

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДА AEDG НА ДЛИНУ ТЕЛОМЕР И МИТОТИЧЕСКИЙ ИНДЕКС ФГА-СТИМУЛИРОВАННЫХ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

В.Х.Хавинсон¹, А.А.Пендина², О.А.Ефимова², А.В.Тихонов², А.С.Кольцова², М.И.Крапивин²,
А.В.Петровская-Каминская², Л.И.Петрова², Н.С.Линькова^{1,3}, В.С.Баранов²

¹Отдел биogerонтологии АНО НИЦ Санкт-Петербургского института биорегуляции
и геронтологии, Санкт-Петербург, РФ;

²Отдел геномной медицины ФГБНУ НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии
им. Д.О.Отта, Санкт-Петербург, РФ;

³Кафедра терапии, гериатрии и антивозрастной медицины Академии постдипломного
образования ФГБУ ФНКЦ ФМБА России, Москва

Изучено влияние пептида AEDG на длину теломер и митотический индекс ФГА-стимулированных лимфоцитов крови индивидов мужского пола младшей (18-22 года, 5 человек) и средней (49-54 года, 6 человек) возрастной группы. В младшей возрастной группе достоверного изменения митотического индекса выявлено не было, а в средней – зарегистрировано уменьшение значения данного параметра в одном случае. Относительная длина теломерных районов метафазных хромосом оценивалась методом флуоресцентной гибридизации *in situ* с ДНК-зондами к теломерным последовательностям. После воздействия пептида AEDG установлены достоверные изменения относительной длины теломер у 7 из 11 индивидов (3 случая в младшей возрастной группе и 4 случая в средней). Достоверное увеличение длины теломер после воздействия пептида AEDG было зарегистрировано в 5 случаях, в том числе у двух индивидов младшей возрастной группы (на 41 и 55%) и у трёх индивидов средней возрастной группы (на 156, 18 и 76%). У одного представителя младшей возрастной группы и одного – средней возрастной группы отмечено достоверное уменьшение длины теломер (на 37 и 15% соответственно). При этом наблюдалась тенденция к нормализации длин теломер: их увеличению у индивидов, у которых была выявлена исходно меньшая длина теломер по отношению к средней внутри группы, и к их уменьшению, если индивидуальное значение превышало среднее внутри группы.

Ключевые слова: длина теломер, пептид AEDG, лимфоциты крови человека, молодой и средний возраст

Теломеры, расположенные на концах хромосом, представляют собой динамические нуклеопротеиновые структуры, состоящие из tandemных повторов 5'-TTAGGG-3' и ассоциированных с ними комплексов белков типа “шелтерин” и некодирующей РНК — TERRA [5,12,13]. Располагаясь на концах хромосом, теломеры защищают их от воздействия нуклеаз, дегградации [3,9,14] и концевых слияний [4]. В связи с концевой недорепликацией, вызванной особенностями биомеханизма действия ДНК-полимеразы, в ходе клеточных делений теломеры укорачиваются [10]. Существуют, однако, механизмы удлинения теломер с помощью фермента теломеразы и гомологичной рекомбинации между теломерными последовательностями

(альтернативное удлинение хромосом — ALT) [6]. Таким образом, длина теломер находится в динамическом равновесии, которое регулируется балансом между удлинением и укорочением теломерных участков.

Длина теломер может критически изменяться под влиянием негативных экзогенных и эндогенных факторов, что влечёт за собой преждевременное клеточное старение, потерю клеткой жизнеспособности и апоптоз [11]. Известны также вещества, способствующие увеличению длины теломер благодаря активации теломеразы. Так, добавление пептида AEDG в культуру эмбриональных фибробластов человека индуцирует экспрессию гена теломеразы и активацию собственно фермента теломеразы, что приводит к увеличению длины теломер в 2.4 раза [7].

Цель данной работы — исследование влияния пептида AEDG на длину теломер и митотическую

Адрес для корреспонденции: miayu@yandex.ru. Линькова Н.С.



активность митогенстимулированных лимфоцитов крови людей разного возраста.

Методика исследования

Материалом для исследования являлись лимфоциты периферической крови 5 мужчин молодого возраста (18-22 лет) и 6 мужчин среднего возраста (49-54 лет). Критерии включения в исследование: отсутствие табачной, алкогольной и наркотической зависимости, симптомов острой вирусной инфекции в течение 1 мес до забора крови, хронических заболеваний, а также систематического приёма лекарственных препаратов.

