

УДК 57.085.23:615.322

ВЛИЯНИЕ ГЕРОПРОТЕКТОРОВ АСТРАГАЛОЗИДА IV, ЦИКЛОАСТРАГЕНОЛА И ПЕПТИДНОГО КОМПЛЕКСА “ТИМОВИАЛЬ–ЭПИВИАЛЬ” НА ДЛИНУ ТЕЛОМЕР И АКТИВНОСТЬ ТЕЛОМЕРАЗЫ В МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ И СТАРЕЮЩИХ ФИБРОБЛАСТАХ ЧЕЛОВЕКА

© 2019 г. Н. И. Енукашвили^{1, *}, М. А. Сказина^{2, 3}, А. В. Чубарь¹, А. Б. Машутин⁴

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

²Псковский Банк стволовых клеток, Санкт-Петербург, 199106 Россия

³Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, 195067 Россия

⁴Промомед, Москва, 129090 Россия

*E-mail: nie@newmail.ru

Поступила в редакцию 14.06.2019 г.

После доработки 08.07.2019 г.

Принята к публикации 10.07.2019 г.

В настоящее время ведется активный поиск геропротекторов, способных воздействовать на длину теломер и (или) активность теломеразы и не обладающих при этом свойством туморогенности. Использование в медицинских целях различных экстрактов растения семейства бобовых рода *Astragalus* впервые описано в 200 г. н. э., однако научные исследования компонентов этих экстрактов (циклоастратегенола, астрагалозида IV) начаты недавно. Целью работы являлось исследование влияния композиции, состоящей из астрагалозида IV, циклоастратегенола и пептидного комплекса “Тимовиаль–Эпивиаль”, и ее компонентов на длину теломер и активность теломеразы в мезенхимных стромальных клетках пупочного канатика человека и в стареющих фибробластах человека. Активность теломеразы определяли методом амплификации теломерных повторов (TRAP), длину теломер – методом измерения интенсивности сигналов флуоресцентной *in situ* гибридизации с помощью проточной цитометрии (Flow-FISH). По отдельности ни один из компонентов композиции не вызывал достоверного изменения оцениваемых параметров. Только циклоастратегенол оказывал незначительное влияние на длину теломер в фибробластах. Сочетание ключевого соединения, астрагалозида IV, скелетного астрагалозида – ЦАГ и комплекса биопептидов позволило добиться изменения длины теломер и активности теломеразы в большей степени, чем в случае использования каждого компонента по отдельности. Комплекс оказывает достоверное влияние на длину теломер и активность теломеразы. Для выяснения причины такого влияния комбинированного препарата необходимы дальнейшие исследования.

Ключевые слова: теломеры, астрагал, циклоастратегенол, теломераза, мезенхимные стромальные клетки, фибробласты, геропротекторы

DOI: 10.1134/S0041377119110014

На клеточном уровне выделяют два основных типа старения: репликативное (связанное с укорочением теломер при неактивной теломеразе или с отсутствием в клетке ALT-механизма поддержания длины теломер) и характерное для непролифериру-

ющих клеток старение, связанное с иными механизмами (Оловников, 1971; Михельсон, Гамалей, 2010).

Теломераза человека (терминальная трансфераза) – фермент, который обеспечивает добавление олигонуклеотидов к теломерным концам хромосом, тем самым препятствуя укорочению длины теломер и вступлению клетки в процесс репликативного старения. Основными субъединицами теломеразы являются каталитическая субъединица hTERT и теломеразный РНК-компонент (TERC). Активность hTERT характерна для большинства (85%) опухолевых клеток (Kim et al., 1994; Hahn, Meyerson, 2001) и ее ингибирование является одним из перспективных способов противоопухолевой терапии. Введение в клетку транскрибируемого гена теломеразы являет-

Принятые сокращения: ДМСО – диметилсульфоксид, МСК ПК – мезенхимные стромальные клетки пупочного канатика, ФБЧ – фибробласты человека, ЦАГ – циклоастратегенол, CREB – белок, связывающийся с cAMP-зависимым элементом (cAMP response element binding protein), hTERT – обратная транскриптаза теломеразы человека (human Telomerase Reverse Transcriptase), TERC – теломеразный РНК-компонент человека (Telomerase RNA Component), TRAP – протокол амплификации теломерных повторов (telomeric repeat amplification protocol).

ся одним из способов иммортализации клетки без приобретения ею свойств опухолевой клетки (нестабильность кариотипа, способность к совершению эпителиально-мезенхимального перехода, выход в кровяное русло и метастазирование).

В настоящее время ведется активный поиск геропротекторов, способных воздействовать на длину теломер и (или) активность теломеразы и не обладающих при этом свойством туморогенности. Использование в медицинских целях различных экстрактов растения семейства бобовых рода *Astragalus* (далее астрагал) описано впервые в 200 г. н. э. В настоящее время в состав фармакопей (The United States Pharmacopoeial Convention; WHO monographs on selected medicinal plants) введен астрагал перепончатый (*Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* (Bunge) P.K. Hsiao или *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge; Fam. Fabaceae). Известно, что препараты этого растения способствуют стабилизации иммунной системы, снижению выраженности синдрома хронической усталости (Liu et al., 2011; Qi et al., 2017).

