

УДК 591.169.1

СТИМУЛЯЦИЯ ПРОЛИФЕРАЦИИ КАРНОЗИНОМ: КЛЕТОЧНЫЙ И ТРАНСКРИПТОМНЫЙ ПОДХОД

© 2014 г. Х. С. Вишнякова¹, М. А. Бабижаев², А. М. Алипер^{3,4}, А. А. Буздин^{3,4,5},
А. В. Кудрявцева¹, Е. Е. Егоров^{1,6*}

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991

²Московский научно-исследовательский институт глазных болезней
им. Гельмгольца Минздрава России, Москва, 105062

³Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии
им. Д. Рогачёва, Москва, 117997

⁴Pathwaypharmaceuticals, Limited, Rooms 2702-3, 27/F Bank of East Asia Harbour View CTR 56,
Gloucester Rd., Wan Chai, Hong Kong SAR

⁵Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова,
Российской академии наук, Москва, 117997

⁶Московский физико-технический институт (государственный университет),
Долгопрудный, Московская обл., 141700

Поступила в редакцию 28.03.2014 г.

Принята к печати 25.04.2014 г.

Концентрация эндогенного дипептида карнозина в мышечной ткани человека достигает десятков миллимолей. За более чем 100 лет исследований накоплен огромный материал о самых разнообразных функциях карнозина, из которых основными считают действия, направленные против процессов старения. При исследовании действия карнозина на культуры клеток нами обнаружено, что помимо уже известных активностей: увеличения предела Хейфлика и морфологического омоложения клеток — карнозин стимулирует клеточные деления в тесте колониеобразования и тормозит процесс перехода клеток в состояние покоя. При анализе изменений в транскриптом, происходящих под действием карнозина, выявлено, что основные сдвиги связаны с позитивной регуляцией клеточного цикла на всех уровнях — от начала синтеза ДНК до конденсации хромосом. Можно предположить, что именно способность карнозина стимулировать клеточный цикл лежит в основе его омолаживающего действия, а высокие концентрации этого дипептида в мышечной ткани играют роль не только физиологического буфера, но и необходимы для восстановления (регенерации) мышц после чрезмерных нагрузок.

Ключевые слова: карнозин, пролиферация, клетки человека, фибробласты, регенерация, мышечная ткань, транскриптом.

STIMULATION OF PROLIFERATION BY CARNOSINE: CELLULAR AND TRANSCRIPTOME APPROACHES, by K. S. Vishnyakova¹, M. A. Babizhayev², A. M. Aliper^{3,4}, A. A. Buzdin^{3,4,5}, A. V. Kudryavtseva¹, Y. E. Yegorov^{1,6*} (¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia, *e-mail: yegorov58@gmail.com; ²Moscow Helmholtz Research Institute of Eye Diseases, Moscow, 103064 Russia; ³Rogachev Centre of Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology, Moscow, 117997 Russia; ⁴Pathwaypharmaceuticals, Limited, Rooms 2702-3, 27/F Bank of East Asia Harbour View CTR 56, Gloucester Rd., Wan Chai, Hong Kong SAR; ⁵Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia; ⁶Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudny, Moscow Region, 141700 Russia). Concentration of endogenous dipeptide carnosine in human muscle tissue reaches tens of millimoles. For more than 100 years of research, a lot of data concerning carnosine functions were accumulated, among which anti-aging effects are regarded most important. Here, effect of carnosine in cell cultures was studied. It has been found that apart from the known action — an increase of the Hayflick limit and morphological rejuvenation — carnosine stimulates cell division in colony-forming assays and in the course of transition of cells to the quiescent state. The analysis of the transcriptome showed that carnosine-induced changes are mainly related to positive regulation of the cell cycle at all levels, from the onset of the DNA synthesis to chromosome condensation. One can suppose that the revealed stimulation of the cell cycle account for the carnosine-induced rejuvenation processes and a high concentration of carnosine in muscle tissue is required for the muscle recovery (regeneration) after excess loads.

Keywords: carnosine, proliferation, human cells, fibroblasts, regeneration, muscle tissue, transcriptome.