Культивирование лимфоцитов проводили с помощью полумикрометода по стандартной методике с использованием митогена фитогемагглютинина (ФГА) [1]. На 48-м часу в культуральные флаконы добавляли пептид AEDG в конечной концентрации 1000 нг/мл. В контрольный флакон пептид не добавляли. На 71-м часу культивирования во флаконы добавляли 1% раствор колхицина. Суспензию клеток фиксировали раствором метанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1, затем раскапывали на охлаждённые до 4°C мокрые предметные стёкла над паровой баней.

Митотический индекс ФГА-стимулированных лимфоцитов вычисляли по соотношению доли делящихся клеток и общего числа анализированных клеток на препаратах.

Для оценки относительной длины теломер метафазных хромосом проводили флюоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) с ДНК-зондами, специфичными к теломерным последовательностям хромосом человека (Telomere PNA Kit/Су3; DAKO) и к локусу в коротком плече хромосомы 9 (CDKN2A; Abbott Molecular) в качестве реперного зонда. FISH проводили в соответствии с рекомендациями производителей ДНК-зондов. После проведения FISH получали фотоизображения метафазных пластинок (рис. 1). С помощью программы ImageJ 1.48v определяли среднюю интенсивность флюоресценции гибридизационного сигнала ДНК-зонда к теломерным последовательностям на хромосомах 1, 9, 16. Для нивелирования влияния конденсации хромосом на результат измерения вычисляли среднюю относительную длину теломер хромосом, которую определяли путём отношения среднего значения интенсивности флюоресценции гибридизационного сигнала теломерспецифических ДНК-зондов и реперного ДНК-зонда. Была измерена интенсивность флюоресценции 7280 гибридизационных сигналов на 260 метафазных пластинках.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism Version 6.01. Для анализа изменений митотического индекса после воз-

действия пептида AEDG применяли критерий χ^2 с поправкой Йейтса для таблиц сопряжённости. Для анализа изменений относительной длины теломер после воздействия пептида AEDG использовали критерий Манна—Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

Результаты исследования

Процент делящихся клеток в контроле варьировал от 4.1 до 8.6% в младшей и от 5.9 до 9.5% в средней возрастной группе. После воздействия пептида AEDG процент делящихся клеток на препаратах достоверно не изменялся в младшей возрастной группе, но достоверно уменьшился на 38% у одного индивида средней возрастной группы (таблица).

Относительная длина теломер хромосом из ФГА-стимулированных лимфоцитов в контрольной серии опытов варьировала от 0.86 до 1.75 и от 0.63 до 1.64 у лиц молодого и среднего возраста соответственно. Достоверных различий по этому параметру между группами установлено не было, хотя наблюдалась тенденция к снижению относительной длины теломер в средней возрастной группе (рис. 2).

После воздействия пептида AEDG установлены достоверные изменения относительной длины теломер у 7 из 11 индивидов. Показано достоверное увеличение относительной длины теломер у двух индивидов молодого возраста (на 41 и 55%) и у трёх индивидов среднего возраста (на 156, 18 и 76% соответственно) (рис. 2). Достоверное уменьшение относительной длины теломер установлено у одного индивида молодого возраста (на 37%) и среднего возраста (на 15%) (рис. 2).

Таким образом, пептид AEDG, добавленный в культуру ФГА-стимулированных лимфоцитов,

Митотический индекс (%) ФГА-стимулированных лимфоцитов без и после воздействия пептида AEDG

Номер индивида	Без воздействия	Пептид AEDG
1	8.6	10.3
2	6.7	5.8
3	4.1	3.7
4	6.1	6.2
5	8.3	10.2
6	9.5	10.6
7	7.7	6.5
8	7.6	4.7**
9	5.9	7.5
10	7.4	7.2
11	7.0	8.6

Примечание. ** $p < 0.01$ (критерий Манна—Уитни).

