

TELOMERES AND TELOMERASE

A. A. BOGDANOV

Telomeres are DNA-protein structures that cap the end of eukaryotic chromosomes. Telomeric DNA typically consists of numerous tandemly repeated sequences which are synthesized by unusual RNA-containing enzyme, telomerase. The consequences of alterations in the telomere length and the telomerase activity for cell aging and tumour growth are discussed in this paper.

На концах линейных хромосом эукариот находятся специализированные ДНК-белковые структуры – теломеры. У большинства организмов теломерная ДНК представлена многочисленными короткими повторами. Их синтез осуществляется необычным РНК-содержащим ферментом теломеразой. В статье обсуждаются связь длины теломерных районов хромосом и активности теломеразы с процессами старения и злокачественного роста.

ТЕЛОМЕРЫ И ТЕЛОМЕРАЗА

А. А. БОГДАНОВ

Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова

Читатели согласятся с утверждением, что одним из важнейших достижений экспериментальной биологии нашего века стало создание методов культивирования клеток животных и растений *in vitro*. С помощью этого метода клетки самых разнообразных тканей человека можно выращивать на специально подобранных питательных средах, подобно бактериям или другим одноклеточным организмам. Множество клеточных культур человека изначально получено из клеток раковых опухолей. Эти клетки могут делиться в культуре неограниченное число раз (поэтому их называют бессмертными, или иммортализованными). Биологи долгое время пребывали в уверенности, что в оптимальных условиях бесконечно долго могут делиться и нормальные клетки человека и животных (как в культуре, так и в организме).

Однако в начале 1960-х годов Леонард Хейфлик установил, что в клеточных культурах нормальные диплоидные (соматические) клетки человека способны делиться лишь ограниченное число раз. При этом предельное число делений (называемое также “лимитом Хейфлика”) сильно зависит от возраста индивидуума, которому эти клетки изначально принадлежали. Так, клетки, которые брали у новорожденных, делились в культуре 80–90 раз, а у 70-летнего человека – только 20–30 раз. Достигнув “лимита Хейфлика”, клетки переходят в состояние одряхления (которое в англоязычной, а теперь зачастую и в русской литературе называется сенесенсом, *senescence*), которое характеризуется резким изменением метаболизма, и в первую очередь нарушением репликации ДНК. Вслед за этим состоянием обычно следует гибель клеток.

В январе 1998 года средства массовой информации во всем мире буквально взорвались сообщениями о том, что группе американских ученых удалось заставить нормальные клетки человека преодолеть “лимит Хейфлика” почти вдвое. Вместо того чтобы состариться и умереть, клетки продолжали делиться и выглядели юными. При этом превращения их в раковые клетки (то есть злокачественной трансформации) не происходило: по всем признакам клетки, потерявшие способность стариться, были нормальными. В газетах немедленно появились статьи с заголовками вроде “Генетики уткнулись в бессмертие”, “Лекарства от старения будут доступны, как аспирин”, “Таблетки от старости становятся реальностью” и т.п.

Что же произошло на самом деле? Ученые из лабораторий Джерри Шейя, Вудринга Райта, работающие

под патронажем фирмы “Джерон корпорейшн” (“Geron Corporation”), с помощью изящных генетических манипуляций заставили в нормальных клетках человека работать фермент теломеразу, активность которой до этого была нулевой. Теломераза участвует в образовании теломер-специальных структур, расположенных на концах линейных хромосом эукариот. Таким образом, обновление теломер и стало причиной спасения клеток от одряхления.

Мы еще вернемся к этой замечательной работе. А вначале более подробно расскажем о том, что такое теломеры и теломераза.

ТЕЛОМЕРЫ

Во многих современных учебниках теломерами называют специализированные концевые районы линейной хромосомной ДНК, состоящие из многократно повторяющихся коротких нуклеотидных последовательностей. Это определение неполное. В состав теломер входят также многие белки, специфически связывающиеся с теломерными ДНК-повторами. Таким образом, теломеры (так же, как и все другие районы хромосомы эукариот) построены из дезоксиинуклеопротеидов (ДНП), то есть комплексов ДНК с белками.

Существование специальных структур на концах хромосом было постулировано в 1938 году классиками генетики, лауреатами Нобелевской премии Барбарой Мак-Клинтон и Германом Мёллером. Независимо друг от друга они обнаружили, что фрагментация хромосом (под действием рентгеновского облучения) и появление у них дополнительных концов ведут к хромосомным перестройкам и деградации хромосом. В сохранности оставались лишь области хромосом, прилегающие к их естественным концам. Лишенные концевых теломер, хромосомы начинают сливаться с большой частотой, что ведет к тяжелым генетическим аномалиям. Следовательно, заключили они, естественные концы линейных хромосом защищены специальными структурами. Г. Мёллер предложил называть их теломерами (от греч. телос – конец и мерос – часть).

В последующие годы выяснилось, что теломеры не только предотвращают деградацию и слияние хромосом (и тем самым поддерживают целостность генома хозяйской клетки), но и, по-видимому, ответственны за прикрепление хромосом к специальной внутриядерной структуре (своеобразному скелету клеточного ядра), называемой ядерным матриксом (рис. 1). Таким образом, теломеры играют важную роль в создании специфической архитектуры и внутренней упорядоченности клеточного ядра. Более того, мы покажем, что наличие на концах хромосом специальной теломерной ДНК позволяет решить так называемую проблему концевой недорепликации ДНК.

Теломерная ДНК попала в поле зрения молекулярных биологов сравнительно недавно, когда были разработаны эффективные методы определения

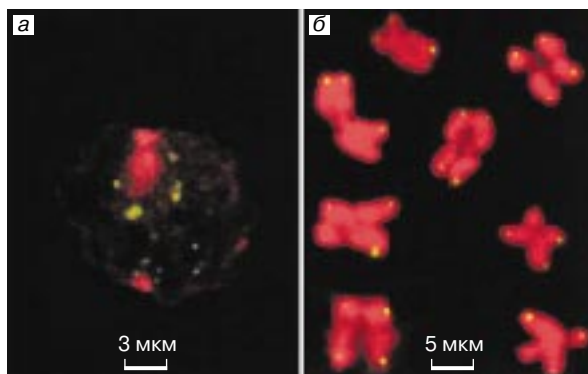


Рис. 1. Локализация теломер в клеточном ядре и на митотических хромосомах человека. Изображения получены с помощью флуоресцентной микроскопии. Флуоресцентную метку желто-зеленого цвета несут специфические белки теломер; ДНК в хромосомах окрашена в красный цвет: а – интерфазное ядро, из которого обработкой нуклеазами удалена основная часть ДНК. Светящиеся точки теломерных белков расположены там, где находится ядерный матрикс; б – митотические хромосомы. Хорошо видно расположение теломер на их концах

последовательности нуклеотидов в нуклеиновых кислотах. Первыми объектами исследования были одноклеточные простейшие (ресничная инфузория тетрахимена, в частности), поскольку из-за особенностей строения ядерного и хромосомного аппарата они содержат несколько десятков тысяч очень мелких хромосом и, следовательно, множество теломер в одной клетке (для сравнения: у высших эукариот на клетку приходится менее ста теломер).

Многократно повторяющиеся блоки в теломерной ДНК простейших состоят всего лишь из шести–восьми нуклеотидных остатков. При этом одна цепь ДНК сильно обогащена остатками гуаниловой кислоты (G-богатая цепь; у тетрахимены она построена из блоков TTGGGG), а комплементарная ей цепь ДНК соответственно обогащена остатками цитидиловой кислоты (C-богатая цепь).

У дрожжей повторяющиеся блоки в теломерной ДНК заметно длиннее, чем у простейших, и зачастую не столь регулярные. Каково же было удивление ученых, когда оказалось, что теломерная ДНК человека построена из TTAGGG-блоков, то есть отличается от простейших всего лишь одной буквой в повторе. Более того, из TTAGGG-блоков построены теломерные ДНК (вернее, их G-богатые цепи) всех млекопитающих, рептилий, амфибий, птиц и рыб. Столь же универсален теломерный ДНК-повтор у растений: не только у всех наземных растений, но даже у их весьма отдаленных родственников – морских водорослей он представлен последовательностью TTAGGG. Впрочем, удивляться здесь особенно нечему, так как в теломерной ДНК не закодировано никаких белков (она не содержит генов), а у

всех организмов теломеры выполняют универсальные функции, речь о которых шла выше. Правда, как это часто бывает в живой природе, из этого общего правила есть редкие, но важные исключения. Наиболее известное из них – теломерная ДНК плодовой мухи дрозофилы. Она представлена не короткими повторами, а ретротранспозонами – подвижными генетическими элементами (подробнее о подвижных генетических элементах и роли ретротранспозонов в образовании теломер см. в статьях В.М. Глазера “Гомологичная генетическая рекомбинация” и “Генетическая рекомбинация без гомологии: процессы, ведущие к перестройкам в геноме” и В.А. Гвоздева “Подвижная ДНК эукариот. Ч. 1–2” в “Соросовском Образовательном Журнале” (1998. № 7, 8).

Очень важная характеристика теломерных ДНК – их длина. У человека она колеблется от 2 до 20 тыс. пар оснований (т.п.о.), а у некоторых видов мышей может достигать сотен т.п.о.

Было замечено, что у многих видов двуспиральная теломерная ДНК на самом конце содержит однотяжевой “хвост”. Этот однотяжевой район теломерной ДНК представлен ее G-богатой цепью и заканчивается свободной 3'-гидроксильной группой. Соответственно белки теломер принято подразделять на две группы: белки, которые связаны с однотяжевой теломерной ДНК, и белки, связанные с двутяжевой ДНК теломеры. Эти белки изучаются весьма интенсивно, но знаем мы о них еще мало. Нет сомнений в том, что теломерные белки участвуют во всех функциях теломер, поддерживая их структуру и регулируя длину теломерной ДНК (как мы увидим ниже, длина теломер – чрезвычайно важный параметр). Установлено, что некоторые из белков, ассоциированных с двуспиральной теломерной ДНК, регулируют активность определенных генов, повышая или подавляя их экспрессию. В качестве примера можно привести дрожжевой белок Rap1p. Этот ДНК-связывающий белок, несомненно, принимает участие в регуляции длины теломерной ДНК. В то же время, даже будучи в составе теломеры, он участвует в активации и репрессии транскрипции. Это означает, что изменения или нарушения в структуре теломер могут затрагивать не только их собственные функции, но и экспрессию жизненно важных генов, находящихся в других районах хромосом. Кроме того, важные для поддержания общей структуры хромосом белки располагаются на ДНК, непосредственно примыкающей к теломерной (иногда ее называют субтеломерной ДНК).

ТЕЛОМЕРЫ, А. ОЛОВНИКОВ И ПРОБЛЕМА “КОНЦЕВОЙ НЕДОРЕПЛИКАЦИИ ДНК”

Известно, что ДНК-полимеразы, синтезируя дочернюю цепь ДНК, прочитывают родительскую цепь в направлении от ее 3'-конца к 5'-концу. Соответственно дочерняя цепь синтезируется в направ-

лении 5' → 3'. В противоположном направлении синтез цепи ДНК фермент катализировать не может (рис. 2). Кроме того, ДНК-полимераза начинает синтез только со специального РНК-праймера – короткой РНК-затравки, комплементарной ДНК. После окончания синтеза ДНК РНК-праймеры удаляются, а пропуски в одной из дочерних цепей ДНК заполняются ДНК-полимеразой. Однако на 3'-конце ДНК такой пропуск заполнить не может, и поэтому 3'-концевые участки ДНК остаются однотяжевыми, а их 5'-концевые участки – недореплицированными. Отсюда ясно, что каждый раунд репликации хромосом будет приводить к их укорочению. Понятно, что прежде всего должна сокращаться длина теломерной ДНК.

Первым на проблему “концевой недорепликации ДНК” обратил внимание А.М. Оловников в 1971 году. Он высказал гипотезу о том, что потеря концевых последовательностей ДНК вследствие их недорепликации ведет к старению клетки. Иными словами, предполагалось, что процесс укорочения теломер и есть тот часовой механизм, который определяет репликативный потенциал “смертной” клетки, и когда длина теломер становится угрожающе короткой, этот механизм предотвращает дальнейшее деление клетки. А.М. Оловников предположил также, что в нестареющих клетках (а к ним кроме раковых относятся зародышевые, стволовые и другие генеративные клетки) должна существовать специализированная ферментативная система,

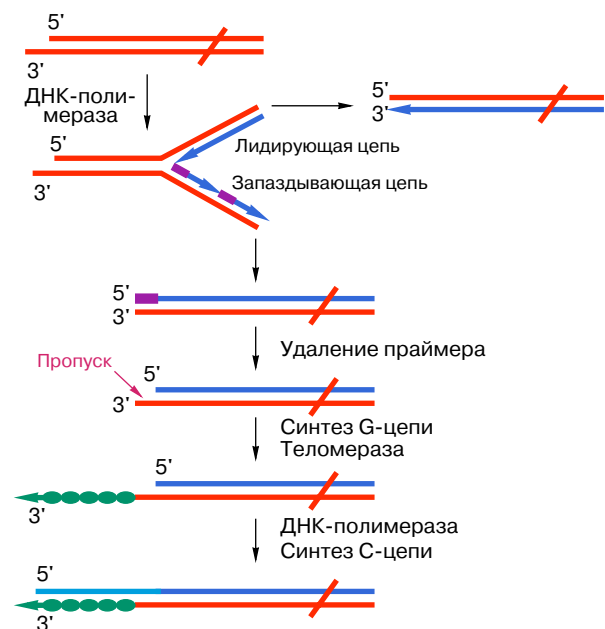


Рис. 2. Схема, иллюстрирующая возникновение недореплицированного 5'-конца линейной хромосомы и синтез на этом концевом участке теломерной ДНК с помощью теломеразы

которая контролирует и поддерживает длину теломерной ДНК.

Гипотеза А.М. Оловникова нашла убедительное подтверждение в последующие годы. Во-первых, было установлено, что теломеры нормальных (то есть обреченных на старение) клеток действительно укорачиваются на 50–60 нуклеотидных звеньев при каждом клеточном делении. Во-вторых, в 1984 году Э. Блэкберн и Э. Грайдер выделили фермент, который с помощью механизма, отличного от механизма реакций, лежащих в основе репликации ДНК, синтезирует теломерную ДНК. Этот фермент был назван теломеразой.

КАК РАБОТАЕТ ТЕЛОМЕРАЗА

Итак, основное назначение теломеразы – синтезировать тандемно повторяющиеся сегменты ДНК, из которых состоит G-цепь теломерной ДНК. Таким образом, она относится к классу ДНК-полимераз, причем оказалось, что теломераза – это РНК-зависимая ДНК-полимераза или обратная транскриптаза. Ферменты этого класса, синтезирующие ДНК на РНК-матрицах, очень хорошо известны молекулярным биологам. Они закодированы и содержатся в ретровирусах (например, в вирусе иммунодефицита человека, вызывающем заболевание СПИДом) и служат для синтеза ДНК-копий их геномов, который в ретровирусе представлен РНК. В клеточном геноме обратные транскриптазы закодированы в ретротранспозонах.

РНК, используемая теломеразой для синтеза теломерной ДНК в качестве матрицы, входит в состав этого фермента. В этом уникальность теломеразы: на сегодня это единственная известная РНК-содержащая обратная транскриптаза. Теломеразные РНК у разных организмов сильно различаются по длине и структуре. Теломеразы простейших содержат РНК длиной в 150–200 нуклеотидных остатков (н.о.), длина теломеразной РНК человека – 450 н.о., в то время как теломераза дрожжей содержит аномально длинную РНК (около 1300 н.о.). Как и любая другая РНК клетки, теломеразная РНК обладает специфической вторичной и третичной структурой. Вторичная структура изолированной теломеразной РНК достоверно установлена только для теломераз простейших. Пространственная структура теломеразной РНК в составе ферментативного комплекса пока еще неизвестна.

Матричный участок представлен в теломеразной РНК только один раз. Его длина не превышает длину двух повторов в теломерной ДНК, которые он кодирует и которым он, разумеется, комплементарен.

Так как теломераза синтезирует сегменты ДНК, повторяющиеся много раз, используя только один сегмент своей РНК, она должна обладать способностью периодически (после завершения синтеза каждого повтора) перемещать (транслоцировать) матричный участок в район 3'-конца синтезируе-

мой теломерной ДНК. Источником энергии для такого перемещения, по-видимому, служит сама реакция синтеза цепи теломерной ДНК, поскольку дезоксинуклеозидтрифосфаты – субстраты этой реакции – высокоэнергетические вещества.

На рис. 3 изображена общепринятая схема механизма синтеза теломерных повторов, катализируемого теломеразой. На первой стадии теломераза находит 3'-конец теломерной ДНК, с которым часть матричного участка теломеразной РНК образует комплементарный комплекс. При этом теломераза использует 3'-конец хромосомной ДНК в качестве праймера. Далее наступает очередь РНК-зависимой ДНК-полимеразной активности теломеразы. Она обеспечивается специальной субъединицей теломеразы, которая по устройству своего каталитического центра во многом сходна с обратными транскриптазами ретровирусов и ретротранспозонов. Когда синтез ДНК-повтора заканчивается, происходит транслокация, то есть перемещение матрицы и белковых субъединиц фермента на заново синтезированный конец теломерной ДНК, и весь цикл повторяется вновь.

Знакомство даже с весьма схематичным описанием механизма теломеразной реакции (см. рис. 3) приводит к заключению, что двумя компонентами – обратной транскриптазой и теломеразной РНК – для ее осуществления обойтись нельзя. Нет сомнения в том, что в его составе должны быть субъединица, отвечающая за поиск и связывание 3'-конца хромосомы (и выполняющая таким образом своеобразную якорную функцию); субъединица, ответственная за транслокацию; субъединицы, связывающие продукт реакции (однотяжевую ДНК). В составе теломеразы обычно обнаруживается и белковая субъединица с нуклеазной активностью, которая,

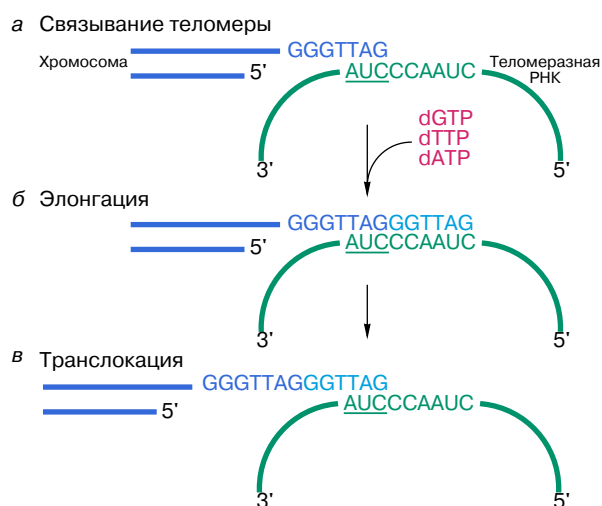


Рис. 3. Основные этапы синтеза одного теломерного ДНК-повтора теломеразой

по-видимому, отщепляет от 3'-конца теломерной ДНК один за другим несколько нуклеотидов до тех пор, пока на этом конце не окажется последовательность, комплементарная нужному участку матричного сегмента теломеразной РНК. Эти субъединицы теломеразы, выполняющие разнообразные функции в ходе синтеза G-цепи теломерной ДНК, изображены на рис. 4, на котором приведена гипотетическая структура теломеразы дрожжей. Нужно еще раз подчеркнуть, что полный белковый состав фермента не известен до сих пор ни в одном случае. Поэтому в табл. 1 приведены характеристики только хорошо изученных белковых субъединиц нескольких теломераз.

Широкое распространение теломераз среди эукариот говорит о том, что механизм синтеза теломерной ДНК, который мы наблюдаем у современных организмов, возник очень давно. Более того, эволюционно-генетический сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов катали-

тических субъединиц теломераз и других обратных транскриптаз показывает, что этот механизм мог существовать еще до появления первых эукариотических клеток.

C-цепь теломерной ДНК синтезируется с помощью обычной ДНК-полимеразы (см. рис. 2). Поэтому 3'-концевой участок G-цепи, на котором, по-видимому, первоначально была РНК-затравка, в конечном итоге остается в одностороннем состоянии (то есть в принципе он готов к тому, чтобы теломераза нарастила на нем новый повтор).

ТЕЛОМЕРАЗА, РАК И СТАРЕНИЕ

Рассмотрим данные о длине теломерной ДНК и активности теломеразы в различных клетках человека, приведенные в табл. 2.

Высокая теломеразная активность наблюдается в половых клетках человека в течение всей его жизни. Соответственно их теломеры состоят из наибольшего числа ДНК-повторов и содержат все необходимые

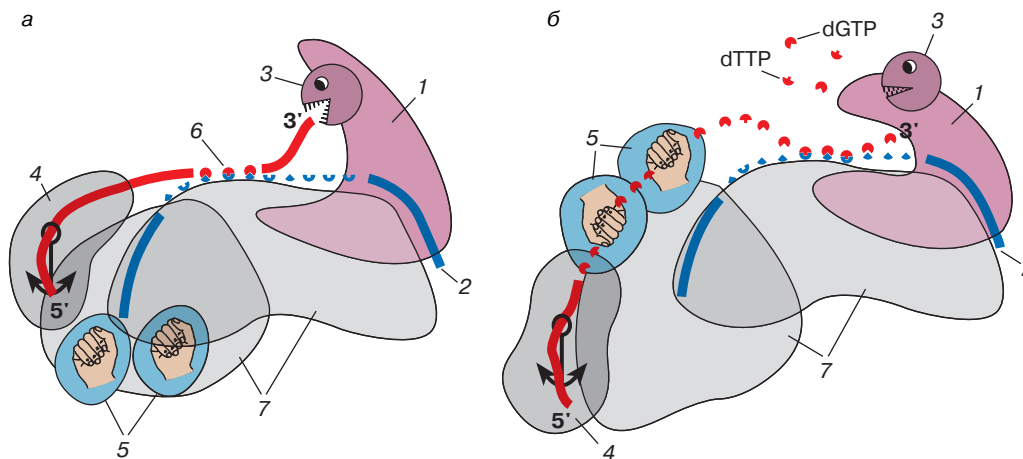


Рис. 4. Гипотетическая структура теломеразы дрожжей по А.В. Петрову: а – нуклеазная субъединица (3) теломеразы “объедает” 3'-конец хромосомной ДНК, тем самым превращает его в праймер для ДНК-полимеразной реакции; б – синтез ДНК-повтора на РНК-матрице. 1 – обратная транскриптаза, 2 – теломеразная РНК, 3 – нуклеаза, 4 – “якорная” субъединица, 5 – субъединица, связывающая вновь синтезированную одностороннюю ДНК, 6 – комплементарный РНК-ДНК-комплекс, 7 – другие субъединицы теломеразы

Таблица 1. Характеристики некоторых белковых субъединиц теломераз различных организмов

Организм	Белок	Длина, а.к.	Масса, kDa	Функция
Инфузория <i>Tetrahymena thermophila</i>	Tt-TERM	1117	133	Обратная транскриптаза
	p80	807	80	Взаимодействует с p95 и теломеразной РНК
	p95	943	95	Взаимодействует с одноцепочечной теломерной ДНК
Инфузория <i>Euplotes aediculatus</i>	p123	1031	123	Обратная транскриптаза
Дрожжи <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	EST2	885	103	Обратная транскриптаза
Мышь <i>Mus musculus</i>	MTERT	~1090	130	Обратная транскриптаза
	TP1	2652	240	Аналог p80
Человек <i>Homo sapiens</i>	HTERT	~1060	127	Обратная транскриптаза
	TP1	2627	260	Аналог p80 (возможно, предохраняет теломеразную РНК от деградации в соматических клетках)

Таблица 2. Длина теломерной ДНК и активность теломеразы в клетках человека

Тип клеток	Теломеры, т.п.н.	Теломеразная активность
Половые	15–20	Высокая
Соматические	10–12 при рождении, уменьшаются с возрастом	Отсутствует
Раковые	4–6, 10–15	Присутствует в 80% случаев

белки для нормальной пролиферации клеток. Аналогичная ситуация наблюдается и для стволовых клеток. Напомним, что стволовые клетки делятся неограниченно долго. Однако у стволовой клетки всегда есть возможность дать две дочерние клетки, одна из которых останется стволовой (“бессмертной”), а другая вступит в процесс дифференцировки. Благодаря этому стволовые клетки служат постоянным источником разнообразных клеток организма. Например, стволовые клетки костного мозга дают начало гемопоэзу – процессу образования клеток крови, а из базальных клеток эпидермиса происходят разнообразные клетки кожного покрова. Как только потомки половых или стволовых клеток начинают дифференцироваться, активность теломеразы падает и их теломеры начинают укорачиваться. В клетках, дифференцировка которых завершена, активность теломеразы падает до нуля, и, как мы уже отмечали, с каждым клеточным делением они с неизбежностью приближаются к состоянию сенесенса (перестают делиться). Вслед за этим наступает кризис, и большинство клеток погибают (рис. 5). Эта картина характерна для подавляющего большинства известных культур клеток эукариот. Однако и здесь есть редкие, но важные исключения: теломеразная активность обнаруживается в таких “смертных” клетках, как макрофаги и лейкоциты.

Недавно было установлено, что нормальные соматические клетки потому лишены теломеразной активности, что в них полностью подавлена экспрессия гена ее каталитической субъединицы (обратной транскриптазы). Другие же составляющие теломеразы, включая теломеразную РНК, образу-

ются в этих клетках, хотя и в меньших количествах, чем в их “бессмертных” прародителях, но постоянно (или, как говорят, конститутивно). Открытие этого важного факта Дж. Шеем, В. Райтом и их сотрудниками и стало основой для той сенсационной работы по преодолению “лимита Хейфлика”. Действительно, все остальное было уже делом техники (хотя и очень непростой).

В нормальные соматические клетки были внесены гены теломеразной обратной транскриптазы с помощью специальных векторов, сконструированных из вирусных ДНК. Уровень экспрессии гена в эукариотической клетке зависит от многих факторов, в том числе от белков – факторов транскрипции, связывающихся со специализированными участками ДНК, расположенными в хромосоме по соседству с этим геном. Геномы вирусов, которым нужно быстро размножиться в клетке-хозяине, несут в себе участки ДНК, способные во много раз усилить экспрессию того или иного гена. Исследователи позаботились о том, чтобы в их конструкциях ген теломеразной обратной транскриптазы человека оказался в окружении именно таких участков вирусной ДНК. Результаты их экспериментов можно суммировать кратко: клетки, в которых теломераза поддерживала длину теломер на уровне, характерном для молодых клеток, продолжали делиться и тогда, когда контрольные клетки (без теломеразы) дряхлели и умирали.

В этой и аналогичной ей работах особенно тщательно контролируется отсутствие в культуре клеток раковых клеток¹. Известно, что клетки большинства исследованных на сегодня раковых опухолей характеризуются достаточно высокой активностью теломеразы, которая поддерживает длину теломер на постоянном уровне (см. табл. 2). Этот уровень заметно ниже, чем, например, у эмбриональных клеток, но он достаточен, чтобы обеспечить безграничное деление раковых клеток в культуре. Существует

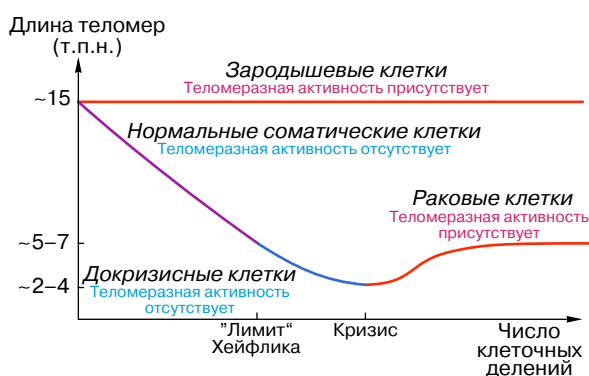


Рис. 5. Схема, иллюстрирующая связь длины теломерной ДНК и активности теломеразы с особенностями клеточного деления различных типов клеток

¹ В процессе подготовки настоящей статьи к печати в научной литературе появилось несколько статей, в которых скептически оценивались результаты сенсационной работы по преодолению “лимита Хейфлика”. Авторы критиковали главным образом за то, что они не привели убедительных доказательств отсутствия ракового перерождения клеток с “ожившей” теломеразой. В начале 1999 года те же авторы опубликовали подробную статью, в которой они приводят такие доказательства. Они сообщили также, что нормальные клетки с активной теломеразой вместо 50–60 прошли более 220 циклов деления. Более того, они активировали теломеразу в клетках живых мышей, и ни у одной из них не возникло злокачественных опухолей.

гипотеза, у которой немало сторонников, предполагающая, что потеря теломеразной активности соматическими клетками современных организмов есть благоприобретенное в процессе эволюции свойство, уберегающее их от злокачественного перерождения.

Сравнительно небольшая длина теломер у большинства раковых клеток наводит на мысль о том, что они происходят из нормальных клеток, достигших предкризисного состояния. Как мы уже отмечали, это состояние характеризуется нарушением регуляции многих биохимических реакций. В таких клетках происходят многочисленные хромосомные перестройки, которые в том числе ведут и к злокачественной трансформации (более подробно о происхождении злокачественных опухолей см. в статье Г.И. Абелева “Что такое опухоль”: Соросовский Образовательный Журнал. 1997. № 10). Большинство этих клеток погибают, но в части из них в результате случайных мутаций может активироваться постоянная экспрессия генов теломеразы, которая будет поддерживать длину теломер на уровне, необходимом и достаточном для их функционирования (см. рис. 5).

Некоторое время вызывал недоумение тот факт, что примерно пятая часть проанализированных раковых опухолей и клеток вообще не содержала активной теломеразы. Оказалось, однако, что длина теломер в них поддерживается на должном уровне. Таким образом, в этих клетках действует другой (не теломеразный, а скорее рекомбинационный) механизм образования теломерной ДНК (см. статью В.М. Глазера “Гомологичная генетическая рекомбинация”: Соросовский Образовательный Журнал. 1998. № 7). Иными словами, такие клетки находятся в том же ряду исключений из правила, что и дрожжи.

ВМЕСТО ЗАКЛЮЧЕНИЯ

Какие же практические выводы следуют из того, что на сегодняшний день удалось узнать о связи между активностью теломеразы, раковым ростом и старением клеток. Казалось бы, они лежат на поверхности: не хочешь стареть — активируй теломеразу; хочешь убить раковую опухоль — убей в ней сначала теломеразу.

Легковесность первого вывода (а именно его подхватили средства массовой информации) очевидна: между культурой клеток и клеточной тканью, а тем более организмом дистанция огромного размера. Еще не пришло время всерьез обсуждать проблему получения трансгенных органов человека для пересадки их больным людям (хотя теоретически это, конечно, возможно). А главное, процесс старения не только организма, но и клетки — это исключительно сложный комплекс изменений во множестве биохимических реакций, и его вряд ли можно повернуть вспять, воздействуя только на какую-то одну из них. В то же время существуют вполне

реальные планы активировать теломеразу в клетках кожи, которую пересаживают пациентам с сильными ожогами, и тем самым активировать их рост. Или попытаться тем же путем “омолодить” клетки сетчатки глаза, взяв их у пациента, страдающего помутнением сетчатки (а это широко распространенное заболевание у пожилых людей, ведущее к слепоте), и затем вернуть назад.

Что же касается разработки методов избирательного подавления теломеразной активности в раковых опухолях, то сейчас это важное направление в поиске новых средств борьбы со злокачественными заболеваниями. Пока большинство работ связано с испытанием ингибиторов обратных транскриптаз (каталитических субъединиц теломераз). Опыт борьбы со СПИДом, где пытаются решить аналогичную задачу, говорит о том, что определенные надежды найти такое лекарство есть. Главная трудность заключается в том, что каталитическая субъединица теломеразы — это одна из ДНК-полимераз и искомым ингибитором должен быть направлен именно на теломеразную ДНК-синтезирующую активность. В противном случае он будет токсичен для нормальных клеток.

Более перспективными кажутся недавно появившиеся работы, в которых описано избирательное подавление теломеразной РНК, вызывающее гибель раковых клеток в культуре. В нормальных клетках, как это мы отмечали выше, теломеразная РНК синтезируется, но эти клетки лишены теломеразной активности и, скорее всего, теломеразная РНК им не нужна.

Изучение тонкой структуры теломер и механизма действия теломераз находится еще только в начальной стадии. Однако они привлекают к себе огромный интерес исследователей, работающих в самых разных областях биологии и медицины, и здесь уже в ближайшее время можно ждать новых интересных открытий.

Автор выражает благодарность А.В. Петрову за помощь в подготовке рисунков к этой статье.

РЕКОМЕНДОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Альбертс Б., Брей Б., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки. М.: Мир, 1994. Т. 1–3.
2. Теломера, теломераза, рак и старение // Биохимия. 1997. Т. 62, № 11.

* * *

Алексей Алексеевич Богданов, доктор химических наук, профессор, действительный член РАН, зав. отделом Института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, зав. кафедрой химии природных соединений химического факультета МГУ. Область научных интересов — ДНК- и РНК-белковые комплексы и их участие в экспрессии генетической информации. Автор и соавтор около 170 научных статей, четырех учебников и двух монографий.

Современные представления о роли теломер и теломеразы в патогенезе гипертонической болезни

О.М. Драпкина, Р.Н. Шепель

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Первый Московский медицинский университет им. И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Драпкина О.М. — доктор медицинских наук, профессор кафедры пропедевтики внутренних болезней лечебного факультета ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Первый МГМУ им. И.М. Сеченова); Шепель Р.Н. — аспирант кафедры пропедевтики внутренних болезней Первого МГМУ им. И.М. Сеченова.

Контактная информация: ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2, 119991. E-mail: drapkina@bk.ru (Драпкина Оксана Михайловна).

Резюме

В эру высокотехнологичной медицины ученым предоставляется возможность открывать ранее неизвестные механизмы развития, течения и исхода заболеваний. К таким высокоинформативным методам относится исследование активности теломеразы и измерение длины теломер при гипертонической болезни. Изменение длины теломер в клетках отражает процессы развития и деградации клетки, а также этапы ее жизненного цикла. Изучение генетических дефектов в теломерах и механизмов восстановления теломер имеют большое практическое значение в подходах к лечению и в прогнозе течения гипертонической болезни. Измерение длины теломер лейкоцитов периферической крови может служить скрининговым методом исследования для прогноза, мониторинга, генетического консультирования и лечения пациента. По состоянию теломер можно оценить также риск развития и прогноз при гипертонической болезни. Определение длины теломер в динамике заболевания позволяет оценить эффективность проводимого лечения. В данном обзоре рассматриваются молекулярные механизмы действия теломер и теломеразы, а также патофизиологические механизмы нарушения восстановления теломер и активности теломеразы, которые приводят к развитию гипертонической болезни.

Ключевые слова: теломера, теломераза, гипертоническая болезнь, старение.

The modern conception of the proper role of telomeres and telomerase in pathogenesis of hypertension

O.M. Drapkina, R.N. Shepel

Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Corresponding author: Sechenov First Moscow State Medical University, 8–2 Trubetskaya st., Moscow, Russia, 119991. E-mail: drapkina@bk.ru (Oksana M. Drapkina, MD, PhD, Professor at the Department of Internal Diseases Propedeutics at Sechenov First Moscow State Medical University).

Abstract

In this era of high-tech medicine, scientists have the opportunity to discover previously unknown mechanisms of development throughout the course and outcome of the disease. These methods include a highly informative study of telomerase activity and telomere length measurement in hypertension. The change of the telomere length in cells reflects the processes of the development and degradation of cells, as well as the stages of their life cycle. The study of genetic defects in telomeres and telomere repair mechanisms are of great practical importance for treatment approaches and making prognosis in hypertension. Measurement of telomere length of peripheral blood leukocytes may serve as a screening method for the prediction of examination, monitoring, genetic counselling

and treatment of a patient. As telomeres can help in estimating risks in hypertension, determining the length of telomeres in the course of the disease to evaluate the effectiveness of the treatment is of great importance. This review discusses the molecular mechanisms of telomeres and telomerase, as well as pathophysiological mechanisms, disorders, recovery of telomerase activity, and telomere that lead to the development of hypertension.

Key words: telomeres, telomerase, hypertension, ageing.

Статья поступила в редакцию: 22.08.13. и принята к печати: 30.08.13.

Введение

В 1938 году генетики Барбара Мак-Клинтон и Герман Меллер независимо друг от друга установили, что фрагментация хромосом и появление у них дополнительных концов ведут к хромосомным перестройкам и деградации хромосом. В сохранности остаются лишь области хромосом, прилегающие к их естественным концам. Лишенные концевых теломер, хромосомы начинают сливаться с большей частотой, что ведет к формированию тяжелых генетических аномалий. Ученые пришли к выводу, что естественные концы линейных хромосом защищены специальными структурами. Г. Меллер предложил называть их теломерами (от греч. «telos» — конец и «meros» — часть). С того времени проблемой изучения роли теломер и фермента теломеразы в клеточном цикле занимались многие ученые, что позволило накопить немалый объем знаний по этому вопросу.

Во многих современных учебниках теломерами называют специализированные концевые районы линейной хромосомной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), состоящей из многократно повторяющихся коротких нуклеотидных последовательностей. Однако это определение неполное. В состав теломер входят также многие белки, специфически связывающиеся с теломерными ДНК-повторами. Таким образом, теломеры (так же, как и другие хромосомы эукариот) построены из дезоксинуклеопротеидов, то есть комплексов ДНК с белками (рис. 1). Теломерные повторы — весьма консервативные последовательности. К примеру, повторы всех позвоночных состоят из шести нуклеотидов (TTAGGG)_n, повторы всех насекомых — из пяти (TTAGG)_n, повторы большинства растений — из семи (TTTAGGG)_n. Длина теломерных ДНК у человека колеблется от 2 до 20 тысяч пар нуклеотидных остатков (т.н.п.), а у некоторых видов мышей может достигать до сотен т.н.п. [1].

Благодаря наличию в теломерах устойчивых повторов клеточная система репарации не путает теломерный участок со случайным разрывом. Таким путем обеспечивается стабильность хромосом: конец одной хромосомы не может соединиться с разрывом другой [2]. Кроме этого, среди основных

функций теломер можно выделить следующие:

1. Механические. Теломеры участвуют в фиксации хромосом к ядерному матриксу. Это важно для правильной ориентации хромосом в ядре, и данное обстоятельство особенно проявляется в мейозе. На зиготенной стадии профазы мейоза происходят направленные перемещения концов хромосом на поверхности ядерной мембраны так, что концы гомологичных хромосом смыкаются, и с них начинается спаривание (конъюгация) этих хромосом строго однородными участками.

2. Стабилизационные. А) Если в клетке нет теломеразы (или ALT), то наличие теломер предохраняет от недорепликации генетически значимые отделы ДНК. Б) Если же в клетке есть теломеразная активность, то появляется еще одна возможность — стабилизация концов разорванных хромосом. Так, при случайном разрыве хромосомы образуются фрагменты, на одном или на обоих концах которых нет теломерных повторов. В отсутствие теломеразы эти фрагменты претерпевают слияние и деградацию, что блокирует клеточный цикл и ведет клетку к гибели. В присутствии же теломеразы к местам разрыва присоединяется теломерная ДНК. Это стабилизирует хромосомные фрагменты и позволяет им функционировать.

3. Влияние на экспрессию генов. Активность генов, расположенных рядом с теломерами, снижена (репрессирована). Такой эффект часто обозначается как транскрипционное молчание, или сайленсинг. При значительном же укорочении теломер эффект положения пропадает и прителомерные гены активируются.

4. «Счетная» функция. Теломерные отделы ДНК выступают в качестве часового устройства (репликометра), которое отсчитывает количество делений клетки после исчезновения теломеразной активности. Причем гораздо важнее для клетки не то, сколько делений уже прошло, а сколько еще осталось до критического укорочения теломеры. Поэтому можно сказать, что теломеры — это «устройства», определяющие количество делений, которые способна совершить нормальная клетка в отсутствие теломеразы. Достигая критически короткой длины, теломеры теряют возможность выполнять все (или многие) из вышперечисленных

Рисунок 1. Схема строения теломеры в составе хромосомы

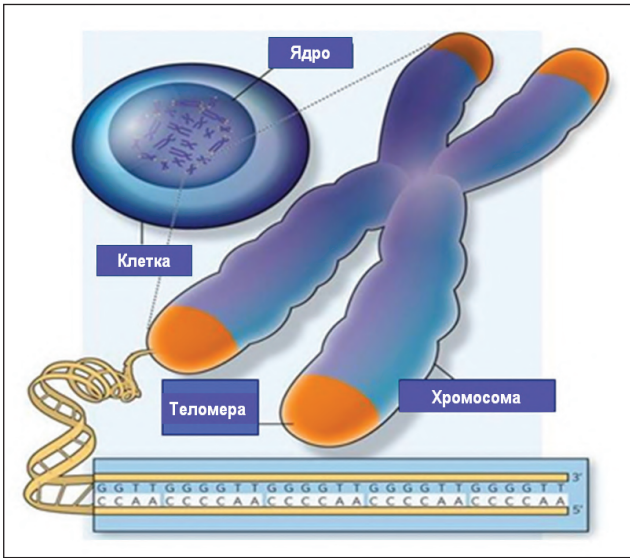


Рисунок 2. Укорочение участков теломер в процессе деления соматической клетки

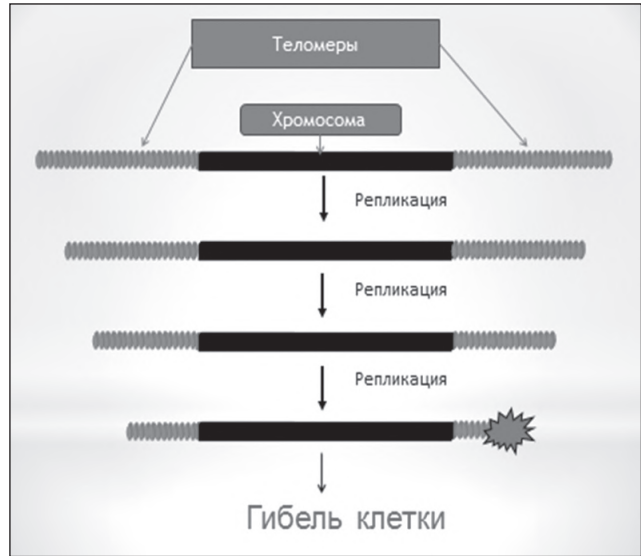


Рисунок 3. Теломеразный комплекс и его компоненты (обратная транскриптаза-TERT, РНК компоненты-TERC, белок дискерин) [7]

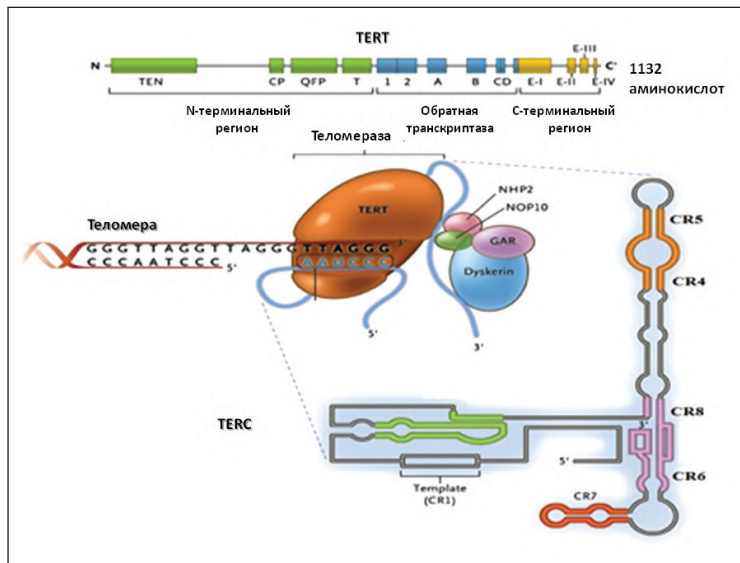
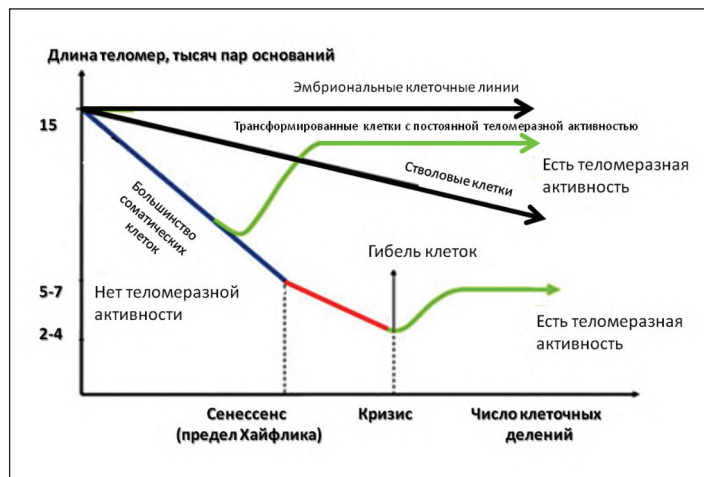


Рисунок 4. Схема, иллюстрирующая связь длины теломерной ДНК и степени активности теломераз различного типа клеток



функций. Нарушается клеточный цикл и, в конечном счете, клетка погибает.

Теломераза — это РНК-зависимая ДНК-полимераза (или обратная транскриптаза). Основное назначение этого фермента — синтезировать тандемно повторяющиеся сегменты ДНК, из которых состоит цепь теломерной ДНК. В обычных (соматических) клетках, из которых в основном и состоит организм, теломераза «не работает», поэтому теломеры при каждом делении клетки укорачиваются, что в конечном итоге приводит к состоянию ее «ареста» (cell senescence — старение, дряхление клетки), когда клетка больше не способна делиться (рис. 2).

В эмбриональных и полипотентных стволовых клетках благодаря экспрессии теломеразы поддерживается постоянный уровень длины теломер. Теломераза существенно экспрессирована в этих клетках. Кроме того, повышенные уровни теломеразы содержатся в гемопоэтических стволовых клетках, в активированных Т-лимфоцитах и в большинстве опухолей человека.

Структура теломеразы и составляющих ее белков впервые описана профессором Скордалакесом и его коллегами. В состав теломеразы входят: белок TERT (который имеет домен, гомологичный обратной транскриптазе), теломеразная рибонуклеиновая кислота (РНК, hTR или TERC) и дискерин (рис. 3). Две субъединицы фермента теломеразы кодируются двумя различными генами. Кодированный регион для TERT имеет длину 3396 аминокислот, TERT содержит 1131 аминокислоту. Этот белок (молекулярная масса > 100 кД) по своей структуре напоминает форму рукавицы, которая позволяет ему прикрепляться к хромосоме и добавлять к ней участки теломер, состоящие из одной цепочки. TERT захватывает TERC (имеющий длину 451 нуклеотид), которая не транслируется, оставаясь РНК [3, 4]. Теломераза синтезирует теломерные ДНК-последовательности, идущие от 5' к 3' концу по направлению к окончаниям хромосом. Регулируемое восстановление хромосомной ДНК необходимо, чтобы компенсировать укорочение, которое возникает в результате активности нуклеазы и неполной концевой ДНК-репликации. Многокомпонентная система «гомеостаза теломер» предотвращает, с

одной стороны, чрезмерное удлинение теломер, а с другой стороны, — критическое укорочение, которое может привести к поломкам ДНК и нестабильности генома. Несмотря на участие теломеразы в процессах восстановления длины теломер в каждом клеточном цикле, восстановление в соматических клетках, в отличие от эмбриональных стволовых клеток, не является полным, и большинство соматических клеток с каждым циклом репликации теряют участки теломер. Длина теломер уменьшается с возрастом. Наиболее интенсивное сокращение длины теломер у человека происходит в первые годы жизни (в связи с потребностями организма в росте) и после 60 лет (в связи с нарушениями механизма восстановления теломер) [5, 6]. В-лимфоциты составляют исключение из этого правила. Удлинение теломер в В-клеточной линии лимфоцитов отражает необходимость экстенсивного деления этих клеток (обусловленного особенностями их функций — клональной секрецией, а также синтезом и продукцией антител). Активация теломеразы запускается по принципу обратной связи в ответ на укорочение длины теломер. Однако этот механизм имеет предел во всех клетках, с течением времени происходит снижение активности теломеразы и, как следствие, — уменьшение средней длины теломер, а также уменьшение возможности ее восстановления. Таким образом, создается барьер для опухолевого перерождения клетки [5].

«Изнашивание» теломер играет важную роль в предотвращении нестабильности генома. Когда длина теломер в соматической клетке достигает критического укорочения (менее 2 кб), наступает резкое изменение метаболизма клетки, и в первую очередь нарушение репликации ДНК, запускаются механизмы клеточного сенесенса и апоптоза, за которым следует гибель клетки. Период от критического укорочения теломер до гибели клетки может длиться в течение нескольких месяцев и даже лет. Клетка теряет способность делиться, но может сохранять метаболическую активность. Активация теломеразы в соматической клетке, имеющей критическую длину теломер, приводит к опухолевой трансформации этой клетки.

Половые клетки имеют наибольшую теломеразную активность в течение всей жизни (табл.).

Таблица

ДЛИНА ТЕЛОМЕРНОЙ ДНК И АКТИВНОСТЬ ТЕЛОМЕРАЗЫ В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

Тип клеток	Теломеры, т.н.п.	Теломеразная активность
Половые	15-20	Высокая
Соматические	10-20 при рождении, уменьшаются с возрастом	Отсутствует
Раковые	4-6, 10-15	Присутствует в 80 % случаев

Их теломеры состоят из наибольшего числа ДНК-повторов и содержат все необходимые белки для нормальной пролиферации клеток. Аналогичная ситуация наблюдается и у стволовых клеток. Напомним, что стволовые клетки делятся неограниченно долго. Однако у стволовой клетки всегда есть возможность дать две дочерние клетки, одна из которой останется стволовой («бессмертной»), а другая вступит в процесс дифференцировки. Благодаря этому, стволовые клетки служат постоянным источником разнообразных клеток организма. Как только потомки половых и стволовых клеток начинают дифференцироваться, активность теломераз падает и их теломеры укорачиваются. В клетках, дифференцировка которых завершена, активность теломераз падает до нуля. С каждым делением они неизбежно приближаются к состоянию сенесенса, то есть перестают делиться. После этого большинство клеток погибают (рис. 4). Такая картина характерна для большинства клеток эукариот [1].

Таким образом, подводя итог вышесказанного, становится очевидным, что биологическая функция теломер выходит за рамки защиты концов хромосом от деградации и имеет весомое значение в процессе старения клетки.

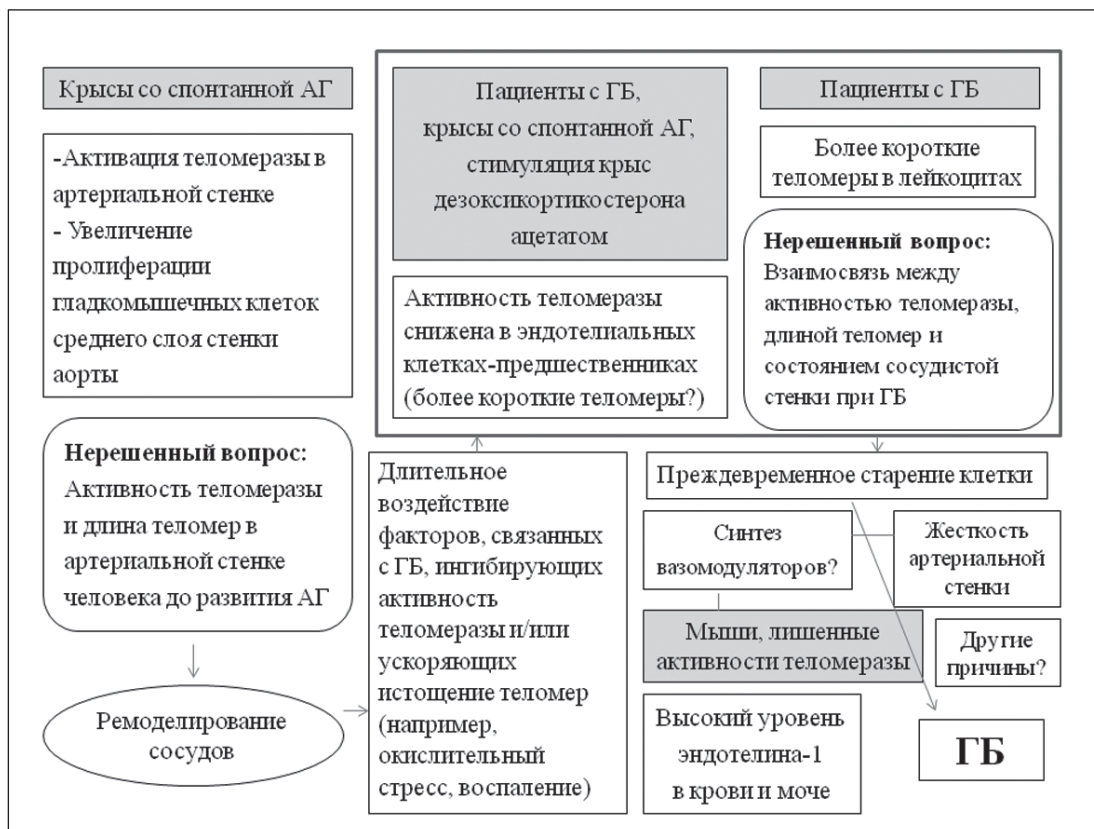
Теломеры и гипертоническая болезнь

В последние годы активно изучается вопрос взаимосвязи между длиной теломер и риском наступления сердечно-сосудистых заболеваний. От длины теломер зависит время наступления процесса старения клетки [7]. В то же время и повышенное артериальное давление (АД) является характерной чертой старения [8]. Возникло предположение, что существует связь между длиной теломер и уровнем АД ввиду того, что выявлена значительная отрицательная корреляция между уровнем систолического кровяного давления и длиной теломер у лиц с артериальной гипертензией (АГ) [9]. Суммируя эту информацию, можно предположить, что укорочение теломер, вызывая изменения фенотипической экспрессии в клетках сосудов, может способствовать развитию АГ.

АГ — один из самых важных факторов риска развития сердечно-сосудистых осложнений и смертности. Достаточно хорошо изучены механизмы ремоделирования сосудистой стенки при АГ, однако молекулярные основы аномалии при гипертонической болезни до конца не определены.

На рисунке 5 представлены результаты исследований, проводившихся на животных и в популяции

Рисунок 5. Гипотетическая модель изменений теломер и теломеразы на различных стадиях развития гипертонической болезни



Примечание: АГ — артериальная гипертензия; ГБ — гипертоническая болезнь.

больных АГ, которые показывают взаимосвязь между длиной теломер и активностью теломеразы на различных стадиях развития гипертонической болезни.

Ying Cao и соавторы (2002) установили, что в аорте (но не в других органах!) крыс со спонтанной гипертензией, теломераза избирательно активируется и теломеры удлиняются (в естественных условиях и в пробирке) [10]. Активация теломераз с последующим удлинением теломер в гладкомышечных клетках среднего слоя стенки аорты стимулирует дисбаланс между апоптозом клеток и их пролиферацией, что в свою очередь приводит к ремоделированию сосудов при генетически обусловленной АГ. По мнению авторов, именно этот механизм представляет собой потенциально новую терапевтическую мишень при АГ.

Gema Pérez-Rivero и соавторы (2006) анализировали влияние дефицита теломеразы и укорочение теломер на АД у мышей [11]. Все процедуры были выполнены на 6-месячных мышах. В трех экспериментальных группах были использованы мыши дикого типа (WT), мыши первого поколения (G1) — с отсутствием активности теломеразы и без значительного сокращения теломер, и мыши третьего поколения (G3) — лишённые активности теломеразы и со значительным укорочением теломер. Каждая группа имела одинаковое количество особей мужского и женского пола. Мыши группы G1 показали увеличение уровня систолического АД (САД) по сравнению с мышами группы WT. В группе G3 в сравнении с группами WT и G1 увеличилось как САД, так и диастолическое АД (ДАД). Затем авторы исследования попытались определить роль вазоактивных эндотелиальных факторов в генезе

АГ среди мышей групп G3 и WT. Мыши обеих групп показали аналогичные ответы на ацетилхолин, NG-нитро-L-аргинин метиловый эфир, ангиотензин II и лозартан (что не подтверждает главной роли данных факторов в генезе АГ у теломераза-дефицитных мышей). Показатели среднего АД в группе G3 (в отличие от мышей группы WT) не увеличились после стимуляции эндотелином-1 (ЭТ-1). При лечении бозентаном (неселективным антагонистом эндотелиновых рецепторов типа ETA и ETB) показатели среднего АД снизились только в группе G3. Концентрация ЭТ-1 (так же, как и концентрация эндотелинконвертирующего фермента-1) в плазме крови и моче была выше в группе G3, чем в группе WT. Таким образом, результаты исследования позволили авторам подтвердить существование прямой связи между дефицитом теломеразы и развитием АГ. В самом деле у теломераза-дефицитных мышей определяются более высокие показатели АД, чем у мышей группы WT. Данные исследования также указывают на то, что эндотелинконвертирующий фермент выступает в качестве одного из факторов, ответственных за высокий уровень АД. С помощью этих данных авторы предполагают, что дефицит теломеразы и укорочение теломер может вызвать изменения в фенотипической экспрессии эндотелинконвертирующего фермента-1 в клетках сосудов с последующим повышением уровня циркулирующего ЭТ-1 и развитием АГ.

Группа ученых во главе Е. Jeanclos проводила исследование (2000), основной задачей которого являлось установление связи между уровнем САД, ДАД, пульсового давления и длиной теломер [12]. В исследовании участвовали 98 здоровых близнецов (10 пар монозиготных и 39 пар дизиготных близ-

Рисунок 6. Взаимосвязь между длиной теломер и величиной пульсового давления

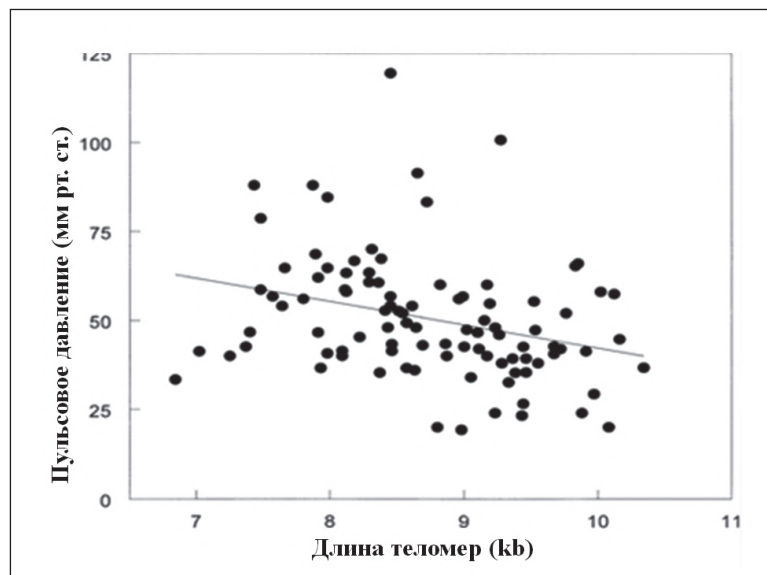


Рисунок 7. Взаимосвязь между возрастом и длиной теломер у мужчин (а) и женщин (б)

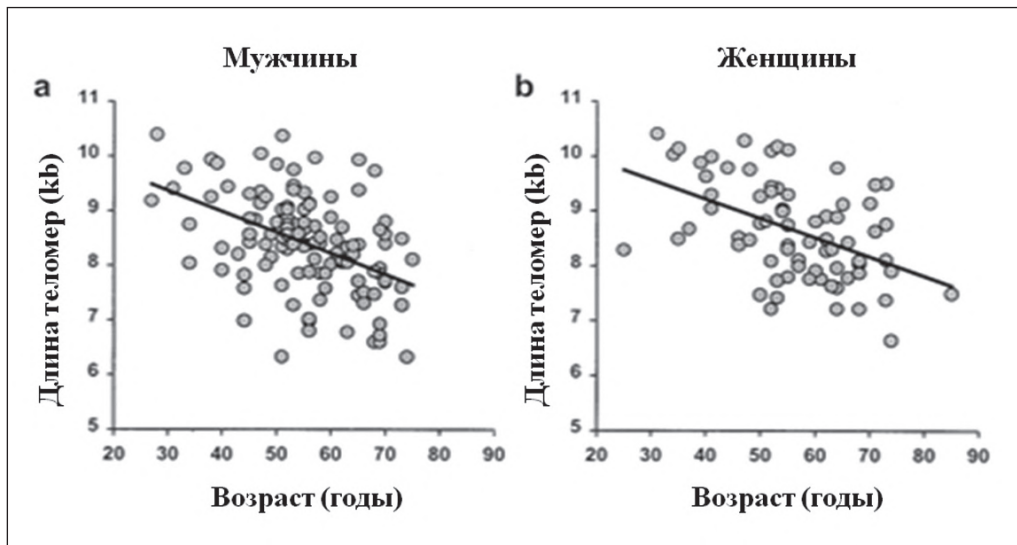
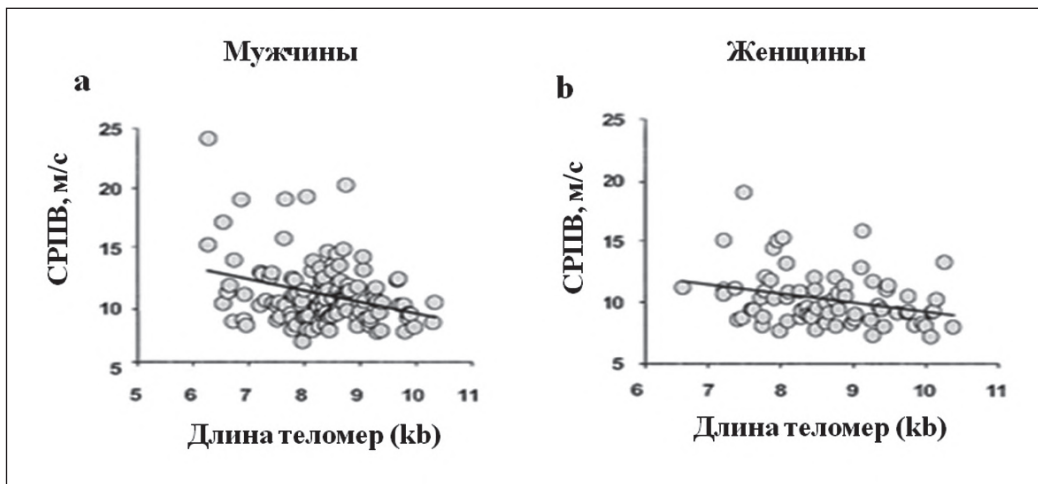
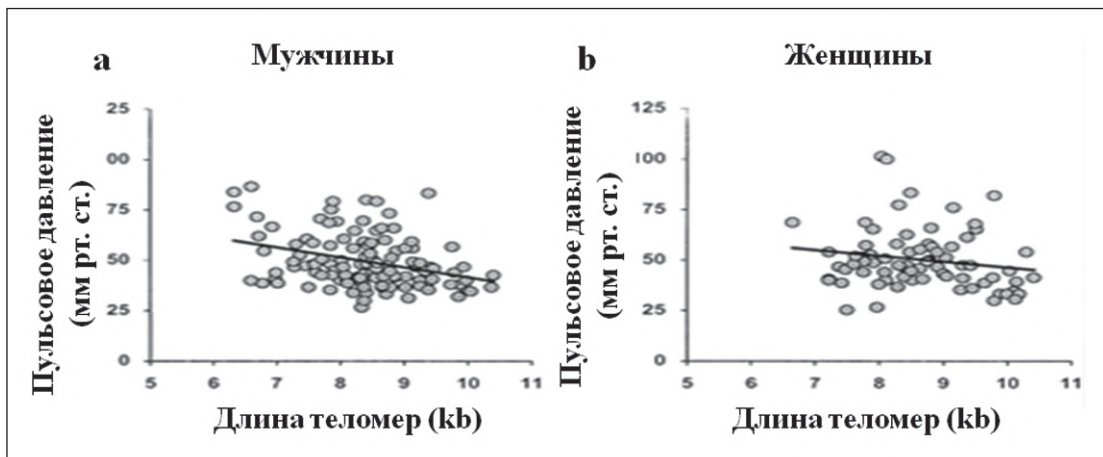


Рисунок 8. Взаимосвязь между скоростью пульсовой волны и длиной теломер у мужчин (а) и женщин (б)



Примечание: СРПВ — скорость распространения пульсовой волны.

Рисунок 9. Взаимосвязь между величиной пульсового давления и длиной теломер у мужчин (а) и женщин (б)



нецов). Изучались образцы ДНК белых кровяных телец (лейкоцитов). Возраст испытуемых был от 18 до 44 лет. Авторы установили, что показатели пульсового давления обратно коррелируют с длиной теломер в белых кровяных тельцах (рис. 6). Более того, корреляция длины теломер и пульсового давления была независима от пола, то есть с высокой вероятностью можно предположить, что оба параметра имеют наследуемый характер. Также установлена положительная корреляция длины теломер в лейкоцитах периферической крови с ДАД и отрицательная — с САД, что подтверждает отрицательную связь между длиной теломер и пульсовым давлением.

А. Venetos и соавторы (2001) в своем исследовании также определяли длину теломер в лейкоцитах периферической крови и АД, которые были ассоциированы с показателями жесткости сосудистой стенки (пульсовое давление и скорость распространения пульсовой волны) у пациентов, которые не принимали антигипертензивные препараты (120 мужчин и 73 женщины, средний возраст 56 ± 11 лет) [13]. При внесении поправки на возраст длина теломер была больше у женщин, чем у мужчин: $8,67 \pm 0,09$ против $8,37 \pm 0,07$ кб, $p = 0,016$ (рис. 7). Длина теломер коррелировала со скоростью пульсовой волны и у мужчин, и у женщин (рис. 8). В то же время показатели пульсового давления коррелируют с длиной теломер только у мужчин (рис. 9). Длина теломер не коррелировала с индексом массы тела, уровнем общего холестерина, частотой сердечных сокращений и показателем липопротеинов высокой плотности.

В данном исследовании достаточно малый размер выборки (особенно женщин). Тем не менее наблюдение за гендерными различиями в длине теломер позволяет установить, что связи между длиной теломер и показателями жесткости сосудистой стенки не могут быть одинаковыми у мужчин и женщин. Согласно результатам многочисленных ранее проведенных исследований, жесткость стенок крупных артерий (с оценкой пульсового давления и скорости распространения пульсовой волны) является фенотипом биологического старения артериальной системы. Несмотря на отрицательную корреляцию длины теломер с возрастом независимо от пола, при мультивариантном анализе А. Venetos и соавторами (2001) установлено, что уменьшение длины теломер способствует увеличению пульсового давления и скорости распространения пульсовой волны только у мужчин.

Большинство современных теорий старения являются продолжением теории, которую в 1956 году предложил Harman [14], и постулируют то,

что окислительный стресс служит основным фактором, определяющим продолжительность жизни (так как он является ключевым элементом заболеваний сердечно-сосудистой системы), и, в конечном итоге, приводит к смерти людей и других млекопитающих [15, 16]. Процесс воспаления, который, как правило, связан с окислительным стрессом, также является важным элементом в жизни человека [17]. С этой точки зрения, процесс старения, в конечном счете, может быть связан с окислительным стрессом и воспалением. В свою очередь, ученым удалось проследить связь между гипертонической болезнью, резистентностью к инсулину и окислительным стрессом [18–20]. Биомаркеры, которые используются для определения резистентности к инсулину, окислительного стресса и процесса воспаления в клинических условиях, в значительной степени отражают метаболические и воспалительные состояния на момент отбора образцов. Вопрос о том, существуют ли биомаркеры, которые фиксируют совокупное пожизненное время окислительного стресса и воспаления, остается открытым. Некоторые ученые предполагают, что одним из таких биомаркеров является длина теломер лейкоцитов.

S. Demissie и соавторы (2006) утверждают, что инсулинорезистентность и окислительный стресс связаны с ускоренным укорочением длины теломер в лейкоцитах [21]. Авторы подтвердили взаимосвязь между длиной теломер лейкоцитов, резистентностью к инсулину, окислительным стрессом и АГ. В исследовании принимали участие 327 мужчин со средним возрастом 62,2 года (диапазон 40–89 лет). Установлено, что длина теломер обратно коррелирует с возрастом, обратно коррелирует с гомеостатической моделью оценки инсулинорезистентности и индексом системного окислительного стресса. При сравнении участников исследования с их сверстниками (у которых отмечались нормальные показатели АД) у больных АГ длина теломер короче, чем у лиц с нормальным уровнем АД (у лиц с АГ — $5,93 \pm 0,042$ кб, у лиц с нормальными показателями АД — $6,07 \pm 0,040$ кб, $p = 0,025$). В совокупности эти наблюдения позволяют предположить, что а) АГ, повышенная резистентность к инсулину и окислительный стресс связаны с более короткой длиной теломер лейкоцитов; б) более короткая длина теломер лейкоцитов у лиц с АГ во многом связана с резистентностью к инсулину.

Подобное исследование провела группа ученых во главе с Annette L. Fitzpatrick (2007). Авторы попытались установить связь между длиной теломер лейкоцитов и отдельными субклиническими сердечно-сосудистыми заболеваниями/факторами риска

сердечно-сосудистых заболеваний. В исследовании участвовало 419 человек (средний возраст — 74,2 года), средняя длина теломер лейкоцитов у которых составляла 6,3 тысячи пар оснований. По результатам проведенного исследования, установлена обратная корреляция между длиной теломер лейкоцитов и риском развития сахарного диабета, степенью повышения уровня глюкозы крови, степенью повышения ДАД, степенью увеличения толщины интима-медиа сонных артерий, уровнем интерлейкина-6. Отмечено, что у молодых участников исследования каждое сокращение теломер на 1 000 нуклеотидов (1 килобаза, кб) ассоциируется с тройным увеличением риска инфаркта миокарда (ОР 3,08, 95 % доверительный интервал 1,22–7,73) и инсульта (ОР 3,22, 95 % доверительный интервал 1,29–8,02). Таким образом, результаты исследования Annette L. Fitzpatrick и соавторов еще раз подтверждают гипотезу о том, что укорочение теломер может быть связано с процессами старения через механизмы с участием окислительного стресса, воспаления и прогрессирования сердечно-сосудистых заболеваний.

Заключение

Таким образом, дальнейшее изучение активности теломеразы и длины теломер при гипертонической болезни позволит разработать современные подходы к лечению, мониторингу заболевания. По состоянию теломер врач может оценить риск развития гипертонической болезни, прогноз течения и исхода заболевания и оценить эффективность проводимого лечения. Кроме того, изучение генетических нарушений теломеразы и теломер, возникающих под влиянием экзогенных факторов, позволит воздействовать на факторы риска развития заболеваний и разработать меры профилактики развития гипертонической болезни, а также выявить группы риска развития этого заболевания. Исследования в области механизмов функционирования теломер и теломеразы является перспективным направлением для разработки новых лекарственных препаратов в кардиологии.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов.

Литература

1. Богданов А.А. Теломеры и теломеразы // Соросовский образовательный журнал. — 1998. — № 12. — С. 12–18. / Bogdanov A.A. Telomeres and telomerases // Soros Educational Journal [Sorosovskiy Obrazovatelniy Zhurnal]. — 1998. — № 12. — P. 12–18 [Russian].
2. Альбертс Б., Брей Б., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки. — М.: Мир, 1994. — С. 1–3. / Alberts B., Brey B., Luis G. et al. Molecular cell biology. — Moscow: Mir, 1994. — P. 1–3 [Russian].

