

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

©Коллектив авторов

ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭКСТРАКТОВ ИЗ МЫШЦ РЫБ ОТ ИНДУЦИРОВАННОГО ОКИСЛИТЕЛЬНЫМ СТРЕССОМ КЛЕТОЧНОГО СТАРЕНИЯ

М.В. Михайлова, Н.Ф. Беляева*, Н.И. Козлова, К.В. Золотарёв, А.Н. Михайлов, А.Е. Берман, А.И. Арчаков

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121, Москва, ул. Погодинская, 10; эл. почта natalia.belyaeva@ibmc.msk.ru

Показано, что экстракты из мышц некоторых видов рыб: щуки (*Esox lucius*), стерляди (*Acipenser ruthenus*), горбуши (*Oncorhynchus gorbusha*) и, в меньшей степени, окуня (*Perca fluviatilis*) и русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii*) препятствуют развитию преждевременного старения эмбриональных фибробластов человека, вызванному сублетальной концентрацией H_2O_2 . Мышечные экстракты других видов рыб – кижуча (*Oncorhynchus kisutch*) и судака (*Sander lucioperca*), такой способности не проявляли. Пролиферация клеток после воздействия мышечных экстрактов, ингибирующая старение, усиливалась. Обсуждаются возможные механизмы действия природных биологически-активных соединений, препятствующих развитию стресс-индуцированного клеточного старения.

Ключевые слова: клеточное старение, окислительный стресс, эмбриональные фибробласты человека, мышечные экстракты рыб

DOI: 10.18097/PBMC20176304351

ВВЕДЕНИЕ

Клеточное старение связано с необратимой остановкой пролиферации и может быть вызвано как эндогенными, так и экзогенными факторами, такими как повреждение ДНК, окислительный стресс, недостаток факторов роста, химические агенты [1, 2]. Различают репликативное и стресс-индуцированное (преждевременное) старение, которые имеют целый ряд общих свойств.

К основным признакам клеточного старения относят:

- 1) Изменения морфологии клеток (клетки увеличиваются в размере и уплощаются, диаметр ядер возрастает в несколько раз).
- 2) Увеличение активности β -галактозидазы при значении pH 6,0.
- 3) Повышение уровня экспрессии ингибиторов циклин-зависимых киназ p16 и (или) p21, что приводит к аресту клеточной пролиферации.

Наиболее широко используемым биомаркером клеточного старения принято считать β -галактозидазу (senescence-associated beta-galactosidase, SA- β -Gal). В норме SA- β -Gal активна при pH 4,0, а при старении клеточной культуры увеличивается число клеток, в которых этот фермент активен при pH 6,0 [3].

Исследование клеточного старения представляется важным для понимания причин и механизмов старения организма в целом [4], а также для поиска биологически-активных соединений, способных препятствовать старению.

Окислительный стресс является одним из основных факторов, который играет ключевую роль в развитии старения. Хорошо известно, что фибробласты подвергаются стресс-индуцированному преждевременному старению (stress-induced premature

senescence, SIPS) *in vitro* при выдерживании с сублетальными концентрациями H_2O_2 [5-7].

Экстракты из тканей растений и животных представляют собой ценные источники биологически активных природных соединений. В настоящее время имеются данные о том, что растительные экстракты способны замедлять клеточное старение [5, 8]. Что касается рыб, то имеются сведения об антивозрастном действии экстрактов из икры белуги и лосося, полученные на культуре фибробластов человека [9-10]. В то же время такого рода данные, касающиеся мышечных экстрактов рыб, в литературе отсутствуют.

В задачу настоящего исследования входило выявление возможности мышечных экстрактов разных видов рыб влиять на стресс-индуцированное клеточное старение. В качестве модели была использована культура клеток эмбриональных фибробластов человека, в которой преждевременное старение индуцировали сублетальной концентрацией H_2O_2 .