Всего из растительных препаратов на основе астрагала выделено свыше 200 различных компонентов (Wang et al., 2017), среди которых основными являются сапонины, полисахариды и флавоноиды. Ключевыми химическими соединениями препаратов на основе астрагалов являются тритерпеновые сапонины, в частности астрагалозиды. Среди них астрагалозид IV считается основным компонентом, по которому стандартизуется лекарственное растительное сырье – корень астрагала (The United States Pharmacopoeial Convention, WHO monographs on selected medicinal plants, The State Pharmacopoeia Commission of China). Астрагалозид IV легко трансформируется в желудочно-кишечном тракте в циклоастрагенол (ЦАГ), представляющий собой агликон астрагалозидов I–VII – это натуральный ингредиент, экстрагируемый в минимальных количествах из корня астрагала – лекарственного растения семейства бобовых (Ren et al., 2013).

Астрагалозид IV в чистом виде обладает мочегонным действием, понижает кровяное давление, позволяет увеличивать физические нагрузки на организм. Различными исследователями показан весьма широкий спектр биологической активности препарата: его действие приводит к снижению способности опухолевых клеток к совершению эпителиально-мезенхимального перехода и, следовательно, к инвазии и метастазированию (Jiang et al., 2017; Qin et al., 2017). Известно, что данное вещество снижает экспрессию TLR4, а также скорость образования активных форм кислорода (Li et al., 2017) и увеличивает восприимчивость опухолевых клеток к воздействию противоопухолевых препаратов (He et al., 2016).

В ряде исследований показано, что вещества, входящие в состав традиционных китайских препаратов на основе астрагала, действительно могут оказывать геропротекторное действие. В некоторых ра-

ботах продемонстрировано, что геропротекторные свойства растительного сырья из астрагала обеспечивает ЦАГ. Предполагается, что это обусловлено его влиянием на длину теломер, возможно, через активацию теломеразы (Bernardes de Jesus et al., 2011; Harley et al., 2011, 2013; Salvador et al., 2016; Shen et al., 2017). Однако прямых доказательств этому нет.

В России предложено использовать высокоочищенные фракции экстракта астрагала (в частности, астрагалозид IV и ЦАГ) в сочетании с пептидным комплексом “Тимовиаль–Эпивиаль” (Савельева, Бычков, 2016). Биорегуляторные функции пептидов широко известны (Khavinson, Malinin, 2005). Астрагалозид IV был выбран как ключевое соединение экстрактов астрагала, а ЦАГ – как структура, общая для всех астрагалозидов. Однако подтверждения эффективности данной композиции на клеточной модели *in vitro* получено не было. Для подбора оптимального сочетания астрагалозидов и биопептидов необходима оценка их биологической активности в широком диапазоне концентраций каждого из компонентов, а также композиции на их основе.

Целью работы являлось исследование влияния композиции 1 (астрагалозид IV, ЦАГ, “Тимовиаль–Эпивиаль”) и ее компонентов на длину теломер и активность теломеразы в мезенхимных стромальных клетках человека и культуре стареющих фибробластов человека.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Использованные препараты. Состав и использованные концентрации композиции 1, а также ее компонентов приведены в табл. 1. Для двух из трех компонентов композиции 1 растворителем является диметилсульфоксид (ДМСО, ПанЭко, Россия). В связи с этим к контрольным культурам клеток добавляли ДМСО до конечной концентрации в среде 1%, что соответствует максимальной концентрации растворителя в образцах клеток при выбранной схеме разведения. Препараты добавляли в культуральную среду во время посева и далее культивировали в присутствии препарата 10 сут., сменяя среду каждые 3 сут. Концентрации препаратов приведены в табл. 2.

Культуры клеток. Фибробласты человека: паспортизованная первичная культура дермальных фибробластов (ФБЧ) крайней плоти человека получена от донора 4 лет при наличии информированного согласия родителей и предоставлена Юдинцевой Н.М. (Институт цитологии РАН, СПб). Клетки культивировали при температуре 37°C, в атмосфере 5% CO₂ в среде DMEM (4.5 г/л глюкозы), содержащей 10% бычьей фетальной сыворотки и смесь антибиотик/антимикотик – пенициллин/стрептомицин. В работе использовали образцы на поздних сроках культивирования (20–21 пассажи).

Таблица 1. Используемые препараты

Название препарата	Производитель	Растворитель	Концентрация, нг/мл
Астрагалозид IV	Council of Europe, European Pharmacopoeia, CS30026-67081	ДМСО	0.5–1000 (0.5, 1, 5, 10, 100, 1000)
ЦАГ	Sigma Arldrich, SMB00372	ДМСО	0.5–1000 (0.5, 1, 5, 10, 100, 1000)
Тимовиаль–Эпивиаль	ТАСИ, Россия Серия № 01-01/14:1-03/14	Физиологический раствор	0.0925–185 (0.0925, 0.925, 1.85, 18.5, 185) нг/мл
Композиция I (Астрагалозид IV : ЦАГ : Тимовиаль–Эпивиаль – 8 : 8 : 1.5)	Смесь ex tempore	ДМСО + физиологический раствор	0.5–1000 (0.5, 1, 5, 10, 100, 1000)*

* Для композиции I концентрацию определяли по содержанию ЦАГ.