DOI: 10.7868/S0026898414050164

* Эл. почта: yegorov58@gmail.com

Карнозин (β -аланил-L-гистидин) открыт в конце XIX века в составе мясного экстракта Гулевичем [1]. Отсюда происходит его название: *carnis* – мясо (*лат.*). Карнозин и родственные ему имидазолсодержащие соединения: гомокарнозин (γ -амино-бутирил-гистидин), баленин (β -аланил-L-3-метилгистидин) и анзерин (β -аланил-L-1-метилгистидин) – входят в высоких концентрациях в состав возбудимых тканей и обладают разнообразными биологическими активностями [2–4]. Карнозин синтезируется карнозинсинтазой из β -аланина и L-гистидина. Синтез идет, главным образом, в мышечных и глиальных клетках, в олигодендроцитах. Нейроны получают карнозин от глиальных клеток. Карнозин может быть ацетилирован и фосфорилирован, однако ферментные системы этих процессов изучены плохо [5]. Клетки хороидального сплетения (часть гематоэнцефалического барьера) содержат транспортер карнозина [6]. Уровень карнозина в тканях регулируется также рядом ферментов, превращающих его в карцинин, N-ацетилкарнозин, анзерин или офидин соответственно декарбоксилированием, ацетилированием или метилированием, либо гидролизующих его до аминокислот: гистидина и β -аланина. Гидролиз осуществляют главным образом тканевая карнозиназа [КФ 3.4.13.3], широко представленная в различных тканях [7, 8], или сывороточная карнозиназа [КФ 3.4.13.20], найденная в мозге и плазме крови приматов и человека [9, 10].

Карнозин и близкие к нему дипептиды: гомокарнозин, анзерин, их N-ацетилированные производные – широко распространены в животном мире и встречаются в мышечной ткани в очень высоких концентрациях. Недавно установлено, что суммарная концентрация карнозина и анзерина в грудной мышце индюшки может превышать 200 мМ [11]. Карнозина больше в белой (анаэробной) мускулатуре, чем в красной [12]. Значительное количество карнозина находится в составе нервной системы, особенно в обонятельной луковице [13]. Цереброспинальная жидкость человека содержит гомокарнозин, но не карнозин [14].

По своим химическим свойствам карнозин является буфером (pK_a 6.83) и поэтому способен регулировать pH в физиологических рамках [12]. Этим, возможно, объясняется его преимущественная ассоциация с белыми (гликолитическими) мышцами, в которых может образовываться большое количество молочной кислоты. Карнозин взаимодействует с альдегидами, что обуславливает его способность подавлять гликолиз [15, 16]. Кроме того, карнозин активирует фермент карбоангидразу, что увеличивает емкость карбонатного буфера [17] и препятствует ацидозу, причем независимо от подавления гликолиза.

В многочисленных исследованиях выявлены антиоксидантные свойства карнозина и гистидин-

содержащих дипептидов. Карнозин и родственные дипептиды предотвращают перекисное окисление в модельных мембранных системах, что позволяет считать их водорастворимым компонентом защитной системы клетки от окислительного повреждения – наравне с жирорастворимыми мембраносвязанными антиоксидантами, такими как α -токоферол. Известна роль карнозина как “мусорщика” активных форм кислорода (АФК), а также α - β -ненасыщенных альдегидов, образующихся при окислительном стрессе в реакциях пероксидации жирных кислот, входящих в состав мембран, [18, 19]. Карнозин и карцинин противостоят реакциям гликирования [16, 20]. Гистидинсодержащие дипептиды способны связывать ионы переходных металлов, включая Cu^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} и Fe^{2+} [21, 22]. Металлсвязывающая активность карнозина использована для создания комплекса карнозин-цинк, который действует как стабилизатор мембран [23] и антиоксидант [24, 25], обладает ранозаживляющим действием [26] и официально зарегистрирован в Японии как средство для лечения язвы желудка (Polaprezinc) [27].