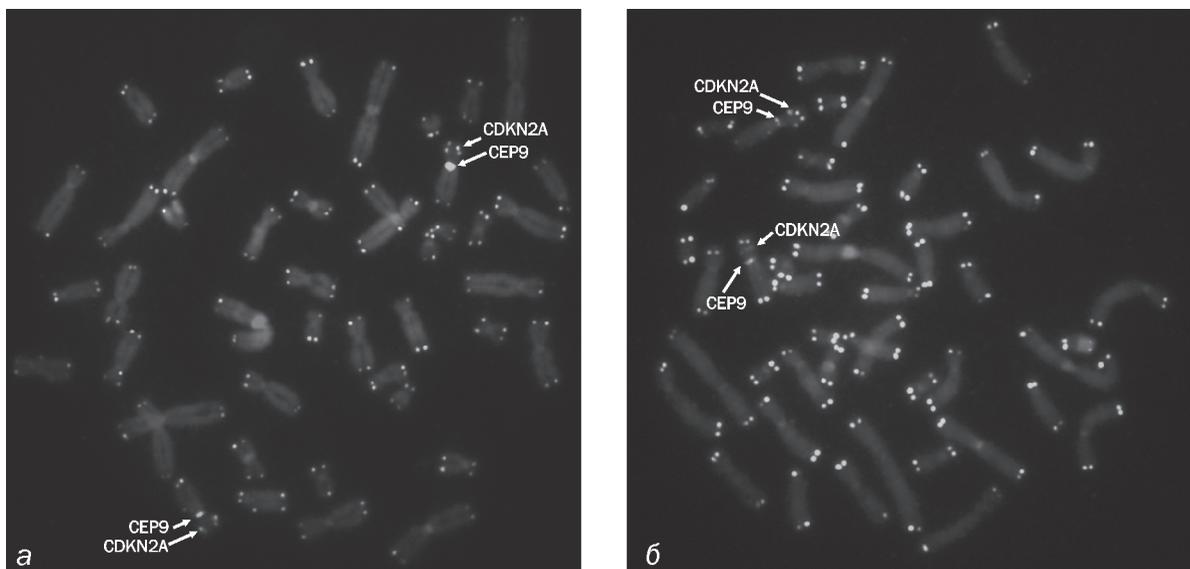


Рис. 1. Метафазные пластинки из ФГА-стимулированных лимфоцитов, культивированных без добавления пептида (а) и с добавлением пептида AEDG (б), после флуоресцентной гибридизации *in situ* с теломерспецифическими реперным (CDKN2A) и центромерспецифичным (CEP9) ДНК-зондами.

вызывал изменение длины теломер у 7 из 11 индивидов. Достоверные изменения длины теломер были более характерны для лиц средней возрастной группы, чем для младшей (4 и 3 случая соответственно). Увеличение длины теломер после воздействия пептида AEDG было отмечено в 2.5 раза чаще, чем уменьшение (5 и 2 случая соответственно). Достоверное увеличение относительной длины теломер выявлено у двух индивидов

младшей возрастной группы и у трёх индивидов средней возрастной группы. Достоверное уменьшение длины теломер зарегистрировано у одного индивида в младшей возрастной группе и у одного — в средней возрастной группе. Наибольшее увеличение длины теломер (на 156%) было выявлено у одного индивида средней возрастной группы, у которого также было показано достоверное уменьшение митотического индекса. При

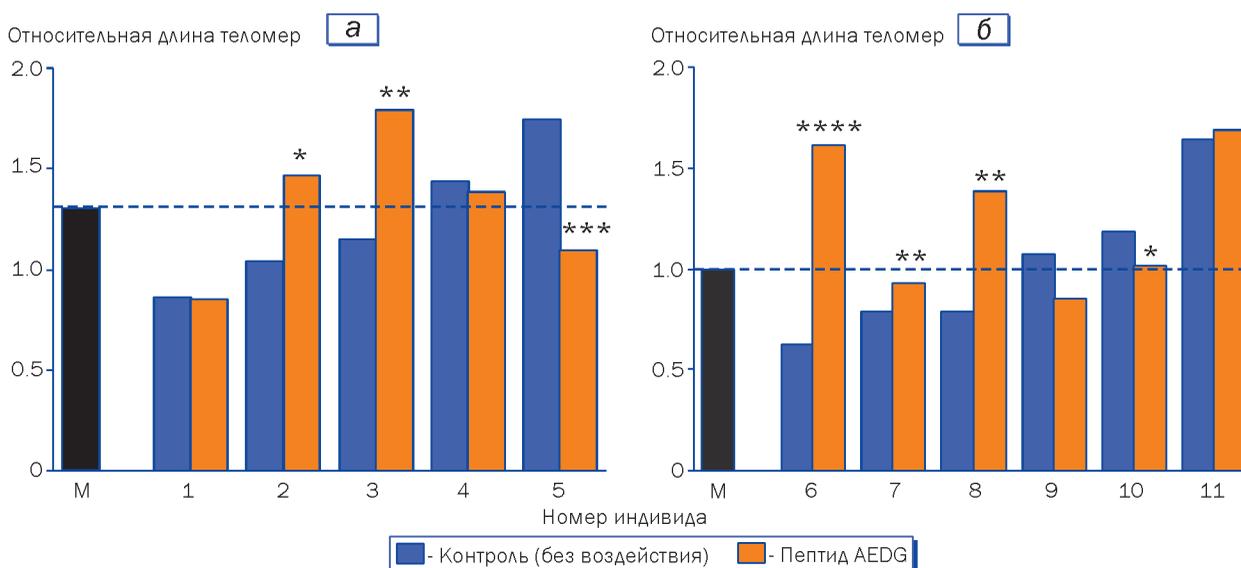


Рис. 2. Относительная длина теломерных районов хромосом ФГА-стимулированных лимфоцитов в контроле и после добавления пептида AEDG у индивидов молодого (а) и среднего (б) возраста.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ по сравнению с контролем (критерий Манна–Уитни). Столбец М и пунктирная линия — среднее для данной возрастной группы значение относительной длины теломерных районов хромосом без добавления пептида AEDG.



