

УДК 591.3

НАРУШЕНИЯ МЕЖКЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ
ПРИ СТАРЕНИИ МОГУТ БЫТЬ ИСПРАВЛЕНЫ

© 2020 г. В. Я. Бродский*

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

*e-mail: Brodsky.idb@bk.ru

Поступила в редакцию 15.03.2020 г.

После доработки 25.03.2020 г.

Принята к публикации 27.03.2020 г.

В кратком обзоре суммированы данные о возможности компенсации одного из нарушений биологии клеток при старении. В культурах гепатоцитов старых крыс, сравнительно с молодыми, снижены амплитуды ритма синтеза белка. Как и другие окологасовые (ультрадианные) ритмы *in vitro*, ритм синтеза белка является маркером синхронизации клеточной популяции путем прямых межклеточных взаимодействий. Амплитуды ритма характеризуют выраженность взаимодействий. Они увеличивались после добавления в среду культур ранее выявленных сигнальных факторов организации межклеточных взаимодействий: ганглиозидов, фенилэфрина, мелатонина, глутаминовой кислоты, регуляторных пептидов. К тому же приводило введение трех последних сигнальных факторов крысе *in vivo*. Эффект сохранялся 2–3 дня. Добавление к среде культур сыворотки крови молодой крысы увеличивало амплитуды ритма не меньше, чем сигнальные факторы. Сыворотка крови старой крысы не изменяла ритм. Но сыворотка крови старой крысы, обогащенная ганглиозидами, действовала как молодая сыворотка. Эти данные и сведения литературы позволяют предложить использование сигнальных факторов прямых межклеточных взаимодействий, для улучшения состояния старых людей.

Ключевые слова: межклеточные взаимодействия, старение, ультрадианные ритмы, синтез белка, ганглиозиды, катехоламины, мелатонин, глутаминовая кислота, регуляторные пептиды

DOI: 10.31857/S0475145020040023

Одно из давно известных нарушений метаболизма при старении млекопитающих – изменение обмена белков (Makrides, 1983; Rattan, 2009). Снижается интенсивность синтеза белков – от 20 до 80% в разных тканях. Кроме того, падает точность сборки молекул, накапливаются дефектные белки. Именно это приводит к развитию катаракты и нейродегенеративных болезней. В старости нарушается и катаболизм белков. Мы обнаружили еще одно следствие старения – нарушение кинетики окологасового (ультрадианного) ритма скорости синтеза белка (Brodsky et al., 2004).

Для того, чтобы стала понятна значимость нашего открытия, необходимо сначала рассказать о том, что такое ультрадианные ритмы и какую роль они играют в жизни разных организмов. Окологасовые (ультрадианные) ритмы – это ритмы с периодами от 20 до 120 минут. Они принципиально отличаются от суточного ритма многих процессов, миллионными лет вынужденно принятыми всеми формами жизни из-за регуляторной смены дня и ночи; суточные циклы регулируются у всех организмов на генетическом уровне. Для коротких ритмов такого внешнего датчика-орга-

низатора нет. Они отражают фундаментальную собственно клеточную регуляцию метаболизма на основе обратных связей, как пример фрактальной кинетики. Одно из свойств такой кинетики, замеченное нами, возможность клеток приспособиться к варьирующим внешним условиям путем прямых межклеточных взаимодействий. Окологасовые ритмы в клеточных культурах как раз характеризуют прямые межклеточные взаимодействия. Такие связи клеток, единственные у бактерий, протистов и растений дополняют центральные нервные регуляции у животных (Brodsky, 2006). В клеточных культурах обнаружение любого окологасового ритма характеризует кооперацию клеток. Иного способа согласования колебаний, их синхронизации в культуре нет. Любой окологасовой ритм в клеточной культуре можно использовать как маркер прямых взаимодействий клеток. Есть ритм, значит клетки согласуют свою активность, нет ритма – колебания разрозненны, не синхронны.