Существует множество примеров защитного действия карнозина. Это защита от кислородных и азотных радикалов, гликирующих агентов, альдегидов, токсичных ионов металлов [16]. Карнозин защищает клетки от повреждений при ишемии-реперфузии [28, 29], помогает при диабете, остеопорозе и нейродегенерации, улучшает зрение и слух, способствует заживлению ран и нормализации иммунных функций [16, 30–33]

В процессах, которые реализуются клеткой при защите от окислительного стресса, задействованы совершенно различные активности карнозина, включая прямое взаимодействие и стабилизацию (защиту) супероксиддисмутазы, подавление перекисного окисления липидов, торможение продукции АФК, защиту теломер, трансгликирование, воздействие на редокс-регуляцию, протеолиз, функциональную активность протеасом и эпигенетическую регуляцию [34–40].

Ранее нами показано, что уровень карнозина в хрусталике глаза человека заметно снижается в процессе созревания катаракты (с 25 мкМ до 5 мкМ) [41]. На мышинной модели болезни Альцгеймера (мышь 3xTg-AD) выявлено, что введение карнозина значительно снижает аккумуляцию β -амилоида в гиппокампе, препятствует развитию ассоциированных со старением нарушений митохондриальных функций и блокирует развитие болезни [42].

Классические опыты МакФарланда и Холлидея [43, 44] показали, что карнозин увеличивает пролиферативный потенциал фибробластов. Принимая во внимание современные данные о теломерной природе счетчика делений, можно предположить,

что поскольку карнозин защищает теломеры [38], то его действие по увеличению пролиферативного потенциала объясняется именно этим. Однако защита теломер не может объяснить быстрое “омолаживающее” действие карнозина, показанное в работе [44]. Также замедление старения дрозофилы [45] трудно объяснить теломерными эффектами, поскольку дрозофила имеет совсем особые длинные теломеры и чрезвычайно низкую скорость их укорачивания, которая не реализуется до проявлений репликативного старения в пределах жизни одной мухи.

В представленной работе изучено воздействие карнозина на пролиферацию неопухолевых клеток человека в культуре.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культуры клеток. Первичные культуры фибробластов кожи человека (штамм 1608) любезно предоставлены С.М. Тереховым (МГНЦ РАМН). Клон иммортализованных фибробластов кожи человека получали путем введения гена каталитического компонента теломеразы (hTERT) в клетки 1608, как описано ранее [46].

Первичные культуры мезенхимальных стромальных клеток человека (Ко-2 и Ко-10), полученные по стандартной методике с применением коллагеназы [47] из фрагментов кости (стенка альвеол верхней или нижней челюсти) от двух здоровых доноров, любезно предоставлены А.А. Докторовым (НИЦБМТ ВИЛАР). Иммортализованная с помощью введения гена (hTERT) культура мезенхимальных стромальных клеток человека из костного мозга любезно предоставлена Э.Б. Дашиным (ИБР РАН).

Клетки росли в среде DMEM (“ПанЭко”, Россия) с добавлением 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки (FBS; “Биолот”, Россия), 2 мМ L-глутамин (“ПанЭко”) и 40 мкг/мл гентамицина (“ПанЭко”) при 37°C и 5% CO₂. Культивирование проводили в инкубаторе ThermoForma, модель 484 (США), позволяющем использовать различные концентрации (21 и 3%) кислорода. Клетки по достижении монослоя пересевали два раза стандартным способом с использованием трипсина и EDTA. Состарившимися признавали те клетки, которые не были в состоянии образовать монослой в течение трех недель после пересадки. Смену среды производили еженедельно в тех случаях, когда клетки не нуждались в пересеве (не достигли монослоя).

Фотографирование клеток и препаратов производили с помощью инвертированного фазово-контрастного микроскопа Nikon Diavert (Япония) и камеры Nikon D5000 (Япония). Изображения контрастировали с помощью программы Image J v1.23 (“Scion”).

