов этих и других редких людей, которые дожили до столь преклонных лет, должен дать представление о процессах, которые способствуют поддержанию здоровья у «супердолгожителей».

Теломеры являются ядерно-белковыми комплексами, расположенными на концах хромо-

сом, они поддерживают стабильность хромосом и предохраняют ДНК от деградации [8]. Теломеры состоят из повторяющихся от сотен до тысяч раз на каждом концевом участке хромосомы гексамерных нуклетидных последовательностей (TTAGGG). Во время репликации ДНК при каждом митозе клетки теломеры укорачиваются. В делящихся клетках утраченные фрагменты теломер синтезируются с помощью фермента теломеразы. Теломераза содержит каталитический компонент (обратную транскриптазу TERT), теломеразную РНК (hTR или TERC), являющуюся матрицей для синтеза теломеров, содержащую две копии теломерного повтора и белок дискерин. В состав комплекса белков на концах хромосом входят также белки шелтерины (TRF1, TRF2, TIN2, Rap1, TPP1, POT1). Они формируют комплекс, отличающий теломеры от сайтов повреждения ДНК и контролируют синтез теломерной ДНК при участии теломеразы [9].

Укорочение теломер приводит к клеточному старению, поэтому их длина рассматривается как потенциальный маркер истории деления клетки и «накопленного» оксидативного стресса [8]. Показано, что меньшая длина теломер в лейкоцитах ассоциируется с субклиническим атеросклерозом [10], возрастными факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) [11, 12] и смертностью [13, 14], хотя ассоциация со смертностью в ряде исследований не подтверждена [15–17]. Эти ассоциации оказались независимыми от хронологического возраста, что предполагает добавленное значение длины теломер как индикатора биологического или клетчатого возраста. Интересно, что мультиэтнические исследования (MESA, Family Heart Study and Bogalusa Study) обнаружили расовые/этнические различия длины теломер и их дифференцированные ассоциации с возрастом [18, 19]. В недавнем метаанализе M. Gardner и соавт. (2013 г.) исследовали 36 когорт ($n > 36000$). Задача усложнялась гетерогенностью материала: метод измерения длины теломер TRF Southern Blot (17 исследований), Real-time PCR (19 исследований) и Flow-FISH (4 исследования); исследуемые клетки – цельная кровь (27 исследований), мононуклеары периферической крови (8 исследований), гранулоциты (2 исследования), лимфоциты (3 исследования). Авторы показали, что женщины имеют большую длину теломер, различие не зависело от возраста или типа клеток, однако величина различия зависела от метода и была значима только для метода TRF (terminal restriction fragment) с блотгибридизацией по Саузерну [20]. Потенциальные биологические механизмы более длинных

теломер у женщин могут включать влияние эстрогенов, которые стимулируют продукцию теломеры, иметь протективный эффект в отношении свободных радикалов [21] и быть связаны с гетерогаметной гипотезой [22], где любые дефектные рецессивные аллели на X хромосоме не будут иметь компенсирующий аллель. Одно из последних исследований длины теломер, как маркера предрасположенности к долгожительству, выполнено в 2014 г. на материале Leiden Longevity Study (870 геронтов, 1580 их потомков и 725 супругов). Ассоциация длины теломер с долгожительством сохранялась независимо от целого ряда взятых в анализ факторов [23]. Но L. Bendix и соавт. (2014 г.) призывают к осторожности в оценке влияния длины теломер на продолжительность жизни, так как 10 лет изучения изменений длины теломер у 1356 лиц в возрасте 30–70 лет показали, что на оценку влияют качество ДНК и целый ряд факторов образа жизни [24]. А. А. Venetos и соавт., наоборот, сделали вывод, что маловероятно влияние образа жизни и его модификаций на длину теломер [11]. То есть единственного мнения о роли длины теломер в продолжительности жизни, здоровье и болезни пока нет. Тем не менее ведутся полногеномные ассоциативные исследования маркеров, ассоциированных с длиной теломер. Исследование Long Life Family Study включало 4289 участников, обнаружены новые межгенные SNP: rs7680468 между *PAPSS1* и *DKK2* на хромосоме 4 (q25) и два на 17-й (q23.2) и 10-й (q11.21) хромосоме. В этих районах лежит целый ряд генов: *DCAF7*, *POLG2*, *CEP95*, *SMURF2* – на 17q23.2, и *RASGEF1A*, *HNRNPF*, *ANF487*, *CSTF2T*, *PRKG1* – на 10q11.21. Но самая сильная ассоциация оказалась с гаплотипами в районе генов *CEP95* и *SMURF2*. Авторы также подтвердили ранее описанные ассоциации с генами *TERC*, *MYNN* и *OBFC1* [25].

