БИОГЕРОНТОЛОГИЯ

ПЕПТИД СПОСОБСТВУЕТ ПРЕОДОЛЕНИЮ ЛИМИТА ДЕЛЕНИЯ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

В.Х.Хавинсон, И.Э.Бондарев, А.А.Бутюгов, Т.Д.Смирнова

Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН

Ранее нами было обнаружено, что обработка нормальных диплоидных клеток человека пептидом эпиталоном (Ala-Glu-Asp-Gly) индуцирует экспрессию каталитической субъединицы теломеразы, ее энзиматическую активность и элонгацию теломер. В данной работе исследовано влияние этого пептида на пролиферативный потенциал фетальных фибробластов человека. Линия первичных легочных фибробластов, полученная от 24-недельного плода, на 34-м пассаже потеряла пролиферативный потенциал. Средний размер теломер в этих клетках был значительно меньше по сравнению с аналогичным показателем на ранних пассажах (10-й пассаж). Добавление в культуру стареющих клеток эпиталона индуцировало элонгацию теломер до размера, сравнимого с их длиной на ранних пассажах. Обработанные пептидом клетки с удлиненными теломерами совершили 10 дополнительных делений (44 пассажа) по сравнению с контрольными и продолжали делиться. Таким образом, пептид эпиталон способствует увеличению продолжительности жизненного цикла нормальных клеток человека за счет преодоления лимита Хейфлика.

Ключевые слова: *пептид, эпиталон, теломеры, фибробласты, старение*

Пептид эпиталон (Ala-Glu-Asp-Gly) сконструирован и синтезирован на основе анализа аминокислотного состава комплексного пептидного препарата эпиталамина, выделенного из эпифиза мозга животных [10]. Установлено, что эпиталон восстанавливает нарушенную нейроэндокринную регуляцию у старых обезьян [11], индуцирует активацию рибосомальных генов [1]. Также обнаружено, что добавление тетрапептида в культуру лимфоцитов, выделенных от людей пожилого и старческого возраста, способствует деконденсации перицентрометрического гетерохроматина и активации генов, репрессированных вследствие зависимой от возраста конденсации эухроматиновых регионов хромосом [4]. Эпиталон способствует увеличению средней продолжительности жизни у мышей [5] и снижает частоту хромосомных аберраций у ускоренно стареющих мышей SAM [2]. Следует отметить, что эпиталон увеличивает среднюю и максимальную продолжительность жизни без увеличения частоты развития злокачественных новообразований у этих животных [5-7]. В настоящее время установлено, что продолжительность жизни диплоидных клеток человека ограничена [9]. Теломеразная теория старения связывает возрастное снижение пролиферативного потенциала тканей с критическим укорочением теломер в процессе клеточного деления [14]. У человека экспрессия белкового компонента теломеразы и соответствующая ферментативная активность наблюдаются в большинстве злокачественных, половых, ранних эмбриональных и, возможно, стволовых клетках. Соматические клетки человека теломеразной активности лишены [12]. Установлено, что обработка нормальных диплоидных клеток человека эпиталоном индуцирует экспрессию каталитической субъединицы теломеразы, ее энзиматическую активность и элонгацию теломер [3]. В данной работе изучалось влияние эпиталона на пролиферативный потенциал фетальных фибробластов человека.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Первичная культура фетальных легочных фибробластов линии 602/17 (24 нед) человека была получена из лаборатории клеточных культур НИИ гриппа РАМН. Клетки культивировали в среде Игла без антибиотиков, содержащей 10% сыворотки крупного рогатого скота, 2 мМ L-глутамина с пересевом их в соотношении 1:2 один раз в 7 дней до 34-го пассажа, после которого деление фибробластов прекращалось. Для того чтобы иметь возможность одновременно сравнивать клетки, прошедшие разное число пассажей, их периодически замораживали и хранили в жидком азоте. Для части фетальных фибробластов, начиная с 28-го пассажа, в культуральную среду вводили эпиталон в концентрации 0.05 мкг/мл [4]. Среднюю длину теломер в индивидуальных клетках измеряли методом флюоресцентной гибридизации *in situ* с проточной цитофлюориметрией (flow-FISH) [13]. Для этого клетки дважды отмывали в забуференном физиологическом растворе (ЗФР), содержавшем 0.2% БСА, и ресуспендировали в растворе для гибридизации, содержавшем 70% формамида, 1.0% БСА, 20 мМ трис-HCl pH 7.0 ("Sigma") и 0.3 мкг/мл специфичной для теломер C_3TA_2 пептидно-нуклеотидной пробы, меченной ФИТЦ ("PerSeptive Biosystems"). Образцы подвергали тепловой денатурации при 80°C в течение 10 мин с последующей 2-часовой гибридизацией при комнатной температуре в темноте. Затем суспензию клеток центрифугировали, супернатанты удаляли, а клетки 2 раза отмывали в буферном растворе, содержащем 70% формамида, 10 мМ трис-HCl pH 7.0, 0.1% БСА, 0.1% Твин-20 ("Sigma"), и 1 раз в ЗФР, содержащем 0.1% БСА и 0.1% Твин-20. После отмывания клетки ресуспендировали в ЗФР, содержащем 0.1% БСА, 10 мкг/мл РНКазы А ("Sigma"), 0.06 мкг/мл йодида пропидия ("Sigma"), и ин-