Таблица 2. Состав композиции I при различных концентрациях ЦАГ*

Концентрация композиции I по ЦАГ, нг/мл	Концентрация Астрагалозид IV, нг/мл	Концентрация ЦАГ, нг/мл	Концентрация пептидного комплекса Тимовиаль–Эпивиаль, нг/мл
0.5	0.5	0.5	0.0925
5	5	5	0.925
10	10	10	1.85
100	100	100	18.5
1000	1000	1000	185

* При исследовании влияния отдельных компонентов композиции I их использовали в той же концентрации, что и в составе композиции.

Мезенхимные стромальные клетки пупочного канатика человека (МСК ПК): паспортизованная первичная культура, предоставленная Покровским банком стволовых клеток (СПб, Россия). Эти клетки активно участвуют в обновлении тканей организма и сохраняют способность к делению. Вне организма МСК обычно культивируют в течение 1–2 мес., при этом они постепенно утрачивают пролиферативный потенциал и вступают в процесс клеточного старения. При отсутствии пролиферативной активности, при наличии контактного ингибирования (формирование монослоя) может наблюдаться старение, не связанное с укорочением теломер (Ho et al., 2011). Однако при интенсивном пассировании, не допускающем образование монослоя, преобладает репликативное старение. В норме в этих клетках отсут-

ствует активная форма теломеразы, а в процессе культивирования после некоторого периода стабильности начинается постепенное укорочение длины теломер (Enukashvily et al., 2016; Айзенштадт и др., 2018). Забор биологического материала производили только при наличии информированного согласия законных представителей. МСК выделяли по описанной ранее методике (Айзенштадт и др., 2015). Клетки переносили в полную ростовую среду Advanced Stem Cell Medium (HyClone, США) и 10% заменитель сыворотки (HyClone, США) с добавлением антибиотика пенициллина и антимикотика стрептомицина (оба – Gibco, США), затем высевали в культуральные флаконы (TPP, Швейцария) при плотности 100–400 тыс. кл/см². Клетки культивиру-

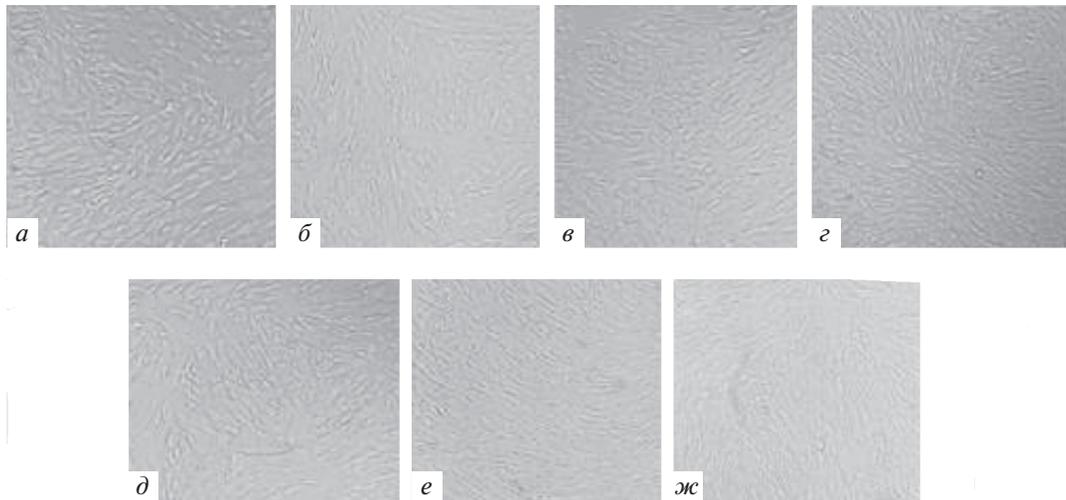


Рис. 1. Культура ФБЧ после обработки композицией 1 в разных концентрациях. *а* – 0.5 нг/мл, *б* – 5 нг/мл, *в* – 10 нг/мл, *г* – 100 нг/мл, *д* – 1000 нг/мл, *е* – необработанные клетки, контроль, *ж* – культуральная среда с добавлением 1% ДМСО. Увел. объектива 20×. Масштабный отрезок – 200 мкм.

вали в условиях гипоксии (7% O₂, 5% CO₂). Смену среды проводили через 3 сут. Пересев при достижении конfluence (плотности культуры) 70–80% осуществляли по стандартным методикам.

Морфологический анализ формы клеток в культурах МСК и фибробластов (фибробластоподобный фенотип, отсутствие сфероидных образований, плотность прикрепления к субстрату, наличие вакуолей) проводили ежедневно с помощью микроскопа Zeiss AxioVert (Zeiss, Германия). Подсчет числа клеток при оценке пролиферативной активности осуществляли с помощью камеры Горяева по общепринятой методике.