МЕТОДИКА

В работе были использованы водные экстракты, полученные из мышц разных видов рыб: щуки (*Esox lucius*), судака (*Sander lucioperca*), окуня (*Perca fluviatilis*), стерляди (*Acipenser ruthenus*), горбуши (*Oncorhynchus gorbusha*), кижуча (*Oncorhynchus kisutch*) и русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii*). Щука, судак, окунь были выловлены в Угличском водохранилище Тверской области, горбуша и кижуч – на Сахалине, стерлядь и русский осетр – выращены в аквакультурных хозяйствах (Тверская и Астраханская области, соответственно). Срезанные со спины мышцы рыб замораживали и хранили до использования при -18°C . Для получения экстракта 80 г мышцы

* - адресат для переписки

измельчали в мясорубке, заливали водой в соотношении 1:3, гомогенизировали в блендере и экстрагировали в течение 1 ч. Осадок удаляли центрифугированием при 6000 g в течение 15 мин, а надосадочную жидкость подвергали лиофилизации. Содержание белка в лиофилизированных экстрактах определяли микробиуретовым методом после растворения в фосфатно-солевом буфере [11].

Культура клеток

В работе использовали клетки ЛЭЧ-Т, полученные из лёгочной ткани 10-недельного эмбриона человека мужского пола. Клетки получены из Федерального научно-исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи (Москва). Клетки, прошедшие контрольное обследование в полном объёме, включая определение туморогенности методом колониеобразования в мягком агаре, чувствительны к широкому кругу вирусов, активно продуцируют интерферон. Клетки культивировали в среде DMEM с 10% FBS в 5% CO₂ при температуре 37°C.

Индукцию преждевременного старения в результате окислительного стресса проводили с использованием сублетальной концентрации H₂O₂ [5]. С этой целью клетки обрабатывали 50 мкМ H₂O₂ в течение 1 ч, затем трижды отмывали фосфатно-солевым буфером (PBS) для удаления H₂O₂ и инкубировали в полной среде (DMEM с 10% FBS) в течение 4 ч. После этого к фибробластам добавляли лиофилизированный экстракт из мышц рыб, растворённый в PBS до конечной концентрации 500 мкг белка/мл, и инкубировали в течение 24 ч.

Клеточное старение оценивали с помощью окрашивания на β-галактозидазу (SA-β-Gal, pH 6,0), согласно инструкции к набору Senescence β-Galactosidase Staining Kit #9860 ("Cell Signaling Technology", США). Клетки, окрашенные в синий цвет, а также общее число клеток подсчитывали при увеличении в 200 раз. Старение оценивали по доле клеток с синим окрашиванием среди общего числа клеток в каждой лунке планшета [12]. SA-β-Gal-положительные клетки выражали в процентах от общего числа клеток, обработанных перекисью водорода.

Для исследования пролиферации клетки (5×10³ клеток/лунка) были посеяны в 96-луночные планшеты по три параллели для каждой группы. На следующий день клетки обрабатывали так же, как и для оценки SA-β-Gal. После инкубации в течение 96 ч клетки окрашивали Crystal violet и измеряли поглощение при 570 нм. Пролиферацию выражали в виде % от оптической плотности клеток, обработанных перекисью водорода.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение активности SA-β-Gal в клетках основано на появлении в цитоплазме характерных синих гранул после инкубации клеток с субстратом X-Gal при pH 6,0. Мы наблюдали значительное увеличение интенсивности окраски и числа SA-β-Gal-позитивных клеток спустя 24 ч после действия H₂O₂ (рис. 1). Число окрашенных на β-галактозидазу клеток в контроле