Величина размаха колебаний, амплитуд среднего ритма клеточной популяции *in vitro* соответствует синхронности популяции, величине кооперации клеток в организации ритма: чем амплитуды боль-

ше, тем больше клетки взаимодействуют. В несинхронной популяции среднего (суммарного) ритма нет: индивидуальные осцилляторы-клетки колеблются в противофазе.

Экспериментально показано, что клетки в культуре самосинхронизируются путем накопления в межклеточной среде некоторого фактора-синхронизатора, синтезируемого и выделяемого в среду самими клетками (Brodsky et al., 2000). Видимый результат — околочасовой ритм. В плотных культурах с небольшими промежутками между клетками ритм находят уже через несколько минут после смены среды на свежую бессывороточную. В редких культурах с большими промежутками между клетками ритм обнаруживают через несколько часов. На этом основана наша модель исследования механизмов прямых межклеточных взаимодействий: плотные и редкие культуры из клеток одной крысы. Очевидно, что выявление ритма в отмытых редких культурах после добавления к среде некоего фактора, определяет синхронизатор ритма. Если другой какой-то фактор ликвидирует ритм в плотных культурах, найден десинхронизатор ритма. Разумеется, при этом учитываются свойства рецепторов, воспринимающих синхронизирующий или десинхронизирующий сигнал. Так, среди семи семейств рецепторов серотонина два блокируют синхронизацию клеток, а пять стимулируют. Рецепторы одного семейства делают дофамин синхронизатором клеток, а связавшись с рецепторами другого семейства, тот же дофамин становится дезорганизатором ритма.

В организме млекопитающих с развитой и совершенной нервной системой значимость прямого общения клеток, казалось бы, ограничена или даже минимальна. Это не так. Во-первых, прямые взаимодействия остаются после денервации органа. Так ритм синтеза белка, маркера прямых межклеточных взаимодействий сохраняется в гепатоцитах после почти полной ваготомии и десимпатизации печени. Во-вторых, в раннем эмбриональном развитии задолго до становления нервной системы околочасовые метаболические ритмы сохраняются после торможения делений дробления и даже после энуклеации яйцеклетки, то есть прямые взаимодействия клеток являются базовыми в эмбриогенезе. И, третье, экспериментальное нарушение прямых взаимодействий клеток, приводит к их гибели.

Основной маркер наших работ — ритм синтеза белка в первичных культурах гепатоцитов крысы. Результаты подтверждены в исследованиях культур кератиноцитов, клеток окологлазной железы, мезенхимных стромальных клеток, некоторых нейронов. Совпадение с межклеточными взаимодействиями *in vivo* доказано введением синхронизаторов в кровь крысам. В лаборатории Д. Ллойда сходные закономерности обнаружены при изучении дыхания син-

хронных и несинхронных культур дрожжей и амёб (Lloyd, 1998, 2007), в лаборатории Д. Гилберта и К. Хэммонд — в исследованиях ферментов фосфорилирования и дефосфорилирования белков (Hammond et al., 1998; Gilbert and Hammond, 2008).

Ритм синтеза белка обнаружили в плотных культурах гепатоцита крыс от рождения и до старости. Сильно различались амплитуды ритма у молодых и старых животных: в старости снижались примерно вдвое. Следовательно, при старении снижаются взаимодействия клеток, их кооперация в синхронизации индивидуальных колебаний интенсивности синтеза белка.

Введение в среду с плотными культурами гепатоцитов старых крыс синхронизаторов повышало амплитуды ритма до уровня молодых животных. На рис. 1 приведен пример. Видно, что амплитуды ритма синтеза белка в плотных культурах гепатоцитов старой крысы (вес 610 г) значительно меньше, чем у молодой (280 г). Введение в среду с культурами этой старой крысы ганглиозидов или фенилэфрина вскоре (для фенилэфрина через 2 мин) повышало амплитуды ритма клеток старой крысы до уровня культур молодой крысы.