Клетки линии 1301: получены от больного с Т-лейкемией (Merck, Германия). Для этих клеток характерны теломеры с длиной значительно выше нормы. Линия 1301 используется в качестве внутреннего контроля при определении длины теломер методом проточной цитометрии по рекомендации произво-

дителя набора Telomere PNA Kit/FITC for Flow Cytometry (Agilent Dako, США).

Измерение активности теломеразы. Активность теломеразы в культуре определяли с помощью протокола амплификации теломерных повторов (telomeric repeat amplification protocol, TRAP) с использованием коммерческого набора TRAPEZE® RT Telomerase Detection Kit (Merck-Millipore, Германия) согласно инструкции производителя. В качестве отрицательного контроля использовали термически инактивированные образцы клеток, в качестве положительного контроля использовали рекомендованные производителем набора клетки линии 1301 с удлиненными теломерами и активной теломеразой. Клетки использовали в количестве 10⁶ клеток на реакцию.

Измерение длины теломер. Оценку изменения длины теломер в ходе культивирования проводили методом измерения флуоресцентной *in situ* гибридизации с помощью проточной цитометрии (Flow-

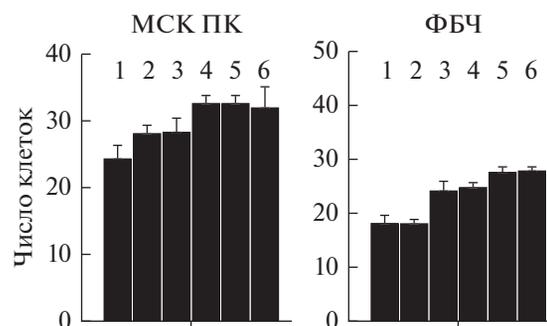


Рис. 2. Влияние композиции 1 на пролиферативную активность МСК ПК и ФБЧ. По горизонтали – экспериментальные группы. 1 – культуральная среда с добавлением 1% ДМСО, 2–6 – композиция 1 в концентрациях 0.5, 5, 10, 100, 1000 нг/мл, соответственно. По вертикали – число клеток, ×10³/см². Первоначальная плотность посева для всех групп составляла 10⁴/см².

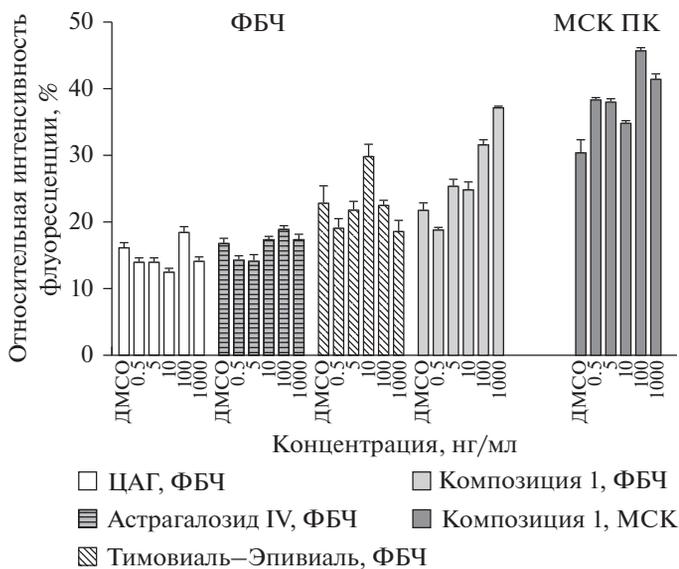


Рис. 3. Длина теломер ФБЧ и МСК после обработки композицией 1 и ее компонентами в различных концентрациях, а также 1% ДМСО (дилуэнтный контроль). Влияние компонентов оценивали только для ФБЧ, ввиду большей выраженности эффектов композиции 1. По горизонтали – концентрация композиции 1 (по ЦАГ) и ее компонентов, по вертикали – относительная интенсивность флюоресценции (%) по отношению к клеткам линии 1301, для которых характерны длинные теломеры. Данные представлены в виде среднего и ошибки среднего (вертикальные отрезки). * – статистически значимые ($p < 0.05$) отличия от образца без внесения композиции 1 (столбец “ДМСО” в группе “Композиция 1, ФБЧ”), ** – статистически значимые ($p < 0.05$) отличия от образца без внесения композиции 1 (столбец “ДМСО” в группе “Композиция 1, МСК”).