Колониеобразование. Изучали способность клеток образовывать колонии, как описано ранее [48]. По 100–200 клеток (подсчет производили в камере Горяева) высевали в пластиковые 10-см чашки Петри (“Costar”) в среде DMEM с 15% FBS. Через 7 сут клетки фиксировали этанолом и окрашивали метиленовым синим. Производили подсчет колоний и клеток в колониях. Просчитывали по три чашки каждого типа. Каждую чашку закрепляли на листе бумаги с нарисованной сеткой. Изображение анализировали с помощью стереомикроскопа МБС-9. На листе бумаги с увеличенным изображением сетки отмечали положение колоний и число клеток в них. Подсчитанное число клеток округляли по разрядам двоичной системы. Например, если группа клеток состояла из трех или четырех клеток, то в зачет шла цифра 4, если в группе было от 5 до 8 клеток – 8, если от 256 до 512, то записывали 512. Чашки с клетками анализировали независимо два человека.

Выделение РНК. Замороженные в жидком азоте образцы фибробластов 1608 человека (20–30 мкг) гомогенизировали вручную и растирали пестиком в керамической ступке. Выделение РНК проводили, используя специализированный набор ZR RNA MiniPrep (“ZymoResearch”, США), по протоколу производителя. Количество выделенной РНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop 1000, (“Nanodrop”, США) и флуориметре Qubit 2.0 (“Invitrogen”, США), качество – на анализаторе качества нуклеиновых кислот Agilent 2100 Bioanalyzer (“AgilentTechnologies”, США). Параметр RIN для РНК составлял не меньше 7.

Подготовка библиотек мРНК и секвенирование. Для подготовки библиотек мРНК для секвенирования на приборе HiSeq 2000 (“Illumina”, США) использовали 3.5 мкг общей РНК, выделенной описанным выше способом. При подготовке образцов для секвенирования использовали набор TruSeqRNA Sample PrepKitv2 (“Illumina”, США) по методике, рекомендованной производителем.

Образцы общей РНК (3.5 мкг) разводили в 50 мкл деионизированной воды. Проводили очистку мРНК, содержащей поли(А)-последовательность, с помощью магнитных шаров RNA Purification Beads (“Illumina”, США), которые содержат поли(Т)-последовательность. На этом этапе также проводили фрагментирование очищенной мРНК. Синтез кДНК проводили на матрице РНК с использованием обратной транскриптазы Super Script II (“Invitrogen”, США) и специфических праймеров. Для синтеза второй цепи использовали ферменты и праймеры из того же набора. Полученную дцДНК очищали на магнитных шарах AMPure XPBeads (“Beckman-Coulter”, США) и восстанавливали тупые концы с использованием 3'- и 5'-экзонуклеаз. Затем к тупым 3'-концам ДНК добавляли единичный