3. Blackburn E.H. Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions // FEBS Letters. — 2005. — Vol. 579, № 4. — P. 859–862.
4. Calado R.T., Young N.S. Telomere diseases // N. Engl. J. Med. — 2009. — Vol. 361, № 24. — P. 2353–2365.
5. Jiang H., Schiffer E., Song Z. et al. Proteins induced by telomere dysfunction and DNA damage represent biomarkers of human aging and disease // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2008. — Vol. 105, № 32. — P. 11299–11304.
6. Stewart S.A., Weinberg R.A. Telomeres: cancer to human aging // Annu Rev. Cell. Dev. Biol. — 2006. — Vol. 22. — P. 531–57.
7. Karlseder J., Smogorzewska A., de Lange T. Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss // Science. — 2002. — Vol. 295, № 5564. — P. 2446–2449.
8. Lakatta E.G. Cardiovascular regulatory mechanisms in advanced age // Physiol. Rev. 1993. — Vol. 73, № 2. — P. 413–465.
9. Blackburn E.H. Switching and signaling at the telomere // Cell. — 2001. — Vol. 106, № 6. — P. 661–673.
10. Cao Y., Li H., Mu F.-T., Ebisui O., Funder J.W., Liu J.-P. Telomerase activation causes vascular smooth muscle cell proliferation in genetic hypertension // FASEB J. — 2002. — Vol. 16, № 1. — P. 96–98.
11. Perez-Rivero G., Ruiz-Torres M.P., Rivas-Elena J.V. et al. Mice deficient in telomerase activity develop hypertension because of an excess of endothelin production // Circulation. — 2006. — Vol. 114, № 4. — P. 309–317.
12. Jeanclos E., Schork N.J., Kyvik K.O., Kimura M., Skurnick J.H., Aviv A. Telomere length inversely correlates with pulse pressure and is highly familial // Hypertension. — 2000. — Vol. 36, № 2. — P. 195–200.
13. Benetos A., Okuda K., Lajemi M. et al. Telomere length as an indicator of biological aging: the gender effect and relation with pulse pressure and pulse wave velocity // Hypertension. — 2001. — Vol. 37, № 2, Pt. 2. — P. 381–385.
14. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry // J. Gerontol. — 1956. — Vol. 11, № 3. — P. 298–300.
15. Beckman K.B., Ames B.N. The free radical theory of aging matures // Physiol. Rev. — 1998. — Vol. 78, № 2. — P. 547–581.
16. Finkel T., Holbrook N.J. Oxidant, oxidative stress and the biology of ageing // Nature. — 2000. — Vol. 408, № 6809. — P. 239–247.
17. Finch C.E., Crimmins E.M. Inflammatory exposure and historical changes in human life-spans // Science. — 2004. — Vol. 305, № 5691. — P. 1736–1739.
18. Griendling K.K., Alexander R.W. Oxidative stress and cardiovascular disease // Circulation. — 1997. — Vol. 96, № 10. — P. 3264–3265.
19. Facchini F.S., Hua N., Abbasi F., Reaven G.M. Insulin resistance as a predictor of age-related diseases // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2001. — Vol. 86, № 8. — P. 3574–3578.
20. Dandona P., Aljada A., Bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes // Trends Immunol. — 2004. — Vol. 25, № 1. — P. 4–7.
21. Demissie S., Levy D., Benjamin E.J. et al. Insulin resistance, oxidative stress, hypertension, and leukocyte telomere length in men from the Framingham Heart Study // Aging Cell. — 2006. — Vol. 5, № 4. — P. 325–330.
22. Fitzpatrick A.L., Kronmal R.A., Gardner J.P. et al. Leukocyte telomere length and cardiovascular disease in the cardiovascular health study // Am. J. Epidemiol. — 2007. — Vol. 165, № 1. — P. 14–21.
23. Imanishi T., Hano T., Nishio I. Estrogen reduces endothelial progenitor cell senescence through augmentation of telomerase activity // J. Hypertens. — 2005. — Vol. 23, № 9. — P. 1699–1706.

ДЛИНА ТЕЛОМЕР И АТЕРОСКЛЕРОЗ

Драпкина О. М., Шепель Р. Н.

Развитие и прогрессирование атеросклероза в большинстве случаев происходит на протяжении десятилетий и на ранних стадиях не всегда имеет клинические проявления. Результаты многочисленных исследований свидетельствуют о том, что длина теломер отражает суммарную степень повреждения ДНК факторами, которые ответственны за развитие атеросклероза и его осложнений. Скорость укорочения теломер увеличивается еще до начала заболевания, что может иметь диагностическое и прогностическое значение.

Российский кардиологический журнал 2016, 9 (137): 84–89
<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2016-9-84-89>

Ключевые слова: атеросклероз, теломеры, клеточное старение, окислительный стресс.

ФГБУ Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины Минздрава России, Москва, Россия.

Драпкина О. М. — д.м.н., профессор, руководитель отдела фундаментальных и прикладных аспектов ожирения, заместитель директора по научной и лечебной работе, Шепель Р. Н.* — м.н.с. отдела фундаментальных и прикладных аспектов ожирения.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author): r.n.shepel@mail.ru

АСК — ацетилсалициловая кислота, АФК — активные формы кислорода, ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, ИР — инсулинорезистентность, МАУ — микроальбуминурия, омега-3 ПНЖК — омега-3 полиненасыщенные кислоты, п.н. — пары нуклеотидов, ССЗ — сердечно-сосудистые заболевания, ССС — сердечно-сосудистая система, т.п.н. — тысяч пар нуклеотидов.

Рукопись получена 16.06.2015

Рецензия получена 11.07.2015

Принята к публикации 20.07.2015

TELOMERE LENGTH AND ATHEROSCLEROSIS

Drapkina O. M., Shepel R. N.

The development and progression of atherosclerosis in most cases takes decades, and at early stages does not present clinically. Multiple studies results witness that telomere length reflects total grade of DNA damage by the factors that are responsible for atherosclerosis and its complications. Velocity of telomeres shortening increases even before the disease onset that may play diagnostic and predictive role.

Russ J Cardiol 2016, 9 (137): 84–89
<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2016-9-84-89>

Key words: atherosclerosis, telomeres, cellular ageing, oxidative stress.

National Research Center for Preventive Medicine of the Ministry of Health, Moscow, Russia.

2015г назван Национальным годом Борьбы с сердечно-сосудистыми заболеваниями (ССЗ). Действительно, заболевания сердечно-сосудистой системы (ССС) и их осложнения по-прежнему представляют большую проблему не только в России, но и во всем мире. В большинстве случаев причиной ССЗ служит атеросклероз. Становится очевидным, что в борьбе с заболеваниями ССС и их многочисленными осложнениями крайне важно проводить своевременный мониторинг доклинических форм атеросклероза и эффективную медикаментозную и немедикаментозную терапию его клинических проявлений.

В то же время появляются новые данные о патогенезе атеросклероза, анализ которых, возможно, найдет отражение в подходе к лечению данной группы пациентов. Атеросклероз представляется возраст-ассоциированным заболеванием [1]. Можно сделать вывод о том, что преждевременное биологическое старение (которое обычно отличается от показателей хронологического старения) вносит свой вклад в патогенез атеросклероза. Это подтверждают результаты клинических исследований, свидетельствующие о том, что в стабильных атеросклеротических бляш-

ках присутствует небольшое количество старых клеток, в то время как в осложненных атеросклеротических бляшках происходит депонирование старых клеток [2]. Укорочение теломер служит триггерным биологическим механизмом, который объясняет клеточное старение.

Структура и функции теломерного комплекса

Теломеры представляют собой концевые участки линейной хромосомной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), состоящей из многократно повторяющихся гексануклеотидов 5'-TTAGGG-3' (Т — тимин, А — аденин, G — гуанин) [3]. Та цепь ДНК, которая обогащена остатками гуаниловой кислоты, называется G — богатой цепью, а комплементарная цепь ДНК, которая обогащена остатками цитидиловой кислоты, получила название C-богатой цепи. Теломеры заканчиваются односторонним нависающим 3'-концом, который, образуя T-петлю, прилегает к двунитчатому участку теломеры, формируя D-петлю. В то время как молекула ДНК несет генетический код и имеет длину около 100 млн пар нуклеотидов, длина теломер в нормальных соматических

клетках у человека составляет от 5 до 15 тысяч пар нуклеотидов (т.п.н.) [4]. В процессе репликации клеток, из-за проблемы концевой репликации, при каждом делении происходит укорочение теломер на 100-200 пар нуклеотидов (п.н.), что приводит к прогрессирующему укорочению последних. В тот момент, когда в соматической клетке длина теломер достигает критической отметки (менее 2 т.п.н.), наступает резкое изменение метаболизма клетки (происходит нарушение репликации ДНК, запускаются механизмы клеточного сенесенса и апоптоза), за которыми следует гибель клетки. Это влечет за собой морфологические и функциональные изменения, которые с возрастом приводят к снижению функций органов и систем (например, старение эндотелиальных клеток в атеросклеротических бляшках).

У человека концевые участки канонических теломер (удлиняющихся теломеразой) в отличие от других областей ДНК, для которых характерна нуклеосомная организация, имеют ненуклеосомную организацию. Ненуклеосомная организация характерна для небольшого количества теломерных последовательностей, которые расположены в терминальной части теломерной ДНК. Все остальные теломерные последовательности, расположенные в направлении к центромере, имеют нуклеосомную организацию [5]. Таким образом, в состав теломер, помимо нуклеотидной последовательности, входят специфически связанные белки.

Комплекс shelterin состоит из 6 связанных с теломерами белков, которые защищают теломеры от действия нуклеаз и слияния друг с другом: TRF1 (Telomere repeat binding factor 1), TRF2 (Telomere repeat binding factor 2), TIN2 (TRF1-interacted nuclear protein 2), RAP1 (Rif-associated protein), POT1 (Protection of telomeres), TPP1 (Telomere protected protein 1) [6]. Так формируется нуклеопротеиновый комплекс, который выполняет защитную функцию посредством влияния на активность теломеразы и собственно структурной протекции теломер.

Кроме вышеперечисленных, существуют вспомогательные белки, которые периодически оказывают влияние на теломеры и не находятся в постоянной связи с последними (белки, не входящие в состав шелтерин): белок защиты теломер 1 (POT1), трипептидилпептидаза I, ядерный белок II, Ku 70/86, поли-АДФ-рибозаполимераза-1 (PARP-1) и др. [7]. Белки, не входящие в состав комплекса шелтерин, оказывают влияние на контроль длины теломер и защищают ДНК от повреждений.

Помимо комплекса шелтерин, за стабильность теломер отвечает комплекс из трех белков CST (CTC1-STN1-TEN1). Комплекс CST регулирует репликацию теломер и активность теломеразы (истощение комплекса CST ассоциируется с увеличением активности теломеразы).

Говоря о концевых участках хромосом, следует отметить, что теломеры могут существовать в двух

состояниях: в “закрытом” (защищенном) и “открытом” [8]. При “открытом” состоянии фермент теломераза осуществляет восстановление длины теломер, “закрытое” состояние необходимо для сохранения целостности геномного материала (доступ теломеразы заблокирован). Теломераза, которая функционально является обратной транскриптазой, синтезирует повторяющиеся нуклеотидные звенья, из которых состоит G-богатая цепь теломерной ДНК.

Несмотря на то, что теломеры имеют достаточно сложную структурную организацию, никаких белков они не кодируют. Тем не менее, теломеры выполняют ряд важных функций, среди которых: сохранение целостности генома эукариотической клетки путем защиты от слияния концов хромосом [5], обеспечение фиксации хромосом к ядерной оболочке [9], обеспечение стабилизации поврежденных и разорванных концов хромосом [10], влияние на экспрессию генов [11], определение репликационного потенциала клетки [12] и многие другие.

Различные факторы, оказывая влияние на теломеры, могут способствовать уменьшению или увеличению (сохранению) длины теломер. Среди основных факторов, влияющих на длину теломер, можно выделить следующие:

- а) недорепликация концов теломер при каждом делении клетки;
- б) окислительный стресс — окислительные повреждения ДНК, которые возникают преимущественно в теломерных участках ДНК;
- в) специфические экзонуклеазы — способствуют деградации РНК-праймеров, участвующих в процессах репликации ДНК;
- г) дефицит Rad 54, который участвует в репарации ДНК;
- д) гистоны: метилирование гистонов H3 и H4 уменьшает активность теломеразы [13].

Среди факторов, которые поддерживают длину теломер, можно выделить:

- а) влияние теломеразы: помимо собственно уровня и активности фермента в клетке следует отметить важную роль большого числа ассоциированных белков, которые стимулирует или ингибируют активность теломеразы в клетке [14];
- б) процесс рекомбинации теломер, который получил название альтернативного удлинения теломер (англ. alternative lengthening of telomeres, ALT) — при 10% онкологических заболеваний сохранение длины теломер осуществляется именно этим путем [15].

Если анализировать механизмы, ведущие к укорочению теломер, а, следовательно, и к старению, то наиболее значимыми (среди всех известных на данный момент) являются проблема концевой репликации и окислительный стресс. Укорочение теломер из-за проблемы концевой репликации относительно

небольшое и происходит постоянно в каждой клетке независимо от длины теломер, в то время как укорочение теломер, индуцированное окислительным стрессом, пропорционально длине теломеров, т.к. более длинные теломеры чаще поражаются свободными радикалами [16, 17].

Окислительный стресс, атеросклероз и длина теломер

Окислительный стресс служит общим патофизиологическим механизмом, ответственным за развитие возраст-ассоциированных заболеваний и прогрессирование старения [18, 19]. При высоком локальном уровне активных форм кислорода (АФК) их биологические эффекты заключаются в прямом окислительном воздействии на все компоненты клетки (включая белки, липиды и ДНК), что ведет к инициации цепных химических реакций, таких как перекисное окисление липидов, происходящее, в основном, внутри бислоя мембран, ядер и митохондрий.

Кроме того, АФК инициируют процессы, вовлеченные в атерогенез, посредством:

- оксида азота (NO): АФК служат основной причиной снижения биодоступности NO, который играет ключевую роль в поддержании нормальной функции эндотелия, эластичности артерий, стимулировании процессов расширения и расслабления сосудов, препятствии адгезии тромбоцитов и лейкоцитов;

- NADPH-оксидазы: ангиотензин II активирует NADPH-оксидазу, в результате чего образуется свободный супероксид радикал. При взаимодействии с NO образуется пероксинитрит, который агрессивно поражает эндотелий. Взаимодействуя с нитритами и белками, пероксинитрит разрушает их, концентрация NO в эндотелиальных клетках снижается, в результате чего последние становятся более уязвимыми;

- ксантинооксидазы: фермента, который превращает пурины в мочевую кислоту и восстанавливает кислород до супероксида.

В то же время следует отметить негативное влияние окислительного стресса на ДНК. Высокое содержание гуанина в теломерах (GGG-участки) делает их особенно чувствительными к повреждениям, вызванным окислительным стрессом, т.к. АФК избирательно взаимодействуют с GGG-участками и способствуют увеличению скорости укорочения теломер при митозе [18]. Этому есть несколько объяснений: а) гуанин является наиболее легко окисляемым основанием ДНК — его окислительный потенциал ниже, чем у остальных трех оснований (аденин<цитозин<тимин); б) гуанин имеет высокую реакционную способность, что обусловлено его структурой. Именно поэтому электроны, расположенные на 5'-GG-цепи в первую очередь подвергаются окислению; с) АФК имеют различные окислительно-восстановительные потенциалы, которые

могут определять специфичность окисления. Например, свободные гидроксильные радикалы вызывают повреждение ДНК без заметной специфичности, в то время как бензолосильные радикалы оказывают избирательное повреждение 5'-GG-цепи теломер.

Теломеры и факторы риска атеросклероза

Курение. Между табакокурением и оксидативным стрессом существует прямая корреляционная связь [20]. Именно этим можно объяснить результаты многочисленных исследований, которые свидетельствуют о меньшей длине теломер у лиц, которые курят табак.

Valders AM, et al. установили, что женщины, которые никогда не курили, имеют большую длину теломер по сравнению с курящими [21]. При этом у курящих женщин длина теломер уменьшается пропорционально количеству выкуренных сигарет — каждая пачка выкуренных сигарет эквивалентна потере 5 п.н. (или 18% от среднегодовой потери) длины теломер.

Morla M, et al. определяли связь между курением и скоростью укорочения теломер среди пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) [22]. С этой целью в исследование было включено 76 мужчин, из них: 26 человек — никогда не курили; 24 человека — курили, но имели нормальные показатели функции легких; 26 человек — больные ХОБЛ. Возраст участников исследования от 40 до 75 лет. Установлено, что лица, которые курят табак (вне зависимости от наличия или отсутствия признаков ХОБЛ) имеют меньшую длину теломер в сравнении с некурящими пациентами.

Результаты 10-летнего исследования под руководством J. Huzen также свидетельствуют о том, что курение способствует укорочению теломер [23]. При изучении 16783 образцов ДНК у 8074 участников в возрасте от 39 до 60 лет было установлено, что активное курение является основным независимым фактором, определяющим скорость истощения теломер. Кроме того, значительную роль (но в меньшей степени) играют компоненты метаболического синдрома (показатель окружности талии, уровень глюкозы в крови, уровень холестерина ЛПВП).

Артериальная гипертензия. Результаты многочисленных исследований свидетельствуют о том, что существует связь между длиной теломер и уровнем артериального давления, при этом укорочение теломер, вызывая изменения фенотипической экспрессии в клетках сосудов, может способствовать развитию гипертонии [24].

Подтверждением вышесказанному являются результаты исследования под руководством E. Jeanclos, в котором принимали участие 98 здоровых близнецов в возрасте от 18 до 44 лет [25]. Было установлено, что показатели пульсового давления обратно коррели-

руют с длиной теломер. Более того, корреляция длины теломер и пульсового давления была независима от пола, т.е. с высокой вероятностью можно предположить, что оба параметра имеют наследуемый характер. Кроме того, установлена положительная корреляционная связь между длиной теломер и диастолическим артериальным давлением и отрицательная — с систолическим артериальным давлением, что подтверждает отрицательную связь между длиной теломер и пульсовым давлением.

Группа ученых во главе с А. Venetos получили подобные результаты — у 120 мужчин и 73 женщин (возраст 56 ± 11 лет), которые не принимали антигипертензивные препараты, длина теломер достоверно коррелировала со скоростью пульсовой волны и у мужчин, и у женщин, а показатели пульсового давления коррелировали с длиной теломер только у мужчин [26].

Ожирение. Не вызывает сомнения, что ожирение тесно связано с риском развития ССЗ. Пациент с избыточной массой тела обычно имеет такие факторы риска, как гипертония, метаболический синдром, дислипидемия. Жировая ткань является источником АФК, провоспалительных цитокинов и множества биоактивных молекул (в том числе ангиотензиногена, лептина, адипонектина, резистина и PAI-1), которые оказывают влияние на функцию и структурную целостность ССС [27]. Вышеперечисленные молекулы нарушают обмен глюкозы, систему свертывания крови, эндотелиальную функцию и показатели артериального давления, что, в конечном счете, ускоряет развитие атеросклероза.

Ретроспективный анализ Heart Study Bogalusa показал, что увеличение веса связано с увеличением скорости истощения теломер [28]. В исследовании Valdes AM, et al. с участием 1 122 здоровых женщин-близнецов (средний возраст — 47 лет) было установлено, что у женщины-близнеца с ожирением теломеры имеют длину на 240 п.н. меньше, чем у близнеца, который не страдает ожирением [21]. Авторы предположили, что данная связь может быть объяснена не значением индекса массы тела, как такового, а повышенным уровнем лептина (который связан с активацией транскрипционного фактора NF-κB) у участников с признаками ожирения.

Сахарный диабет. Ожирение является только началом каскада физиологических событий, которые ведут к различным ассоциированным с возрастом заболеваниям, включая сахарный диабет (СД). В настоящее время известно, что гипергликемия, даже на стадии предиабета (нарушении толерантности к глюкозе), увеличивает окислительный стресс и, в конечном счете, приводит к клеточному старению [29]. Клеточное старение и апоптоз происходят не только в эндотелиальных и гладкомышечных клетках сосудов, но и в эндотелиальных клетках-предшественницах [30]. Именно поэтому СД 2 типа необхо-

димо рассматривать не только как фактор риска развития ССЗ, но и как фактор, способствующий преждевременному старению.

Многочисленные клинические исследования свидетельствуют о том, что существует обратная корреляционная связь между наличием СД 2 типа и короткими теломерами [31–33]. Olivieri F, et al. удалось установить, что у пациентов с СД 2 типа длина теломер связана с продолжительностью диабета: пациенты с 10-летним “стажем” и более имеют меньшую длину теломер по сравнению с пациентами с более короткой продолжительностью диабета [34]. Кроме того, авторы исследования предположили, что длина теломер может использоваться в качестве маркера общего состояния пациентов — лейкоциты пациентов, которые имеют осложнения СД 2 типа, обладают меньшей длиной теломер по сравнению с группой контроля. А группа ученых во главе с F. Fyhrquist предложили использовать длину теломер в качестве независимого предиктора прогрессирования диабетической нефропатии у больных сахарным диабетом 1 типа [35].

Более короткая длина теломер отмечается у пациентов с сочетанием предиабета/диабета и атеросклеротических заболеваний по сравнению со случаями изолированного наличия СД или ССЗ. Olivieri F, et al. показано, что меньшую длину теломер имели пациенты, страдающие СД, которые перенесли инфаркт миокарда, в сравнении с теми, кто болеет СД, но не имеет в анамнезе инфаркт миокарда [34]. В другом исследовании подобная ситуация прослеживается в отношении микроальбуминурии (МАУ): длина теломер была меньше у пациентов с СД 2 типа и МАУ, чем у пациентов с СД 2 типа и без МАУ [36]. Однако в данной ситуации необходимо учитывать тот факт, что у пациентов с СД 2 типа отмечаются высокие показатели сосудистой жесткости, которые могут объяснять меньшую длину теломер в указанной группе. Меньшая длина теломер отмечалась и у пациентов с СД 2 типа и атеросклеротическими бляшками, по сравнению с теми, кто не имел последних [37].

Инсулинорезистентность. Наличие инсулинорезистентности (ИР) оказывает негативное влияние на функцию эндотелия. Эта связь объясняется влиянием инсулина на митогенез. В условиях гипоксии избыток инсулина способствует секреции различных факторов роста и цитокинов, что приводит к патологическому сосудистому ремоделированию сосудов (гипертрофии гладкомышечных клеток, дисфункции эндотелия, утолщению интимы-медиа), развитию атеросклероза и увеличению скорости сосудистого старения.

В крупном популяционном исследовании была установлена обратная корреляционная связь между длиной теломер и ИР [30]. ИР тесно связана с хроническим воспалением и окислительным стрессом, которые влияют на длину теломер. Это подтвердили результаты Фремингемского исследования, которые

свидетельствовали о том, что уменьшение длины теломер у пациентов с артериальной гипертонией в большей степени ассоциировано с ИР [38]. Группа ученых во главе с О. Al-Attas также подтвердили наличие связи между длиной теломер лейкоцитов и резистентностью к инсулину. В исследовании приняли участие арабы среднего возраста (мужчины и женщины) с/без сахарного диабета [39]. Длина теломер обратно коррелировала с уровнем инсулина натощак и индексом инсулинорезистентности НОМА-IR, причем индекс НОМА-IR оказался наиболее значимым предиктором длины теломер у мужчин.

Влияние ИР прослеживается и на активности фермента теломеразы — у 47 пациентов с ожирением и нарушением толерантности к глюкозе активность теломеразы была значительно ниже, чем у лиц без нарушений углеводного обмена [40].

Способы защиты от клеточного старения

Медикаментозная и немедикаментозная терапия клинических проявлений атеросклероза косвенно может влиять и на процессы клеточного старения.

Среди немедикаментозных методов следует отметить активный образ жизни и высокий уровень физической активности, здоровое питание и снижение потребления поваренной соли [41, 42].

В исследовании Cherkas LF, et al. было доказано, что малоподвижный образ жизни (в дополнение к курению, высокому индексу массы тела и низкому социально-экономическому статусу) оказывает влияние на длину теломер и может ускорить процесс старения [43]. В исследование были включены 2401 близнец из Англии (2152 женщины и 249 мужчин в возрасте от 18 до 81 года). Оказалось, что длина теломер у более активных участников была на 200 нуклеотидов больше, чем у менее активных (7,1 и 6,9 килобазы, соответственно).

Аналогичные результаты получены в исследовании J. Krauss, et al., которые проанализировали длину теломер у больных 944 пациентов со стабильным течением ишемической болезни сердца [44]. Длина теломер у лиц с низким уровнем физической активности была меньше, чем у лиц с высоким уровнем физической активности (5349±3781 п.о. и 5566±3829 п.о., соответственно).

Долго оставался неясным вопрос, насколько полезны в долгосрочной перспективе многократные и регулярные аэробные физические упражнения на сверхвыносливость (например, бег на длинные дистанции в марафоне). С этой целью были обследованы 67 участников марафонов [45]. После поправки на возраст, традиционные факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний и маркеры воспаления (С-реактивный белок, IL-6, лептин, Е-селектин и др.) удалось установить, что у марафонцев длина теломер была на 11% больше ($T/S=3,5\pm 0,68$), чем в контрольной группе ($T/S=3,1\pm 0,41$).

Немаловажным является вопрос рационального питания, в частности, достаточный уровень в рационе омега-3 полиненасыщенных кислот (омега-3 ПНЖК). Присутствие в рационе достаточного количества омега-3 ПНЖК ассоциируется с низким уровнем F2-изопропанов (стандартный индикатор системного окислительного стресса), а также с более высоким уровнем антиоксидантных ферментов (каталазы и супероксид дисмутаза), что снижает выраженность окислительного стресса [46].

Особого внимания заслуживают лекарственные препараты, которые назначаются для лечения заболеваний ССЗ.

Ацетилсалициловая кислота (АСК), как известно, обладает антитромботическим и противовоспалительным эффектами. Помимо этого, АСК уменьшает синтез диметиларгинина, который является эндогенным ингибитором NO-синтазы, тем самым снижая окислительный стресс и скорость старения эндотелиальных клеток [47].

Ингибиторы АПФ (особенно те, которые содержат сульфгидрильную группу), также снижают скорость старения клеток эндотелия путем активации фосфорилирования киназой АКТ и усилением экспрессии NO-синтазы [48].

Некоторые ученые выдвигают гипотезу о том, что увеличение показателей выживаемости кардиологических пациентов, длительно принимающих статины, может быть объяснено воздействием препаратов данной группы на теломеры. Spyridopoulos I, et al. доказали, что статины способны повысить миграционную способность эндотелиальных клеток-предшественниц посредством влияния через TRF2-белок, входящий в состав шелтерин-комплекс Т-петли теломер [49].

Заключение

Развитие и прогрессирование атеросклероза в большинстве случаев происходит на протяжении десятилетий и на ранних стадиях не всегда имеет клинические проявления. Анализ отдельных факторов риска атеросклероза не всегда обладает высокой эффективностью. Результаты многочисленных исследований свидетельствуют о том, что длина теломер отражает суммарную степень повреждения ДНК в течение всей жизни человека факторами, которые ответственны за развитие атеросклероза и его осложнений. Скорость укорочения теломер увеличивается еще до начала клинического заболевания, что может иметь диагностическое и прогностическое значение — измерение длины теломер в первые годы жизни может указывать на генетическую предрасположенность к ССЗ и служить сигналом к своевременному началу профилактических и лечебных мероприятий (в том числе с использованием новых методов лечения, направленных на задержку клеточного старения путем воздействия на теломеры и/или теломеразу).

Литература

1. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407: 233-41.
2. Willeit P, Willeit J, Brandstatter A, et al. Cellular aging reflected by leukocyte telomere length predicts advanced atherosclerosis and cardiovascular disease risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30: 1649-56.
3. Drapkina OM, Shepel RN. Telomeres and telomerase complex. The main clinical manifestation of genetic malfunctioning. *Cardiovascular Therapy and Prevention* 2015; 14(1): 70-7. Russian (Драпкина О.М., Шепель Р.Н. Теломеры и теломеразный комплекс. Основные клинические проявления генетического сбоя. Кардиоваскулярная терапия и профилактика 2015, 14(1): 70-7).
4. Grabowski P, Hultdin M, Karlsson K, et al. Telomere length as a prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia with special reference to VH gene mutation status. *Blood* 2005; 105: 4807-12.
5. Blackburn EH. Switching and signaling at the telomere. *Cell* 2001; 106(6): 661-73
6. de Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* 2005; 19(18): 2100-10.
7. Palm W, de Lange T. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet* 2008; 42: 301-34.
8. De Boeck G, Forsyth RG, Praet M, et al. Telomere-associated proteins: cross-talk between telomere maintenance and telomere-lengthening mechanisms. *J Pathol* 2009; 217: 327-44.
9. Rose A, Patel S, Meier I. The plant nuclear envelope. *Planta* 2004; 218: 327-36.
10. Pennaneach V, Putnam C D, Kolodner RD. Chromosome healing by de novo telomere addition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol* 2006; 59: 1357-68.
11. Pedram M, Sprung CN, Gao Q, et al. Telomere position effect and silencing of transgenes near telomeres in the mouse. *Mol. Cell. Biol* 2006; 26: 1865-78.
12. Olovnik AI. A theory of marginotomy: the incomplete copying of template margin in enzymatic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J. Theor. Biol* 1973; 41: 181-90.
13. Brouillette SW, Whittaker A, Stevens SE, et al. Telomere length is shorter in healthy offspring of subjects with coronary artery disease: support for the telomere hypothesis. *Heart* 2008; 94: 422-5.
14. Stewart JA, Chaiken MF, Wang F, et al. Maintaining the end: Role of telomere proteins in end-protection, telomere replication and length regulation. *Mutat Res: Fundam Mol Mech Mutagen* 2011, doi:10.1016/j.mrfmmm.2011.08.011.
15. Gilson E, Segal-Bendirdjian E. The telomere story or the triumph of an open-minded research. *Biochimie* 2010; 92: 321-6.
16. Von Zglinicki T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci* 2002; 27: 339-44.
17. De Meyer T, Rietzschel ER, De Buyzere ML, et al. Systemic telomere length and preclinical atherosclerosis: the Asklepios Study. *Eur Heart J* 2009; 30: 3074-81.
18. Kawanishi S, Oikawa S. Mechanism of telomere shortening by oxidative stress. *Ann NY Acad Sci* 2004; 1019: 278-84.
19. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular disease: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000; 87: 840-4.
20. Burke A, Fitzgerald GA. Oxidative stress and smoking-induced vascular injury. *Prog Cardiovasc Dis* 2003; 46: 79-90.
21. Valdes AM, Andrew T, Gardner JP, et al. Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *Lancet* 2005; 366: 662-4.
22. Morla M, Busquets X, Pons J, et al. Telomere shortening in smokers with and without COPD. *Eur Respir J* 2006; 27: 525-8.
23. Huzen J, Wong LSM, van Veldhuisen DJ, et al. Telomere length loss due to smoking and metabolic traits. *Journal of Internal Medicine* 2014; 275(2): 155-63.
24. Drapkina OM, Shepel RN. The modern conception of the proper role of telomeres and telomerase in pathogenesis of hypertension. *Arterial hypertension* 2013; 19(4): 290-8. Russian (Драпкина О.М., Шепель Р.Н. Современные представления о роли теломер и теломеразы в патогенезе гипертонической болезни. Артериальная гипертензия 2013, 19(4): 290-8).
25. Jeanclous E, Schork NJ, Kyvik KO, et al. Telomere length inversely correlates with pulse pressure and is highly familial. *Hypertension* 2000; 36: 195-200.
26. Benetos A, Okuda K, Lajemi M, et al. Telomere length as an indicator of biological aging: the gender effect and relation with pulse pressure and pulse wave velocity. *Hypertension* 2001; 37: 381-5.
27. Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E. The endocrine function of adipose tissue. *Clin Endocrinol* 2006; 64(4): 355-65.
28. Gardner JP, Shengxu L, Srinivasan SR, et al. Rise in insulin resistance is associated with escalated telomere attrition. *Circulation* 2005; 111: 2171-7.
29. Su Y, Liu XM, Sun YM, et al. The relationship between endothelial dysfunction and oxidative stress in diabetes and pre-diabetes. *Int J Clin Pract* 2008; 62: 877-82.
30. Brodsky SV, Gealekman O, Chen J, et al. Prevention and reversal of premature endothelial cell senescence and vasculopathy in obesity-induced diabetes by ebselen. *Circ Res* 2004; 94: 377-84.
31. Adaiakaloteswari A, Balasubramanyam M, Mohan V. Telomere shortening occurs in Asian Indian Type 2 diabetic patients. *Diabet Med* 2005; 22: 1151-6.
32. Zee RL, Castonguay AJ, Barton NS, et al. Mean leukocyte telomere length shortening and type 2 diabetes mellitus: a case-control study. *Translational Res* 2010; 155: 166-9.
33. Salpea KD, Talmud PJ, Cooper JA, et al. Association of telomere length with type 2 diabetes, oxidative stress and UCP2 gene variation. *Atherosclerosis*. 2010; 209: 42-50.
34. Olivieri F, Lorenzi M, Antonicelli R, et al. Leukocyte telomere shortening in elderly Type2DM patients with previous myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2009; 206(2): 588-93.
35. Fyhriquist F, Tiitu A, Saijonmaa O, et al. Telomere Length and progression of diabetic nephropathy in patients with type 1 diabetes. *J Intern Med* 2010; 267(3): 278-86.
36. Tentolouris N, Nzietchueng R, Cattani V, et al. (2007). White blood cells Telomere Length is shorter in males with type 2 diabetes and microalbuminuria. *Diabetes Care* 2007; 30(11): 2909-15.
37. Adaiakaloteswari A, Balasubramanyam M, Ravikumar R, et al. Association of telomere shortening with impaired glucose tolerance and diabetic macroangiopathy. *Atherosclerosis* 2007; 195: 83-9.
38. Demissie S, Levy D, Benjamin EJ, et al. Insulin resistance, oxidative stress, hypertension, and leukocyte telomere length in men from the Framingham Heart Study. *Aging Cell* 2006; 5: 325-30.
39. Al-Attas O, Al-Daghri N, Bamakhramah A, et al. Telomere length in relation to insulin resistance, inflammation and obesity among Arab youth. *Acta Paediatr* 2010; 99: 896-9.
40. Daubenmiera J, Linb J, Blackburnb E, et al. Changes in stress, eating, and metabolic factors are related to changes in telomerase activity in a randomized mindfulness intervention pilot study. *Psychoneuroendocrinology* 2012; 37(7): 917-28.
41. Zhu H, Belcher M, van der Harst P. Healthy aging and disease: role for telomere biology? *Clin Sci* 2011; 120: 427-440.
42. Drapkina OM, Shepel RN. Low sodium diet: pros and cons. *Ration Pharmacother Cardiol* 2015; 11(2): 190-5. Russian (Драпкина О.М., Шепель Р.Н. Диета с низким содержанием поваренной соли: за и против. Рациональная фармакотерапия в кардиологии 2015, 11(2): 190-5).
43. Cherkas LF, Hunkin JL, Kato BS, et al. The association between physical activity in leisure time and leukocyte telomere length. *Archives of Internal Medicine* 2008; 168: 154-8.
44. Krauss J, Farzaneh-Far R, Puterman E, et al. Physical Fitness and Telomere Length in Patients with Coronary Heart Disease: Findings from the Heart and Soul Study. *PLoS ONE* 2011; 6(11): e26983. doi:10.1371/journal.pone.0026983
45. Denham J, Nelson CP, O'Brien BJ, et al. Longer Leukocyte Telomeres Are Associated with Ultra-Endurance Exercise Independent of Cardiovascular Risk Factors. *PLoS ONE* 2013; 8(7): e69377. doi:10.1371/journal.pone.0069377
46. Farzaneh-Far R, Lin J, Eipel ES, et al. Association of marine omega — 3 fatty acid levels with telomeric aging in patients with coronary heart disease. *JAMA* 2010; 303: 250-7.
47. Bode-Boger SM, Martens-Lobenhoffer J, Tager M, et al. Aspirin reduces endothelial cell senescence. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 334: 1226-32.
48. Donnini S, Terzuoli E, Ziche M, et al. Sulfhydryl angiotensin-converting enzyme inhibitor promotes endothelial cell survival through nitric-oxide synthase, fibroblast growth factor-2, and telomerase crosstalk. *J Pharmacol Exp Ther* 2010; 332 (3): 776-84.
49. Spyridopoulos I, Haendeler J, Urbich C, et al. Statins enhance migratory capacity by upregulation of the telomere repeat-binding factor TRF2 in endothelial progenitor cells. *Circulation* 2004; 110: 3136-42.

ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ СНА: СОВРЕМЕННЫЙ ВЗГЛЯД НА ПРОБЛЕМУ С ПОЗИЦИЙ КАРДИОЛОГА

О.М. Драпкина*, Р.Н. Шепель

Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова
119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

В настоящее время известна и доказана роль нарушений продолжительности сна в развитии различных хронических заболеваний, включая заболевания сердечно-сосудистой системы. Кроме того, результаты многих клинических исследований демонстрируют связь между нарушением продолжительности сна и скоростью укорочения теломер. В свою очередь, короткие теломеры ассоциируются с развитием артериальной гипертонии, хронической сердечной недостаточности, атеросклероза и других заболеваний, летальность от которых в России и в мире в целом остается высокой. В данной статье представлен обзор клинических исследований, доказывающих негативное влияние нарушений продолжительности сна на общую и сердечно-сосудистую смертность, а также подробно рассматриваются работы, в которых установлена связь между продолжительностью сна и длиной теломер.

Ключевые слова: сон, теломеры, старение, сердечно-сосудистая система.

Рациональная фармакотерапия в кардиологии 2015;11(4):413-419

Sleep duration: modern view of the problem from the standpoint of a cardiologist

O.M. Drapkina*, R.N. Shepel'

I. M. Sechenov First Moscow State Medical University. Trubetskaya ul. 8-2, Moscow, 119991 Russia

Today the role of disturbances in sleep duration in the development of various chronic diseases, including cardiovascular diseases is known and proven. In addition, the results of many clinical studies demonstrate the relationship between impaired sleep duration and the rate of telomere shortening. In turn, short telomeres are associated with the development of arterial hypertension, chronic heart failure, atherosclerosis and other diseases with high mortality both in Russia and worldwide. This article presents an overview of the clinical studies demonstrating the negative effect of sleep duration disturbances on total and cardiovascular mortality, as well as works that specify in detail the relation between sleep duration and telomere length.

Key words: sleep, telomeres, aging, cardio-vascular system.

Ration Pharmacother Cardiol 2015;11(4):413-419

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author): drapkina@bk.ru

Введение

«Сон – это особое генетически детерминированное состояние организма теплокровных животных (млекопитающих и птиц), характеризующееся закономерной последовательной сменой определенных полиграфических картин в виде циклов, фаз и стадий» [1]. Сон является неоднородным процессом и представляет собой последовательность функциональных состояний головного мозга: фазы медленного сна (ортодоксальный сон, сон без сновидений) и фазы быстрого сна (парадоксальный сон, сон со сновидениями или REM-фаза). Нормальный восьмичасовой сон состоит из 4-6 волнообразных циклов, каждый из которых длится около 90 минут. При этом фаза медленного сна занимает 75-85% от всего времени сна, а фаза быстрого сна – до 25%.

Сон необходим для физического и психического здоровья. Потеря или нарушение продолжительности сна влечет за собой нарушение функции различных орга-

нов и систем. Национальная комиссия по исследованию расстройств сна у жителей США отмечает, что 36% взрослых людей имеют проблемы, связанные с его нарушениями. При этом около 40 млн американцев страдают хроническими нарушениями сна, а у 20-30 млн инсомния носит периодический характер, что создает угрозу возникновения различных заболеваний [2]. В России около 45% взрослых людей не удовлетворены качеством и продолжительностью своего сна, а почти 20% нуждаются в серьезном лечении нарушений сна [3].

На продолжительность и качество сна влияют различные факторы: генетические, биологические, поведенческие, экологические, социальные и другие. Длительное воздействие этих факторов вызывает каскад изменений в организме человека, результатом которых является развитие ряда заболеваний, в том числе и сердечно-сосудистой системы (рис. 1).

Продолжительность сна и общая смертность

Первоначально эксперименты, целью которых было определение связи длительности сна и риска возникновения заболеваний, проводились на животных. Достаточно революционными для своего времени были опыты М.М. Манасеиной, которые стали пионерскими в данном направлении. В 1880-1890-х годах с целью

Сведения об авторах:

Драпкина Оксана Михайловна – д.м.н., профессор кафедры пропедевтики внутренних болезней лечебного факультета Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, заведующая отделением кардиологии Клиники пропедевтики внутренних болезней, гастроэнтерологии и гепатологии им. В.Х. Василенко того же университета

Шепель Руслан Николаевич – врач-кардиолог, аспирант той же кафедры

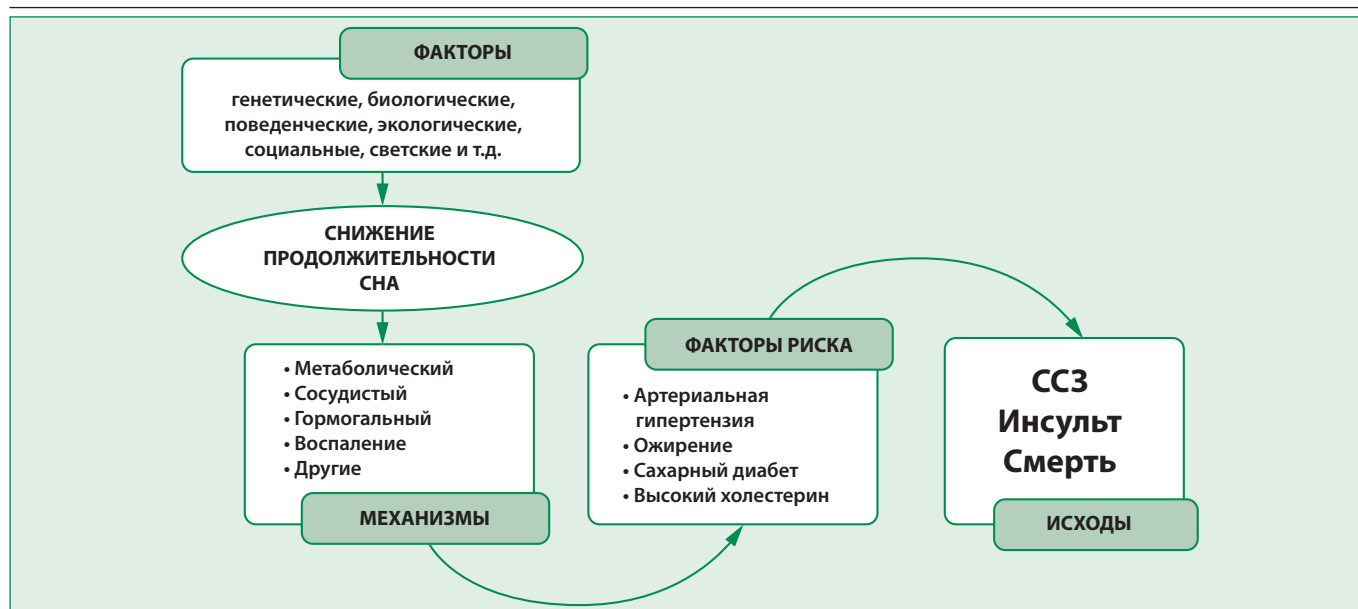


Рисунок 1. Механизмы и эффекты нарушений продолжительности сна [4]

изучения депривации (лишения) сна М.М. Манасеина с единомышленниками в экспериментах не давала спать щенкам [5]. Через пять бессонных суток щенки погибали. М.М. Манасеина подробно описала физиологические изменения в организме, и макроанатомические признаки нарушения мозгового кровообращения и дегенерации клеток головного мозга.

На современном этапе подобные опыты были выполнены в 1983 г. А. Рокшаффеном. Используя методику «карусели», которая позволяла лишать крыс до 90% суточного времени сна, было подтверждено, что длительное лишение сна приводит к гибели животного в течение нескольких недель. Причиной того считали разрушение иммунной системы и развитие сепсиса [6]. Тем не менее, механизмы, которые приводят организм, лишенный сна, к гибели, в настоящее время окончательно не определены.

Как сказывается длительность сна на общей продолжительности жизни и смертности? Приведенные ниже примеры клинических исследований демонстрируют эту связь:

1. Kojima M. и соавт. провели исследование, основной целью которого являлась оценка взаимосвязи общей смертности и продолжительностью и качеством сна. С этой целью в исследование были включены в общей сложности 5322 жителей Японии в возрасте от 20 до 67 лет, которым было предложено заполнить анкеты с вопросами об образе жизни и состоянии здоровья (в том числе о продолжительности и субъективном качестве сна). Период наблюдения составил 11,9 лет. По результатам исследования оказалось, что общая смертность у мужчин, чей сон составлял больше или меньше 7-8 часов в сут, была в 2 раза выше (относительный риск [ОР] для ≥ 10 часов=1,94 и ОР для < 7 часов=1,90)

в сравнении с контрольной группой. У женщин такой тенденции отмечено не было, однако риск внезапной смерти оказался выше у женщин, которые принимали снотворные препараты (ОР=1,89) [7].

2. В рамках исследования по оценке риска развития рака JACC (Japan Collaborative Cohort Study on Evaluation of Cancer Risk) участникам было предложено ответить на вопросы о продолжительности и качестве сна. В общей сложности 104010 человека (43852 мужчин и 60158 женщин) в возрасте от 40 до 79 лет наблюдались с 1988 по 1990 г.г. Оказалось, что мужчины, как правило, спят дольше, чем женщины, а пожилые люди спят дольше, чем лица молодого возраста. Средняя продолжительность сна составила 7,5 часов для мужчин и 7,1 часов для женщин. Сон короче или длиннее 7 часов был связан со значительным увеличением риска смертности от всех причин [8].

3. Участникам исследования Cancer Prevention Study II, которое проводило Американское Общество Рака, было предложено пройти опросник о продолжительности и качестве сна. В исследовании участвовало более чем 1,1 млн. человек (636095 женщин и 480841 мужчин) в возрасте от 30 до 102 лет. Лучшие показатели выживания были среди тех, кто спал 7 часов в сут. Участники, которые спали 8 часов или более имели больший риск общей смертности, как и те, кто спал 6 часов или меньше (риск возрастал до 15% для тех, кто спал более 8,5 часов в сут или менее 4,5 часов в сут) в сравнении с контрольной группой. Использование снотворных препаратов при различных видах инсомнии увеличивало общую летальность [9].

4. В одном из финских клинических исследований участвовало 21268 близнецов в возрасте ≥ 18 лет, которым предложили ответить на вопросы касательно их

сна. После этого участники были разделены на группы: 1) по продолжительности сна: короткий (<7 часов в сут), средний или длинный (>8 часов в сут); 2) по качеству сна: хороший, достаточно хороший/плохой и плохой; 3) по факту приема снотворных препаратов или транквилизаторов: не принимают, редкие/частые пользователи снотворных и/или транквилизаторов.

Повышенный риск общей смертности наблюдался как в группе короткого сна у мужчин (+26%) и у женщин (+21%), так и длинного сна (+24% у мужчин и +17% у женщин). Кроме того, повышенный риск смертности ассоциировался с частым приемом снотворных/ транквилизаторов (+31% у мужчин и +39% у женщин) [10].

Таким образом, подводя итог перечисленных исследований, можно сделать вывод о том, что сон менее 6 часов в сут и более 9 часов в сут ассоциируется с повышенным риском общей смертности. Причину такой зависимости еще предстоит установить.

Продолжительность сна и сердечно-сосудистые заболевания

Артериальная гипертензия (АГ) остается одной из наиболее значимых медико-социальных проблем. Это обусловлено как широким распространением данного заболевания, так и тем, что АГ является главным фактором риска таких сердечно-сосудистых заболеваний, как инфаркт миокарда (ИМ) и инсульт, главным образом определяющих смертность в России по сей день. Широко известен факт, что снижение систолического артериального давления (АД) на 10 мм рт. ст. или диастолического на 5 мм рт. ст. при антигипертензивной терапии снижает риск ИМ на 22%, а инсульта – на 41% [11].

Определена взаимосвязь между продолжительностью сна и риском возникновения артериальной гипертонии. Результаты исследования SHHS (Sleep Heart Health Study) свидетельствуют о том, что у лиц, которые спят менее 5 часов в сут, достоверно чаще диагностируется артериальная гипертензия [12]. Подобные результаты получены в другом клиническом исследовании [13], показывающем, что длительность сна менее 5 часов в сут, повышает риск возникновения артериальной гипертензии на 60%. Следует отметить, что подобная зависимость не прослеживается в возрастной группе старше 60 лет, что, вероятно, связано с нормальной длительностью сна лиц пожилого возраста [13-14]. Кроме того, по результатам исследования SHHS удалось установить, что сон более 9 часов так же не безвреден и ассоциируется с большим риском возникновения артериальной гипертонии в сравнении с теми, кто спит 7-8 часов в сут [15].

Результаты исследования Nord-Trøndelag Health study (HUNT) свидетельствуют о том, что существует связь

между продолжительностью сна и риском развития сердечной недостаточности [16]. Кроме того, хорошо известно, что наличие у пациента нарушений продолжительности сна увеличивают риск сердечно-сосудистой смертности [7, 17-23].

В одном крупном исследовании, в котором приняли участие 49405 жителей Австралии, было установлено, что продолжительность сна <6 часов в сут и ≥9 часов в сут определялась у 16,6% и 13,9% участников, соответственно [24]. При этом прослеживалась достоверная связь между коротким сном и низким уровнем образования, табакокурением, чрезмерным потреблением алкоголя, ожирением, депрессией/тревогой, в том время как длинный сон был связан с недавним лечением рака и перенесенным ИМ (табл. 1). Таким образом, авторы предполагают, что в борьбе со снижением частоты развития ССЗ и смертности от их осложнений особое внимание следует уделить модификации детерминант короткого сна. Сон ≥9 часов в сут, по мнению исследователей, является следствием, а не причиной хронических заболеваний.

Патофизиологические механизмы данной связи еще не полностью изучены. В случае нарушений продолжительности сна возникает хроническая стрессовая ситуация для организма, которая сопровождается ответной реакцией в виде повышения активности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы и симпатической нервной системы [25]. Это, в свою очередь, ведет к повышенной секреции кортизола и активации ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, результатом чего является увеличение частоты сердечных сокращений, снижение вариабельности сердечного ритма и повышение АД, секреции провоспалительных цитокинов и катехоламинов и других эффектов, которые играют ключевую роль в развитии сердечно-сосудистой патологии [26]. Кроме того, активация симпатической нервной системы у лиц с нарушениями продолжительности сна играет не последнюю роль в развитии инсулинрезистентности и метаболического синдрома [29]. Это может способствовать эндотелиальной дисфункции, прогрессированию атеросклероза, почечной дисфункции и прогрессированию процессов ремоделирования левого желудочка [25]. Таким образом, нарушения вегетативной нервной системы и нейроэндокринной системы в некоторой степени могут объяснить причинно-следственную связь между наличием нарушений продолжительности сна и риском развития сердечно-сосудистых заболеваний.

Говоря о влиянии малой продолжительности сна и его плохом качестве на организм человека, нельзя не сказать о том, что воздействие этого фактора прослеживается и на молекулярно-генетическом уровне. Обнаружена ассоциативная связь между нарушением

Таблица 1. Факторы, которые ассоциируются с коротким и длинным сном среди населения Австралии и США [24]

США (n=110 441)	Австралия (n=49 405)
Факторы, которые ассоциируются с коротким сном (менее 6 часов в сут)	
Социально-демографические переменные: <ul style="list-style-type: none"> • Этническая принадлежность (а) • Семейное положение (холост/не замужем) • Длительный рабочий день • Уровень образования • Количество детей (а) • Семейный доход 	Социально-демографические переменные: <ul style="list-style-type: none"> • Страна рождения (б) • Семейное положение (холост/не замужем) • Долгие часы работы • Уровень образования
Хронические заболевания в анамнезе: <ul style="list-style-type: none"> • Кардиоваскулярные заболевания • Диабет (а) • Болевой синдром (а) • Респираторные заболевания 	Недавнее лечение по поводу: <ul style="list-style-type: none"> • Болезней сердца/стенокардии • Астмы • Повышенного артериального давления (б) • Повышенного уровня холестерина (б)
Другие: <ul style="list-style-type: none"> • Курение • Злоупотребление алкоголем (а) • Ожирение • Избыточный вес • Дефицит массы тела • Депрессия • Тревога • Ограниченная физическая активность (а) 	Другие: <ul style="list-style-type: none"> • Бывший/текущий курильщик • Нет потребления алкоголя • Ожирение • Избыточный вес • Дефицит массы тела • Депрессия • Тревога
Факторы, которые ассоциируются с длинным сном (≥9 часов в сут)	
Социально-демографические переменные: <ul style="list-style-type: none"> • Этническая принадлежность (а) • Количество детей (а) • Короткий рабочий день • Уровень образования 	Социально-демографические переменные: <ul style="list-style-type: none"> • Страна рождения (б) • Уровень образования • Короткий рабочий день • Семейное положение (холост/не замужем) • Далекое расположение места жительства
Хронические заболевания в анамнезе: <ul style="list-style-type: none"> • Кардиоваскулярные заболевания • Диабет (а) 	Недавнее лечение по поводу: <ul style="list-style-type: none"> • Рака • Сердечного приступа/стенокардии • Артрита
Другие: <ul style="list-style-type: none"> • Бывший/текущий курильщик • Дефицит массы тела • Депрессия • Тревога • Ограниченная физическая активность 	Другие: <ul style="list-style-type: none"> • Чрезмерное потребление алкоголя • Депрессия • Тревога
(а) – критерий использовался в американском исследовании, но не в австралийском; (б) – критерий использовался в австралийском исследовании, но не в американском.	

сна и его качеством и длиной концевых участков хромосом теломер.

Структура и функции теломер

Теломеры – это концевые районы линейной хромосомной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), состоящей из многократно повторяющихся нуклеотидных последовательностей и специфически связанных белков [27]. Теломеры человека содержат от 2 до 20 тыс пар оснований и состоят из повторяющихся последовательностей нуклеотидов (TTAGGG)_n. Для сравнения укажем, что теломеры инфузории реснитчатой имеют 0,35 тысяч пар оснований, дикой свиньи – до 18 тысяч пар оснований, овцы домашней – до 25 тысяч пар оснований, мыши аборигенной – 5-25 тысяч пар оснований. Т.е. связи между длиной теломерного участ-

ка хромосомы и эволюционной организацией живого организма не прослеживается. Теломерные повторы, напротив, весьма консервативные последовательности: повторы всех позвоночных состоят из шести нуклеотидов (TTAGGG)_n, повторы всех насекомых – (TTAGG)_n, повторы большинства растений – (TTTAGGG)_n. Как было сказано выше, теломерная ДНК человека состоит из TTAGGG-блоков. Теломеры заканчиваются односторонним нависающим 3'-концом, завернутым в структуру, называемую Т-петлей, которая не позволяет концам хромосом соединяться друг с другом; при этом односторонний конец теломеры проникает в прилегающий к Т-петле двусторонний участок, образуя D-петлю, закрепляющую Т-петлю (рис. 2).

Среди основных функций теломер можно выделить следующие: а) механическая – фиксация хромосом к

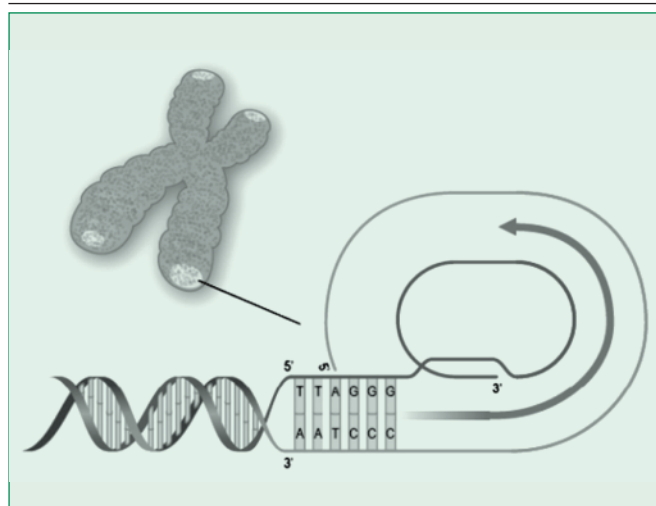


Рисунок 2. Структурная организация теломер [15]

ядерному матриксу; б) стабилизационная – защита от недорепликации; в) влияние на экспрессию генов; г) «счетная» функция – определение репликационного потенциала клетки [28].

Результаты клинических исследований доказывают связь короткой длины теломер с риском возникновения сахарного диабета [29], ожирения, как у детей, так и у взрослых [30], инсульта [19], онкологических заболеваний [29] и общей смертности [19]. Кроме того, короткие теломеры ассоциируются с риском развития сердечно-сосудистых заболеваний. В частности, ассоциативные связи прослеживаются между короткими теломерами и АГ [27], хронической сердечной недостаточностью (ХСН) [30], атеросклерозом [31].

В настоящее время длина теломер признана биомаркером клеточного старения и претендует на роль «нового» фактора риска сердечно-сосудистых заболеваний [28]. Ниже представлены клинические исследования, которые демонстрируют связь между длиной теломер и показателями продолжительности сна.

Продолжительность сна и длина теломер

В когортном исследовании Whitehall II приняли участие 434 человека (47,5% мужчин и 52,5% женщин), средний возраст которых составлял 63,3 года [34]. Участники ответили на вопросы о статусе курения, возрасте, уровне образования и занятости, индексе массы тела (ИМТ) и т.п. Кроме того, пациентам было предложено ответить на вопрос о том, как много часов

они спят в сутки: а) 5 часов и менее; б) 6 часов и менее; в) 7 часов и менее; г) больше, чем 7 часов.

Высшее образование имели 31% участников, симптомы депрессии – 6,6% пациентов, 6,2% участников курили табак, а средний показатель ИМТ составил 25,9 кг/м².

В зависимости от продолжительности сна участники распределились следующим образом: а) ≤5 часов в сут – 6,7%; б) ≤6 часов в сут – 34,8%; в) ≤7 часов в сут – 43,1%; г) ≥7 часов в сут – 15,4%.

Оказалось, что связь между продолжительностью сна и длиной теломер прослеживалась только у мужчин, но не у женщин (p=0,035). Мужчины, которые по результатам анкетирования имели короткую продолжительность сна, обладали более короткими теломерами независимо от возраста, ИМТ, табакокурения, уровня образования, текущей занятости и симптомов депрессии. Длина теломер была в среднем на 6% меньше у мужчин, спящих ≤5 часов в сут по сравнению с теми, кто спал ≥7 часов в сут (табл. 2).

Таким образом, среди пожилых участников связь между длиной теломер и продолжительностью сна прослеживается только у мужчин. Авторы объясняют результаты своего исследования тем, что у мужчин нарушения сна с возрастом выражены в большей мере, чем у женщин.

Похожие результаты получены и в исследовании The Nurses' Health Study (NHS). Работа в ночную смену зачастую приводит к нарушению циркадных ритмов и продолжительности сна. Появляется все больше данных о том, что ночные смены и, соответственно, короткий сон коррелируют с повышенным риском развития различных метаболических расстройств, сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний [35–39].

В рамках исследования NHS авторы ставили перед собой задачу проследить установить связь между длиной теломер и работой в ночное время [40]. В исследовании участвовали 41 17 женщины. Оказалось, что женщины, работающие в ночные смены, чей сон составлял <6 часов в сут, имели более короткую длину теломер. Стоит заметить, что данная связь прослеживалась у лиц моложе 50 лет, у женщин старше 50 лет подобной зависимости не отмечалось.

Участникам исследования под руководством Prather A.A. было предложено ответить на вопросы анкеты о качестве сна [41]. Участники – 201 здоровая женщина в

Таблица 2. Взаимосвязь длины теломер и продолжительности сна у участников когортного исследования Whitehall II [33]

Параметр	Продолжительность сна (часов в сут)			
	≤5	≤6	≤7	>7
Длина теломер у мужчин (T/L, p=0,099)	0,956	0,986	0,990	0,999
Длина теломер у женщин (T/L, p=0,114)	1,014	1,004	0,998	0,982

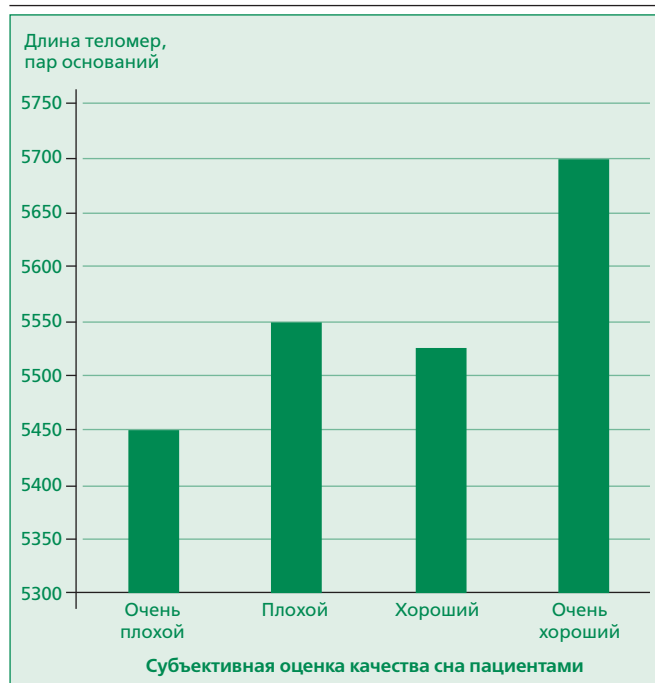


Рисунок 3. Взаимосвязь длины теломер и субъективного качества сна [41]

возрасте от 50 до 63 лет, все не курили, не имели онкологических заболеваний за последние 5 лет, и не получали химио- или радиотерапии по этому поводу, не имели за последние 10 лет аутоиммунных заболеваний и не получали иммунодепрессивную терапию по этому поводу. Качество сна субъективно оценивалось по следующим критериям: очень плохо; плохо; хорошо; очень хорошо. Оказалось, что сон, субъективно оцененный пациентками как «очень хороший», коррелировал и большей длиной теломер хромосом (рис. 3)

Механизмы, которые объясняют влияние нарушений сна на истощение теломер, еще предстоит установить. Известно, что малая продолжительность сна и короткая длина теломер связаны с хроническим воспалением [42-44]. Окислительный стресс также может быть причастен, ведь, с одной стороны, лишение нормальной продолжительности сна приводит к увеличению окислительного стресса [45], а, с другой стороны, окислительный стресс способствует увеличению скорости укорочения теломерных участков хромосом [46]. Высокое содержание гуанина в теломерах (GGG-участки) делает их особенно чувствительными к повреждениям, вызванных окислительным стрессом, т.к. активные формы кислорода (АФК) избирательно взаимодействуют с GGG-участками и способствуют увеличению скорости укорочения теломер при митозе. Этому есть несколько объяснений: а) гуанин является

наиболее легко окисляемым основанием ДНК – его окислительный потенциал ниже, чем у остальных трех оснований (аденин<цитозин<тимин); б) распределение электронов в основаниях ДНК. Гуанин имеет высокую реакционную способность, что обусловлено его структурой. Именно поэтому электроны, расположенные на 5'-GG-цепи, в первую очередь подвергаются окислению; в) АФК имеют различные окислительно-восстановительные потенциалы, которые могут определять специфичность окисления. Например, свободные гидроксильные радикалы вызывают повреждение ДНК без заметной специфичности, в то время как бензолоксильные радикалы оказывают избирательное повреждение 5'-GG-цепи теломер.

Короткая продолжительность сна и длина теломер также ассоциируются с увеличением симпатического тонуса нервной системы [48]. Влияние нарушений сна на длину теломер может быть обусловлено нейроэндокринными механизмами, поскольку происходит изменение суточных уровней кортизола [49-50]. В опытах *in vitro* группой ученых во главе с Choi J. [51] показано, что высокие уровни кортизола в крови вызывают уменьшение активности теломеразы (главного фермента, участвующего в поддержании нормальной длины теломер).

Заключение

В настоящее время широко известна и доказана роль нарушений продолжительности сна в развитии различных хронических заболеваний (включая ССЗ) и общей смертности. Кроме того, результаты многих клинических исследований демонстрируют связь между нарушением продолжительности сна и скоростью укорочения теломер. В свою очередь короткие теломеры ассоциируются с развитием АГ, ХСН, атеросклерозом и другими хроническими заболеваниями, летальность от которых в России (да и в мире в целом) остается высокой. Данный механизм заслуживает отдельного, более детального изучения. Тем не менее, очевиден факт: поиск и изучение причин, способствующих возникновению и прогрессированию нарушений продолжительности сна, а также новых подходов к их эффективному лечению, являются перспективными принципами профилактики сердечно-сосудистых заболеваний.

Конфликт интересов. Все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Литература

1. Kovalzon V.M. About functions of sleep. Zhurnal evolyutsionnoy biokhimi i fiziologii 1993; 29 (5-6): 627-34. Russian (Ковальзон В.М. О функциях сна. Журнал эволюционной биохимии и физиологии 1993; 29(5-6):627-634).
2. Romanov A.I., ed. Wake up America: a warning to the nation about sleep problems: report of the National Commission for the study of sleep disorders: key issues and a formal report. Moscow: Nauka; 1997. Russian (Романов А.И., ред. Проснись, Америка: предупреждение нации о проблемах сна: доклад Национальной Комиссии по исследованию расстройств сна. Москва: Наука; 1997)
3. Wayne A. M. Problems of somnology and sleep medicine. Actual problems of somnology: abstracts of reports of Russian conference (Moscow, 19-20 November 1998). Moscow, 1998: 4-11. Russian (Вейн А.М. Проблемы сомнологии и медицины сна. Актуальные проблемы сомнологии: тезисы докладов Всероссийской конференции (Москва 19-20 ноября 1998 г.). Москва; 1998: 4-11).
4. Cappuccio FP, Miller MA. Are Short Bad Sleep Nights a Hindrance to a Healthy Heart? Commentary on Hoevenaar-Blom et al. Sleep duration and sleep quality in relation to 12-year cardiovascular disease incidence: the MORGEN Study. Sleep 2011;34:1487-92.
5. Zavalko I. M., Kovalzon V. M. How did the science of sleep. Part I. Priroda 2014; 3: 53-60. Russian (Завалко И.М., Ковальзон В.М. Как возникла наука о сне. Часть I. Природа 2014; 3: 53-60).
6. Rechtschaffen A, Bergmann BM. Sleep deprivation in the rat: an update of the 1989 paper. Sleep 2002;25:18-24.
7. Kojima M, Wakai K, Kawamura T, et al. Sleep patterns and total mortality: a 12-year follow-up study in Japan. J Epidemiol 2000;10:87-93.
8. Tamakoshi A, Ohno Y. Self-reported sleep duration as a predictor of all-cause mortality: results from the JACC study, Japan. Sleep 2004;27(1):51-4.
9. Kripke DF, Garfinkel L, Wingard DL, et al. Mortality associated with sleep duration and insomnia. Arch Gen Psychiatry 2002;59:131-6.
10. Hublin C, Partinen M, Koskenvuo M, Kaprio J. Sleep and mortality: a population-based 22-year follow-up study. Sleep 2007;30:1245-53.
11. Law MR, Morris JK, Wald NJ. Use of blood pressure lowering drugs in the prevention of cardiovascular disease: metaanalysis of 147 randomised trials in the context of expectations from prospective epidemiological studies. BMJ 2009;338:b1665.
12. Gottlieb DJ, Redline S, Nieto FJ, et al. Association of usual sleep duration with hypertension: the Sleep Heart Health Study. Sleep 2006;29(8):1009-14.
13. Gangwisch JE, Heymsfield SB, Boden-Albala B, et al. Short sleep duration as a risk factor for hypertension: analyses of the first National Health and Nutrition Examination Survey. Hypertension 2006;47(5):833-9.
14. Van den Berg JF, Tulen JH, Neven AK, et al. Sleep duration and hypertension are not associated in the elderly. Hypertension 2007;50(3):585-9.
15. Wong LS, van der Harst P, de Boer RA, et al. Aging, telomeres and heart failure. Heart Fail Rev 2010;15(5):479-86.
16. Laugsand LE, Strand LB, Platou C, et al. Insomnia and the risk of incident heart failure: a population study. Eur Heart J 2013;34:1-12.
17. Hoevenaar-Blom MP, Spijkerman AMW, Kromhout D, et al. Sleep duration and sleep quality in relation to 12-year cardiovascular disease incidence: the MORGEN Study. Sleep 2011;34(11):1487-92.
18. Cappuccio FP, Cooper D, D'Elia L, et al. Sleep duration predicts cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. Eur Heart J 2011;32(12):1484-92.
19. Ikehara S, Iso H, Date C, et al. Association of sleep duration with mortality from cardiovascular disease and other causes for Japanese men and women: the JACC study. Sleep 2009;32(3):259-301.
20. Gangwisch JE, Heymsfield SB, Boden-Albala B, et al. Short sleep duration as a risk factor for hypertension: analyses of the first National Health and Nutrition Examination Survey. Hypertension 2006;47:833-9.
21. Cappuccio FP, Stranges S, Kandala NB, et al. Gender-specific associations of short sleep duration with prevalent and incident hypertension. The Whitehall II Study. Hypertension 2007;50:694-701.
22. Cappuccio FP, Miller MA. Are short bad sleep nights a hindrance to a healthy heart? Sleep 2011;34(11):1457-8.
23. Ferrie JE, Shipley MJ, Cappuccio FP, et al. A prospective study of change in sleep duration: associations with mortality in the Whitehall II Cohort. Sleep 2007;30: 659-66.
24. Magee CA, Iverson DC, Caputi P. Factors associated with short and long sleep. Preventive Medicine 2009;49:461-7.
25. Brostrom A, Johansson P. Sleep disturbances in patients with chronic heart failure and their holistic consequences-what different care actions can be implemented? Eur J Cardiovasc Nurs 2005;4: 183-97.
26. Speidelhalder K, Scholtes C, Riemann D. The association between insomnia and cardiovascular diseases. Nat Sci Sleep 2010;2:71-8.
27. Drapkina O.M., Shepel R.N. Modern views on the role of telomeres and telomerase in the pathogenesis of hypertension. Arterial'naya Gipertenziya 2013; 19(4): 290-8. Russian (Драпкина О.М., Шепель Р.Н. Современные представления о роли теломера и теломеразы в патогенезе гипертонической болезни. Артериальная Гипертензия 2013; 19(4): 290-8).
28. Drapkina O.M., Shepel R.N. Telomeres and telomerase complex. The main clinical manifestation of genetic malfunctioning. Kardiovaskulyarnaya Terapiya i Profilaktika 2015; 14(1): 70-7. Russian (Драпкина О.М., Шепель Р.Н. Теломеры и теломеразный комплекс. Основные клинические проявления генетического сбоя. Кардиоваскулярная Терапия и Профилактика 2015, 14(1): 70-7).
29. Cappuccio FP, D'Elia L, Strazzullo P, Miller MA. Quantity and quality of sleep and incidence of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. Diabetes Care 2010;33:414-20.
30. Cappuccio FP, Taggart FM, Kandala NB, et al. Meta-analysis of short sleep duration and obesity in children, adolescents and adults. Sleep 2008;31:619-26.
31. Willeit P, Willeit J, Mayr A, et al. Telomere length and risk of incident cancer and cancer mortality. JAMA 2010;304:69-75.
32. Drapkina O.M., Shepel R.N. Telomeres and chronic heart failure. Kardiologiya 2014; 54(4): 60-7. Russian (Драпкина О.М., Шепель Р.Н. Теломеры и хроническая сердечная недостаточность. Кардиология 2014; 54(4): 60-7).
33. Ogami M, Ikura Y, Ohsawa M, et al. Telomere shortening in human coronary artery diseases. Arterioscler Tromb Vasc Biol 2004;24:546-50.
34. Jackowska M, Hamer M, Carvalho LA, et al. Short Sleep Duration Is Associated with Shorter Telomere Length in HealthyMen: Findings from the Whitehall II Cohort Study. PLoS ONE 2012;7(10):e47292.
35. Ha M, Park J. Shiftwork and metabolic risk factors of cardiovascular disease. J Occup Health 2005;7:89-95.
36. Esquirol Y, Bongard V, Mabile L, et al. Shift work and metabolic syndrome: respective impacts of job strain, physical activity, and dietary rhythms. Chronobiol Int 2009;26:544-59.
37. Pronk A, Ji BT, Shu XO, et al. Night-shift work and breast cancer risk in a cohort of Chinese women. Am J Epidemiol 2010;171:953-9.
38. Knutson KL. Sleep duration and cardiometabolic risk: a review of the epidemiologic evidence. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2010;24:731-43.
39. Kakizaki M, Kuriyama S, Sone T, et al. Sleep duration and the risk of breast cancer: the Ohsaki Cohort Study. Br J Cancer 2008; 99: 1502-5.
40. Liang G, Schernhammer E, Qi L, et al. Associations between Rotating Night Shifts, Sleep Duration, and Telomere Length in Women. PLoS ONE 2011;6(8):e23462.
41. Prather AA, Puterman E, Lin J, et al. Shorter leukocyte telomere length in midlife women with poor sleep quality. Journal of Aging Research 2011;1:1-6.
42. Bekaert S, De Meyer T, Rietzschel ER, et al. Telomere length and cardiovascular risk factors in a middle-aged population free of overt cardiovascular disease. Aging Cell 2007;6:639-47.
43. Farzaneh-Far R, Lin J, Epel E, Lapham K, Blackburn E, et al. Telomere length trajectory and its determinants in persons with coronary artery disease: longitudinal findings from the heart and soul study. PLoS One 2010;5:e8612.
44. Mullington JM, Haack M, Toth M, et al. Cardiovascular, inflammatory, and metabolic consequences of sleep deprivation. Prog Cardiovasc Dis 2009;51:294-302.
45. McEwen BS. Sleep deprivation as a neurobiologic and physiologic stressor: allostasis and allostatic load. Metabolism 2006;55:S20-S23.
46. Richter T, Von Zglinicki T. A continuous correlation between oxidative stress and telomere shortening in fibroblasts. Exp Gerontol 2007;42:1039-42.
47. Kawanishi S, Oikawa S. Mechanism of telomere shortening by oxidative stress. Ann NY Acad Sci 2004;1019:278-84.
48. Lusardi P, Mugellini A, Preti P, et al. Effects of a restricted sleep regimen on ambulatory blood pressure monitoring in normotensive subjects. Am J Hypertens 1996; 9: 503-5.
49. Kumari M, Badrick E, Ferrie J, et al. Self-reported sleep duration and sleep disturbance are independently associated with cortisol secretion in the Whitehall II study. J Clin Endocrinol Metab 2009;94: 4801-9.
50. Spath-Schwalbe E, Scholler T, Kern W, et al. Nocturnal adrenocorticotropin and cortisol secretion depends on sleep duration and decreases in association with spontaneous awakening in the morning. J Clin Endocrinol Metab 1992;75:1431-1435.
51. Choi J, Faucz SR, Effros RB. Reduced telomerase activity in human T-lymphocytes exposed to cortisol. Brain Behav Immun 2008;22:600-605.