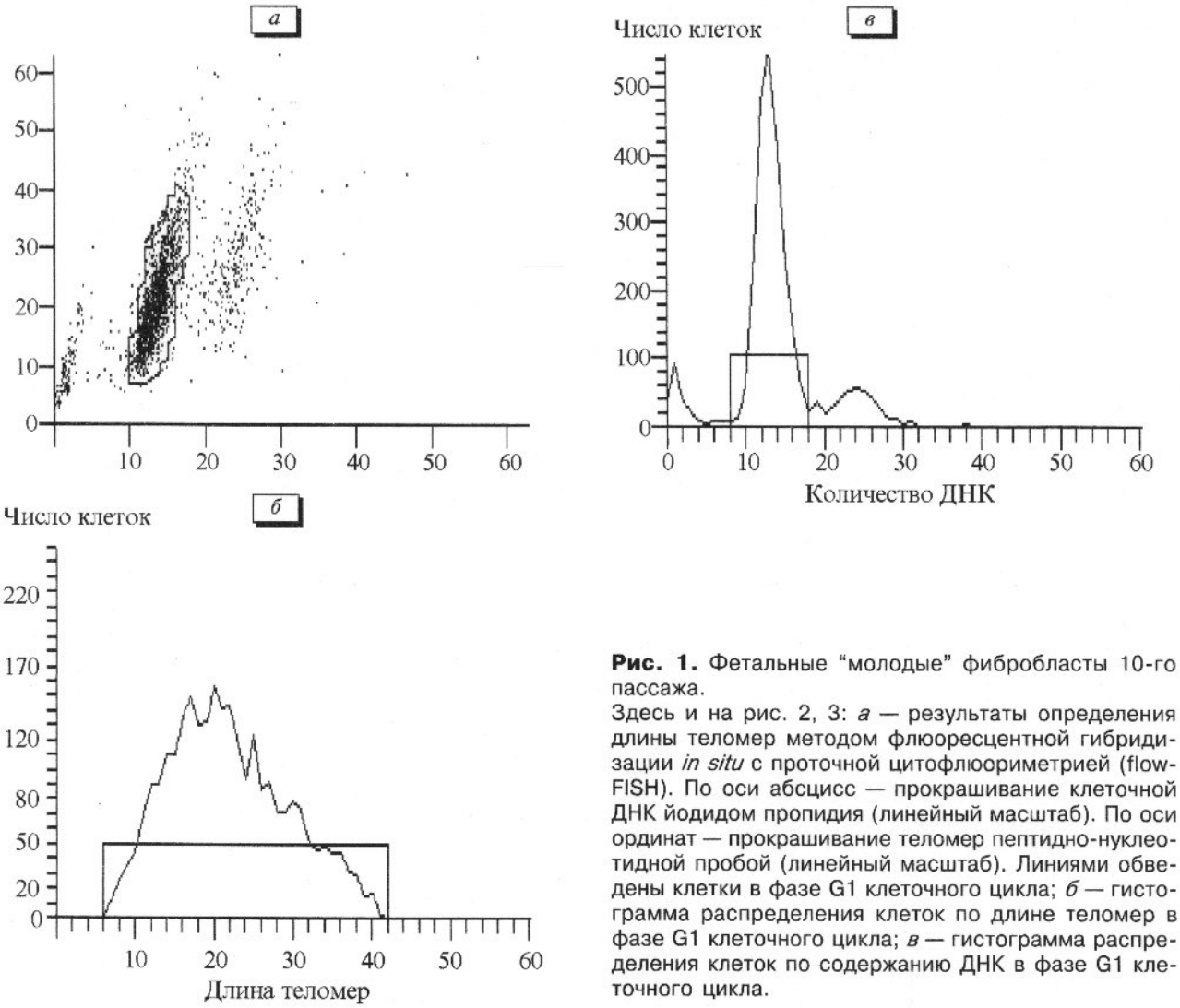

Рис. 1. Фетальные "молодые" фибробласты 10-го пассажа.
Здесь и на рис. 2, 3: *а* — результаты определения длины теломер методом флюоресцентной гибридизации *in situ* с проточной цитофлюориметрией (flow-FISH). По оси абсцисс — прокрашивание клеточной ДНК йодидом пропидия (линейный масштаб). По оси ординат — прокрашивание теломер пептидно-нуклеотидной пробой (линейный масштаб). Линиями обведены клетки в фазе G1 клеточного цикла; *б* — гистограмма распределения клеток по длине теломер в фазе G1 клеточного цикла; *в* — гистограмма распределения клеток по содержанию ДНК в фазе G1 клеточного цикла.

кубировали при комнатной температуре в темноте в течение 2 ч. Контрольную гибридизацию (без пептидно-нуклеотидной пробы) проводили для выявления фоновой автофлюоресценции и для расчета специфичной для теломер флюоресценции в условных единицах (усл. ед.). Методом проточной цитофлюориметрии на приборе "Beckman-Coulter" анализировали 10^4 клеток. Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения "CellQuest" и "WinList 4.0".