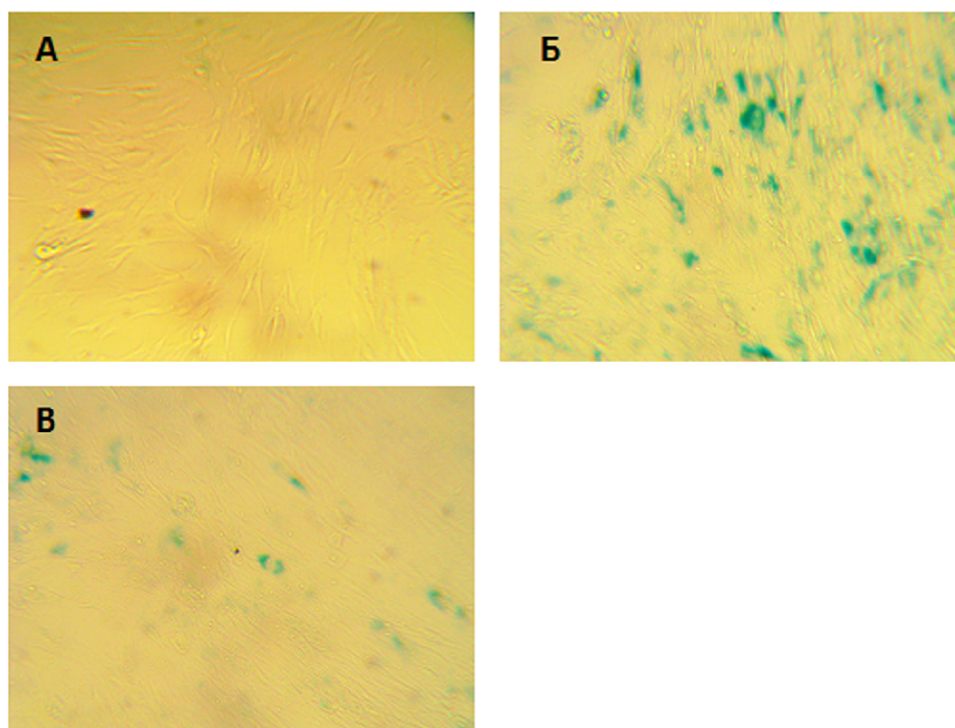


Рисунок 1. Действие экстракта из мышц щуки на старение клеток ЛЭЧ-Т (окраска на SA-β-Gal), индуцированное H₂O₂. А - клетки без обработки H₂O₂. Б - клетки после обработки 50 мкМ H₂O₂ в течение 1 ч (окраска на SA-β-Gal через 24 ч) - контроль. В - клетки после инкубация с экстрактом из мышц щуки в течение 24 ч после индукции клеточного старения - опыт.

(без обработки H_2O_2) варьировало от 5 до 13% от общего числа клеток, а после воздействия H_2O_2 число таких клеток возрастало до 60-70%.

Следует отметить, что преинкубация клеток с мышечным экстрактом до индукции клеточного старения (обработка H_2O_2) не влияла на число SA- β -Gal-позитивных клеток. Это может быть связано как с быстрым внутриклеточным метаболизмом низкомолекулярных соединений экстрактов, проявляющих защитные свойства, так и с необходимостью присутствия внеклеточных агентов (которые будут удалены вместе с экстрактом), препятствующих развитию стресс-индуцированного преждевременного старения (SIPS).

Как видно из данных, представленных на рисунке 2А, экстракты, полученные из мышц рыб разных видов, по-разному влияли на развитие (проявление) фенотипа клеточного старения (количество SA- β -Gal-позитивных клеток). Наибольшую защиту проявляли экстракты их мышц стерляди, горбуши и щуки (в среднем на 40-50%), и в меньшей степени – экстракты из мышц окуня и русского осетра (в среднем на 30%).

Следует отметить, что, денатурация и частичное удаление белков после кратковременной термообработки не оказывали влияния на клеточное старение, однако, более длительная термообработка приводила к снижению защитного действия экстракта (данные не приведены).

На рисунке 2Б приведены результаты по пролиферации фибробластов через 96 ч после обработки клеток H_2O_2 . Наблюдаемое усиление пролиферации может быть связано с действием на клетки, находящиеся в покое и не подвергнутые героконверсии (переход от обратимого ареста пролиферации к необратимому [13]), полипептидных факторов роста, которые могут присутствовать в экстракте. В таком случае, чем больше таких “непостаревших” клеток, тем сильнее будет выражена пролиферация, что согласуется с данными, представленными на рисунке 3. В то же время, экстракт из мышц судака, практически не оказывая влияние на преждевременное старение, на 37% усиливал пролиферацию клеток через 96 ч после индукции окислительного стресса (рис. 2Б), что может указывать на вовлечение различных факторов в эти процессы.