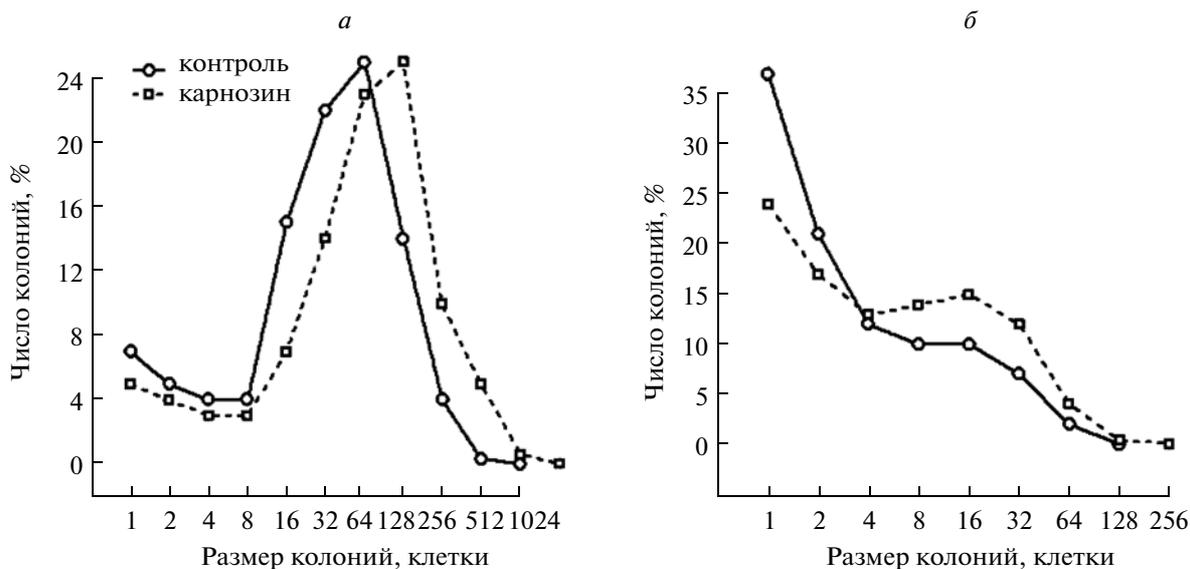


Рис. 1. Стимуляция карнозином (10 мМ) пролиферации клеток при редком посеве. Представлены кривые распределения колоний по размерам. *а* – Клетки Bmsl, *б* – Ko-10.

нуклеотид А для предотвращения их лигирования друг с другом в процессе лигирования адаптеров. Далее проводили лигирование на тимин-содержащих адаптерах и подготавливали образцы ДНК к гибридизации на проточной ячейке. ПЦР-амплификацию выполняли по протоколу производителя набора: 1) активирование ДНК-полимеразы – 30 с при 98°C; 2) 14 циклов: денатурация – 10 с при 98°C, отжиг праймеров – 30 с при 60°C и элонгация – 30 с при 72°C; 3) элонгация – 5 мин при 72°C.

Качество библиотек проверяли на биоанализаторе Agilent 2100, концентрацию библиотек оценивали с помощью ПЦР в реальном времени на приборе Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (“Applied Biosystems”, США).

ДНК-кластеры генерировали на приборе сBot по методике, описанной в протоколе фирмы “Illumina”. Полученную на сBot проточную ячейку с кластерами использовали для секвенирования на полногеномном секвенаторе Illumina HiSeq 2000.

Анализ транскриптома. Для функционального анализа полученных данных использовано программное обеспечение и база данных MetaCore™ (GeneGO, “Thomson Reuters”, США). Дифференциально экспрессируемыми считались гены, уровень экспрессии которых был изменен (повышен либо понижен) более чем в 2 раза по сравнению с нормой (порог дифференциальной экспрессии: $|\lg_2(\text{fold-change})| > 1$). В результате анализа функциональных онтологий MetaCore получены наиболее обогащенные дифференциально экспрессируемыми генами метаболические карты (MetaCoreMaps), сети (MetaCoreNetworks) и процессы GO (GO Processes). Для определения уровня значи-

мости обогащения рассчитывали значения *p-value* по формуле гипергеометрического распределения. Наиболее значимыми считались биологические процессы с наименьшим значением *p-value*. Для удобства использован отрицательный десятичный логарифм значения *p-value* [$-\lg(p\text{Value})$].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Карнозин стимулирует колониеобразование клеток в культуре

В первой серии экспериментов изучено влияние карнозина на колониеобразование различных клеток, в том числе классического объекта исследований: фибробластов кожи (штамм 1608), а также его иммортализованного варианта (1608hTERT) – и двух линий мезенхимальных стромальных клеток: Ko-10 (первичная культура) и BMSL (иммортализованный вариант). По сравнению с распространенной методикой измерения скорости роста клеток метод колониеобразования позволяет получать значительно больше информации по действию исследуемого соединения на пролиферацию (рис. 1).

Из рисунка 1 видно, что карнозин стимулирует пролиферацию разных видов мезенхимальных стромальных клеток человека: увеличивается средний и максимальный размер колоний, уменьшается доля неделящихся клеток, кривая распределения по размерам сдвигается вправо.

В таблице 1 представлены результаты сравнительного анализа (на количественном уровне) влияния карнозина на колониеобразование различных клеток. Для клеток 1608-hTERT, в отличие от других, карнозин увеличивает выживаемость

клеток (число колоний), для всех клеток в 2 раза увеличивается максимальный размер колоний и снижается доля колоний, состоящих из одной клетки (уменьшается вероятность выхода из клеточного цикла). Наиболее информативный показатель – средний размер колоний – увеличивается в 1.5–2 раза.