Таким же был результат влияния еще одного синхронизатора — мелатонина (рис. 2). Здесь приведен пример прямого действия мелатонина после введения его в культуральную среду (рис. 2а и 2б) и в опыте *in vivo* после инъекции мелатонина крысе. Еще один синхронизатор, глутаминовая кислота, также как мелатонин, проникая в клетку, как и он, действовал через свои специфические рецепторы (рис. 3). Из опытов *in vivo* следует, что синхронизатор, введенный в кровь (мелатонин) или поглощенный с пищей (глутаминовая кислота), то есть тоже через кровь, доходит до печени, синхронизирует там в течение 2 часов клетки (время постановки культур), и затем его эффект сохраняется еще сутки. Клетки помнят сигнал 2–4 дня.

Наши данные показали, что синхронизаторы ритма синтеза белка, влияя на прямые взаимодействия гепатоцитов, исправляют нарушения кинетики синтеза у старых животных. Гепатоциты — долго живущие клетки. После завершения интенсивных их делений вскоре после рождения крысы, гепатоциты слабо обновляются (один митоз на 10–20 тысяч клеток у взрослых). Без делений гепатоциты могут жить полгода или год, то есть четверть или половину жизни крысы. В старости могут произойти изменения состояния гепатоцитов. Известно, что в печени старых крыс и мышей значительно снижена концентрация ганглиозидов, как суммарных, так и моносиалоганглиозида — GM1 (Nakamura et al., 1993; Ozkok et al., 1999). GM1 — один из двух синхронизаторов гепатоцитов, из десятков содержащихся в печени (Brodsky et al., 2000). Изменения ганглиозидов в сыворотке

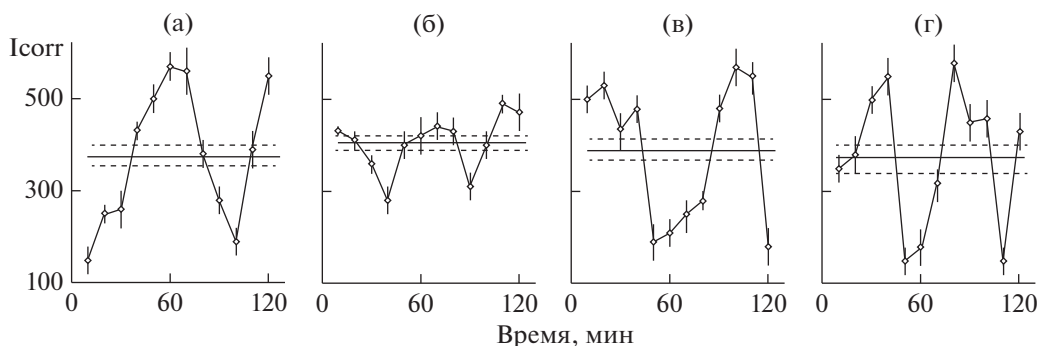


Рис. 1. Кинетика синтеза белка (I_{corr} , cpm) в плотных культурах молодой (280 г) или старой (610 г) крысы – (а) и (б). Действие на культуры старой крысы ганглиозидов (в) или фенилэфрина (г). Суточные культуры отмыты и перенесены в свежую бессывороточную среду, (а) и (б) или в среду с 0.3 мкМ ганглиозидов на 30 мин (в) или в среду с 2 мкМ фенилэфрина на 2 мин (г); затем все культуры опять отмыты и в них определена кинетика синтеза белка (по материалам Brodsky et al., 2004). Прямая линия – среднее для данного варианта опыта; пунктирные линии – ошибка этой средней.