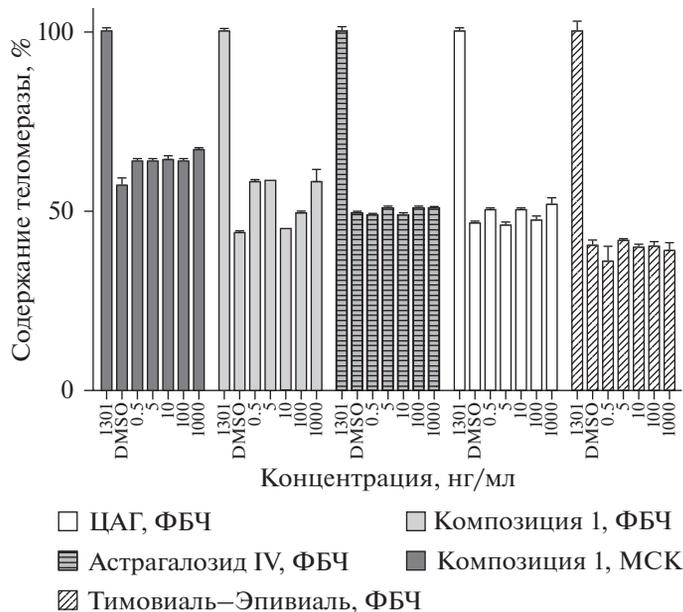


Рис. 4. Активность теломеразы в МСК ПК и ФБЧ после обработки композицией 1 и ее компонентами в различных концентрациях или ДМСО (дилуэнтный контроль) и в необработанных клетках 1301 (клетки с активной теломеразой, положительный контроль для теста). Влияние компонентов оценивали только для ФБЧ, ввиду большей выраженности в них эффектов композиции 1. По горизонтали – концентрация композиции 1 по ЦАГ и ее компонентов, по вертикали – относительное содержание активной теломеразы (%) по отношению к количеству теломеразы в клетках линии 1301. Данные представлены в виде среднего и ошибки среднего (вертикальные отрезки).

FISH). Анализ проводили с использованием коммерческого набора “Telomere PNA Kit/FITC for Flow Cytometry” (Dako, США) на проточном цитометре Beckman Coulter FC500 в соответствии с инструкцией производителя. В качестве положительного контроля использовали клетки линий 1301 с удлинненными теломерами, как рекомендовано производителем. Для одного измерения использовали 3×10^6 клеток.

Статистическая обработка данных. Для каждой концентрации каждого из исследуемых препаратов эксперимент повторяли трижды. Для каждого из этих экспериментов ставили три реакции для измерения активности теломеразы и три – для измерения длины теломер. При анализе длины теломер на проточном цитометре анализировали не менее 500000 клеток. Для статистической обработки данных и построения диаграмм использовали пакет Graphpad Prism.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфология и пролиферативная активность. При оценке морфологии клеточных культур МСК и ФБЧ, обработанных 1% ДМСО (контроль) и компо-

зицией 1 (0.5–1000 нг/мл по ЦАГ), с помощью световой микроскопии не было обнаружено изменений по сравнению с необработанными образцами, полученными от тех же доноров (рис. 1). В концентрации 0.5 нг/мл композиция 1 не влияла на скорость пролиферации клеток. При увеличении концентрации наблюдали увеличение скорости пролиферации (рис. 2). При этом после увеличения концентрации от 10 до 100 нг/мл дальнейшего достоверного увеличения скорости пролиферации не наблюдали.

Влияние композиции 1 и ее компонентов на длину теломер. В контрольных образцах ФБЧ (21 пассаж), обработанных 1% ДМСО, длина теломер составляла 10–20% ($16.1 \pm 1.1\%$) от длины теломер в клеточной линии 1301 (рис. 3). В контрольных образцах МСК ПК (4 пассаж) – 25–37% ($31.0 \pm 0.6\%$), при продолжении культивирования до 7 пассажа средняя длина снижалась на 10–23% (до $26.1 \pm 2.4\%$). По нашим ранее полученным данным, далее большинство образцов первичных культур МСК ПК останавливаются в росте (Айзенштадт и др., 2018). При обработке композицией 1 в диапазоне концентраций 0.5–1000 нг/мл по ЦАГ в используемой экспериментальной модели на-

блюдали дозозависимое увеличение длины теломер в ФБЧ поздних пассажей (рис. 3). Максимальное значение ($36.8 \pm 0.9\%$ к длине теломер клеток 1301; увеличение параметра – 180% по отношению к контролю) зарегистрировано при концентрации композиции 1 1000 нг/мл. Дозозависимый рост длины теломер наблюдался и в МСК, но был менее выражен – при концентрации 1000 нг/мл длина теломер составляла $45.26 \pm 0.6\%$ к длине теломер клеток 1301, что составляло только 145% от контрольных показателей. При этом обработка по отдельности каждым из компонентов не приводила к такому же эффекту (рис. 3).

Обработка ЦАГ (100 нг/мл) и астрагалозидом IV (100 нг/мл) сопровождалась небольшим ростом длины теломер, однако это увеличение было гораздо менее выраженным по сравнению с наблюдаемым при обработке композицией 1 в этой же концентрации по ЦАГ. При обработке отдельно пептидным комплексом также не наблюдали достоверного дозозависимого увеличения оцениваемого параметра. Тем не менее, в присутствии малых концентраций пептидного комплекса (до 10 мкг/мл) длина теломер слабо возрастала с 22.1 ± 1.5 до $29.8 \pm 1.0\%$ от длины теломер клеток 1301.