Поступила: 13.04.2015

Принята в печать: 03.07.2015

УДК 615.014.23.417

ВОЗМОЖНОСТИ И ЭФФЕКТЫ АКТИВАЦИИ ТЕЛОМЕРАЗЫ

© 2013 г. Н. А. Коваленко^{1*}, Д. Д. Жданов², Т. Ф. Коваленко³

¹Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения РФ, Москва, 119992

²Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича
Российской академии медицинских наук, Москва, 119121

³Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук Москва, 117997

Поступила в редакцию 25.09.2012 г.

Принята к печати 14.01.2013 г.

В представленном обзоре кратко описаны современные представления о механизмах регуляции активности теломеразы (преимущественно теломеразы человека). Рассмотрены локализация компонентов теломеразного комплекса в клетке и проявления активности фермента, не связанные с удлинением теломера. Описаны заболевания человека, связанные с пониженной активностью теломеразы, короткими теломерами и ускоренным укорачиванием теломер. Детально обсуждаются возможности активации транскрипции гена *hTERT* различными природными и синтетическими соединениями, а также эффекты трансфекции активного гена *hTERT* в клетки. Экзогенная активация транскрипции гена *hTERT* приводит к повышению пролиферативного потенциала клеток, что может использоваться в клеточной терапии. Необходимо отметить, что повышенная экспрессия гена *hTERT*, особенно при его трансдукции, может приводить к малигнизации клеток, что необходимо учитывать при выборе способа активации теломеразы в лечебных целях.

Ключевые слова: теломераза человека, активаторы теломеразы, ген *hTERT*.

POSSIBILITIES AND EFFECTS OF TELOMERASE ACTIVATION, by N. A. Kovalenko^{1*}, D. D. Zhdanov², T. F. Kovalenko³ (¹Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119992 Russia; *e-mail: vartala@yandex.ru; ²Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 119121 Russia; ³Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia). In this review we briefly describe recent knowledge of telomerase (predominately human telomerase) activity regulation mechanisms. We also point telomerase complex components localization in cells and discuss the enzyme activities that are independent of telomere elongation. The paper includes the overview of human diseases correlating with reduced telomerase activity, short telomeres and rapid telomeres shortening. We describe in details the possibilities of exogenous *hTERT* gene transcription activation by different natural and synthetic compounds as well as *hTERT* gene transfection effects. Such exogenous activation cause increasing proliferative potential of the cells and might be used in cell therapy. It must be noticed that elevated *hTERT* gene expression, especially in the case of *hTERT* gene transfection, might be the cause of cell malignesation. In this regard strict constraining criteria in medical application of different methods of telomerase activation must be developed.

Keywords: human telomerase, telomerase activators, *hTERT* gene.

DOI: 10.7868/S0026898413040071

ВВЕДЕНИЕ

На концах хромосом всех эукариотических и некоторых прокариотических организмов с линейной ДНК расположены ДНК-белковые комплексы – теломеры. У позвоночных животных, в

том числе и у человека, теломеры имеют длину 2–30 т.п.н. и состоят из двухцепочечных гексануклеотидных повторов 5'-(TTAGGG)_n-3', которые заканчиваются на 3'-конце одноцепочечной последовательностью из 50–300 н. [1, 2]. За каждый цикл репликации длина теломер уменьшается на

Принятые сокращения: TR – теломеразная РНК (telomerase RNA); HSP – белок теплового шока (Heat Shock Protein); siРНК – короткие интерферирующие РНК (short interfering RNA).

*Эл. почта: vartala@yandex.ru

50–200 н., что ограничивает число репликаций, к которым способны те или иные клетки (“предел Хейфлика”) [3]. Некоторые клетки могут поддерживать длину теломер с помощью фермента теломеразы, активность которой увеличивает предел Хейфлика, а, следовательно, и пролиферативный потенциал клетки.

Теломераза – высокомолекулярный (около 1000 кДа у позвоночных) рибонуклеопротеидный комплекс – синтезирует теломерные повторы на концах линейных хромосом и поддерживает структуру теломер в клетках [4]. Для проявления ферментативной активности *in vitro* достаточно двух основных компонентов теломеразного комплекса: обратной транскриптазы (TERT, telomerase reverse transcriptase) и теломеразной РНК (TR, telomerase RNA), содержащей матричный участок для синтеза теломерных повторов. Активность фермента *in vivo* обеспечивают также многочисленные дополнительные компоненты теломеразного комплекса [5]. Так, белок дискерин (dyskerin, DKC1 – dyskeratosis congenita), участвующий во взаимодействии отдельных компонентов теломеразы и ДНК, обеспечивает локализацию TR и, возможно, всего теломеразного комплекса в тельцах Кахаля. Шапероны HSP90 (Heat Shock Protein 90), а именно: HSP90 α 1 [6] и белок P23, необходимы для присоединения TERT к другим компонентам комплекса и поддержания всей структуры теломеразы. Последний из главных компонентов теломеразы – ассоциированный с теломеразой белок TEP1 (telomerase-associated protein 1), как полагают, также обеспечивает правильную конформацию теломеразы, опосредуя взаимодействия между основными ее компонентами. На уровень теломеразной активности, безусловно, влияют также теломерные белки, или белки шелтеринового комплекса, которые участвуют в образовании и поддержании особой структуры концов теломеры – Т- и Д-петель, которые защищают хромосомы от распознавания системой репарации ДНК в качестве участка, содержащего повреждение. Белки шелтеринового комплекса участвуют в регуляции синтеза теломер теломеразой [7–11]. На уровень теломеразной активности влияет РНК, которая синтезируется на теломерных последовательностях (TERRA) [12], а также белки, вовлеченные в репликацию и осуществление других жизненно важных функций в клетке.

Функции каталитической субъединицы теломеразы – TERT – не ограничены удлинением теломер. Установлено, что hTERT (TERT человека) стабилизирует теломеры, вызывает усиление пролиферации клеток и повышение их жизнеспособности, участвует в регуляции экспрессии некоторых генов, а также в регуляции ответа на повреждение ДНК [13, 14]. В опытах *in vivo* показано,

что для синтеза первой цепи ДНК TERT может использовать различные РНК [15], как и для синтеза двухцепочечных РНК (дцРНК) [14], т.е. hTERT обладает активностью РНК-зависимой РНК-полимеразы и hTR-независимой обратной транскриптазы. Продуктами РНК-полимеразной активности являются дцРНК, в результате процессинга которых образуются малые интерферирующие РНК (siРНК), влияющие на транскрипционную активность генов-мишеней [14]. Митохондриальная hTERT использует в качестве матрицы РНК-компонент эндорибонуклеазы [14]. Ее активность не связана с удлинением теломер (мтДНК имеет кольцевую структуру и не содержит теломерных повторов). В митохондриях нет TR, но они содержат 10–20% клеточной hTERT, остальные 80–90% находятся в ядре. В hTERT обнаружены сигналы ядерной и митохондриальной локализации. Митохондриальная hTERT связана с ДНК и в обычных условиях защищает ее от воздействия различных повреждающих агентов [15]. Предполагается, что фермент может принимать участие в репарации повреждений мтДНК [15]. На внутриклеточное распределение и активность hTERT влияют специфические стимулы и посттрансляционная модификация (фосфорилирование и дефосфорилирование) [16, 17]. hTERT повышает устойчивость клеток к химиотерапевтическим средствам и проапоптотическим стимулам, блокируя, по-видимому, митохондриальный путь апоптоза [14, 18].

Таким образом, в TERT имеются структуры, ответственные за ее локализацию и такие функции, как синтез теломерной ДНК, синтез РНК на РНК-матрице, усиление клеточной пролиферации, подавление апоптоза, регуляция ответа на повреждение ДНК, увеличение срока жизни клетки. Механизмы, необходимые для выполнения отдельных функций, изучены не полностью. Особенно интересным представляется сопряжение пролиферативного эффекта с продолжительностью жизни клетки и энергообеспечением.

Регуляции уровня теломеразной активности посвящены многие экспериментальные работы и несколько обзоров [5, 19–21].

Активный теломеразный комплекс включает несколько белков, экспрессия генов которых контролируется на уровне транскрипции и эпигенетически. мРНК этих белков могут подвергаться альтернативному сплайсингу, а сами белки – посттрансляционным модификациям. Активность теломеразы зависит и от белков шелтеринового комплекса, например от танкиразы, и белков, участвующих в миграции теломеразы в определенные компартменты клетки. В свою очередь, синтез и активность этих белков также подвергаются регуляции. Однако для проявления теломеразной активности достаточно экспрессии гена

TERT. Особенно нужно отметить, что *TERT* модулирует экспрессию многих генов, контролирующих рост [22, 23].

В представленном обзоре мы попытались обобщить данные о возможности активации теломеразы (преимущественно теломеразы человека), а также биосинтеза отдельных компонентов теломеразного комплекса различными экзогенными соединениями.

АКТИВНОСТЬ ТЕЛОМЕРАЗЫ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ И ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ

Теломеры укорачиваются при каждом цикле репликации. Укорачивание длины теломер до 5–8 т.п.н. вызывает переход клеток в состояние репликативного старения, при котором наблюдается замедление или полная остановка пролиферации, а активация теломеразы увеличивает продолжительность жизни клеток [24]. Нормальные клетки зародыша, эмбриональные и другие стволовые клетки, кроветворные клетки, активированные лимфоциты, клетки базального слоя кожи, волосяных фолликулов и тонкого кишечника способны поддерживать длину теломер с помощью теломеразы. В большинстве соматических клеток человека теломераза либо вовсе неактивна, либо имеет невысокую активность (в фибробластах, ткани молочной железы, в клетках печени) [4, 13]. Теломераза активна в 85–90% опухолевых клеток [25]. Из приведенных в обзоре [26] данных видно, что поиску специфических ингибиторов теломеразы и изучению их влияния на рост опухолевых клеток и выживаемость животных посвящены многие работы. Некоторые ингибиторы проходят доклинические и клинические испытания в качестве противоопухолевых средств [27, 28].

Преждевременное репликативное старение клеток может вызываться нарушениями в формировании активного теломеразного комплекса, в результате чего в соматических клетках, не обладающих теломеразной активностью, образуются короткие теломеры. Ускорение укорачивания теломер также может служить причиной развития некоторых патологических состояний.

Старение организма можно определить как серию возрастных физиологических изменений, которые снижают функциональные возможности организма. На молекулярном уровне старение связано со снижением активности хроматина и биосинтеза белков. Согласно одной из теорий, старение организма связывают со старением клеток и с функционированием системы теломеры–теломеразы [29]. К этому, вероятно, можно добавить значимость энергетического обеспечения клеток, т.е. состояния и количества митохондрий,

в регуляции функционирования которых участвует *TERT* [15].

Ускоренное старение как клеток, так и всего организма наблюдается при синдроме Вернера (Werner syndrome). Считается, что в основе патогенеза этого синдрома лежат нарушения гена АТФ-зависимой хеликазы – фермента, участвующего в репарации и репликации ДНК. Однако при синдроме Вернера происходит также ускорение укорачивания теломер [30, 31]. Другое редкое заболевание, связанное с преждевременным старением (замедление роста, болезни суставов, морщинистость кожи, раннее развитие атеросклероза и пр.) и сокращением продолжительности жизни – синдром Хатчинсона–Гилфорда (Hutchinson–Gilford syndrome). Теломеры в фибробластах таких больных более короткие, чем у здоровых лиц того же возраста [32]. При синдроме Дауна (Down's syndrome) также наблюдается раннее старение со всеми его характерными проявлениями, включая болезнь Альцгеймера, и ускорение укорачивания теломер в лимфоцитах [33]. Предполагается, что укороченные до критической длины теломеры вносят важный вклад в развитие некоторых форм апластической анемии [34] и анемии Фанкони (Fanconi's anemia) [35].

С недостаточной активностью теломеразы стволовых клеток связан ряд врожденных патологий. Дискератоз (dyskeratosis congenita) – наследственное заболевание кожи с пойкилодермией, лейкоплакией слизистой оболочки рта, дистрофией ногтей, ладонно-подошвенным гипергидрозом, закупоркой или атрезией слезно-носовых каналов и прогрессирующей апластической анемией. Различают X-сцепленную форму, при которой мутации в гене дискерина нарушают сборку теломеразного комплекса, и аутосомно-доминантную форму, обусловленную мутацией, затрагивающей H/ACA-домен hTR. Встречаются также мутации в гене *hTERT* [36, 37], которые приводят к снижению теломеразной активности в стволовых клетках и, как следствие, к появлению в соматических клетках укороченных теломер [38].

Укороченные теломеры обнаружены в лейкоцитах периферической крови больных гипертонией, при инсулинорезистентности, окислительном стрессе [39], а также у пожилых людей, особенно при риске хронической ишемии сердца [40], остеопорозе у женщин [41], длительном воздействии стресса и хронических инфекционных заболеваниях [42]. Способность иммунных клеток усиливать теломеразную активность подавляется гормоном стресса – кортизолом. Длительное поддержание высокого уровня этого гормона в крови истощает иммунную систему и повышает предрасположенность к различным заболеваниям.

ВОЗМОЖНОСТИ И ЭФФЕКТЫ АКТИВАЦИИ ТЕЛОМЕРАЗЫ

ям [43]. Поскольку укороченные теломеры ассоциированы со старением, многими возрастными и другими патологиями, возможность увеличить теломеразную активность и, следовательно, длину теломер вызывает большой интерес [24, 42, 44].

ЭНДОГЕННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ТЕЛОМЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ

Теломеразная активность зависит от количества фермента в клетке, что во многом определяется уровнем экспрессии генов, прежде всего генов коровых субъединиц теломеразы (*hTERT* и *hTR*), представленных в геноме человека только одной копией. Время полужизни *hTERT* (24 ч) гораздо короче, чем у *hTR* (5 дней) [19], которая находится в клетке и в отсутствие теломеразной активности [45]. Это, возможно, дает ядерной *hTR* конкурентные преимущества перед другими РНК и реализацию в ядре именно теломеразной активности TERT. Иначе говоря, разнообразные про-

явления активности TERT зависят, в первую очередь, от экспрессии гена *hTERT*. Показано также, что введение гена *hTERT* в клетки приводит к появлению в них теломеразной активности и обеспечивает выполнение других функций TERT.

В регуляции экспрессии гена *hTERT* участвуют многие факторы транскрипции (таблица). Некоторые факторы, стимулирующие экспрессию *hTERT*, могут активировать онкогены. Например, фактор STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription), который фосфорилируется киназами Src и Jak, при взаимодействии мембранных рецепторов с факторами роста и цитокинами активирует непосредственно *hTERT* в нормальных и опухолевых клетках, причем STAT3 может активировать и онкогены [46]. Амплификация хромосомного локуса, который кодирует *hTERT* или *hTR*, коррелирует с повышением уровня активного фермента в клетках и их онкотрансформацией [47, 48].

Регуляция экспрессии гена *hTERT* и активности теломеразы*

Позитивная регуляция	Негативная регуляция
Транскрипционный и посттранскрипционный уровень	
<p>Фактор транскрипции Sp1 взаимодействует с пятью GC-боксами в промоторе <i>hTERT</i></p> <p>Продукт онкогена <i>c-Myc</i> (гомолог онкогена <i>v-myc</i> вируса миелоцитоматоза) взаимодействует с E-боксами промотора <i>hTERT</i> – CACGTC</p> <p>ER (рецептор эстрогенов) α и β</p> <p>NF-κB (ядерный фактор κB) трансактивирует <i>hTERT</i></p> <p>USF (вышележащий стимулирующий фактор) 1 и 2 взаимодействует с E-боксами в промоторе <i>hTERT</i></p> <p>E6 (белок E6 папилломавируса человека типа 16) активирует <i>hTERT</i> через E-боксы и GC-боксы промотора</p> <p>LANA (ассоциированный с латентностью ядерный антиген герпесвируса, ассоциированного с саркомой Капоши) активирует <i>hTERT</i> при взаимодействии с SP1 в промоторе</p> <p>STAT3 (переносчик сигнала и активатор транскрипции) активирует экспрессию гена <i>hTERT</i> при взаимодействии с консенсусной последовательностью в его промоторе TTCNNNGAAA (три сайта), опосредует влияние факторов роста, цитокинов (интерлейкинов 6 и 2), онкогенов</p> <p>Метилирование промотора <i>hTERT</i> на участке –441...–218.</p> <p>Метилирование экзона 1</p>	<p>Опухолевый супрессор WT1 (взаимодействует с промотором гена <i>hTERT</i>)</p> <p>Фактор CTCF (взаимодействует с экзонами 1 и 2 гена <i>hTERT</i>)</p> <p>Метилирование ДНК в области кор-промотора <i>hTERT</i></p> <p>Антисмысловая РНК TERRA (содержит теломерные и субтеломерные последовательности, ингибирует РНК-компонент теломеразы)</p> <p>Альтернативный транскрипт <i>hTERTα</i> (трансляция с этой мРНК приводит к образованию белка со сниженной активностью)</p>
Посттрансляционный уровень	
<p>Киназа Akt (фосфорилирование повышает активность теломеразы)</p> <p>Белок TCAB1 (осуществляет перенос РНК-компонента теломеразы в ядро)</p> <p>Белок TRP1 (предположительно участвует в доставке теломеразы к теломерам и увеличивает процессивность теломеразы)</p>	<p>Киназа c-Ab1 (фосфорилирование приводит к трехкратному снижению активности)</p> <p>Убиквитинирование с помощью MKRN1 приводит к деградации теломеразы</p> <p>Взаимодействие CHIP (C-концевой домен белка, взаимодействующего с Hsc70) с теломеразой вызывает ее полиубиквитинирование</p>

* Использованы данные [5, 19, 21, 46, 50–53].

Активировать экспрессию гена *hTERT* могут природные регуляторные пептиды, например комплекс пептидов эпифиза [49].

Известно, что метилирование ДНК приводит к снижению экспрессии генов [54]. Однако влияние этой эпигенетической модификации на транскрипцию гена *hTERT* неоднозначно и зависит от расположения сайтов метилирования. Так, не выявлено взаимосвязи между степенью метилирования участка размером 550 п.н. гена *hTERT* (–500...+50) и уровнем экспрессии этого гена [55]. Гиперметилирование участка –441...–218 в промоторе гена *hTERT* обнаружено во всех клеточных линиях, обладающих теломеразной активностью, а во всех негативных по теломеразе образцах отмечено гипометилирование этого участка [50]. Причины этого явления не установлены. Позднее показали, что ген *hTERT* успешно экспрессируется, если область его кор-промотора остается неметилированной. Эта область представляет собой участок гена *hTERT* (–160...–80), содержащий три из четырех сайтов связывания фактора Sp1 – активатора транскрипции гена *hTERT* [19, 51]. Экспрессия гена *hTERT* зависит от метилирования не только его промоторной области, но и кодирующих последовательностей. Экзоны 1 и 2 этого гена содержат сайты связывания ингибитора CTCF [52]. Если эти последовательности метилированы, то связывание ингибитора происходит с очень низкой эффективностью. Если же ДНК в районе сайтов связывания гипометилирована, то фактор CTCF взаимодействует с геном *hTERT*, что приводит к подавлению транскрипции [51].

мРНК *hTERT* подвергается тканеспецифичному сплайсингу. Всего идентифицировано около 10 вариантов сплайсинга мРНК *hTERT*. Наиболее часто встречаются варианты α (делеция 36 п.н. в экзоне 6) и β (делеция 182 п.н. в экзонах 7 и 8, инсерция 36 п.н.), причем активный фермент кодируется полноразмерным транскриптом. Некоторые варианты мРНК *hTERT* также транслируются, но при этом синтезируются белки, обладающие меньшей каталитической активностью. Варианты сплайсинга α и β выполняют, вероятно, регуляторные функции, они ингибируют активность теломеразы при ее повышенной экспрессии в нормальных и опухолевых клетках, по-видимому, поддерживают длину теломер, а также осуществляют и иные функции, присущие *hTERT*. На экспрессию гена *hTERT* влияют трансформирующий фактор β 1 (TGF- β 1) и с-Мус, который стабилизирует β -вариант сплайсинга. Более подробно сплайсинг мРНК *hTERT* обсуждается в обзоре [53].

Экспорт теломеразы из клеточного ядра приводит к снижению в нем теломеразной активности. Этому противодействует тирозинфосфатаза Shp2, способствующая тем самым продлению жиз-

ни клетки. В цитоплазме Shp2 участвует в модуляции клеточного роста, развития, тканевого воспаления, хемотаксиса. В ядре тирозинфосфатаза ассоциирована с активатором транскрипции белком STAT5. Таким же способом Shp2 затрудняет выход *hTERT* из митохондрий и замедляет старение, индуцируемое активными формами кислорода [56]. В условиях окислительного стресса содержание *hTERT* в митохондриях возрастает [13, 15]. В отсутствие теломеразы структура митохондрий нарушается, а содержание свободных радикалов в них увеличивается [15]. Предполагается, что теломераза участвует в регуляции числа митохондрий в клетке. В обычных условиях фермент защищает мтДНК от повреждений и тем самым поддерживает стабильное количество органелл в клетке. В условиях окислительного стресса митохондрии с поврежденной ДНК подвергаются деградации [57].

На локализацию теломеразы оказывает влияние полифункциональный белок нуклеолин, основная функция которого состоит в регуляции транскрипции рибосомной ДНК. Нуклеолин участвует также в созревании рибосом и транспорте компонентов рибосомы из ядра в цитоплазму [58]. Этот фосфопротеин связывает весь теломеразный комплекс посредством белок-белковых и РНК-белковых взаимодействий. В нормальных фибробластах теломераза вместе с нуклеолином локализуется в ядрышке [59]. Функции, структура и посттрансляционные модификации нуклеолина подробно рассмотрены в обзоре [58]. Приведены данные о том, что в ядре нуклеолин участвует в регуляции клеточного цикла и транскрипции многих генов, в стабилизации теломер (путем связывания с одноцепочечными G-богатыми участками), а также в репликативном старении клеток. Вне ядра этот белок способен взаимодействовать со многими белками. Он регулирует активность факторов транскрипции и протеинкиназ, влияя таким образом на пролиферацию клеток. В гликозилированном состоянии нуклеолин образует кластеры на поверхности клеток и выполняет рецепторные функции. С его участием происходит передача сигналов факторов роста и цитокинов, а также эндоцитоз вирусных белков [59].

Среди белков шелтеринового комплекса с активностью теломеразы наиболее тесно связана танкираза – поли(ADP-рибозо)полимераза. Удлинение теломер, катализируемое теломеразой, ингибируется белком TRF1, связывающим теломерные повторы (telomere repeat binding factor 1). Танкираза 1 (TNKS1) поли(ADP)-рибозилирует TRF1, что приводит к отделению этого белка от теломер, которые становятся доступными для взаимодействия с теломеразой. В свою очередь, функция TNKS1 регулируется путем фосфорилирования polo-подобной киназой 1 (Polo-like kinase 1 – Plk1)

[60]. Отмечается прямая корреляционная связь между экспрессией генов *TNKS1* и *hTERT*, при этом уровень экспрессии обоих генов увеличен при раке [61]. Накоплены доказательства в пользу того, что во многих клетках *TNKS1* (и, вероятно, *TNKS2*) является основным компонентом сигнального пути Wnt/ β -катенин [62, 63]. Ингибирование *TNKS1* ускоряет укорачивание теломер, вызванное подавлением теломеразной активности. Все это позволяет предполагать, что при онкологических заболеваниях наиболее успешной будет комбинированная терапия, направленная на ингибирование активности обоих ферментов [64]. Танкиразы 1 и 2 – ферменты, участвующие в посттрансляционной модификации. Танкиразы могут взаимодействовать с различными белками, влияя на протекающие в клетке процессы, в том числе на перемещение рецептора GLUT-4, что отражается на стимулируемом инсулином поглощении глюкозы клетками, т.е. на энергетическом метаболизме. Танкиразы 1 и 2, вероятно, взаимозаменяемы в случае взаимодействия с TRF1 и IRAP (insulin-responsive aminopeptidase) [65]. Однако наличие у *TNKS1* некоторых структурных особенностей позволяет специфически влиять (например, ингибировать) именно на этот фермент [66]. Таким образом, танкираза как сама по себе, так и вместе с теломеразой может служить мишенью для противоопухолевой терапии. Увеличение теломеразной активности и параллельное повышение уровня танкиразы с ее разнообразными эффектами, особенно на энергетический метаболизм, и приводит, возможно, к “улучшению качества жизни” клетки, о чем будет сказано далее.

Некоторые особенности метаболизма, потенциальные факторы риска развития опухолевых заболеваний способствуют активации теломеразы или стимулируют ее биосинтез. Белок лептин и его мембранные рецепторы играют центральную роль в регуляции массы тела, а экспрессия гена лептина коррелирует с экспрессией *hTERT*. Сигналы лептина передаются преимущественно через JAK/STAT (Janus-activated Kinase/signal transducers and activators of transcription), что приводит к повышению экспрессии гена *hTERT* и продукции таких важных регуляторов клеточного цикла и выживаемости клеток, как циклин D1, c-Мус и сурвивин. В опосредуемой лептином регуляции экспрессии *hTERT* участвуют также Мус/Max/Mad, что в ряде случаев связано с ацетилированием гистонов в проксимальном участке промотора гена *hTERT* [67].

Холестерин (в составе липопротеинов) и его специфический поверхностный рецептор – C_k – вовлечен в регуляцию транскрипции *hTERT* в мононуклеарных клетках периферической крови

человека. Активация этого рецептора приводит к подавлению экспрессии гена *hTERT* в результате репрессии генов *c-Myc* и *PPAR γ* (peroxisome proliferator-activated receptor- γ), кодирующего фактор транскрипции, вовлеченный в регуляцию адипогенеза, гомеостаза глюкозы, а также клеточной дифференцировки и пролиферации, экспрессии многих генов, связанных с канцерогенезом [68, 69]. Следовательно, существует обратная связь между активированным рецептором холестерина и экспрессией гена *hTERT* [68].

Таким образом, на экспрессию *hTERT* влияют определенные метаболиты, причем преимущественно энергетического и липидного обмена.

Возможно, существуют не только общие, но и тканеспецифичные механизмы активации экспрессии гена *hTERT*. Например, в CD8⁺ Т-лимфоцитах аденозиндезаминаза повышает экспрессию генов *CD28* и *hTERT*, а аденозин, напротив, стимулирует снижение содержания CD28, падение уровня теломеразы и ускорение клеточного старения [70].

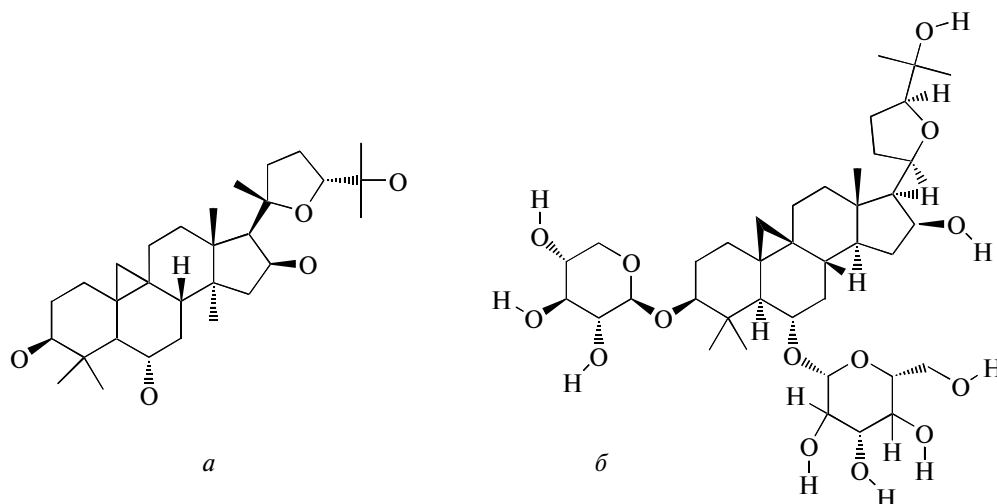
Предполагается, что активировать теломеразу и ее каталитическую субъединицу, обладающую значимыми самостоятельными биологическими активностями, можно воздействуя на экспрессию гена *hTERT* и формирование ферментативных комплексов, а также на локализацию TERT и ее взаимодействие с другими компонентами клетки.

ПОВЫШЕНИЕ ТЕЛОМЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ С ПОМОЩЬЮ ЭКЗОГЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Установлено, что фитогормоны обладают способностью стимулировать теломеразную активность. Ауксин (индолилуксусная кислота) индуцирует теломеразную активность в тех органах растений, где она обычно отсутствует. Способность к индукции связана с модификацией ауксином белка, регулирующего транскрипцию гена *TERT* [71].

На уровень теломеразной активности у человека влияет синтетический пептид эпиталон (Ala-Glu-Asp-Gly), первичная структура которого соответствует структуре пептидов эпифиза. Этот пептид связывается с промотором гена *hTERT* [49]. Эпиталон активирует ген *hTERT* в культивируемых фетальных фибробластах человека, в которых этот ген обычно не экспрессируется. В клетках, обработанных эпиталоном, длина теломер увеличена приблизительно на 33%. Такие клетки способны к более длительной пролиферации, превышающей предел Хейфлика, без проявлений признаков онкотрансформации [72, 73].

В результате эмпирического скрининга активаторов теломеразы обнаружили, что подобной активностью обладает циклоастрогенол (cycloas-



Циклоастратегенол (а) и астрагалозид IV (б).

tragenol-CAG, TAT-2), выделенный из растения *Astragalus membranaceus*, применяемого в китайской медицине. TAT-2 является агликоном, производным астрагалозида IV (рисунок), он быстро проникает в клетки путем пассивной диффузии, как показано на культивируемых клетках. В микросомах печени крыс и человека TAT-2 подвергается моногидроксилированию и окислению, а продукты окисления гидроксилируются. После инкубации с микросомами в течение 30 мин неметаболизированным остается лишь 10–20% TAT-2 [74].

Известно, что в процессе иммунного ответа в Т- и В-лимфоцитах возрастает теломеразная активность [75, 76]. Оказалось, что активатор TAT-2 может замедлять укорачивание теломер, повышать репликативный потенциал и иммунные функции CD8⁺Т-лимфоцитов: продукцию цитокинов и хемокинов, противовирусную активность. Такое действие особенно выражено в случае CD8⁺Т-клеток, полученных от HIV-инфицированных индивидов. Известно, что Т-лимфоциты HIV-инфицированных теряют способность к пролиферации, и связано это именно с активностью теломеразы, так как конкурентный ингибитор теломеразы GRN163L, последовательность нуклеотидов которого комплементарна матричному участку hTR, препятствует эффектам TAT-2 [77]. Оказалось, что TAT-2 повышает экспрессию гена *hTERT* с использованием сигнального пути MAPK/ERK (mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase). TAT-2 влияет также на посттрансляционное фосфорилирование hTERT, которое активирует фермент [77].

Интересно, что стабилизация длины теломер, повышение пролиферативного потенциала, увеличение теломеразной и противовирусной актив-

ности наблюдалось также при трансдукции гена *hTERT* в Т-лимфоциты HIV-инфицированных индивидов [78].

Выделено также несколько аналогов циклоастратегенола. Показано, что астрагалозид IV оказывает положительное действие при ишемии головного мозга и сердца крыс [79], регулирует уровень глюкозы в крови [80], проявляет кардиопротекторную активность [81], однако не известно, как эти факторы связаны с активацией теломеразы.

TA-65[®] – активатор теломеразы, также выделенный из растения *A. membranaceus*, индуцирует экспрессию гена *hTERT*, дозозависимо увеличивает теломеразную активность и длину теломер в неонатальных кератиноцитах и фибробластах человека [82]. TA-65[®] способен увеличивать среднюю длину теломер и уменьшать долю критически коротких теломер и повреждений ДНК в фибробластах мыши. TA-65[®] не повышает теломеразную активность и не удлиняет теломеры в фибробластах мышей с нокаутом гена *mTERT*. У мышей, получавших TA-65[®], улучшалось состояние кожи и костей, возросла толерантность к глюкозе. Частота злокачественных заболеваний при этом не возрастала [83]. У людей, принимавших TA-65[®] (10–50 мг ежедневно в течение 3–6 мес) и наблюдавшихся в течение года, улучшались показатели иммунной системы: уменьшалось количество стареющих цитотоксических (CD8⁺/CD28⁻) Т-лимфоцитов и натуральных киллерных клеток, значительно меньше стало клеток с короткими теломерами, хотя средняя длина теломер не изменилась. Более выраженные изменения отмечены у серопозитивных в отношении цитомегаловирусов индивидов. Негативных изменений выявлено не было. Предполагается проведение контро-

лируемых рандомизированных испытаний, направленных на оценку специфичности действия ТА-65 на человека [82].

Генистеин — изофлавоон, выделенный из сои, лугового клевера и других растений, обладает фитоэстрогенной активностью. Генистеин регулирует транскрипцию гена *hTERT* [84]. На клетках рака предстательной железы показано, что в низких концентрациях генистеин повышает теломеразную активность, а в высоких — подавляет ее.

Ресвератрол, которым богат красный виноград и ряд других растений, относится к фитоалексинам, веществам фенольной природы, защищающим растения от грибной инфекции. Ресвератрол влияет на посттрансляционную модификацию и локализацию теломеразы, ингибирует фермент в опухолевых клетках и увеличивает его активность в предшественниках эпителиальных и эндотелиальных клеток [85–87].

Препараты из группы статинов, применяемые для снижения уровня холестерина при атеросклерозе, замедляли укорачивание теломер в лейкоцитах периферической крови больных, активность теломеразы при этом не изучали [88].

Таким образом, влияние на теломеразную активность может зависеть как от дозы вещества, так и от направления и стадии дифференцировки клеток. Можно согласиться с авторами обзора [89], что, вероятно, существует возможность регуляции теломеразной активности при помощи лекарственных средств, однако очень многое еще предстоит выяснить.

ТРАНСДУКЦИЯ ГЕНА *hTERT*

Перед клеточной терапией стоят задачи повышения способности тканей к регенерации, а также получения необходимого количества клеток нужного фенотипа для замещения поврежденных клеток и клеток-переносчиков для направленной доставки нужных генов. Большие надежды связывают с использованием веществ, стимулирующих теломеразную активность, либо с трансфекцией каталитической субъединицы теломеразы.

Мезенхимные стволовые клетки человека (hMSC) обладают способностью к остеогенной, адипогенной и хондрогенной дифференцировке при определенных условиях *in vivo* и *in vitro*. Однако в костном мозге, обычном источнике hMSC, их содержание не превышает 0.01%, а выращиванию в культуре мешает репликативное старение с падением теломеразной активности [90, 91]. У культивируемых hMSC предел Хейфлика равен 40 удвоениям, далее клетки теряют пролиферативный потенциал и способность к дифференцировке [92, 93]. Трансфекция гена *hTERT* с помощью ретровирусного вектора в ряде случаев приводила не

только к желаемому росту клеток, но и к их онкотрансформации [94]. Однако в некоторых случаях удавалось сохранять исходный фенотип клеток при трансфекции гена *hTERT* в составе ретровирусного вектора и при длительном культивировании [95]. Успешным оказалось использование лентивирусного вектора. Получен клон hMSC, в котором в течение длительного времени сохранялась экспрессия генов-супрессоров (т.е. исходный фенотип) и способность к последующей дифференцировке, как и у исходных клеток [94]. В другом опыте иммортализованные MSC, существовавшие в культуре в течение 6 нед и более, сохраняли первичный фенотип (CD34⁻, CD45⁻, SH2⁺(CD105), SH3⁺(CD73). Внутривенное введение таких клеток животным с ишемическими повреждениями головного и спинного мозга оказывало терапевтический эффект [96]. Многие клетки, как известно, отвечают на трансфекцию гена *hTERT* повышением репликативного потенциала, способности к дифференцировке и резистентности к повреждающим воздействиям (остеобласты, нейроны и их предшественники, эпителиальные клетки, хондроциты, клетки коры надпочечников, кератиноциты, пигментный эпителий сетчатки глаза, фибробласты, кардиомиоциты, цитотоксические Т-лимфоциты, гемопоэтические стволовые клетки, гепатоциты, холангиоциты, скелетные миоциты и др.) [42].

В hMSC, экспрессирующих ген *hTERT* в составе ретровирусного вектора, выявлено 20 белков, содержание которых отличалось от содержания в исходных hMSC на определенных стадиях роста (прошедших определенное число удвоений популяции). Экспрессия генов большей части этих белков также изменялась. Изменения затрагивали белки, выполняющие различные функции: Са-связывающие, структурные белки, шапероны, участвующие в фолдинге других белков, антиоксидантные белки, белки, связанные с транскрипцией, трансляцией, метаболизмом, образованием энергии и с трансдукцией сигнала [97].

Можно отметить некоторые особенности, наблюдаемые в ряде случаев при трансдукции гена *hTERT*.

Иммортализация глиальных клеток обонятельной луковицы человека достигалась путем трансфекции генов *BMI1* (polycomb ring finger oncogene) и *hTERT*. Популяция клеток, трансфицированных геном *TERT*, была менее однородной со значительным количеством стареющих и покоящихся клеток, тогда как клетки, трансфицированные одновременно генами *BMI1* и *hTERT*, сохраняли исходный кариотип, генетическую стабильность и уровень маркеров клеточного старения (т.е. пролиферативный потенциал) даже после 300 дней культивирования [98].

Иммортализованные геном *hTERT* клетки коры надпочечников оказались пригодными для проведения заместительной терапии адреналэктомированным мышам с иммунодефицитом. Трансфекция только гена *hTERT* не сопровождалась опухолевой трансформацией и увеличением экспрессии онкогенов, но приводила к изменению активности других генов, а клетки становились более устойчивыми к различным воздействиям [99].

Введение гена *hTERT* в культивируемые нормальные фибробласты легкого и клетки НерG2 оказывало терапевтический эффект и предупреждало острое повреждение клеток такими токсичными веществами, как четыреххлористый углерод, *D*-галактозамин и др. [100].

Ген *hTERT*, кодирующий активную и неактивную (мутантную) каталитическую субъединицу теломеразы человека, вводили мышам. Оказалось, что у животных, содержащих активную TERT, увеличилась продолжительность жизни. Усиление пролиферации наблюдали в опытах с культивируемыми кардиомиоцитами, трансфицированными активной TERT [101]. Согласно некоторым сообщениям, в клетках, не обладающих теломеразной активностью, *hTERT* вовлечена в ответ на двухцепочечные разрывы ДНК [102]. Показано, что продукция TERT усиливала рост клеток и их пролиферацию независимо от элонгации теломер [103]. Следует отметить, что многие представления о разнообразных функциях каталитической субъединицы теломеразы появились благодаря экспериментам, в которых клетки трансфицировали геном *TERT* либо использовали трансгенных животных. У трансгенных мышей при сверхпродукции *mTERT* возникали опухоли молочной железы – интраэпителиальные неоплазии, переходящие в дальнейшем в инвазивный рак [104], что явно связано не с удлинением теломер. У мышей теломеры длиннее, чем у человека [105], поэтому после генетической инактивации теломеразы могут нормально существовать четыре поколения потомков этих мышей [106]. Кроме того, нормальные соматические клетки мышей содержат активную теломеразу [107]. Показано, что каталитическая субъединица *mTERT* активирует экспрессию генов, вовлеченных в сигнальный путь Wnt, и таким образом влияет на пролиферацию клеток [108, 109].

Возможно, что TERT влияет на клеточную пролиферацию при помощи другого механизма. Например, трансдукция *hTERT* вызывает увеличение пролиферации эпителиальных клеток молочной железы человека (НМЕС), изменяя уровень таких регуляторных белков, как циклин D1, A2, E2F, pRB, причем для этого необходим неповрежденный каталитический домен TERT [14].

Малигнизацию клеток можно объяснить увеличением дозы экспрессируемого гена и эктопической экспрессией гена *mTERT*. Предполагается, что TERT может стимулировать рост опухолевых стволовых клеток, и эта функция не зависит от функции поддержания теломер [110]. Пролиферацию стволовых клеток и их малигнизацию при сверхпродукции TERT, по-видимому, можно объяснить взаимодействием TERT с фактором транскрипции BRG1, в результате которого ремодулируется связывание β -катенина и включается Wnt-сигнализация, характерная для стволовых и опухолевых клеток [111]. Кроме того, TERT, предположительно, взаимодействует с тем же промоторным элементом, что и BRG1 и активирует сигнальный путь Wnt [108, 109].

Таким образом, активация теломеразы в различных клетках при трансдукции гена *TERT* приводит к противоречивым результатам. Эти противоречия сохраняются даже в практически идентичных опытах, в которых в разных тканях трансгенных мышей постоянно экспрессируется экзогенный ген *TERT*. В одних работах [112] у таких мышей наблюдали развитие почечной патологии, связанной с усилением пролиферации почечных подоцитов и активацией Wnt-сигнализации, что не зависело от удлинения теломер. В других работах не обнаруживали почечной (и какой-либо другой) патологии, а TERT влияла на увеличение продолжительности жизни животных, их здоровье и омоложение [113]. Эти эффекты были связаны с удлинением теломер в результате экспрессии *TERT*.

Распространяются ли выводы о практически непосредственном участии теломеразы (TERT) в малигнизации на ситуации, когда доза экспрессируемого гена не превышена, и экспрессия гена контролируется обычными клеточными механизмами, еще предстоит выяснить. От этих выводов и конкретных условий, которые позволили бы избежать малигнизации клеток при активации теломеразы, зависит возможность использования теломеразы в клинических целях.

Результаты опытов по переносу *hTERT* в разные клетки и опытов, проведенных на трансгенных животных, позволяют сделать некоторые выводы:

1) в настоящее время используются разные способы трансдукции *hTERT*, и каждый эксперимент уникален;

2) путем трансдукции удастся вызвать появление или увеличение теломеразной активности в клетках с различным фенотипом, повысить их пролиферативный потенциал и устойчивость к повреждающим воздействиям;

3) путем трансдукции *TERT* достигается им-мортализация и пролиферация клеток, что в ряде случаев способствует их малигнизации. Это ставит под вопрос возможность использования таких клеток для регенерации (т.е. клеточной терапии) *in vivo*. Возможно, исключение представляют случаи иммунной реакции на белки векторных вирусов, приводящие к элиминации иммортализованных клеток;

4) транскрипция гена *hTERT*, а также кодируемая им каталитическая субъединица теломеразы влияют как на содержание и активность компонентов теломеразного комплекса, так и на экспрессию многих генов;

5) эктопическая экспрессия *TERT* может вызывать изменение в распределении белка в клетке и в иерархии регуляторных влияний на функции каталитической субъединицы.

Известно, что для ингибирования активности теломеразы достаточно исключить из теломеразного комплекса один из его компонентов, например HSP90 [28], тогда как при активации экспрессии одного гена *hTERT* возможна реактивация всего комплекса. Согласно более ранним [114–116] и последним данным [14], именно *hTERT* оказывает антиапоптотическое действие и повышает выживаемость клеток даже в отсутствие теломеразной активности. Белок *hTERT* способен стимулировать экспрессию не только компонентов теломеразного комплекса, но и других генов. Механизмы влияния экспрессии гена *hTERT* на активность других генов изучены недостаточно. Модуляция клеточной пролиферации опосредуется, вероятно, также малыми интерферирующими РНК, производными продуктов РНК-зависимой РНК-полимеразной активности *TERT*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Первоначально казалось, что действие ингибиторов теломеразной активности, независимо от их механизма, приводит к одному и тому же результату – укорачиванию теломер и последующей гибели клеток. Предполагается, что способность укорачивать теломеры, в первую очередь, можно использовать в терапии опухолей. Применению ингибиторов теломеразной активности должно предшествовать изучение их физико-химических свойств и специфичности действия, так как наиболее специфичные соединения будут, по-видимому, и менее токсичными.

Вполне вероятной представляется возможность неоднозначного ответа клеток на применение активаторов теломеразы. Различия в клеточном ответе могут быть связаны с тем, что разные клетки или обладают разными регуляторными механизмами поддержания способности к проли-

ферации в зависимости от типа и степени дифференцировки, или способны активировать такие механизмы. Особенно серьезные опасения возникают при трансдукции гена *hTERT*, прежде всего, потому, что экспрессия этого гена способна усиливать экспрессию других генов, участвующих в пролиферации клетки, а также, предположительно, “молчащего” гена *hTERT* клетки-хозяина. Таким образом, увеличение дозы этого гена может создать предпосылки для малигнизации. Необходимость в выработке строгих и надежных критериев безопасности применения активаторов теломеразы и трансдукции гена *hTERT* нуждается, по-видимому, в широком обсуждении.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Griffith J.D., Comeau L., Rosenfield S., et al. 1999. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*. **97** (4), 503–514.
2. Blachburn E.H. 1991. Structure and function of telomeres. *Nature*. **350**, 569–573.
3. Hayflick L. 1976. The cell biology of human aging. *N. Engl. J. Med.* **295**, 1302–1308.
4. Masutomi K., Yu E.Y., Khurts S., et al. 2003. Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell*. **114** (2), 241–253.
5. Зверева М.Э., Щербакова Д.М., Донцова О.А. 2010. Теломераза: структура, функции и пути регуляции активности. *Успехи биол. химии*. **50**, 155–202.
6. Жданов Д.Д., Коваленко Н.А., Хоробрых Т.В. и др. 2009. Теломеразная активность и ее связь с экспрессией транскрипционных вариантов гена *HSP90α* и гена каталитической субъединицы теломеразы при опухолевых заболеваниях желудка и кишечника. *Молекуляр. медицина*. **6**, 37–41.
7. Robart A.R., Collins K. 2010. Investigation of human telomerase holoenzyme assembly, activity, and processivity using disease-linked subunit variants. *J. Biol. Chem.* **285**, 4375–4386.
8. De Boeck G., Forsyth R.G., Praet M., et al. 2009. Telomere-associated proteins: cross-talk between telomere maintenance and telomere-lengthening mechanisms. *J. Pathol.* **217**, 327–344.
9. De Lange T. 2005. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.* **19**, 2100–2110.
10. Loayza D., De Lange T. 2003. POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature*. **423**, 1013–1018.
11. Smogorzewska A., van Steensel B., Bianchi A., et al. 2000. Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 1659–1668.
12. Azzalin C.M., Reichenbach P., Khoriauli L., et al. 2007. Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science*. **318**, 798–801.

13. Bollman F.M. 2008. The many faces of telomerase: merging extratelomeric effects. *Bio Essays* **30**, 728–732.
14. Mukherjee S., Firpo E.J., Wang Y., et al. 2011. Separation of telomerase function by reverse genetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **108**, E1363–E1371.
15. Sharma N.K., Reyes A., Green P., et al. 2012. Human telomerase acts as a hTR-independent reverse transcriptase in mitochondria. *Nucl. Acids Res.* **40** (2), 712–725.
16. Ram R., Uziel O., Eldan O., et al. 2009. Ionizing radiation up-regulates telomerase activity in cancer cell lines by post-translational mechanism via ras/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Clin. Cancer Res.* **15** (3), 914–923.
17. Büchner N., Zschauer T.-C., Lukosz M., Altschmied J., Haendeler J. 2010. Downregulation of mitochondrial telomerase reverse transcriptase induced by H₂O₂ is Src kinase dependent. *Exp. Gerontol.* **45** (7–8), 558–562.
18. Lee J., Sung Y.H., Cheong C., Choi Y.S., Jeon H.K., Sun W., et al. 2008. TERT promotes cellular and organismal survival independently of telomerase activity. *Oncogene*. **27**, 3754–3760.
19. Cifuentes-Rojas C., Shippen D.E. 2012. Telomerase regulation. *Mutat. Res.* **730**, 20–27.
20. Cairney C.J., Keith W.N. 2008. Telomerase redefined: integrated regulation of hTR and hTERT for telomere maintenance and telomerase activity. *Biochemie.* **90**, 13–23.
21. Kyo S., Takakura M., Fujiwara T., Inoue M. 2008. Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for diagnosis and treatment of human cancers. *Cancer Sci.* **99**, 1528–1538.
22. Zhu J., Zhao Y., Wang S. 2010. Chromatin and epigenetic regulation of the telomerase reverse transcriptase gene. *Protein Cell.* **1**, 22–32.
23. Smith L.L., Collier H.A., Roberts J.M. 2003. Telomerase modulates expression of growth-controlling genes and enhances cell proliferation. *Nat. Cell. Biol.* **5**, 474–479.
24. Bodnar A.G., Ouellette M., Frolkis M., et al. 1998. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*. **279**, 349–352.
25. Kim N.W., Piatyszek M.A., Prowse K.R., et al. 1994. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. **266**, 2011–2015.
26. Жданов Д.Д., Орлова Е.В. 2011. Ингибиторы функций теломер и теломеразы. *Молекуляр. медицина.* № 2, 3–17.
27. El-Daly H., Kull M., Zimmermann S., et al. 2005. Selective cytotoxicity and telomere damage in leukemia cells using the telomerase inhibitor BIBR1532. *Blood*. **105**, 1742–1749.
28. Stravopodis D.J., Margaritis L.H., Voutsinas G.E. 2007. Drug-mediated targeted disruption of multiple protein activities through functional inhibition of the Hsp90 chaperone complex. *Curr. Med. Chem.* **14**, 3122–3138.
29. Ahmed A., Tollefsbol T. 2001. Telomeres and telomerase: basic science implications for aging. *J. Am. Geriatrics Soc.* **49** (8), 1105–1109.
30. Crabbe L., Jauch A., Naeger C.M., et al. 2007. Telomere dysfunction as a cause of genomic instability in Werner syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **104** (7), 2205–2210.
31. Crabbe L., Verdun R.E., Haggblom C.I., Karlseder J. 2004. Defective telomere lagging strand synthesis in cells lacking WRN helicase activity. *Science*. **306** (5703), 1951–1953.
32. Allsopp R.C., Vaziri H., Patterson C., et al. 1992. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **89** (21), 10114–10118.
33. Vaziri H., Schächter F., Uchida I., et al. 1993. Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes. *Am. J. Hum. Genet.* **52** (4), 661–667.
34. Marrone A., Stevens D., Vulliamy T., et al. 2004. Heterozygous telomerase RNA mutations found in dyskeratosis congenita and aplastic anemia reduce telomerase activity via haploinsufficiency. *Blood*. **104** (13), 3936–3942.
35. Franco S., van de Vrugt H.J., Fernández P., et al. 2004. Telomere dynamics in Fancg-deficient mouse and human cells. *Blood*. **104** (13), 3927–3935.
36. Nelson N.D., Bertuch A.A. 2012. Dyskeratosis congenita as a disorder of telomere maintenance. *Mutat. Res.* **730** (1–2), 43–51.
37. Armanios M., Chen J.L., Chang Y.P., et al. 2005. Haploinsufficiency of telomerase reverse transcriptase leads to anticipation in autosomal dominant dyskeratosis congenital. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102** (44), 15960–15964.
38. Marrone A., Dokal I. 2004. Dyskeratosis congenita: molecular insights into telomerase function, ageing and cancer. *Exper. Rev. Mol. Med.* **6** (26), 1–23.
39. Demissie S., Levi D., Bendjamine E.J., et al. 2006. Insulin resistance, oxidative stress, hypertension, and leukocyte telomere length in men from the Framingham heart study. *Aging. Cell.* **5**, 325–330.
40. Starr J.M., McGurn B., Harris S.E., et al. 2007. Association between telomere length and heart disease in a narrow age cohort of older people. *Exp. Gerontol.* **42**, 571–573.
41. Valdes A.M., Richards J.B., Gardner J.P., et al. 2007. Telomere length in leukocytes correlates with bone mineral density and is shorter in women with osteoporosis. *Osteoporos. Int.* **18**, 1203–1210.
42. Harley C.B. 2005. Telomerase therapeutics for degenerative diseases. *Curr. Mol. Med.* **5**, 205–211.
43. Valenzuela H.F., Effros R.B. 2002. Divergent telomerase patterns in human CD4 and CD8 T cells following repeated encounters with the same antigenic stimulus. *Clin. Immunol.* **105**, 117–125.
44. Harley C.B. 2002. Telomerase is not an oncogene. *Oncogene*. **21**, 494–502.

45. Natarajan S., Chen Z., Wancewicz E.V., et al. 2004. Telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA and telomerase RNA (hTR) as targets for downregulation of telomerase activity. *Oligonucleotides*. **14**, 263–273.
46. Konnikova L., Simeone M.C., Kruger M.M., et al. 2005. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) regulates human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in human cancer and primary cells. *Cancer Res*. **65**, 6516–6520.
47. Soder A.I., Hoare S.F., Muir S., et al. 1997. Amplification, increased dosage and in situ expression of the telomerase RNA gene in human cancer. *Oncogene*. **14**, 1013–1021.
48. Saretzki G., Petersen S., Petersen I., et al. 2002. *hTERT* gene dosage correlates with telomerase activity in human lung cancer cell lines. *Cancer Lett*. **176**, 81–91.
49. Хавинсон В.Х., Шатаева Л.К., Чернова А.А. 2003. Влияние регуляторных пептидов на транскрипцию генов. *Бюлл. Эксп. Биол. Мед.* **136** (9), 328–330.
50. Guilleret I., Yan P., Grange F., et al. 2002. Hypermethylation of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene correlates with telomerase activity. *Int. J. Cancer*. **101**, 335–341.
51. Renaud S., Loukinov D., Abdullaev Z., et al. 2007. Dual role of DNA methylation inside and outside of CTCF-binding regions in the transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene. *Nucl. Acids Res*. **35** (4), 1245–1256.
52. Renaud S., Loukinov D., Bosman F.T., et al. 2005. CTCF binds the proximal exonic region of hTERT and inhibits its transcription. *Nucl. Acids Res*. **33**, 6850–6860.
53. Wojtyla A., Gladych M., Rubis B. 2011. Human telomerase activity regulation. *Mol. Biol. Rep.* **38** (5), 3339–3349.
54. Прохорчук А.В., Рузов А.С. 2000. Метилирование генома и его роль в функционировании эукариотического организма. *Генетика*. **36** (11), 1475–1486.
55. Devreux T.R., Horikawa I., Anna C.H., et al. 1999. DNA methylation analysis of the promoter region of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene. *Cancer Res*. **59**, 6087–6090.
56. Jakob S., Altschmied J., Haendeler J. 2009. Shping 2 different cellular localizations a potential new player in aging processes. *AGING*. **1** (7), 664–668.
57. Santos J.H., Meyer J.N., Van Houten B. 2006. Mitochondrial localization of hTERT as a determinant for hydrogen peroxide-induced mtDNA damage and apoptosis. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 1757–1768.
58. Tajrishi M.M., Tuteja R., Tuteja N. 2011. Nucleolin. The most abundant multifunctional phosphoprotein of nucleolus. *Commun. Integ. Biol.* **4** (3), 267–275.
59. Khurts S., Masutomi K., Delgermaa L., et al. 2004. Nucleolin interact with telomerase. *J. Biol. Chem.* **279**, 51508–51515.
60. Ha G.H., Kim H.S., Go H., et al. 2012. Tankyrase1 function at telomeres and during mitosis is regulated by Polo-like kinase 1-mediated phosphorylation. *Cell. Death. Differ.* **19** (2), 321–332.
61. Gao J., Zhang J., Long Y., et al. 2011. Expression of tankyrase 1 in gastric cancer and its correlation with telomerase activity. *Pathol. Oncol. Res.* **17** (3), 685–690.
62. Tang B., Wang J., Fang J., Jiang B., et al. 2012. Expression of TNKS1 is correlated with pathologic grade and Wnt/ β -catenin pathway in human astrocytomas. *J. Clin. Neurosci.* **19** (1), 139–143.
63. Karner C.M., Merkel C.E., Dodge M., et al. 2010. Tankyrase is necessary for canonical Wnt signaling during kidney development. *Dev. Dyn.* **239** (7), 2014–2023.
64. Zhang H., Yang M.N., Zhao J.J., et al. 2010. Inhibition of tankyrase-1 in human gastric cancer cells enhances telomere shortening by telomerase inhibitors. *Oncol. Res.* **24** (4), 1059–1065.
65. Sbodio J.I., Lodish H.F., Chi N.W. 2002. Tankyrase-2 oligomerizes with tankyrase-1 and binds to both TRF1 (telomere-repeat-binding factor1) and IRAP (insulin-responsive aminopeptidase). *Biochem. J.* **361** (Pt3), 451–459.
66. Chang Y.J., Hsiao S.J., Yver D., et al. 2008. Tankyrase-1 and tankyrase-2 are essential but redundant for mouse embryonic development. *PLoS One*. **3** (7), e2639.
67. Stefanou N., Papanikolaou V., Furukawa Y., et al. 2010. Leptin as a critical regulator of hepatocellular carcinoma development through modulation of human telomerase reverse transcriptase. *BMC Cancer*. **10**, 442–452.
68. Sikand K., Kaul D., Varma N. 2006. Receptor Ck-dependent signaling regulates hTERT gene transcription. *BMC Cell. Biol.* **7**, 2–14.
69. Fajas L., Debril M.B., Auwerx J. 2001. Peroxisome proliferators-activated receptor- γ : from adipogenesis to carcinogenesis. *J. Mol. Endocrinol.* **27**, 1–9.
70. Parish S.T., Kim S., Sekhon R.K., et al. 2010. Adenosine deaminase modulation of telomerase activity and replicative senescence in human CD8 T lymphocytes. *J. Immunol.* **184**, 2847–2854.
71. Ren Sh., Mandani K., Boedeker A.L., et al. 2007. Regulation of telomerase in *Arabidopsis* by BT2, an apparent target of telomerase activator 1. *Plant Cell*. **19**, 23–31.
72. Хавинсон В.Х., Бондарев И.Э., Бутюгов А.А. 2003. Пептид эпиталон индуцирует теломеразную активность и элонгацию теломер в соматических клетках человека. *Бюлл. Эксп. Биол. Мед.* **135** (6), 692–695.
73. Хавинсон В.Х., Бондарев И.Э., Бутюгов А.А., Смирнова Т.Д. 2004. Пептид способствует преодолению лимита деления соматических клеток. *Бюлл. Эксп. Биол. Мед.* **137** (5), 573–576.
74. Zhu J., Lee S., Ho M.K., et al. 2010. *In vitro* intestinal absorption and first-pass intestinal and hepatic metabolism of cycloastragenol, a potent small molecule telomerase activator. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **25** (5), 477–486.

75. Roth A., Yssel H., Pene J., et al. 2003. Telomerase levels control the lifespan of human T lymphocytes. *Blood*. **102**, 849–857.
76. Bodnar A.G., Kim N.W., Effros R.B., Chiu C.P. 1996. Mechanism of telomerase induction during T cell activation. *Exp. Cell. Res.* **228**, 58–64.
77. Fauci S.R., Jamieson B.D., Chin A.C., et al. 2008. Telomerase-based pharmacologic enhancement of antiviral function of human CD8+ T lymphocytes. *J. Immunol.* **181** (10), 7400–7406.
78. Dagarag M., Evazyan T., Rao N., Effros R.B. 2004. Genetic manipulation of telomerase in HIV-specific CD8+ T cells: enhanced antiviral functions accompany the increased proliferative potential and telomere length stabilization. *J. Immunol.* **173**, 6303–311.
79. Zhao Z., Wang W., Wang F., et al. 2009. Effects of astragaloside IV on heart failure in rats. *Chin. Med.* **4**, 6–9.
80. Lv L., Wu S.Y., Wang G.F., et al. 2010. Effect of astragaloside IV on hepatic glucose-regulating enzymes in diabetic mice induced by a high-fat diet and streptozotocin. *Phytother. Res.* **24** (2), 219–224.
81. Zhang W.D., Chen H., Zhang C., et al. 2006. Astragaloside IV from *Astragalus membranaceus* shows cardioprotection during myocardial ischemia *in vivo* and *in vitro*. *Planta Med.* **72** (1), 4–8.
82. Harley C.B., Liu W., Blasco M., et al. 2011. A natural product telomerase activator as part of a health maintenance program. *Rejuvenation Res.* **14** (1), 45–56.
83. de Jesus B.B., Schneeberger K., Vera E., et al. 2011. The telomerase activator TA-65 elongates short telomeres and increases health span of adult/old mice without increasing cancer incidence. *Aging. Cell.* **10** (4), 604–621.
84. Chan M.N., El Touny L.H., Yagadeesh S., Baneryee P.P. 2007. Physiologically achievable concentration of genistein enhance telomerase activity in prostate cancer cells via the activation of STAT3. *Carcinogenesis*. **28** (11), 2282–2290.
85. Lanzilli G., Euggetta M.P., Tricarico M., et al. 2006. Resveratrol down-regulates the growth and telomerase activity of breast cancer cells *in vitro*. *Int. J. Oncol.* **28**, 642–648.
86. Pears V.P., Sherrell J., Lou Z., et al. 2008. Immortalization of epithelial progenitor cells mediated by resveratrol. *Oncogene*. **27**, 2365–2374.
87. Xia L., Wang X.X., Hu X.S., et al. 2008. Resveratrol reduces endothelial progenitor cells senescence through augmentation of telomerase activity by Akt-dependent mechanism. *Br. J. Pharmacol.* **155**, 387–394.
88. Satoh M., Minami Y., Takahashi Y., et al. 2009. Effect of intensive lipid-lowering therapy on telomere erosion in endothelial progenitor cells obtained from patients with coronary artery disease. *Clin. Sci. (Lond)*. **116** (11), 827–835.
89. Sprouse A.A., Steding C.E., Herbert B.S. 2012. Pharmaceutical regulation of telomerase and its clinical potential. *J. Cell. Mol. Med.* **16** (1), 1–7.
90. Stenderup K., Justesen J., Clausen C., Kassem M. 2003. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*. **33**, 919–926.
91. Zimmermann S., Voss M., Kaiser S., et al. 2003. Lack of telomerase activity in human mesenchymal stem cells. *Leukemia*. **17**, 1146–1149.
92. Banfi A., Muraglia A., Dozin B., et al. 2000. Proliferation kinetics and differentiation potential of *ex vivo* expanded human bone marrow stromal cells: implications for their use in cell therapy. *Exp. Hematol.* **28**, 707–755.
93. DiGirolamo C.M., Stokes D., Colter D., et al. 1999. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br. J. Haematol.* **107**, 275–281.
94. Böcker W., Yin Zh., Drosse I., et al. 2008. Introducing a single-cell-derived human mesenchymal stem cell line expressing hTERT after lentiviral gene transfer. *J. Cell. Mol. Med.* **12** (4), 1347–1359.
95. Huang G., Zheng Q., Sun J., et al. 2008. Stabilization of cellular properties and differentiation multipotential of human mesenchymal stem cells transduced with hTERT gene in a long-term culture. *J. Cell. Biochem.* **103**, 1256–1269.
96. Honma T., Honmou O., Iihoshi S., et al. 2006. Intravenous infusion of immortalized human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat. *Exp. Neurol.* **199** (1), 56–66.
97. Huang G.P., Pan Z.J., Huang J.P., et al. 2008. Proteomic analysis of human bone marrow mesenchymal stem cells transduced with human telomerase reverse transcriptase gene during proliferation. *Cell Prolif.* **41**, 625–644.
98. Garcha-Escudero V., Garcha-Gomez A., Gargini R., et al. 2010. Prevention of senescence progression in reversibly immortalized human ensheathing glia permits their survival after deimmortalization. *Mol. Therapy*. **18** (2), 394–403.
99. Huang Q., Chen M., Liang S., et al. 2007. Improving cell therapy – experiments using transplanted telomerase-immortalized cells in immunodeficient mice. *Mech. Ageing Dev.* **128** (1), 25–30.
100. Song J.S., Murase N., Demetris A.J., et al. 2007. Protection from acute cellular injury using sleeping beauty mediated telomerase gene transfer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **363** (2), 253–256.
101. Oh H., Taffet G.E., Youker K.A., et al. 2001. Telomerase reverse transcriptase promotes cardiac muscle cell proliferation, hypertrophy, and survival. *PNAS*. **98**, 10308–10313.
102. Masutomi K., Possemato R., Wong J.M., et al. 2005. The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102** (23), 8222–8227.
103. Geserick C., Tejera A., Gonzalez-Suarez E., et al. 2006. Expression of mTert in primary murine cells links the growth-promoting effects of telomerase to transforming

ВОЗМОЖНОСТИ И ЭФФЕКТЫ АКТИВАЦИИ ТЕЛОМЕРАЗЫ

- growth factor-beta signaling. *Oncogene*. **25**, 4310–4319.
104. Astandi S.E., Alson S., Tietze M.K., et al. 2002. Constitutive telomerase expression promotes mammary carcinomas in aging mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99** (12), 8191–8196.
 105. Kipling D., Cooke H.J. 1990. Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature*. **347** (6291), 400–402.
 106. Blasco M.A. 1997. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell*. **91**, 25–34.
 107. Greenberg R.A., Allsopp R.C., Chin L., et al. 1998. Expression of mouse telomerase reverse transcriptase during development, differentiation and proliferation. *Oncogene*. **16**, 1723–1730.
 108. Park J.I., Venteicher A.S., Hong J.Y., et al. 2009. Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin. *Nature*. **460**, 66–72.
 109. Barker N., Hurlstone A., Musisi H., Miles A., Bienz M., Clevers H. 2001. The chromatin remodelling factor Brg-1 interacts with beta-catenin to promote target gene activation. *EMBO J*. **20**, 4935–4943.
 110. Okamoto N., Yasukawa M., Nguyen C., Kasim V., Maida Y., Possemato R., et al. 2011. Maintenance of tumor initiating cells of defined genetic composition by nucleostemin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **108**, 20388–20393.
 111. Hoffmeyer K., Raggioli A., Rudloff S., et al. 2012. Wnt/beta-catenin signaling regulates telomerase in stem cells and cancer cells. *Science*. **336**, 1549–1554.
 112. Shkreli M., Sarin K.Y., Pech M.F., et al. 2012. Reversible cell-cycle entry in adult kidney podocytes through regulated control of telomerase and Wnt signaling. *Nat. Med.* **18**, 111–119.
 113. Bernardes de Jesus B., Vera E., Schneeberger K., et al. 2012. Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer. *EMBO Mol. Med.* **4**, 691–704.
 114. Park J.I., Venteicher A.S., Hong J.Y. 2009. Telomerase modulates Wnt signaling by association with target gene chromatin. *Nature*. **460** (7251), 66–72.
 115. Lee J., Sung Y.H., Cheong C., et al. 2008. TERT promotes cellular and organismal survival independently of telomerase activity. *Oncogene*. **27** (26), 3754–3760.
 116. Rahman R., Latonen L., Wiman K.G. 2005. hTERT antagonizes p53-induced apoptosis independently of telomerase activity. *Oncogene*. **24** (8), 1320–1327.

ЭФФЕКТ АКТИВАЦИИ ТЕЛОМЕРАЗЫ И МОДУЛЯЦИИ ДЛИНЫ ТЕЛОМЕР ХИМИЧЕСКИМИ СОЕДИНЕНИЯМИ РАСТЕНИЙ

Березуцкий М.А. Дурнова Н.А. Романтеева Ю.В. Шереметьева А.С.
Комарова Е.Э. Матвиенко У.А. Зенина И.В.

ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского Минздрава России», Саратов, e-mail: berezutsky61@mail.ru

В обзоре представлен анализ экспериментальных и отчасти клинических данных по исследованию эффекта активации фермента теломеразы и модуляции длины теломер химическими соединениями и экстрактами растений. Укорочение теломер считается в настоящее время важнейшим фактором, ускоряющим клеточное старение и приводящим к возрастной дисфункции всех тканей и органов. Удлинять теломеры способен фермент теломераза. В связи с этим активация теломеразы и модуляция длины теломер являются потенциальной стратегией в процессе реверсирования старения человека. Исследования были проведены на культурах клеток различных линий, лабораторных животных и, частично, на добровольцах. Результаты показали, что природные фармакологические средства обладают широким набором эффектов: одновременной активации теломеразы и модуляции длины теломер, активации теломеразы без влияния на длину теломер, увеличения длины теломер без активации теломеразы, ингибирования и активации теломеразы одним и тем же соединением в зависимости от дозы. В связи с тем, что активация теломеразы тесно связана с процессами канцерогенеза, в обзоре особое внимание уделяется природным средствам, обладающим бинарным действием – способностью активировать теломеразу и одновременно ингибировать процессы канцерогенеза. Делается вывод, что полученные результаты открывают хорошие перспективы создания новых безопасных антивозрастных препаратов.

THE EFFECT OF TELOMERASE ACTIVATION AND MODULATION OF TELOMERE LENGTH BY CHEMICAL COMPOUNDS OF PLANTS

Berezutsky M.A. Durnova N.A. Romanteeva Yu.V. Sheremetyeva A.S. Komarova E.E
Matvienko U.A. Zenina I.V.

FGBOU VO «Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky Ministry of Health of Russia», Saratov, e-mail: berezutsky61@mail.ru

This review presents an analysis of experimental and partly clinical data on the study of the effect of telomerase enzyme activation and telomere length modulation by chemical compounds and extracts of plants. Telomere shortening is now considered to be the most important factor accelerating cellular aging and leading to age-related dysfunction of all tissues and organs. The telomerase enzyme is able to elongate telomeres. Therefore, telomerase activation and modulation of telomere length is a potential strategy in the process of human aging reversal. The studies have been carried out on cell cultures of various cell lines, laboratory animals and, in part, on volunteers. The results showed that natural pharmacological agents have a wide range of effects: simultaneous activation of telomerase and modulation of telomere length, activation of telomerase without affecting telomere length, increasing telomere length without activating telomerase, and inhibition and activation of telomerase by the same compound in a dose-dependent manner. Since telomerase activation is closely connected with the processes of carcinogenesis, special attention in this review is paid to natural remedies with a binary effect- the ability to activate telomerase and inhibit carcinogenesis at the same time. It is concluded that the results open up good prospects for design and development of new safe anti-aging medicines.

В последние десятилетия значительно возрос интерес к работам в области реверсирования процессов старения человека и создания эффективных антивозрастных препаратов [1]. Народная медицина на протяжении нескольких тысячелетий занималась

поиском и проверкой на медицинской практике лекарственных растений, замедляющих процессы старения. К настоящему времени у ряда растений, применяемых в народной медицине, экспериментально установлено наличие различных антивозрастных эффектов, а на основе отдельных видов созданы уникальные препараты, влияющие на процессы старения. В частности, не только лабораторные, но и клинические исследования подтвердили наличие у некоторых сборов традиционной китайской медицины свойств более эффективно, чем применяемые в настоящее время препараты, воздействовать на протекание таких неизлечимых возрастных нейродегенеративных заболеваний, как болезни Альцгеймера и Паркинсона [2]. Хорошие перспективы в разработке методов терапии этих сенильных нейродегенеративных заболеваний показали химические соединения, содержащиеся в истоде тонколистной (*Polygala tenuifolia* Willd.) [3] и орхидее гастродии высокой (*Gastrodia elata* Blume) [4]. Однако еще десятки лекарственных растений традиционной медицины могут рассматриваться в качестве кандидатов, на основе которых будут созданы новые эффективные антивозрастные препараты.