этом отмечена тенденция к нормализации длин теломер: их увеличению у тех испытуемых, у которых была выявлена исходно меньшая длина по отношению к средней внутри группы, и к уменьшению, если индивидуальное значение превышало среднее внутри группы.

Пептид AEDG не влияет на митотическую активность ФГА-стимулированных лимфоцитов крови индивидов молодого и среднего возраста, однако стимулирует пролиферацию фетальных фибробластов человека, как было показано ранее [8]. Возможно, фетальные фибробласты имеют больший биологический резерв митотической активности, чем лимфоциты крови индивидов молодого и среднего возраста. Кроме того, пептид AEDG является тканеспецифичным [2], и его активность или её отсутствие может зависеть от типа клеток, используемых в эксперименте.

Пептид AEDG модулирует относительную длину теломер лимфоцитов крови индивидов молодого и среднего возраста. При этом стимулирующий эффект пептида AEDG в отношении относительной длины теломер лимфоцитов крови проявляется при исходно сниженном значении этого показателя. Полученные результаты согласуются с данными о стимулирующем влиянии пептида AEDG на активность гена и фермента теломеразы в фетальных фибробластах [8]. Можно предположить, что пептид AEDG в разных типах клеток человека регулирует активность гена теломеразы, функцию соответствующего фермента и длину теломер.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках темы прикладных научных исследований на 2017-2019 гг. (AAAA-A17-117042510406-1). А.С.Кольцова и М.И.Крапивин являются получателями стипендии Президента РФ.

Литература

1. Кузнецова Т.В., Логинова Ю.А., Чиряева О.Г., Пендина А.А., Ефимова О.А., Федорова И.Д., Баранов В.С. Цитогене-

тические методы // Медицинские лабораторные технологии / под ред. А.И.Карпищенко. Москва, 2013. Т. 2. С. 623-650.

2. Anisimov V.N., Khavinson V.Kh. Peptide bioregulation of aging: results and prospects // *Biogerontology*. 2010. Vol. 11, N 2. P. 139-149.
3. Azzalin C.M., Lingner J. Molecular biology: damage control // *Nature*. 2007. Vol. 448. P. 1001-1002.
4. deLange T. Protection of mammalian telomeres // *Oncogene*. 2002. Vol. 21, N 4. P. 532-540.
5. Déjardin J., Kingston R.E. Purification of proteins associated with specific genomic loci // *Cell*. 2009. Vol. 136, N 1. P. 175-186.
6. Dunham M.A., Neumann A.A., Fasching C.L., Reddel R.R. Telomere maintenance by recombination in human cells // *Nat. Genet.* 2000. Vol. 26, N 4. P. 447-450.
7. Khavinson V.Kh., Bondarev I.E., Butyugov A.A. Epithalon peptide induces telomerase activity and telomere elongation in human somatic cells // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2003. Vol. 135, N 6. P. 590-592.
8. Khavinson V.Kh., Bondarev I.E., Butyugov A.A., Smirnova T.D. Peptide promotes overcoming of the division limit in human somatic cell // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2004. Vol. 137, N 5. P. 503-506.
9. Lundblad V. DNA ends: maintenance of chromosome termini versus repair of double strand breaks // *Mut. Res.* 2000. Vol. 451, N 1-2. P. 227-240.
10. Olovnikov A.M. A theory of marginotomy: the incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon // *J. Theor. Biol.* 1973. Vol. 41, N 1. P. 181-190.
11. O'Sullivan R.J., Karlseder J. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2010. Vol. 11, N 3. P. 171-181.
12. Ozturk S., Sozen B., Demir N. Telomere length and telomerase activity during oocyte maturation and early embryo development in mammalian species // *Mol. Hum. Reprod.* 2013. Vol. 20, N 1. P. 15-30.
13. Schoeftner S., Blasco M.A. Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II // *Nat. Cell Biol.* 2008. Vol. 10, N 2. P. 228-236.
14. Zhao Y., Hoshiyama H., Shay J.W., Wright W.E. Quantitative telomeric overhang determination using a double-strand specific nuclease // *Nucleic Acids Res.* 2007. Vol. 36, N 3. e14.

Получено 15.03.19