Влияние композиции 1 и ее компонентов на активность теломеразы. При измерении активности теломеразы (рис. 4) средняя величина порогового цикла для контрольных проб (термически инактивированная теломераза) соответствовала lg числа копий стандарт-амплификата (8 теломерных повторов) в пробе 4.8 ± 0.035 . Таким образом, в необработанных ФБЧ теломераза практически неактивна (4.9 ± 0.04) и слабоактивна в МСК ПК (6.4 ± 0.02). В пробах клеток линии 1301 с высокоактивной теломеразой средняя величина порогового цикла составляла 23.4 ± 0.4 , что соответствует 11.2 ± 0.1 lg числа копий амплификата в пробе. При обработке МСК композицией 1 статистически значимых изменений активности теломеразы зарегистрировано не было. В фибробластах зарегистрировано небольшое, но статистически достоверное увеличение активности теломеразы. При этом подъем активности наблюдали в диапазоне 0.5–10 нг/мл (до 6.53 ± 0.02 против 4.9 ± 0.04) и 100–1000 нг/мл (до 6.49 ± 0.4).

ОБСУЖДЕНИЕ

В проведенных исследованиях длина теломер в ФБЧ поздних пассажей была меньше длины теломер в клетках использованных первичных культур МСК ПК 4–7 пассажей. Ранее нами была описана культура МСК ПК, способная к культивации в течение 6 мес. (Айзенштадт и др., 2018). Длина теломер в клетках этой культуры вплоть до 51 пассажа превышала длину теломер в ФБЧ при том, что теломераза была неактивна в этой культуре с момента начала культивирования. В культурах МСК ПК, использованных в данном исследовании, теломераза была слабоактив-

на. Учитывая, что полученные средние значения порогового цикла для МСК МК и отрицательного контроля различались всего на 1–1.5 цикла, а разница с положительным контролем составляла 10 циклов (до пересчета согласно калибровочной кривой в lg числа копий), можно считать, что активность теломеразы в использованных образцах МСК ПК была близка к показателям отрицательного контроля. Известно, что в МСК ПК поддержание длины теломер осуществляется в основном за счет альтернативного механизма поддержания длины теломер (ALT), в том числе и при процессе онкотрансформации мезенхимных тканей (Lafferty-Whyte et al., 2009; Mazzolini et al., 2018). Возможно, наличием альтернативного пути поддержания длины теломер в МСК объясняются полученные данные по превышению длины теломер культивируемых МСК ПК по сравнению с культурами ФБЧ.

В проведенных нами исследованиях комбинация астрагалозида IV и его производного – ЦАГ – в сочетании с пептидным комплексом “Тимовиаль–Эпивиалем” способствовала увеличению длины теломер ФБЧ и, в меньшей мере, МСК ПК, а также увеличению пролиферативной активности МСК ПК и ФБЧ (рис. 2–4). При этом действие на пролиферативную активность также было сильнее выражено в ФБЧ, чем в МСК. Активацию теломеразы при обработке композицией 1 наблюдали только в случае ФБЧ, но не МСК ПК. Видимо, это связано с тем, что в МСК и фибробластах несколько различаются механизмы поддержания длины теломер: в МСК достаточно хорошо развит ALT-механизм поддержания длины теломер и меньше зависимость от активности теломеразы (Bernardo et al., 2007; Lafferty-Whyte et al., 2009; Mazzolini et al., 2018).

По отдельности ни один из компонентов композиции не вызывал достоверного изменения оцениваемых параметров. Только ЦАГ оказывал незначительное влияние на длину теломер в ФБЧ. Похожие результаты были получены на модели стимулированных лимфоцитов (Bernardes de Jesus et al., 2011; Salvador et al., 2016). Способность ЦАГ активировать теломеразу и усиливать пролиферативную активность была подтверждена командой калифорнийских биологов и биохимиков под руководством Гектора Валензуэлы (Dr. H.F. Valenzuela) на модели стимулированных фитогемагглютинином лимфоцитов (Molgora et al., 2013). В 2014 г. были опубликованы данные о том, что ЦАГ усиливает пролиферативную активность неонатальных кератиноцитов и активирует теломеразу в этих клетках. Действие теломеразы при этом опосредовано CREB-фактором (Ip et al., 2014). Таким образом, возможно, что действие препаратов на основе ЦАГ или других астрагалозидов может быть сложнее, чем это представлялось ранее,

хотя само наличие влияния препарата на длину теломер и пролиферативную активность достаточно убедительно доказано в различных работах. Вероятнее всего, действие препарата *in vitro* различно для разных типов клеток или клеточных культур, в зависимости от соотношения в них различных механизмов поддержания длины теломер.

В проведенных нами исследованиях сочетание ключевого соединения, астрагалозида IV, скелетного астрагалозида — ЦАГ и комплекса биопептидов позволило добиться изменения длины теломер и активности теломеразы в большей степени, чем в случае использования каждого компонента по отдельности. Для выяснения причины такого влияния комбинированного препарата необходимы дальнейшие исследования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Государственного задания МЗ РФ, при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-74-20102).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ ИНТЕРЕСОВ