Такие важнейшие процессы функционирования клеток, как их способность делиться, дифференцироваться и регенерировать, во многом определяются длиной концевых участков хромосом – теломер, которые обеспечивают их целостность и стабильность. В большинстве нормальных клеток теломеры становятся короче с каждым клеточным делением на 50–200 пар нуклеотидов из-за проблемы репликации концов, что в итоге приводит к необратимой остановке клеточного цикла [5]. Укорочение теломер считается в настоящее время важнейшим фактором, ускоряющим клеточное старение и приводящим к возрастной дисфункции всех тканей и органов. Исследования показали, что короткая длина теломер тесно связана с сердечно-сосудистыми заболеваниями, инсультом, раком, артритом, остеопорозом, катарактой, диабетом 2-го типа, психическими заболеваниями и деменцией [6]. Имеются интересные данные о связи употребления наркотиков и укорочения теломер [7]. Установлено также, что от длины теломер зависят сложность и эффективность лечения некоторых возрастных заболеваний, в частности возрастной макулярной дегенерации [8]. В связи с этим изучение процессов модуляции длины теломер представляет большой теоретический и практический интерес для исследователей различных областей биологии и медицины, в первую очередь таких, как геронтология и онкология.

Удлинять теломеры способен фермент теломеразы – специализированный рибонуклеопротеиновый комплекс, важнейшим компонентом которого является теломеразная обратная транскриптаза человека (hTERT), катализирующая синтез новых теломерных повторов на основе шаблона РНК. Установлено также, что hTERT выполняет многие нетеломерные функции, которые тоже непосредственно связаны с процессами старения

клеток: защищает митохондриальную ДНК, увеличивает мембранный потенциал митохондрий, снижает уровень АФК, ингибирует индукцию апоптоза. Показано, что теломеразная обратная транскриптаза увеличивает пролиферативный потенциал стволовых клеток независимо от его функции удлинения теломер [9]. Активность теломеразы является высокой на ранних стадиях внутриутробного развития человека и значительно ограничена в большинстве нормальных клеток взрослого человека, кроме мужских половых клеток и активированных лейкоцитов [10]. Экспериментально установлено, что повышение активности теломеразы можно индуцировать с помощью ряда экзогенных химических соединений, как синтетических, так и природного происхождения [11]. В связи с этим активация теломеразы и модуляция длины теломер являются потенциальной стратегией в процессе реверсирования старения человека. Однако теломераза и уровень ее экспрессии потенциально тесно связаны с побочными отрицательными эффектами. Известно, что активность теломеразы и особенно ее субъединицы hTERT в раковых клетках в несколько раз выше, чем в нормальных [12].

В предыдущем обзоре [13] мы подробно описывали способность экстракта корня астрагала перепончатого – *Astragalus membranaceus* (Fisch. ex Link) Bunge, его отдельных компонентов (полисахариды, астрагалозид, циклоастрогенол, алкалоиды), а также созданного на их основе препарата ТА-65 (Telomerase activator-65) активировать теломеразу и увеличивать длину теломер. Данный эффект был получен не только в результате большой серии экспериментов на культурах клеток, но и в двух клинических исследованиях. Особенно важно, что экстракт *Astragalus membranaceus*, а также отдельные его компоненты одновременно показали способность вызывать индукцию апоптоза, остановку клеточного цикла, подавление пролиферации, ингибирование миграции, инвазии и ангиогенеза раковых клеток [14]. Полученные результаты делают актуальным поиск других соединений природного происхождения с подобным бинарным действием, а также соединений, способных модулировать длину теломер без увеличения активности теломеразы. Экспериментальные исследования последних лет позволили выявить подобные эффекты у ряда химических соединений, экстрактов и сборов растений.

Эфирные масла

В эксперименте на клетках линии K562 (хроническая миелогенная лейкемия человека) было изучено действие 31 вида эфирных масел, выделенных из различных растений. Клетки подвергали воздействию перекиси водорода, что приводило в отсутствие добавления масел к уменьшению длины теломер примерно на 40%. Параллельно клетки обрабатывались маслами в субтоксической концентрации (0,005%) в течение 48 часов. Результаты показали, что воздействие эфирного масла базилика обыкновенного (*Ocimum basilicum* L.) (содержит 11

компонентов) привело к восстановлению длины теломер примерно на 70% по сравнению с контролем. Особый интерес вызывает тот факт, что данный эффект был связан не с повышением экспрессии гена hTERT, кодирующего каталитическую субъединицу теломеразы, а с подавлением супрессора длины теломер TRF-1 (TERF-1). Таким образом, увеличение длины теломер было достигнуто без увеличения активности теломеразы и связанного с этим повышением риска индуцирования канцерогенеза [15]. Кроме того, эфирное масло базилика обыкновенного обладает подтвержденной противораковой активностью. Оно показало сильный цитотоксический эффект в экспериментах на клеточных линиях рака шейки матки человека (HeLa), эпителиальной карциномы гортани человека (HEp-2), эмбриональных фибробластов мыши (NIH 3T3) [16], инвазивной аденокарциномы протоков молочной железы человека (MCF-7), аденокарциномы молочной железы человека (MDA-MB-231) и глиобластомы человека (U-87 MG) [17].

Полисахариды

Полисахариды дягиля китайского (*Angelica sinensis* (Oliv.) Diels), который применяется в Китае не только как лекарственное, но и как пищевое растение, исследовали на мышах, которых подвергли рентгеновскому облучению. Это приводило к уменьшению длины теломер (определяли при помощи саузерн-блоттинга) и снижению активности теломеразы (определяли при помощи TRAP-PCR) в гемопоэтических стволовых клетках. Пероральное введение во время облучения полисахаридов значительно ингибировало уменьшение длины теломер и повышало активность теломеразы [18]. При этом полисахариды данного растения в других экспериментах индуцировали апоптоз клеток рака молочной железы [19].

В эксперименте на мышах с моделью подострого старения, которая была индуцирована введением D-галактозы, полисахариды цистанхе пустынного (*Cistanche deserticola* Y.C. Ma) достоверно повысили активность теломеразы в клетках сердца и головного мозга [20]. Водный экстракт этого растения, богатый полисахаридами, оказался эффективен в профилактике колоректального рака [21]. Полисахариды другого паразитического растения – цинномория джунгарского (*Synnotrium songaricum* Ruprecht) в сходных по методике экспериментах, где модель старения создавалась при помощи введения D-галактозы, значительно повысили активность теломеразы в клетках семенников [22], а также увеличили длину теломер (определяли методом гибридизации и хемилюминесценции) в клетках крови и мозга мышей [23].

Флавоноиды

Флавоноиды горянки коротконогой (*Epimedium brevicornu* Maxim.) в эксперименте на эмбриональных диплоидных фибробластических клетках легких человека (2BS) проявили способность удлинять теломеры (определяли при помощи метода саузерн-блоттинга

теломерных рестрикционных фрагментов), но при этом не вызывали активации теломеразы (определяли методом TRAP) [24]. Сумма флавоноидов молочая приземистого (*Euphorbia humifusa* Wild.) при воздействии на клетки половых органов и мозга старых мышей вызвала активизацию в них теломеразы [25], а пренилированный халкон – паратокарпин E, выделенный из этого растения, продемонстрировал значительную цитотоксичность (IC₅₀ при 19,6 μ M) в отношении клеток линии MCF-7 (инвазивная аденокарцинома протоков молочной железы человека) [26].

Интересно, что у некоторых соединений данной группы конечный эффект зависит от концентрации вещества. Примером является изофлавоон генистеин, содержащийся во многих представителях семейства бобовых и других растениях. Высокие концентрации этого соединения блокируют активность теломеразы, а низкие, наоборот, повышают. В частности, в эксперименте на клетках рака предстательной железы человека линий DU-145 и LNCaP низкие и физиологически достижимые концентрации генистеина – 0,5 и 1 мкМ – повышали активность теломеразы примерно в 1,5 раза, а при концентрациях 10–100 мкМ она значительно снижалась. Повышение активности теломеразы в данном эксперименте не влияло на длину теломер [27].

Другие соединения

В группе тритерпеновых гликозидов выраженное влияние на теломеразу и длину теломер оказывает гинзенозид Rg1, содержащийся в корнях женьшеня настоящего (*Panax ginseng* С.А. Меу.). В двух экспериментах на клетках фибробластов человека, искусственное старение которых было вызвано обработкой трет-Бутилгидропероксидом [28] и 8-метоксипсораленом совместно с воздействием ультрафиолета [29], предварительная обработка гинзенозидом Rg1 приводила к активации теломеразы и замедлению укорочения теломер.

Фракция тритерпенов, выделенная из центеллы азиатской (*Centella asiatica* (L.) Urb.), увеличила активность теломеразы (измеряли с помощью набора PCR-ELISA (Sigma-Aldrich)) в мононуклеарных клетках периферической крови человека в 8,8 раза по сравнению с необработанными клетками. Интересно, что это оказалось значительно выше подобных показателей, полученных в данном эксперименте, у препарата «ТА-65», о котором мы упоминали во введении [30]. Экстракт этого растения ингибировал на 50% укорочение теломер в культуре клеток млекопитающих линий НЕК293 и 3Т3L1 по сравнению с контролем, а также увеличил среднюю продолжительность жизни самцов *Drosophila melanogaster* на 23,9%, а самок – на 12,6%. В эксперименте на клетках рака легкого человека линии А549 тритерпеноиды из центеллы азиатской – азиатиковая кислота, мадекасская

кислота и азиатикозид – в нетоксических концентрациях ингибировали индуцированную ионизирующим излучением миграцию и инвазию клеток [31].

Экстракты лекарственных растений

В ряде работ приводятся сведения лишь по экстрактам растений; при этом пока не установлены группа веществ или конкретное соединение из их состава, непосредственно отвечающие за выявленные эффекты. Экстракт корней цинанхума Бунге (*Cynanchum bungei* Desne.) значительно увеличил активность теломеразы в клетках мышей с моделью старения, индуцированного введением D-галактозы [32], а два эписмера из этого растения – цинанбунгейгенины С и D – являются перспективными соединениями при лечении медуллобластомы и других Hh-зависимых злокачественных новообразований [33]. Экстракт корневища купены сибирской (*Polygonatum sibiricum* Delar. ex Redoute) повысил активность теломеразы в клетках гонад и мозга мышей с моделью искусственного старения [34]. При этом полисахариды, содержащиеся в большом количестве в экстракте этого растения, ингибировали процессы канцерогенеза в экспериментах на клетках линии RAW264.7 [35]. В исследовании *in vitro* на клетках линии HeLa экстракт корней витании снотворной (*Withania somnifera* (L.) Dunal) в концентрации 10–50 мг / мл повысил активность теломеразы на 45% [36]. Корни витании снотворной при этом считаются одним из лучших природных средств для профилактики и лечения различных форм рака; причем при терапии рака предстательной железы и легких хороший эффект отмечается даже на поздних стадиях. Экстракт плодов терминалии хебула (*Terminalia chebula* Retz.) в эксперименте на клетках линии HEK-N/F показал эффект ингибирования процесса укорочения теломер. В частности, не обработанные экстрактом клетки в процессе культивирования уменьшили теломеры с 12,0 тыс. пар нуклеотидов до 7,9 тыс. пар, а в клетках, которые непрерывно обрабатывали экстрактом, теломеры уменьшились лишь до 9,6 тыс. пар [37]. Экспериментальные исследования показали, что экстракт плодов этого растения обладает антиканцерогенной активностью при карциноме [38], раке толстой кишки [39], груди, предстательной железы [40] и др.

Значительного увеличения средней длины теломер (28 кр по сравнению с 22 кр в контрольной группе ($p < 0,05$)) удалось добиться при использовании экстракта травы портулака огородного (*Portulaca oleracea* L.) при введении дозы 10 мг/кг в день самцам мышей 3-месячного возраста; активность теломеразы также была увеличена ($p < 0,05$) [41]. Экстракт стеблей ункаррии китайской (*Uncaria sinensis* (Oliv.) Navil.) ингибировал возрастное укорочение теломер у клеток линии HEK-N/F; при этом непрерывное введение данного экстракта в дозе 3 мкг/мл привело к увеличению продолжительности жизни этих клеток в культуре на 201% [42]. Экстракт листьев гинкго двулопастного (*Ginkgo biloba* L.) в дозе 25

мг/л значительно ($p < 0,05$) увеличил активность теломеразы в эндотелиальных клетках-предшественниках через сигнальный путь PI3k/Akt [43].

Сборы лекарственных растений

Были получены данные по сбору, применяемому в традиционной китайской медицине, – «Qilianshupi» (4 компонента). Исследования проводились на крысах линии Wistar, которым была создана модель хронического атрофического гастрита, считающегося предраковым заболеванием желудочно-кишечного тракта. Это привело к уменьшению средней длины теломер в клетках слизистой оболочки желудка (определяли методом гибридизации и хемилюминесценции) на 10 kbp и сильному повышению активности теломеразы (измеряли с помощью набора Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA PLUS (Roche)) по сравнению с нормальной группой. В группе, которая при этом получала высокую дозу сбора (2 г/мл) в течение 15 недель, было отмечено сильное ингибирование укорочения теломер; оно составило всего 2 kbp по сравнению с нормальной группой. Активность теломеразы при этом была снижена и незначительно отличалась от показателей нормальной группы [44].

Особый интерес представляют клинические исследования индийского омолаживающего сбора «Amalaki Rasayana» (3 компонента). Для исследования были выбраны 116 здоровых, некурящих и не употребляющих алкоголь мужчин-добровольцев в возрасте от 45 до 60 лет. Они принимали «Amalaki Rasayana» по 45 г раз в день на протяжении 45 дней. На 0-й, 45-й и 90-й день в мононуклеарных клетках периферической крови анализировали активность теломеразы (метод TRAP) и длину теломер (количественный ПЦР-метод). Результаты показали значительное увеличение ($p < 0,001$) активности теломеразы по сравнению с группой, принимавшей плацебо. Наибольшее увеличение наблюдалось у людей в возрасте 45–52 года. При этом не было зафиксировано изменения длины теломер, что, по мнению авторов исследования [45], может быть связано с коротким периодом наблюдения (90 дней), в то время как данный состав следует применять в течение длительного периода времени.

Заключение

Таким образом, эксперименты на культурах клеток, лабораторных животных и отдельные клинические исследования позволили выявить значительное число химических соединений, а также экстрактов и сборов растений, которые обладают свойствами влиять на активность теломеразы и длину теломер. Интересно, что при этом они продемонстрировали широкий и разнообразный спектр эффектов: одновременной активации теломеразы и модуляции длины теломер, активации теломеразы без влияния на длину теломер, увеличения длины теломер без активации теломеразы, ингибирования и активации теломеразы одним и тем же соединением в зависимости от дозы. Важно, что многие из этих средств показали

различные эффекты ингибирования процессов канцерогенеза. Подобное бинарное действие природных соединений делает возможным использование природных модуляторов теломеразы в различных областях медицины и, в частности, открывает перспективы создания новых безопасных антивозрастных препаратов для улучшения качества и продолжительности жизни человека.

Список литературы

1. Gu C., Yang X., Huang L. Cistanches Herba: A Neuropharmacology Review. *Frontiers in Pharmacology*. 2016. vol. 7. P. 289. DOI: 10.3389/fphar.2016.00289.
2. Березуцкий М.А., Дурнова Н.А., Андропова Т.А., Синичкина О.В. Болезнь Альцгеймера: экспериментальные и клинические исследования нейробиологических эффектов природных фармакологических средств китайской медицины (обзор литературы) // *Успехи геронтологии*. 2020. Т. 33. № 2. С. 273-281. DOI: 10.34922/АЕ.2020.33.2.008.
3. Березуцкий М.А., Дурнова Н.А., Сигарёва Л.Е. Нейробиологические эффекты тенуигенина и перспективы его применения в терапии болезней Альцгеймера и Паркинсона (обзор литературы) // *Успехи геронтологии*. 2021. Т. 34. № 2. С. 210-216. DOI: 10.34922/АЕ.2021.34.2.004.
4. Березуцкий М.А., Дурнова Н.А., Романтеева Ю.В. Нейробиологические эффекты гастродина и возможности его использования в неврологии и психиатрии // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2022. Т. 122. № 8. С. 27-34. DOI: 10.17116/jnevro202212208127.
5. De Lange T. Shelterin-Mediated Telomere Protection. *Annual Review of Genetics*. 2018. vol. 52. P. 223–247. DOI: 10.1146/annurev-genet-032918-021921.
6. Willeit P., Raschenberger J., Heydon E.E., Tsimikas S., Haun M., Mayr A., Weger S., Witztum J.L., Butterworth A.S., Willeit J., Kronenberg F., Kiechl S. Leucocyte telomere length and risk of type 2 diabetes mellitus: new prospective cohort study and literature-based meta-analysis. *PLoS One*. 2014. vol. 9. № 11. P. e112483. DOI: 10.1371/journal.pone.0112483.
7. Vakonaki E., Tzatzarakis M., Tsiminikaki K., Nathena D., Fragkiadaki P., Kalliantasi K., Kanaki K., Vaki G., Plaitis S., Tsoukalas D., Alegakis A., Spandidos D.A., Tsatsakis A. Effect of chronic and heavy drug abuse on biological aging. *World Academy of Sciences Journal*. 2019. vol. 1. P. 67-73. DOI: 0.3892/wasj.2019.7.
8. Фурсова А.Ж., Дербенева А.С., Тарасов М.С., Никулич И.Ф., Девяткин В.А., Телегина Д.В., Колосова Н.Г., Кожевникова О.С. Длина теломер лейкоцитов и ответ на антиангиогенную терапию у пациентов с неоваскулярной возрастной макулярной

дегенерацией // Успехи геронтологии. 2021. Т. 34. № 6. С. 823-830. DOI: 10.34922/AE.2021.34.6.002.

9. Ding D., Zhou J., Wang M., Cong Y.S. Implications of telomere-independent activities of telomerase reverse transcriptase in human cancer. *The FEBS Journal*. 2013. vol. 280. P. 3205–3211. DOI: 10.1111/febs.12258.

10. Shay J.W., Wright W.E. Telomeres and telomerase: Three decades of progress. *Nature Reviews Genetics*. 2019. vol. 20. P. 99–309. DOI: 10.1038/s41576-019-0099-1.

11. Коваленко Н.А., Жданов Д.Д., Коваленко Т.Ф. Возможности и эффекты активации теломеразы // Молекулярная биология. 2013. Т. 47. № 4. С. 544–557. DOI: 10.7868/S0026898413040071.

12. Saretzki G. Extra-telomeric Functions of Human Telomerase: Cancer, Mitochondria and Oxidative Stress. *Current Pharmaceutical Design*. 2014. vol. 20. P. 6386–6403. DOI: 10.2174/1381612820666140630095606.

13. Березуцкий М.А., Дурнова Н.А., Власова Я.А. Экспериментальные и клинические исследования механизмов антивозрастных эффектов химических соединений *Astragalus membranaceus* (обзор литературы) // Успехи геронтологии. 2019. Т. 32. № 5. С. 702-710.

14. Berezutsky M.A., Matvienko U.A., Karetnikova A.Yu., Durnova N.A. Anti-cancer activity of *Astragalus membranaceus* - a review. *International Journal of Pharmaceutical Research*. 2021. vol. 13. no 3. P. 206-215. DOI: 10.31838/ijpr/2021.13.03.003.

15. Plant J. Effects of Essential Oils on Telomere Length in Human Cells. *Medicinal & Aromatic Plants*. 2016. vol. 5. no 2. P. 1-6. DOI: 10.4172/2167-0412.1000230.

16. Kathirvel P., Ravi S. Chemical composition of the essential oil from basil (*Ocimum basilicum* Linn.) and its in vitro cytotoxicity against HeLa and HEP-2 human cancer cell lines and NIH 3T3 mouse embryonic fibroblasts. *Natural Product Research*. 2012. vol. 26. no 12. P. 1112-1118. DOI: 10.1080/14786419.2010.545357.

17. Aburjai T.A., Mansi K., Azzam H. Chemical Compositions and Anticancer Potential of Essential Oil from Greenhouse-cultivated *Ocimum basilicum* Leaves. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020. vol. 82. no 1. P. 178-183. DOI:10.36468/pharmaceutical-sciences.637.

18. Zhang X.P., Liu J., Xu C.Y., Wei Q., Li J., Wang L., Wang J.-W., Wang Y.-P. Effect of *Angelica sinensis* polysaccharide on expression of telomere, telomerase and P53 in mice aging hematopoietic stem cells. *China Journal of Chinese Materia Medica*. 2013. vol. 38. no 14. P. 2354-2358.

19. Zhou W.-J., Wang S., Hu Z., Zhou Z.-Y., Song C.-J. *Angelica sinensis* polysaccharides promotes apoptosis in human breast cancer cells via CREB-regulated caspase-3 activation.

Biochemical and Biophysical Research Communications. 2015. vol. 467. no 3. P. 562-569. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.09.145.

20. Zhang H.-Q., Li Y., Song Y.-Y. Effect of polysaccharides of *Cistanche deserticola* on immune cells and telomerase activity in aging mice. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences. 2011. vol. 46. no 14. P. 1081-1083.

21. Jia Y., Guan Q., Guo Y., Du C. Reduction of Inflammatory Hyperplasia in the Intestine in Colon Cancer-prone Mice by Water-extract of *Cistanche deserticola*. Phytotherapy Research. 2012. vol. 26. no 6. P. 812-819. DOI: 10.1002/ptr.3637.

22. Ma L. J., Chen G. L., Jia H. Y. Xie J. Anti-senescence effect of *Cynomorium songaricum* polysaccharide on D-galactose-induced aging mice. Chinese Journal of Hospital Pharmacy. 2009. vol. 14. P. 1186-1189.

23. Ma L., Chen G., Nie L., Ai M. Effect of *Cynomorium songaricum* polysaccharide on telomere length in blood and brain of D-galactose-induced senescence mice. China Journal of Chinese Materia Medica. 2009. vol. 34. no 10. P. 1257-1260.

24. Hu Z.W., Shen Z.Y., Huang J.H. Experimental study on effect of epimedium flavonoids in protecting telomere length of senescence cells HU. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine. 2004. vol. 24. no 12. P. 1094-1097.

25. Cao R.Z., Wei Y.C., Zhang G.W., Sun, L.J. Effect of total flavonoids of herba euphorbiae humifusae on the expression of telomerase activity in aged mice. West China Journal of Pharmaceutical Sciences. 2011. vol. 2. P. 189–190.

26. Gao S., Sun D., Wang G., Zhang J., Jiang Y., Li G., Zhang K., Wang L., Huang J., Chen L. Growth inhibitory effect of paratocarpin E, a prenylated chalcone isolated from *Euphorbia humifusa* Wild., by induction of autophagy and apoptosis in human breast cancer cells. Bioorganic Chemistry. 2016. vol. 69. P. 121-128. DOI: 10.1016/j.bioorg.2016.10.005.

27. Chau M.N., El Touny L.H., Jagadeesh S., Banerjee P.P. Physiologically achievable concentrations of genistein enhance telomerase activity in prostate cancer cells via the activation of STAT3. Carcinogenesis. 2007. vol. 28. no 11. P. 2282–2290. DOI: 10.1093/carcin/bgm148.

28. Zhao C.H. Roles of telomere and telomerase in the process of ginseno- side Rg1 protection against tert-butyl hydroperoxide-induced senescence in WI-38 cells. Chinese Pharmacological Bulletin. 2005. vol. 21. no 1. P. 61-66.

29. Zhou B.-R., Xu Y., Wu D., Permatasari F., Gao Y.-Y., Luo D. Ginsenoside Rg1 protects human fibroblasts against psoralen- and UVA-induced premature senescence through a telomeric mechanism. Archives of Dermatological Research. 2012. vol. 304. P. 223–228. DOI: 10.1007/s00403-012-1221-9.

30. Tsoukalas D., Fragkiadaki P., Docea A.O. Discovery of potent telomerase activators: Unfolding new therapeutic and anti-aging perspectives. *Molecular Medicine Reports*. 2019. vol. 20. P. 3701-3708. DOI: 10.3892/mmr.2019.10614.
31. Han A.-R., Lee S., Han S., Lee Y.J., Kim J.-B., Seo E.K., Jung C.H. Triterpenoids from the Leaves of *Centella asiatica* Inhibit Ionizing Radiation-Induced Migration and Invasion of Human Lung Cancer Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2020. vol. 2020. P. 3683460. DOI: 10.1155/2020/3683460.
32. Zhang S.X., Li X., Yin J.L. Study on antiaging effect of C21 steroidal glycoside from the root of *Cynanchum auriculatum* planted in Jiangsu. *Practical Geriatrics*. 2007. vol. 21. no. 2. P. 104-107.
33. Li X.-J., Zhou L.-F., Gao L.J., Wei Y., Xu S.-F., Chen F.-Y., Huang W.-J., Tan W.-F., Ye Y.-P. Cynanbungeigenin C and D, a pair of novel epimers from *Cynanchum bungei*, suppress hedgehog pathway-dependent medulloblastoma by blocking signaling at the level of Gli. *Cancer Letters*. 2018. vol. 420. P. 195-207. DOI: 10.1016/j.canlet.2018.02.005.
34. Li Y.Y., Yang Y., Deng H.B., Hu, X.Q., Chen, L.L. Effect of *Polygonatum sibiricum* on telomerase activity in aging mice tissue. *Central China Medical Journal*. 2002. vol. 31. no 4. P. 225–226.
35. Long T., Liu Z., Shang J., Zhou X., Yu S., Tian H., Bao Y. *Polygonatum sibiricum* polysaccharides play anti-cancer effect through TLR4-MAPK/NF- κ B signaling pathways. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018. vol. 111. P. 813-821. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.01.070.
36. Raguraman V., Subramaniam J.R. *Withania somnifera* Root Extract Enhances Telomerase Activity in the Human HeLa Cell Line. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2016. vol. 7. no 4. P. 199-204. DOI: 10.4236/abb.2016.74018.
37. Na M.K., Bae K.H., Kang S.S., Min B.S., Yoo J.K., Kamiryo Y., Senoo Y.-I., Yokoo S., Miwa N. Cytoprotective effect on oxidative stress and inhibitory effect on cellular aging of *Terminalia chebula* fruit. *Phytotherapy Research*. 2004. vol. 18. no 9. P. 737-741. DOI: 10.1002/ptr.1529.
38. Ahuja R., Agrawal N., Mukerjee A. Evaluation of anticancer potential of *Terminalia chebula* Fruits against Ehrlich Ascites Carcinoma induced cancer in mice. *Journal of Scientific and Innovative Research*. 2013. vol. 2. no 3. P. 549-554.
39. Bupesh G., Manikandan E., Thanigaiarul K., Magesh S., Senthilkumar V., Tamilarasan S., Pandian K., Ameenah G.-F., Malik M. Enhanced Antibacterial, Anticancer Activity from *Terminalia chebula* Medicinal Plant Rapid Extract by Phytosynthesis of Silver Nanoparticles Core-shell Structures. *Journal of Nanomedicine and Nanotechnology*. 2016. vol. 7. no 1. P. 1-6. DOI: 10.4172/2157-7439.1000355.

40. Saleem A., Husheem M., Härkönen P., Pihlaja K. Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* retz. Fruit. Journal of Ethnopharmacology. 2002. vol. 81. no 3. P. 327-336. DOI: 10.1016/s0378-8741(02)00099-5.
41. Березуцкий М.А., Дурнова Н.А., Шереметьева А.С., Матвиенко У.А., Курчатова М.Н. Экспериментальные исследования геропротекторного и антивозрастного эффектов химических соединений *Portulaca oleracea* L. (обзор литературы) // Успехи геронтологии. 2021. Т. 34. № 5. С. 715-720. DOI: 10.34922/AE.2021.34.5.007.
42. Na M.K., Kim Y.H., Min B.S., Bae K., Kamiryo Y., Senoo Y.-I., Yokoo S., Miwa N., Song K.S., Seong Y.H. Cytoprotective effect on oxidative stress and inhibitory effect on cellular aging of *Uncaria sinensis* Havil. Journal of Ethnopharmacology. 2004. vol. 95. no 2–3. P. 127-132. DOI: 10.1016/j.jep.2004.06.027.
43. Dong X.X., Hui Z.J., Xiang W.X., Rong Z.F., Jian S., Zhu C.J. Ginkgo Biloba Extract Reduces Endothelial Progenitor-Cell Senescence Through Augmentation of Telomerase Activity. Journal of Cardiovascular Pharmacology. 2007. vol. 49. no 2. P. 111-115. DOI: 10.1097/FJC.0b013e31802ef519.
44. Zhang Y., Li C., Sun S., Cao Z., Chen J., Hiang H., Song L.. Screening and Identification of Molecular Targets Involved in Preventing Gastric Precancerous Lesions in Chronic Atrophic Gastritis by Qilianshupi Decoction. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2019. vol. 2019. P. 5804710. DOI: 10.1155/2019/5804710.
45. Guruprasad K.P., Dash S., Shivakumar M.B., Shetty P.R., Raghu R.S., Shamprasad B.R., Udupi V., Acharya R.V., Vidya P.B., Nayak J., Mana A.E., Moni R., Sankaran M.T., Satyamoorthy K. Influence of Amalaki Rasayana on telomerase activity and telomere length in human blood mononuclear cells. Journal of Ayurveda and Integrative Medicine. 2017. vol. 8. P. 105-112. DOI: 10.1016/j.jaim.2017.01.007.

Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского
Биология. Химия. Том 9 (75). 2023. № 1. С. 93–101.

УДК 615.322

DOI 10.29039/2413-1725-2023-9-1-93-101

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ *WITHANIA SOMNIFERA*

Запорожченко А. А.¹, Суботялов М. А.^{1,2}

¹Новосибирский государственный педагогический университет, Новосибирск, Россия

²Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, Россия

E-mail: subotalov@yandex.ru

В обзоре представлен анализ публикаций, посвященных выявлению биологической активности, компонентного состава, фармакологических свойств и терапевтического потенциала различных компонентов растения *Withania somnifera*. При подготовке настоящей публикации использовались статьи в изданиях, включенных в PubMed, Scopus. Проведенный анализ показал, что в составе *Withania somnifera* присутствует широкий спектр биологически активных веществ: алкалоиды, стероидные соединения (витанолиды), сапонины, аминокислоты и другие. В исследованиях были продемонстрированы противовоспалительный, антиоксидантный, антибиотический, противоопухолевый, антидепрессантный, антидиабетический, адаптогенный, гепатопротекторный эффекты. Обзор показал, что *Withania somnifera* обладает терапевтическим потенциалом и может быть перспективным видом сырья для разработки средств, эффективных при различных заболеваниях.

Ключевые слова: *Withania somnifera*, фармакогнозия, биологическая активность, растительные ресурсы, компонентный состав, фармакологические свойства, витанолиды, терапевтический потенциал.

ВВЕДЕНИЕ

Частота применения растительных ресурсов в качестве терапевтических средств при различных отклонениях в состоянии здоровья повышается с каждым годом.

Современные фармацевтические препараты должны быть экономически выгодны, безопасны, эффективны и обладать широким спектром действия. Поэтому большое внимание уделяется поиску и введению в фармацевтику новых источников биологически активных веществ.

В результате изучения и систематизации данных отечественных и зарубежных источников литературы по состоянию развития рынка растительных препаратов, выявлена тенденция роста потребности населения в лекарственном растительном сырье в среднем ежегодно на 17,8 %.

Частота применения лекарств растительного происхождения в России по группам заболеваний (в убывающей последовательности) следующая: заболевания дыхательных путей, ЦНС, ЖКТ, печени, желчного пузыря, сердечно-сосудистые заболевания, неспецифическое повышение иммунитета, гинекологические заболевания, ревматические заболевания (средства для внутреннего применения) [1].

Одним из перспективных растительных ресурсов, с богатым набором биологически активных веществ, обладающих высоким терапевтическим потенциалом, является *Withania somnifera*.

В связи с вышесказанным **цель** данного обзора: проанализировать компонентный состав, биологическую активность и терапевтический потенциал *Withania somnifera*.

При подготовке настоящей публикации использовались статьи в изданиях, включенных в PubMed, Scopus. Глубина поиска публикаций составила 15 лет, также в обзор был включен ряд более ранних работ, соответствующих теме исследования. Для отбора публикаций были выбраны статьи, отвечающие требованиям рандомизированных клинических исследований.

Withania somnifera L. (синонимы: ашваганда, суранджан, зимняя вишня, индийский женьшень) – лекарственное растение семейства *Solanaceae*, в изобилии встречающееся в субтропических регионах мира: Африке, Средиземноморье, Шри-Ланке, Пакистане и Индии. В традиционной аюрведической медицине корни и листья данного растения считаются незаменимыми из-за высокого терапевтического и нутрицевтического потенциала для лечения различных заболеваний [2]. Клинические и доклинические испытания показали потенциал растения в лечении гепатотоксичности, неврологических расстройств, тревожности, болезни Паркинсона, иммунологических заболеваний и гиперлипидемии. Плоды содержат значительное количество сапонинов, а листья обладают свойствами, отпугивающими насекомых.

1. КОМПОНЕНТНЫЙ СОСТАВ *WITHANIA SOMNIFERA*

Фитохимический анализ *Withania somnifera* выявил наличие фармакологически активных стероидных лактонов, названных витанолидами [3]. Витанин, группа алкалоидов, выделенных из корней растения, составляет 38 % от общего веса алкалоидов. Основными витанолидами, выделенными из *Withania somnifera* в Индии, были витанолид D и витаферин А, которые проявляли противоопухолевые и цитотоксические свойства [4–6]. В дополнение к алкалоидам растение также содержит стероиды, сапонины, фенольные соединения, флавоноиды, фитофенолы и гликозиды:

- Алкалоиды – ашвагандин, анагигрин, анаферин, кускогигрин, тропин, изопеллетерин, псевдотропин, 3-тиглоилокстропин, 3-тропилтиглоат, длизопеллетерин, гигрин, мезоанаферин, холин, сомниферин, витанин, витананин, хентриаконтан, визамин, витасомнин и др.

- Стероидные соединения – эргостановые стероидные лактоны: витаферин А, витанолиды А-У, витасомниферин-А, витасомидиенон, витасомниферолы А-С, витанон и др.

- Сапонины – ситоиндозид VII и VIII.

- Витанолиды – ситоиндозид IX и X.

- Витанолидные гликозиды – витанозиды I, II, III, IV, V, VI и VII.

- Аминокислоты, витаниол, ацилстерилгликозиды, крахмал, редуцирующий сахар, хантраконтан, дукитол, железо.

Медицинские свойства алкалоидов хорошо известны; они являются сильнодействующими основой для создания многих, если не большинства,

фармацевтических препаратов за последние 100 лет. Многие анальгетики, такие как морфин и кодеин, были получены из растений, и на их основе были разработаны менее вызывающие привыкание вещества, которые используют при сердечных и дыхательных нарушениях. Одним из наиболее распространенных алкалоидов является никотин, получаемый из табачного растения и содержащийся в сигаретах и сигарах.

Основными витанолидами, которые были выделены химическим путем, являются витаферин А и витаферин D. Эти два изолята являются стероидными; они представляют собой жирорастворимые органические соединения, которые легко синтезируются в организме и могут функционировать как сигнальные молекулы, воздействующие на клеточные мембраны. Эти характеристики помогают объяснить многие противовоспалительные и обезболивающие свойства, связанные с *Withania somnifera*, как и те, которые содержатся в других алкалоидных растительных соединениях.

2. БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ *WITHANIA SOMNIFERA*

Различные части растения, такие как листья, корни, цветы, кора и стебель, традиционно используются для лечения проблем с сердцем, разных видов боли, заболеваний печени, лихорадки, респираторных инфекций, ран, язв и заболеваний, связанных с нарушениями в работе иммунной системы. Лечебный потенциал растений, используемых в традиционных системах медицины (Унани и Аюрведе), был во многом обусловлен биологически активными веществами, такими как алкалоиды, стероиды, фенолы, флавоноиды и т.д.

2.1 Противовоспалительная активность

Противовоспалительный потенциал спиртового экстракта цельного растения был изучен и оказался более значительным, чем даже у стандартного препарата гидрокортизона, в основном из-за присутствия стероидов. Другое исследование показало, что растение вызывало дозозависимое подавление макроглобулина в сыворотке крови крыс, что считается показателем противовоспалительной активности [7]. Аналогичным образом водно-спиртовой растительный экстракт обладал значительной противовоспалительной активностью благодаря витанолидам и алкалоидам против денатурации белка *in vitro*.

Многообещающий противартритный потенциал был исследован путем стабилизации активности лизосомальных ферментов. Введение порошка корня в дозе 600 мг/кг массы тела крысам с артритом, индуцированным коллагеном, значительно уменьшало тяжесть артрита с улучшением функционального восстановления двигательной активности и рентгенологического показателя. Витаферин А, экстрагированный и очищенный из корней *Withania somnifera* проявлял противовоспалительную активность, воздействуя на цистеин-179 ИКК β и ингибируя активацию NF- κ B. Результаты были сопоставимы с действием стандартного препарата, сукцината натрия гидрокортизона. Противовоспалительный потенциал растения также может быть обусловлен пролиферацией лимфоцитов и замедленной гиперчувствительностью в зависимости

от модели воспаления, такой как артрит, индуцированный адьювантом, вызванный каррагинаном, и модель воспаления гранулемы хлопковых гранул [8].

2.2 Адаптогенный эффект

Клинические исследования с экстрактами корней и листьев *Withania somnifera* также показали выраженные антистрессовые и адаптогенные эффекты [9]. Известно, что компоненты *Withania somnifera* поддерживают и оказывают благотворное влияние на функцию надпочечников, повышают устойчивость к стрессу, отчего данное растение часто упоминается как «адаптоген». Растения, считающиеся адаптогенами, исторически использовались следующим образом:

- Для восстановления жизненных сил у ослабленных и слабых людей;
- для увеличения ощущения энергии;
- для улучшения умственной и физической работоспособности;
- для предотвращения негативных последствий стресса и усиления реакции организма на стресс [10].

В двойном слепом исследовании на людях у испытуемых с хроническим стрессом, принимавших запатентованный экстракт *Withania somnifera* (Sensoril), наблюдалось значительное снижение шкалы тревоги Гамильтона, уровня сывороточного кортизола, С-реактивного белка, частоты пульса и артериального давления, а также значительное повышение уровня DHEA-S и гемоглобина в сыворотке по сравнению с группой плацебо. Кроме того, наблюдались дозозависимые реакции в снижении уровня глюкозы в крови натощак и улучшении уровня липидов в сыворотке крови [11].

Адаптогенные растения в основном используются для усиления иммунного ответа человеческого организма, контролируемого уровнем гормонов стресса в крови. Цельный растительный экстракт *Withania somnifera* при введении подверженным стрессу животным снижает уровень трибулина в моче, что стимулирует физическое и психическое здоровье, повышает сопротивляемость организма и увеличивает продолжительность жизни [12]. Была исследована и обнаружена важная роль растения в синергической активации дифференциального рецептора гамма-аминомасляной кислоты как потенциального пути для адаптогенных и неврологических расстройств (тревога, нервное истощение, бессонница и т.д.) у мышей. Стандартизированный очищенный экстракт из корней растения был исследован на антистрессовую активность, лактатдегидрогеназу, сывороточную креатинфосфокиназу, уровень кортикостерона в сыворотке крови и перекисное окисление липидов в сыворотке крови самцов крыс [13]. По результатам исследования были сделаны выводы касательно свойств в отношении хронического стресса, гипергликемии, кортикостерона в плазме и мужской сексуальной дисфункции у самцов крыс линии Вистар. Результаты показали, что экстракт корня (концентрации 25 и 50 мг/кг) проявлял значительную антистрессовую и адаптогенную активность при вызванных стрессом иммунологических нарушениях у экспериментальных животных [14].

2.3 Противоопухолевая активность

Витанолиды, выделенные из *Withania somnifera*, ингибировали рост раковых клеток в центральной нервной системе, лёгких, молочной железе и клеточных

линиях толстой кишки. Было исследовано, что витаферин А значительно снижал рост клеточных линий рака молочной железы и толстой кишки и делал это более эффективно, чем известный противоопухолевый препарат доксорубицин. Блокирование активации NF- κ B может включать индуцируемые или конститутивные механизмы подавления, которые приводят к усилению апоптоза, ингибированию инвазии и остеокластогенеза. Витанолид D, выделенный из листьев *Withania somnifera* проявлял антилейкемическую активность. Антилейкемическая активность витанолида D была опосредована накоплением церамида после активации нейтральной сфингомиелиназы-2, которая, в свою очередь, усиливала апоптотическую активность опухолевых клеток [15].

В одном исследовании была проведена оценка цитотоксичности 50 %-ного этанолового экстракта корня, стебля и листьев *in vitro* в отношении различных линий раковых клеток человека, например простаты, лёгких, толстой кишки и нейроblastомы. Было обнаружено, что этаноловый экстракт листьев проявляет более сильную противоопухолевую активность в отношении рака предстательной железы и толстой кишки, чем экстракты корней и стеблей. Механизм, лежащий в основе противоопухолевой активности, заключается в замедлении ферментов циклооксигеназы, пролиферации опухолевых клеток и перекисного окисления липидов путем ингибирования активации ядерного фактора- κ B (NF- κ B) на генетическом уровне [16]. Витаферин А также проявлял антиангиогенную активность *in vivo*, ингибируя факторы транскрипции для роста эндотелиальных клеток сосудов в очень низких концентрациях [17].

3. ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ *WITHANIA SOMNIFERA*

Среди других лекарственных растений семейства *Solanaceae* (Паслёновые) *Withania somnifera* неизменно привлекает интерес исследователей благодаря своей универсальности, традиционному терапевтическому применению и фармацевтическим свойствам. Экстракты данного растения с успехом применяются при терапии различных заболеваний, таких как рак, артрит, диабет, астма, геморрой, язвы, гепатит, различные виды воспалений. Результаты многочисленных доклинических испытаний подтвердили широкий спектр целебных свойств растения, таких как антидепрессивное, антиоксидантное, антибактериальное, противогрибковое, противовоспалительное, кардиопротекторное, гепатопротекторное и гипогликемическое действие. Данные испытания проводились на животных моделях (мыши, крысы и кролики), и в абсолютном большинстве были успешны [18]. Научная литература свидетельствует о противоопухолевом потенциале растения в отношении различных линий раковых клеток, который приписывается группе алкалоидов, называемых витанолидами. Флавоноиды, которые содержатся в этом растении, укрепляют мышцы и замедляют старение. *Withania somnifera* оказывает содействие в сокращении мышечных белков, обеспечивая идеальную естественную анаболическую помощь для спортсменов [19]. Корни растения показали потенциал против обсессивно-компульсивного расстройства, однако активные фитохимические вещества, ответственные за эту активность, до сих пор неизвестны. В статье, опубликованной в журнале *Phytotherapy Research* в 2011 году, было обнаружено, что водный экстракт корня *Withania somnifera* обладает

способностью ингибировать образование зрелых β -амилоидных фибрилл *in vitro*. Амилоидные бляшки участвуют в развитии болезни Альцгеймера. Существует острая необходимость в выделении фитохимических веществ для разработки коммерческих препаратов для лечения обсессивно-компульсивного расстройства и других психических расстройств, и некоторые исследователи выдвигают компоненты *Withania somnifera* как наиболее перспективные в этом направлении. Экстракт *Withania somnifera* изучается также в качестве лекарственного средства для лечения мужского бесплодия, успокоительного, укрепляющего кости и мышцы, гиполипидемического и противодиабетического средства. Необходимы дальнейшие клинические испытания различных экстрактов частей растения *Withania somnifera* для разработки эффективных и безопасных лекарственных препаратов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, обзор результатов исследований компонентного состава и биологической активности *Withania somnifera* показал, что на экспериментальных моделях заболеваний у животных, а также в клинических исследованиях *Withania somnifera* и её активные вещества проявили благотворное воздействие на течение ряда заболеваний.

Витанолиды и другие компоненты *Withania somnifera* являются перспективными биологически активными веществами для лечения широкого спектра заболеваний – в первую очередь воспалительных и нейродегенеративных. Высокая противовоспалительная и адаптогенная активность компонентов *Withania somnifera* доказана как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*. Эти данные дают основу для аргументации необходимости проведения дальнейших исследований, а также указывают на важность и актуальность изучения мишеней и механизмов действия биологически активных веществ *Withania somnifera* при различных заболеваниях.

Список литературы

1. Григорян Э. Р. Методический подход к оптимизации ассортимента лекарственных растительных препаратов, используемых в условиях санаторно-курортного реабилитационного комплекса Кавказских Минеральных Вод. Автореф. дис ... канд. фарм. наук. – Пятигорск. – 2015. – 24 с.
2. Суботялов М. А. Традиционная аюрведическая медицина: источники, история и место в современном здравоохранении: автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора медицинских наук / М. А. Суботялов. – Москва. – 2014. – 50 с.
3. Alam N. High catechin concentrations detected in *Withania somnifera* (ashwagandha) by high performance liquid chromatography analysis / N. Alam, M. Hossain, M. I. Khalil, M. Moniruzzaman, S. A. Sulaiman, S. H. Gan // *Altr Med.* – 2011. – No 11. – P. 65–69.
4. Das S. Qualitative screening of bioactive secondary metabolites present in *Withania somnifera* and *Rauwolfia serpentina* root and stem extract with pharmacological importance / S. Das, A. Saraf, D. Sharma, J. K. Sohal // *Int J Res Ana Rev.* – 2019. – No 6. – P. 69–74.
5. Divisha R. Quantifying phytophenols in *Andrographis paniculata* and *Withania somnifera* leaf extract / R. Divisha, V. Ranganathan, K. Vijayakaran, A. Elamaran, K. P. Senthil // *J Pharam.* – 2018. – No 7. – P. 477–479.
6. Mirjalili M. H. Steroidal lactones from *Withania somnifera*, an ancient plant for novel medicine / M. H. Mirjalili, E. Moyano, M. Bonfill, R. M. Cusido, J. Palazon // *Mole.* – 2009. – No 14. – P. 2373–2393.

7. Sumantran V. N. The relationship between chondroprotective and anti-inflammatory effects of *Withania somnifera* root and glucosamine sulphate on human osteoarthritic cartilage in vitro / V. N. Sumantran, R. Chandwaskar, S. Boddul, B. Patwardhan, A. Chopra, U. V. Wagh // *Phytother Res.* – 2008. – No 22. – P. 1342–1348.
8. Rasool M. Immunomodulatory role of *Withania somnifera* root powder on experimental induced inflammation: An in vivo and in vitro study / M. Rasool, P. Varalakshmi // *Vas Pharma.* – 2006. – No 44. – P. 406–410.
9. Yeniseti S. C. Neuropharmacological properties of *Withania somnifera* – Indian ginseng: an overview on experimental evidence with emphasis on clinical trials and patents / S. C. Yeniseti, M. J. Manjunath, C. Muralidhara // *Recent Pat CNS Drug Discov.* – 2016. – Vol. 10, No 2. – P. 204–215.
10. Raut A. A. Exploratory study to evaluate tolerability, safety, and activity of Ashwagandha (*Withania somnifera*) in healthy volunteers / A. A. Raut, N. N. Rege, F. M. Tadv [et al.] // *J Ayurveda Integr Med.* – 2012. – Vol. 3, No 3. – P. 111–114.
11. Auddy B. A standardized *Withania somnifera* extract significantly reduces stress-related parameters in chronically stressed humans: a double-blind, randomized, placebo-controlled study / B. Auddy, J. Hazra, A. Mitra [et al.] // *JANA.* – 2008. – No 11. – P. 50–56.
12. Mishra L. C. Scientific basis for the therapeutic use of *Withania somnifera* (Ashwagandha): A review / L. C. Mishra, B. B. Singh, S. Dagenais // *Alter Med Rev.* – 2000. – No 5. – P. 334–346.
13. Misra L. Withanolides from *Withania somnifera* roots / L. Misra, P. Mishra, A. Pandey, R. S. Sangwan, N. S. Sangwan, R. Tuli // *Phytochem.* – 2008. – No 69. – P. 1000–1004.
14. Mahdi A. A. *Withania somnifera* improves semen quality in stress-related male fertility / A. A. Mahdi, K. K. Shukla, M. K. Ahmad, S. Rajendar, S. N. Shankwar, V. Singh [et al.] // *Evi Based Compl Alter Med.* – 2009. – Vol. 2011. – P. 1–9.
15. Mondal S. Withanolide D. Carrying the baton of Indian rasayana herb as a lead candidate of antileukemic agent in modern medicine / S. Mondal, S. Roy, R. Maity, A. Mallick, R. Sangwan, S. Misra-Bhattacharya, C. Mandal // *Biochem Roles Eukar Cell Surf Macromol.* – 2012. – No 749. – P. 295–312.
16. Khan M. A. In vivo extract of *Withania somnifera* roots ameliorates arthritis via regulation of key immune mediator of inflammation in experimental model of arthritis / M. A. Khan, R. S. Ahmad, N. Chandra, V. K. Arora, A. Ali // *Anti Inflamm Anti All Agents in Med Chem.* – 2019. – No 18. – P. 55–70.
17. Ichikawa H. Withanolides potentiate apoptosis, inhibit invasion, and abolish osteoclastogenesis through suppression of nuclear factor- $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) activation and NF- $\kappa\beta$ -regulated gene expression / H. Ichikawa, Y. Takada, S. Shishodia, B. Jayaprakasam, M. G. Nair, B. B. Aggarwal // *Mole Can Ther.* – 2006. – No 5. – P. 1434–1445.
18. Lim D. W. Antihyperalgesic effect of ashwagandha (*W. somnifera* root extract) in rat model of post operative and neuropathic pain / D. W. Lim, J. G. Kim, E. Y. Lim, Y. T. Kim // *Inflammopharm.* – 2018. – No 26. – P. 207–215.
19. Tiwari P. Diuretic activity of ashwagandharishta prepared by traditional and modern methods in experimental rats / P. Tiwari, R. K. Patel // *Pharmacology online.* – 2011. – No 1. – P. 740–747.

BIOLOGICAL ACTIVITY AND THERAPEUTIC POTENTIAL OF *WITHANIA SOMNIFERA*

*Zaporozhchenko A. A.*¹, *Subotyalov M. A.*^{1,2}

¹*Novosibirsk State Pedagogical University, Novosibirsk, Russia*

²*Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia*

E-mail: subotyalov@yandex.ru

Withania somnifera is one of the perspective plants resources with a rich set of biologically active substances with a high therapeutic potential. The purpose of this review: to analyze the composition, biological activity and therapeutic potential of *Withania somnifera*.

When writing this work, articles in publications included in PubMed, Scopus were used. The depth of the search for publications was 15 years, and a number of earlier works corresponding to the research topic were also included in the review. For the selection of publications, articles that meet the requirements of randomized clinical trials were selected.

Withania somnifera L. (synonyms: ashwagandha, suranjan, winter cherry, Indian ginseng) is a medicinal plant of the Solanaceae family, found in abundance in the subtropical regions of the world: Africa, the Mediterranean, Sri Lanka, Pakistan and India. In traditional Ayurvedic medicine, the roots and leaves of this plant are considered indispensable due to their high therapeutic and nutraceutical potential for the treatment of various diseases. Clinical and preclinical studies have shown the potential of the plant in the treatment of hepatotoxicity, neurological disorders, anxiety, Parkinson's disease, immunological diseases and hyperlipidemia. The fruits contain a significant amount of saponins, and the leaves have properties that repel insects.

Phytochemical analysis of *Withania somnifera* revealed the presence of pharmacologically active steroidal lactones called withanolides. Vitanin, a group of alkaloids isolated from the roots of the plant, makes up 38 % of the total alkaloid weight. The main withanolides isolated from *Withania somnifera* in India were withanolide D and withaferin A, which exhibited antitumor and cytotoxic properties. In addition to alkaloids, the plant also contains steroids, saponins, phenolic compounds, flavonoids, phytophenols, and glycosides.

A review of the results of studies on the composition and biological activity of *Withania somnifera* demonstrated that in experimental animal models of diseases, as well as in clinical studies, *Withania somnifera* and its active substances showed a beneficial effect on the course of a number of diseases.

The analysis showed that *Withania somnifera* contains a wide range of biologically active substances: alkaloids, steroid compounds (withanolides), saponins, amino acids, and others. Studies have demonstrated anti-inflammatory, antioxidant, antibiotic, antitumor, antidepressant, antidiabetic, adaptogenic, hepatoprotective effects.

Withanolides and other components of *Withania somnifera* are perspective biologically active substances for the treatment of a wide range of diseases, primarily inflammatory and neurodegenerative ones. The high anti-inflammatory and adaptogenic activity of *Withania somnifera* components has been proven both in vitro and in vivo. These data provide a basis for arguing the need for further research, and also indicate the importance and relevance of studying the targets and mechanisms of action of *Withania somnifera* biologically active substances in various diseases.

Keywords: *Withania somnifera*, pharmacognosy, biological activity, plant resources, component composition, pharmacological properties, withanolides, therapeutic potential.

References

1. Grigoryan E. R. *A methodical approach to optimizing the range of medicinal herbal preparations used in the conditions of the sanatorium-resort rehabilitation complex of the Caucasian Mineral Waters*. Abstract of thesis... cand. pharmaceut. sciences. 24 p. (Pyatigorsk, 2015). [In Russian].
2. Subotyalov M. A. *Traditional Ayurvedic Medicine: Sources, History and Place in Modern Healthcare*. Abstract of thesis... d. med. sciences. 50 p. (Moscow, 2014). [In Russian].

3. Alam N., Hossain M., Khalil M. I., Moniruzzaman M., Sulaiman S. A., Gan S. H. High catechin concentrations detected in *Withania somnifera* (ashwagandha) by high performance liquid chromatography analysis, *Altr Med*, **11**, 65 (2011).
4. Das S., Saraf A., Sharma D., Sohal J. K. Qualitative screening of bioactive secondary metabolites present in *Withania somnifera* and *Rauwolfia serpentina* root and stem extract with pharmacological importance, *Int J Res Ana Rev*, **6**, 69 (2019).
5. Divisha R., Ranganathan V., Vijayakaran K., Elamaran A., Senthil K. P. Quantifying phytophenols in *Andrographis paniculata* and *Withania somnifera* leaf extract, *J Pharam*, **7**, 477 (2018).
6. Mirjalili M. H., Moyano E., Bonfill M., Cusido R. M., Palazon J. Steroidal lactones from *Withania somnifera*, an ancient plant for novel medicine, *Mole*, **14**, 2373 (2009).
7. Sumantran V. N., Chandwaskar R., Boddul S., Patwardhan B., Chopra A., Wagh U. V. The relationship between chondroprotective and anti-inflammatory effects of *Withania somnifera* root and glucosamine sulphate on human osteoarthritic cartilage in vitro. *Phytother Res*, **22**, 1342 (2008).
8. Rasool M., Varalakshmi P. Immunomodulatory role of *Withania somnifera* root powder on experimental induced inflammation: An in vivo and in vitro study, *Vas Pharma*, **44**, 406 (2006).
9. Yeniseti S. C., Manjunath M. J., Muralidhara C. Neuropharmacological properties of *Withania somnifera* – Indian ginseng: an overview on experimental evidence with emphasis on clinical trials and patents, *Recent Pat CNS Drug Discov*, **10(2)**, 204 (2016).
10. Raut A. A., Rege N. N., Tadvi F. M., et al. Exploratory study to evaluate tolerability, safety, and activity of Ashwagandha (*Withania somnifera*) in healthy volunteers, *J Ayurveda Integr Med*, **3(3)**, 111 (2012).
11. Auddy B., Hazra J., Mitra A., et al. A standardized *Withania somnifera* extract significantly reduces stress-related parameters in chronically stressed humans: a double-blind, randomized, placebo-controlled study, *JANA*, **11**, 50 (2008).
12. Mishra L. C., Singh B. B., Dagenais S. Scientific basis for the therapeutic use of *Withania somnifera* (Ashwagandha): A review, *Alter Med Rev*, **5**, 334 (2000).
13. Misra L., Mishra P., Pandey A., Sangwan R. S., Sangwan N. S., Tuli R. Withanolides from *Withania somnifera* roots, *Phytochem*, **69**, 1000 (2008).
14. Mahdi A. A., Shukla K. K., Ahmad M. K., Rajendar S., Shankhwar S. N., Singh V. et al. *Withania somnifera* improves semen quality in stress-related male fertility, *Evi Based Compl Alter Med*, **2011**, 1 (2009).
15. Mondal S., Roy S., Maity R., Mallick A., Sangwan R., Misra-Bhattacharya S., Mandal C. Withanolide D. Carrying the baton of Indian rasayana herb as a lead candidate of antileukemic agent in modern medicine, *Biochem Roles Eukar Cell Surf Macromol*, **749**, 295 (2012).
16. Khan M. A., Ahmad R. S., Chandra N., Arora V. K., Ali A. In vivo extract of *Withania somnifera* roots ameliorates arthritis via regulation of key immune mediator of inflammation in experimental model of arthritis, *Anti Inflamm Anti All Agents in Med Chem*, **18**, 55 (2019).
17. Ichikawa H., Takada Y., Shishodia S., Jayaprakasam B., Nair M. G., Aggarwal B. B. Withanolides potentiate apoptosis, inhibit invasion, and abolish osteoclastogenesis through suppression of nuclear factor- κ B (NF- κ B) activation and NF- κ B-regulated gene expression, *Mole Can Ther*, **5**, 1434 (2006).
18. Lim D. W., Kim J. G., Lim E. Y., Kim Y. T. Antihyperalgesic effect of ashwagandha (*W. somnifera* root extract) in rat model of post operative and neuropathic pain, *Inflammopharm*, **26**, 207 (2018).
19. Tiwari P., Patel R. K. Diuretic activity of ashwagandharishta prepared by traditional and modern methods in experimental rats, *Pharmacology online*, **1**, 740 (2011).

УДК 574.577

**CYTOTOXICITY AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF EXTRACTS OF RARE MEDICINAL PLANTS
(DIOSCOREA CAUCASIA LYPSKY, ASTRAGALUS DASYANTHUS PALL, WITHANIA
SOMNIFERA L.) UNDER IN VITRO CONDITIONS**

Kalashnikova E.

*Doctor in Biological Sciences, Professor, Department of biotechnology,
Moscow state agricultural University MTAA named after K.A. Timiryazev*

Zaytseva S.

*Associate Professor, PhD in Biological Sciences,
Moscow state Academy of veterinary medicine and biotechnology named after K.I. Skryabin,
Associate Professor, PhD in Biological Sciences, Department of biotechnology,
Moscow state agricultural University MTAA named after K.A. Timiryazev*

Doan Thu Thuy

*Associate Professor, PhD in Biological Sciences
Vietnam National University of Agriculture*

Kirakosyan R.

*Associate Professor, PhD in Biological Sciences, Department of biotechnology,
Moscow state agricultural University MTAA named after K.A. Timiryazev*

**ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ РЕДКИХ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ (DIOSCOREA CAUCASIA LYPSKY, ASTRAGALUS
DASYANTHUS PALL, WITHANIA SOMNIFERA L.) В УСЛОВИЯХ IN VITRO.**

Калашникова Е.А.

*д.б.н. профессор кафедры биотехнологии
Государственного аграрного университета МСХА имени К.А. Тимирязева*

Зайцева С.М.

*к.б.н. доцент кафедры кормления и кормопроизводства Московской
Государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии МВА имени К.И. Скрябина,
к.б.н., доцент кафедры биотехнологии*

Государственного аграрного университета МСХА имени К.А. Тимирязева

Доан Тху Тхун

*к.б.н. доцент агрономического факультета,
Вьетнамский национальный аграрный университет*

Киракосян Р.Н.

*к.б.н., доцент кафедры биотехнологии
Государственного аграрного университета МСХА имени К.А. Тимирязева*

Abstract

When studying the formation of secondary metabolites in the microclones of medicinal plants, it was found that in vitro the peculiarities of polyphenols accumulation characteristic of intact plants are preserved. Plant extracts obtained from microclones of plants *Astragalus Dasyanthus Pall*, *Withania somnifera L.* Have a high cytotoxic effect on human cancer cells.

Аннотация

При изучении образования вторичных метаболитов в микроклонах лекарственных растений выяснили что в условиях *in vitro* сохраняются особенности накопления полифенолов, характерные для интактных растений. Растительные экстракты, полученные из микроклонов растений *Astragalus Dasyanthus* Pall, *Withania somnifera* L. оказывают высокое цитотоксическое действие на раковые клетки человека.

Keywords: *Dioscorea nipponica* Makino, *Astragalus Dasyanthus* Pall, *Withania somnifera* L. phenolic compounds (Polyphenols), flavanes, flavanols, Microclonal reproduction, cytotoxic effect

Ключевые слова: диоскорея, астрагал, ашваганда, культуры *in vitro*, микроклоны, вторичный метаболизм, полифенолы, биологическая активность, цитотоксичность

Фитотерапия является неотъемлемой частью современной медицинской практики, а фитотермакогнозия – одной из основных фармацевтических наук, изучающей растительное сырье для научной медицины, в том числе и ветеринарной. Особенности метаболизма растительного организма, где помимо реакций первичного обмена, синтезируются разнообразные вещества вторичного происхождения, обладающие высокой биологической активностью, как раз и обуславливают обширное терапевтическое действие их экстрактивных веществ. Растения содержат чрезвычайно разнообразный спектр веществ вторичного происхождения, который насчитывает несколько десятков тысяч индивидуальных соединений, среди которых наиболее распространёнными являются фенольные соединения (биофлаваноиды). Широкое применение полифенолов в фармакологии в качестве биологически активных веществ основано на способности к окислению с образованием хиновых форм, что определяет их гепатопротекторные, нейрорегуляторные, капилляроукрепляющие, желчегонные и противоопухолевые и другие свойства [1].

Одним из перспективных направлений биотехнологии является сохранение биоразнообразия редких, лекарственных, а также исчезающих форм растений и создание на их основе генетических банков *in vitro*. В строго контролируемых условиях *in vitro* при модификации питательных сред и внешних условий культивирования, возможно добиться целевой направленности в синтезе определенных продуктов вторичного метаболизма растительными культурами [2]. Кроме того, экспериментально установлено, что не только дедифференцированные, но и дифференцированные клетки, например, микроклоны сохраняют способность к синтезу соединений, в том числе и фенольной природы, характерную для интактных растений. Данное физиологическое свойство является базовой основой для технологии получения клонированных растений – продуцентов ценных биологически активных веществ.

Перспективными для изучения вторичного метаболизма, в том числе и в строго контролируемых условиях *in vitro*, являются такие растения, как диоскорея, астрагал и ашваганда. Особенности вторичного метаболизма и способность к образованию богатого спектра веществ, в том числе и фенольной природы, обуславливают широкое терапевтическое действие экстрактивных веществ указанных растений [3].

В медицинской практике препараты на основе диоскореи применяются для терапии и профилактики атеросклероза сосудов головного мозга и сердечно-сосудистой системы в сочетании с гипертонической болезнью, для улучшения функции и проведения импульсов к сердцу. Из астрагала получают настои для лечения начальных форм гипертонической болезни, недостаточности кровообращения и острых гламерунефритов, которые обладают антифунгицидными свойствами. Растения ашваганды на протяжении нескольких тысячелетий применяют в народной медицине при лечении физиологических заболеваний, вызванных оксидативным стрессом. В аюрведической медицине ашваганда считается **одной из самых ценных и основополагающих культур**, обладающих иммуномодулирующими и омолаживающими свойствами. Это обусловлено тем, что во всех частях растения (листьях, коре, плодах, семенах, и в большей степени в корне) синтезируются разнообразные вещества вторичного метаболизма – полифенолы и их гликозиды, сапонины, стероидные лактоны, олигосахариды, витамин D, а также свободный витамин А (агликон), обладающий цитотоксическим действием.

Следует отметить, что изучение вторичного метаболизма имеет важное значение не только для фитотермакогнозии, но и для исследований по сохранению биоразнообразия, так как полифенолы оказывают непосредственное влияние на успешность введения растений в культуру *in vitro*. Исследователями неоднократно отмечалось, что эти вещества могут оказывать как стимулирующий, так и ингибирующий эффект на процессы морфогенеза. Так, например, содержащихся в исходных эксплантах вещества фенольной природы, приводят к ингибированию ростовых процессов на этапе введения эксплантов ценных лекарственных растений в культуру *in vitro* [4]. Такие культуры в дальнейшем могут быть использованы для воспроизводства растений-регенераторов генетически идентичных исходному виду, а также служить источником уникальных биологически активных веществ для фармацевтической промышленности. Однако данных об образовании и локализации фенольных соединений в растениях, обладающих лекарственными свойствами не многочисленно.

Несмотря на значительные отличия морфофизиологических характеристик этих ценных растений, их объединяет высокая биосинтетическая способность к образованию вторичных соедине-

ний, в том числе и фенольной природы - биофлаваноидов. Как известно, биосинтез и накопление вторичных соединений, отличается пластичностью и зависит не только от видовой принадлежности растений, его органа и стадии онтогенеза, но и от условий произрастания растения [5].

В связи с тем, что в литературе практически отсутствуют данные об образовании вторичных веществ в микроклонах лекарственных растений *Dioscorea*, *Astragalus Dasyanthus* Pall, *Withania somnifera* L. то целью нашего исследования являлось изучение морфогенетического потенциала данных растений и установление биологической активности их экстрактов *in vitro*, в качестве потенциальных источников лекарственных препаратов, применяемых и для ветеринарной медицины.

Методы и материалы

Материалом для работы служили растения диоскореи кавказской (*Dioscorea caucasia* Lypsky), астрагала (*Astragalus Dasyanthus* Pall) и ашваганды (*Withania somnifera* L.). В качестве эксплантов использовали семена, побеги, почки, листовые пластинки и многолетние клубни, которые культивировали на питательной среде Мурасига и Скуга, содержащей вещества с цитокининовой (БАП, 2ip, кинетин (0,5 -1,0 мг/л) и ауксиновой (НУК 0,5-1,0 мг/л, ИМК и ИУК 1-7 мг/л) активностью. Растительный материал выращивали в условиях световой комнаты, где поддерживалась температура 25±2°C, 16-ти часовой фотопериод, освещение белыми люминесцентными лампами OSRAM L36/25 с интенсивностью освещения 3,5 тыс. лк. Для укоренения микропобегов использовали модифицированную питательную среду Мурасиге и Скуга, содержащую ½ нормы макроэлементов, а также сахарозу 20 г/л и ИУК 1 мг/л.

Для извлечения фенольных соединений измельченный растительный материал экстрагировали горячим 96%-ным этанолом. В экстрактах спектрофотометрическим методом определяли содержание суммы растворимых фенольных соединений, флаванов (катехины и проантоцианидины) и флавонолов. Калибровочные кривые строили по рутину и (-) -эпикатехину [6]. На графиках представлены средние арифметические значения и их стандартные отклонения.

Для определения цитотоксического эффекта растительных экстрактов использовали МТТ-тест. Работу проводили в 96-луночном планшете. В каждую лунку вносили раковые клетки в количестве 2*10⁴ кл/лунку и добавляли 100 мкл питательной среды и инкубировали в течение 1 часа. Лиофильно высушенные спиртовые экстракты растений-регенерантов (ашваганды и астрагала) растворяли в DMSO до концентрации 5000 мкг/мл, после чего проводили разбавление раствора до 50 мкг/мл и полученные концентрации в дальнейшем наносили на раковые клетки человека. К содержимому каждой лунки добавляли по 25 мкл МТТ (4 мг/мл в PBS), который первоначально был профильтрован, после чего проводили инкубацию в CO₂-инкубаторе в течение 4 часов. После этого в каждую лунку добавляли по 50 мкл SDS (20% SDS на воде с 0,02 N HCl или H₂SO₄) и инкубировали в течении ночи. Затем измеряли оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 570 и 650 нм. В качестве объекта исследования была взята линия клеток М-HeLa (эпителиоидная карцинома шейки матки человека, сублиния HeLa, клон М HeLa, коллекция Института цитологии РАН, Санкт-Петербург). В контрольном варианте экстракты не вносили.

Результаты и обсуждения

Поскольку растения (*Dioscorea caucasia* Lypsky, *Astragalus Dasyanthus* Pall, *Withania somnifera* L.) относятся к ценным исчезающим видам и имеют ограниченный ареал распространения в природе, то большое практическое значение приобретает получение культур *in vitro*, как возможных источников биологически активных веществ и лекарственных препаратов. Модифицировав гормональный состав питательной среды, мы добились изменения морфофизиологических процессов, которые проявлялись в формировании каллусной ткани в основании первичного экспланта с одновременной регенерацией растений. Микроклоны во всех случаях характеризовались интенсивным ростом, формированием мощной наземной биомассы и высоким коэффициентом размножения (Рис.1).

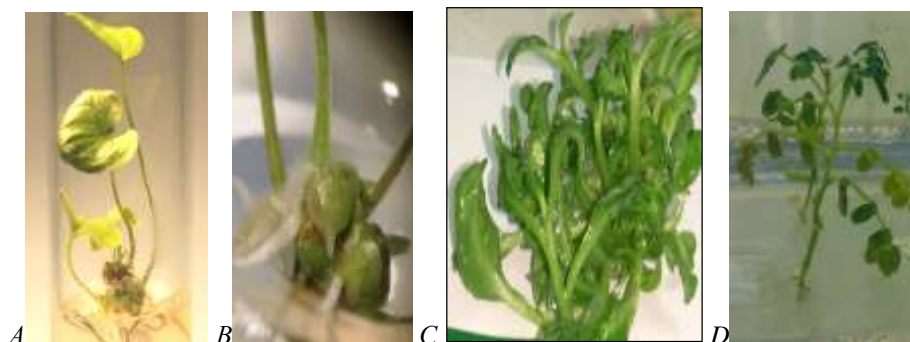


Рис. 1. А - микроклон диоскореи, В - образование микроклубней на микроклоне диоскореи, С - формирование микроклонов ашваганды - D и астрагала

Одной из основных задач наших исследований было выяснение особенностей накопления в микроклонах диоскореи соединений фенольной природы, обладающих высокой биологической активностью. Ранее нами было показано, что максимальное содержание полифенолов в растениях диоскореи было в клубнях, (особенно в листьях) [7].

При изучении фенольных соединений в растениях было показано, что при введении в культуру *in vitro*, у микроклонов диоскореи, также, как и у интактного растения, содержание биофлаваноидов было выше в подземных органах – микроклубнях. Они характеризовались достаточно высоким содержанием растворимых фенольных соединений до

53,4 мг/г свежей массы, где доля флаванов и флаванолов составляла 18% и 43%, соответственно. Однако способность к синтезу вторичных соединений в микроклонах была ниже, чем у исходных тканей. Это согласуется с многочисленными данными, свидетельствующими, что в условиях *in vitro* сохраняется идентичная тенденция к синтезу вторичных соединений, характерных для интактных тканей, но в менее выраженной степени (Рис. 2) [8].

Как следует из анализа литературных источников, растения ашваганды (*Withania somnifera*) и астрагала (*Astragalus*) в комплексе вторичных метаболитов преобладают такие вещества, как полифенолы, обладающие противораковой активностью [9].

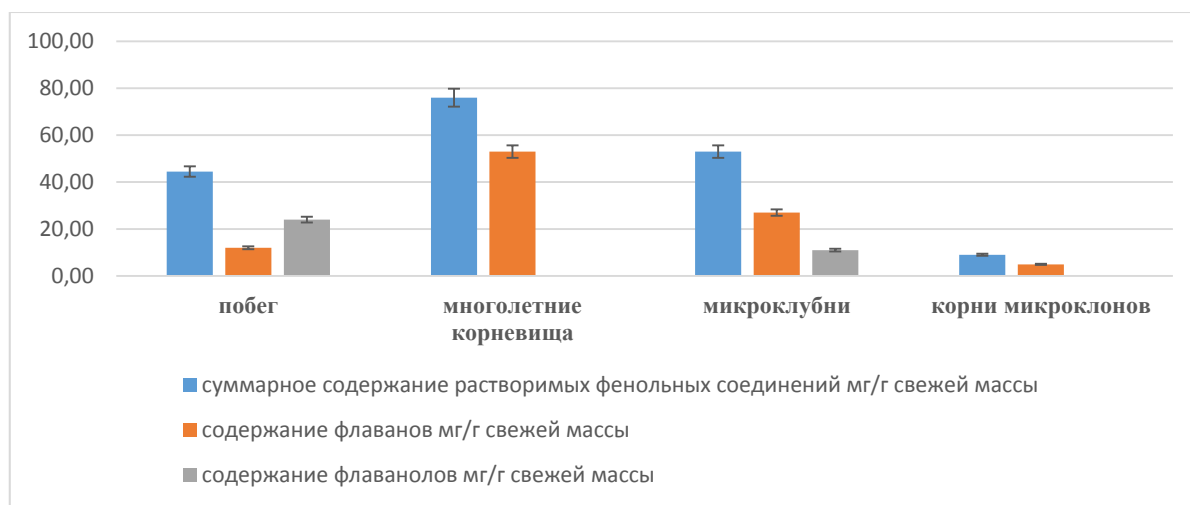


Рис. 2 Суммарное содержание растворимых фенольных соединений, флаванов и флаванолов в интактных растениях диоскореи и инициированных из них микроклонах

Поэтому изучение действия экстрактов данных растений на раковые клетки человека, является актуальным направлением и может служить косвенным признаком биосинтетической способности растений к образованию вторичных веществ обладающих не только биологической активностью, но и цитотоксическим действием.