Универсальной схемы развития клеточного старения нет, и его механизм зависит, прежде всего, от стрессового фактора и используемой клеточной линии. Ниже мы рассмотрим вызываемые действием H_2O_2 изменения, которые могут повлиять на жизнеспособность фибробластов и привести к индукции клеточного старения. Так, на культуре клеток IMR-90 (фибробласты лёгкого эмбриона человека) было установлено, что сразу же после обработки клеток H_2O_2 в сублетальной концентрации происходит дефосфорилирование белка ретинобластомы (pRb), что сопровождается последовательной индукцией p53, p21 и p16. Кроме того, pRb участвует в индукции морфологических изменений, индуцированных

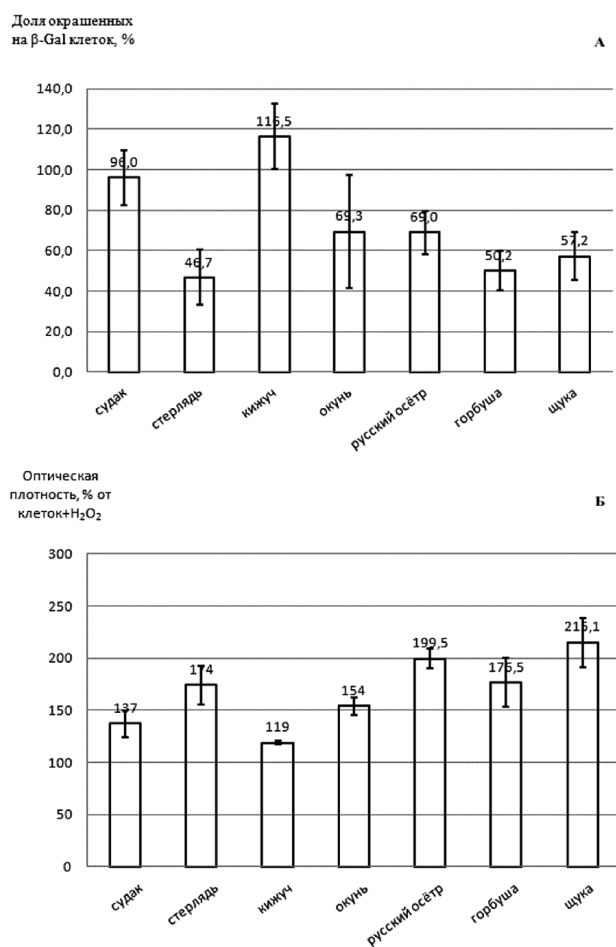


Рисунок 2. Действие экстрактов из мышц рыб различных видов на старение (А) (доля SA- β -Gal-позитивных клеток) и пролиферацию (Б) клеток ЛЭЧ-Т. А - для индукции SIPS клетки обрабатывали 50 мкМ H_2O_2 в течение 1 ч и через 24 ч окрашивали на β -Gal. За 100% принято число клеток, обработанных H_2O_2 (контроль). Б - пролиферацию клеток оценивали через 96 ч после индукции SIPS, используя crystal violet. Результаты представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение из трёх независимых экспериментов. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

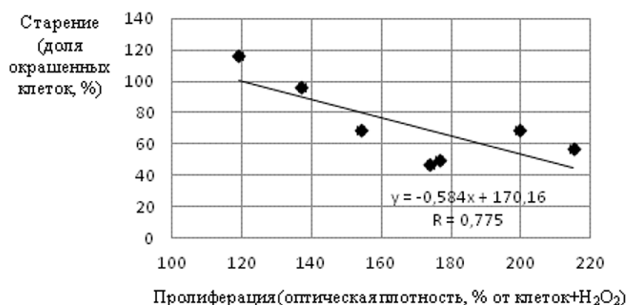


Рисунок 3. Зависимость между торможением старения (число SA- β -Gal-позитивных клеток), вызванного окислительным стрессом, и пролиферацией фибробластов после инкубации с мышечными экстрактами (использованы данные, представленные на рисунках 2А и 2Б).

действием H_2O_2 [6]. При этом индукция p16 совпадала с увеличением активности SA- β -gal [7]. Считается, что p53 и p21^{CIP1/WAF1} играют важную роль в инициации клеточного старения, а p16^{INK4a} передаёт сигналы, приводящие к необратимой остановке пролиферации [14].

В клеточной культуре наблюдается неоднородность ответа на сублетальное стрессовое воздействие: некоторые клетки могут восстанавливаться и повторно входить в клеточный цикл, тогда как в других – остановка пролиферации необратима и проявляется фенотип клеточного старения.

В зависимости от типа клеток, условий культивирования и стрессовых воздействий для предотвращения старения необходима инактивация либо p53-p21-pRb-, либо p16-pRb-зависимых путей по отдельности или обоих сигнальных путей, а также ключевых сигнальных белков MAP-киназного каскада – ERK1/2, p38, JNK и Akt/PKB, которые также активируются в фибробластах под действием окислительного стресса.