Процесс старения является неотъемлемой частью человеческого жизненного цикла, затрагивает многие клетки. Хронологический возраст определяется по дате рождения, биологический – по изменениям физиологического состояния организма. Корреляция между ними изучается давно, в том числе и на клеточном уровне. Для измерения клеточного старения были разработаны различные методы. Наиболее значимые из них – это измерение длины теломер [26] и исследование перестроек ДНК Т-клеток [27].

Вначале определяли длину теломер с помощью блот-гибридизации по Саузерну. Этот способ, однако, требует большого количества ДНК и затрат времени. Измерение длины теломер с

помощью количественной ПЦР, предложенной Р. Sawthorn [26], могут быть выполнены значительно быстрее и с относительно небольшими количествами ДНК. Этот метод позволяет измерить относительную (но не фактическую) длину теломер и сравнивать ее у разных индивидуумов. Но, как полагают N.J. O’Callaghan и M. Fenech (2011 г.), количественная ПЦР может быть использована для измерения абсолютной длины теломер [28]. Этот метод основан на количественной ПЦР по Р. Sawthorn, но существенно модифицирован: используются другие праймеры, а также олигомерные стандарты для расчета абсолютной длины теломер. Кроме того, длина теломер может быть измерена с помощью Flow-FISH [29] или с использованием метода STELA (Single Telomere Length Analysis) [30].

Целью нашего исследования является изучение градиента и детерминант возрастных изменений здоровья при старении и исследование их связей с рядом биомаркеров «биологического» возраста в современной российской популяции предпенсионного и пенсионного возраста. Настоящее исследование является проектом международной научной группы, включающей исследователей НИИТПМ СО РАН (Новосибирск, Россия), University College London (London UK), Laboratory of Molecular Genetics at Center for Experimental Medicine (Prague, Czech Republic) и выполняется за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-45-00030).

В рамках глобального увеличения продолжительности жизни населения мира российская популяция также становится старше и более подвержена развитию хронических неинфекционных заболеваний (ХНИЗ), половина из которых приходится на сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ). Несмотря на прогрессивные успехи медицины в профилактике и лечении заболеваний пожилого возраста, на сегодня механизмы, определяющие скорость снижения здоровья с возрастом, исследованы только частично. Прогрессия возрастных изменений и ее детерминанты имеют популяционную специфичность. Поскольку основные исследования по проблеме выполнены на североамериканских и западноевропейских популяциях, в которых эпидемиологическая ситуация в отношении ХНИЗ и ССЗ существенно отличается от России, анализ возрастного градиента здоровья на материале российской популяции крайне актуален.

Исследование будет выполняться на стратифицированных по полу и возрасту популяционных выборках мужчин и женщин (1000 чел.) в возрасте 55–79 лет, входящих в когорту 10-летнего проспективного наблюдения. Молеку-

лярно-генетические исследования будут проводиться на базе межинститутского сектора молекулярной эпидемиологии и эволюции человека (НИИТПМ СО РАМН и НИИ цитологии и генетики СО РАН). Исследование длины теломер будет проводиться на материале ДНК, выделенной из клеток крови, с помощью количественной ПЦР (qPCR) в реальном времени на основе методики R.T. Sawthorn и соавт. (2002 г.) [26] с модификациями.

В настоящее время в рамках пилотного этапа выполнено тестирование следующего варианта методики: в качестве однокопийного референсного гена взят бэта-гемоглобин (HBB). Отдельные количественные реакции для теломер и бэта-гемоглобина поставили в парных 96-луночных плашках в идентичных позициях. Каждая плашка включала серию разведений ДНК (0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10; 20 и 30 нг), которые были использованы для создания калибровочной кривой и количественной оценки каждого образца. Десять нанограмм ДНК взяты в каждую индивидуальную реакцию. Образцы и стандартные разведения были раскатаны в плашки и высушены в течение суток при +37 °С. Реакционная смесь для анализа теломер содержала следующие реагенты: 270 nM tellb праймер (5'-CGGTTT(GTTTGG)5GTT-3'), 900 nM tel2b праймер (5'-GGCTTG(CCTTAC)5CCT-3'), 0,2X SYBR Green I, 5 mM DTT (dithiothreitol), 1 % DMSO (dimethylsulfoxide), 0,2 mM of each dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 1,25 ед. DNA polymerase в конечном объеме 15 мкл буфера для ПЦР. Циклы ПЦР: при 95 °С 10 мин, затем 25 циклов при 95 °С – 15 с, 54 °С – 30 с, 72 °С – 90 с. Реакционная смесь для анализа бэта-гемоглобина содержала следующие реагенты: 300 nM Hgb1 праймер (5'-GC TTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGC-3'), Hgb2 праймер (5'-CACCAACTTCATCCACGTTACCC-3') 0,2X SYBR Green I, 5 mM DTT (dithiothreitol), 1 % DMSO (dimethylsulfoxide), 0,2 mM of each dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 1,25 ед. DNA polymerase в конечном объеме 15 мкл буфера. Циклы ПЦР: 95 °С – 3 мин, затем 35 циклов при 95 °С – 15 с, 58 °С – 20 с и 72 °С – 20 с. Обе реакции ставились на StepOnePlus (USA). Для расчетов использовалось штатное программное обеспечение амплификатора. Для определения относительной длины теломера выполняли контроль качества и расчет отношения T/S (теломеры к однокопийному гену). Если кривые амплификации образца в трех репликах имели стандартное отклонение больше 0,5, то такой образец исключался из дальнейшего анализа. Каждая плашка включала три контрольных образца с нормальной и один с короткой длиной теломер.