В работе была изучена цитотоксичность экстрактов, полученных из растений-регенерантов ашваганды и астрагала. Результаты исследований представлены на рисунке 3.

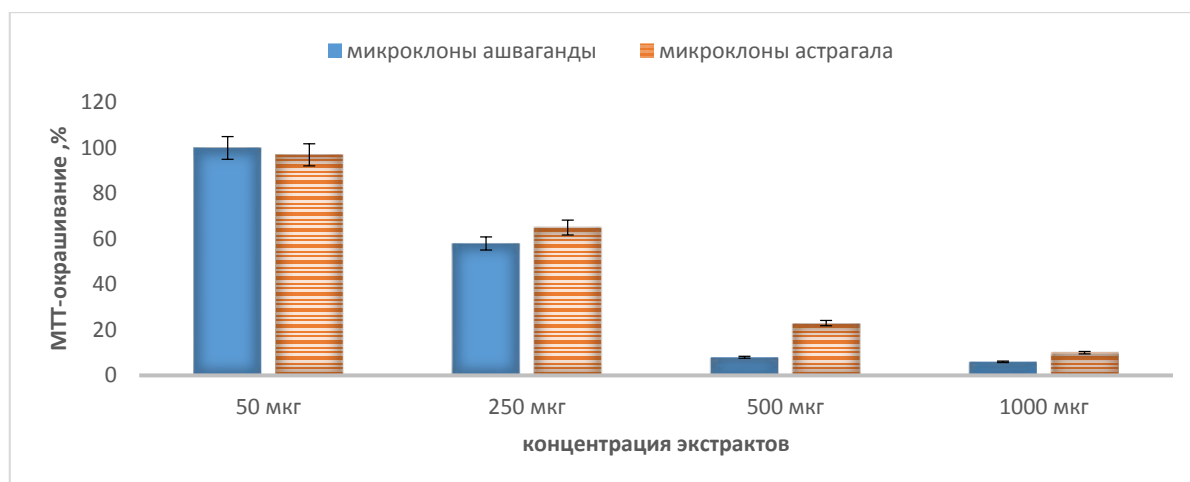


Рис. 3 Влияние различных концентраций растительных экстрактов ашваганды и астрагала на жизнеспособность раковых клеток человека

В результате проведенных исследований было установлено, что растительные экстракты, полученные из растений-регенерантов ашваганды и астрагала, при разных концентрациях обладают различной цитотоксичностью. Как следует из полученных результатов, малые концентрации экстрактов (50 мкг/мл) были не токсичны для исследуемых раковых клеток, о чем свидетельствует 100%-ное их выживание при использовании двух изучаемых экстрактов. Однако, по мере повышения концентрации цитотоксический эффект экстрактов начинал проявляться. Для экстрактов ашваганды, уже при концентрации 250 мкг/мл наблюдали гибель более 40% раковых клеток, а при концентрации 500 мкг/л и выше гибель раковых клеток была в пределах 90-95%.

Что касается экстрактов астрагала, то наибольшей цитотоксичностью обладали экстракты при концентрации 1000 мкг/л, когда выживаемость исследуемых раковых клеток составляла менее 10%, при этом концентрации экстракта 500 мкг/л также характеризовалась высоким цитотоксическим эффектом.

На основе изложенного выше, можно заключить что микроклоны исследованных растений обладают высокой способностью к биосинтезу большего числа разнообразных фенольных соединений, что, несомненно, имеет важное практическое значение как потенциальный источник ценных биологически активных веществ для фарминдустрии. Причем в условиях *in vitro* при образовании биофлавоноидов сохраняется органоспецифичность, характерная для интактных растений, но в менее выраженной степени. Биохимические данные находят подтверждение и в цитотоксических исследованиях. Наши исследования показали, что вторичные метаболиты могут оказывать не только ингибирующий эффект на рост раковых клеток человека, но и могут быть стимуляторами различных морфофизиологических процессов, о чем свидетельствует ряд литературных источников [10,11].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Куркин, В.А. Фенилпропаноиды– перспективные природные биологически активные соединения / В.А. Куркин // Самара: Изд. Гос. Мед. Ун-т. - 1996. - С. 31-37.
2. Носов, А.М. Регуляция синтеза вторичных соединений в культуре клеток растений/ А.М.Носов// Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. Под редакцией Р.Г. Бутенко. М. Наука. - 1991.
3. Алексеева, Г.М.//Фармакогнозия. Лекарственное сырье растительного и животного происхождения. Санкт-Петербург. СпецЛит. - 2013г.
4. Дубравина, Г.А. Изменения в образовании и локализации фенольных соединений при дедифференциации тканей тисса ягодного и тисса канадского в условиях *in vitro* / Г.А.Дубравина, С.М.Зайцева, Н.В. Загоскина // Физиология растений. - 2005. - Т. 52. - С. 755-762
5. Запрометов М.Н. Фенольные соединения и их роль в жизни растения. LVI Тимирязевские чтения. М.: Наука. 1996. 45с.
6. Запрометов, М. Н. Фенольные соединения и методы их исследования // Биохимические методы в физиологии растений. Наука, - 1971. - С. 185-197.
7. Доан Тху Тхуи, Калашникова Е.А., Зайцева С.М., Киракосян Р.Н. Фенольные соединения растений Диоскореи кавказской (*Dioscorea caucasica* Lipsky), особенности их образования и локализации. // Естественные и технические науки. 2018 №2
8. Доан Тху Тхуи, Зайцева С.М., Калашникова Е.А., Киракосян Р.Н. О влиянии регуляторов роста на способность микроклонов лекарственных растений *Dioscorea caucasica* Lypsky к образованию и локализации полифенолов // Актуальные вопросы ветеринарной биологии, №2 (38) 2018 С. 39-45
9. Jeong, H. Molecular Discrimination of Medicinal *Astragali Radix* by RAPD Analysis. Immunopharmacology and Immunotoxicology / H. Jeong, J. Um, S. Kim, K. Koh, W. Hwang, K. Lee, C. Kim, H. Kim // Pakistan Journal of Biological Sciences, - 2015. – 310 p.
10. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБК-ПРЕСС. 1999. 160 с.
11. Zengqi li, Tiexin Tang, Shejian Liang, Xiping Ning, Mei Bai, Hong Wu // The synthesis and storage of phenolic compounds in the root and rhizome of *Echinacea purpurea* // American journal of Plant Sciences, 2012, 3,551-558

© ТОРОПОВА А.А., БАТОЦЫРЕНОВА Э.Т., ОЛЕННИКОВ Д.Н., ТАНХАЕВА Л.М., ШАНТАНОВА Л.Н., НИКОЛАЕВ С.М. - 2012
УДК 615.322

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ СУХОГО ЭКСТРАКТА ПОДЗЕМНЫХ ОРГАНОВ *ASTRAGALUS MEMBRANACEUS* И ЕГО ФРАКЦИЙ

Анна Алексеевна Торопова¹, Эльвира Токтохоевна Батоцыренова¹, Даниил Николаевич Оленников¹,
Лариса Максимовна Танхаева¹, Лариса Николаевна Шантанова¹, Сергей Матвеевич Николаев^{1,2}

(¹Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, г. Улан-Удэ, директор – д.б.н., проф. Л.Л. Убугунов, отдел биологически активных веществ, зав. – д.м.н., проф. С.М. Николаев; ²Иркутская государственная академия последипломного образования, ректор – д.м.н., проф. В.В. Шпрах, кафедра клинической фармакологии, зав. – д.м.н., проф. Н.В. Верлан)

Резюме. Проведено исследование антиоксидантной активности сухого экстракта корней астрагала перепончатого (*Astragalus membranaceus* (Fish.) Bunge) и выделенных из него фракций с применением методов *in vitro*. Установлено, что сухой экстракт *A. membranaceus* обладает выраженной инактивирующей активностью в отношении радикаловДФПГ, супероксид-радикалов и молекул оксида азота. Выявлено наличие Fe²⁺-хелатирующей активности и способности к защите биологического субстрата от перекисного повреждения.

Ключевые слова: *Astragalus membranaceus*, антиоксидантная активность, ДФПГ, супероксид-радикалы, оксид азота.

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF EXTRACT FROM *ASTRAGALUS MEMBRANACEUS* UNDERGROUND PARTS AND ITS FRACTIONS

A.A. Toropova¹, E.T. Batotsyrenova¹, D.N. Olennikov¹, L.M. Tankhaeva¹, L.N. Shantanova¹, S.M. Nikolaev^{1,2}

(¹Institute of General and Experimental Biology SB RAS; ²Irkutsk State Medical Academy of Continuing Education)

Summary. The antioxidant activity of *Astragalus membranaceus* extract and its fractions using *in vitro* methods was investigated. It was found that the remedies shown expressed antioxidant activity, including inactivating of DPPH free radicals, superoxide-radicals and NO molecules. The Fe²⁺-chelating activity and the ability to protect a biological substrate against peroxidative damage has been revealed.

Keywords: *Astragalus membranaceus*, antioxidant activity, DPPH, superoxide-radicals, nitrogen oxide.

Проблемы химической регуляции окислительного стресса и поиск биологически активных веществ, обладающих антиоксидантной активностью, находятся в центре внимания исследователей различных направлений экспериментальной биологии и медицины [3]. В физиологических условиях окислительно-восстановительные процессы, обеспечивающие энергетические потребности клеток и утилизацию кислорода в тканях, контролируются регуляторными системами, поддерживающими сбалансированное взаимодействие реакций образования продуктов окисдации и антиоксидантных факторов. Нарушение этого взаимодействия, сопровождаемого активацией свободнорадикальных процессов и накоплением продуктов перекисного окисления липидов, рассматривается в качестве универсального механизма повреждения биологических мембран, лежащего в основе ряда патологических процессов [9].

Применение синтетических антиоксидантов часто осложняется побочными эффектами, поэтому все большее внимание уделяется природным, в частности растительным антиоксидантам, обладающим низкой токсичностью и отсутствием побочных эффектов при длительном приеме [3].

Объектом настоящего исследования является сухой экстракт подземных органов *A. membranaceus* и выделенных из него фракций.

Целью настоящей работы является определение антиоксидантной активности сухого экстракта подземных органов *A. membranaceus* и его фракций в экспериментах *in vitro*.

Материалы и методы

Растительное сырье – подземные органы *A. membranaceus* было собрано в окрестности г. Улан-Удэ (сентябрь 2011 год). Для получения сухого экстракта *A. membranaceus* (СЭА) измельченное сырье экстрагировали этанолом 60-70%, спиртовое извлечение концентрировали до водного остатка и высушивали в вакууме. Для получения фракций сухой экстракт *A. membranaceus* суспендировали в воде в соотношении 1:10, полученную суспензию подвергали жидко-фазной экстракции гексаном, хлороформом, этилацетатом и бутанолом.

Антирадикальную активность определяли с применением DPPH-метода [8]. Антиоксидантную активность оценивали по степени влияния исследуемого фитосредства на динамику перекисной дегградации β-каротина (СВА-метод) в системе олеиновая кислота-ДМСО-Н₂O₂ [7]; влияние исследуемого средства на связывание супероксидных анион-радикалов (O₂^{·-}) – в неэнзиматической системе феназин-метосульфат/НАДН [5]; Fe²⁺-хелатирующую активность определяли фенантролиновым методом [4]; связывание молекул оксида азота (NO) – нитропруссидным методом [6]. Влияние *A. membranaceus* и его фракций на процесс перекисного окисления липидов (ПОЛ) изучали в модельной системе содержащей суспензию желточных липопротеидов (ЖЛП-метод). Величиной антиоксидантной активности считали концентрацию исследуемых фитосредств, необходимую для ингибирования (связывания) 50% реактивных частиц [2]. Все эксперименты проводили в трехкратной повторности.

В работе использовали ионол (Sigma) и аскорбиновую кислоту (АК) (Sigma). Спектрофотометрические исследования проводили на спектрофотометре UV-Vis-mini (Shimadzu) в кварцевых кюветках с толщиной поглощающего слоя 10 мм.

Корреляционный анализ проводили с применением пакета программ Advanced Grapher ver. 2.11 (Alentum Software Inc.), статистическую обработку – согласно рекомендациям [1].

Результаты и обсуждение

В модельных системах *in vitro*, в которых происходила генерация свободных радикалов, сухой экстракт *A. membranaceus* и его фракции проявляли выраженные антиоксидантные свойства (табл. 1).

Установлено, что СЭА обладает антирадикальной активностью в отношении DPPH-радикала – IC₅₀ = 60,0 мкг/мл. Наибольший вклад в проявление данного вида активности исследуемого фитосредства вносит хлороформная (IC₅₀=52,1 мкг/мл) и этилацетатная фракции (IC₅₀=58,1 мкг/мл).

Таблица 1

Антиоксидантная активность сухого экстракта *Astragalus membranaceus* и его фракций, IC₅₀

Объект	DPPH-метод, мкг/мл	СВА-метод, мкг/мл	ЖЛП-метод, мкг/мл	Fe ²⁺ мкг/мл	O ₂ ^{·-} мкг/мл	NO мкг/мл
СЭА	60,0±1,4	20,1±1,1	494,2±7,2	4,93±0,12	500,0±7,2	242,4 ± 5,0
BF	277,1±4,2	57,0±2,1	182,2±5,7	2,84±0,11	714,0±8,1	> 5000
WF	> 5000	15,3±0,8	1903,0±32,7	6,42±0,28	500,0±7,2	> 5000
HF	> 5000	83,1±2,5	3466,0±41,3	-	> 5000	401,0 ± 11,0
CF	52,1±1,1	22,1±1,3	153,4±4,4	2,05±0,12	> 5000	993,1 ± 32,8
EF	58,1±1,4	34,1±1,4	355,7±6,2	6,85±0,32	430,0±7,0	913,2 ± 22,2
АК ^a	4,8±0,2	-	50,8±1,2	0,15±0,01	101,0±3,2	1140,0±34,2
Ионол ^a	45,1±1,4	1,7±0,1	-	-	-	-

Примечания: DPPH-метод – антирадикальная активность в отношении ДФПГ, СВА-метод – антиоксидантная активность в системе β-каротин-олеиновая кислота-Н₂O₂-ДМСО, ЖЛП-метод – антиоксидантная активность в отношении накопления ТБК-активных продуктов, Fe²⁺ – Fe²⁺-хелатирующая активность, O₂^{·-} – связывание супероксид-анион радикала, NO – связывание молекул оксида азота (II); Фракции: BF – бутанольная, WF – водная, HF – гексановая, CF – хлороформная, EF – этилацетатная; ^a – вещество сравнения.

Показано, что фитопрепарат проявлял способностью к защите биологического субстрата от перекисного повреждения (СВА-метод). Антиоксидантная активность сухого экстракта *A. membranaceus*, определенная методом СВА, составляет 20,1 мкг/мл. Для ионола (препарат сравнения) данный показатель составил 1,7 мкг/мл (IC₅₀=1,7 мкг/мл). Антиоксидантная активность (СВА-метод) выделенных фракций возрастала в ряду: водная (IC₅₀=15,3 мкг/мл) > хлороформная > этилацетатная > бутанольная > гексановая (IC₅₀ = 83,1 мкг/мл).

Сухой экстракт *A. membranaceus* и его фракции ингибировали образование ТБК-активных продуктов *in vitro*. Антиоксидантная активность исследуемых средств возрастает в ряду: хлороформная (IC₅₀ = 153,4 мкг/мл) > бутанольная > этилацетатная > *A. membranaceus* > водная > гексановая (IC₅₀ = 3466,0 мкг/мл).

При изучении влияния исследуемого средства и его фракций на ряд активных форм кислорода (O₂^{·-} и NO) и ионы Fe²⁺ выявлено, что сухой экстракт *A. membranaceus* обладает способностью к их инактивации. В эксперименте установлено, что исследуемое фитосредство обладает умеренной Fe²⁺-хелатирующей активностью (IC₅₀=4,9 мкг/мл).

В отношении к супероксид-анион радикалам наблюдалась умеренная выраженность действия СЭА (IC₅₀=500,0 мкг/мл). Для препарата сравнения – аскорбиновой кислоты, данный показатель составил 101,0 мкг/мл. Данный вид активности исследуемого фитосредства обусловлен, вероятно, присутствием фенольных соединений, о чем свидетельствовал тот факт, что наибольшая O₂^{·-} - связывающая активность характерна для этилацетатной фракции (IC₅₀=430,0 мкг/мл).

Сухой экстракт *A. membranaceus* проявлял выраженную способность к связыванию молекул NO (IC₅₀=242,4 мкг/мл), превосходящей таковую препарата сравнения – аскорбиновой кислоты (IC₅₀=1140,0 мкг/мл).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что сухой экстракт подземных органов *A. membranaceus* и его фракции обладают способностью к восстановлению биологических субстратов, проявляют выраженное антирадикальное действие и ингибируют процесс перекисной дегградации β-каротина. Результаты проведенных исследований дают основание рассматривать исследуемое фитосредство в качестве потенциального антиоксидантного средства, характеризующегося присутствием ряда биологически активных веществ, представителей классов фенольных соединений и полисахаридов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дерффель К. Статистика в аналитической химии. – М.,

1994. – 98 с.

2. Клебанов Г.И., Бабенков И.В., Теселкина Ю.О. и др.

Оценка антиокислительной активности плазмы крови с применением липопротеидов // Лабораторное дело. – 1988. – №5. – С.59-62.

3. Костюк В.А., Потапович А.И. Биорадикалы и биоантиоксиданты. – Минск, 2004. – 174 с.

4. Оленников Д.Н., Зилфикаров И.Н., Торопова А.А., Ибрагимов Т.А. Химический состав сока каллизии душистой (*Callisia fragrans* Wood.) и его антиоксидантная активность (in vitro) // Химия растительного сырья. – 2008. – №4. – С.95-100.

5. Chen A.-S., Taguchi T., Sakai K., et al. Antioxidant activities of chitibiose and chititriose // Biol. Pharm. Bull. – 2003. – Vol. 26. №9. – P.1326-1330.

6. Govindarajan R., Rastogi S., Vijayakumar M. Studies on the antioxidant activities of *Desmodium gagenticum* // Biol. Pharm. Bull. – 2003. – Vol. 26. №10. – P.1424-1427.

7. Olennikov D.N., Tankhaeva L.M. Lamiaceae carbohydrates. I. Pectinic substances and hemicelluloses from *Mentha x piperita* // Chem. Nat. Comp. – 2007. – Vol. 43. №5. – P.501-507.

8. Seyoum A., Asres K., El-Fiky F.K. Structure-radical scavenging relationships of flavonoids // Phytochemistry. – 2006. – Vol. 67. №18. – P.2058-2070.

9. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease // Int. J. Biochem. Cell Biol. – 2007. – Vol. 39. №1. – P.44-84.

Информация об авторах: 670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6, ИОЭБ СО РАН, ОБАВ, тел. (3012) 433463, e-mail: anyuta-tor@mail.ru, Торопова Анюта Алексеевна – научный сотрудник, к.б.н.; Батоцыренова Эльвира Токтохоевна – аспирант; Оленников Даниил Николаевич – старший научный сотрудник, к.фарм.н.; Танхаева Лариса Максимовна – старший научный сотрудник, к.фарм.н.; Шантанова Лариса Николаевна – заведующий лабораторией, д.б.н., профессор; Николаев Сергей Матвеевич – заведующий отделом, д.м.н., профессор.

DOI: 10.24411/2074-5036-2019-10027

УДК 574.577

Ключевые слова: ашваганда, астрагал, каллусные культуры, микроклоны, биологическая активность, цитотоксичность, фунгицидная активность

Key words: callus cultures, microclones, biological activity, cytotoxicity, fungicidal activity *Astragalus Dasyanthus* Pall, *Withania somnifera* L.

Калашникова Е.А.¹, Киракосян Р.Н.¹, Зайцева С.М.²

ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ И ФУНГИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ РАСТЕНИЙ АШВАГАНДЫ И АСТРАГАЛА В УСЛОВИЯХ IN VITRO

CYTOTOXICITY AND FUNGICIDAL ACTIVITY OF EXTRACTS OBTAINED FROM PLANTS OF ASHWAGANDA AND ASTRAGALUS IN VITRO

¹Российский Государственный аграрный университет МСХА имени К.А. Тимирязева

Адрес: 127550 Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, дом 49

Russian State agrarian university-MTAA named after K. A. Timiryazev

Address: 127550 Russian Federation Moscow, Timiryazevskaya street, 49

²Московская Государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии МВА имени К.И. Скрябина

Адрес: 109472, Российская Федерация, г. Москва, ул. Академика Скрябина, д. 23

Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology named after K. I. Skryabin

Address: 109472, Russian Federation, Moscow, Akademika Skryabina street, d. 23

Калашникова Елена Анатольевна д.б.н. профессор. E-mail: Kalash0407@mail.ru

Kalashnikova Elena Anatol'evna. Doctor in Biological Sciences, Professor. E-mail: Kalash0407@mail.ru

Киракосян Рима Нориковна, к.б.н., доцент. E-mail: Mia4129@mail.ru

Kirakosyan Rima Norikovna. Associate Professor, PhD. In Biological Science. E-mail Mia4129@mail.ru

Зайцева Светлана Михайловна к.б.н., доцент. E-mail: Smzaytseva@yandex.ru

Zaytseva Svetlana Mikhailovna, Associate Professor, PhD. In Biological Science. E-mail: Smzaytseva@yandex.ru

Аннотация. При изучении микроклонов и каллусной ткани лекарственных растений выяснили, что в условиях *in vitro* сохраняются фунгицидная активность и цитотоксичность, присущая интактным растениям. Растительные экстракты, полученные из микроклонов растений *Astragalus Dasyanthus* Pall, *Withania somnifera* L., оказывали более высокое цитотоксическое действие на раковые клетки человека, чем экстракты, полученные из каллусной ткани. Фунгицидная активность экстрактивных веществ микроклонов также была выше, чем каллусных культур.

Summary. In the study of microclones and callus tissue of medicinal plants it was found that fungicidal activity and cytotoxicity inherent in intact plants is preserved *in vitro*. Plant extracts obtained from microclones of plants *Astragalus Dasyanthus* Pall, *Withania somnifera* L. have a higher cytotoxic effect on human cancer cells than extracts obtained from callus tissue. The fungicidal activity of extractive substances of microclones was also higher than that of callus cultures.

Введение

Благодаря физиолого-биохимическим особенностям растительного метаболизма, где помимо реакций первичного обмена, синтезируются разнообразные вещества вторичного происхождения, обладающие высокой биологической активностью, целебные свойства растений широко используются в фитотерапии. Растения образуют чрезвычайно разнообразный спектр вторичных веществ, обуславливающих обширное терапевтическое действие их экстрактивных веществ. В фитофармакогнозии – одной из основных фармацевтических наук, изучающей растительное сырье для научной меди-

цины, в том числе и ветеринарной, известны гепатопротекторные, нейрорегуляторные, капилляроукрепляющие, желчегонные и противоопухолевые и многие другие свойства растительного сырья [1].

Как правило наиболее ценные для фитофармакогнозии растения характеризуются ограниченным ареалом и специфическими условиями произрастания и отнесены к малочисленным исчезающим видам. В связи с этим, одним из перспективных направлений биотехнологии является сохранение биоразнообразия редких, лекарственных, а также исчезающих форм растений и создание на их основе генетических банков

in vitro. Успешно решить эту задачу позволяет применение метода клонального микро-размножения, благодаря которому в кратчайшие сроки возможно получить большое количество растений-регенератов генетически идентичных исходному виду при ограниченных ресурсах исходного материала. Кроме того, растительные культуры *in vitro* используются в биотехнологии не только в качестве модельного объекта, но в качестве источника ценных биологически активных веществ, которые успешно применяются в фармацевтической промышленности, а также для изучения вторичного метаболизма [5].

Перспективными объектами для изучения вторичного метаболизма, в том числе и в строго контролируемых условиях *in vitro*, являются такие растения, как астрагал (*Astragalus Dasyanthus Pall.*) и ашваганда (*Withania somnifera L.*). Особенности их вторичного метаболизма и способность к образованию богатого спектра веществ, в том числе и фенольной природы, обуславливает широкое терапевтическое действие экстрактивных веществ указанных растений [4]. Астрагал содержит флавоноиды, кумарины, тритерпеноидные сапонины, полисахариды и микроэлементы. На его основе получают настои для лечения начальных форм гипертонической болезни, недостаточности кровообращения и острых гламерунефритов, отмечено фунгицидное действие. Растения ашваганды на протяжении нескольких тысячелетий применяют в народной медицине при лечении заболеваний, вызванных оксидативным стрессом. Ашваганда также известна под несколькими другими названиями, такими, как индийский женьшень и зимняя вишня. В аювердической медицине растения ашваганды считаются одной из самых ценных и основополагающих культур, обладающих иммуномодулирующими, регенеративными и омолаживающими свойствами. Это обусловлено тем, что во всех частях растения (листьях, коре, плодах, семенах, и в большей степени в корне) синтезируются разнообразные вещества вторичного метаболизма – полифенолы и их гликозиды, сапонины, стероидные лактоны, олигосахариды, витанолид, а также свобод-

ный витаферин А (агликон), обладающий цитотоксическим действием [8].

Помимо описанных выше терапевтических действий, с давних времен эти растения известны в ветеринарии как весьма ядовитые растения для пасущихся животных, которые способны причинить значительный экономический ущерб и от непосредственной гибели животных. Зачастую у животных отмечается пристрастие к астрагалу. Они с большим удовольствием поедают астрагал, выискивая его в травостое, несмотря на патологические последствия и высокую смертность вследствие отравления. Животные, отравившиеся астрагалом, становятся апатичными, вялыми с прогрессирующей общей слабостью, наблюдается угнетение дыхания, потеря голоса, кашель, скрежет зубами и затруднение проглатывания корма.

Токсикология ядовитых растений тесно связана с биологическими науками – ботаникой, физиологией и биохимией растений, а также ветеринарными дисциплинами, прежде всего, с кормопроизводством и кормлением сельскохозяйственных животных.

Таким образом, изучение вторичного метаболизма растений имеет важное значение не только для фитотерапии, но и для токсикологии с целью обеспечения эффективного и безопасного кормопроизводства. Кроме того, вторичные метаболиты растений оказывают непосредственное влияние на успешность проведения исследований на культуре *in vitro*. Такие культуры в дальнейшем могут быть использованы для воспроизводства растений-регенератов генетически идентичных исходному виду, а также служить источником уникальных биологически активных веществ для фармацевтической промышленности [6]. Однако данных об образовании соединений, обладающих фунгицидными и цитотоксическими свойствами в интактных растениях и в культурах *in vitro*, не много.

В связи с тем, что в литературе практически отсутствуют данные об образовании вторичных веществ в микроклонах лекарственных растений *Astragalus Dasyanthus Pall* и *Withania somnifera L.*, то целью нашего исследования являлось изучение морфоген-

нетического потенциала данных растений и установление биологической активности их экстрактов *in vitro*, в качестве потенциальных источников высокоэффективных лекарственных препаратов, применяемых и для ветеринарной медицины.

Методы и материалы

Материалом для работы служили растения астрагала (*Astragalus Dasyanthus Pall*) и ашваганды (*Withania somnifera L.*) произрастающих в природных условиях и на территории Главного ботанического сада РАН (Москва). В качестве эксплантов использовали семена, побеги, почки и листовые пластинки, которые культивировали на питательной среде Мурасига и Скуга, содержащей вещества с цитокининовой (БАП, 2ip, кинетин (0,5 -1,0 мг/л)) и ауксиновой (НУК 0,5-1,0 мг/л, ИМК и ИУК 1-7 мг/л) активностью. Растительный материал выращивали в условиях световой комнаты, где поддерживалась температура $25\pm 2^\circ\text{C}$, 16-часовой фотопериод, освещение белыми люминесцентными лампами OSRAM L36/25 с интенсивностью освещения 3,5 тыс. лк. Для укоренения микропобегов использовали модифицированную питательную среду Мурасиге и Скуга, содержащую $\frac{1}{2}$ нормы макросолей, а также сахарозу 20 г/л и ИУК 1 мг/л.

Для определения цитотоксического эффекта растительных экстрактов использовали МТТ-тест. Работу проводили в 96-луночном плейте. В каждую лунку вносили раковые клетки в количестве $2\cdot 10^4$ клеток/лунка, добавляли 100 мкл питательной среды и инкубировали в течение 1 часа. Лиофильно высушенные спиртовые экстракты растений-регенерантов (ашваганды и астрагала) растворяли в DMSO до концентрации 5000 мкг/мл, после чего проводили разбавление раствора до 50 мкг/мл и полученные концентрации в дальнейшем наносили на раковые клетки человека. К содержимому каждой лунки добавляли по 25 мкл МТТ (4 мг/мл в PBS), который первоначально был профильтрован, после чего проводили инкубацию в CO₂-инкубаторе в течение 4 часов. После этого в каждую лунку добавляли по

50 мкл SDS (20% SDS на воде с 0,02 N HCl или H₂SO₄) и инкубировали в течение ночи. Затем измеряли оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 570 и 650 нм. В качестве объекта исследования была взята линия клеток M-HeLa (эпителиоидная карцинома шейки матки человека, сублиния HeLa, клон M HeLa, коллекция Института цитологии РАН, Санкт-Петербург). В контрольном варианте экстракты не вносили.

Определение фунгицидной активности растительных экстрактов проводили на чистой культуре грибов рода *Fusarium*, в частности *Fusarium culmorum* (штамм M-10-1, выделенный из растений пшеницы, 2009, Московская область) и *Fusarium sporotrichioides* Sherd (штамм OP-14-1, выделенный из растений пшеницы, 2014, Орловская область).

Данные штаммы были выделены и идентифицированы сотрудниками лаборатории микологии Института фитопатологии РАН.

Для эксперимента использовали живые культуры грибов рода *Fusarium L.* (*Fusarium culmorum*, *Fusarium sporotrichioides*), длительно хранившиеся в холодильнике при температуре $+4^\circ\text{C}$, первоначально размножали на питательной среде, содержащей минеральные соли по прописи МС, не содержащей фитогормоны. Выращивали грибы в чашках Петри в условиях световой комнаты при температуре 25°C , 16-часовом фотопериоде, при интенсивности света 3000 лк. Пересадку осуществляли при необходимости на 5-7 сутки в ламинарном боксе. Растворенный в DMSO сухой растительный остаток, полученный из экстрактов, добавляли в состав питательной среды уже после ее автоклавирования.

Концентрация экстракта составила 30, 60, 100 мг/л. Контролем служила среда без экстракта, а также чистый растворитель (DMSO). Фунгицидную активность растительных экстрактов определяли по росту мицелий гриба. Для этого на 7-е сутки культивирования проводили измерение диаметра гриба в двух плоскостях.

Результаты и обсуждения

Поскольку растения *Astragalus Dasyanthus Pall*, *Withania somnifera L.* относятся к цен-

ФАРМАКОЛОГИЯ И ТОКСИКОЛОГИЯ

ным немногочисленным видам и имеют ограниченный ареал распространения в природе, то большое практическое значение приобретает получение культур *in vitro*, как возможных источников биологически активных веществ и лекарственных препаратов. Известно, что каллусогенез является сложным процессом, который непосредственно зависит от применяемых гормонов, их концентрации, типа первичного экспланта и исследуемого генотипа. Отмечены некоторые особенности и закономерности в способности листовых эксплантов к каллусогенезу. Как правило, этот процесс начинался с периферийной зоны листа, а также в местах прикрепления черешка. По мере культивирования дифференцированные клетки листа полностью превращались в дедифференцированные и было отмечено активное формирование каллусной ткани.

Исследования показали, что гормональный состав питательной среды приводил к изменению морфофизиологических процессов, которые проявлялись в формировании каллусной ткани в основании первичного экспланта с последующей регенерацией растений, в индукции развития меристем. Микроклоны во всех случаях характеризовались интенсивным ростом, формированием мощной наземной биомассы и высоким коэффициентом размножения (Рис.1 А-Ф).

На основании многоплановых исследований по влиянию различных регуляторов роста на клональное микроразмножение изучаемых растений были установлены наилучшие сочетания гормонов и их концентрации, приводящие к максимальному пролиферативному эффекту. Для этих растений высокий коэффициент размножения, интенсивный рост пазушных меристем и формирование хорошо развитых побегов были отмечены на среде, содержащей БАП 0,5 мг/л в сочетании с ИУК 0,5 мг/л. Кроме того, для ашваганды высокие положительные результаты были получены и на среде, содержащей препарат Дропн (0,01 мг/л).

Как следует из анализа литературных источников, для растений ашваганды (*Withania somnifera*) и астрагала (*Astragalus Dasyanthus Pall*) в комплексе вторичных метаболитов преобладают такие вещества, как полифенолы, обладающие в том числе фунгицидным действием и противораковой активностью [7].

Поэтому изучение действия экстрактов данных растений на раковые клетки человека, является актуальным направлением и может служить косвенным признаком биосинтетической способности растений к образованию вторичных веществ обладающих не только биологической активностью, но и цитотоксическим действием. В нашей работе была изучена цитотоксичность экстрактов,

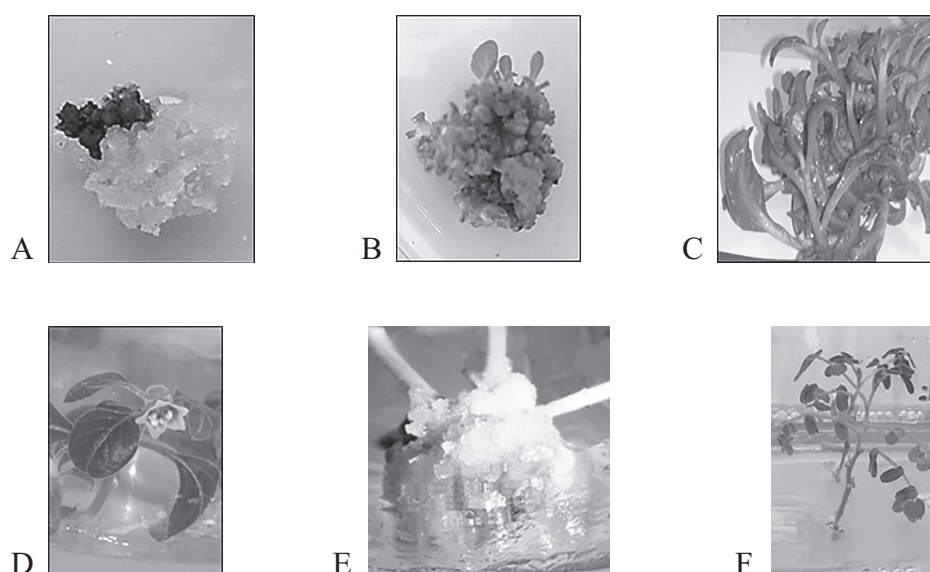


Рис. 1. А – каллусная ткань ашваганды, В – регенерация растений на каллусной ткани ашваганды, С, D – микроклон ашваганды Е – каллусная ткань астрагала, F – микроклон астрагала

полученных из растений-регенерантов ашваганды и астрагала, а также каллусной ткани ашваганды (Рис 2).

В результате проведенных исследований было установлено, что растительные экстракты, полученные из растений-регенерантов ашваганды и астрагала, при разных концентрациях обладают различной цитотоксичностью. Как следует из полученных результатов, малые концентрации экстрактов (50 мкг/мл) были не токсичны для исследуемых раковых клеток, о чем свидетельствует 100%-ное их выживание при использовании двух изучаемых экстрактов. Однако, по мере повышения концентрации цитотоксический эффект экстрактов начинал проявляться. Для экстрактов ашваганды, уже при концентрации 250 мкг/мл наблюдали гибель более 40% раковых клеток, а при концентрации 500 мкг/л и выше гибель раковых клеток была в пределах 90-95%.

Что касается экстрактов астрагала, то наибольшей цитотоксичностью обладали экстракты при концентрации 1000 мкг/л, когда выживаемость исследуемых раковых клеток составляла менее 10%, при этом концентрации экстракта 500 мкг/л также характеризовалась высоким цитотоксическим эффектом.

Так как наибольшей цитотоксичностью обладали растения – регенеранты ашваганды, было принято решение именно на культуре каллусной ткани этого растения проследить изменения цитотоксического эффекта в недеференцированных клетках. Результаты наших исследований растительных экстрактов, полученных из каллусной ткани, свидетельствуют, что цитотоксический эффект был слабо выражен и максимальная гибель раковых клеток (не более 24%) была отмечена лишь при самых высоких концентрациях экстракта – 5000 мкг/мл (Рис. 3). О том, что на основе продуктов вторичного метаболизма растений получают высокоэффективные лекарственные препараты для успешной терапии онкологических заболеваний, не раз сообщалось в литературе.

Полученные результаты могут служить косвенным признаком, характеризующим биосинтетический потенциал культур *in vitro* к образованию продуктов вторичного синте-

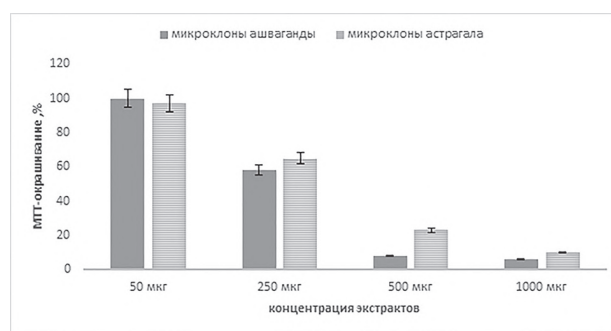


Рис. 2. Влияние различных концентраций растительных экстрактов микрклонов ашваганды и астрагала на жизнеспособность раковых клеток человека

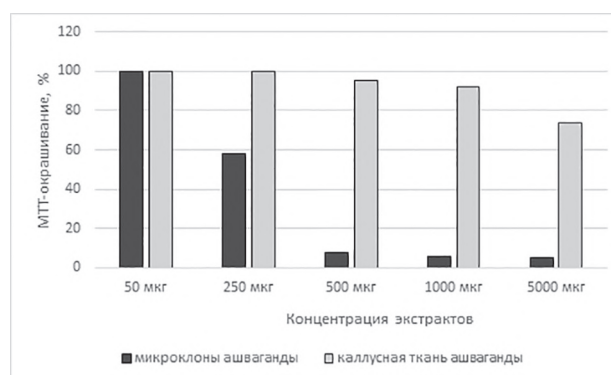


Рис. 3. Влияние различных концентраций растительных экстрактов микрклонов и каллусной ткани ашваганды на жизнеспособность раковых клеток человека

за. Выявленные особенности клеток к синтезу вторичных метаболитов, обладающих цитотоксичностью, обусловлены тем, что в клетках целого растения вторичные метаболиты образуются в строго дифференцированных клетках и этот процесс находится под контролем регуляторных систем растительного организма. Иное дело обстоит с дедифференцированными клетками (каллусная ткань), которые постоянно делятся и не переходят в дифференцированное состояние. Вследствие чего в каллусной ткани биосинтез ряда вторичных метаболитов может быть нивелирован, вплоть до его полного терминирования. Об изменении и угнетении вторичного метаболизма каллусных тканей еще несколько десятилетий назад сообщалось в научной литературе [3]. Согласно многочисленным исследованиям, данным процессом можно эффективно управлять, изменяя условия культивирования, например, химические факторы питательной среды (минеральные соли, гормоны), физические внешние факторы (спектральный состав света и

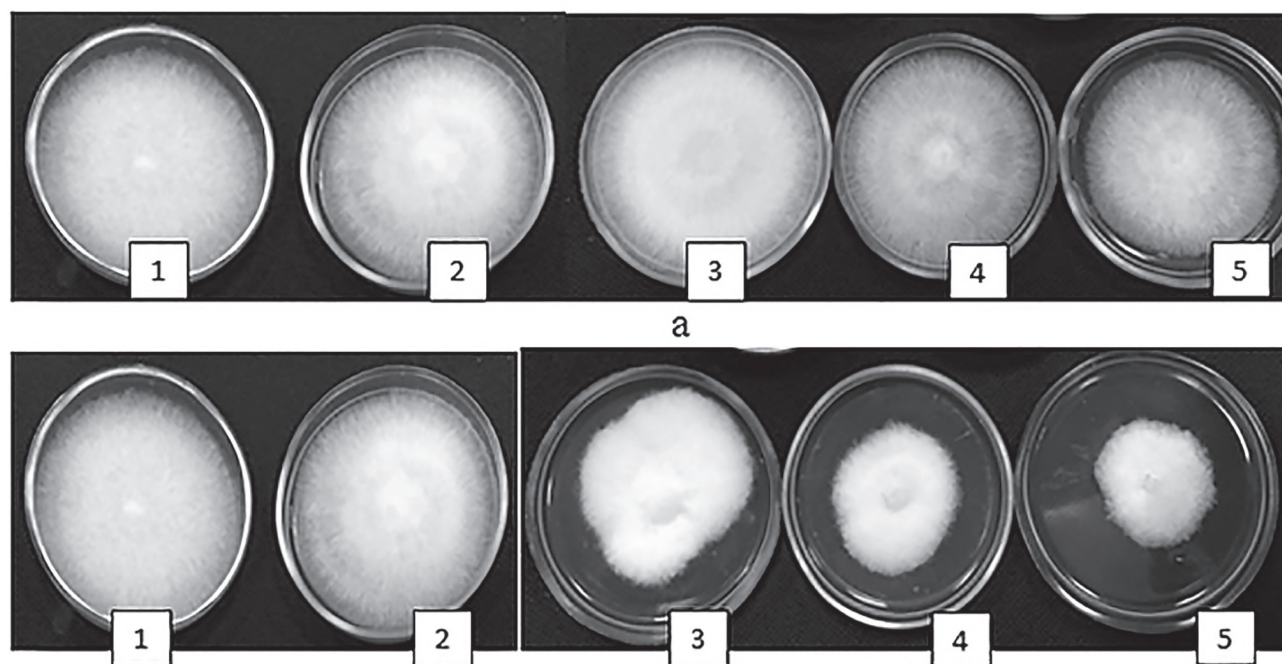


Рис. 4. Влияние различных концентраций экстрактов ашваганды на рост *Fusarium culmorum*, штамм М-10-1: а – экстракт, полученный из каллусной ткани, б – экстракт, полученный из растений – регенерантов

его интенсивность, рН питательной среды, температурный режим выращивания) или создавая стрессовые условия (присутствие факторов абиотической и биотической природы).

Кроме того, наши исследования показали, что изучаемые экстракты обладают антифунгицидной активностью, которая зависит от источника получения экстракта, его концентрации, а также от исследуемого штамма фитопатогена. Так, было установлено, что исследуемые экстракты оказали различное токсическое действие на рост мицелия гриба *Fusarium culmorum* и *Fusarium sporotrichioides* Sherd. Следует отметить, что экстракты, полученные из каллусной ткани, обладали меньшей антифунгицидной активностью (Рис. 4), по сравнению с экстрактами, полученными из растений-регенерантов. Причем данная ответная реакция изучаемых фитопатогенов (*Fusarium sporotrichioides* Sherd, *Fusarium culmorum*) на действие двух экстрактов различных видов растений была практически одинаковой (Рис 5).

Заключение

На основе изложенного выше, можно заключить что культуры *in vitro* исследованных растений обладают способностью к биосин-

тезу вторичных соединений, обладающих высокой цитотоксичностью и фунгицидной активностью, что, несомненно, имеет важное практическое значение как потенциальный источник ценных биологически активных веществ для фарминдустрии. Причем в условиях *in vitro* при образовании биологически активных веществ сохраняется специфичность, приуроченная к организованным тканям интактных растений, но в менее выраженной степени [2]. Указанные свойства растительных тканей, произрастающих в строго контролируемых условиях, находят подтверждение и в цитотоксических исследованиях, когда дедифференцированные каллусные культуры отличались наименьшим

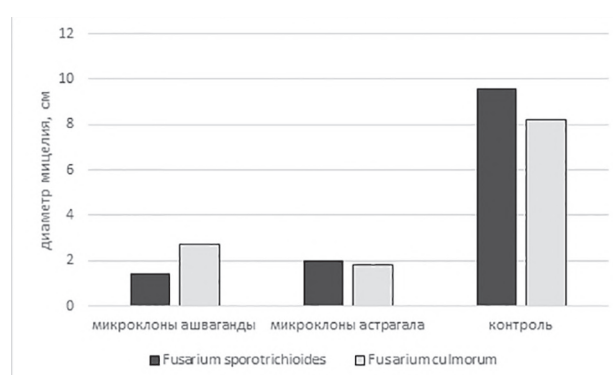


Рис. 5. Влияние растительных экстрактов микроклонов ашваганды и астрагала в концентрациях 100 мг/л на рост мицелия грибов рода *Fusarium* L.

эффектом. Наши исследования показали, что вторичные метаболиты могут оказывать не только ингибирующий эффект на рост раковых клеток человека, но и могут быть стимуляторами различных морфофизиологических процессов, о чем свидетельствует ряд литературных источников [9,10].

Список литературы

1. Алексеева, Г.М. Фармакогнозия. Лекарственное сырье растительного и животного происхождения. Санкт-Петербург. СпецЛит. – 2013.
2. Доан Тху Тхуи. О способности микрочлонов лекарственных растений на примере *Dioscorea caucasica* Lipsky к образованию биофлаваноидов / Доан Тху Тхуи, Е.А. Калашникова, С.М. Зайцева, Р.Н. Киракосян // Естественные и технические науки. – 2018. – №2. – С. 38.
3. Запрометов М.Н. Образование фенольных соединений в процессе дифференциации в каллусной культуре чайного растения / М.Н. Запрометов, Н.В. Загоскина, В.Ю. Стрекова, Г.А. Морозова // Физиология растений. – 1979. – №26. – С. 485–491.
4. Куркин, В.А. Фенилпропаноиды – перспективные природные биологически активные соединения / В.А. Куркин // Самара: Изд. Гос. Мед. Ун-т. – 1996. – С. 31-37.
5. Носов, А.М. Регуляция синтеза вторичных соединений в культуре клеток растений / А.М. Носов // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. Под редакцией Р.Г. Бутенко. – М.: Наука. – 1991.
6. Носов А.М. Использование клеточных технологий для промышленного получения биологически активных веществ растительного происхождения / А.М. Носов // Биотехнология, – 2010. – №5. – С. 8-28.
7. Alves C.T. Antifungal activity of phenolic compounds identified in flowers from North Eastern Portugal against *Candida* species / Alves C.T., Ferreira I., Barros L., Silva S., Azeredo J., Henriques M. // Future Microbiol. – 2014. – 9(2). P. 139-146
8. Devi, P.U. *Withania somnifera* dunal (ashwagandha): potential plant source of a promising drug for cancer chemotherapy and radiosensitization. / P.U.Devi // Indian J. Exp Biol. – 1996. – 34. – P. 927-932.
9. Jeong, H. Molecular Discrimination of Medicinal *Astragali Radix* by RAPD Analysis. Immunopharmacology and Immunotoxicology / H. Jeong, J. Um, S. Kim, K. Koh, W. Hwang, K. Lee, C. Kim, H. Kim // Pakistan Journal of Biological Sciences, – 2015. – 310 p.
10. Zengqi Li. The synthesis and storage of phenolic compounds in the root and rhizome of *Echinacea purpurea* / Zengqi Li, Tiexin Tang, Shejian Liang, Xiping Ning, Mei Bai, Hong Wu // American journal of Plant Sciences. – 2012. – 3– P. 551–558.

Associations of green tea, coffee, and soft drink consumption with longitudinal changes in leukocyte telomere length

Inhae Sohn¹, Chol Shin²✉ & Inkyung Baik¹✉

Whether beverage consumption is associated with longitudinal observation of telomere length remains unclear. We evaluated the association of green tea, coffee, and soft drink consumption with 6-year changes in leukocyte telomere length (LTL). The study included 1952 participants who provided whole blood samples for LTL assays during the baseline (year 2011–2012) and follow-up (year 2017–2018) periods and reported baseline information on consumption of green tea, coffee, and soft drinks. Robust regression analysis was used to analyze the association adjusted for potential confounding variables. In the results, an inverse association between green tea consumption and LTL changes from baseline, which indicate telomere shortening, was found; regression coefficient [95% confidence interval] was -0.097 [-0.164 , -0.029] for participants who daily consumed at least 1 cup of green tea compared with non-consumers (p value = 0.006). This association was stronger among women (versus men) and younger participants aged 50–64 years (versus older). However, a positive association between soft drink consumption and LTL shortening was observed among women (p value < 0.05). Coffee consumption was not associated with LTL changes. These findings suggested that green tea consumption may be protective against telomere shortening reflecting biological aging whereas coffee and soft drink consumption may not.

Telomeres consisting of repeated DNA sequences (TTAGGG) are known to play a role in protecting the ends of human chromosomes from fusions and degradation. As cells replicate, telomere length shortens due to the end-replication problem leading to cellular senescence^{1,2}. Recently, many epidemiological studies measured leukocyte telomere length (LTL) as a useful marker of biological aging and accumulating data showed an inverse association between LTL and chronological age³. Some studies have provided data on the association of LTL with obesity, diabetes mellitus, hypertension, cardiovascular diseases, dementia, and cancer, including all-cause mortality^{4–9}.

It was reported that LTL is influenced by genetic and lifestyle factors, including diet and alcohol consumption^{10–13}. A few studies showed a significant association of LTL with the consumption of beverages, such as tea¹⁴, coffee¹⁵, and sweetened beverages^{12,16}. These associations were analyzed in cross-sectional data while longitudinal data regarding changes in LTL are still limited. There is one intervention study which has observed LTL changes with beverage consumption as an exposure and found increased LTL in obese women with two-month green tea supplementation¹⁷. Although this study used a high dose of supplementation equivalent to at least 10 cups/day of green tea for a short period, it provides primary data to support the association between green tea consumption and longitudinal changes in LTL. Based on previous epidemiological studies reporting the significant associations of mortality with green tea and coffee consumption¹⁸ as well as with LTL changes^{19,20}, it is worthy to investigate the link between these beverages and LTL changes in terms of exploring implications for lifestyle factors related to longevity.

The present study, which was embedded in a population-based cohort study, conducted repeated assays of LTL and aimed to investigate the association of green tea, coffee, and soft drink consumption with cross-sectional LTL and longitudinal changes in LTL during a six-year period among middle-aged and older Korean men and women. Furthermore, it evaluated whether the association results are different according to age groups and sex.

¹Department of Foods and Nutrition, College of Science and Technology, Kookmin University, 77 Jeongneung-ro, Songbuk-gu, Seoul 02707, Korea. ²Department of Internal Medicine, Korea University Ansan Hospital, 123 Jeokgeum-ro, Danwon-gu, Ansan 15355, Korea. ✉email: chol-shin@korea.ac.kr; ibaik@kookmin.ac.kr

Results

Characteristics, including beverage consumption status of the study participants, were compared across the tertile groups of LTL changes (Table 1). According to higher tertiles indicating greater LTL shortening, baseline values were greater whereas follow-up values of LTL were less. Participants with greater LTL shortening were more likely to be males and current smokers and consumed less green tea (p value for trend < 0.05). Compared with participants in the first and second tertiles, those in the top tertile tended to have less consumption of green tea and brewed coffee but consumed greater amount of instant coffee and soft drinks. Those in the second tertile showed greatest consumption of other types of tea.

Cross-sectional and longitudinal associations between beverage consumption and LTL. A supplemental table shows results regarding the association between beverage consumption and cross-sectional observations for LTL (Supplemental Table S1). No significant association between beverage consumption and baseline LTL was observed. In the multiple model for follow-up LTL, participants with green tea consumption ≥ 7 cups/week showed longer LTL values compared with those who did not drink green tea ($p < 0.05$).

Table 2 presents regression coefficient estimates and their 95% confidence intervals (95% CI) for the association between beverage consumption and longitudinal observations for LTL. As shown, green tea drinkers showed less LTL shortening during the six-year period compared with nondrinker ($p < 0.01$). After further adjustment of the baseline LTL in the multiple model, this significant association was not changed (data available upon request). No significant association was observed for other beverages.

Stratified analyses by age groups and sex for the longitudinal association between beverage consumption and LTL. Results of the association between beverage consumption and LTL changes stratified by age groups are shown in Table 3. As shown, a significant inverse association between green tea consumption ≥ 7 cups/week and LTL shortening was solely observed among participants younger than 65 years ($p < 0.01$). However, no significant association was observed among older participants. Because this null association might be partly due to a small number of those with 65 years or older, we re-analyzed data using 60 years as a cutoff point of age and observed similar results (data available upon request). Other types of beverages consumed were not associated with LTL shortening.

Variables	All participants		Tertile of changes in leukocyte telomere length			p value for trend
	[median]		1st tertile	2nd tertile	3rd tertile	
Number of participants (%)	1952 (100)		650 (33.3)	651 (33.4)	651 (33.4)	
Baseline and follow-up LTL data						
LTL changes ¹	-0.03 ± 0.54	[-0.02]	-0.58 ± 0.37	-0.02 ± 0.10	0.52 ± 0.38	< 0.001
Baseline LTL	1.08 ± 0.40	[0.98]	0.86 ± 0.25	0.97 ± 0.22	1.40 ± 0.46	< 0.001
Follow-up LTL	1.10 ± 0.40	[1.02]	1.44 ± 0.43	0.99 ± 0.23	0.88 ± 0.25	< 0.001
Baseline data of characteristics						
Age, years	58.1 ± 6.9	[56.0]	58.4 ± 7.0	58.0 ± 6.8	57.8 ± 6.7	0.12
Men, %	50.0		46.3	50.5	53.2	< 0.05
Low income ² , %	17.0		18.9	16.3	15.9	0.16
Employed, %	34.9		30.9	37.2	36.6	< 0.05
Body mass index, kg/m ²	24.7 ± 3.0	[24.6]	24.7 ± 3.0	24.7 ± 2.9	24.8 ± 3.0	0.80
Current smoker, %	12.5		9.9	13.5	14.0	0.02
Current alcohol drinker, %	48.7		45.4	50.2	50.5	0.06
Physical activity, met-h/day	40.9 ± 6.3	[40.0]	40.9 ± 5.9	40.7 ± 6.4	41.1 ± 6.6	0.65
Presence of hypertension, %	34.1		33.7	33.5	35.2	0.57
Presence of diabetes mellitus, %	18.1		17.9	18.0	18.4	0.78
White blood cell counts, thousand/uL	5.1 ± 1.5	[4.9]	5.0 ± 1.5	5.1 ± 1.4	5.2 ± 1.5	0.06
Beverage consumption, cup/week						
Green tea	1.8 ± 6.2	[0]	2.1 ± 6.2	2.0 ± 7.4	1.4 ± 4.5	0.04
Other types of tea ³	0.27 ± 2.81	[0]	0.19 ± 1.61	0.49 ± 4.34	0.14 ± 1.51	0.77
Brewed coffee	2.5 ± 7.1	[0]	2.5 ± 7.0	3.0 ± 7.9	2.1 ± 6.2	0.38
Instant coffee	8.9 ± 11.6	[7]	8.6 ± 11.5	8.9 ± 11.5	9.4 ± 11.9	0.80
Soft drink	0.17 ± 1.46	[0]	0.16 ± 1.75	0.13 ± 0.86	0.20 ± 1.60	0.61

Table 1. Characteristics of the 1952 participants according to tertile groups of six-year changes in leukocyte telomere length. Values are mean \pm standard deviation or %. ¹Changes were calculated by subtracting the follow-up value from the baseline value of telomere length (baseline value – follow-up value) and its positive value indicates telomere shortening. ²Monthly household income less than 1,500,000 won (approximately equal to 1300 dollars). ³Black tea, oolong tea, and other teas.

Beverage consumption			Age, sex, WBCC adjusted model	Multiple model ⁴
Types	Categories	N ²	Estimate ³ (95% CI)	Estimate ³ (95% CI)
Green tea	None	1505	Reference	Reference
	< 7 cups/week	227	- 0.024 (- 0.090, 0.043)	- 0.021 (- 0.089, 0.044)
	≥ 7 cups/week	220	- 0.094 (- 0.161, - 0.027) ⁶	- 0.097 (- 0.164, - 0.029) ⁶
Others ⁵	None	1910	Reference	Reference
	≥ 1 cup/month	42	- 0.054 (- 0.199, 0.090)	- 0.052 (- 0.197, 0.093)
Brewed coffee	None	1563	Reference	Reference
	< 14 cups/week	217	0.035 (- 0.033, 0.103)	0.037 (- 0.031, 0.105)
	≥ 14 cups/week	172	- 0.030 (- 0.106, 0.045)	- 0.030 (- 0.105, 0.046)
Instant coffee	None	755	Reference	Reference
	< 14 cups/week	518	- 0.001 (- 0.054, 0.052)	- 0.001 (- 0.054, 0.053)
	≥ 14 cups/week	679	- 0.009 (- 0.061, 0.043)	- 0.012 (- 0.064, 0.041)
Soft drink	None	1870	Reference	Reference
	≥ 1 cup/month	82	- 0.009 (- 0.115, 0.096)	- 0.008 (- 0.113, 0.098)

Table 2. Association between beverage consumption and 6-year changes¹ in leukocyte telomere length. CI confidence interval, WBCC white blood cell counts. ¹Changes were calculated by subtracting the follow-up value from the baseline value of telomere length (baseline value – follow-up value) and its positive value indicates telomere shortening. ²Number of participants. ³Regression coefficient estimate. ⁴Model adjusted for age, sex, monthly household income status, employment status, body mass index, smoking status, alcohol consumption status, physical activity, white blood cell counts, and presence of hypertension or diabetes mellitus. ⁵Black tea, oolong tea, and other types of tea. ⁶*p* value = 0.006.

Beverage consumption		Model ³ for < 65 years		Model ³ for ≥ 65 years	
Types	Categories	N ²	Estimate ⁴ (95% CI)	N ²	Estimate ⁴ (95% CI)
Green tea	None	1578		374	
	< 7 cups/week	1198	Reference	307	Reference
	≥ 7 cups/week	189	- 0.003 (- 0.075, 0.070)	38	- 0.118 (- 0.292, 0.055)
Others ⁵	None	1542	Reference	29	0.052 (- 0.147, 0.252)
	≥ 1 cup/month	36	- 0.112 (- 0.268, 0.043)	6	0.154 (- 0.263, 0.571)
Brewed coffee	None	1222	Reference	368	Reference
	< 14 cups/week	197	0.031 (- 0.041, 0.102)	341	Reference
	≥ 14 cups/week	159	- 0.042 (- 0.120, 0.036)	20	0.167 (- 0.069, 0.403)
Instant coffee	None	586	Reference	13	0.047 (- 0.242, 0.336)
	< 14 cups/week	414	0.007 (- 0.053, 0.066)	169	Reference
	≥ 14 cups/week	578	- 0.009 (- 0.066, 0.048)	104	- 0.039 (- 0.165, 0.088)
Soft drink	None	1504	Reference	101	- 0.034 (- 0.172, 0.104)
	≥ 1 cup/month	74	- 0.013 (- 0.123, 0.097)	366	Reference
				8	- 0.153 (- 0.531, 0.224)

Table 3. Age-stratified association between beverage consumption and six-year changes¹ in leukocyte telomere length. CI, confidence interval. ¹Changes were calculated by subtracting the follow-up value from the baseline value of telomere length (baseline value – follow-up value) and its positive value indicates telomere shortening. ²Number of participants. ³Model adjusted for sex, monthly household income status, employment status, body mass index, smoking status, alcohol consumption status, physical activity, white blood cell counts, and presence of hypertension or diabetes mellitus. ⁴Regression coefficient estimate. ⁵Black tea, oolong tea, and other teas. ⁶*p* value = 0.002.

Table 4 presents results stratified by gender for the association between beverage consumption and LTL changes. A significant inverse association between green tea consumption ≥ 7 cups/week and LTL shortening was shown among women only after adjusting for potential confounding variables (*p* < 0.05). Although no association for soft drinks was observed among all participants in Table 2, a significant positive association was observed among women (*p* < 0.05). In contrast, an insignificant inverse trend was examined among men. For other beverages, no significant association was observed.

Beverage consumption		Model ³ for women		Model ³ for men	
Types	Categories	N ²	Estimate ⁴ (95% CI)	N ²	Estimate ⁴ (95% CI)
		976		976	
Green tea	None	737	Reference	768	Reference
	< 7 cups/week	140	- 0.088 (- 0.176, 0.001)	87	0.075 (- 0.028, 0.178)
	≥ 7 cups/week	99	- 0.104 (- 0.206, - 0.001) ⁶	121	- 0.083 (- 0.173, 0.006)
Others ⁵	None	953	Reference	957	Reference
	≥ 1 cup/month	23	- 0.027 (- 0.228, 0.175)	19	- 0.098 (- 0.309, 0.114)
Brewed coffee	None	738	Reference	825	Reference
	< 14 cups/week	142	0.037 (- 0.052, 0.126)	75	0.044 (- 0.067, 0.154)
	≥ 14 cups/week	96	- 0.029 (- 0.135, 0.076)	76	- 0.034 (- 0.144, 0.076)
Instant coffee	None	476	Reference	279	Reference
	< 14 cups/week	311	- 0.010 (- 0.080, 0.060)	207	0.014 (- 0.070, 0.098)
	≥ 14 cups/week	189	- 0.021 (- 0.104, 0.063)	490	- 0.009 (- 0.079, 0.060)
Soft drink	None	953	Reference	917	Reference
	≥ 1 cup/month	23	0.230 (0.030, 0.431) ⁶	59	- 0.095 (- 0.217, 0.027)

Table 4. Sex-stratified association between beverage consumption and six-year changes¹ in leukocyte telomere length. *CI* confidence interval. ¹Changes were calculated by subtracting the follow-up value from the baseline value of telomere length (baseline value – follow-up value) and its positive value indicates telomere shortening. ²Number of participants. ³Model for leukocyte telomere length adjusted for age, monthly household income status, employment status, body mass index, smoking status, alcohol consumption status, physical activity, white blood cell counts, and presence of hypertension or diabetes mellitus. ⁴Regression coefficient estimate. ⁵Black tea, oolong tea, and other teas. ⁶*p* value < 0.05.

Discussion

In this study, we evaluated six-year changes in LTL among 1952 Korean adults and its association with beverage consumption, including tea, coffee, and soft drinks. In our findings, daily consumption of green tea was inversely associated with LTL shortening, a change from baseline to follow-up values, whereas soft drink consumption was positively associated with it. In particular, these associations were more evident among women than among men. This association for green tea consumption was also significant among participants younger than 65 years. Additionally, consumption of coffee and other types of tea was associated with neither cross-sectional values nor longitudinal changes of LTL.

An earlier epidemiological study reported a positive association between tea consumption and cross-sectional values of LTL¹⁴. Although further data for the association between varied types of tea and LTL are limited, the beneficial effects of green tea, oolong, and black tea, which are favorably consumed worldwide, have been well described^{21–23}. These teas contain polyphenols, tocopherols, ascorbic acid, carotenoids, phytochemical compounds, and minerals such as Cr, Mn, Se, or Zn. Specifically, green tea contains catechins, which are polyphenolic compounds classified as flavonoids, showing robust antioxidant properties²⁴, gallic acid, and other phenolic acids²⁵. Polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCG), one of the most abundant catechins found in green tea, is a component with antioxidant and anti-inflammatory properties^{26,27}. Furthermore, compounds with antioxidant properties scavenge reactive oxygen species (ROS) and nitrogen species and chelate redox-active metal ions, which are involved in Fenton and Haber–Weiss reactions. These scavenging properties are essential because ROS attacks the G triplets in telomeres, leading to DNA cleavage and telomere attrition^{28–30}. Thus, antioxidant properties of green tea may delay telomere attrition by protecting telomeres against oxidative damage. As another mechanism, the impact of green tea compounds on telomerase may contribute to the maintenance or elongation of telomeres. According to an *in vitro* study, EGCG increased chromosomal instability (CIN) in a dose-dependent manner, reportedly correlated with telomere shortening, in colon adenocarcinoma cells, but it decreased CIN in normal colon epithelial cells, proposing different effects of EGCG on normal and malignant cells³¹. In normal cells, EGCG may inhibit telomere shortening by modifying the mechanism of telomere biology, for example, by upregulating telomerase activity. An intervention study demonstrated that obese women with green tea supplementation had increased LTL, possibly reflecting telomere lengthening¹⁷. Our study found a significant association between green tea consumption and LTL changes, in particular LTL lengthening, among women only. Biological mechanisms underlying the differential associations by sex are not fully understood. It has been suggested that men have faster attrition of telomere length than women partly due to the association of sex hormones in telomere maintenance and oxidative stress³², and thus there may be sex-specific effects of green tea on this association.

Some investigations reported conflicting data regarding the association between coffee consumption and LTL^{11,12,33}. For example, a cross-sectional study showed no association¹¹, while others observed a positive association^{12,33}. The present longitudinal study observed a significant association between soft drink consumption and LTL shortening in women. An earlier animal data³⁴ indicating that soft drink consumption induces oxidative stress may explain a biological mechanism underlying this association.

Study limitations should be considered when interpreting our findings. Telomere length was assessed in leukocytes rather than somatic cells in this study. Because it was reported that telomere shortening rates were similar in leukocytes and somatic cells³⁵, LTL has been a valuable marker of biological aging. However, based on longitudinal changes in LTL, telomere lengthening has been proposed to be limited to hematopoietic cells³⁶. We used the baseline information of beverage consumption as an exposure in this study because its follow-up information was unavailable. Under the assumption that the baseline information of beverage consumption is sustained during the study period, we analyzed its association with longitudinal changes in telomere length. Thus, the exposure of beverage consumption might be less accurate probably due to non-differential misclassification leading to weak or null associations. Thus, further investigation on coffee consumption and other beverages, except green tea, is warranted. In addition, unadjusted residual confounding factors including diet and dietary supplementations, which we were unable to observe in this study, might lead to weak or null associations.

The study findings can also be generalized to Korean adults of similar ages. Nevertheless, further studies including participants with varied ethnicities and age ranges are warranted. The strength of our study includes using a large sample size from the general population, a wide range of confounding variables, and the longitudinal observation method of LTL adopted.

Therefore, based on our findings, we suggest beneficial effects of green tea consumption and potentially disadvantageous effects of soft drink consumption on LTL shortening, which may reflect accelerated biological aging.

Methods

Study design and participants. Study participants were from an ongoing population-based prospective cohort study, a part of the Korean Genome Epidemiology Study. Detailed information on the study design and procedures is available in a previous study^{37,38}. Briefly, eligible study subjects were selected based on a two-stage cluster sampling method using the information of residential district and demographic characteristics and identified by telephone contact. They were invited to visit the Korea University Ansan Hospital on a designated date between June, 2001 and January, 2003. Finally, 5012 participants were enrolled at baseline and have been followed up biennially since February, 2003. At baseline, trained researchers conducted a questionnaire-based interview and comprehensive health examination, including anthropometric assessment, blood pressure (BP) measurement, and bio-specimen collection. The questionnaire inquired about participants' demography, medical history, health conditions, and lifestyle including smoking and alcohol drinking, and dietary intake. During the follow-up period, similar interviews and health examinations were repeated although food frequency questionnaire was not included after 2011. The Human Subjects Review Committee at the Korea University Ansan Hospital approved all study procedures and protocols, and participants signed an informed consent form during every visit (IRB number: ED0624). All methods were performed in accordance with the Declaration of Helsinki and local guidelines and regulations concerning the ethics of human research.

For the present study, initial investigation on beverage consumption, as an exposure, and LTL, as an outcome, was conducted between February, 2011 and November, 2012 (the baseline period). Then, repeated measurement of LTL was conducted between February, 2017 and December, 2018 (the follow-up period). Thus, longitudinal changes during six years between initial assays and repeated assays of LTL were observed. As recorded, 2314 cohort members completed the interview and health examination and their initial LTL were assayed. Among 84% of them, the follow-up assay of LTL were completed. Thus, 1952 participants were included in the analysis. General characteristics, except age, between participants and nonparticipants were similar.

Beverage consumption. Information on green tea, coffee, and soft drink consumption was collected during the baseline period using a caffeine food frequency questionnaire (C-FFQ), but it was not updated during the follow-up period. C-FFQ inquired consumption of 18 beverage categories, including brewed coffee, three types of instant coffee, green tea, black tea, oolong, two types of instant hot chocolate, two types of regular coke, diet coke, two types of carbonated drinks, two types of energy drink, and two types of processed milk with the information on quantified consumption frequency (one standard serving size for beverage is defined as one paper cup of 190 mL) consumed over the past year. This questionnaire was constructed based on the Fred Hutchinson Cancer Research Center Caffeine Questionnaire³⁹. We calculated average consumption per week for each beverage and generated categories considering the number of participants in each category; none, 0–14 cups/week, and ≥ 14 cups/week for brewed and instant coffee; none, 1–6 cups/week, and ≥ 7 cups/week for green tea; then none and ≥ 1 cup/week for other types of tea or soft drinks.

Measurement of leukocyte telomere length. Relative LTL was measured using quantitative real-time polymerase chain reaction⁴⁰. Genomic DNA in leukocytes was extracted from peripheral blood samples collected during the baseline and six-year follow-up periods, using a QIAamp DNA blood mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). Then, purified DNA samples were diluted and quantified using a NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). Subsequently, the ratio of telomere repeat copy number to the single-copy gene copy number (36B4 gene encoding acidic ribosomal phosphoprotein) was determined using the iQ Multi-Color Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The final concentrations of the PCR reagents were 1× SYBR Green SuperMix (Bio-Rad), 50 ng of DNA, 0.2 μ M of telomere primers (forward, 5'-GGTTTTTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGTG A GGGT-3'; reverse, 5'-TCCCGACTA TCCCTATCCC TATC CCTATCCCTATCCCTA-3') and 0.3 μ M of 36B4 primers (forward, 5'-CAGCAAGTG GGAAGGTGTAATC C-3'; reverse, 5'-CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA-3'). Reactions were conducted using telomere and 36B4 primers in the same 96-well plate, and each plate included a reference DNA sample. Finally, a four-point standard curve was established to transform the cycle threshold to nanograms of DNA. In a quality control test, coefficient of variation values were 4.4% for the intra-assay and 7.6% for the inter-assay

when 34 duplicate samples were run in two batches. To evaluate reproducibility, we obtained Pearson correlation coefficients; 0.97 ($p < 0.001$) for 34 duplicate samples, 0.98 ($p < 0.001$) for 17 duplicate samples in one batch, and 0.95 ($p < 0.001$) for 17 duplicate samples in the other batch. To calculate six-year changes in LTL, a change from baseline to follow-up values indicating LTL shortening for each individual was calculated.

Potential confounding variables. On the basis of previous studies related to main exposures and outcomes^{12,14}, we considered age, sex, body mass index (BMI), income status, smoking status, alcohol consumption status, physical activity, and presence of diabetes mellitus or hypertension as potential confounding variables. In this study, the baseline information on these confounding variables was used. Body weight and height were measured to the nearest 0.1 kg and 0.1 cm, respectively, to calculate BMI (kg/m^2). Smoking status was categorized into four groups; nonsmoker and current smoker (≤ 10 cigarettes/day, 11–20 cigarettes/day, and > 20 cigarettes/day). Alcohol consumption status was also categorized into four groups; nondrinker and current drinker (< 15 g/day, 15–30 g/day, and > 30 g/day). To assess physical activity, participants were asked to report hours spent in a typical day in sleep and five categories of activity intensity (sedentary, very light, light, moderate, vigorous), for each of which specific activities were listed. A total metabolic equivalent (MET) score was calculated by multiplying hours spent by a MET value (1.0 for sleep or sedentary, 1.5 for very light, 2.4 for light, 5.0 for moderate, and 7.5 for vigorous activity), which was an average of MET values of specific activities listed for each category⁴¹, and summing up the total. The presence of diabetes mellitus or hypertension was determined if one of the following criteria was met: use of hypoglycemic medications or fasting plasma glucose levels ≥ 126 mg/dL or postprandial glucose level ≥ 200 mg/dL; use of hypertension treatment medications or systolic BP ≥ 140 mmHg or diastolic BP ≥ 90 mmHg.