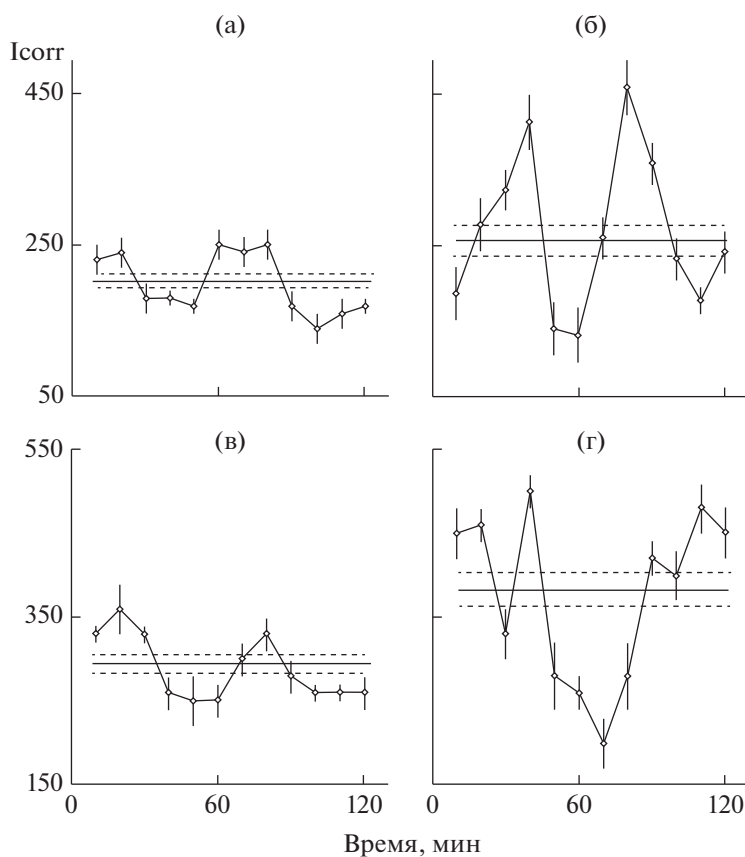


Рис. 2. Влияние мелатонина на кинетику синтеза белка в плотных культурах старых крыс: (а) суточные плотные культуры 2-год (570 г) крысы; (б) в среду с такими культурами этой крысы ввели 5 нМ мелатонина; (в) другой старой крысе (540 г) ввели физраствор и поставили плотные культуры; (г) третьей старой крысе (580 г) ввели 0.017 мкг/кг мелатонина и поставили такие культуры (по материалам Brodsky, Zvezdina, 2010).

крови известны (Senn et al., 1989; Bergelson, 1995). Значительно падает в крови старых крыс концентрация другого синхронизатора – норадrenalина (Прозоровская, 1983). Судя по нашим данным,

стареют не столько клетки, сколько межклеточная среда. И это можно исправить.

Вывод подтвердили в изучении влияния сыворотки крови, то есть межклеточной среды на ки-