Были проверены относительные интенсивности сигнала из контрольных образцов, чтобы гарантировать сопоставимость между плашками. Первые тестирования методики получили удовлетворительные результаты, воспроизводимость методики составила 95,5 %, поэтому она будет использована для анализа всей запланированной в настоящем исследовании выборки.

На очередном этапе будет выполняться анализ связи длины теломер, оцененной с использованием отработанной в пилоте методики, с рядом возраст-зависимых качественных и количественных фенотипов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 14-45-00030).

ЛИТЕРАТУРА

1. Newman A.B., Murabito J.M. The Epidemiology of Longevity and Exceptional Survival // *Epidem. Rev.* 2013. Jan 31.
2. Sebastiani P., Riva A., Montano M. et al. Whole genome sequences of a male and female supercentenarian, ages greater than 114 years // *Front Genet.* 2012. Jan. Vol. 3, N 2. P. 90.
3. <http://genomics.senescence.info/longevity/>
4. Di Bona D., Accardi G., VIRRUSO C. et al. Association Between Genetic Variations in the Insulin/Insulin-Like Growth Factor (Igf-1) Signaling Pathway and Longevity: a Systematic Review and Meta-Analysis // *Curr. Vasc. Pharmacol.* 2013. Dec. 18.
5. Bao J.M., Song X.L., Hong Y.Q. et al. Association between FOXO3A gene polymorphisms and human longevity: a meta-analysis // *Asian. J. Androl.* 2014. May-Jun. Vol. 16, N 3. P. 446–452.
6. Deelen J., Beekman M., Uh H.W. et al. Genome-wide association meta-analysis of human longevity identifies a novel locus conferring survival beyond 90 years of age // *Hum. Mol. Genet.* 2014. Apr. 15.
7. Han J., Ryu S., Moskowitz D.M. et al. Discovery of novel non-synonymous SNP variants in 988 candidate genes from 6 centenarians by target capture and next-generation sequencing // *Mech Ageing Dev.* 2013. Oct. Vol. 134, N 10. P. 478–485.
8. Von Zglinicki T., Martin-Ruiz C.M. Telomeres as biomarkers for ageing and age-related diseases // *Curr. Mol. Med.* 2005. Vol. 5. P. 197–203.
9. Calado R., Young N. Telomeres in disease. F1000 // *Med. Rep.* 2012. Vol. 4. P. 8.
10. Fitzpatrick A.L., Kronmal R.A., Gardner J.P. et al. Leukocyte telomere length and cardiovascular disease in the cardiovascular health study // *Am. J. Epidemiol.* 2007. Vol. 165. P. 14–21.
11. Benetos A., Kark J.D., Susser E. et al. Tracking and fixed ranking of leukocyte telomere length across the adult life course // *Aging. Cell.* 2013. Aug. Vol. 12, N 4. P. 615–621.
12. Nordfjall K., Eliasson M., Stegmayr B., Lundin S., Roos G., Nilsson P.M. Increased abdominal obesity, adverse psychosocial factors and shorter telomere