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Линия первичных легочных фибробластов 602/17 на 34-м пассаже демонстрировала потерю пролиферативного потенциала и остановку клеточного роста. Флюоресцентная гибридизация *in situ* с проточной цитофлюориметрией продемонстрировала уменьшение средней и максимальной длины теломер в фазе G1 клеточного цикла в "старых" фетальных фибробластах линии 602/17 после 32-го пассажа (рис. 2, *а*, *б*) по сравнению с контрольными "молодыми" клетками, прошедшими 10 пассажей (рис. 1, *а*, *б*). Средняя длина теломер в фазе G1 клеточного цикла в контроле (10 пассажей) составила 20.9±6.6 усл. ед. (рис. 1, *а*, *б*). Длительное культивирование клеток (32 пассажа) привело к укорочению средней длины теломер до 10.9±4.3 усл. ед. ($p<0.05$; рис. 2, *а*, *б*). При окрашивании "молодых" клеток йодидом пропидия среднее содержание ДНК в фибробластах составило 13.2±1.5 усл. ед. (рис. 1, *а*, *в*), в то время как в "старых" клетках этот показатель составил 18.6±1.9 усл. ед. ($p<0.05$; рис. 2, *а*, *в*). Этот факт обусловлен, по-видимому, массовыми хромосомными аберрациями, в свою очередь, вызванными укорочением теломер до критического уровня, когда они уже не способны предотвратить слияния хромосом