Statistical analysis. Descriptive statistics, chi-square test, and analysis of variance (ANOVA) were used to compare participants' characteristics according to the categories of LTL changes. The Cochran-Armitage trend test and linear trend analysis in ANOVA were performed to obtain p values for trend. To analyze the association between beverage consumption and LTL changes, a robust linear regression model was used because the distribution of the dependent variable, which had negative and positive values and zero, was skewed due to outliers. In multiple models, age, BMI, and physical activity were treated as continuous variables and sex, monthly household income, smoking status, alcohol consumption status, and the presence of hypertension and diabetes mellitus as categorical variables. We confirmed no missing data for continuous covariates and created an additional group for missing data of categorical covariates. Further analysis stratified by sex and age groups (age < 65 years and ≥ 65 years) was also conducted. All tests were based on a two-sided level of significance, and SAS, version 9.4 software was used (SAS Institute, Cary, NC, USA).

Data availability

Datasets are available in a funder-mandated (website of the Korea Disease Control and Prevention Agency: <https://is.kdca.go.kr/>).

Received: 25 July 2022; Accepted: 12 December 2022

Published online: 10 January 2023

References

1. Harley, C. B., Futcher, A. B. & Greider, C. W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**, 458–460 (1990).
2. Li, L., Lejnine, S., Makarov, V. & Langmore, J. P. In vitro and in vivo reconstitution and stability of vertebrate chromosome ends. *Nucleic Acids Res.* **26**, 2908 (1998).
3. Müezziner, A., Zaineddin, A. K. & Brenner, H. A systematic review of leukocyte telomere length and age in adults. *Ageing Res. Rev.* **12**, 509–519 (2013).
4. Valdes, A. M. *et al.* Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *Lancet* **366**, 662–664 (2005).
5. Demissie, S. *et al.* Insulin resistance, oxidative stress, hypertension, and leukocyte telomere length in men from the Framingham Heart Study. *Aging Cell* **5**, 325–330 (2006).
6. Aviv, A. Telomeres, sex, reactive oxygen species, and human cardiovascular aging. *J. Mol. Med.* **80**, 689–695 (2002).
7. Grodstein, F. *et al.* Shorter telomeres may mark early risk of dementia: Preliminary analysis of 62 participants from the Nurses' Health Study. *PLoS ONE* **3**, e1590 (2008).
8. Blasco, M. A. Telomeres and human disease: Ageing, cancer and beyond. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 611–622 (2005).
9. Cawthon, R. M., Smith, K. R., O'Brien, E., Sivatchenko, A. & Kerber, R. A. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet* **361**, 393–395 (2003).
10. Andrew, T. *et al.* Mapping genetic loci that determine leukocyte telomere length in a large sample of unselected female sibling pairs. *Am. J. Hum. Genet.* **78**, 480–486 (2006).
11. Nettleton, J. A., Diez-Roux, A., Jenny, N. S., Fitzpatrick, A. L. & Jacobs, D. R. Dietary patterns, food groups, and telomere length in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Am. J. Clin. Nutr.* **88**, 1405–1412 (2008).
12. Lee, J. Y., Jun, N. R., Yoon, D., Shin, C. & Baik, I. Association between dietary patterns in the remote past and telomere length. *Eur. J. Clin. Nutr.* **69**, 1048–1052 (2015).
13. Shin, C. & Baik, I. Associations between alcohol consumption and leukocyte telomere length modified by a common polymorphism of ALDH2. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **40**, 765–771 (2016).
14. Chan, R., Woo, J., Suen, E., Leung, J. & Tang, N. Chinese tea consumption is associated with longer telomere length in elderly Chinese men. *Br. J. Nutr.* **103**, 107–113 (2010).
15. Tucker, L. A. Caffeine consumption and telomere length in men and women of the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). *Nutr. Metab.* **14**, 10 (2017).
16. Leung, C. W. *et al.* Soda and cell aging: Associations between sugar-sweetened beverage consumption and leukocyte telomere length in healthy adults from the national health and nutrition examination surveys. *Am. J. Public Health* **104**, 2425–2431 (2014).
17. Nonino, C. B. *et al.* Green tea supplementation promotes leukocyte telomere length elongation in obese women. *Nutr. Hosp.* **35**, 570–575 (2018).

18. Teramoto, M., Muraki, I., Yamagishi, K., Tamakoshi, A. & Iso, H. Green tea and coffee consumption and all-cause mortality among persons with and without stroke or myocardial infarction. *Stroke* **52**, 957–965 (2021).
19. Duggan, C. *et al.* Change in peripheral blood leukocyte telomere length and mortality in breast cancer survivors. *J. Natl. Cancer Inst.* **106**, dju035 (2014).
20. Goglin, S. E. *et al.* Change in leukocyte telomere length predicts mortality in patients with stable coronary heart disease from the heart and soul study. *PLoS ONE* **11**, e0160748 (2016).
21. Cabrera, C., Artacho, R. & Giménez, R. Beneficial effects of green tea—A review. *J. Am. Coll. Nutr.* **25**, 79–99 (2006).
22. McKay, D. L. & Blumberg, J. B. The role of tea in human health: An update. *J. Am. Coll. Nutr.* **21**, 1–13 (2002).
23. Gardner, E. J., Ruxton, C. H. S. & Leeds, A. R. Black tea—Helpful or harmful? A review of the evidence. *Eur. J. Clin. Nutr.* **61**, 3–18 (2007).
24. Rice-Evans, C. Implications of the mechanisms of action of tea polyphenols as antioxidants in vitro for chemoprevention in humans. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **220**, 262–266 (1999).
25. Bhagwat, S., Haytowitz, D. B. & Holden, J. M. *USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods, Release 3.1* (2012).
26. Juśkiewicz, J. *et al.* Extract of green tea leaves partially attenuates streptozotocin-induced changes in antioxidant status and gastrointestinal functioning in rats. *Nutr. Res.* **28**, 343–349 (2008).
27. Donà, M. *et al.* Neutrophil restraint by green tea: Inhibition of inflammation, associated angiogenesis, and pulmonary fibrosis. *J. Immunol.* **170**, 4335–4341 (2003).
28. von Zglinicki, T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 339–344 (2002).
29. Oikawa, S. & Kawanishi, S. Site-specific DNA damage at GGG sequence by oxidative stress may accelerate telomere shortening. *FEBS Lett.* **453**, 365–368 (1999).
30. Saretzki, G. & Von Zglinicki, T. Replicative aging, telomeres, and oxidative stress. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **959**, 24–29 (2002).
31. Ni, J., Guo, X., Wang, H., Zhou, T. & Wang, X. Differences in the effects of EGCG on chromosomal stability and cell growth between normal and colon cancer cells. *Molecules* **23**, 788 (2018).
32. Barrett, E. L. B. & Richardson, D. S. Sex differences in telomeres and lifespan. *Aging Cell* **10**, 913–921 (2011).
33. Liu, J. J., Crous-Bou, M., Giovannucci, E. & De Vivo, I. Coffee consumption is positively associated with longer leukocyte telomere length in the Nurses' Health Study. *J. Nutr.* **146**, 1373–1378 (2016).
34. El-Terras, A. *et al.* Carbonated soft drinks induce oxidative stress and alter the expression of certain genes in the brains of Wistar rats. *Mol. Med. Rep.* **13**, 3147–3154 (2016).
35. Daniali, L. *et al.* Telomeres shorten at equivalent rates in somatic tissues of adults. *Nat. Commun.* **4**, 1597 (2013).
36. Wang, C. J. Y. *et al.* Dissociation of telomerase activity and telomere length maintenance in primitive human hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 14398–14403 (2005).
37. Baik, I. & Shin, C. Prospective study of alcohol consumption and metabolic syndrome. *Am. J. Clin. Nutr.* **87**, 1455–1463 (2008).
38. Kim, Y., Han, B. G., KoGES group. Cohort profile: The Korean Genome and Epidemiology Study (KoGES) consortium. *Int. J. Epidemiol.* **46**, e20 (2017).
39. Fred Hutchinson Cancer Research Center. *Nutrition Assessment Shared Resources: Caffeine Questionnaire* (Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, 2022). <https://www.fredhutch.org/en/research/divisions/public-health-sciences-division/research/nutrition-assessment.html#short>. Accessed 30 June 2022.
40. Cawthon, R. M. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.* **30**, e47 (2002).
41. Ainsworth, B. E. *et al.* Compendium of physical activities: An update of activity codes and MET intensities. *Med. Sci. Sports Exerc.* **32**, S498–504 (2000).

Author contributions

C.S. and I.B. conceived the projects, constructed research conception and design, and produced data. I.S. and I.B. analyzed data, interpreted results, and prepared the manuscript. All authors critically reviewed the manuscript.

Funding

This study was supported by a fund (2011-E71004-00, 2012-E71005-00, 2017-E71001-00, 2018-E7101-00) by research of Korea Disease Control and Prevention Agency and by National Research Foundation of Korea Grant funded by the Korean Government (NRF-2019R1A2C2084000).

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-022-26186-y>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to C.S. or I.B.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



OPEN

SUBJECT AREAS:
PLANT BIOTECHNOLOGY
BIOLOGICAL TECHNIQUESReceived
22 August 2014Accepted
24 December 2014Published
23 January 2015Correspondence and
requests for materials
should be addressed to
L.H. (huangluqi01@
126.com)* These authors
contributed equally to
this work.

Analysis of the age of *Panax ginseng* based on telomere length and telomerase activity

Jiabei Liang^{1,2*}, Chao Jiang^{1,3*}, Huasheng Peng¹, Qinghua Shi⁴, Xiang Guo⁴, Yuan Yuan¹ & Luqi Huang¹

¹State Key Laboratory Breeding Base of Dao-di Herbs, National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, P.R. China, ²College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, People's Republic of China 610072, ³Beijing Area Major Laboratory of Protection and Utilization of Traditional Chinese Medicine, College of Resources, Beijing Normal University, Beijing, People's Republic of China 100875, ⁴State Key Laboratory of Plant Cell and Chromosome Engineering, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China.

Ginseng, which is the root of *Panax ginseng* (Araliaceae), has been used in Oriental medicine as a stimulant and dietary supplement for more than 7,000 years. Older ginseng plants are substantially more medically potent, but ginseng age can be simulated using unscrupulous cultivation practices. Telomeres progressively shorten with each cell division until they reach a critical length, at which point cells enter replicative senescence. However, in some cells, telomerase maintains telomere length. In this study, to determine whether telomere length reflects ginseng age and which tissue is best for such an analysis, we examined telomerase activity in the main roots, leaves, stems, secondary roots and seeds of ginseng plants of known age. Telomere length in the main root (approximately 1 cm below the rhizome) was found to be the best indicator of age. Telomeric terminal restriction fragment (TRF) lengths, which are indicators of telomere length, were determined for the main roots of plants of different ages through Southern hybridization analysis. Telomere length was shown to be positively correlated with plant age, and a simple mathematical model was formulated to describe the relationship between telomere length and age for *P. ginseng*.

Ginseng, which is the root of *Panax ginseng* C.A. Meyer (Araliaceae), has been used in Chinese medicine for thousands of years as a stimulant and dietary supplement¹. In European and American countries, ginseng phytomedicines have been used to increase physical and mental performance, provide resistance to stress and disease, and prevent exhaustion for decades². Ginseng plants begin flowering in their fourth year, and the roots can live for hundreds of years after maturing at 4–6 years of age. The older the root, the higher its medicinal value because of the higher concentration of ginsenosides, which are the active chemical compounds in ginseng^{3,4}. However, chemical analyses often require gram quantities of dried ginseng material, and it is difficult to extract such quantities while leaving the ginseng intact; thus, chemical analysis greatly decreases the ginseng's value. Therefore, effective methods for identifying the age of ginseng roots are urgently needed to improve quality control and protect the interests of ginseng consumers.

Telomeres, which are specialized structures at the physical ends of eukaryotic chromosomes that consist of highly conserved, repeated DNA sequences^{5,6}, shorten with each round of DNA replication^{7–10} because DNA polymerases cannot completely replicate linear DNA molecules. In gymnosperms, telomere length can be used to predict the future replicative capacity of cells^{11,12}. Highly significant correlations between telomere length and age have been observed in humans^{8,13}, Australian sea lions¹⁴, martins and dunlins¹⁵ and different stages of barley¹⁶. Therefore, telomere shortening can be used as a marker of cell replication and aging. Telomerase activity has been detected in plants using a polymerase chain reaction (PCR)-based telomerase repeat amplification protocol (TRAP) assay¹⁷. Telomerase appears to be developmentally regulated in plants, which is similar to what occurs in humans¹⁸. These reports indicate biological correlations between telomere length and age. However, plant telomeres are maintained by telomerase. Telomere lengths remain stable in tomato leaves¹⁹, whereas they change cyclically, lengthening and shortening with age, in the needles of *Pinus longaeva*²⁰. After the first plant telomere sequence was cloned from *Arabidopsis*²¹, nearly all plant telomeres were found to consist of the heptanucleotide

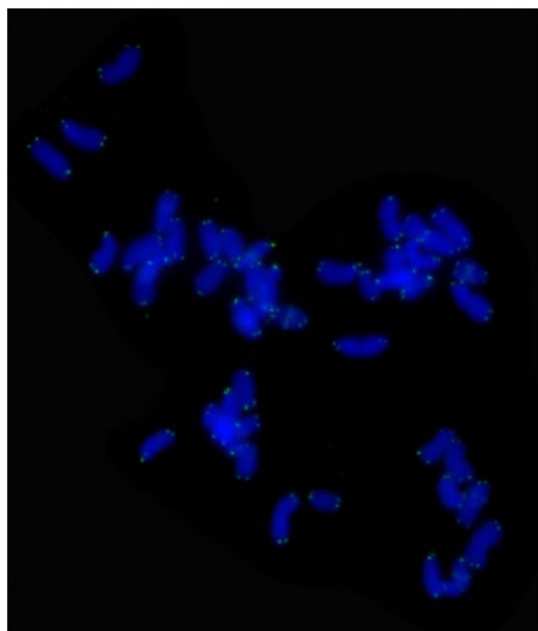


Figure 1 | In Situ Localization of TTTAGGG Telomeric Motifs on *P. ginseng* Chromosomes. The the digoxigenin–dUTP nick tag sequence (CCCTAAA)₅ telomeric probe was hybridized with adventitious root of *P. ginseng* metaphase chromosomes and counterstained with propidium iodide.

repeat (TTTAGGG)_n^{22,23}. *Arabidopsis*-type repeats have also been found in *P. ginseng*²⁴. However, researchers have not yet ascertained whether *Arabidopsis*-type repeats are located in telomeres or their relationship with age.

In this study, we combined traditional identification methods and measurements of telomere length in ginseng plants of known age. Preliminary investigations indicated that telomere length was slightly positively correlated with the age of the ginseng plant. Analysis of telomerase activity in different parts of the plant further revealed that the main root was the most active meristematic region. Therefore, we used this tissue to evaluate telomere length. Determination of telomere terminal restriction fragment (TRF) lengths in *P. ginseng* specimens of different ages demonstrated that the telomeres in the main roots showed a significant increase in TRF length with plant age that could be used for age estimation for 2–8 years.

Results

Fluorescence *in situ* hybridization to determine telomere sequences.

The telomeres of most higher plant species are composed of the repeated sequence (TTTAGGG)_n. To investigate *P. ginseng* telomeres comprising the same repeat, we using the complementary end digoxigenin-labeled, telomere-specific oligonucleotide (CCCTAAA)₃ as a probe to perform *in situ* hybridization. Hybridization signals visualized as green fluorescence demonstrated that *Arabidopsis*-type telomeric sequence repeats, (TTTAGGG)_n, were located in the chromosomes of *P. ginseng* (Fig. 1).

Growth rings in the roots of *P. ginseng* from Ji'an. The paraffin sections of *P. ginseng* rhizomes of different ages collected from Ji'an revealed distinct growth rings in the xylem of secondary roots, and the number of growth rings in the main root was consistent with an age of 1–6 years (Fig. 2). However, microscopy analysis showed that the growth rings of the ginseng specimens did not precisely reflect age after 6 years.

Telomeric activity of different ginseng tissues. A representative TRAP analysis image that was used to quantify telomerase activity is shown in Fig. 3. Average telomerase activities in various tissues and

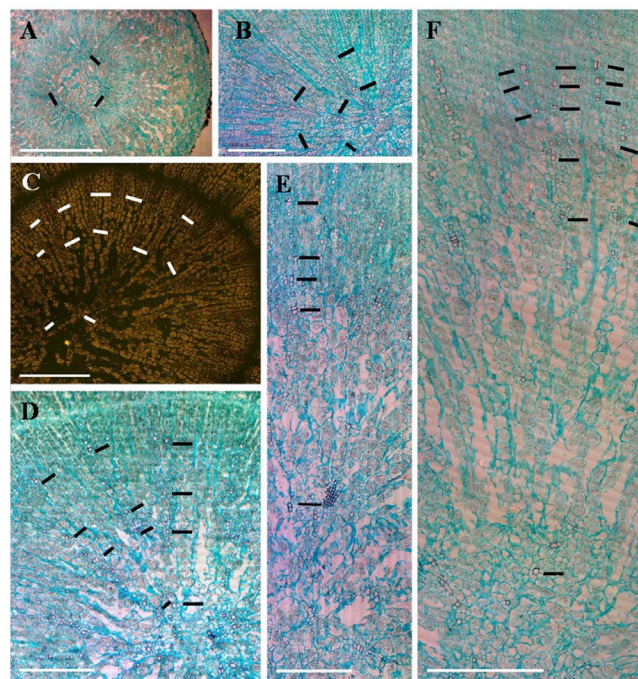


Figure 2 | The growth rings in the ginseng root of 1 ~ 6 years. (A), (B), (C): 1 year ginseng root, 2 year ginseng root, 3 year ginseng root, Bar = 1000 µm; (D), (E), (F): 4 year ginseng root, 5 year ginseng root, 6 year ginseng root, Bar = 500 µm.

different stages of plant development were assayed using TRAP, and the results indicated that the main root showed the highest average telomerase activities of all of the examined tissues. Because telomerase can lengthen telomeres, and the activity of telomerase

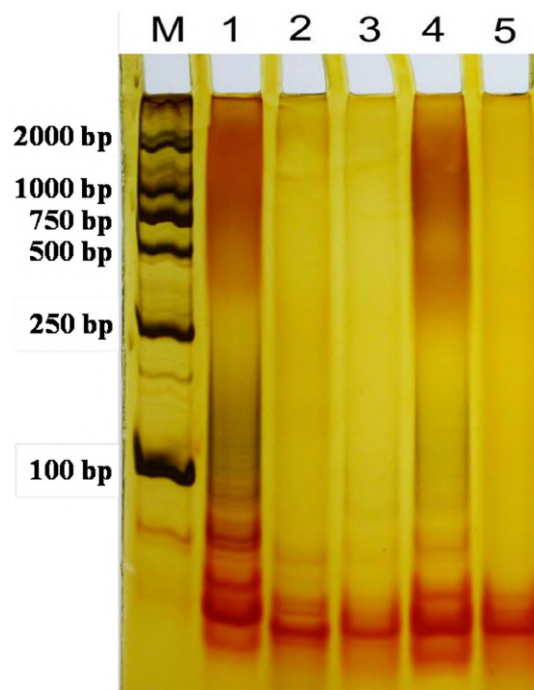


Figure 3 | Developmental Regulation of Telomerase Expression in 5 years *P. ginseng*. Telomerase activities in various tissues and different stages of plant development were assayed by TRAP, using 47F as the forward primer and PTeC3 as reverse primers. Lane1: tap root; Lane2: leaves; Lane3: stems; Lane4: root tips; Lane5: seeds.

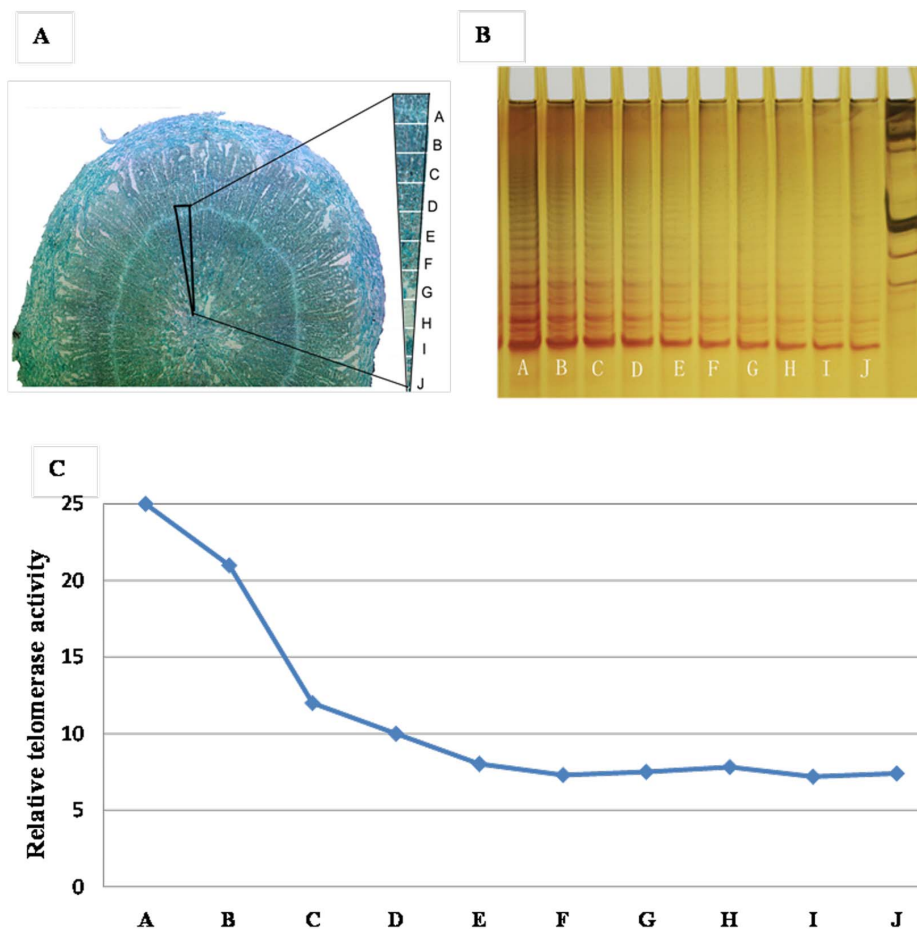


Figure 4 | Anatomical observation of 5 years *P. ginseng* by tangential cryosectioning. A series of 400- μ m-thick tangential cryosections (A) ~ (J) was taken for each sample: tissues at different stages were isolated by tangential cryosectioning; (B): Telomerase activities in various tissues and different stages of plant development were assayed by TRAP, using 47F as the forward primer and PTeC3 as reverse primers; (C): Densitometric quantization revealed higher relative telomerase activity (relative units) in cambiums.

may be correlated with age, the main roots were used for further analyses.

Tangential cryo-sectioning of 400 μ m sections of samples from 5-year-old *P. ginseng* tissues, followed by densitometric quantitation of telomerase activity (in relative units), revealed the highest telomerase activity in the cambium and adjacent zones of differentiating secondary xylem (Fig. 4).

Analysis of TRF lengths in ginseng of different ages. DNA fragments were analyzed through DNA gel blot hybridization using the (CCCTAAA)₃ oligonucleotide as a probe. A representative Southern blot image that was used to quantify TRFs is shown in Fig. 5a, b, where the hybridization signals represent telomeric regions. The autoradiograph was scanned and imported as a TIFF-format image to measure TRF length. The location of the peak intensity could not be accurately determined by eye. Therefore, an easy-to-use system that was able to determine the distributions of telomeric regions based on copy number and calculate statistics was employed. The unbiased TRF measure software Telotool²⁵ was used to measure the TRF lengths of ginseng roots. A plot of the relative telomere copy number versus molecular weight was created, which provided the user with a realistic picture of the actual distribution of telomeric lengths. The measurements of TRF length for each sample using Southern hybridization were repeated three times.

We investigated the correlation between TRF length and plant age using *P. ginseng* samples of known age from Ji'an and Fusong. First, DNA fragments were analyzed through Southern hybridization

using the (CCCTAAA)₃ oligonucleotide as a probe for telomeric DNA (Fig. 5a). Although observations made by eye are not precisely accurate, this easy-to-use method is convenient and allowed rapid analysis of the telomeres of ginseng roots by determining copy number²⁶. A general model for age-related TRF length in ginseng was introduced. Eleven models were simulated using SPSS 20.0 software, and the most suitable linear fitting curve was determined. The obtained results satisfied the 83% confidence limits ($R^2 = 0.832$, $F = 79.029$, $Sig. = 0.000$), and it was found that TRF length was significantly positively correlated with age after 3 years (Fig. 5b), which indicated that TRF length could be maintained via telomerase activity as tissues developed. Based on these results, we propose a mathematical model through which telomere length can be used to predict *P. ginseng* age:

$$y = 0.827x + 8.231,$$

where, x is age, and y is TRF length.

Discussion

Scientific identification of the potency of traditional Chinese medicines is crucial to ensure their authenticity and effectiveness. Authenticity can be assured based on several factors: the geographic origin or cultivation source of the species; proper harvesting and processing methods; and growth stage²⁷. These factors are all important for the quality of Chinese herbal medicines. Because bioactive secondary compounds accumulate as medicinal plants such as *P. ginseng*, *Salvia miltiorrhiza* and *Coptis chinensis* age, older plants

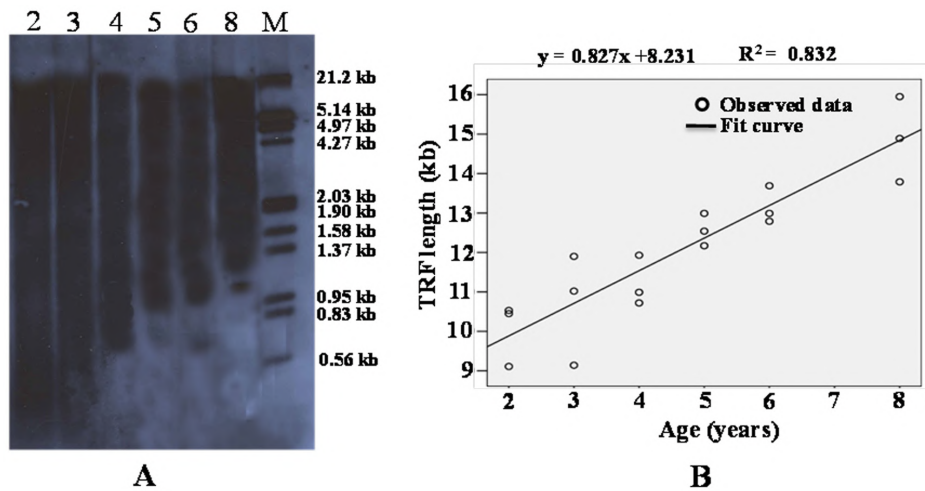


Figure 5 | Southern hybridization images used for measurement and quantization of TRF length. Lane M: DNA Molecular Weight Marker III, Digoxigenin-labeled (Roche). Numbers 2, 3, 4, 5, 6, 8 means different years of *P. ginseng* samples collected from the city of Ji'an, Jilin province, China. B: Data fitting results and the trend of variation of TRF length with different ages. Overall, average TRF length increased with ages in main root (The following 1 cm of “ginseng lutou”).

usually serve as better medicinal herbs. However, in the pursuit of economic efficiency, a number of inappropriate strategies, including the use of growth hormones and swelling agents as well as continual transplantation, have been employed to simulate age. Therefore, the quality of Chinese herbal medicines is difficult to determine. This study aimed to establish a reliable and effective method for identifying the age of ginseng that complements traditional methods of age determination.

Gymnosperms and dicotyledonous angiosperms generally undergo primary and secondary growth, whereas monocots usually lack secondary growth. The retention of stem-cell-like meristematic cells plays a critical role in perennial longevity²⁸. Stem-cell-like meristematic cells are located in the cambium. Accordingly, when environmental conditions change periodically, associated with different growing seasons, the cambium cell cycle is activated, and the tissue layers form rings (termed growth rings) during each individual period of growth. Arx, Schweingruber and Dietz^{29,30} indicated that growth rings could be an effective biomarker for estimating age in the roots of dicotyledonous perennial herbs. In the present study, growth-ring characteristics were clearly present in 1- to 6-year-old ginseng top roots. However, when the ginseng specimens were older than 6 years, dry, decayed channels emerged within the cambium rings, making the growth rings difficult to distinguish and influence age estimation. Therefore, this method can only be applied over a minimum age range, and a new marker was required for estimation of the age of older ginseng samples.

Telomere length and telomerase activity are useful biomarkers for age prediction in animals and plants^{31–33} due to their close association with cell proliferation. However, it was unclear whether telomerase activity is related to the mechanisms maintaining stem cells in meristems. Our analyses of several *P. ginseng* tissues showed that telomerase activity was highest in the cambium. Telomerase expression in plants is very similar to that in humans. In plants, telomerase activity is highest in the meristem and reproductive organs, whereas there is little or no activity in the endosperm, leaves and stems¹⁷. In *Ginkgo biloba*, tissues with a high percentage of dividing cells also exhibit high levels of telomerase activity, which is consistent with our results^{31,34}. We found that the sampled tissue had a substantial impact on the age estimation in *P. ginseng*. The main root samples contained most of the organized cambium and annual growth rings. We found that telomere length in the main roots was positively correlated with plant age. However, due to sampling limitations, ginseng plants of

older ages were difficult to sample. Therefore, our mathematical model is only suitable for a certain range of ginseng ages.

A study that examined TRF branch length in detail suggested that telomere branch lengths increase with age to some extent in *G. biloba*^{31,35}, in accord with the results of the present study. Our analyses indicate that ginseng telomere length increases significantly with age; however, in contrast to the progressive shortening of TRFs observed in somatic cells as animals aging, telomere length and telomerase activity change in different patterns during plant development. Telomere lengths have been observed to be stable in tomato leaves in four-week-old to six-month-old plants¹⁹, and they do not significantly change during plant ontogenesis or leaf senescence in *Melandrium album*¹⁸ and *Arabidopsis thaliana*³⁶ or during cyclical changes of lengthening and shortening in size associated with age in *Pinus longaeva*²⁰. Furthermore, telomeres do not shorten during increased tissue differentiation from embryonic to adult stages in *Hordeum vulgare*¹⁶ and *Pinus sylvestris*³⁷, whereas they show decreased lengths during *Betula pendula* tissue culture³⁸, while increased lengths are observed with age in *G. biloba*³¹. These results suggest that the relationship between telomere length and plant development is complex and may be affected by the species and lines involved as well as environmental stress and telomerase and stem cell activities. The present study indicates that telomere length in the top roots of *P. ginseng* increases with age, as observed in the leaves and calli of *G. biloba*^{31,35}. Interestingly, many studies show that ginsenoside Rg1, which is one of the main biologically active components of ginseng, can decrease telomere shortening and reinforce telomerase activity in delayed hematopoietic stem cells and reduce senescence in human somatic cells^{39–41}. Similar results were found for a *G. biloba* extract, which significantly augmented endothelial progenitor cell telomerase activity to prevent the cells from entering senescence⁴². These results imply that the increase in telomere length with age

Table 1 | The Ginseng samples collected from two different districts

Age (year)	2	3	4	5	6	8
Fusong	√	√	√	√	√	√
Ji'an	√	√	√	√	√	√

Ginseng samples of known age were collected from the Ji'an and Fusong districts of Jilin Province, China, in mid-August, 2010 and 2013. The samples were taxonomically identified by Prof. Shiquan Xu, Institute of special animal and plant science, Chinese Academy of Agricultural Sciences. All samples consist of 3 individuals every year.



observed in ginseng and ginkgo may be related to the bioactive components of these plants, which may maintain telomere length by the telomerase mechanism or/and the ALT mechanism. The correlation between telomere length and telomerase activity in *P. ginseng* that was demonstrated here suggests that telomere length and telomerase activity might play essential roles in directly or indirectly regulating the life span of *P. ginseng*.

Methods

Sample collection. Ginseng samples of known age were collected from the Ji'an and Fusong districts of Jilin Province, China, in mid-August, 2010 and 2013 (Table 1). Samples of the main root (1 cm below the rhizome, known as "ginseng lutou" in China), leaf, stem, secondary root and seeds were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use.

Chromosome preparation and *in situ* hybridization. Adventitious roots was induced from calli of *P. ginseng* by cultured in the MS rooting medium for 14 d. Adventitious root tips were used as a source of metaphase chromosomes, and the digoxigenin-dUTP nick (Roche, Penzberg, Germany) tag sequence (CCCTAAA)₅ was used as a chromosome probe, as previously described⁴³. Slides were removed immediately after immersion in $1 \times$ PBS (containing 0.2% Tween) and dipped in $1 \times$ blocking buffer (Boehringer, Ingelheim, Germany) at 37°C for 30 min. After drying, each slide was placed in $50 \times$ blocking buffer containing 2 μl of a FITC-conjugated anti-digoxin antibody (anti-Dig FITC, Boehringer, Ingelheim, Germany), covered with a 22×22 mm coverslip, and incubated in a dark, wet box at 37°C for 60 min. The slides were then washed three times (5 min each) in $1 \times$ PBS (containing 0.2% Tween) at room temperature. After the slides were dried, 12 μl of the anti-fading agent VECTASHIELD[®] (Vector Lab, California, USA) containing 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ propidium iodide (Life Technologies, California, USA) was added slowly to cover the coverslips. Different filters in a DMRXA fluorescence microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) were then used to observe the red chromosomes and yellow-green hybridization signals. An air-cooled digital (CCD) camera was employed, and the input of images into a computer was performed using Leica QFISH software to adjust the contrast and brightness.

Paraffin sectioning. Fresh roots of *P. ginseng* were harvested, and samples were collected 1 cm from the root tip and fixed with FAA solution (70% 90 : 5 : 5 ethanol: formaldehyde: acetic acid), then vacuum infiltrated and dehydrated through increasing alcohol concentrations. Next, the sections were embedded in paraffin, and the preparations were baked on an HI1220 flattening table and sectioned using an RM2265 rotary microtome (Leica Biosystems, Nussloch, Germany) to a thickness of 10–15 μm . The samples were subsequently baked for more than 24 h, then deparaffinized, stained with a safranin-fast green or phloroglucinol-HCl reagent, mounted with neutral gum and observed and photographed using BH-2 optical and LG-PS2 stereo microscopes (Olympus, Tokyo, Japan).

Hand sectioning. One-centimeter samples from the tips of fresh *P. ginseng* roots were sectioned at a thickness of approximately 1 mm. One drop of phloroglucinol-HCl was used to develop color, and a scanner was employed to image the samples.

Tangential cryo-sectioning. A series of 40 μm -thick tangential sections were obtained for each sampled section as described by Uggla & Sundberg⁴⁴, with some modifications. Regenerated tissues at different stages were isolated through tangential cryo-sectioning at -20°C with a Leica CM1850 Cryostat (Leica Biosystems, Nussloch, Germany). Cryosections of regenerated tissues from the same root and stage were collected in a 1.5 ml microfuge tubes, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C .

Determination of telomerase activity. Total protein was harvested from approximately 5.0 mg of freshly ground, fine powder from each sample. Telomerase activity was measured as previously described⁴⁵ using the TRAP assay. Plant extracts containing telomerase were prepared according to Fitzgerald¹⁷, and the total protein content in the extracts was determined⁴⁶. The oligonucleotides 47F (5'-CGCGGTAGTGTGGTTGTGT-3') and PtelC3 (5'-CCCTAAACCCTAAACCCTAAA-3') were used as forward and reverse primers, respectively, in the TRAP analysis¹⁸.

DNA extraction and Southern hybridization analysis. The TRF length, which is the gold standard for telomere length, was determined through Southern hybridization analysis⁴⁷. Root samples were placed in a mortar and ground to a fine powder using a pestle and liquid nitrogen. Then, genomic DNA was prepared from each sample using the hot CTAB method⁴⁸ and subsequently purified by treated with RNase (New England Biolabs, Massachusetts, USA) and Proteinase K (Merck, Darmstadt, Germany). The concentration of the isolated DNA and the ratio of the absorbance at 260 nm to 280 nm (A_{260}/A_{280} ratio) were measured using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Gene, Hong Kong, China). Approximately 20 μg of each DNA sample was then digested for 12 h with TaqI, and the digestion products were loaded into the lanes of a horizontal, 6.5×10 cm, 1% agarose gel and electrophoresed in $1 \times$ TAE buffer for approximately 6 h at 90 V at room temperature with buffer recirculation. To measure and quantify the TRFs, Southern hybridizations were

performed with the DIG High PrimeDNA Labeling and Detection Starter kit II (Roche, Penzberg, Germany) as previously described^{49,50} using an end digoxigenin-labeled complementary telomere-specific oligonucleotide probe (CCCTAAA)₃. Measurements were repeated three times, and TRF lengths are reported as the mean \pm standard deviation.

- Patil, D. A. Ethnomedicine to modern medicine: genesis through ages. *J. Exp. Sci.* **2**, 25–29 (2011).
- Gillis, C. N. *Panax ginseng* pharmacology: a nitric oxide link? *Biochem. Pharmacol.* **54**, 1–8 (1997).
- Chen, F., Luo, J. & Kong, L. Determination of 10 ginsenosides in *Panax ginseng* of different harvest times based on HPLC fingerprints and principal component analysis. *Nat. Prod. Res.* **27**, 851–854 (2013).
- Kim, N. *et al.* Nontargeted metabolomics approach for age differentiation and structure interpretation of age-dependent key constituents in hairy roots of *panax ginseng*. *J. Nat. Prod.* **75**, 1777–1784 (2012).
- Azanza, R. V. & Taylor, F. J. Are Pyrodinium blooms in the Southeast Asian region recurring and spreading? A view at the end of the millennium. *Ambio*. **30**, 356–364 (2001).
- Kipling, D., Wilson, H. E., Thomson, E. J. & Cooke, H. J. YAC cloning *Mus musculus* telomeric DNA: physical, genetic, *in situ* and STS markers for the distal telomere of chromosome 10. *Hum. Mol. Genet.* **4**, 1007–1014 (1995).
- Olovnikov, A. M. Telomeres, telomerase, and aging: origin of the theory. *Exp. Gerontol.* **31**, 443–448 (1996).
- Harley, C. B., Futcher, A. B. & Greider, C. W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*. **345**, 458–460 (1990).
- 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.* **41**, 181–190 (1973).
- Watson, J. D. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat. New Biol.* **239**, 197–201 (1972).
- Murray, B. G., Friesen, N. & Heslop-Harrison, J. S. Molecular cytogenetic analysis of *Podocarpus* and comparison with other gymnosperm species. *Ann. Bot.* **89**, 483–489 (2002).
- Allsopp, R. C. *et al.* Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 10114–10118 (1992).
- Hastie, N. D. *et al.* Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature*. **346**, 866–868 (1990).
- Izzo, C., Hamer, D. J., Bertozzi, T., Donnellan, S. C. & Gillanders, B. M. Telomere length and age in pinnipeds: The endangered Australian sea lion as a case study. *Mar. Mammal Sci.* **27**, 841–851 (2011).
- Pauliny, A., Wagner, R. H., Augustin, J., Szép, T. & Blomqvist, D. Age-independent telomere length predicts fitness in two bird species. *Mol. Ecol.* **15**, 1681–1687 (2006).
- Kilian, A., Stiff, C. & Kleinhofs, A. Barley telomeres shorten during differentiation but grow in callus culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 9555–9559 (1995).
- Fitzgerald, M. S., McKnight, T. D. & Shippen, D. E. Characterization and developmental patterns of telomerase expression in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 14422–14427 (1996).
- Riha, K., Fajkus, J., Siroky, J. & Vyskot, B. Developmental control of telomere lengths and telomerase activity in plants. *Plant Cell.* **10**, 1691–1698 (1998).
- Broun, P., Ganal, M. W. & Tanksley, S. D. Telomeric arrays display high levels of heritable polymorphism among closely related plant varieties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 1354–1357 (1992).
- Flanary, B. E. & Kletetschka, G. Analysis of telomere length and telomerase activity in tree species of various life-spans, and with age in the bristlecone pine *Pinus longaeva*. *Biogerontology*. **6**, 101–111 (2005).
- Richards, E. J. & Ausubel, F. M. Isolation of a higher eukaryotic telomere from *Arabidopsis thaliana*. *Cell*. **53**, 127–136 (1988).
- Ganal, M. W., Lapitan, N. L. & Tanksley, S. D. Macrostructure of the tomato telomeres. *Plant. Cell* **3**, 87–94 (1991).
- McKnight, T. D., Fitzgerald, M. S. & Shippen, D. E. Plant telomeres and telomerases. A review. *Biochemistry*. **62**, 1224–1231 (1997).
- Ho, I. S. & Leung, F. C. Isolation and characterization of repetitive DNA sequences from *Panax ginseng*. *Mol. Genet. Genomics*. **266**, 951–961 (2002).
- Göhring, J., Fulcher, N., Jacak, J. & Riha, K. TeloTool: a new tool for telomere length measurement from terminal restriction fragment analysis with improved probe intensity correction. *Nucleic. Acids. Res.* **42**, e21 (2014).
- Grant, J. D. *et al.* Telometric: a tool providing simplified, reproducible measurements of telomeric DNA from constant field agarose gels. *Biotechniques*. **31**, 1314–1316, 1318 (2001).
- Huang, L., Xiao, P., Guo, L. & Gao, W. Molecular pharmacognosy. *Sci. China Life Sci.* **53**, 643–652 (2010).
- Lanner, R. M. Why do trees live so long? *Ageing Res. Rev.* **1**, 653–671 (2002).
- Arx, G. & Dietz, H. Growth rings in the roots of temperate forbs are robust annual markers. *Plant Biol.* **8**, 224–233 (2006).
- Dietz, H. & Schweingruber, F. H. Development of growth rings in roots of dicotyledonous perennial herbs: experimental analysis of ecological factors. *Bull. Geobot. Inst. ETH.* **67**, 97–105 (2001).



31. Liu, D. *et al.* Comparative analysis of telomeric restriction fragment lengths in different tissues of *Ginkgo biloba* trees of different age. *J. Plant Res.* **120**, 523–528 (2007).
32. Mather, K. A., Jorm, A. F., Parslow, R. A. & Christensen, H. Is telomere length a biomarker of aging? A review. *J. Gerontol. A.* **66**, 202–213 (2011).
33. Watson, J. & Riha, K. Telomeres, aging, and plants: from weeds to Methuselah—a mini-review. *Gerontology.* **57**, 129–136 (2010).
34. Song, H., Liu, D., Li, F. & Lu, H. Season- and age-associated telomerase activity in *Ginkgo biloba* L. *Mol. Biol. Rep.* **38**, 1799–1805 (2011).
35. Liu, D. *et al.* Dynamic changes of telomeric restriction fragment (TRF) lengths in cells during the developmental process from embryos to seedlings and a comparison with the embryonal calli in *Ginkgo biloba* L. *Forest. Stud. China.* **9**, 127–131 (2007).
36. Zentgraf, U., Hinderhofer, K. & Kolb, D. Specific association of a small protein with the telomeric DNA-protein complex during the onset of leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **42**, 429–438 (2000).
37. Aronen, T. & Rynnänen, L. Variation in telomeric repeats of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Tree Genet. Genomes.* **8**, 267–275 (2012).
38. Aronen, T. & Rynnänen, L. Silver birch telomeres shorten in tissue culture. *Tree Genet. Genomes.* **10**, 67–74 (2014).
39. Zhou, B. *et al.* Ginsenoside Rg1 protects human fibroblasts against psoralen- and UVA-induced premature senescence through a telomeric mechanism. *Arch. Dermatol. Res.* **304**, 223–228 (2012).
40. Zhou, Y. *et al.* Changes of telomere and telomerase in effect of ginsenoside Rg1 to delay hematopoietic stem cell senescence. *J. Chin. Mater. Med.* **36**, 3172–3175 (2011).
41. Zhao, C. *et al.* Roles of telomere and telomerase in the process of ginsenoside Rg1 protection against tert-butyl hydroperoxide-induced senescence in WI-38 cells [J]. *Chin. Pharmacol. Bull.* **1**, 61–66 (2005).
42. Dong, X. X. *et al.* Ginkgo biloba extract reduces endothelial progenitor-cell senescence through augmentation of telomerase activity. *J. Cardiovasc. Pharm.* **49**, 111–115 (2007).
43. Kurata, N. & Omura, T. Karyotype analysis in rice, 1: A new method for identifying all chromosome pairs. *Japan. J. Genet.* **53**, 251–255 (1978).
44. Chaffey, N. J. *Wood formation in trees: cell and molecular biology techniques* (CRC Press, Florida, 2004).
45. Kim, N. W. *et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science.* **266**, 2011–2015 (1994).
46. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
47. Nakamura, K. *et al.* Comparative analysis of telomere lengths and erosion with age in human epidermis and lingual epithelium. *J. Invest. Dermatol.* **119**, 1014–1019 (2002).
48. Rogers, S. O. & Bendich, A. J. *Plant Molecular Biology Manual* 73–83 (Springer Press, Heidelberg, Germany, 1989).
49. Flanary, B. E. & Streit, W. J. Telomeres shorten with age in rat cerebellum and cortex in vivo. *J. Anti. Aging Med.* **6**, 299–308 (2003).
50. Flanary, B. E. & Streit, W. J. Progressive telomere shortening occurs in cultured rat microglia, but not astrocytes. *Glia.* **45**, 75–88 (2004).

Acknowledge

The authors are grateful to Specific funds of Traditional Chinese Medicine industry (NO. 201407003) and Key Projects in the National Science & Technology Pillar Program (NO. 2012BAI29B02).

Author contributions

J.L. conducted experiments and data analysis. C.J. conducted data analysis and wrote the paper. H.P. collected the majority of the samples provided the case information and conducted experiments. Q.S. and X.G. conducted the FISH experiments. Y.Y. designed experiments and revised the paper. L.H. designed experiments, performed data analysis and wrote the paper.

Additional information

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Liang, J. *et al.* Analysis of the age of *Panax ginseng* based on telomere length and telomerase activity. *Sci. Rep.* **5**, 7985; DOI:10.1038/srep07985 (2015).

가시오갈피와 두충의 첨가 급여가 브로일러의 생산 능력, 혈장 생화학 지표 및 텔로미어 함량에 미치는 영향

손시환[†] · 장인석 · 문양수 · 김영주 · 이수희 · 고영현 · 강선영 · 강혜경

진주산업대학교 동물생명과학과

Effect of Dietary Siberian Ginseng and Eucommia on Broiler Performance, Serum Biochemical Profiles and Telomere Length

S. H. Sohn[†], I. S. Jang, Y. S. Moon, Y. J. Kim, S. H. Lee, Y. H. Ko, S. Y. Kang and H. K. Kang

Department of Animal Science & Biotechnology, Jinju National University

ABSTRACT The Siberian ginseng and Eucommia are a kind of medicinal plant with powerful anti-oxidant activity. An experiment was conducted to investigate the effect of Siberian ginseng leaf and Eucommia leaf at level of 0.5% and 1% per feed in Ross commercial broiler for 4 to 35 days of age on performance, organ weight, blood biochemical profiles and telomere quantity. Chickens consuming diets containing 1% Siberian ginseng had higher feed conversion ratio than the other treated chicken during experimental period whereas no significant differences were detected in body weight, weight gain and feed intake. The weight of bursa of fabricius was significantly increased in chickens with dietary supplementation compared with chickens fed control but this was not seen in liver, spleen and thymus. In blood biochemical profiles, chickens with dietary supplementation had higher concentration than chickens fed control in triglyceride, cholesterol and glucose. The concentration of aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, albumin and total protein, however, was not significantly different between dietary supplemented chickens and control chickens. The relative amount of telomeric DNA of lymphocytes in chickens with dietary supplementation was significantly higher than that of control chickens but the difference was not found in liver, heart and testis tissues. In conclusion, dietary supplementation of Siberian ginseng and Eucommia in broiler improved immune activity and telomere length without decreasing chicken growth performance.

(Key words : Siberian ginseng, Eucommia, anti-oxidant, telomere, growth performance, broiler)

서 론

최근 동물성 단백질의 소비 증가와 더불어 고 품질 안전성 육류의 선호도가 높아지고 있다. 또한, 과도한 동물성 식품 섭취로 비만과 같은 원발성 질환 발생이 증가됨에 따라 소비자는 저지방 육류나 기능성 향진 축산물을 요구하고 있다. 이러한 사회적 관점에 비추어 근육 내 지방의 축적이 상대적으로 적은 가금류의 소비는 앞으로도 지속적으로 증가될 전망이다. 닭고기의 선호와 더불어 최근 선진국에서는 보다 친환경적이고 건강 지향적인 닭고기 생산을 위한 사육 방법들에 관심을 경주하고 있다. 이들 중 다양한 천연식물성 소재들을 이용한 기능성 사료 첨가물의 개발이 활발히 이루

어지고 있는데, 이는 주로 항산화 기능이 탁월한 것으로 알려지고 있다. 이런 물질은 지방산의 산패에 의한 사료 품질을 보호하는 기능 및 체 조직의 항산화, 면역 증진, 번식 능력 개선 등과 같은 생리적 작용뿐만 아니라 고기의 보존성에도 긍정적 영향을 미친다.

현재 육계 사료의 경우, 지방 등을 첨가한 고 에너지 사료가 사용되고 있는데, 사료 내 불포화 지방산은 장기 보존시 쉽게 산화되어 맛, 색깔, 냄새 등의 변화를 초래한다. 따라서 사료 성분 중 지방 산화를 방지하고 영양소 파괴를 최소화하기 위하여 천연 항산화제로서 비타민 E, 합성 항산화제로서 BHA, exthoxyquin 등이 널리 사용되고 있다. 이러한 항산화제 급여는 육계의 생산성에 중요한 영향을 미치는 복수

[†] To whom correspondence should be addressed : shsohn@jinju.ac.kr

증 예방, 고기의 안전성 및 보존성에 개선 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 뿐만 아니라 항산화 물질은 생산성 증가, 지방산의 산화 방지, 세포 면역 증진 등 생체 조직에서 지질 과산화 작용으로 발생하는 유해산소기의 생성을 억제 또는 제거하여 체내 항상성을 증가시키는 작용을 한다(Galvin 등, 1997; Lopez-Bote 등, 1998; Hernandez 등, 2004; Rebole 등, 2006; Brenes 등, 2008).

이러한 천연 식물성 소재 중 가시오갈피(Siberian ginseng)는 elutheroside가 다량 함유되어 있는 약용식물로서 이들 추출물이 강력한 항 스트레스 및 항산화 작용을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다(Lee 등, 2003). 또한, 두충(Eucommia)에는 혈압 강하 작용이 있는 (+)-pinoresinol-di-β-D-glucoside와 비타민 C가 다량 함유되어 있어 산화적 스트레스로부터 DNA를 보호하는 항산화 작용이 매우 우수한 것으로 알려져 있다(Hsieh와 Yen, 2000).

따라서 본 연구는 지역 특산물인 가시오갈피와 두충과 같은 천연 생리활성 항산화제를 육계의 사료 첨가제로 급여하고 이에 따른 브로일러의 생산 능력을 살펴보고, 혈장 생화학 성분 및 장기 무게를 분석하여 면역 및 항상성 관련 지표에 미치는 영향을 고찰하고자 하였다. 또한, 이들 물질의 첨가 급여가 생리 활성도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 백혈구, 간, 심장, 폐 및 정소 세포 내 텔로미어(telomere) 함량을 비교 분석하였다.

재료 및 방법

1. 공시 동물 및 사양 관리

본 시험에 공시된 시험동물은 브로일러 Ross종 수컷 200수로서 (주)올품에서 구입하였으며, 구입 후 2일간의 적응 기간을 거친 후 4일령 병아리를 완전 임의 배치법에 의해 5개 처리구로 하고 케이지 당 4수씩 배치하였다. 시험에 사용한 기초 사료는 상업용 육계 사료를 이용하였고, 가시오갈피 및 두충을 w/w 비율로서 0.5% 및 1.0% 수준으로 각각 첨가하였다. 시험 사료의 조성 및 화학적 성분은 Table 1과 같다. 공시 동물들은 35일령까지 control, T1(가시오갈피 0.5%), T2(가시오갈피 1.0%), T3(두충 0.5%), T4(두충 1.0%)의 처리 사료로 자유 급이를 실시하였고, 사양 관리는 본 대학 종합농장 무창 시험계사에서 Ross 육계 사육 관리 지침(Ross Broiler Management Manual, 2002)에 따라 사육하였다.

2. 샘플 채취 및 표본 제작

혈장 성분 분석을 위하여 시험이 종료된 후 각 처리구 당

8수씩 경정맥을 절개하여 헤파린 튜브에 채혈을 실시하고 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리한 다음 혈장을 채취하였다. 각 장기를 획득하기 위하여 복강을 가위로 절개하고 위장의

Table 1. Formula and chemical composition of basal diets

Items	Diets	
	Starter	Finisher
Ingredients (%)		
Corn	38.26	44.28
Wheat	20.00	20.00
Wheat bran	5.00	4.00
Animal fat	2.20	3.00
Corn gluten	4.00	4.00
Soybean meal (44% CP)	23.00	16.50
Rapeseed meal	1.50	2.00
Fish meal	1.00	1.00
Meat meal	2.00	2.00
Salt	0.20	0.23
Calcium carbonate	0.40	0.20
Tricalcium phosphate	1.40	1.60
Lysine (liquid)	0.46	0.66
Methionine	0.13	0.12
Choline-HCl	-	0.01
Vitamin premix ¹	0.20	0.20
Mineral premix ²	0.20	0.20
Maduramycin+nicarbazine	0.05	-
Antibiotics	0.0133	0.001
Chemical composition (%)		
Crude protein	21.00	19.00
Ether extract	4.80	5.20
Crude fiber	4.30	3.90
Crude ash	5.00	4.90

¹ Contained per kg: Vit. A 5,500,000 IU; Vit D₃ 1,500,000 IU; Vit E 15,000 mg; Vit K 800 mg; thiamin 1,000 mg; riboflavin 4,000 mg; niacin 25,000 mg; biotin 30 mg; folic acid 500 mg; pantothenic acid 5,000 mg; pyridoxine 1,500 mg; Vit B₁₂ 15 mg; Cu 12,000 mg; Fe 35,000 mg; Zn 25,000 mg; Co 150 mg; I 500 mg; Se 120 mg; Mn 38,000 mg.

유문부에서 맹장 앞부분까지 절단하여 소장을 획득하고 이어서 간, 비장, 흉선 및 F-낭 등의 조직을 채취하여 무게를 측정하였다. 채취된 조직들은 멸균된 생리식염수로서 세척하고 여분의 수분을 제거 후 초 저온 냉동고(-72 °C)에 보관하여 분석에 사용하였다. 텔로미어의 함량 분석은 혈액, 간, 폐, 심장 및 정소 조직을 대상으로 하였으며, 도살 개체의 각 조직들을 떼어 분석하였다. 채집된 조직들은 D-PBS(Gibco, Invitrogen Corp. Grand Island, N.Y, USA) 용액으로 세척한 다음 RPMI 1640 배양액(Gibco)이 들어있는 시험관으로 옮겨 200 × g에서 10분간 원심분리 시켰다. 침전된 세포에 0.9% sodium citrate (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) 용액을 첨가하여 15분간 저장처리하고 이후 고정액을 10방울 정도 첨가하여 원심분리 시켰다. 고정처리하는 methanol과 acetic acid 가 3:1로 혼합된 고정액을 이용하고 이를 3회 반복 처리한 후 세포액을 3~5방울 정도 떨어뜨려 슬라이드 표본을 제작하였다.

3. 분석 항목

1) 체중 및 사료 섭취량 측정

체중 측정은 시험 개시(4일령), 21일령 및 시험 종료 (35일령)에 처리별 반복구 전체를 측정 조사하였다. 사료 섭취량은 사양 시험 전기간 동안 매주 잔량을 측정하여 조사하고, 사료 섭취량 대비 증체량으로서 사료 요구율을 계산하였다.

2) 혈장 생화학적 성분 분석

혈장 aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase(ALT), albumin, total protein, triglyceride, cholesterol 및 glucose 분석은 자동생화학분석기(Hitachi 747, Japan)를 이용하여 실시하였다.

3) 텔로미어 함량 분석

텔로미어 접합 특이 probe 제작을 위하여 (CCCTAA)₇으로 구성된 42 mers 단일 oligomers를 primer로 이용하여 Polymerase Chain Reaction(PCR)을 수행하고 이의 증폭된 산물을 PCR-DIG Probe Synthesis Kit(Roche, Mannheim, Germany)로서 digoxigenin labeling을 하였다.

본 연구에서 수행한 형광접합보인법(fluorescence *in situ* hybridization; FISH)은 먼저 슬라이드 표본을 RNase(Sigma-Aldrich) 처리 후 Hybridization 용액(13 μL formamide, 5 μL hybridization buffer, 2 μL(100 ng/μL) chicken telomeric DNA probe; Roche)으로 85 °C에서 5분간 변성(denaturation)하고

38.5 °C에서 12시간 접합(hybridization)시켰다. 접합 후 슬라이드를 2×SSC로서 72 °C에서 5분간 처리하고 PN buffer(0.1% sodium phosphate, 0.1% Nonidet P-40; Roche)로 세척하였다. 형광 접합 탐지를 위하여 anti-digoxigenin-fluorescein(FITC; Roche)으로 38.5 °C에서 30분간 반응시키고 PN buffer로 세척한 후 암소에서 건조시켰다. 배경 염색은 propidium iodide solution(PI; Sigma-Aldrich)을 이용하였으며, 형광 접합 발현 양상은 PI와FITC 파장대의 검용 필터를 부착한 형광현미경(Model AX-70 with WIB filter, Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다. 처리된 슬라이드를 형광현미경으로 관찰한 후 100배의 대물렌즈 하에서 평균 5개의 간기 상을 한 프레임으로 하여 디지털 카메라(Model DP-70, Olympus, Tokyo, Japan)로 촬영하고 이를 컴퓨터에 저장하였다. 저장된 상은 이미지 분석 프로그램(Image analyzer program, MetaMorph, UIC, Pennsylvania, USA)을 이용하여 핵 대비 telomeric DNA 분포량을 계산하였다.

4. 통계 분석

처리 간 생산 능력, 장기 무게, 혈장 생화학 지표 및 닭의 각 조직 내 telomeric DNA 함량을 비교 분석하기 위하여 SAS package program(SAS Institute Inc, Cary, NC, USA)을 이용하여 one-way ANOVA 및 Turkey 다중검정분석법으로 처리 평균간 유의성 검증을 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 가시오갈피 및 두충 첨가 급여에 따른 생산 능력

가시오갈피와 두충 첨가에 따른 육계의 생산 능력을 Table 2에 제시하였다. 육계 성장 전기(4~21일)에 체중 및 증체량에 있어서는 대조구를 포함한 모든 처리구간에 유의적 차이가 없었으나, 사료 섭취량 및 사료 요구율은 가시오갈피 첨가구(0.5% 및 1.0%)가 대조구에 비해 상대적으로 불량한 성적을 나타내었다($P<0.05$). 성장 후기(22~35일)에서는 사료요구율에서 두충 0.5% 첨가구가 다른 처리구에 비해 다소 양호한 성적을 보인 것을 제외하고 체중, 증체량, 사료 섭취량 등 대부분의 생산 능력에서 처리구 간 차이가 없는 것으로 나타났다. 시험 전체 기간(4~35일) 동안의 사양 성적을 살펴보면 증체량 및 사료 섭취량에서는 처리구간 유의적 차이를 보이지 않았으나, 사료 요구율에 있어서는 가시오갈피 첨가 급여구가 대조구 및 두충 첨가구에 비해 다소 저조한 결과를 나타내었다.

Table 2. Effect of dietary supplementation of Siberian ginseng and Eucommia on growth performance, feed intake and feed conversion ratio in broiler chickens

Item ¹	Treatments				
	Control	0.5% Siberian ginseng	1% Siberian ginseng	0.5% Eucommia	1% Eucommia
Initial BW	69.38 ± 0.72	70.14 ± 0.69	69.38 ± 0.49	69.69 ± 0.59	70.00 ± 0.64
<u>4~21 days</u>					
BW (g)	807.29 ± 11.78	811.19 ± 42.37	774.06 ± 49.21	799.38 ± 13.88	789.69 ± 9.18
Gain (g)	737.92 ± 11.98	741.05 ± 42.06	704.69 ± 49.08	729.69 ± 13.83	719.69 ± 9.23
FI (g)	1118.96 ± 17.42 ^b	1305.96 ± 65.88 ^a	1288.61 ± 77.36 ^a	1226.29 ± 30.38 ^{ab}	1100.63 ± 19.86 ^b
FCR	1.52 ± 0.02 ^c	1.77 ± 0.06 ^{ab}	1.84 ± 0.04 ^a	1.68 ± 0.02 ^b	1.53 ± 0.04 ^c
<u>22~35 days</u>					
BW	2035.00 ± 46.55	2016.79 ± 54.54	1893.91 ± 45.93	2014.84 ± 2.28	1973.75 ± 56.14
Gain	1227.71 ± 36.61	1205.60 ± 81.72	1119.84 ± 41.63	1215.47 ± 20.42	1184.06 ± 49.65
FI	1735.94 ± 56.14	1774.41 ± 58.57	1797.88 ± 90.53	1623.28 ± 50.02	1815.57 ± 75.06
FCR	1.42 ± 0.06 ^{ab}	1.50 ± 0.08 ^{ab}	1.63 ± 0.13 ^a	1.34 ± 0.03 ^b	1.55 ± 0.07 ^{ab}
<u>4~35 days</u>					
Total gain	1965.63 ± 46.83	1946.64 ± 54.32	1824.53 ± 45.93	1945.16 ± 27.66	1903.75 ± 55.83
Total FI	2854.90 ± 64.83	3129.52 ± 122.94	3135.69 ± 183.85	2844.38 ± 57.83	2962.81 ± 125.11
Total FCR	1.46 ± 0.04 ^b	1.61 ± 0.05 ^{ab}	1.72 ± 0.10 ^a	1.46 ± 0.02 ^b	1.56 ± 0.06 ^{ab}

¹ Item; BW (Body weight), Gain (Weight gain), FI (Feed intake) and FCR (Feed conversion ratio).

^{a-c} Values with different superscripts differ significantly among treatments ($P < 0.05$).

지금까지 매우 다양한 천연 생리 활성 식물성 소재들이 소개되고 있고, 대개 이들 소재들은 우수한 항산화 능력을 지니고 있는 것으로 보고되고 있다. 육계에 있어 천연 생리 활성물질의 급여는 복수증 예방이나 면역력의 증강 및 고기의 보존성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 육계에 있어 천연 항산화 물질로서 포도씨끼(Goni 등, 2007; Brenes 등, 2008), 해바라기 씨앗(Galvin 등, 1997; Rebole 등, 2006; Rama Rao 등, 2006), 올리브유(O'Neill 등, 1998), 로즈마리(Lopez-Bote 등, 1998), essential oil(Hernandez 등, 2004) 등을 이용한 첨가 시험이 수행된 바 있는데, 이들 대부분이 생산 능력의 저하 없이 항산화 효과와 더불어 고기의 보존성과 안정성에 개선의 효과를 보고하고 있다. 가시오갈피와 두충은 지역에 산재하는 값싼 천연 부존 식물로서 항산화 효과와 더불어 다양한 약리 작용을 지니는 것으로 알려져 있다(Amella 등, 1985; Uchida, 1991; Hsieh 와 Yen, 2000; Lee 등, 2003; Shi 등, 2003). 따라서 본 연구에서는 이를 이용하여 육계의 생리활성 사료 첨가제로 개발 가능성을 살펴보고자 우선 첨가 급

여에 따른 생산 능력에 미치는 영향을 고찰하였다. 사양 시험 결과 육계에 있어 가시오갈피 및 두충의 첨가 급여는 1% 첨가 수준 이하에서 소재와 관계없이 체중 및 증체량과 같은 생산 능력에 부정적인 영향이 없는 것으로 나타났으며, 사료 섭취량에 있어서도 첨가 급여에 따른 섭취량의 저하가 없는 것으로 나타났다. 이상의 결과로부터 육계에 있어 가시오갈피와 두충의 소량 첨가(0.5%)는 생산 능력의 저하 없이 개체의 생리 활성도를 증진할 수 있는 것으로 판단되어 개발 가능성이 높은 천연 생리활성 식물성 사료 첨가 소재로 사료된다.

2. 장기 무게 변화

가시오갈피 및 두충 첨가에 따른 육계의 각종 장기 무게의 변화를 조사한 결과는 Table 3과 같다. 시험 결과 간, 비장 및 흉선의 무게는 가시오갈피 및 두충 급여와 수준에 상관없이 대조구와 유사한 결과를 나타내었다. 그러나 파브리시우스낭(bursa of Fabricius; F낭)은 두충 1.0% 첨가구가 다

Table 3. Effect of dietary supplementation of Siberian ginseng and Eucommia on organ weights in broiler chickens

Item	Treatments				
	Control	0.5% Siberian ginseng	1% Siberian ginseng	0.5% Eucommia	1% Eucommia
	----- % (organ weight/body weight×100) -----				
Liver	2.26 ± 0.10	2.35 ± 0.25	2.26 ± 0.11	2.20 ± 0.08	2.30 ± 0.15
Spleen	0.13 ± 0.01	0.15 ± 0.03	0.12 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.13 ± 0.02
Thymus	0.25 ± 0.02	0.36 ± 0.08	0.30 ± 0.03	0.42 ± 0.06	0.36 ± 0.04
Bursa of fabricius	0.18 ± 0.02 ^b	0.25 ± 0.02 ^{ab}	0.26 ± 0.03 ^{ab}	0.24 ± 0.02 ^{ab}	0.31 ± 0.04 ^a

^{a,b} Values with different superscripts differ significantly among treatments ($P < 0.05$).

른 처리구에 비해 유의적($P < 0.05$)으로 증가되었으며, 모든 천연물 첨가구가 대조구에 비해 전반적으로 F낭의 무게가 높게 나타났다. F낭은 가금류에만 존재하는 체액성 면역과 관련된 림프구를 형성하는 조직이다(Ribatti 등, 2006). 따라서 가시오갈피 및 두충 급여구에서 이의 크기가 작은 본 조직의 기능적 활성도가 상대적으로 높다는 것을 간접적으로 시사하는 것으로 가시오갈피 및 두충의 급여가 개체의 면역작용 활성화에 매우 긍정적 영향을 미치는 것으로 사료된다.

3. 혈액 생화학적 성분 변화

천연 항산화 물질인 가시오갈피 및 두충 급여에 따른 육계의 혈액 생화학적 성분에 대한 결과는 Table 4와 같다. 시험 종료 후 35일령 개체로부터 얻은 혈장 내 albumin, AST, ALT 및 total protein과 같은 대부분의 생화학적 성분은 대조

구와 처리구 간에 거의 비슷한 수치를 나타내었다. 그러나 triglycerides는 대조구에 비해 가시오갈피 1% 처리구에서 유의적($P < 0.05$)으로 높게 나타났으며, cholesterol은 두충 처리구가 다른 시험구에 비해 높게 나타났다. 혈중 glucose 수준은 생리활성 물질 첨가 급여구 모두에서 대조구에 비해 현저히 높게 나타났다($P < 0.05$). 이와 같은 결과는 대조구에 비해 천연물 급여구가 혈중 생화학 성분 중 에너지 대사에 관련된 성분이 현저히 증가된 양상이다. 이는 가시오갈피 및 두충의 급여가 지방 및 탄수화물 대사를 보다 활성화 하는 것으로 해석되나, 이에 대한 원인과 기작에 대해서는 또 다른 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다. 그러나 천연물 급여에 따른 간 기능 수치 관련 지표에서는 모든 처리구간에 유의적 차이가 없는 것으로 나타나 저 수준의 가시오갈피 및 두충 급여는 육계의 생리적 대사 작용에 부정적 영향이 없는 것으로 사료된다.

Table 4. Effect of dietary supplementation of Siberian ginseng and Eucommia on blood biochemical profiles in broiler chickens

Item	Treatments				
	Control	0.5% Siberian ginseng	1% Siberian ginseng	0.5% Eucommia	1% Eucommia
Albumin (g/dL)	1.2 ± 0.03	1.2 ± 0.04	1.2 ± 0.05	1.3 ± 0.06	1.3 ± 0.09
AST (IU/μL)	305.1 ± 25.01	309.2 ± 25.46	302.7 ± 16.81	333.0 ± 15.61	330.7 ± 25.46
ALT (IU/μL)	3.6 ± 0.30	3.3 ± 0.42	3.4 ± 0.37	4.0 ± 0.22	3.9 ± 0.51
Total protein (g/dL)	3.8 ± 0.24	3.3 ± 0.11	3.4 ± 0.09	3.4 ± 0.19	4.0 ± 0.31
Triglyceride (mg/dL)	19.3 ± 1.51 ^b	19.8 ± 1.28 ^b	29.4 ± 3.39 ^a	26.0 ± 2.43 ^{ab}	23.9 ± 2.03 ^{ab}
Cholesterol (g/dL)	147.7 ± 5.94 ^b	160.0 ± 6.45 ^{ab}	169.9 ± 9.41 ^{ab}	182.0 ± 6.66 ^a	181.7 ± 14.65 ^a
Glucose (mg/dL)	216.9 ± 5.64 ^b	256.0 ± 10.76 ^a	254.1 ± 6.34 ^a	253.1 ± 8.83 ^a	253.9 ± 15.66 ^a

^{a,b} Values with different superscripts differ significantly among treatments ($P < 0.05$).

4. 가시오갈피 및 두충 첨가 급여에 따른 텔로미어 함량 분석

실용 브로일러를 대상으로 가시오갈피 및 두충 첨가 급여가 세포의 생리적 활성도에 미치는 영향을 살펴보고자 35일령 개체의 각 조직별 세포들에 대한 텔로미어 함량을 분석하였다.

Table 5는 시험 종료시 처리구 별 개체들의 혈액, 간, 폐, 심장 및 정소 세포의 평균 텔로미어 함유율을 분석 제시한 값이다. 전체적으로 조직 별 세포간 텔로미어 함유율은 거의 차이가 없는 것으로 나타나나, 조직에 따라 생리활성 물질 첨가 급여에 따른 함량의 차이는 있는 것으로 보여진다. 백혈구 세포의 텔로미어 함유율은 평균 2.83%로 처리구 간 생리활성물질 첨가 급여에 따른 유의적인($P < 0.01$) 영향을 있음을 나타내고 있다. 가시오갈피(2.9%) 및 두충(2.8%)의 첨가 급여가 급여치 않은 개체(2.7%)들에 비해 유의적으로 높은 텔로미어 함유율을 보이고, 특히 가시오갈피 첨가가 두충에 비해 더욱 효과적임을 나타내었다. 반면 0.5% 및 1%의 첨가 수준간에는 유의적 차이가 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 가시오갈피와 두충의 첨가 급여가 브로일러의 백혈구 세포의 생리활성도에 영향을 미치므로 특히 개체의 노화 및 면역과 관련하여 유의한 효과가 있음을 시사하는 것이다. 또한, 폐와 같은 호흡기 세포의 경우 생리활성 물질 첨가 급여가 대조구에 비해 유의적으로 높은 텔로미어 함유율을 보이고 있는데, 특히 가시오갈피 1% 처리구 및 두충 첨가구가 높은 함유율을 나타내었다. 이는 본 급여 물질들이 호흡기계 세포들의 생리활성도에도 영향을 미치는 것으로 생각되어 이들 조직의 특성과 텔로미어간의 관계에 대해 보다 면밀한 검토가 필요한 것으로 사료된다. 그러나 비 증식성 세포인 간이

나 심장과 증식성 세포인 정소에서는 생리활성 물질 첨가 급여에 따른 텔로미어 함유율의 차이는 없는 것으로 나타났다.