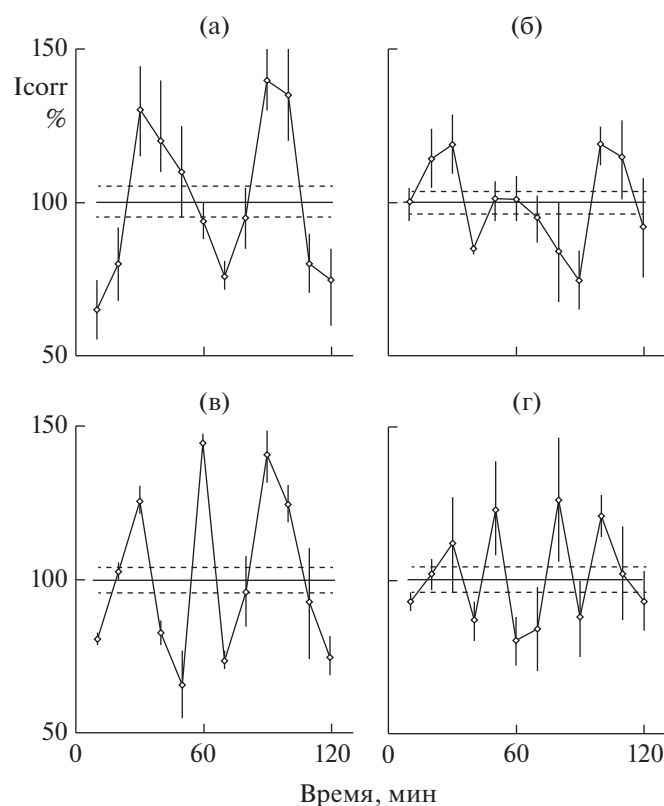


Рис. 3. Действие глутаминовой кислоты на кинетику синтеза белка в плотных суточных культурах гепатоцитов молодой и старой крысы: (а) – культуры молодой крысы отмыты, перенесены в свежую нормальную среду и через 60 мин исследован синтез белка; (б) – такие же культуры старой крысы; (в) – в среду культур той же старой крысы добавлено 0.2 мг/мл глутаминовой кислоты; (г) – в среду добавили ингибитор рецепторов глутаминовой кислоты MCRG (0.01 мг/мл) и затем 0.4 мг/мл глутаминовой кислоты на 60 мин. Включение лейцина с поправкой на пул Icorr выражено в процентах от среднего уровня (100%) для каждого варианта опыта. Пунктир – ошибка этой средней (Brodsky et al., 2018).

нетику синтеза белка в гепатоцитах старых крыс (рис. 4). 10 мин нахождения культур в среде с 10% сыворотки старых крыс не изменили кинетику синтеза белка сравнительно со средой без сыворотки. Сыворотка крови молодых крыс увеличила амплитуды колебаний примерно вдвое. Так же

подействовала старая сыворотка, к которой добавили ганглиозиды. Значит, в старой сыворотке не хватает синхронизаторов, в этом случае, ганглиозидов. По нашему показателю, прямым межклеточным взаимодействиям, старую сыворотку можно превратить в молодую.

Таблица 1. Амплитуды ритма синтеза белка у старых крыс в контроле и после введения синхронизатора

Контроль	Амплитуда (контроль)*	Синхронизатор	Амплитуда (эксперимент)*
<i>In vitro</i>	24 ± 2	Фенилэфрин	62 ± 4
<i>In vitro</i>	То же	Ганглиозиды	46 ± 3
<i>In vitro</i>	23 ± 2	Мелатонин	65 ± 5
<i>In vitro</i>	34 ± 2	Глутаминовая кислота	65 ± 4
<i>In vivo</i>	38 ± 3	То же	68 ± 3
<i>In vitro</i>	44 ± 3	Пептид семакс	91 ± 8
<i>In vitro</i>	То же	Пептид HLDF-6	86 ± 7
<i>In vivo</i>	34 ± 2	Семакс	77 ± 4
<i>In vivo</i>	То же	HLDF-6	73 ± 4

* Амплитуды ритма синтеза белка выражены в % от среднего уровня для каждого варианта опыта, принятого за 100%.