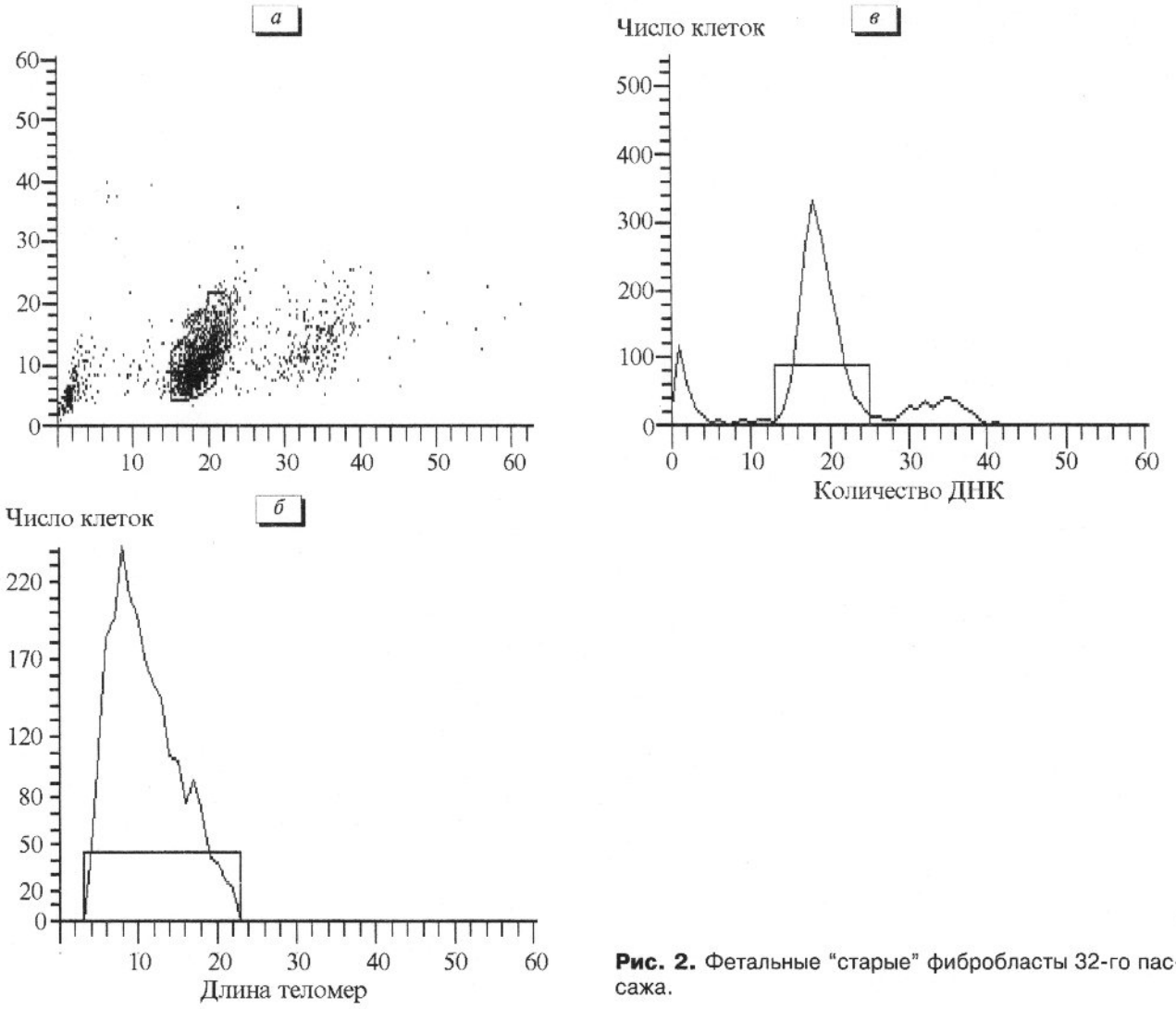

Рис. 2. Фетальные "старые" фибробласты 32-го пассажа.