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников (доноров клеточного материала — культуры МСК и фибробластов) было получено информированное добровольное согласие.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Айзенштадт А.А., Енукашвили Н.И., Золина Т.Н., Александрова А.В., Смолянинов А.Б.* 2015. Сравнение пролиферативной активности и фенотипа МСК, полученных из костного мозга, жировой ткани и пупочного канатика. Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. 7(2) : 14–22. (*Aisenstadt A.A., Enukashvili N.I., Zolina T.L., Alexandrov L.V., Smoljaninov A.B.* 2015. Comparison of proliferation and immunophenotype of MSC, obtained from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord. Herald of North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov. 7(2) : 14–22.)
- Айзенштадт А.А., Сказина М.А., Котелевская Е.А., Елсукова Л.В., Золина Т.Л., Пономарев Н.В., Галактионов Н.К., Галембо И.А., Иволгин Д.А., Масленникова И.И., Енукашвили Н.И.* 2018. Характеристики мезенхимных стромальных клеток пупочного канатика человека при длительном культивировании *in vitro*. Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. 10(1) : 11–19. (*Aizenstadt A.A., Skazina M.A., Kotelevskaya E.A., Yelsukova L.V., Zolina T.L., Ponomartsev N.V., Galaktionov N.K., Galembo I.A., Ivolgin D.A., Maslennikova I.I., Enukashvili N.I.* 2018. Characterization of umbilical cord mesenchymal stromal cells during long-term expansion *in vitro*. Herald of North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov. 10(1) : 11–19.)
- Михельсон В.М., Гамалей И.А.* 2010. Укорочение теломер — основной механизм естественного и лучевого старения. Радиационная биология. Радиоэкология. 50(3) : 269–275. (*Mikhelson V.M., Gamaley I.A.* 2010. Telomere shortening is the main mechanism of natural and radiation aging. Radiats. Biol. Radioecol. 50(3) : 269–275.)
- Оловников А.М.* 1971. Принцип маргинотомии в матричном синтезе полинуклеотидов. Докл. Акад. Наук СССР. 201(6) : 1496–1499. (*Olovnikov A.M.* 1973. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. J. Theor. Biol. 41(1) : 181–190.)
- Савельева О.М., Бычков К.Е.* 2016. Патент РФ 2593586. Изобретения. Полезные модели. Официальный бюллетень Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам. 22 : 25 с.
- Bernardes de Jesus B., Schneeberger K., Vera E., Tejera A., Harley C.B., Blasco M.A.* 2011. The telomerase activator TA-65 elongates short telomeres and increases health span of adult/old mice without increasing cancer incidence. Aging Cell. 10 : 604–621.
- Bernardo M.E., Zaffaroni N., Novara F., Cometa A.M., Avanzini M.A., Moretta A., Montagna D., Maccario R., Villa R., Daidone M.G., Zuffardi O., Locatelli F.* 2007. Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term *in vitro* culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. Cancer Res. 67 : 9142–9149.
- Enukashvili N., Ayzenshtadt A., Bagaeva V., Zolina T., Aleksandrova L., Supilnikova O., Adilov S.* 2016. The use of autologous and allogenic fibrin glues as scaffolds for mesenchymal stem cells and prechondrocytes in traumatology and orthopedics. Cytotherapy. 18 : 60–61.
- Hahn W.C., Meyerson M.* 2001. Telomerase activation, cellular immortalization and cancer. Ann Med. 33 : 123–129.
- Harley C.B., Liu W., Blasco M., Vera E., Andrews W.H., Briggs L.A., Raffaele J.M.* 2011. A natural product telomerase activator as part of a health maintenance program. Rejuvenation Res. 14 : 45–56.
- Harley C.B., Liu W., Flom P.L., Raffaele J.M.* 2013. A natural product telomerase activator as part of a health maintenance program: Metabolic and cardiovascular response. Rejuvenation Res. 16 : 386–395.
- He C.S., Liu Y.C., Xu Z.P., Dai P.C., Chen X.W., Jin D.H.* 2016. Astragaloside IV enhances cisplatin chemosensitivity in non-small cell lung cancer cells through inhibition of B7-H3. Cell Physiol. Biochem. 40 : 1221–1229.