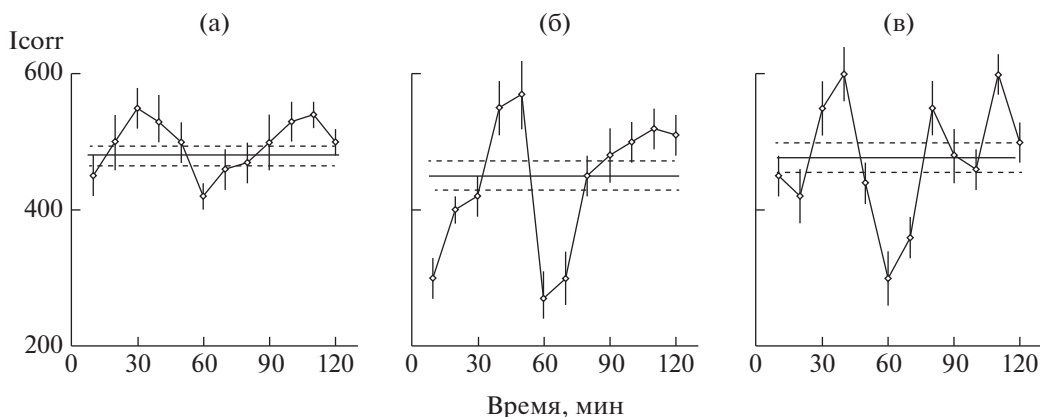


Рис. 4. Влияние сыворотки крови на кинетику синтеза белка (прямые межклеточные взаимодействия) в плотных культурах старой крысы (вес 560 г): (а) — плотные культуры крысы (вес 580 г) отмыли и перенесли в среду с 10% сыворотки старых крыс; через 10 мин исследовали синтез белка; (б) — такие культуры перенесли в среду с 10% сыворотки молодых крыс и также через 10 мин исследовали синтез белка; (в) такие культуры перенесли в сыворотку старых крыс, обогащенную 0.3 мл ганглиозидов (по материалам Brodsky et al., 2004).

В серии опытов выясняли действие сыворотки на редкие культуры молодых крыс (Brodsky et al., 2004). В таких культурах, как уже отмечалось, после смены нормальной среды ритм не определяется несколько часов. Добавление в среду 10% сыворотки крови старых крыс привело к выявлению ритма, но его амплитуды были небольшими, что можно расценить как следствие малой концентрации синхронизирующих факторов в сыворотке старой крысы. Добавление в среду с редкими культурами сыворотки крови молодых крыс привело к обнаружению ритма с высокими амплитудами, такими как на рис. 4б и 4в.

В табл. 1 приведен материал более чем по 50 крысам (наши данные (2000–2020)). Главный вывод: прямые взаимодействия, нарушенные в старости, можно нормализовать, влияя на свойства межклеточной среды.

Независимо Д. Ллойд и др. (Murrey et al., 1999; Lloyd, Murrey, 2005; Lloyd, 2008) в опытах на дрожжах и амебах показали, что окологасовые ритмы этих одноклеточных организуются факторами среды, продуктами активности самих дрожжей. Принципиально важно, что уже найден организатор клеточных популяций дрожжей, общий с популяциями клеток млекопитающих. Нашли влияние серотонина на синхронный рост культур *Candida* (Страховская и др., 1993) и *Saccharomyces* (Цавкелова и др., 2000). Рост дрожжей подавлялся при добавлении к среде *n*-хлорофенилаланина, ингибитора синтеза серотонина и ускорялся парадизолом, ингибирующим моноаминоксидазу, фермент деградации моноаминов. Позже и в лаборатории Ллойда (Lloyd, Murrey, 2005) отмечена чувствительность популяции дрожжей к ингибиторам моноаминоксидазы; эти вещества предотвращают окисление биоаминов, включая

нейротрансмиттеры. В лаборатории А.В. Олескина (2009) фундаментально обосновано влияние серотонина, норадреналина на рост бактерий.

Уже в первых наших исследованиях обнаружили любопытный факт. Небольшая часть кривых кинетики синтеза белка в гепатоцитах молодых крыс имеет низкие амплитуды, а единичные кривые старых животных не отличаются от молодых (рис. 5). По нашему показателю — амплитудам, характеризующим выраженность прямых

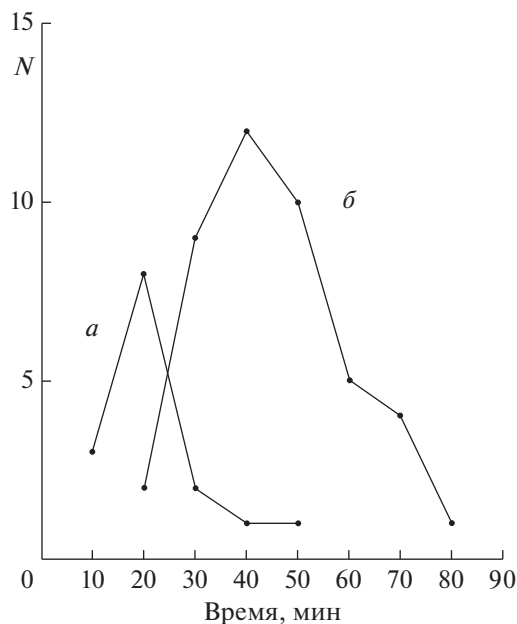


Рис. 5. Вариабельность средних амплитуд кинетики синтеза белка (прямых межклеточных взаимодействий) у 15 старых (а) и 43 молодых (б) крыс (по данным работ лаборатории цитологии ИБР).