Разнообразие биохимических каскадов, участвующих в развитии и поддержании фенотипа клеточного старения, предполагает множество мишеней в действии агентов, препятствующих старению. Так, рапамицин – ингибитор киназы mTOR – предотвращает переход обратимого ареста пролиферации к p21^{CIP1/WAF1}-зависимому клеточному старению, как в раковых, так и в нормальных клетках [15-16]. Содержащийся в кожуре и косточках красного винограда ресвератрол в концентрациях, которые ингибируют mTOR, также тормозит клеточное старение [17].

Исследования, проведенные *in vitro* и *in vivo*, показывают, что соединения, содержащиеся в растениях (полифенолы, флавоноиды, терпеноиды, витамины), способны активировать редокс-чувствительную Nrf2-сигнальную систему, которая усиливает экспрессию антиоксидантных генов и, тем самым, улучшает защиту от окислительного стресса и старения [2, 18]. Например, активаторы Nrf2 обнаружены в экстрактах брокколи [8]. Широко используемый в традиционной китайской медицине камфорный гриб *Antrodia cinnatomea* содержит тритерпеноиды, способные препятствовать преждевременному старению фибробластов, активируя Nrf2-зависимые антиоксидантные гены и усиливая экспрессию SIRT-1 (NAD⁺-зависимую гистондеацетилазу), которая взаимодействует также с рядом молекул, включая p53 и FoxO1 [2, 19]. Экспрессию SIRT-1 усиливают и не содержащие спирт экстракты красного вина, которые защищают клетки эндотелия от индуцированного окислительным стрессом старения на 26-40% [20]. Водные экстракты из листьев, цветов и корней одуванчика (*Taraxacum officinale*) тормозили стресс-индуцированное старение фибробластов кожи человека, вызванного перекисью водорода, на 62%, 73% и 40%, соответственно. При этом защитное действие экстракта одуванчика не зависело от того, был ли он добавлен до или после H_2O_2 [21]. Используемый в китайской медицине водный экстракт из шести растений

(Kangen-karyu) защищал фибробласты от стресс-индуцированного старения, как в условиях преинкубации, так и при добавлении после H_2O_2 . Однако количественной оценки ингибирования клеточного старения авторы не приводят [5, 22]. В то же время, широко используемый в косметологии экстракт центеллы (*Centella asiatica*) добавленный к фибробластам человека до индукции старения H_2O_2 уменьшал число клеток, окрашенных на SA- β -gal, лишь на 21%, а добавленный после обработки перекисью водорода – вообще не влиял на число SA- β -gal-позитивных клеток [23]. В отличие от растительных экстрактов, исследованные в настоящей работе экстракты из мышечной ткани рыб оказывали защитное действие от клеточного старения только после индукции окислительного стресса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами установлено, что биологически-активные соединения мышечных экстрактов щуки, стерляди, горбуши и, в меньшей степени, окуня и русского осетра способны препятствовать индукции преждевременного клеточного старения, вызванного окислительным стрессом. Природу этих соединений, а также мишени их действия и сигнальные пути необходимо исследовать. В то же время, эффекты таких сложных смесей, какими являются экстракты, могут быть результатом синергичного действия многих соединений при отсутствии какой-либо значительной активности каждого из них в отдельности.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в рамках Соглашения о предоставлении субсидии №14.607.21.0129 от 27.10.2015 “Разработка тест-системы для оценки безопасности химической продукции в отношении здоровья *in vitro*”.

ЛИТЕРАТУРА

1. Campisi J. (2013) Annu. Rev. Physiol., **75**, 685-705.
2. Senthil K.K., Gokila V.M., Mau J.L., Lin C.C., Chu F.H., Wei C.C., Liao V.H., Wang S.Y. (2016) Oncotarget, **7**, 62836-62861.
3. Dimri G.P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E.E., Linskens M., Rubelj I., Pereira-Smith O., Peacocke M., Campisi J. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **92**, 9363-9367.
4. van Deursen J.M. (2014) Nature, **509**, 439-446.
5. Cho E.J., Okamoto T., Yokozawa T. (2008) J. Pharm. Pharmacol., **60**, 1537-1544.
6. Chen Q.M., Tu V.C., Catania J., Burton M., Toussaint O., Dilley T. (2000) J. Cell Sci., **113**, 4087-4097.
7. Chen J.H., Stoeber K., Kingsbury S., Ozanne S.E., Williams G.H., Hales C.N. (2004) J. Biol. Chem., **279**, 49439-49446.
8. Argyropoulou A., Aligiannis N., Trougakos I.P., Skaltsounis A.L. (2013) Nat. Prod. Rep., **30**, 1412-1437.
9. Marotta F., Polimeni A., Solimene U., Lorenzetti A., Minelli E., Jain S., Rastmanesh R., Sedriep S., Soresi V. (2012) Rejuvenation Research, **15**, 174-177.