- Ho J.H., Chen Y.F., Ma W.H., Tseng T.C., Chen M.H., Lee O.K. 2011. Cell contact accelerates replicative senescence of human mesenchymal stem cells independent of telomere shortening and p53 activation: Roles of Ras and oxidative stress. *Cell Transplant.* 20 : 1209–1220.
- Ip F.C., Ng Y.P., An H.J., Dai Y., Pang H.H., Hu Y.Q., Chin A.C., Harley C.B., Wong Y.H., Ip N.Y. 2014. Cycloastragenol is a potent telomerase activator in neuronal cells: Implications for depression management. *Neurosignals.* 22 : 52–63.
- Jiang K., Lu Q., Li Q., Ji Y., Chen W., Xue X. 2017. Astragaloside IV inhibits breast cancer cell invasion by suppressing Vav3 mediated Rac1/MAPK signaling. *Int. Immunopharmacol.* 42 : 195–202.
- Khavinson V.Kh., Malinin V.V. 2005. Gerontological aspects of genome peptide regulation. Basel: Karger AG. 104 p.
- Kim N.W., Piatyszek M.A., Prowse K.R., Harley C.B., West M.D., Ho P.L., Coviello G.M., Wright W.E., Weinrich S.L., Shay J.W. 1994. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science.* 266 : 2011–2015.
- Lafferty-Whyte K., Cairney C.J., Will M.B., Serakinci N., Daidone M.G., Zaffaroni N., Bilsland A., Keith W.N. 2009. A gene expression signature classifying telomerase and ALT immortalization reveals an hTERT regulatory network and suggests a mesenchymal stem cell origin for ALT. *Oncogene.* 28 : 3765–3774.
- Li M., Li H., Fang F., Deng X., Ma S. 2017. Astragaloside IV attenuates cognitive impairments induced by transient cerebral ischemia and reperfusion in mice via anti-inflammatory mechanisms. *Neurosci. Lett.* 639 : 114–119.
- Liu Y., Zhang H.G., Li X.H. 2011. A Chinese herbal decoction, Danggui Buxue Tang, improves chronic fatigue syndrome induced by food restriction and forced swimming in rats. *Phytother. Res.* 25 : 1825–1832.
- Mazzolini R., González N., García-Garijo A., Millanes-Romero A., Peiró S., Smith S., García de Herreros A., Canudas S. 2018. Snail1 transcription factor controls telomere transcription and integrity. *Nucleic Acids Res.* 46 : 146–158.
- Molgora B., Bateman R., Sweeney G., Finger D., Dimler T., Effros R.B., Valenzuela H.F. 2013. Functional assessment of pharmacological telomerase activators in human T cells. *Cells.* 2 : 57–66.
- Qi Y., Gao F., Hou L., Wan C. 2017. Anti-inflammatory and immunostimulatory activities of astragalosides. *Am. J. Chin. Med.* 45 : 1157–1167.
- Qin C.D., Ma D.N., Ren Z.G., Zhu X.D., Wang C.H., Wang Y.C., Ye B.G., Cao M.Q., Gao D.M., Tang Z.Y. 2017. Astragaloside IV inhibits metastasis in hepatoma cells through the suppression of epithelial-mesenchymal transition via the Akt/GSK-3 β / β -catenin pathway. *Oncol. Rep.* 37 : 1725–1735.
- Ren S., Zhang H., Mu Y., Sun M., Liu P. 2013. Pharmacological effects of Astragaloside IV: A literature review. *J. Tradit. Chin. Med.* 33 : 413–416.
- Salvador L., Singaravelu G., Harley C.B., Flom P., Suram A., Raffaele J.M. 2016. A natural product telomerase activator lengthens telomeres in humans: A randomized, double blind, and placebo controlled study. *Rejuvenation Res.* 19 : 478–484.
- Shen C.Y., Jiang J.G., Yang L., Wang D.W., Zhu W. 2017. Anti-ageing active ingredients from herbs and nutraceuticals used in traditional Chinese medicine: Pharmacological mechanisms and implications for drug discovery. *Br. J. Pharmacol.* 174 : 1395–1425.
- The state pharmacopoeia commission of China. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. V. 1. Beijing: China Medicine Science and Technology Press. P. 283–284.
- The United States Pharmacopoeial Convention: USP39–NF34, 2016.
- Wang H.L., Zhou Q.H., Xu M.B., Zhou X.L., Zheng G.Q. 2017. Astragaloside IV for experimental focal cerebral ischemia: Preclinical evidence and possible mechanisms. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2017 : 1–13.
- WHO monographs on selected medicinal plants. 1999. Geneva: WHO Press. 1 : 50–58.

INFLUENCE OF GEROPROTECTORS ASTRAGALOSIDE IV, CYCLOASTRAGENOL, AND PEPTIDE COMPLEX “TIMOVIAL–EPIVIAL” ON THE TELOMERE LENGTH AND TELOMERASE ACTIVITY IN HUMAN MESENCHYMAL STROMAL CELLS AND SENESCENT FIBROBLASTS

N. I. Eukashvily^{a,*}, M. A. Skazina^{b,c}, A. V. Chubar^a, and A. B. Mashutin^d

^aInstitute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064 Russia

^bStem Cell Bank Pokrovsky, St. Petersburg, 199106 Russia

^cNorth-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, 195067 Russia

^dPromomed, LLC, Moscow, 12909, Russia

*e-mail: nie@newmail.ru

An active search for non-tumorigenic geroprotectors affecting telomere length and/or telomerase activity is in progress now. The use of various extracts of a plant *Astragalus* (Fabaceae) for medical purposes was described for the first time in 200 AD. However, scientific studies on the components of these extracts, cycloastragenol and astragaloside IV, have only recently been initiated. The aim of the present work was to study the effect of the composition consisting of astragaloside IV, cycloastragenol and the “Timovial–Epiivial” dipeptide and its components on the length of telomeres and the telomerase activity in human umbilical cord mesenchymal stromal cells and the senescent human

fibroblasts. Telomerase activity was estimated by telomeric repeats amplification (TRAP). The length of telomeres was measured as the intensity of fluorescent *in situ* hybridization signals by flow cytometry (Flow-FISH). None of the composition components alone caused a significant change in the estimated parameters. Only cycloastragenol had low effect on telomere length in fibroblasts. The combination of a key compound astragaloside IV, core astragaloside (CAG) and a complex of biopeptides made it possible to achieve a significant change in telomere length and telomerase activity more than in the case of using each component separately. Further research is needed to determine the cause of this effect of the combined drug.

Keywords: telomeres, *Astragalus sp.*, cycloastragenol, telomerase, mesenchymal stromal cells, fibroblasts, geroprotectors