межклеточных взаимодействий, 10–15% молодых крыс (всего их здесь 43) соответствуют максимальным значениям у старых животных. Что, помимо, интереснее: две старые крысы из 15 изученных не отличались по межклеточным взаимодействиям от медиан молодых крыс.

Исправление кинетики синтеза белка путем прямых межклеточных взаимодействий — частный пример адаптивности фракталов, окологосового ритма синтеза белка, как их представителя. В данном случае клетки приспособляются к среде их обитания. В межклеточной среде стариков не хватает синхронизирующих факторов. Добавление в среду культур старых животных или в их кровь синхронизаторов ритма синтеза белка омолаживает клетки.

БЛАГОДАРНОСТИ

Благодарю профессора В.В. Терских за обсуждение и полезные замечания.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы использования животных в экспериментах и условия ухода за ними были соблюдены. Люди в данном исследовании не участвовали в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бродский В.Я., Мальченко Л.А., Лазарев Д.С., Буторина Н.Н., Дубовая Т.К., Звездина Н.Д.* Сигнал глутаминовой кислоты синхронизирует кинетику синтеза белка в гепатоцитах старых крыс в течение нескольких дней. Память в метаболизме клеток // Биохимия. 2018. Т. 83. № 3. С. 429–435.
- Олескин А.В.* Нейрохимия и симбиотическая микрофлора человека // Вестник Российской Академии наук. 2009. Т. 79. № 5. С. 431–438.
- Прозоровская М.П.* Возрастные изменения адреналина и норадреналина в тканях крысы // Физиол. журн. СССР. 1983. Т. 69. С. 1244–1246.
- Страховская М.Г., Иванова Э.В., Фрайкин Г.Я.* Стимулирующее влияние серотонина на рост дрожжей *Candida guilliesmondii* и бактерий *Streptococcus faecalis* // Микробиология. Т. 62. № 1. С. 46–49.
- Цавкелова Е.А., Ботвинко И.Б., Кудрин В.С., Олескин А.В.* Детекция нейромедиаторных аминов у микроорганизмов // Доклады РАН. 2000. Т. 372. С. 840–842.
- Bergelson L.D.* Serum gangliosides as endogenous immunomodulators // Immunol. Today. 1995. V. 16. P. 483–486.
- Brodsky V.Y.* Direct cell–cell communication. A new approach derived from recent data on the nature and self-organization of ultradian (circadian) intracellular rhythms // Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc. 2006. V. 82. P. 143–162.
- Brodsky V.Y., Zvezdina N.D.* Melatonin as the most effective organizer of the protein synthesis rhythm in hepatocytes *in vitro* and *in vivo* // Cell Biology Internat. 2010. V. 34. P. 1199–1204.
- Brodsky V.Y., Nechaeva N.V., Zvezdina N.D., Prokazova N.V., Golovanova N.K., Novikova T.E., Gvasava I.G., Fateeva V.I.* Gangliodide-mediated synchronization of the protein synthesis activity in cultured hepatocytes // Cell Biology International. 2000. V. 24. P. 211–222.
- Brodsky V.Y., Nechaeva N.V., Zvezdina N.D., Novikova T.E., Gvasava I.G., Fateeva V.I., Malchenko L.A.* Small cooperative activity of old rat's hepatocytes may depend on composition of the intercellular medium // Cell Biology International. 2004. V. 28. P. 311–316.
- Brodsky V.Y., Malchenko L.A., Butorina N.N., Lazarev D.S., Zvezdina N.D., Dubovaya T.K.* Glutamic acid as enhancer of protein synthesis kinetics in hepatocytes from old rats // Biochemistry (Moscow). 2017. V. 82. № 8. P. 957–961.
- Gilbert D.A., Hammond K.D.* Phosphorylation dynamics in mammalian cells // Ultradian Rhythms from Molecules to Mind / Eds. Lloyd D., Rossi E.L. Springer-Verlag, London. NY, 2008. P. 105–128.
- Hammond K.D., Bhoola R., Bodalina U., Gilbert D.A.* Dynamic cells: temporal organisation and control of phosphorylation // Trends Comparative Bioch. Physiol. 1998. № 4. P. 75–88.
- Lloyd D.* Circadian and ultradian clock-controlled rhythms in unicellular microorganisms // Adv. Microb. Physiol. 1998. V. 39. P. 291–338.
- Lloyd D.* Biological time is fractal: Early events reverberate over a life time // J. Biosci. 2008. V. 33. № 1. P. 9–19.
- Lloyd D., Murrey D.B.* Ultradian metronome: timekeeper for orchestration of cellular coherence // Trends in Biochemical Sciences. 2005. V. 30. № 7. P. 373–377.
- Makrides S.C.* Protein synthesis and degradation during aging and senescence // Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc. 1983. V. 58. P. 343–422.
- Murray D.B., Engelen F., Lloyd D., Kuriyama H.* Involvement of glutathione in the regulation of respiratory oscillation during a continuous culture of *Saccharomyces cerevisiae* // Microbiology. 1999. V. 145. P. 2739–2745.
- Nakamura Y., Hishimoto Y., Yamakawa T., Suzuki A.* Age-dependent changes in GM1 and GD1a expression in mouse liver // J. Biochem. 1988. V. 103. P. 396–398.
- Ozkok E., Cendiz S., Guevener B.* Age-dependent changes in liver ganglioside levels // J. Basic. Clin. Physiol. Pharmacol. 1999. V. 10. P. 337–344.
- Rattan S.I.S.* Synthesis, modification and turnover of proteins during aging // Protein Metabolism and Homeostasis in Aging / Ed. Tavernarakis N. Landes Bioscience and Springer Science, 2009. P. 1–13.
- Senn H.J., Orth M., Fitzke E., Wieland H., Gerok W.* Gangliosides in normal human serum. Concentrations, pattern and transport by lipoproteins // Europ. J. Biochem. 1989. V. 81. P. 657–662.