- length in subjects reporting early ageing; the MONICA Northern Sweden Study // *Scand. J. Public Health*. 2008. Vol. 36. P. 744–752.
13. Cawthon R.M., Smith K.R., O'Brien E., Sivatchenko A., Kerber R.A. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older // *Lancet*. 2003. Vol. 361. P. 393–395.
 14. Kimura M., Hjelmberg J.V., Gardner J.P. et al. Telomere length and mortality: a study of leukocytes in elderly Danish twins // *Am. J. Epidemiol.* 2008. Vol. 167. P. 799–806.
 15. Bischoff C., Petersen H.C., Graakjaer J. et al. No association between telomere length and survival among the elderly and oldest old // *Epidemiology*. 2006. Vol. 17. P. 190–194.
 16. Harris S.E., Deary I.J., MacIntyre A. et al. The association between telomere length, physical health, cognitive ageing, and mortality in nondemented older people // *Neurosci. Lett.* 2006. Vol. 406. P. 260–264.
 17. Martin-Ruiz C.M., Gussekloo J., van Heemst D. et al. Telomere length in white blood cells is not associated with morbidity or mortality in the oldest old: a population-based study // *Aging Cell*. 2005. Vol. 4. P. 287–290.
 18. Roux A.V.D., Ranjit N., Jenny N.S. et al. Race/ethnicity and telomere length in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis // *Ibid.* 2009. June. Vol. 8, N 3, P. 251–257.
 19. Hunt S.C., Chen W., Gardner J.P., Kimura M., Srinivasan S.R., Eckfeldt J.H. et al. Leukocyte telomeres are longer in African Americans than in whites: the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study and the Bogalusa Heart Study // *Ibid.* 2008. Vol. 7. P. 451–458.
 20. Gardner M., Bann D., Wiley L., Cooper R., Hardy R. et al. Gender and telomere length: systematic review and meta-analysis // *Exp. Gerontol.* 2014. Mar. Vol. 51. P. 15–27.
 21. Aviv A., Valdes A.M., Spector T.D. Human telomere biology: pitfalls of moving from the laboratory to epidemiology // *Int. J. Epidemiol.* 2006. Vol. 35. P. 1424–1429.
 22. Barrett E.L., Richardson D.S. Sex differences in telomeres and lifespan // *Aging Cell*. 2011. Vol. 10. P. 913–921.
 23. Deelen J., Beekman M., Codd V. et al. Leukocyte telomere length associates with prospective mortality independent of immune-related parameters and known genetic markers // *Int. J. Epidemiol.* 2014. Jan. Vol. 14.
 24. Bendix L., Thinggaard M., Fenger M. et al. Longitudinal changes in leukocyte telomere length and mortality in humans // *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 2014. Feb; Vol. 69, N 2. P. 231–239. doi: 10.1093/gerona/glt153. Epub 2013 Oct 22.
 25. Lee J.H., Cheng R., Honig L.S. et al. Genome wide association and linkage analyses identified three loci-4q25, 17q23.2, and 10q11.21-associated with variation in leukocyte telomere length: the Long Life Family Study // *Front Genet.* 2014. Jan. Vol. 17.
 26. Cawthon R.M. Telomere measurement by quantitative PCR // *Nucleic Acids Research*. 2002. Vol. 30. P. e47.
 27. Zubakov D., Liu F., van Zelm M.C. et al. Estimation human age from T-cell DNA rearrangements // *Curr. Biol.* 2010. Vol. 20. P. R970–R971.
 28. O'Callaghan N.J., Fenech M. A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length // *Biol. Proc. Online*. 2011. Vol. 13. P. 3.
 29. Baerlocher G.M., Vulto I., De Jong G. Lansdorp P.M. Flow cytometry and FISH to measure the average length of telomeres (flow FISH) // *Nature Protocols*. 2006. Vol. 1. P. 2365–2376.
 30. Hills M., Lücke K., Chavez E.A., Eaves C.J., Lansdorp P.M. Probing the mitotic history and developmental stage of hematopoietic cells using single telomere length analysis (STELA) // *Blood*. 2009. Vol. 113. P. 5765–5775.

GENETICS OF LONGEVITY: TELOMERE LENGTH OF LEUKOCYTES AS A MARKER OF AGING AND A RISK FACTOR FOR AGE-RELATED DISEASES IN HUMANS

V.N. Maksimov¹, E.N. Voropaeva¹, M. Bobak², S.K. Malyitina¹, M.I. Voevoda¹

¹Research Institute of Internal and Preventive Medicine of SB RAMS
630089, Novosibirsk, Boris Bogatkov str., 175/1

²University College London, Inined Kingdom, London, 1–19 Torrington Place

The manuscript is devoted to review in the area of genetics of longevity (current state of knowledge), in particular, the use of leukocyte telomere length measurement as a marker of aging and as an indicator of the risk for age-related diseases in humans. The paper also gives an overview of laboratory methods to assess telomere length. In the frame of pilot study of the project on biomarkers of «biological age» in Russian population (grant RSCF) the method for analysis of telomeres length by real-time PCR on the base of technique by Cawthon (2002) was tested. The results of testing provided required accuracy, reproducibility of method's was of 95,5 %, the tried and tested technique will be used for analysis in present project.

Keywords: genetics of longevity, telomere length, a marker of aging, risk factors, polymerase-chain reaction, age-dependent diseases.

Статья поступила 10 ноября 2014 г.