텔로미어는 염색체 말단부에 위치한 DNA-단백질 복합체로서 (TTAGGG) $_n$ 의 DNA 염기 서열로 구성되어 있고 염색체 안정성에 주된 작용을 한다. 세포 분열이 진행함에 따라 텔로미어 길이는 짧아지고 일정 길이 이하가 되면 세포 사망 (apoptosis)이 유기되므로 텔로미어 길이와 세포의 노화간에는 매우 밀접한 관련이 있다(Greider와 Blackburn, 1985; Ahmed와 Tollefsbol, 2001; Cottliar와 Slavutsky, 2001; Sohn 등, 2002). 뿐만 아니라 개체의 생리활성도와 텔로미어 길이간에도 밀접한 관련성이 있는 것으로 알려져 텔로미어 길이를 이용한 생리적 표지 연구가 활발히 진행되고 있다(Frenck 등, 1998; Jeanclos 등, 2000; Benetos 등, 2001; Okuda 등, 2002). 텔로미어의 감축은 세포 분열시 말단 DNA가 복구가 되지 않으므로 유기되는 현상인데, 이의 유실량과 속도는 여러 환경적 요인들에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 이들 중 세포의 산화적 스트레스(oxidative stress)가 텔로미어 감축을 촉진시키는 가장 큰 요인으로 알려져 있는데(Saretzki와 von Zglinicki, 1999; von Zglinicki, 2000; Kurz 등, 2004), 항산화제는 이러한 현상을 완화 또는 지연시킨다(Xu 등, 2000; Bar-Or 등, 2001; Haendeler 등, 2004). 따라서 이러한 항산화제 첨가 급여가 생체 세포 내 텔로미어 감축에 미치는 영향을 근거로 본 시험에서는 육계에 가시오갈피 및 두충을 첨가 급여하여 텔로미어의 함량을 비교 분석하므로 항산화의 효과를 살펴보았다. 시험 결과 육계에 있어 소량의 가시오갈피 및 두충의 첨가는 면역 관련 세포들의 텔로미어 감축을 현저히 완화함으로써 첨가 물질들이 개체의 항산화와 관련하여 매우 긍정

Table 5. The relative amount of telomeric DNA in interphase nuclei of the tissues in broiler chickens at 35 days

Treatments	Control	0.5% Siberian ginseng	1% Siberian ginseng	0.5% Eucommia	1% Eucommia
Blood	2.72 ± 0.06 ^b (n=700)	2.90 ± 0.04 ^a (n=700)	2.92 ± 0.04 ^a (n=700)	2.85 ± 0.04 ^{ab} (n=600)	2.76 ± 0.04 ^{ab} (n=700)
Liver	2.25 ± 0.06 (n=150)	2.36 ± 0.04 (n=150)	2.38 ± 0.04 (n=150)	2.31 ± 0.06 (n=150)	2.32 ± 0.07 (n=150)
Lung	2.22 ± 0.06 ^b (n=150)	2.26 ± 0.05 ^{ab} (n=150)	2.33 ± 0.04 ^a (n=150)	2.30 ± 0.04 ^a (n=150)	2.32 ± 0.05 ^a (n=150)
Heart	2.30 ± 0.04 (n=150)	2.37 ± 0.07 (n=150)	2.40 ± 0.24 (n=150)	2.36 ± 0.04 (n=150)	2.37 ± 0.04 (n=150)
Testis	2.33 ± 0.04 (n=150)	2.36 ± 0.04 (n=150)	2.37 ± 0.03 (n=150)	2.32 ± 0.05 (n=150)	2.33 ± 0.04 (n=150)

^{ab} Values (Means ± SE) with different superscripts differ significantly among treatments ($P < 0.01$).

적 효과를 나타낸 것으로 생각된다.

적 요

가시오갈피와 두충은 강력한 항산화 작용을 가진 약용 식물로 알려져 있다. 본 연구에서는 상업용 브로일러를 대상으로 가시오갈피 잎과 두충 잎의 첨가 급여(0.5% 및 1%)가 개체의 생산 능력, 장기 무게, 혈장 생화학적 성분 및 텔로미어 함량에 미치는 영향을 알아보려고 하였다. 시험 전체 기간(4~35일) 동안 체중, 증체량 및 사료 섭취량에서는 처리구 간 유의적 차이를 보이지 않았으나, 사료 요구율에 있어서는 가시오갈피 첨가 급여구가 대조구 및 두충 첨가구에 비해 다소 저조한 결과를 나타내었다. 장기 무게에 있어서 간, 비장 및 흉선의 무게는 처리구 간 차이가 없었으나, F낭(bursa of Fabricius)의 무게는 가시오갈피 및 두충 첨가 급여가 대조구에 비해 유의적으로 높게 나타났다. 혈액 생화학적 성분 분석에서는 혈장 내 albumin, AST, ALT 및 total protein은 대조구와 처리구 간에 거의 비슷한 수치를 나타내었으나 triglycerides, cholesterol 및 glucose 수준은 생리활성 물질 첨가 급여구가 대조구에 비해 높게 나타났다. 가시오갈피 및 두충 첨가에 따른 각 조직 별 텔로미어 함량 분석에 있어 백혈구 내 텔로미어 함유율은 모든 첨가 급여구가 대조구에 비해 현저히 높은 함량을 보이거나 간, 심장, 정소 조직 간에는 처리구별 차이가 없었다. 이상의 결과로부터 브로일러에 가시오갈피와 두충의 첨가 급여는 생산의 능력 저하 없이 개체의 면역 활성을 증진시키고, 텔로미어 길이의 감축을 상대적으로 완화시키는 것으로 판단된다.

사 사

본 논문은 농림부 농림기술개발사업(과제번호 106118-3)의 지원에 의해 수행되었습니다.

인용문헌

Ahmed A, Tollefsbol T 2001 Telomeres and telomerase: basic science implications for aging. *J Am Geriatr Soc* 49(8): 1105-1109.

Amella M, Bronner C, Briancon F, Haag M, Anton R, Landry Y 1985 Inhibition of mast cell histamine release by flavo-

noids and biflavonoids. *Planta Med* 1:16-20.

Bar-Or D, Thomas GW, Rael LT, Lau EP, Winkler JV 2001 Asp-Ala-His-Lys (DAHK) inhibits copper-induced oxidative DNA double strand breaks and telomere shortening. *Biochem Biophys Res Commun* 282(1):356-360.

Benetos A, Okuda K, Lajemi M, Kimura M, Thomas F, Skurnick J, Labat C, Bean K, Aviv A 2001 Telomere length as an indicator of biological aging: the gender effect and relation with pulse pressure and pulse wave velocity. *Hypertension* 37(2):381-385.

Brenes A, Viveros A, Goñi I, Centeno C, Sáyago-Ayerdy SG, Arija I, Saura-Calixto F 2008 Effect of grape pomace concentrate and vitamin E on digestibility of polyphenols and antioxidant activity in chickens. *Poult Sci* 87(2):307-316.

Cottliar AS, Slavutsky IR 2001 Telomeres and telomerase activity: their role in aging and in neoplastic development. *Medicina* 61:335-342.

Frencik RW Jr, Blackburn EH, Shannon KM 1998 The rate of telomere sequence loss in human leukocytes varies with age. *Proc Natl Acad Sci* 95(10):5607-10.

Galvin K, Morrissey PA, Buckley DJ 1997 Influence of dietary vitamin E and oxidised sunflower oil on the storage stability of cooked chicken muscle. *Br Poult Sci* 38(5):499-504.

Goñi I, Brenes A, Centeno C, Viveros A, Saura-Calixto F, Rebolé A, Arija I, Estevez R 2007 Effect of dietary grape pomace and vitamin E on growth performance, nutrient digestibility, and susceptibility to meat lipid oxidation in chickens. *Poult Sci* 86(3):508-516.

Greider CW, Blackburn EH 1985 Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 43:405-413.

Haendeler J, Hoffmann J, Diehl JF, Vasa M, Spyridopoulos I, Zeiher AM, Dimmeler S 2004 Antioxidants inhibit nuclear export of telomerase reverse transcriptase and delay replicative senescence of endothelial cells. *Circ Res* 94(6):768-775.

Hernández F, Madrid J, García V, Orengo J, Megías MD 2004 Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. *Poult Sci* 83(2):169-174.

Hsieh CL, Yen GC 2000 Antioxidant actions of du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) toward oxidative damage in biomolecules. *Life Sci* 66(15):1387-1400.

- Jeanclous E, Schork NJ, Kyvik KO, Kimura M, Skurnick JH, Aviv A 2000 Telomere length inversely correlates with pulse pressure and is highly familial. *Hypertension* 36(2):195-200.
- Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Trivier E, Akhmedov A, Erusalimsky JD 2004 Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells. *J Cell Sci* 117:2417-2426.
- Lee SE, Shin HT, Hwang HJ, Kim JH 2003 Antioxidant activity of extracts from *Alpinia katsumadai* seed. *Phytother Res* 7(9):1041-1047.
- Lopez-Bote CJ, Gray JI, Gomaa EA, Flegal CJ 1998 Effect of dietary administration of oil extracts from rosemary and sage on lipid oxidation in broiler meat. *Br Poult Sci* 39(2):235-240.
- O'Neill LM, Galvin K, Morrissey PA, Buckley DJ 1998 Comparison of effects of dietary olive oil, tallow and vitamin E on the quality of broiler meat and meat products. *Br Poult Sci* 39(3):365-371.
- Okuda K, Bardeguet A, Gardner JP, Rodriguez P, Ganesh V, Kimura M, Skurnick J, Awad G, Aviv A 2002 Telomere length in the newborn. *Pediatr Res* 52(3):377-381.
- Rama Rao SV, Raju MV, Panda AK, Reddy MR 2006 Sunflower seed meal as a substitute for soybean meal in commercial broiler chicken diets. *Br Poult Sci* 47(5):592-598.
- Rebolé A, Rodríguez ML, Ortiz LT, Alzueta C, Centeno C, Vi-veros A, Brenes A, Arijia I 2006 Effect of dietary high-oleic acid sunflower seed, palm oil and vitamin E supplementation on broiler performance, fatty acid composition and oxidation susceptibility of meat. *Br Poult Sci* 47(5):581-591.
- Ribatti D, Crivellato E, Vacca A 2006 The contribution of Bruce Glick to the definition of the role played by the bursa of Fabricius in the development of the B cell lineage. *Clin Exp Immunol* 145(1):1-4.
- Ross Broiler Management Manual 2002 Aviagen Incorporated, Huntsville, Alabama
- Saretzki G, von Zglinicki T 1999 Replicative senescence as a model of aging: the role of oxidative stress and telomere shortening. *Z Gerontol Geriatr* 32(2):69-75.
- Shi Y, Wang W, Mo J, Du L, Yao S, Tang W 2003 Interactions of growth inhibitory factor with hydroxyl and superoxide radicals. *Biomaterials* 16(3):383-389.
- Sohn SH, Multani AS, Gugnani PK, Pathak S 2002 Telomere erosion-induced mitotic catastrophe in continuously grown Chinese hamster Don cells. *Exptl Cell Res* 279(2):271-276.
- Uchida Y 1991 Growth-inhibitory factor. *No To Shinkei* 43(12):1114-1120.
- von Zglinicki T 2000 Role of oxidative stress in telomere length regulation and replicative senescence. *Ann N Y Acad Sci* 908:99-110.
- Xu D, Neville R, Finkel T 2000 Homocysteine accelerates endothelial cell senescence. *FEBS Lett* 470(1):20-24.

(접수: 2008. 09. 06, 수정: 2008. 09. 12, 채택: 2008. 09. 15)



(11) **EP 3 492 093 A1**

(12) **EUROPEAN PATENT APPLICATION**

(43) Date of publication:
05.06.2019 Bulletin 2019/23

(51) Int Cl.:
A61K 36/74^(2006.01) A61K 9/00^(2006.01)
A61K 9/70^(2006.01) A61P 25/28^(2006.01)

(21) Application number: **18209434.2**

(22) Date of filing: **30.11.2018**

(84) Designated Contracting States:
AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO RS SE SI SK SM TR
Designated Extension States:
BA ME
Designated Validation States:
KH MA MD TN

(72) Inventors:
• **GIAMPAPA, Vincent C.**
Monclair, NJ New Jersey 07042 (US)
• **CROUSE, Linda**
Ben Lomond, CA California 95005 (US)

(74) Representative: **Zaccaro, Elisabetta et al**
Notarbartolo & Gervasi S.p.A.
Corso di Porta Vittoria, 9
20122 Milano (IT)

(30) Priority: **30.11.2017 US 201715827223**

(71) Applicant: **Optigenex, Inc.**
Melissa, TX 75454 (US)

(54) **INCREASING TELOMERE LENGTH IN A CELL**

(57) A method of increasing the lengths of telomeres in animal cells is practiced by administering an aqueous extract of an *Uncaria* species to an animal. The animal may be a human and the *Uncaria* species may be *Uncaria tomentosa*. Human subjects receiving a daily dose of an

aqueous extract of *Uncaria tomentosa* for a sufficient period of time exhibited an increase in telomere length relative to a baseline measurement taken prior to treatment. The extract may be administered topically or systemically.

Description

BACKGROUND OF THE INVENTION

5 [0001] The present invention relates to a method of increasing the length of a telomere in an animal cell. The invention is practiced by administering an aqueous extract of an *Uncaria* species to an animal.

[0002] A telomere is a region of repetitive DNA sequence at the end of a chromosome, which protects the end of the chromosome from truncation and from fusion with a neighboring chromosome. Accordingly, telomeres provide stability to linear DNA molecules (Greider, CW (1990) *BioEssays* 12(8):363-369). The telomeric TTAGGG repeat sequences capping the ends of chromosomes have been shown to shorten during replicative ageing of normal cells (Harley et al. (1990) *Nature* 345(6274): 458-460).

10 [0003] Telomeres are consumed during cell division, but are replenished by the action of the enzyme telomerase reverse transcriptase. Human somatic cells without telomerase gradually lose telomeric sequences as a result of incomplete replication. Various methods for increasing the length of a telomere in a cell are known in the art (Joeng et al. (2004) *Long lifespan in worms with long telomeric DNA. Nature Genetics* 36(6): 607-611; Bodnar et al. (1998) *Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. Science* 279(5349): 349-352). These methods primarily rely on increasing the activity of telomerase. For example, a study that looked at normal human cells over-expressing the human telomerase catalytic subunit demonstrated elongated telomeres as a result of enhanced telomerase activity (Bodnar et al., *supra*) As distinguished from the present invention, these prior art methods do not provide a means of enhancing DNA repair in combination with a method of increasing the activity of telomerase, or otherwise increasing telomere length.

[0004] Methods for measuring telomere length are well known in the art and are described, for example, in Cawthon, RM (2002) *Nucleic Acids Res.* 30(10): e47, Harley et al. (1990) *Nature* 345: 458-460, O'Callaghan and Fenech (2011) *Biological Procedures Online* 13:3, USPN 5,489,508 (West et al., issued February 6, 1996), and USPN 5,741,677 (Kozlowski et al., issued April 21, 1998). Any method of measuring telomere length can be used in the present invention.

25 [0005] Any nucleated cell type may be used for the purpose of measuring telomere length. Lymphocytes and buccal cells are commonly used, as they are easily obtained from patients (O'Callaghan and Fenech (2011) *Biological Procedures Online* 13:3). Peripheral leukocytes are also commonly used for telomere length assessment (Aviv et al. (2011) *Nucleic Acids Research* 39(20): e134). As described herein, the terms "peripheral leukocytes" and "white blood cells" are used interchangeably. Genomic DNA isolated from the nucleated cell type of interest is used to measure telomere length. Methods for isolating genomic DNA are well known in the art.

[0006] AC-11®, formerly known as C-Med 100®, is a hot water extract of the bark of the plant *Uncaria tomentosa*. Its characterization and method of preparation are described in U.S. Pat. No. 6,039,949 to Pero (issued March 21, 2000). Animal and human studies have demonstrated a beneficial effect of AC-11® on enhancing DNA repair and immune function (Sheng et al. (2000) *J. Ethnopharmacol.* 69: 115-126; Sheng et al. (2001) *Phytomedicine* 8(4): 275-282).

35 [0007] U.S. Pat. No. 6,039,949 to Pero discloses a water soluble extract of an *Uncaria* species, as well as a method for preparing it. The reference further discloses oral administration of the extract to rats. The reference does not, however, contemplate a method of lengthening the telomeres or otherwise manipulating or maintaining telomere length. Likewise, the reference does not contemplate measuring telomere length.

40 [0008] Sheng et al. (2001, *supra*) disclose oral administration of C-MED-100 (a water extract of *Uncaria tomentosa*) to twelve healthy adult human volunteers. The doses tested were daily doses of 250 mg and 350 mg, for 8 weeks. A decrease of DNA damage and an increase in DNA repair was seen in both supplement groups when compared to an untreated control group. The reference does not disclose a method of lengthening telomeres and does not contemplate measuring telomere length before and after administration of the supplement.

45 [0009] Lamm et al. (2001, *Phytomedicine* 8(4):267-274) disclose oral administration of C-MED-100® at a dose of 350 mg x 2 times daily for two months, to human volunteers. Study participants supplemented with C-MED-100® were tested for their ability to respond to a 23 valent pneumococcal vaccine as compared to an untreated control group. Statistically significant immune enhancement was observed for those in the supplemented group. The reference does not disclose a method of lengthening telomeres and does not contemplate measuring telomere length before and after administration of the supplement.

50 [0010] U.S. Pat. No. 7,955,626 to Pero (issued June 7, 2011) discloses non-topical administration of a purified quinic acid alkyl ester or a carboxy alkyl ester. The reference discloses a water extract of *Uncaria tomentosa*, as well as further purification of the extract by thin layer chromatography to obtain carboxy alkyl esters (CAE). The invention is not directed to administration of a composition comprising quinic acid. Moreover, the method of the invention does not require the inclusion of quinic acid (in the free acid form or a salt thereof) because the invention is specifically directed to administering a pharmaceutical composition comprising an effective amount of an ester, either a quinic acid alkyl ester or a carboxy alkyl ester, meeting specified criteria. Furthermore, the reference does not disclose measuring telomere length and does not contemplate increasing the length of the telomeres.

55

5 [0011] U.S. Pat. No. 8,372,449 (Pero, Ronald W., issued February 12, 2013) describes a method of non-topical administration of a pharmaceutical composition comprising a purified and isolated compound selected from the group consisting of quinic acid and a quinic acid salt. The invention is directed to a method for enhancing the response to tumor formation and/or growth in a mammal in need thereof. The pharmaceutical composition is administered in an amount effective to inhibit TNF- α production or to induce apoptosis of white blood cells, where said quinic acid and said quinic acid salt may form an ammonium salt and/or chelate thereof having a bioassay efficacy using IC₅₀ in HL-60 cells of approximately 500 μ g/ml or less. The disclosure indicates that the bioactive agent of C-MED-100® (a water extract of *Uncaria tomentosa*) *in vivo* is not quinic acid lactone, but rather is quinic acid and its salts, including its ammonium salt. The *in vivo* working examples pertain to oral dosing studies in mice and rats, with administration by gavage in rats and via the drinking water in mice. Treatment of mice with C-MED-100® resulted in an increased number of spleen cells, due to the prolongation of lymphocyte half life. In rats, quinic acid (QA) and its ammonium salt (QAA) were about as effective as C-MED-100® at reversing doxorubicin-induced leukopenia. The reference reveals that daily oral doses of C-MED-100® between 250-700 mg have proven efficacious in humans with regard to enhancing anti-inflammatory, DNA repair, immune stimulation, and anti-tumor processes. This reference does not contemplate a method of lengthening the telomeres or otherwise manipulating or maintaining telomere length. Likewise, the reference does not contemplate measuring telomere length before or after administration of quinic acid, a quinic acid salt, or C-MED-100®.

10 [0012] The bioactive component in AC-11®, formerly known as C-MED-100®, is reported to be quinic acid lactone (USPN 6,964,784, issued November 15, 2005). Moreover, the bioactive agent *in vitro* is quinic acid lactone (USPN 8,372,448, issued February 12, 2013), while the *in vivo* bioactive agent is quinic acid (USPN 8,372,449, issued February 12, 2013).

15 [0013] U.S. Pat. No. 8,974,839 to Giampapa (issued October 16, 2014) discloses a multi-component supplement composition comprising a water extract of *Uncaria tomentosa*, which is disclosed as being a DNA repair complex. The supplement of the invention also comprises a telomere maintenance complex. However, the water extract of *Uncaria tomentosa* is not disclosed as being a telomere maintenance complex. The reference does not contemplate a method of lengthening the telomeres or otherwise manipulating telomere length. Likewise, the reference does not contemplate measuring telomere length.

20 [0014] U.S. Patent Application No. 2017/0128355 to Giampapa et al. (published May 11, 2017) discloses a method of topically applying a multi-component composition comprising a water soluble extract of an *Uncaria* species. The reference does not contemplate a method of lengthening the telomeres or otherwise manipulating or maintaining telomere length. Likewise, the reference does not contemplate measuring telomere length.

25 [0015] U.S. Pat. No. 5,656,665 to Yu et al. (issued August 12, 1997) discloses a method for visibly reducing a skin wrinkle and for reversing the effect of aging on human facial skin by topically applying to the wrinkle and/or affected facial skin quinic acid or quinolactone. A wide variety of preparations are contemplated. The working examples are directed to testing the various compositions in 90 human volunteer subjects, by topical application to the skin. This reference does not contemplate a method of lengthening the telomeres or otherwise manipulating or maintaining telomere length. Likewise, the reference does not contemplate measuring telomere length before or after administration of quinic acid or quinolactone. The reference does not disclose administering a water extract of *Uncaria tomentosa* to a subject or a cell. Moreover, there is no mention of an extract of *Uncaria tomentosa*. The reference is limited to topical application and does not contemplate other modes of administration.

30 [0016] U.S. Patent Application Publication No. 2015/0338387 to Ehrenkranz (published November 26, 2015) discloses a method for monitoring and adjusting a biometric, such as aging. The method of the invention comprises administering to a subject a supplement selected to affect the state of the selected biometric. The supplement may be formulated for oral administration. Among a long list of possibilities, the supplement may be an extract of *Uncaria tomentosa* and the biometric analyte, among a long list of possibilities, may be telomere length. The reference does not include any working examples, nor does it specifically mention using an extract of *Uncaria tomentosa* to increase the length of a telomere in a cell by administration of the extract to a mammal. Moreover, the reference does not specifically disclose a **water** extract of *Uncaria tomentosa*.

35 [0017] U.S. Patent Application No. 2014/0079836 to McDaniel (published March 20, 2014) discloses a method for modulating the activity of the gene maintenance process in order to influence the length and/or structural integrity of the telomere in living cells. Quinic acid is disclosed as an exemplary lifespan altering compound. The method of the invention is specifically directed to contacting a cell, tissue, organ, or organism with quinic acid, or an analog or derivative thereof. Quinic acid is disclosed as being naturally found in the coffee cherry. The disclosure contemplates lengthening telomeres, as well as modulating the activity or level of at least one of the telomere length maintenance genes or modulating the activity or level of telomerase. This reference does not contemplate using a water extract of *Uncaria tomentosa* for any purpose. There is no mention of an *Uncaria* species. The reference does not specifically point to quinic acid as modulating the length of the telomere in living cells. There are no working examples pertaining to quinic acid or telomere lengthening in an organism. Working examples directed to telomere length maintenance are provided, but these are *in vitro* experiments (cells in culture) examining the effects of green tea extract, coffee cherry extract, and idebenone.

[0018] It has now been shown by Applicants that administration of an aqueous extract of an *Uncaria* plant to a subject results in telomere lengthening.

SUMMARY OF THE INVENTION

5 [0019] The present invention relates to a non-therapeutic method of increasing the length of a telomere in an animal cell. The invention is practiced by administering an aqueous extract of an *Uncaria* species to an animal in an amount and for a period of time sufficient to increase the length of said telomere, and measuring the length of said telomere before and after administration of said extract. In a preferred embodiment, the method of the invention is directed to increasing the length of a telomere in a mammalian cell, said method comprising administering an aqueous extract of an *Uncaria* species to a mammal, or a mammal in need thereof, in an amount and for a period of time sufficient to increase the length of said telomere, and measuring the length of said telomere before and after administration of said extract. Said preferred embodiment comprises the steps of:

- 15 a) measuring the length of one or more telomeres of a cell sample from the subject;
b) administering to the subject an aqueous extract of an *Uncaria* species in an amount and for a period of time sufficient to increase the lengths of said telomeres in said cells of said subject;
c) re-measuring lengths of one or more telomeres, wherein if the telomeres have not lengthened, administering is continued; and
20 d) said method resulting in lengthening of said telomeres.

[0020] As such, it is a first object of the present invention to provide a method of increasing telomere length in a cell, said method comprising administering to a subject an aqueous extract of an *Uncaria* species in an amount and for a period of time sufficient to increase the length of a telomere in a cell of said subject.

25 [0021] It is a further object of the present invention to provide a method of increasing telomere length in a cell, said method comprising orally administering to a subject a daily dose of about 200 mg to about 700 mg of an aqueous extract of an *Uncaria* species for a period of time sufficient to increase the length of a telomere in a cell of said subject.

[0022] It is a still further object of the present invention to provide a method of increasing telomere length in a cell, said method comprising administering to a subject an aqueous extract of an *Uncaria* species in a pharmaceutically effective amount and for a period of time sufficient to increase the length of a telomere in a cell of said subject, wherein said *Uncaria* species is *Uncaria tomentosa*.

[0023] It is a still further object of the present invention to provide a method of increasing telomere length in a cell, said method comprising orally administering to a subject a daily dose of about 200 mg to about 700 mg of an aqueous extract of an *Uncaria* species for a period of time sufficient to increase the length of a telomere in a cell of said subject, wherein said *Uncaria* species is *Uncaria tomentosa*, wherein the period of time sufficient to increase the length of a telomere in a cell of said subject is at least one year, and further wherein said aqueous extract comprises a minimum of 8% carboxy alkyl esters (CAEs) (weight/weight (w/w)).

[0024] It is a still further object of the present invention to provide a method of increasing telomere length in a cell, said method comprising orally administering to a subject an aqueous extract of an *Uncaria* species in an amount and for a period of time sufficient to increase the length of a telomere in a cell of said subject, wherein said aqueous extract of an *Uncaria* species is provided as a capsule, tablet, liquid, or gel, and wherein said *Uncaria* species is *Uncaria tomentosa*. The capsule, tablet, liquid, or gel may be provided as a time-release formula or extended-release formula.

[0025] It is a still further object of the present invention to provide a method of increasing telomere length in a cell, said method comprising orally administering to a subject a daily dose of about 700 mg of an aqueous extract of an *Uncaria* species for a period of time sufficient to increase the length of a telomere in a cell of said subject, wherein said *Uncaria* species is *Uncaria tomentosa*, and said subject is a human. In a preferred aspect said subject is in good health. It is a still further object of the present invention to provide an aqueous extract of an *Uncaria* species for use in increasing the length of telomeres in a cell of a subject having Alzheimer's disease, Parkinson's disease or cancer.

[0026] These and other objects, aspects and features of the present invention will be better understood from the following detailed description when read in conjunction with the examples described herein.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0027]

55 FIG. 1 Telomere length of a human study participant, subject HV, before treatment and after treatment, at timepoints of one year and two years. Treatment was carried out by oral administration of an aqueous extract of *Uncaria tomentosa* formulated into a capsule, at a daily dose of 700 mg. The standard curve provides average telomere

lengths for the general population at different ages.

FIG. 2 Telomere length of a human study participant, subject EL, before treatment and after treatment, at timepoints of one year and two years.

FIG. 3 Telomere length of a human study participant, subject DB, before treatment and after treatment, at timepoints of one year and two years.

FIG. 4 Telomere length of a human study participant, subject LC, before treatment and after treatment, at timepoints of one year and two years.

FIG. 5 Telomere length of a human study participant, subject RC, before treatment and after treatment, at timepoints of one year and two years. This subject stopped using AC-11®, for 4 to 5 months, during the second year of the study, in accordance with their doctor's request.

FIG. 6 Telomere length of a human study participant, subject LM, before treatment and after treatment, at timepoints of one year and two years.

FIG. 7 Telomere length of a human study participant, subject KC, before treatment and after treatment, at timepoints of one year and two years.

FIG. 8 Telomere length of a human study participant, subject BD, before treatment and after treatment, at timepoints of one year and two years.

FIG. 9 Telomere length of a human study participant, subject MM, before treatment and after treatment, at timepoints of one year and two years. This subject stopped using AC-11®, for 4 to 5 months, in accordance with their doctor's request.

FIG. 10 Telomere length of a human study participant, subject JM, before treatment and after treatment, at timepoints of one year and two years.

FIG. 11 Telomere length of a human study participant, subject LCR, before treatment and after treatment, at timepoints of one year and two years.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0028] Methods for administering a plant extract to an animal, thereby delivering the plant extract to a cell of the animal, are well known in the art. Standard delivery means are contemplated. Accordingly, the plant extract may be formulated into a delivery means such as a capsule, tablet, liquid, gel, lotion, cream, or ointment to facilitate a desired dosing regimen. The plant extract may be administered orally, topically, or via a transdermal patch. The delivery means, particularly a capsule, tablet, liquid, or gel may be provided as a time-release formula or extended-release formula.

[0029] Methods for measuring telomere length are well known in the art and are described, for example, in Cawthon, RM (2002, *supra*), Harley et al. (1990, *supra*), O'Callaghan and Fenech (2011, *supra*), USPN 5,489,508 (West et al., issued February 6, 1996), and USPN 5,741,677 (Kozłowski et al., issued April 21, 1998), as well as the examples provided herein. The quantitative polymerase chain reaction (qPCR) of Cawthon, RM (2002, *supra*) is a fluorescence-based assay that uses a primer pair where each primer is designed to allow DNA polymerase to extend from its 3'-end when it is hybridized to telomere hexamer repeats, but not when it is hybridized to the other primer. Any method of measuring telomere length can be used in the method of the present invention.

[0030] The aqueous extract of *Uncaria tomentosa* used in the examples set forth herein below has been well characterized in over 20 years of research (see e.g., US Pat. No. 6,039,949 to Pero, RW, issued March 21, 2000 and US Pat. No. 8,372,449 to Pero, RW, issued Feb. 12, 2013). The aqueous extract was spray dried onto a carrier element, such as maltodextrin, to obtain a commercial product comprising a minimum of 8% (w/w) carboxy alkyl esters (CAEs), with the concentration of CAEs ranging from 8-10% (w/w), as described in US Pat. No. 8,372,449 (*supra*) and Sheng et al. (2001, *supra*). This product is also known as AC-11®. The examples described herein were carried out using capsules containing 350 mg of AC-11® prepared in this manner.

[0031] AC-11® has been subjected to rigorous toxicological studies (Sheng et al. (2000) J. Ethnopharmacology 69: 115-126). No acute toxicity was observed in rats given a series of single oral doses of the product up to a dose of 8 g/kg body weight or human volunteers given a daily dose of 5 mg/kg for six consecutive weeks. Rats treated daily with *U. tomentosa* extracts at the doses of 10-80 mg/kg for 8 weeks or 160 mg/kg for 4 weeks showed no signs of acute or chronic toxicity (Sheng et al., 2000, *supra*). Furthermore, the bark of the *U. tomentosa* vine is harvested from the wild, specifically the Amazonian rainforest. This is the starting material for the hot water extraction process. No solvents other than water are used in the extraction process. Moreover, AC-11 has an exemplary microbiological profile and an unblemished safety record in over 15 years of commercial use. The toxicological screening assays used to evaluate the safety profile of AC-11 are well known in the art (see e.g., Hasnisa et al. (2017) J. Trop. Agric. and Fd. Sci. 45(1): 111-119; Zhang et al. (2017) Fundam. Toxicol. Sci. 4(2): 45-56; and Parasuraman, S. (2011) J. Pharmacol. and Pharmacotherapeutics 2(2): 74-79).

[0032] The present invention relates to a non-therapeutic method of increasing the length of a telomere in an animal cell. Said method comprises the steps of:

- a) measuring the length of one or more telomeres of a cell sample from the subject;
b) administering to the subject an aqueous extract of an *Uncaria* species in an amount and for a period of time sufficient to increase the lengths of said telomeres in said cells of said subject;
c) re-measuring lengths of one or more telomeres, wherein if the telomeres have not lengthened, administering is continued; and
d) said method resulting in lengthening of said telomeres.

[0033] In a preferred embodiment the animal is a mammal. In a further embodiment, the animal is a rodent, including a mouse or rat. In a further embodiment, the animal is a primate, including a human.

[0034] In some embodiments, the subject is a human having a disease or disorder, such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, or cancer. In other embodiments, the subject is a human in apparent good health. It is a still further object of the present invention to provide an aqueous extract of an *Uncaria* species for use in increasing the length of telomeres in a cell of a subject having Alzheimer's disease, Parkinson's disease or cancer. In a preferred embodiment said use is in a method which comprises the steps of:

- a) measuring the length of one or more telomeres of a cell sample from the subject;
b) administering to the subject an aqueous extract of an *Uncaria* species in a pharmaceutically effective amount and for a period of time sufficient to increase the lengths of said telomeres in said cells of said subject;
c) re-measuring lengths of one or more telomeres, wherein if the telomeres have not lengthened, administering is continued; and
d) said method resulting in lengthening of said telomeres.

[0035] In a preferred embodiment of the method of the invention, the extract is administered orally and the dose is about 700 mg/day. In other embodiments, the dose ranges from about 200 mg/day to about 700 mg/day. In some embodiments, the daily dose is about 350 mg. In other embodiments, the daily dose is about 250 mg. Oral dosing in rats demonstrated an LD₅₀ > 8g/kg (Sheng et al. (2001) J. Ethnopharm. 69: 115-26). Given the high level of tolerance demonstrated in rats, a dose of 10 g/day administered to a subject is contemplated, up to a dose that falls below the level that would be toxic to the subject. Likewise, while a dose of 200 mg/day is contemplated to be effective to increase the length of a telomere in a cell of a subject, when administered for a sufficient period of time, doses below 200 mg/day are also contemplated when effective to increase the length of a telomere in a cell of the subject, when administered for a sufficient period of time. The doses described herein refer to an extract comprising 8-10% (w/w) CAEs.

[0036] In a preferred embodiment, the period of time sufficient to increase the length of telomeres in cells of a subject is a time period of up to one year. In other embodiments, the period of time sufficient to increase the length of telomeres in cells of a subject ranges from about 6 months to about 2 years. In some embodiments, regular dosing, including daily dosing of the *Uncaria* extract, is continued for the life of the subject. The duration of treatment can vary widely and still result in increasing telomere length. One of ordinary skill in the art with this disclosure having been reviewed can determine a pharmaceutically effective dosage to result in telomere lengthening.

[0037] In a preferred embodiment, the frequency of dosing is once daily. In other embodiments, the dosing frequency is twice daily. In still other embodiments, the dosing frequency ranges from at least once daily to at least once monthly. The *Uncaria* extract may be administered once daily, twice daily, once every other day, once every third day, once a week, or once a month. In still other embodiments, a transdermal patch is applied once every other day or once a week and delivers the extract to the subject over an extended period of time. Accordingly, the dosing frequency can vary widely and still result in an increase in telomere length.

[0038] In a preferred embodiment, the subject's telomeres are measured before administration of the extract and after a period of time sufficient to increase the length of a telomere in a cell of a subject. In other embodiments, samples are taken from a subject before administration of the *Uncaria* extract and at various timepoints during the treatment period. Samples may be preserved and telomere length may be assessed any time after obtaining the sample. In some embodiments, the samples are collected, preserved for a period of time, and then subjected to measurement of telomere length after all samples have been obtained from the subject.

[0039] In a preferred embodiment, the *Uncaria* extract is formulated for oral administration, as a capsule, tablet, liquid, syrup, or gel. In other embodiments, the *Uncaria* extract is formulated for topical administration, as a lotion, cream, ointment, or gel. In another embodiment, the *Uncaria* extract is formulated for systemic administration, as a transdermal patch.

[0040] In a further preferred embodiment of the method of the invention, the *Uncaria* species is *Uncaria tomentosa*.

EXAMPLES

[0041] The examples that follow illustrate aspects of the invention and provide one of ordinary skill in the art with a

complete description of how to make and use the present invention, and are not intended to limit the scope of what the inventors regard as their invention nor are they intended to represent that the experiments below are all or the only experiments performed. Rather, these non-limiting examples provide specific methodology useful in practicing the invention.

5

EXAMPLE 1

[0042] AC-11® Human Pilot Study: The Impact of AC-11® on Telomere Length in an Aging Population

[0043] The average person's telomeres shorten each year in adulthood. That fact is reflected in the bold line on each of the figures. A pilot study of 11 human volunteers measured telomere lengths before treatment with AC-11® and after treatment, at timepoints of one year and two years. Treatment was carried out by oral administration of an aqueous extract of *Uncaria tomentosa* formulated into a capsule, at a daily dose of 700 mg. The extract comprised 8-10% CAEs (w/w). The telomeres of all 11 subjects increased in length, sometimes dramatically. FIGS. 1-11 provide both the actual telomere length (in kilobases) and the percentile scores of each subject for a clear visual illustration. The results were surprising and unexpected. The only exceptions were two subjects (RC and MM) who stopped using AC-11®, each for 4 to 5 months, in accordance with their doctor's request (FIGS. 5 and 9). Theirs were the only telomeres which shortened. Note that, it is normal for people in the study to have lost from 2 to 5% in their telomere length at their given ages during the course of the study, if left untreated.

[0044] A pattern has emerged among 4 of the 5 people whose baseline scores started well below the mean. Each score went up slightly in year 1, and then skyrocketed in year 2. This finding may reflect a delayed response to telomere length repair in people with poorer telomere health. While another commercial product (see USPN 7,846,904, issued December 7, 2010) proposes to lengthen telomeres by augmenting telomerase, without repairing DNA damage, this approach is questionable since increasing a cell's capacity to divide without decreasing DNA damage would be expected to increase the chances of accumulating cell mutations and epigenetic changes, which could lead to cancer. Without adequate repair, cells would replicate with an increased accumulation of damaged DNA, which can have a negative impact on health, aging, and disease. The biological effects of AC-11® address this issue in that it both lengthens telomeres and cellular life span while at the same time improving the natural DNA repair process.

[0045] The highest scoring patient went from an average telomere length to the 91st percentile in year 1, and then tapered to 92% in year 2.

[0046] In order to ensure compliance, AC-11® was delivered to each patient on a monthly basis. The selected sample was a fairly homogenous sample: older, wellness oriented individuals with no known disease, ethical, and they paid for their own telomere testing. AC-11® was provided free of charge to each individual.

[0047] Whole blood was drawn from each subject, at appropriate timepoints, processed, and analyzed by SpectraCell, thereby providing unbiased data collection. Nucleated white blood cells were separated from whole blood and used to measure telomere length. Genomic DNA was isolated from the white blood cells and telomere length was evaluated according to the qPCR method of Cawthon, RM (2002, *supra*). The results were surprising and unexpected. Although the statistical sample is small, a clear and strong trend emerged in year one and continued into year two (see Table 1). Changes in telomere length is normally a very slow process, and is normally a shortening process (see standard curve in Figs. 1-11).

40

Table 1. Telomere lengths for each subject before oral dosing and after one year and two years of 700 mg/day oral administration of an aqueous extract of *Uncaria tomentosa*. Subjects RC and MM stopped using AC-11®, for 4 to 5 months, in accordance with their doctor's request. Abbreviations: **kb** = kilobases.

Subject	Baseline (kb)	Year 1 (kb)	Year 2 (kb)	Change (kb)
HV	5.68	6.09	7.24	+1.56
EL	4.57	4.57	5.52	+0.95
DB	7.71	8.16	8.48	+0.77
LC	6.4	7.98	8.06	+1.66
RC	6.02	6.55	6.36	+0.34
LM	5.15	5.37	7.44	+2.29
KC	6.01	7.06	7.63	+1.62
BD	5.67	6.62	7.74	+2.07
MM	6.89	6.62	7.11	+0.22

55

(continued)

Subject	Baseline (kb)	Year 1 (kb)	Year 2 (kb)	Change (kb)
JM	7.27	7.7	7.67	+0.40
LCR	5.2	5.45	6.8	+1.60

EXAMPLE 2

Toxicity Studies

[0048] Oral AC-11®, administered to rats in doses of 40, 80, or 160 mg/kg/day for up to 8 weeks did not result in any significant changes in food consumption or weight gain. Single oral doses up to 8 g/kg did not result in deaths or signs of acute toxicity. Thus, an LD₅₀ > 8g/kg in rats has been reported (Sheng et al. (2000) J. Ethnopharm. 69: 115-26). Rats given 5 to 160 mg/kg of oral AC-11® showed no significant differences in liver, kidney, and spleen weights. One study did note that rats that were administered 80 mg/kg of AC-11® plus doxorubicin had a significantly increased mean heart weight coefficient (4.4%) when compared to animals that only received doxorubicin (0.386% ± 0.034 vs. 0.369% ± 0.022). However, there was no significant difference in mean heart weight when AC-11® plus doxorubicin treated animals were compared to untreated controls. Histopathological examination of tissues obtained from rats treated with 5 to 160 mg/kg/day of AC-11® for up to 8 weeks did not reveal an increase in pathological changes.

Claims

1. A non-therapeutic method for increasing the length of telomeres in a cell of a subject comprising the step of using an aqueous extract of an *Uncaria* species.
2. The method according to claim 1, comprising the steps of:
 - a) measuring the length of one or more telomeres of a cell sample from the subject;
 - b) administering to the subject an aqueous extract of an *Uncaria* species in an amount and for a period of time sufficient to increase the lengths of said telomeres in said cells of said subject;
 - c) re-measuring lengths of one or more telomeres, wherein if the telomeres have not lengthened, administering is continued; and
 - d) said method resulting in lengthening of said telomeres.
3. The method according to any one of claims 1 or 2, wherein said aqueous extract is administered orally.
4. The method according to any one of claims 1 to 3, wherein the amount of said aqueous extract ranges from about 200 mg/day to about 700 mg/day, and further wherein said aqueous extract comprises a minimum of 8% weight/weight (w/w) carboxy alkyl esters (CAEs).
5. The method according to any one of claims 1 to 4, wherein the amount of said aqueous extract is about 700 mg/day.
6. The method according to any one of claims 1 to 5, wherein the subject is a human.
7. The method according to any one of claims 1 to 6, wherein said aqueous extract is formulated into a delivery means selected from the group consisting of a capsule, a tablet, a liquid, a syrup, and a gel.
8. The method according to any one of claims 1 to 7, wherein said aqueous extract is formulated into a transdermal patch.
9. The method according to any one of claims 1 to 8, wherein said *Uncaria* species is *Uncaria tomentosa*.
10. The method according to any one of claims 1 to 9, wherein said subject is in good health.
11. The method according to any one of claims 1 to 10, wherein said period of time sufficient to increase the lengths of said telomeres in cells of said subject is at least 6 months.

12. The method according to any one of claims 1 to 11, wherein said period of time sufficient to increase the lengths of said telomeres in cells of said subject is at least 1 year.

5 13. The method according to any one of claims 1 to 12, wherein the transdermal patch delivers said extract to the subject over an extended period of time.

14. An aqueous extract of an *Uncaria* species for use in increasing the length of telomeres in a cell of a subject having Alzheimer's disease, Parkinson's disease or cancer.

10 15. The aqueous extract for use according to claim 14, wherein said use comprises the steps of:

a) measuring the length of one or more telomeres of a cell sample from the subject;

b) administering to the subject an aqueous extract of an *Uncaria* species in a pharmaceutically effective amount and for a period of time sufficient to increase the lengths of said telomeres in said cells of said subject;

15 c) re-measuring lengths of one or more telomeres, wherein if the telomeres have not lengthened, administering is continued; and

d) said method resulting in lengthening of said telomeres.

20 16. The aqueous extract for use according to any one of claims 14 or 15, wherein the amount of said aqueous extract ranges from about 200 mg/day to about 700 mg/day, and further wherein said aqueous extract comprises a minimum of 8% weight/weight (w/w) carboxy alkyl esters (CAEs).

25 17. The aqueous extract for use according to any one of claims 14 to 16, wherein said aqueous extract is formulated into a delivery means selected from the group consisting of a capsule, a tablet, a liquid, a syrup, a transdermal patch and a gel.

30 18. The aqueous extract for use according to any one of claims 14 to 17, wherein said *Uncaria* species is *Uncaria tomentosa*.

35

40

45

50

55

Figure 1

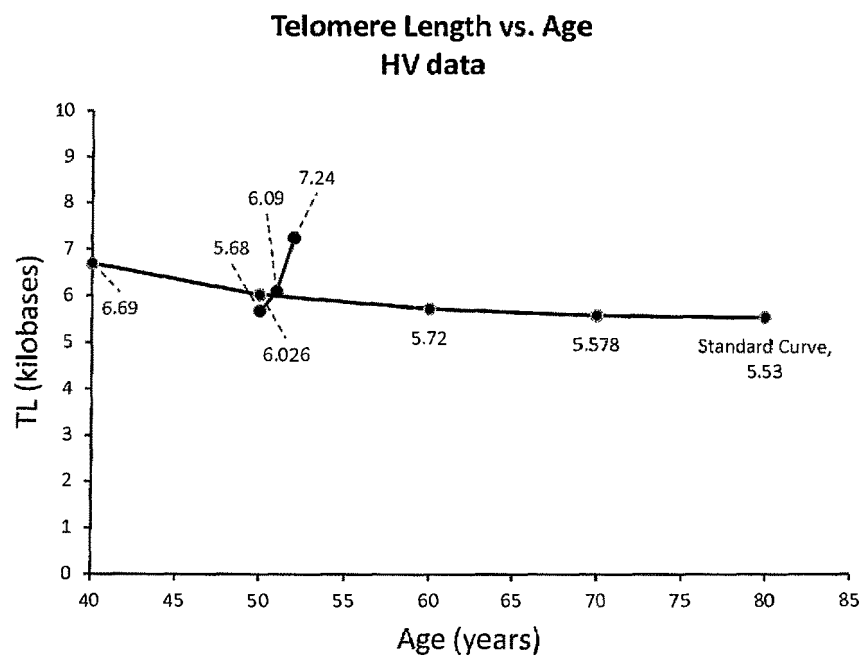


Figure 2

Telomere Length vs. Age
EL data

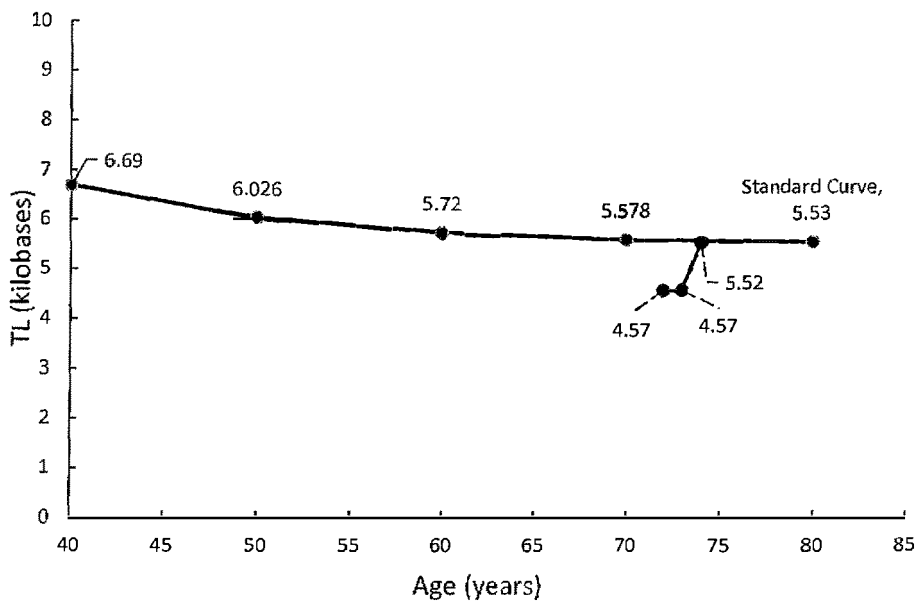


Figure 3

Telomere Length vs. Age
DB data

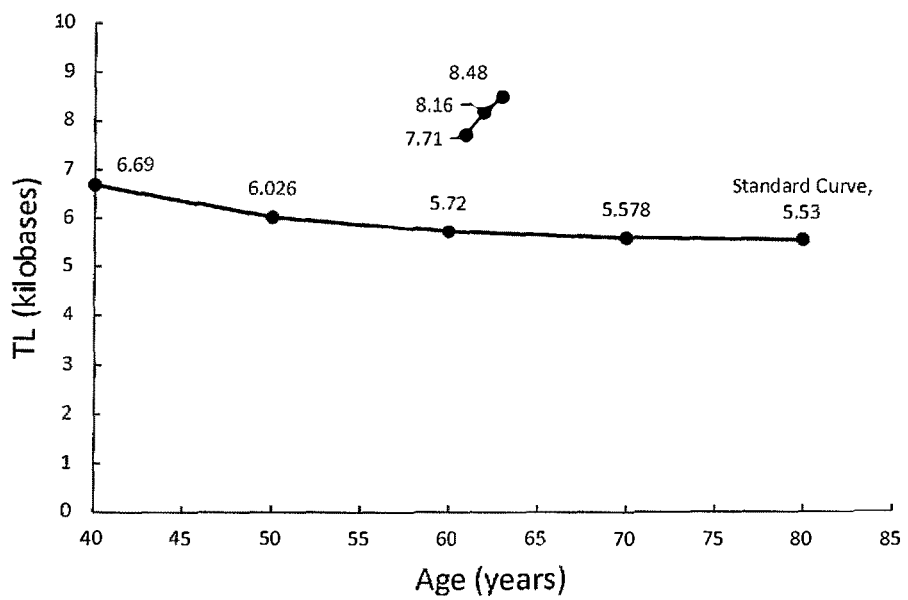


Figure 4

Telomere Length vs. Age
LC data

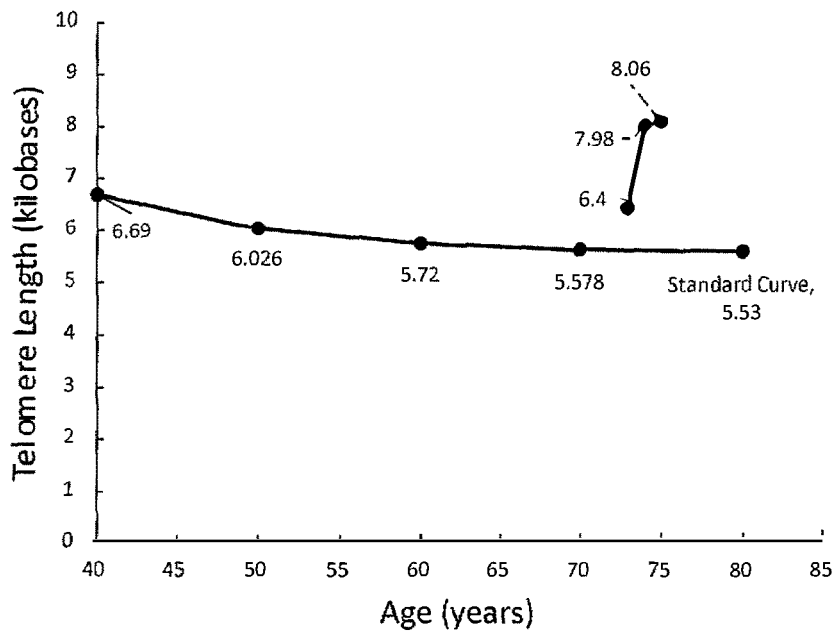


Figure 5

Telomere Length vs. Age
RC data

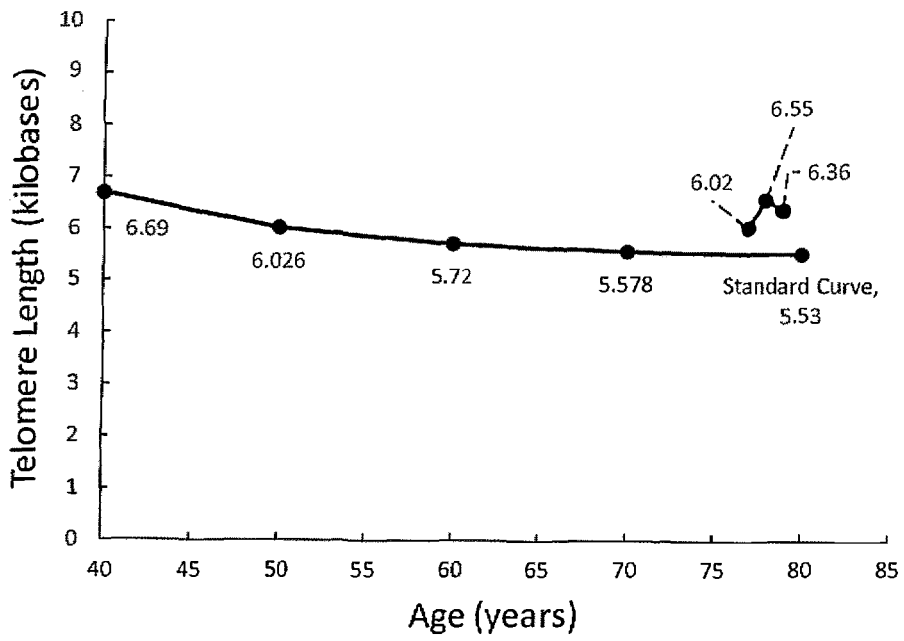


Figure 6

Telomere Length vs. Age
LM data

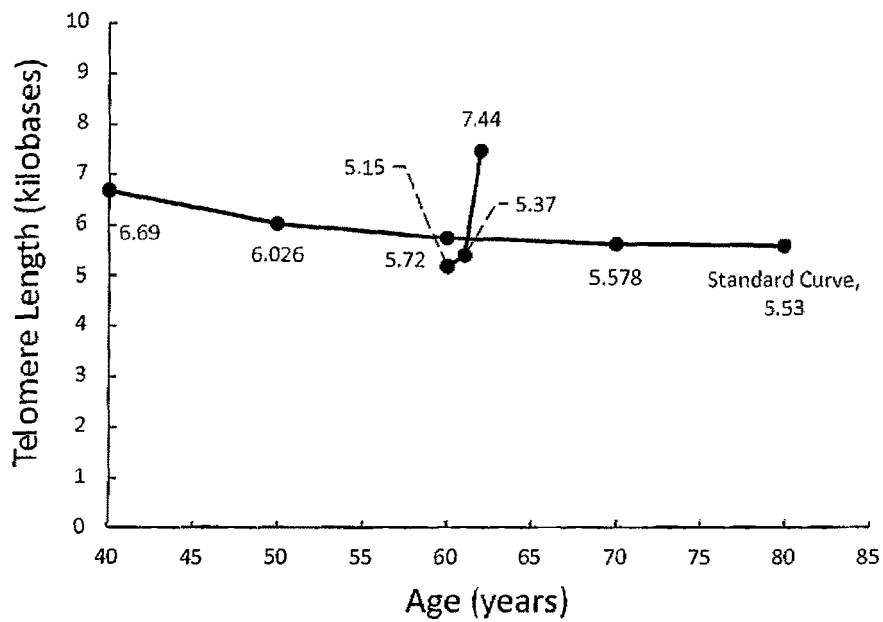


Figure 7

Telomere Length vs. Age
KC data

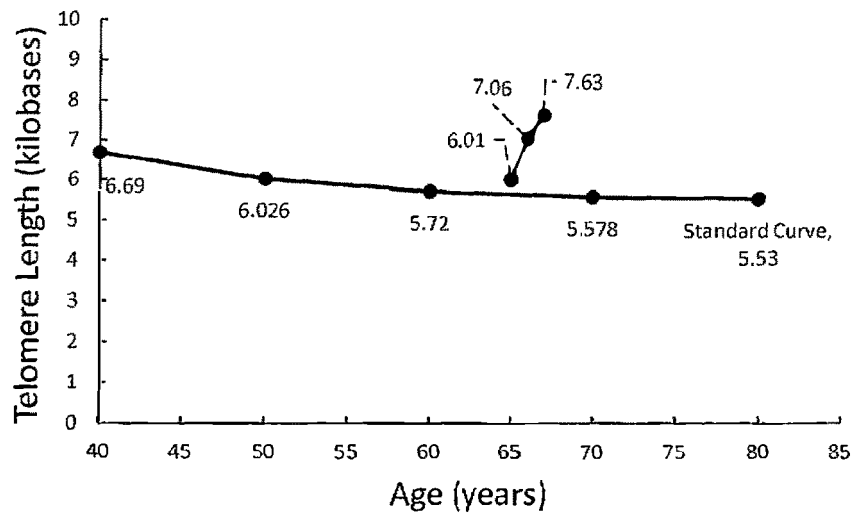


Figure 8

Telomere Length vs. Age
BD data

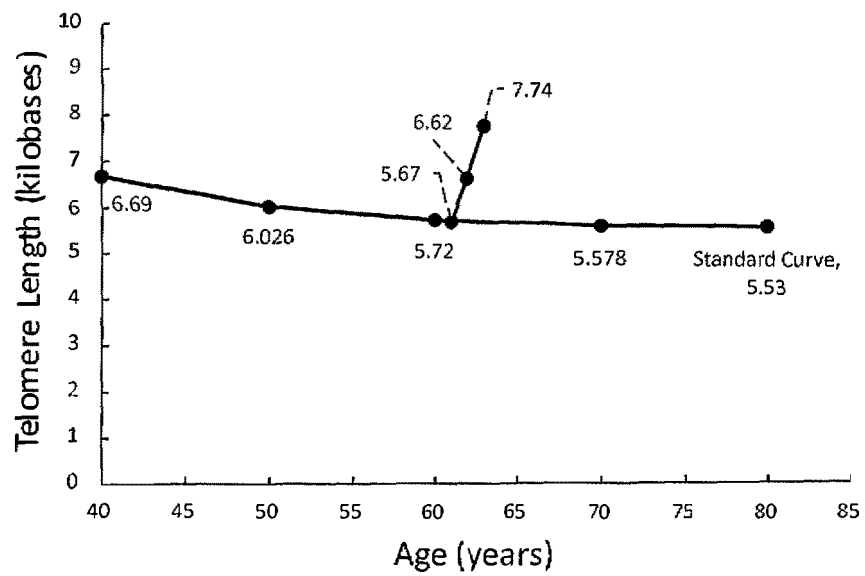


Figure 9

**Telomere Length vs. Age
MM data**

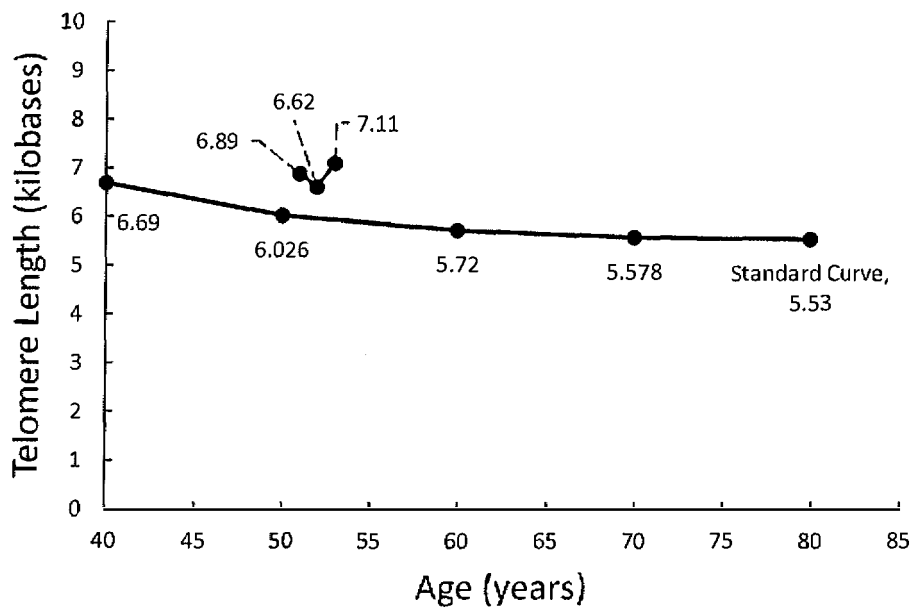


Figure 10

**Telomere Length vs. Age
JM data**

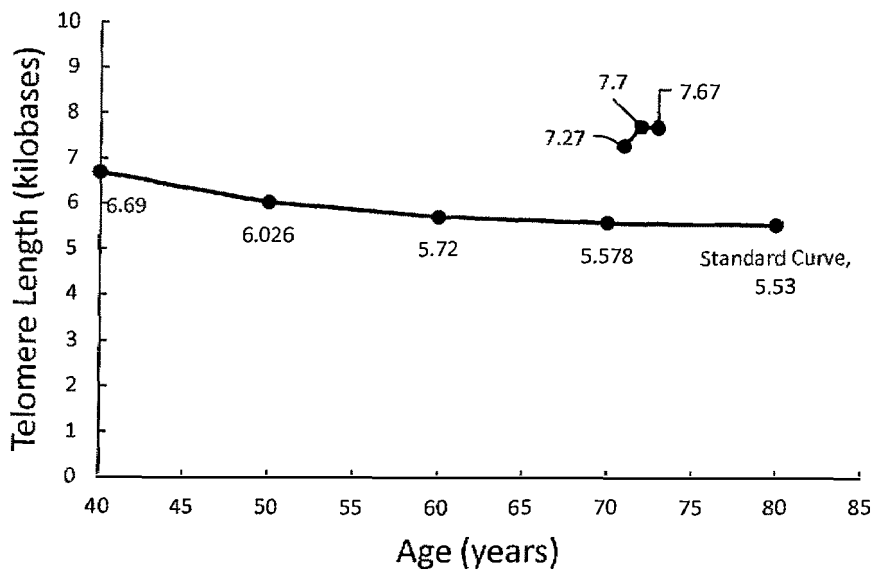
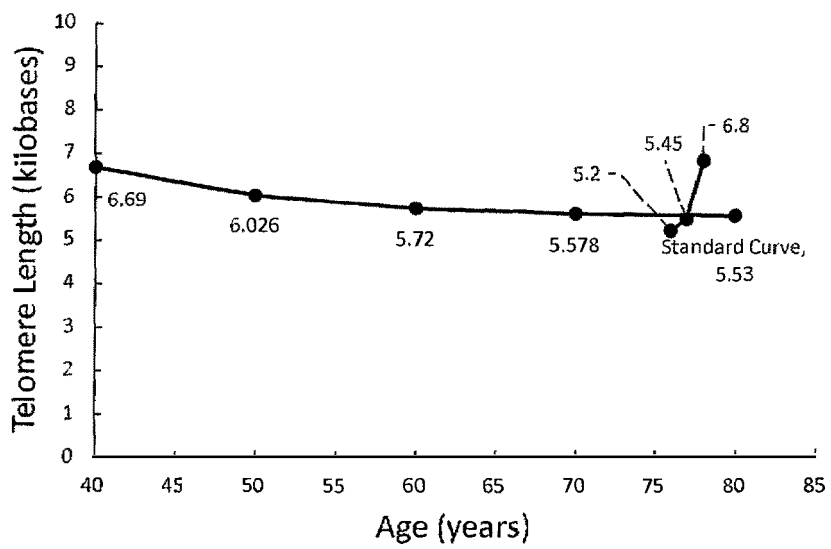


Figure 11

Telomere Length vs. Age
LCR data



5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (IPC)	
X	WO 03/074062 A2 (PERO RONALD W [SE]) 12 September 2003 (2003-09-12) * paragraph [0005]; claims *	14,16-18	INV. A61K36/74 A61K9/00 A61K9/70 A61P25/28	
Y	-----	1-18		
X	WO 98/51302 A1 (UNIV WASHINGTON [US]) 19 November 1998 (1998-11-19) * claims *	14,16-18		
Y	-----	1-18		
X	SHI ZHENHUA ET AL: "Neuroprotective effects of aqueous extracts of <i>Uncaria tomentosa</i> : Insights from 6-OHDA induced cell damage and transgenic <i>Caenorhabditis elegans</i> model", NEUROCHEMISTRY INTERNATIONAL, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 62, no. 7, 14 March 2013 (2013-03-14), pages 940-947, XP028586620, ISSN: 0197-0186, DOI: 10.1016/J.NEUINT.2013.03.001	14,18		
Y	* abstract; figures *	1-18		
Y	-----	1-18		TECHNICAL FIELDS SEARCHED (IPC)
Y	US 2009/263367 A1 (FOLEY RYAN JASON [CA]) 22 October 2009 (2009-10-22) * claims *	1-18		A61K A61P
Y	-----	1-18		
Y	WO 02/42429 A2 (PROTEOTECH INC [US]) 30 May 2002 (2002-05-30) * claims *	1-18		
Y,D	-----	1-18		
	SHENG Y ET AL: "DNA repair enhancement of aqueous extracts of <i>Uncaria tomentosa</i> in a human volunteer study", PHYTOMEDI, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 8, no. 4, 1 January 2001 (2001-01-01), pages 275-282, XP004956870, ISSN: 0944-7113, DOI: 10.1078/0944-7113-00045	1-18		
	* abstract; figures *			

		-/--		
The present search report has been drawn up for all claims				
Place of search Munich		Date of completion of the search 3 April 2019	Examiner Langer, Astrid	
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS		T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document		
X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document				

EPO FORM 1503 03.02 (P04C01)

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (IPC)
Y	WO 2010/065567 A2 (LIFESPAN EXTENSION LLC [US]; MCDANIEL DAVID H [US]) 10 June 2010 (2010-06-10) * page 1, line 21 - line 30; claims *	1-18	
Y	NA M ET AL: "Cytoprotective effect on oxidative stress and inhibitory effect on cellular aging of Uncaria sinensis Havil", JOURNAL OF ETHNOPHARMACO, ELSEVIER IRELAND LTD, IE, vol. 95, no. 2-3, 1 December 2004 (2004-12-01), pages 127-132, XP004990553, ISSN: 0378-8741, DOI: 10.1016/J.JEP.2004.06.027 * abstract; figures *	1-18	
A	REINHARD K-H: "UNCARIA TOMENTOSA (WILLD.) DC. - CAT'S CLAW, UNA DE GATO ODER KATZENKRALLE", ZEITSCHRIFT FUER PHYTOTHERAPIE, STUTTGART, DE, vol. 18, no. 2, 15 April 1997 (1997-04-15), pages 112-121, XP002064093, * the whole document *	1-18	
Y	TOMAS-LOBA ANTONIA ET AL: "Telomerase Reverse Transcriptase Delays Aging in Cancer-Resistant Mice", CELL,, vol. 135, no. 4, 1 November 2008 (2008-11-01), pages 609-622, XP002532531, ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/J.CELL.208.09.034 * the whole document *	1-18	
The present search report has been drawn up for all claims			
Place of search Munich		Date of completion of the search 3 April 2019	Examiner Langer, Astrid
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document		T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document	

EPO FORM 1503 03.02 (P04C01)

**ANNEX TO THE EUROPEAN SEARCH REPORT
ON EUROPEAN PATENT APPLICATION NO.**

EP 18 20 9434

5 This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned European search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

03-04-2019

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 03074062	A2	12-09-2003	AU 2003207894 A1	16-09-2003
			BR PI0308253 A2	12-07-2016
			CA 2477785 A1	12-09-2003
			CN 1649610 A	03-08-2005
			EP 1485114 A2	15-12-2004
			JP 2005526053 A	02-09-2005
			KR 20040099300 A	26-11-2004
			MX PA04008567 A	06-12-2004
			US 2003170320 A1	11-09-2003
			US 2005176825 A1	11-08-2005
			US 2006068035 A1	30-03-2006
			US 2009281180 A1	12-11-2009
			US 2009298939 A1	03-12-2009
			US 2011245337 A1	06-10-2011
US 2011263706 A1	27-10-2011			
WO 03074062	A2	12-09-2003		
WO 9851302	A1	19-11-1998	AT 359071 T	15-05-2007
			AU 7580098 A	08-12-1998
			CA 2289531 A1	19-11-1998
			DE 69837551 T2	20-12-2007
			DK 1019044 T3	06-08-2007
			EP 1019044 A1	19-07-2000
			ES 2285772 T3	16-11-2007
			JP 4386470 B2	16-12-2009
			JP 2002508752 A	19-03-2002
			US 6939570 B1	06-09-2005
			US 2001055630 A1	27-12-2001
			US 2004076698 A1	22-04-2004
			US 2004086585 A1	06-05-2004
			US 2008206162 A1	28-08-2008
WO 9851302	A1	19-11-1998		
US 2009263367	A1	22-10-2009	CA 2649477 A1	18-10-2009
			US 2009263367 A1	22-10-2009
WO 0242429	A2	30-05-2002	AU 3976402 A	03-06-2002
			CA 2427661 A1	30-05-2002
			EP 1335738 A2	20-08-2003
			JP 4708675 B2	22-06-2011
			JP 2004514679 A	20-05-2004
			NZ 544691 A	21-12-2007
			US 2002197692 A1	26-12-2002
			US 2004057964 A1	25-03-2004
			US 2004137092 A1	15-07-2004
			WO 0242429	A2

EPO FORM P0459

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

55

**ANNEX TO THE EUROPEAN SEARCH REPORT
ON EUROPEAN PATENT APPLICATION NO.**

EP 18 20 9434

5 This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned European search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

03-04-2019

10

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010065567 A2	10-06-2010	AU 2009322474 A1	21-07-2011
		CA 2745376 A1	10-06-2010
		CN 102300578 A	28-12-2011
		EP 2370086 A2	05-10-2011
		US 2010173024 A1	08-07-2010
		US 2014079836 A1	20-03-2014
		WO 2010065567 A2	10-06-2010

15

20

25

30

35

40

45

50

EPO FORM P0459

55

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

REFERENCES CITED IN THE DESCRIPTION

This list of references cited by the applicant is for the reader's convenience only. It does not form part of the European patent document. Even though great care has been taken in compiling the references, errors or omissions cannot be excluded and the EPO disclaims all liability in this regard.

Patent documents cited in the description

- US 5489508 A, West [0004] [0029]
- US 5741677 A, Kozlowski [0004] [0029]
- US 6039949 A, Pero [0006] [0007] [0030]
- US 7955626 B, Pero [0010]
- US 8372449 B, Pero, Ronald W. [0011] [0012] [0030]
- US 6964784 B [0012]
- US 8372448 B [0012]
- US 8974839 B, Giampapa [0013]
- US 20170128355 A, Giampapa [0014]
- US 5656665 A, Yu [0015]
- US 20150338387 A, Ehrenkranz [0016]
- US 20140079836 A, McDaniel [0017]
- US 7846904 B [0044]

Non-patent literature cited in the description

- **GREIDER, CW.** *BioEssays*, 1990, vol. 12 (8), 363-369 [0002]
- **HARLEY et al.** *Nature*, 1990, vol. 345 (6274), 458-460 [0002]
- **JOENG et al.** Long lifespan in worms with long telomeric DNA. *Nature Genetics*, 2004, vol. 36 (6), 607-611 [0003]
- **BODNAR et al.** Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, 1998, vol. 279 (5349), 349-352 [0003]
- **CAWTHON, RM.** *Nucleic Acids Res.*, 2002, vol. 30 (10), e47 [0004]
- **HARLEY et al.** *Nature*, 1990, vol. 345, 458-460 [0004]
- **O'CALLAGHAN ; FENECH.** *Biological Procedures Online*, 2011, vol. 13, 3 [0004] [0005]
- **AVIV et al.** *Nucleic Acids Research*, 2011, vol. 39 (20), e134 [0005]
- **SHENG et al.** *J. Ethnopharmacol.*, 2000, vol. 69, 115-126 [0006]
- **SHENG et al.** *Phytomedicine*, 2001, vol. 8 (4), 275-282 [0006]
- **LAMM et al.** *Phytomedicine*, 2001, vol. 8 (4), 267-274 [0009]
- **SHENG et al.** *J. Ethnopharmacology*, 2000, vol. 69, 115-126 [0031]
- **HASNISA et al.** *J. Trop. Agric. and Fd. Sci.*, 2017, vol. 45 (1), 111-119 [0031]
- **ZHANG et al.** *Fundam. Toxicol. Sci.*, 2017, vol. 4 (2), 45-56 [0031]
- **PARASURAMAN, S.** *J. Pharmacol. and Pharmacotherapeutics*, 2011, vol. 2 (2), 74-79 [0031]
- **SHENG et al.** *J. Ethnopharm.*, 2001, vol. 69, 115-26 [0035]
- **SHENG et al.** *J. Ethnopharm.*, 2000, vol. 69, 115-26 [0048]

Research Article

Antiaging Effects of *Vicatia thibetica de Boiss* Root Extract on *Caenorhabditis elegans* and Doxorubicin-Induced Premature Aging in Adult Mice

Wenwen Liu ¹, Yunhui Guan ², Sicong Qiao ¹, Jiqun Wang ¹, Keting Bao ¹,
Zhifan Mao ¹, Liang Liao ¹, Alexey Moskalev ³, Bei Jiang ⁴, Jin Zhu ¹,
Conglong Xia ², Jian Li ^{1,2,5} and Zelan Hu ¹

¹State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, Shanghai Key Laboratory of New Drug Design, East China University of Science and Technology, 130 Mei Long Road, Shanghai 200237, China

²College of Pharmacy and Chemistry, Dali University, 5 Xue Ren Road, Dali, Yunnan 671000, China

³Laboratory of Geroprotective and Radioprotective Technologies, Institute of Biology, Komi Science Centre, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, 28 Kommunisticheskaya st, Syktyvkar 167982, Russia

⁴Institute of Materia Medica, Dali University, 5 Xue Ren Road, Dali, Yunnan 671000, China

⁵Clinical Medicine Scientific and Technical Innovation Center, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200092, China

Correspondence should be addressed to Conglong Xia; long7484@126.com, Jian Li; jianli@ecust.edu.cn, and Zelan Hu; huzelan@ecust.edu.cn

Received 16 March 2021; Revised 19 May 2021; Accepted 22 July 2021; Published 9 August 2021

Academic Editor: Vladimir Jakovljevic

Copyright © 2021 Wenwen Liu et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The roots of *Vicatia thibetica de Boiss* are a kind of Chinese herb with homology of medicine and food. This is the first report showing the property of the extract of *Vicatia thibetica de Boiss* roots (HLB01) to extend the lifespan as well as promote the healthy parameters in *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). For doxorubicin- (Doxo-) induced premature aging in adult mice, HLB01 counteracted the senescence-associated biomarkers, including P21 and γ H2AX. Interestingly, HLB01 promoted the expression of collagen in *C. elegans* and mammalian cell systemically, which might be one of the essential factors to exert the antiaging effects. In addition, HLB01 was also found as a scavenger of free radicals, thereby performing the antioxidant ability. Lifespan extension by HLB01 was also dependent on DAF-16 and HSF-1 via oxidative stress resistance and heat stress resistance. Taken together, overall data suggested that HLB01 could extend the lifespan and healthspan of *C. elegans* and resist Doxo-induced senescence in mice via promoting the expression of collagen, antioxidant potential, and stress resistance.