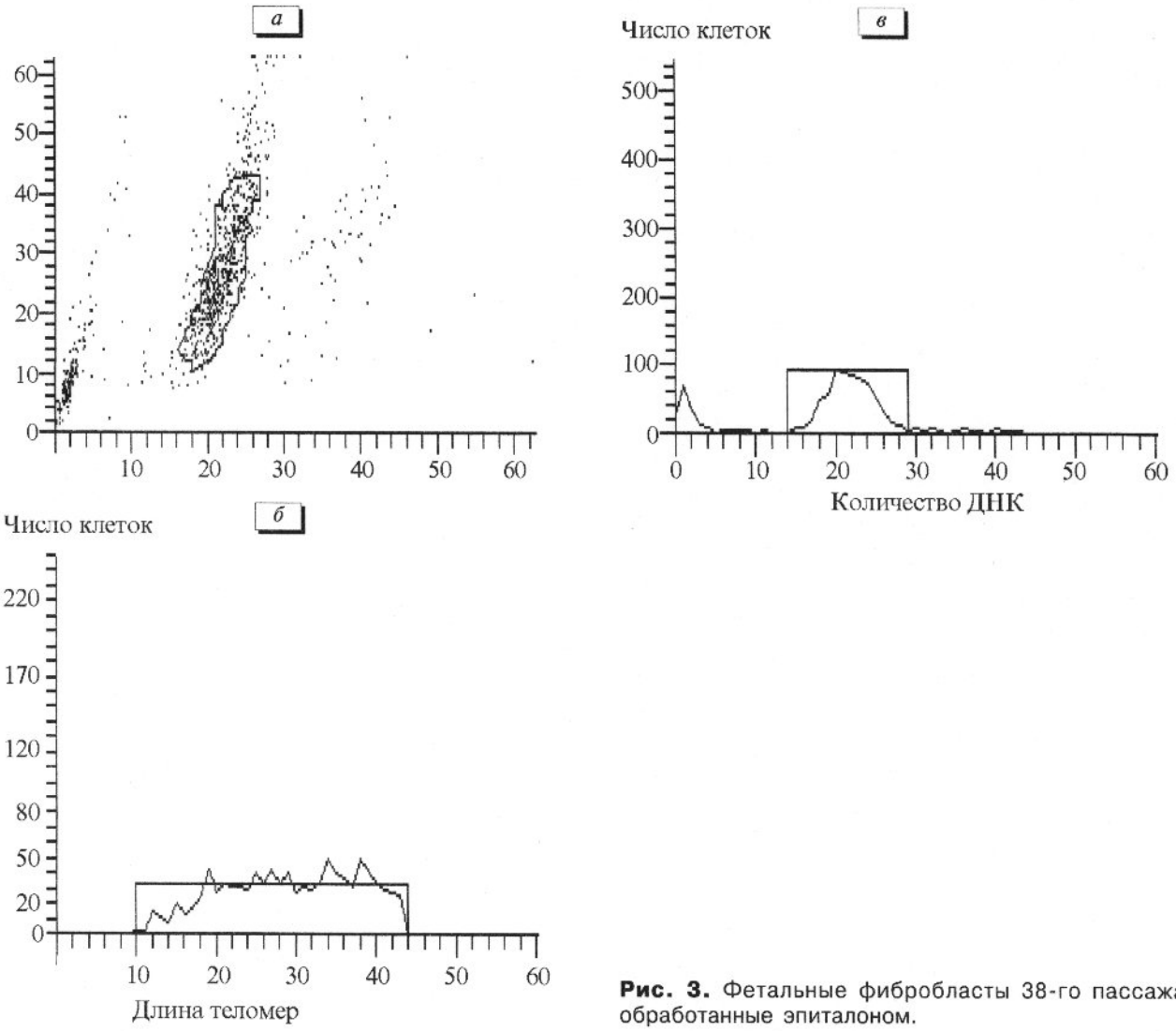

Рис. 3. Фетальные фибробласты 38-го пассажа, обработанные эпиталоном.