Cell-Cell Interaction Disorders Associated with the Senescence Can Be Repaired

V. Ya. Brodsky*

*Koltzov Institute of Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences,
ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia*

**e-mail: Brodsky.idb@bk.ru*

This mini-review summarizes the data concerning the possibility of compensating for one of senescence disorders. In hepatocyte cultures of old rats, comparing with young ones, the ultradian protein synthesis rhythms were reduced in amplitudes. Like other ultradian rhythms detected in vitro, protein synthesis rhythm is a marker of cell population synchronization through direct intercellular interactions. Amplitudes of the rhythm characterize the intensity of interactions. The interactions were enhanced after adding to the culture medium previously identified signaling factors of cell-cell communication, such as gangliosides, phenylephrine, melatonin, glutamic acid, some regulatory peptides. The same occurred after addition the factors in vivo. This effect lasted for 2–3 days. The addition of the blood serum of young rats to the culture medium increased the amplitudes of protein synthesis rhythm as well. The blood serum of old rats did not change the rhythm amplitudes. However, the blood serum of old rats enriched with gangliosides enhanced the amplitudes as effective as a young rat serum. These data as well as some literature data allow to recommend the use of signaling factors of cell-cell communication for improving the condition of old people.

Keywords: cell-cell communication, senescence, ultradian rhythms, protein synthesis, gangliosides, catecholamines, melatonin, glutamic acid, regulatory peptides