1. Introduction

Aging is a process which includes loss of physiological integrity, impaired functions, and increased vulnerability to death. The well-known hallmarks of aging include telomere attrition, loss of proteostasis, mitochondrial dysfunction, cellular senescence, and stem cell exhaustion [1]. In recent years, some antiaging interventions like SA- β -gal-activated prodrugs and senolytics have appeared [2–4]. Several senescence biomarkers such as SA- β -gal, P16^{INK4A}, P53, P21, and

γ H2AX have been widely used to evaluate the effects of antiaging interventions [5, 6]. Damage accumulation of extracellular matrix (ECM) proteins is called a missing hallmark of aging, which has recently drawn an increased attention [7]. Age-related changes of the components of the ECM (collagen, elastin, MMPs, cathepsins, etc.) could disrupt the homeostasis of tissue microenvironment and facilitate the age-related pathologies [8, 9]. Therefore, the deterioration in ECM integrity has been implicated in many age-dependent diseases, such as diabetes, cancer, chronic liver

diseases, and cardiovascular diseases [9–11]. Interestingly, it was shown that the cells in a proper microenvironment could live significantly longer than those in the original environment [12, 13], which also demonstrated the importance of ECM maintenance.

Collagens are the most abundant ECM proteins in the organism and major structural proteins of the ECM [14]. The structural changes and degradation of collagen are associated with bone and cartilage deterioration, skin wrinkling, and cardiovascular and respiratory malfunctions [15]. Moreover, it has been shown in the studies that the increased collagen expression is a shared feature of multiple conserved longevity pathways including *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) [11]. Promoting the biosynthesis of collagens during the lifetime is required and beneficial for the healthy aging and longevity in *C. elegans* [11]. Furthermore, deficits in matrix metalloproteinases 14 (MMP14), which are involved in collagen degradation and ECM remodeling, lead to premature aging, short lifespan, and aging in mice [16]. Taken together, all these findings suggest that strategies for promoting the collagen and ECM function systemically may be widely applicable in delaying aging. However, interventions which promote collagen and ECM function are rarely reported.

Because of fast reproduction, short life cycle, and conserved sequence with human genes, *C. elegans* was widely used in antiaging drug candidate screening and novel target finding [17, 18]. Moreover, many compounds, which were discovered to have antiaging effects by the lifespan screening on *C. elegans*, also showed similar effects in the mouse model [19–21]. In our previous work, we screened our in-house 1,386 marketable drugs by testing their effect on the lifespan of *C. elegans* and antihypertensive drug verapamil was found to have an antiaging effect [22]. Herein, in this study, we screened 836 extracts of Chinese herbal medicine which have been used for a long time in humans. After several rounds of lifespan tests, the extract of *Vicatia thibetica de Boiss* roots (HLB01) was selected for further study based on its activity (Figure 1). The root of *Vicatia thibetica de Boiss* is a kind of herb with homology of medicine and food, suggesting that HLB01 has a great potential to be developed for its antiaging potential with high safety.

The common chemotherapeutic drug doxorubicin (Doxo) has a proven effect of inducing senescence and liver toxicity in rodents and humans [23]. In our study, Doxo-induced premature aging mice were selected as the animal models for evaluating the antiaging pharmacological effect of HLB01 via biomarkers of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), P21, and γ H2AX. Then, the mechanisms of HLB01 were studied with the emphasis on collagen expression, antioxidative ability, and stress resistance.

2. Materials and Methods

2.1. Preparation of HLB01 Extract. 10 kg of dried roots of *Vicatia thibetica de Boiss* was crushed with a shredder, decocted with distilled water for 3 times at 80°C with a solid-liquid ratio of 1:10, 90 min each time. Thereafter,

extracts were combined, decompressed, and concentrated. This protocol resulted in 4.55 kg extract (HLB01), and the calculated yield was 45.5%.

2.2. *C. elegans* Maintenance and Strains. Strains were cultured on nematode growth medium (NGM) agar plates at 20°C. *C. elegans* strains used in this study included the following (name, genotype, and origin): N2, *C. elegans* wild isolate, CGC; CF1038, *daf-16(mu86)* I, CGC; PS3551, *hsf-1(sy441)* I, CGC.

2.3. Lifespan Analysis. Live *Escherichia coli* strain OP50 was used as the food source. Worms were synchronized and transferred to NGM agar plates at L4 stage. We set control and HLB01-treated groups, with approximately 100 worms per group. To avoid progeny hatching, 50 μ g/mL of 5-fluorodeoxyuridine (FudR) was added to the agar plates from day 0 to day 10. Worms were treated with HLB01 (200 μ g/mL or 400 μ g/mL) only for the first 10 days. Worms were counted every day and transferred to the fresh plates every 3 days until all the worms were dead. Worms which exhibited exploded vulva phenotype and crawled off the plate were censored. Three replicate experiments were conducted. The log-rank (Mantel-Cox) test was used to calculate the *P* values.

2.4. Thrashing Assay. Thrashing assay was conducted as described previously [24]. Wild-type worms were cultured on NGM plates as per the lifespan assay protocol. 20–30 worms were prepared for control and HLB01 (200 μ g/mL) treatment groups, respectively. One worm was removed in an M9 buffer drop on an NGM plate without OP50 bacteria and allowed to adapt for 30 s. Then, we counted the number of thrashes for 30 seconds. Any change in the midbody bending direction was referred to as a thrash [25]. Thrashes were counted on days 3, 8, and 13. Three replicate experiments were conducted. A two-way ANOVA along with the Sidak multiple comparisons test was used to calculate *P* values, and error bars represented SEM.

2.5. Pharyngeal Pumping Assay. Pharyngeal pumping assay was conducted as per previously reported protocol [26]. Wild-type worms were cultured on NGM according to the lifespan assay protocol. 20–30 worms were prepared for the pharyngeal pumping assay for control and HLB01 (200 μ g/mL) treatment groups. On days 1, 3, 5, 7, 9, and 11, the pharyngeal pumping rate was tested by quantifying the contractions of the pharynx over a period of 30 seconds. Three replicate experiments were conducted. A two-way ANOVA along with the Sidak multiple comparisons test was used to calculate *P* values, and error bars represented SEM.

2.6. Bacterial Growth Assay. Bacterial growth assay was conducted as described previously [27]. Initially, a single colony of OP50 was inoculated in LB media and cultured at 37°C. For each group, 30 μ L of bacterial culture ($OD_{600} = 0.4$) was dropped to an NGM plate and cultured at 20°C. Bacteria were washed off using 1 mL M9 buffer, and OD_{600} was measured every 12 h, with M9 buffer as the blank control. OD was assessed using a Hitachi U-2910 spectrometer with a

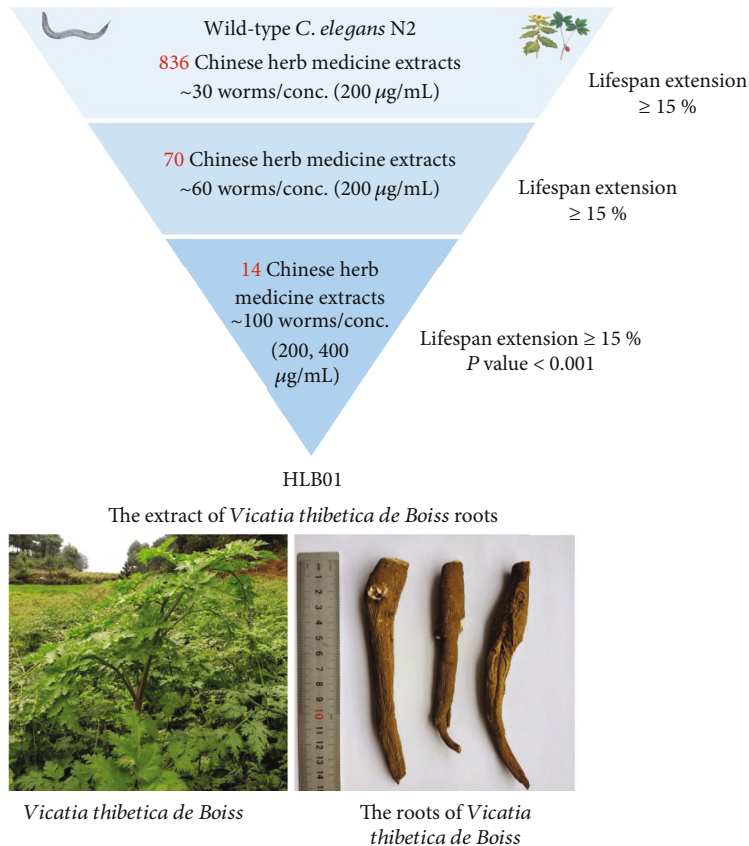


FIGURE 1: A Chinese herbal medicine library-based phenotypic screening led to the discovery of HLB01.

10 mm quartz cuvette. Three replicate experiments were conducted. An unpaired *t*-test was used to calculate the *P* values, and error bars represented SEM.

2.7. Mouse Experiments. Male C57BL/6J mice were purchased from Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd. (Beijing, China). Mouse experiments were conducted at Shanghai SLAC Laboratory Animal Co., Ltd. (Shanghai, China), permit number: SYXK (Shanghai) 2017-0008, contract no: SLAC2020072806. Animal procedures were carried out according to the National Institutes of Health (NIH) guidelines. Mouse experiments were conducted as per the previously described protocol [28]. We have tried three doses of Doxo (2 mg/kg, 5 mg/kg, and 10 mg/kg) to induce premature aging in adult mice. Among them, the dose of 5 mg/kg we selected showed both a high survival rate and significant aging indexes. C57BL/6J mice (10 weeks, male) were employed to evaluate the efficacy of HLB01 in vivo. In the blank group ($n = 10$), mice were treated with saline. In the Doxo group ($n = 15$), mice were intraperitoneally injected with 5 mg/kg Doxo twice on day 0 and day 10 to induce aging. In Doxo-HLB01 groups ($n = 15$, each group), the Doxo-treated mice were administered intragastrically with HLB01 (two groups: one received HLB01: 1.2 g/kg and another group received HLB01: 2.4 g/kg) by intragastric route from day 16 to day 37 (Figure 2). The doses of HLB01 were set by referring to the dose of *Seselopsis* extract in an antifatigue effect [29]. Mice were administrated with

the same volume of extracts in 1.2 g/kg and 2.4 g/kg groups. The mortality rate of mice after Doxo and HLB01 treatment was recorded. Thereafter, mice were sacrificed on day 38.

2.8. Test of AST and ALT Level. Plasma sample of treated and untreated mice was collected and spun for 20 minutes at 3000 rpm. The supernatant was collected and sent to KingMed Diagnostics, Shanghai, China, for AST and ALT measurement. The level of AST was tested according to the protocol of aspartate aminotransferase (ASTL) (Roche). A 9 µL supernatant was incubated with 40 µL R1 and 17 µL R2 and placed at 37°C for 10 min. Then, the absorbance of NADH ($\lambda = 340$ nm) was tested. AST could catalyze the transfer of amino groups between L-aspartate and 2-ketoglutaric acid and then generate L-glutamic acid and oxobutanedioic acid. Under the catalysis of malate dehydrogenase (MDH), oxaloacetic acid reacts with reduced nicotinamide adenine dinucleotide NADH to form NAD⁺. The oxidation rate of NADH is proportional to the catalytic activity of AST. The level of ALT was tested according to the protocol of alanine aminotransferase acc. to IFCC (ALTL) (Roche). A 9 µL supernatant was incubated with 59 µL R1 and 17 µL R2 and placed at 37°C for 10 min. Then, the absorbance of NADH ($\lambda = 340$ nm) was tested. L-Alanine and 2-ketoglutaric acid were catalyzed by ALT to form pyruvic acid. Under the catalysis of lactate dehydrogenase, pyruvic acid and NADH produce L-lactic acid and NAD⁺. The oxidation rate of NADH was proportional to the activity of ALT. Therefore,

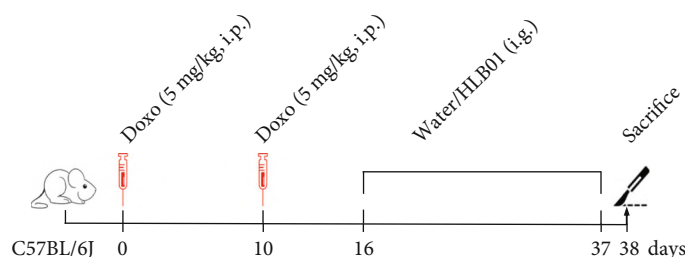


FIGURE 2: Experimental design for Doxo-induced premature aging and HLB01 treatment of those aged mice. Doxo: two times i.p. at 5 mg/kg. HLB01: from day 16 to 37, i.g. at 1.2 g/kg and 2.4 g/kg.

levels of AST or ALT could be calculated by absorbance of NADH ($\lambda = 340$ nm). An unpaired *t*-test was used to calculate the *P* values, and error bars represented SEM.

2.9. Quantitative Real-Time PCR. The samples of wild-type worms, liver, and kidney were prepared, and their RNA was extracted from them using the Total RNA Kit (OMEGA, Bio-Tek). Then, reverse transcription was conducted using Hifair® 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (gDNA digester plus) (Yeasen, 11123ES10) by LongGene A200. Hieff UNICON® Universal Blue qPCR SYBR Green Master Mix (Yeasen, 11184ES03) was used to perform qPCR (BIO-RAD, CFX96). Three replicate experiments were conducted. An unpaired *t*-test was used to calculate the *P* values, and error bars represented SEM.

2.10. Western Blot. Protein was extracted from cells, liver, and kidney using RIPA lysis buffer (Yeasen). Protein extracts were quantified by the BCA Protein Quantification Kit (Yeasen). For γ H2AX, 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was conducted to separate the protein bands, and then, proteins were transferred from gel to the PVDF membrane, blocked with 5% milk powder in TBST for 1 hour. Membranes were incubated with specific antibodies for γ H2AX (ab81299, Abcam) and tubulin (ab6160, Abcam). For collagen, 8% SDS-PAGE was run. Membranes were incubated with specific antibodies for GAPDH (60004-1-Ig, Proteintech) and Collagen I (ab260043, Abcam). Then, immunocomplexes were detected by Peroxidase-Conjugated Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (33101ES60, Yeasen), Peroxidase-Conjugated Goat Anti-Rat IgG (H+L) (33301ES60), and Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (33201ES60, Yeasen) followed by enhanced chemoluminescence (New Cell & Molecular Biotech). The membrane was finally photographed by imaging techniques (Tanon-4600SF). ImageJ was used to quantify the intensity.

2.11. RNA-seq. Wild-type worms of control and HLB01 (200 μ g/mL) groups were cultured according to the lifespan assay. At day 10, worms were collected for RNA-seq in Shanghai Majorbio Bio-pharm Technology Co., Ltd. Data was analyzed using the free online platform of Majorbio Cloud Platform. The accession number for RNA-seq reported in this paper is GEO: GSE168322.

2.12. Collagen Assay. Collagen assay was conducted as described previously [30]. Wild-type worms from the control and HLB01 (200 μ g/mL) groups were cultured according to the lifespan assay. At day 10, worms were collected and washed by M9 for three times. Thereafter, collagen levels were measured by detecting hydroxyproline using the Hydroxyproline (HYP) Content Assay Kit (Solarbio, BC0250) according to the manufacturer's instructions. Three replicate experiments were conducted. An unpaired *t*-test was used to calculate the *P* values, and error bars represented SEM.

2.13. Cell Viability Assay. Human embryonic lung fibroblast MRC-5 cells were cultured in MEM (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco), 1% sodium pyruvate (BI), 1% NEAA (BI), and 1% penicillin-streptomycin (Yeasen). Human skin fibroblast CCC-ESF-1 were cultured in DMEM (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco) and 1% penicillin-streptomycin (Yeasen). Cells were maintained in an incubator at 37°C under 5% CO₂. For testing cell viability, cells were seeded into a 96-well plate at 1×10^4 cells per well and treated with varying concentrations of HLB01 (6.25, 12.50, 25.00, 50.00, 100.00, and 200 μ g/mL) for 48 h. After that, CCK8 solution was added to the wells and incubated at 37°C for 2 h. Thereafter, absorbance was measured at 450 nm using a microplate reader (BioTek Instruments, Synergy, H1). Three replicate experiments were conducted. An unpaired *t*-test was used to calculate the *P* values, and error bars represented SEM.

2.14. 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging Assay. DPPH radical scavenging assay was conducted as described previously [31]. 100 μ L HLB01 of different concentrations were incubated with 100 μ L of 200 μ M DPPH solution in a 96-well plate. The plate was incubated at room temperature for 30 min, away from any source of light. Then, absorbance was measured at 517 nm. A blank without DPPH addition was prepared and measured for each sample in a similar way. DPPH radical scavenging ability (%) = $[(A_0 - A_1)/A_0] * 100$. A_0 and A_1 represent the absorbance of the control and the sample, respectively. Three replicate experiments were conducted.

2.15. Measurement of Reactive Oxygen Species (ROS) Level. 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) (Yeasen) was used to detect the ROS level. DCFH-DA is a ROS

sensor that gets deacetylated by intracellular esterases to release a nonfluorescent compound (DCFH), which is later oxidized by ROS into 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) emitting green fluorescence that could be detected by fluorescence microscope to indicate the intracellular ROS levels [32]. Worms were cultured according to the lifespan assay. For the whole worms, ROS level determination was conducted by the previously described method [33]. About 30~40 worms of the HLB01 (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) group and control group were, respectively, collected at day 6 and washed three times by M9 buffer. After that, the worms were incubated with 50 μM DCFH-DA in the M9 for 30 min. Fluorescence was measured after that by an inverted fluorescence microscope (Nikon Eclipse Ti2 microscope) at 100 \times magnification. ImageJ was used to quantify intensity. Three replicate experiments were conducted. An unpaired *t*-test was used to calculate the *P* values, and error bars represented SEM. For worm lysis solution, ROS levels were detected as described previously [34]. About 500 worms of the HLB01 (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) group and control group were, respectively, collected at day 6, and washed by M9 buffer for three times to eliminate the bacterial contamination. After that, worms were washed by PBS once in a 1.5 mL tube. These worms were frozen in liquid nitrogen immediately and then thawed immediately at room temperature. Thereafter, sonication (UXI, JY92-IIN) was used to further lyse these worms. Lysates were centrifuged (12,000 rpm at 4°C for 15 min) to obtain the supernatants. Supernatants were quantified by the BCA Protein Quantification Kit (Yeasten). Next, a supernatant containing 50 μg protein and 200 μL of 250 μM DCFH-DA in PBS were incubated together and scanned using a fluorospectro photometer (Techcomp, F-4700) immediately. The ROS level was determined by the fluorescence intensity. Three replicate experiments were conducted.

2.16. Statistical Analysis. All quantitative data are presented as the means \pm SEM. Statistical analyses included unpaired *t*-test, log-rank (Mantel-Cox) test, and two-way ANOVA along with the Sidak multiple comparisons test. All figures were generated using GraphPad Prism 6 and Microsoft Office.

3. Results

3.1. HLB01 Extends Lifespan and Healthspan of *C. elegans*. To examine the antiaging effects of HLB01, we first analyzed the lifespan extension of *C. elegans* after treatment with HLB01. Compared to the control group, treatment with 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HLB01 led to a lifespan extension by 14.79% ($*P < 0.05$) in *C. elegans* and that with 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HLB01 by 9.61% ($****P < 0.0001$) (Figure 3(a), Table S1). Based on the above, we chose the concentration of 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for further studies. We further monitored the age-dependent changes of aging biomarkers to assess the physiological status of aging in *C. elegans*. The effect of HLB01 on the motility of *C. elegans* was evaluated by counting the body bends times every 30 seconds on day 3, day 8, and day 13 of adulthood. HLB01-treated groups showed a more intense swinging motion, especially on day 8 ($*P < 0.05$) (Figure 3(b)).

Pharyngeal pumping assay of *C. elegans* also showed that HLB01 treatment did not have any adverse effect on the pumping rate (on days 1, 3, 5, 7, 9, and 11) and promoted healthy parameter on day 11 significantly ($*P < 0.05$) (Figure 3(c)). The above results showed that HLB01 not only extended the lifespan but also promoted healthspan and physiological parameters in *C. elegans*. Furthermore, the cell viability test in human fetal lung fibroblasts cells (MRC-5) was investigated, and the results demonstrated no cytotoxicity of HLB01 even at a high concentration of 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figure S1).

Next, to evaluate whether HLB01 increased the survival of *C. elegans* by reducing the bacterial growth, we examined the growth of bacteria (*Escherichia coli*, OP50) treated with HLB01. Bacterial growth was found not to be inhibited by HLB01, which suggested the lifespan extension of HLB01 was not due to the inadequate food provision (Figure 3(d)).

3.2. HLB01 Counteracts Doxorubicin-Induced Aging in Mice. We further studied the antiaging effect of HLB01 in mammals. The mortality rate of mice in the Doxo group ($n = 15$) and Doxo/HLB01 (2.4 g/kg) group ($n = 15$) was 13.3%. There were no mice that died in the blank group ($n = 15$) and Doxo/HLB01 (1.2 g/kg) group ($n = 15$). As a drug with strong chemical toxicity, Doxo increased the plasma levels of AST and ALT, which are known biomarkers for liver damage. HLB01 counteracted the Doxo-induced elevation of plasma AST (1.2 g/kg, N.S.; 2.4 g/kg, $P = 0.0692$) and ALT (1.2 g/kg, $*P < 0.05$; 2.4 g/kg, N.S.) (Figures 4(a) and 4(b)). Moreover, aging-related P21 and γH2AX were detected. Compared with the Doxo group, HLB01 decreased this transcriptional upregulation of *p21* in the liver remarkably (1.2 g/kg, N.S.; 2.4 g/kg, $***P < 0.001$) (Figure 4(c)). Excitingly, HLB01 downregulated the protein levels of γH2AX in the liver (1.2 g/kg, $P = 0.0594$; 2.4 g/kg, $**P < 0.01$) (Figure 4(d)). Together, these results demonstrated that HLB01 is effective in reducing Doxo-induced aging along with the upregulation of AST, ALT, *p21* mRNA, and γH2AX protein levels.

3.3. HLB01 Promotes Collagen Expression in *C. elegans* and Mammalian Cell. To decipher the mechanism of HLB01-mediated antiaging effect, we used RNA-seq to analyze which process was altered by HLB01 in *C. elegans*. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analysis showed that the longevity-regulating pathway was dramatically changed (Figure 5(a)). Gene Ontology (GO) enrichment analysis and classification showed that HLB01 mainly affected the collagen-based extracellular matrix (Figure 5(b)). We further examined transcriptional level changes of collagen genes via quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis and found that mRNA expression of *col-12*, *col-77*, and *col-138* was significantly increased in HLB01-treated worms (Figure 5(c)). Moreover, we also observed the increased level of collagen in HLB01-treated worms as detected by the level of hydroxyproline, compared to the control group ($***P < 0.001$) (Figure 5(d)).

In order to explore the collagen level in mammalian cells, we chose a strain of human skin fibroblast (CCC-ESF-1) for evaluating the collagen-promoting ability of HLB01. In the

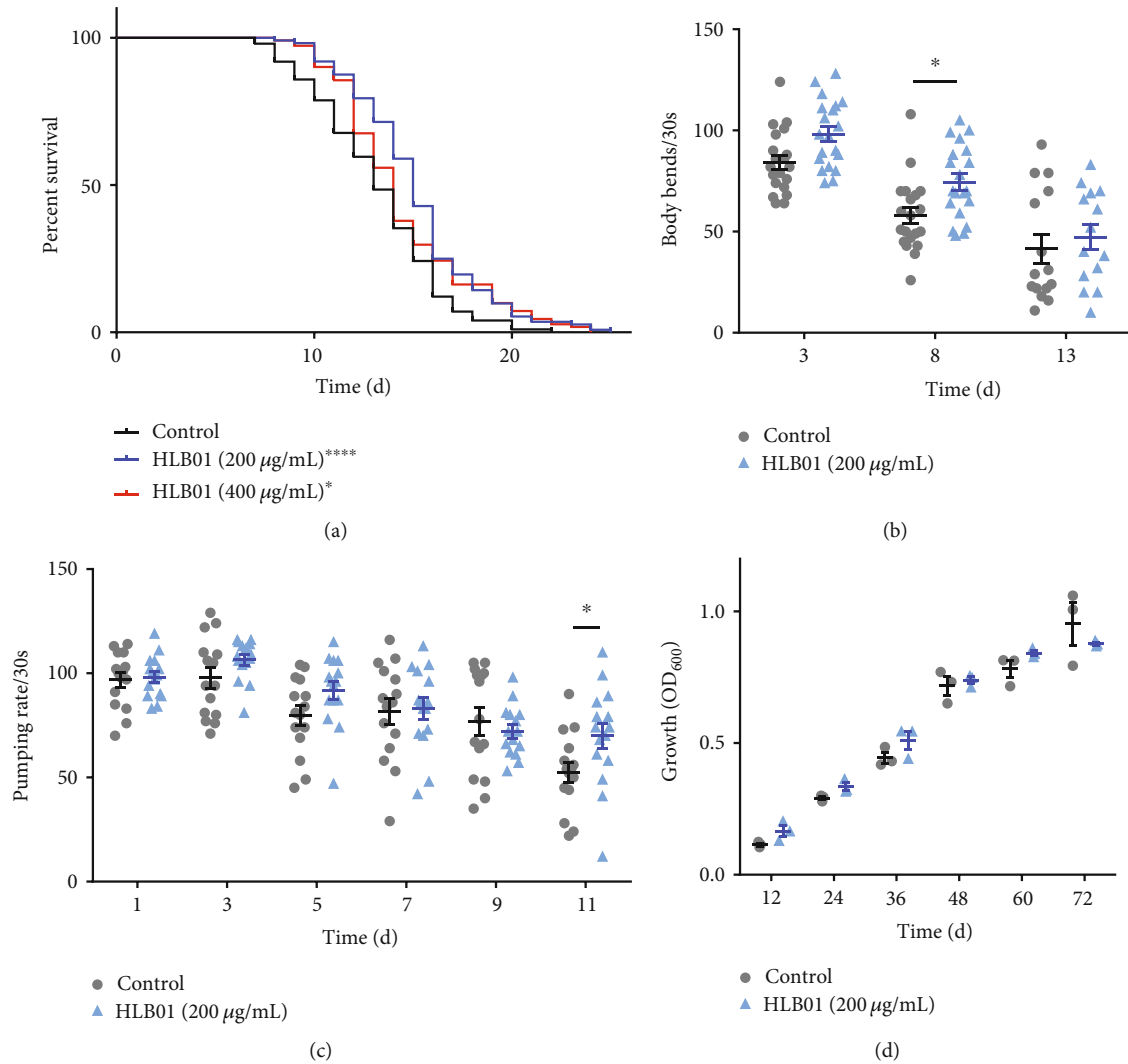


FIGURE 3: HLB01 extends lifespan and healthspan of *C. elegans*. (a) HLB01 increased the lifespan of *C. elegans* (wild-type) at 200 µg/mL and 400 µg/mL. (b) HLB01 promoted the ability of body bends of wild-type worms, significantly on day 8. (c) HLB01 increased the pharyngeal pumping rate of wild-type worms significantly on day 11. (d) HLB01 did not reduce bacterial growth. The log-rank (Mantel-Cox) test was used to calculate the *P* values in (a). A two-way ANOVA along with Sidak multiple comparisons test was used to calculate *P* values, and error bars represented SEM in (b) and (c). Multiple *t*-tests were used to calculate the *P* values, and error bars represented SEM in (d). **P* < 0.05; *****P* < 0.0001.

first place, we conducted a cell viability assay to evaluate appropriate concentrations of HLB01. HLB01 showed no toxicity to human skin fibroblast and had no influence in cell proliferation of human skin fibroblast except at the concentration of 200 µg/mL (Figure 5(e)). In order to avoid the influence of cell proliferation to collagen level, we tested collagen protein levels in human skin fibroblasts at concentration of 50 µg/mL but not 200 µg/mL in human skin fibroblasts. As a result, western blotting of collagen also revealed that the protein levels of collagen (type I) are much higher in the HLB01-treated group than in the control group (*****P* < 0.0001) (Figure 5(f)). In summary, we found an antiaging extract which promoted collagen protein levels both *in vitro* and *in vivo*. These results suggested that the antiaging effect of HLB01 is related to the upregulation of collagen.

3.4. HLB01 Decreases Oxidative Stress in *C. elegans*. Next, we tested the radical-scavenging effect of HLB01 to evaluate its antioxidant property *in vitro*. HLB01 showed concentration-dependent DPPH radical scavenging ability (Figure 6(a)). Next, to examine whether the antioxidative capacity is maintained *in vivo*, we tested the ROS level via the DCFH-DA assay in *C. elegans*. Compared to the control group, the ROS level in whole worms of the HLB01-treated group was significantly decreased on day 6 (****P* < 0.001) (Figures 6(b) and 6(c)). The ROS level was detected by another protocol also wherein worm lysis solution of different groups was collected, respectively, incubated with DCFH-DA, and detected by a fluorospectro photometer. It was observed that the ROS levels gradually increased with the time, but the level of the HLB01-treated group was lower than the control group (Figures 6(d) and 6(e)). Therefore, it

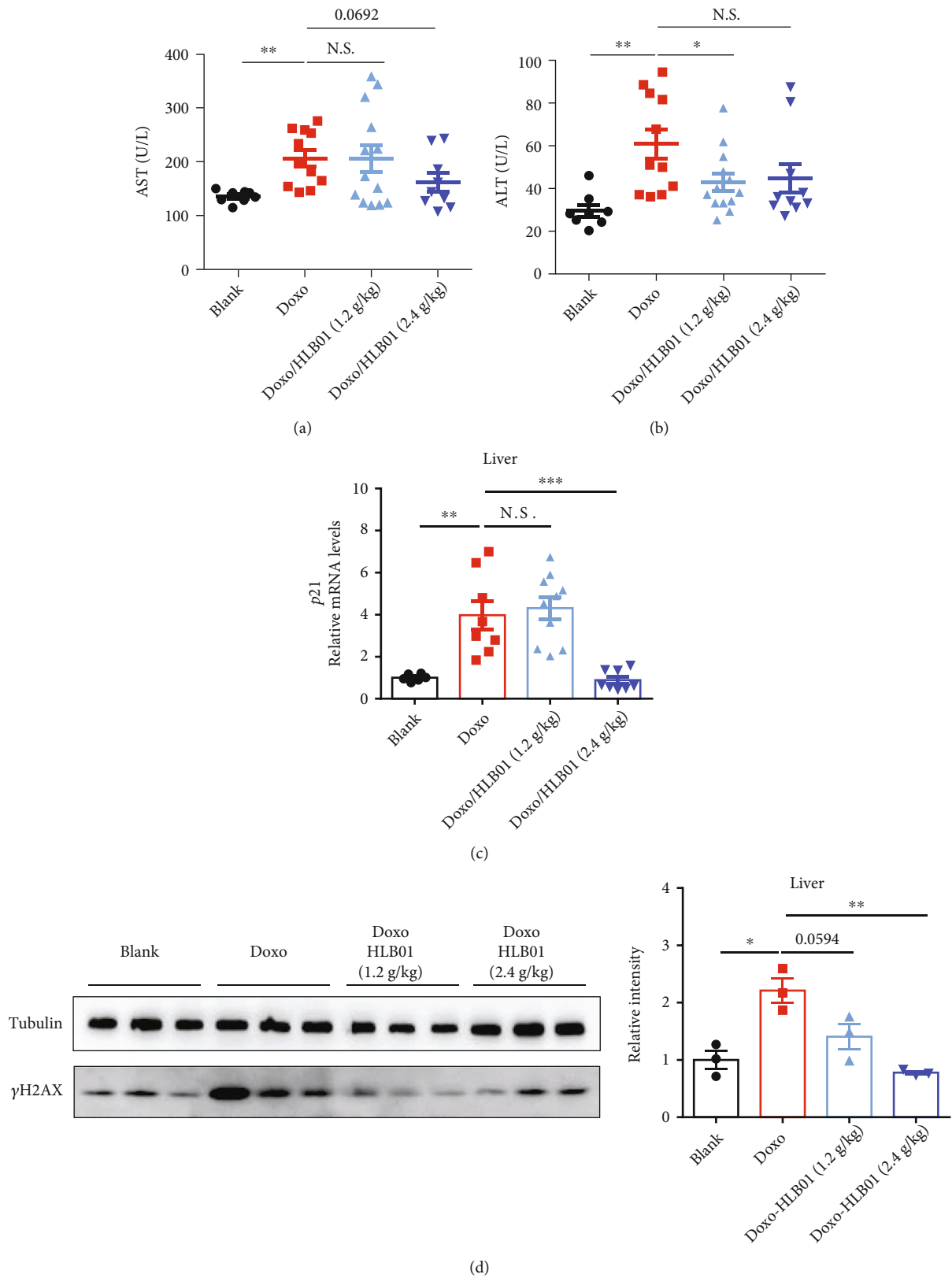


FIGURE 4: HLB01 counteracts Doxo-induced premature aging in adult mice. (a) HLB01 intended to counteract the Doxo-induced elevation of plasma AST levels. (b) HLB01 (1.2 g/kg) significantly counteracted Doxo-induced elevation of plasma ALT levels. (c) HLB01 (2.4 g/kg) decreased the Doxo-induced increase of *p21* mRNA level. (d) HLB01 (2.4 g/kg) downregulated Doxo-induced increase of γ H2AX expression. An unpaired *t*-test was used to calculate the *P* values, and error bars represented SEM in (a–d). **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001; N.S.: not significant.

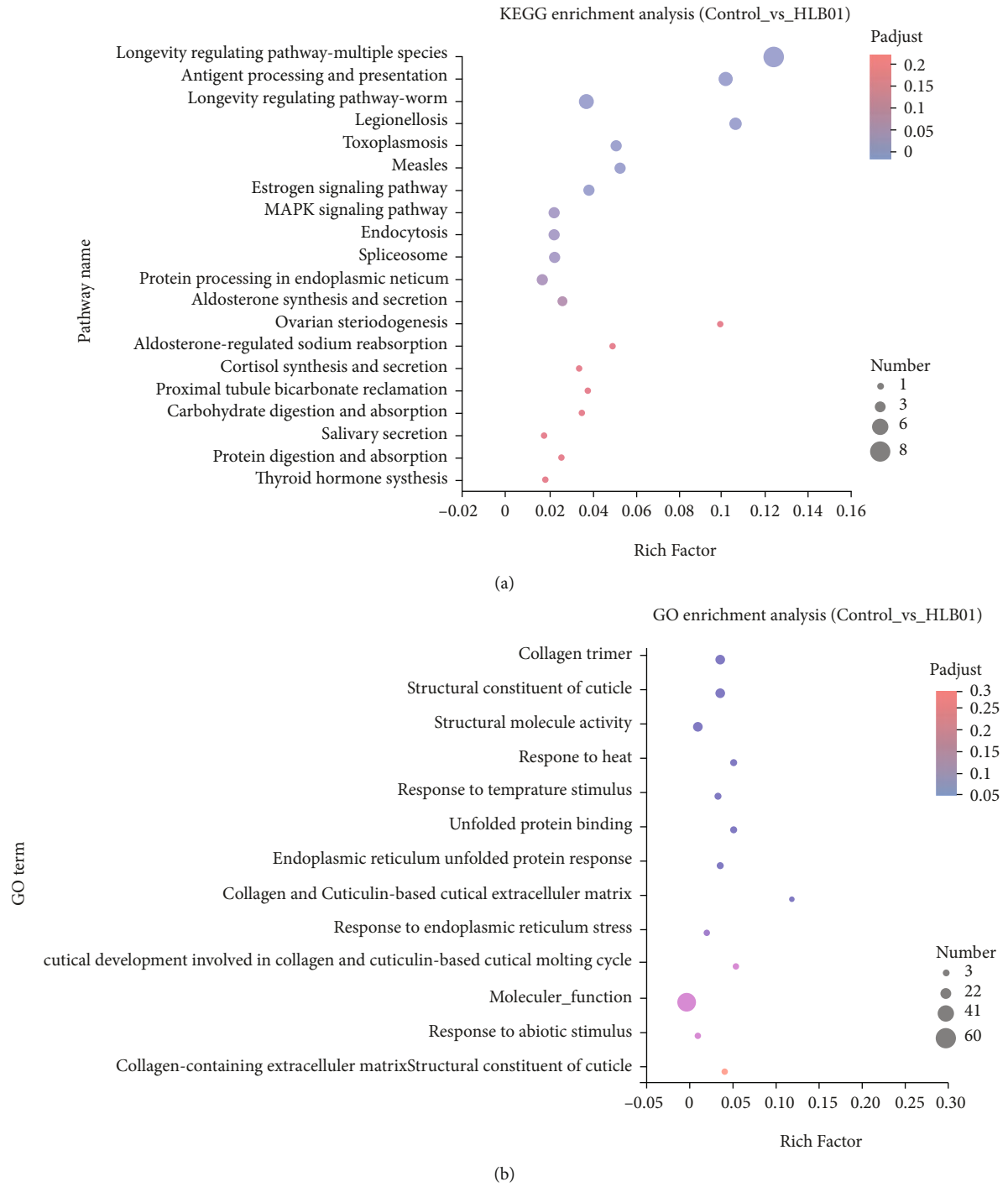


FIGURE 5: Continued.

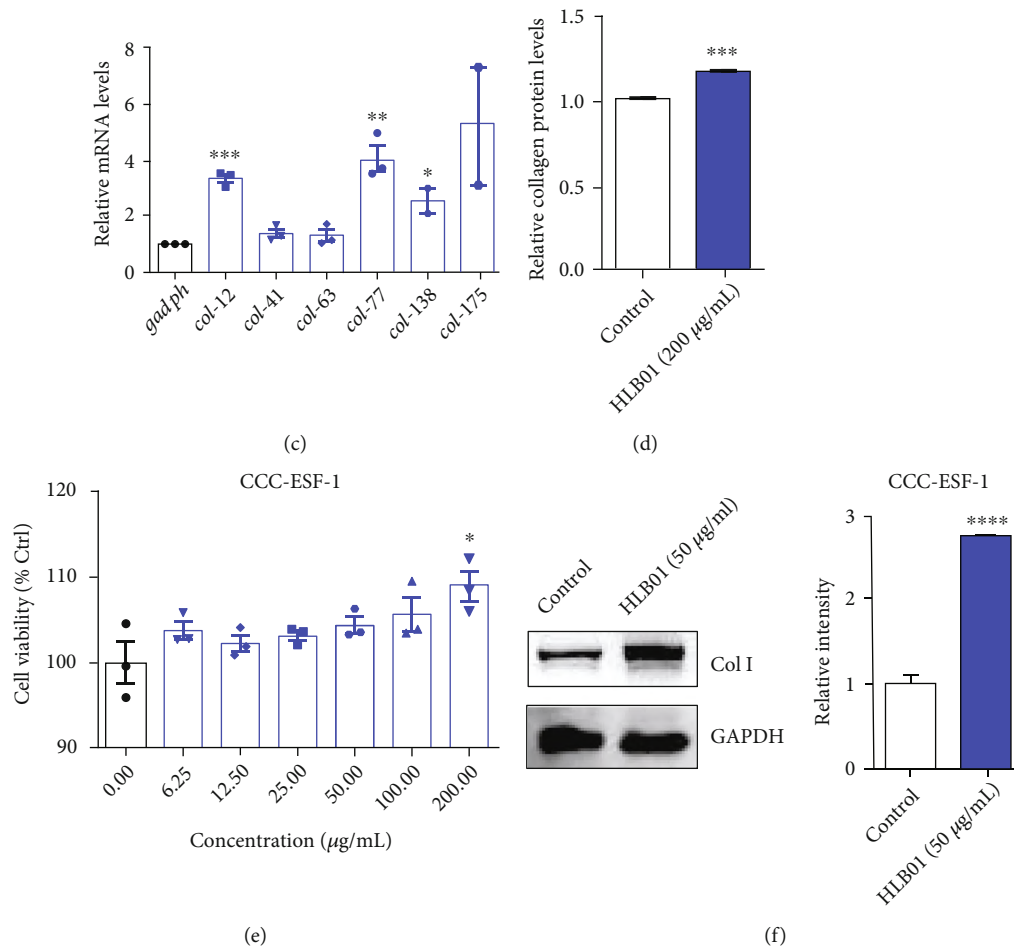


FIGURE 5: HLB01 promotes collagen expression in *C. elegans* and a mammalian cell. (a) KEGG analysis between the control and HLB01-treated groups in *C. elegans* revealed that HLB01 mainly affects the longevity-regulating pathway. (b) GO enrich analysis between the control and HLB01-treated groups in *C. elegans* revealed that HLB01 mainly affected the collagen-based extracellular matrix. (c) HLB01 upregulated the expression of collagen-related genes (*col-12*, *col-41*, *col-63*, *col-77*, *col-138*, and *col-175*) in *C. elegans*. (d) HLB01 (200 μ g/mL) increased the expression of collagen in *C. elegans* by detecting the level of hydroxyproline. (e) The cell viability of HLB01 in human skin fibroblast (CCC-ESF-1). (f) HLB01 (50 μ g/mL) upregulates the expression of collagen type I in human skin fibroblast. An unpaired *t*-test was used to calculate the *P* values, and error bars represented SEM in (c–f). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

could be inferred that HLB01 decreased the oxidative stress and showed antioxidative ability in *C. elegans*.

3.5. HLB01 Enhances Stress Resistance of *C. elegans* via HSF-1 and DAF-16. Since HLB01 can extend the lifespan of *C. elegans* and decrease the ROS accumulation during aging, the related longevity signal pathway was explored. We found that HLB01 failed to extend the lifespan in the *daf-16* mutant (Figure 7(a)). Additionally, we also found that HLB01 increased the mRNA levels of superoxide dismutase (*sod*) genes including *sod-2*, *sod-3*, and *sod-4* (* $P < 0.05$, * $P < 0.05$, and **** $P < 0.0001$), which are the downstream target genes of DAF-16 and encode antioxidant enzymes (Figure 7(b)). These results suggested that HLB01 increases the lifespan of *C. elegans* via activation of DAF-16 and its downstream antioxidant genes.

HSF-1 mainly regulates the expression of heat shock protein (*hsp*) genes to resist the heat stress. We found that

HLB01 treatment no longer extended the lifespan in the *hsf-1* mutant (Figure 7(c)). In the HLB01-treated group, *hsp* genes including *hsp-16.2*, *hsp-16.41*, and *hsp-70*, were upregulated (*** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, and * $P < 0.05$) (Figure 7(d)). Together, these results suggested that HLB01 extends the lifespan of *C. elegans* related to HSF-1 and increases the heat stress resistance.

4. Discussion

The root of *Vicatia thibetica de Boiss* has medicinal and edible value in northwestern Yunnan Province for many years [35, 36]. Homology of medicine and food makes it a potential herbal medicine with high safety. Here, we analyzed the effect of HLB01 on the lifespan and the healthspan including pharyngeal pump and swing of *C. elegans*. As per our knowledge, this is the first report investigating the lifespan-extension and health-improving effect of HLB01 (Figure 3). Not limited to

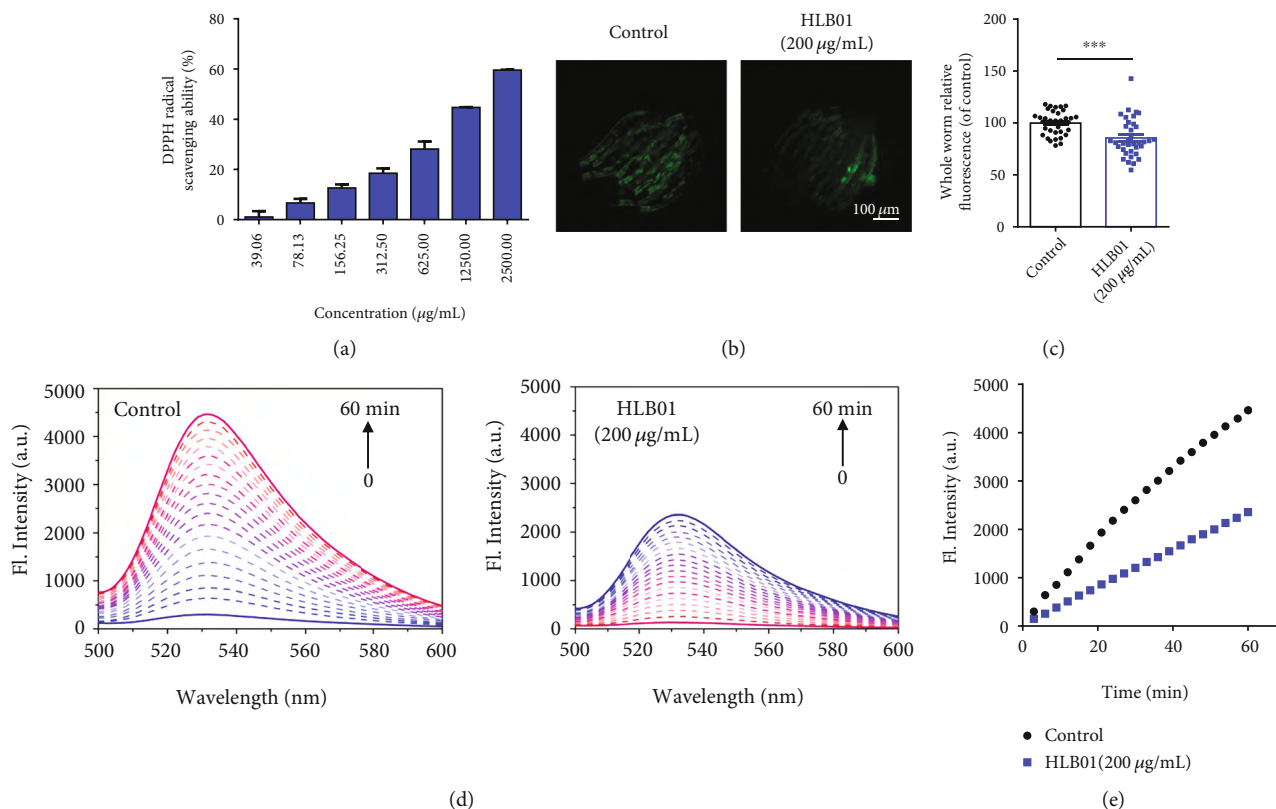


FIGURE 6: HLB01 decreases oxidative stress in *C. elegans*. (a) HLB01 showed concentration-dependent DPPH radical scavenging ability. (b, c) HLB01 decreased the ROS levels in worms detected by DCFH-DA. (c) is the statistical analysis of (b). (d) Fluorescence intensity of DCFH-DA incubated with worm lysis solution in one hour. (e) HLB01 decreased ROS levels in worm lysis solution, compared with the control group. An unpaired *t*-test was used to calculate the *P* values, and error bars represented SEM in (c). ****P* < 0.001.

worms, we evaluated antiaging effects in Doxo-treated mice. As the most efficient anthracycline antibiotics used in chemotherapy, Doxo can destroy the cancer cells by blocking the action of the enzyme topoisomerase-II, which prevents the repair of DNA molecules to damage the cell [37]. The senescence-activating effect of Doxo may involve the shortening of telomere length, inhibition of topoisomerases, inducing nucleosome instability, and damaging to DNA [38, 39]. Many works reported that Doxo-induced senescence showed an upregulation of P16^{ink4a}, IL1 α , IL6, FOXO4 foci, and AST [28]. Doxo also induced the upregulation of the *p21* mRNA level in the liver, which is a cyclin-dependent kinase inhibitor and consistently upregulated in response to different aging stimuli [40]. Here, we reported HLB01 could neutralize the Doxo-induced upregulation of AST, ALT, *p21* mRNA, and γ H2AX protein levels (Figure 4). γ H2AX accumulation is a mark of double-strand DNA breakage which subsequently stimulates the expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor P21, an essential mediator of senescence-associated cell cycle arrest [41, 42]. Our results suggested HLB01 counteracted nuclear DNA damage by activating the DNA damage repair pathway, which subsequently alleviates cell cycle arrest and liver damage in Doxo-induced premature aging. Pharmacological evaluation in senescent mice makes HLB01 an antiaging candidate for human health.

Next, in order to further explore the mechanism of the antiaging effect induced by HLB01, transcriptome sequenc-

ing was conducted. It was found that HLB01 significantly upregulated the transcription of collagen genes and promoted collagen levels in *C. elegans*. Besides, HLB01 also promoted the expression of collagen type I in human fibroblast (CCC-ESF-1) (Figure 5). It is well-known that collagens are the most abundant and significant ECM proteins in the organism and tissues [14]. A previous study has showed that enhancement of collagen production and ECM remodeling are essential signatures for longevity in worms [11]. The decline in collagen production during aging was observed across the species [30]. For instance, senescent human hepatic stellate cells (HSCs) have reduced the expression of collagen mRNA and protein [43, 44]. Since the enhancement of collagen production can delay aging and promote longevity [11], the increased expression of collagen induced by HLB01 might be one of the essential factors which was responsible for the longevity-promoting property of HLB01. In addition, our findings also suggested that HLB01 could be developed as a natural substance which could promote the collagen and ECM function systemically to exert its anti-aging effects.

At present, researches have showed that excess ROS in the organism could cause lipid peroxidation, DNA damage, and changes of proteins, and the oxidative damage caused by ROS was the main factor leading to the aging of the organism [45]. In order to reduce oxidative damage, several studies have been conducted to develop antioxidants [46, 47]. The

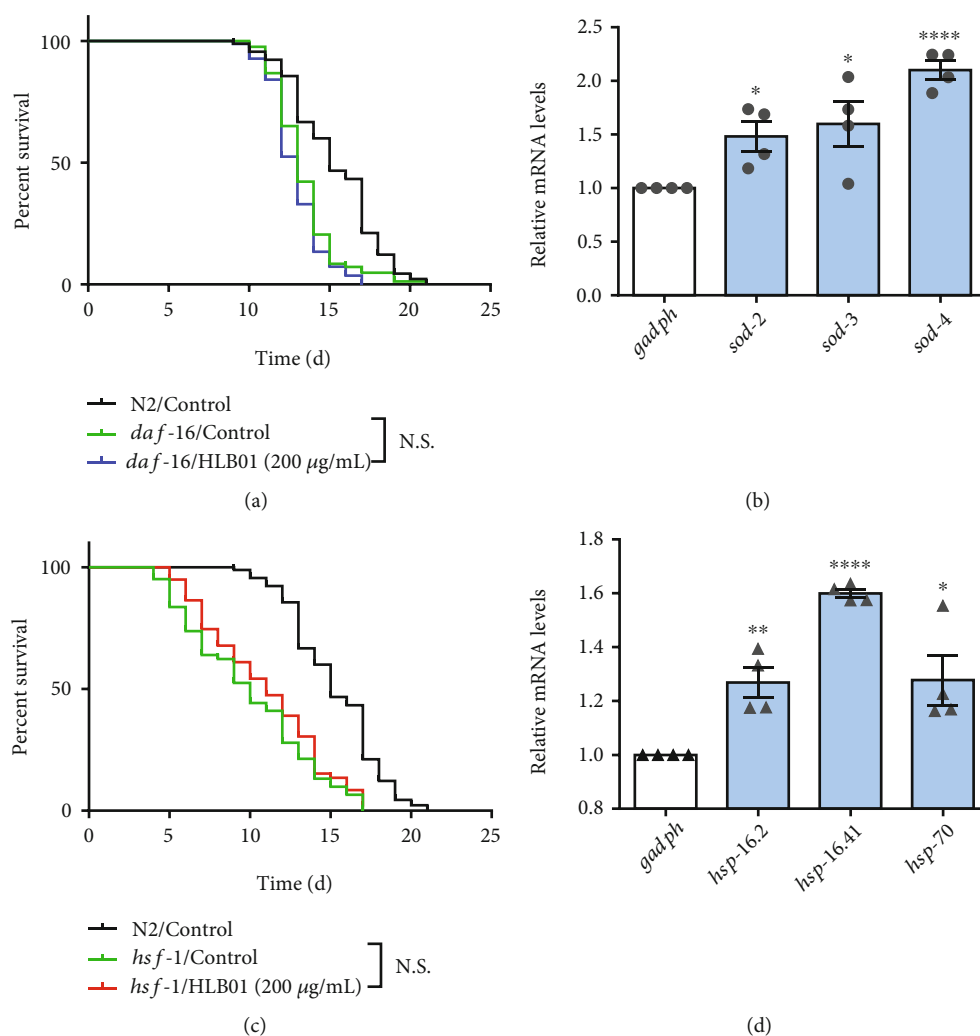


FIGURE 7: HLB01 enhances stress resistance of *C. elegans* via HSF-1 and DAF-16. (a) HLB01 did not extend the lifespan of *daf-16* mutant worms. (b) HLB01 upregulated the DAF-16-targeted genes (*sod-2*, *sod-3*, and *sod-4*). (c) HLB01 did not extend the lifespan of *hsf-1* mutant worms. (d) HLB01 upregulated the heat shock protein-related genes (*hsp-16.2*, *hsp-16.41*, and *hsp-70*). The log-rank (Mantel-Cox) test was used to calculate the *P* values in (a) and (c). An unpaired *t*-test was used to calculate the *P* values, and error bars represented SEM in (b) and (d). **P* < 0.05; ***P* < 0.01; *****P* < 0.0001; N.S., not significant.

roots of *Vicatia thibetica de Boiss* have diverse components including umbelliferone, bergapten, ferulic acid, apigenin, β -sitosterol, daucosterol, and flavonoid [35, 48], which led us to test the antioxidative ability of HLB01. We found that HLB01 has the free radical scavenging and ROS reducing ability (Figure 6). It means that the antiaging effect of HLB01 is related to the antioxidant pathway to some extent. It is well known that DAF-16 is a transcription factor known to regulate the oxidative stress tolerance and extend the lifespan in *C. elegans* [49]. Many DAF-16 target genes encoding proteins have been predicted to protect the cells from oxidative stress [50, 51], and they are related to HSF-1 which has been known to activate the expression of stress resistance genes for promoting longevity in *C. elegans* [52]. We explored the signal transduction mechanism related to stress resistance. The results showed that the lifespan extension in *C. elegans* induced by HLB01 is DAF-16 and HSF-1 dependent. HLB01 upregulated the downstream genes of DAF-16 and HSF-1 to enhance the oxidative stress resistance and heat

stress resistance (Figure 7). Although insulin/insulin-like growth factor-1 signaling implicates collagen remodeling in longevity in *C. elegans* [11], the relationship between DAF-16 and collagen is unknown. Therefore, whether HLB01 promotes the expression of collagen dependent on DAF-16 needs to be further explored.

5. Conclusion

After lifespan screening of 836 extracts from Chinese herbal medicine in *C. elegans*, HLB01 was selected for antiaging studies. We for the first time discovered that HLB01 extended the lifespan and healthspan of *C. elegans* as well as neutralized the Doxo-induced premature aging in adult mice. Antiaging effects of HLB01 were mediated via upregulated collagen, antioxidant ability, and stress resistance, indicating HLB01 is beneficial for aging and aging-related disease and could be further developed as a potential Chinese herbal medicine for antiaging in the future. However, the

interrelationship in collagen upregulation, antioxidant ability, and stress resistance is unclear, and how these three anti-aging mechanisms work in Doxo-induced premature aging mice needs further exploration.

Data Availability

The data used and analyzed in this study are available from the corresponding author on reasonable request.

Conflicts of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Authors' Contributions

Wenwen Liu and Yunhui Guan contributed equally to this work.

Acknowledgments

We would like to thank ManuscriptEdit (<https://www.manuscriptedit.com>) for English language editing (ORDER10471). We thank the Caenorhabditis Genetic Center (CGC) for providing the worm strains. The financial support for this research was provided by the National Natural Science Foundation of China (22037002 and 81872747), the Program for Professor of Special Appointment (Eastern Scholar) at Shanghai Institutions of Higher Learning (TP2018025), the Innovation Program of Shanghai Municipal Education Commission, the Innovative Research Team of High-level Local Universities in Shanghai, and the Chinese Special Fund for State Key Laboratory of Bioreactor Engineering (2060204).

Supplementary Materials

Figure S1: cell viability of MRC-5 cells treated with HLB01. Table S1: lifespan data of *C. elegans*. Table S2: primers for specific genes. (*Supplementary Materials*)

References

- [1] C. Lopez-Otin, M. A. Blasco, L. Partridge, M. Serrano, and G. Kroemer, "The hallmarks of aging," *Cell*, vol. 153, no. 6, pp. 1194–1217, 2013.
- [2] A. Guerrero, R. Guiho, N. Herranz et al., "Galactose-modified duocarmycin prodrugs as senolytics," *Aging Cell*, vol. 19, no. 4, article e13133, 2020.
- [3] M. Xu, T. Pirtskhalava, J. N. Farr et al., "Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age," *Nature Medicine*, vol. 24, no. 8, pp. 1246–1256, 2018.
- [4] J. L. Kirkland and T. Tchkonian, "Senolytic drugs: from discovery to translation," *Journal of Internal Medicine*, vol. 288, no. 5, pp. 518–536, 2020.
- [5] N. Noren Hooten and M. K. Evans, "Techniques to induce and quantify cellular senescence," *Journal of Visualized Experiments*, vol. 123, no. 123, article 55533, 2017.
- [6] V. Gorgoulis, P. D. Adams, A. Alimonti et al., "Cellular senescence: defining a path forward," *Cell*, vol. 179, no. 4, pp. 813–827, 2019.
- [7] A. Fedintsev and A. Moskalev, "Stochastic non-enzymatic modification of long-lived macromolecules - a missing hallmark of aging," *Ageing Research Reviews*, vol. 62, article 101097, 2020.
- [8] H. L. Birch, "Extracellular matrix and ageing," *Sub-Cellular Biochemistry*, vol. 90, pp. 169–190, 2018.
- [9] E. Mavrogonatou, H. Pratsinis, A. Papadopoulou, N. K. Karmanos, and D. Kletsas, "Extracellular matrix alterations in senescent cells and their significance in tissue homeostasis," *Matrix Biology*, vol. 75–76, pp. 27–42, 2019.
- [10] A. C. Teuscher, C. Statzer, S. Pantasis, M. R. Bordoli, and C. Y. Ewald, "Assessing collagen deposition during aging in mammalian tissue and in *Caenorhabditis elegans*," *Methods in Molecular Biology*, vol. 1944, pp. 169–188, 2019.
- [11] C. Y. Ewald, J. N. Landis, J. P. Abate, C. T. Murphy, and T. K. Blackwell, "Dauer-independent insulin/IGF-1-signalling implicates collagen remodelling in longevity," *Nature*, vol. 519, no. 7541, pp. 97–101, 2015.
- [12] D. E. Harrison, "Mouse erythropoietic stem cell lines function normally 100 months: loss related to number of transplantations," *Mechanisms of Ageing and Development*, vol. 9, no. 5–6, pp. 427–433, 1979.
- [13] L. Magrassi, K. Leto, and F. Rossi, "Lifespan of neurons is uncoupled from organismal lifespan," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 110, no. 11, pp. 4374–4379, 2013.
- [14] N. Levi, N. Papisov, I. Solomonov, I. Sagi, and V. Krizhanovsky, "The ECM path of senescence in aging: components and modifiers," *The FEBS Journal*, vol. 287, no. 13, pp. 2636–2646, 2020.
- [15] P. Panwar, G. S. Butler, A. Jamroz, P. Azizi, C. M. Overall, and D. Bromme, "Aging-associated modifications of collagen affect its degradation by matrix metalloproteinases," *Matrix Biology*, vol. 65, pp. 30–44, 2018.
- [16] A. Gutiérrez-Fernández, C. Soria-Valles, F. G. Osorio et al., "Loss of MT1-MMP causes cell senescence and nuclear defects which can be reversed by retinoic acid," *The EMBO Journal*, vol. 34, no. 14, pp. 1875–1888, 2015.
- [17] T. Kaletta and M. O. Hengartner, "Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 5, no. 5, pp. 387–399, 2006.
- [18] R. A. Kobet, X. Pan, B. Zhang, S. C. Pak, A. S. Asch, and M. H. Lee, "Caenorhabditis elegans: a model system for anti-cancer drug discovery and therapeutic target identification," *Biomolecules & therapeutics*, vol. 22, no. 5, pp. 371–383, 2014.
- [19] D. Ryu, L. Mouchiroud, P. A. Andreux et al., "Urolithin A induces mitophagy and prolongs lifespan in *C. elegans* and increases muscle function in rodents," *Nature Medicine*, vol. 22, no. 8, pp. 879–888, 2016.
- [20] D. E. Harrison, R. Strong, Z. D. Sharp et al., "Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice," *Nature*, vol. 460, no. 7253, pp. 392–395, 2009.
- [21] S. Robida-Stubbs, K. Glover-Cutter, D. W. Lamming et al., "TOR signaling and rapamycin influence longevity by regulating SKN-1/Nrf and DAF-16/FoxO," *Cell Metabolism*, vol. 15, no. 5, pp. 713–724, 2012.
- [22] W. Liu, H. Lin, Z. Mao et al., "Verapamil extends lifespan in *Caenorhabditis elegans* by inhibiting calcineurin activity and promoting autophagy," *Aging (Albany NY)*, vol. 12, no. 6, pp. 5300–5317, 2020.

- [23] I. B. Roninson, "Tumor cell senescence in cancer treatment," *Cancer Research*, vol. 63, no. 11, pp. 2705–2715, 2003.
- [24] X. Xiao, X. Zhang, C. Zhang et al., "Toxicity and multigenerational effects of bisphenol S exposure to *Caenorhabditis elegans* on developmental, biochemical, reproductive and oxidative stress," *Toxicology research*, vol. 8, no. 5, pp. 630–640, 2019.
- [25] K. G. Miller, A. Alfonso, M. Nguyen, J. A. Crowell, C. D. Johnson, and J. B. Rand, "A genetic selection for *Caenorhabditis elegans* synaptic transmission mutants," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 93, no. 22, pp. 12593–12598, 1996.
- [26] J. A. Yin, G. Gao, X. J. Liu et al., "Genetic variation in glia-neuron signalling modulates ageing rate," *Nature*, vol. 551, no. 7679, pp. 198–203, 2017.
- [27] B. Han, P. Sivaramakrishnan, C.-C. J. Lin et al., "Microbial genetic composition tunes host longevity," *Cell*, vol. 169, no. 7, pp. 1249–1262.e13, 2017.
- [28] M. P. Baar, R. M. C. Brandt, D. A. Putavet et al., "Targeted apoptosis of senescent cells restores tissue homeostasis in response to chemotoxicity and aging," *Cell*, vol. 169, no. 1, pp. 132–147.e16, 2017, e116.
- [29] Y. Z. Lei Ting and Z. Xu, "Study on mechanism of anti-fatigue effect of Seselopsis extract," *China Pharmaceuticals*, vol. 17, no. 3, pp. 6-7, 2008.
- [30] Y. L. Chen, J. Tao, P. J. Zhao et al., "Adiponectin receptor PAQR-2 signaling senses low temperature to promote *C. elegans* longevity by regulating autophagy," *Nature communications*, vol. 10, no. 1, article 2602, 2019.
- [31] S. Thabit, H. Handoussa, M. Roxo, B. Cestari de Azevedo, N. S. El Sayed, and M. Wink, "*Styphnolobium japonicum* (L.) Schott fruits increase stress resistance and exert antioxidant properties in *Caenorhabditis elegans* and mouse models," *Molecules*, vol. 24, no. 14, p. 2633, 2019.
- [32] C. Zhu, W. Hu, H. Wu, and X. Hu, "No evident dose-response relationship between cellular ROS level and its cytotoxicity - a paradoxical issue in ROS-based cancer therapy," *Scientific Reports*, vol. 4, no. 1, 2015.
- [33] S. Luo, X. Jiang, L. Jia et al., "In vivo and in vitro antioxidant activities of methanol extracts from olive leaves on *Caenorhabditis elegans*," *Molecules*, vol. 24, no. 4, p. 704, 2019.
- [34] B. Zhou, L. Yang, S. Li et al., "Midlife gene expressions identify modulators of aging through dietary interventions," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 109, no. 19, pp. E1201–E1209, 2012.
- [35] D. Z. Zhang Weimin, "The chemical constituents reom the roots of *Vicatia thibetica*," *Natural Product Research and Development*, vol. 16, no. 3, pp. 218-219, 2004.
- [36] S. Y. Huangbin, Z. Bufen, L. Weina, W. Yu, and L. Yang, "A study on phamacologica I effects of Seselopsis on mice," *Journal of Dali University*, vol. 5, no. 6, pp. 78–80, 2006.
- [37] T. Radonjic, M. Rankovic, M. Ravic et al., "The effects of thiamine hydrochloride on cardiac function, redox status and morphometric alterations in doxorubicin-treated rats," *Cardiovascular Toxicology*, vol. 20, no. 2, pp. 111–120, 2020.
- [38] S. Buttiglieri, M. Ruella, A. Risso et al., "The aging effect of chemotherapy on cultured human mesenchymal stem cells," *Experimental Hematology*, vol. 39, no. 12, pp. 1171–1181, 2011.
- [39] F. Yang, S. S. Teves, C. J. Kemp, and S. Henikoff, "Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1845, no. 1, pp. 84–89, 2014.
- [40] S. T. Tang, "When death is imminent: where terminally ill patients with cancer prefer to die and why," *Cancer Nursing*, vol. 26, no. 3, pp. 245–251, 2003.
- [41] R. di Micco, V. Krizhanovsky, D. Baker, and F. d'Adda di Fagagna, "Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities," *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, vol. 22, no. 2, pp. 75–95, 2021.
- [42] T. V. Pospelova, Z. N. Demidenko, E. I. Bukreeva, V. A. Pospelov, A. V. Gudkov, and M. V. Blagosklonny, "Pseudo-DNA damage response in senescent cells," *Cell Cycle*, vol. 8, no. 24, pp. 4112–4118, 2009.
- [43] B. Schnabl, C. A. Purbeck, Y. H. Choi, C. H. Hagedorn, and D. Brenner, "Replicative senescence of activated human hepatic stellate cells is accompanied by a pronounced inflammatory but less fibrogenic phenotype," *Hepatology*, vol. 37, no. 3, pp. 653–664, 2003.
- [44] V. Krizhanovsky, M. Yon, R. A. Dickins et al., "Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis," *Cell*, vol. 134, no. 4, pp. 657–667, 2008.
- [45] F. Bonomini, L. F. Rodella, and R. Rezzani, "Metabolic syndrome, aging and involvement of oxidative stress," *Aging and Disease*, vol. 6, no. 2, pp. 109–120, 2015.
- [46] Y. Zhu, X. Yu, Q. Ge et al., "Antioxidant and anti-aging activities of polysaccharides from *Cordyceps cicadae*," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 157, pp. 394–400, 2020.
- [47] J. M. A. Tullet, J. W. Green, C. Au et al., "The SKN-1/Nrf 2 transcription factor can protect against oxidative stress and increase lifespan in *C. elegans* by distinct mechanisms," *Aging Cell*, vol. 16, no. 5, pp. 1191–1194, 2017.
- [48] W. L. Zhou Ping, D. Li, H. Jie, W. Changyou, and W. Chengjun, "Study on antioxidative activity of flavonoids extracted from Seselopsis in vivo," *Journal of Anhui Agricultural Science*, vol. 39, no. 3, pp. 1359-1360, 2011.
- [49] X. X. Lin, I. Sen, G. E. Janssens et al., "DAF-16/FOXO and HLH-30/TFEB function as combinatorial transcription factors to promote stress resistance and longevity," *Nature Communications*, vol. 9, no. 1, p. 4400, 2018.
- [50] C. Saier, I. Gommlich, V. Hiemann et al., "Agrimonia procera Wallr. extract increases stress resistance and prolongs life span in *Caenorhabditis elegans* via transcription factor DAF-16 (FoxO orthologue)," *Antioxidants*, vol. 7, no. 12, p. 192, 2018.
- [51] T. Heidler, K. Hartwig, H. Daniel, and U. Wenzel, "Caenorhabditis elegans lifespan extension caused by treatment with an orally active ROS-generator is dependent on DAF-16 and SIR-2.1," *Biogerontology*, vol. 11, no. 2, pp. 183–195, 2010.
- [52] A. L. Hsu, C. T. Murphy, and C. Kenyon, "Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor," *Science*, vol. 300, no. 5622, pp. 1142–1145, 2003.

Ashwagandha

Enhances

Telomerase Activity



THEORY:

Ashwagandha (*Withania somnifera* Dunal) has been used for millennia as a rasayana or “life extender” in Ayurveda. Researchers are studying how to extend healthy lifespan, including looking at some of the physiological factors that may accelerate the aging process, specifically, the degradation of telomeres. While ashwagandha has been suggested to increase longevity, there is only limited scientific evidence to support the claim. Could ashwagandha’s anti-aging effects be attributed in part to an ability to enhance telomerase activity?



PARAMETERS:


Human HeLa cells were maintained in DMEM, supplemented with 10% fetal bovine serum in a humidified incubator. Cells (40%-60% confluency) were treated with various concentrations—10 µg, 50 µg, 100 µg, 500 µg, 5 mg—of ashwagandha root extract (as KSM-66 Ashwagandha from Ixoreal Biomed). Cells were collected and centrifuged, and detection of telomerase activity assayed using the PCR-based telomeric repeat amplification protocol (TRAP assay).



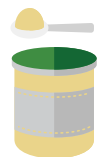
OUTCOME:

Ashwagandha root extract powder, at a concentration of only 10 µg to 50 µg, **increased telomerase activity** by

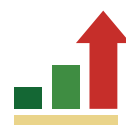
45% ↑
upon 72 hours
of exposure.



There was a **dose-dependent increase in telomerase** activity up to 50 µg/ml, after which activity started decreasing as the preparation is a powder suspension.



Telomerase activity was highest between 50 ng and 5 µg of total protein of cell extract, with 2 µg as the ideal protein concentration in this study.

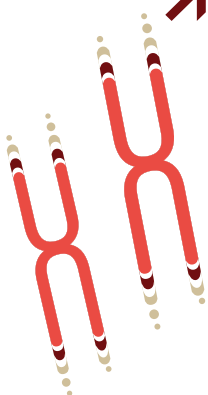


Researchers concluded: “Ashwagandha root extract is able to enhance telomerase activity,” and suggest it should be evaluated under various adult onset disease conditions for its holistic protective effect.



IMPACT:

Aging-associated telomere shortening is well documented, while telomerase, which is needed to maintain telomere length through replication, is essential for healthy life.¹ Several factors, including stress, aggravate the senescence process through telomere shortening.² As ashwagandha exerts anti-stress activities, its ability to enhance telomerase activity suggests it may indeed function as a “life extender” by supporting the body’s natural processes.



1. *Curr Opin Cell Biol.* 2006;18:254-260. DOI: 10.1016/j.ceb.2006.03.003.
2. *PNAS.* 2004;101(49):17312-15. DOI: 10.1073/pnas.0407162101.