10. Yoshino A., Polouliakh N., Meguro A., Takeuchi M., Kawagoe T., Mizuki N. (2016) Clin. Interv. Aging, **11**, 1159-1168.
11. Itzhaki R.F., Gill D.M. (1964) Anal. Biochem., **9**, 401-410.
12. Wang Z., Wei D., Xiao H. (2013) Methods Mol. Biol., **1048**, 137-139.
13. Blagosklonny M.V. (2014) Cell Cycle, **13**, 3628-3635.
14. Simboeck E., Di Croce L. (2013) Aging, **5**, 590-601.
15. Demidenko Z.N., Zubova S.G., Bukreeva E.I., Pospelov V.A., Pospelova T.V., Blagosklonny M.V. (2009) Cell Cycle, **8**, 1888-1895.
16. Blagosklonny M.V. (2012) Aging, **4**, 159-165.
17. Demidenko Z.N., Blagosklonny M.V. (2009) Cell Cycle, **8**, 1901-1904.
18. Giovannelli L., Pitozzi V., Jacomelli M., Mulinacci N., Laurenzana A., Dolara P., Mocali A. (2011) J. Gerontol. Biol. Sci. Med. Sci., **66**, 9-18.
19. Brunet A., Sweeney L.B., Sturgill J.F., Chua K.F., Greer P.L., Lin Y., Tran H., Ross S.E., Mostoslavsky R., Cohen H.Y. et al. (2004) Science, **303**, 2011-2015.
20. Botden I.P., Oeseburg H., Durik M., Leijten F.P., Van Vark-Van Der Zee L.C., Musterd-Bhaggoe U.M., Garrelds I.M., Seynhaeve A.L., Langendonk J.G., Sijbrands E.J., Danser A.H., Roks A.J. (2012) Clin. Sci., **23**, 499-507.
21. Yang Y., Li S. (2015) Oxid. Med. Cell Longev., **2015**, 619560. DOI: 10.1155/2015/619560.
22. Satoh A., Yokozawa T., Kim Y.A., Cho E.J., Okamoto T., Sei Y. (2005) J. Pharm. Pharmacol., **57**, 1335-1343.
23. Kim Y.J., Cha H.J., Nam K.H., Yoon Y., Lee H., An S., Kim Y.J., Cha H.J., Nam K.H., Yoon Y., Lee H., An S. (2011) Exp. Dermatol., **20**, 998-1003.

Поступила: 01. 06. 2017.
Принята к печати: 27. 06. 2017.

PROTECTIVE ACTION OF FISH MUSCLE EXTRACTS AGAINST CELLULAR SENESCENCE INDUCED BY OXIDATIVE STRESS

M.V. Mikhailova, N.F. Belyaeva, N.I. Kozlova, K.V. Zolotarev, A.N. Mikhailov, A.E. Berman, A.I. Archakov

Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; e-mail: natalia.belyaeva@ibmc.msk.ru

Muscle extracts of some fish species, i.e. pike (*Esox lucius*), sterlet (*Acipenser ruthenus*), pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) and, to a lesser extent, perch (*Perca fluviatilis*) and Russian sturgeon, (*Acipenser gueldenstaedtii*) prevent the development of premature senescence of the human embryonic fibroblasts induced by the sublethal concentration of H₂O₂. Muscle extracts of other fish species tested, i.e. coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and zander (*Sander lucioperca*), have not demonstrated this feature. Cell proliferation increased after the action of the senescence-inhibiting muscle extracts. Possible mechanisms of the action of nature biologically active compounds that interfere with the development of stress-induced cell senescence are discussed.

Key words: cellular senescence, human embryonic fibroblasts, fish muscle extracts