[8]. По результатам flow-FISH, добавление в культуральную среду эпиталона привело к увеличению средней длины теломер в фазе G1 клеточного цикла "старых" фибробластов 38-го пассажа до уровня 26.2±7.9 усл. ед. (рис. 3, *а*, *б*), что достоверно ($p<0.05$) в 2.5 раза превосходит среднюю длину теломер в клетках 32-го пассажа (рис. 2, *а*, *б*). Фибробласты в присутствии эпиталона в культуральной среде прошли 44 деления, и этот процесс продолжался. Следует отметить, что на фоне удлинения теломер содержание ДНК в клетках осталось таким же, как и в клетках, прошедших длительное пассирование (рис. 2, *а*, *в*; рис. 3, *а*, *в*). Это, по-видимому, связано с необратимостью уже произошедших хромосомных аберраций [7].

Таким образом, пептид эпиталон способствует увеличению продолжительности жизненного цикла диплоидных клеток человека за счет преодоления лимита Хейфлика. Эти данные в значительной мере объясняют геропротекторный эффект эпиталона в разных экспериментальных моделях [10].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Анисимов С.В., Бохелер К.П., Хавинсон В.Х., Анисимов В.Н.* // Бюл. экспер. биол. 2002. Т. 133, № 3. С. 340-347.
2. *Розенфельд С.В., Того Е.Ф., Михеев В.С. и др.* // Там же. С. 320-322.
3. *Хавинсон В.Х., Бондарев И.Э., Бутюгов А.А.* // Там же. 2003. Т. 135, № 6. С. 692-695.
4. *Хавинсон В.Х., Лежава Т.А., Монаселидзе Дж.Г. и др.* // Там же. Т. 134, № 10. С. 451-455.
5. *Anisimov V.N., Khavinson V.K., Mikhalski A.I., Yashin A.I.* // Mech. Aging Dev. 2001. Vol. 122, N 1. P. 41-68.
6. *Anisimov V.N., Khavinson V.K., Popovich I.G., Zabezhinski M.A.* // Cancer Lett. 2002. Vol. 183. P. 1-8.
7. *Anisimov V.N., Khavinson V. Kh., Provinciali M. et al.* // Int. J. Cancer. 2002. Vol. 101, N 1. P. 7-10.

8. *Elmore L.W., Holt S.E.* // Mol. Carcinog. 2000. Vol. 28, N 1. P. 1-4.
9. *Heyflick L.* // Exp. Gerontol. 2003. Vol. 38, N 11-12. P. 1231-1241.
10. *Khavinson V.Kh.* // Neuroendocrinol. Lett. 2002. Vol. 23, Suppl. 3. P. 11-144.
11. *Khavinson V., Goncharova N., Lapin B.* // Ibid. 2001. Vol. 22, N 4. P. 251-254.
12. *Meyerson M., Counter C., Eaton E.N. et al.* // Cell .1997. Vol. 90, N 4. P. 785-795.
13. *Rufer N., Dragowska W., Thornbury G. et al.* // Nat. Biotechnol. 1998. Vol. 16, N 8. P. 743-747.
14. *Wright W.E., Shay J.W.* // Ibid. 2002. Vol. 20, N 7. P. 682-688.

Получено 24.01.04

Новые книги

Сухих Г.Т., Ванько Л.В.

Иммунология беременности

Монография посвящена важному для акушерства вопросу-изучению роли иммунных реакций в развитии физиологической и осложненной беременности. Представлены общие сведения об иммунитете и аутоиммунных реакциях. Приведены данные о клеточных и молекулярных основах иммунных реакций в половых органах женщины. Рассмотрены иммунологические аспекты оплодотворения яйцеклетки, имплантации бластоцисты, формирования и развития плаценты при нормальной беременности, а также роль растворимых факторов в регуляции гестации. Собственные результаты и данные литературы рассмотрены с позиции концепции иммунных факторов, служащих одной из причин осложнения течения беременности, и значения иммунотерапии в комплексном лечении женщин с патологией беременности.

Книга предназначена иммунологам, акушерам-гинекологам, перинатологам, студентам медицинских ВУЗов.
М.: Издательство РАМН. 400 с.