В таблице 2 приведена концентрационная зависимость действия карнозина на колониеобразование. Как видно, самый большой урожай клеток наблюдается при 15 мМ карнозина; при дальнейшем повышении концентрации эффект ослабевает и при 30 мМ становится почти недостоверным.

Таким образом, выявлено, что карнозин дозозависимо стимулирует пролиферацию четырех видов клеток человека при редком посеве.

Карнозин увеличивает пролиферативный потенциал клеток в культуре

Из работы МакФарланда и др. [43] известно, что карнозин увеличивает пролиферативный потенциал фибробластов человека. Распространяется ли этот эффект на мезенхимальные стромальные клетки, которые уже в значительной мере исчерпали свой пролиферативный потенциал (прошли в культуре несколько десятков удвоений популяции), было неизвестно. Нами показано, что длительное культивирование клеток в присутствии карнозина приводит к увеличению пролиферативного потенциала. В использованных нами условиях (см. раздел “Экспериментальная часть”) клетки Ко-10 давали 10 удвоений популяции в течение 100 сут. При культивировании в присутствии 10 мМ карнозина клетки сделали на 2 удвоения больше за 130 сут от начала эксперимента. Клетки Ко-2 росли хуже и давали только три удвоения популяции за 80 сут. При культиви-

ровании в присутствии 10 мМ карнозина эти клетки прошли 4.6 удвоений популяции (рис. 2).

Более того, при культивировании фибробластов 1608 добавление карнозина на стадии уже состарившейся культуры (время удвоения популяции более 21 сут) вызывало восстановление роста клеток, которые в этих условиях делали еще одно удвоение популяции за 40 дней.

Следует обратить внимание на изменение морфологии клеток в присутствии карнозина (рис. 2). Клетки становились менее распластанными и более вытянутыми, т.е. похожими на молодые фибробласты. Таким образом, карнозин увеличивает пролиферативный потенциал трех видов фибробластоподобных клеток человека, одновременно приводя к эффекту морфологического омоложения.

Карнозин замедляет переход клеток в пролиферативный покой

Способность клеток переходить в состояние пролиферативного покоя при снижении концентрации факторов роста в среде является свойством диплоидных клеток. При изучении перехода клеток в состояние пролиферативного покоя обнаружено, что карнозин замедляет этот процесс. Если через 96 ч сывороточного голодания в контрольных клетках (без карнозина) митотические клетки не детектируются, то в присутствии 10 мМ карнозина они еще есть (рис. 3): 27 митозов в клетках 1608-hTERT и 10 в клетках 1608 в условиях пониженного парциального давления кислорода (4%) и 8 митотических клеток 1608-hTERT в условиях атмосферного кислорода (21%). Всего в трех независимых экспериментах проанализировано по 12 флаконов (T25) с карнозином и без него.

Таблица 1. Анализ сравнительного влияния карнозина (10 мМ) на колониеобразование различных клеток*

Клетки	1608hTERT, %	1608, %	BMSL, %	Ко-10, %
Число колоний	172 ± 17	102 ± 14	98 ± 11	92 ± 16
Средний размер колоний	200 ± 22	194 ± 23	165 ± 20	147 ± 18
Доля колоний, состоящих из одной клетки	53 ± 7	81 ± 8	71 ± 9	63 ± 8
Максимальный размер колоний	Увеличивается в 2 раза			

* Соответствующие показатели контроля приняты за 100%. Разбросы равны 1.96 SD.

Таблица 2. Зависимость стимуляции пролиферации клеток 1608 от концентрации карнозина

Концентрация карнозина, мМ	0	5	10	15	20	30
Суммарное число клеток, * (%)	100 ± 9.7	121 ± 12	186 ± 14	205 ± 12	161 ± 11	127 ± 9.4

* Разбросы равны 1.96 SD.

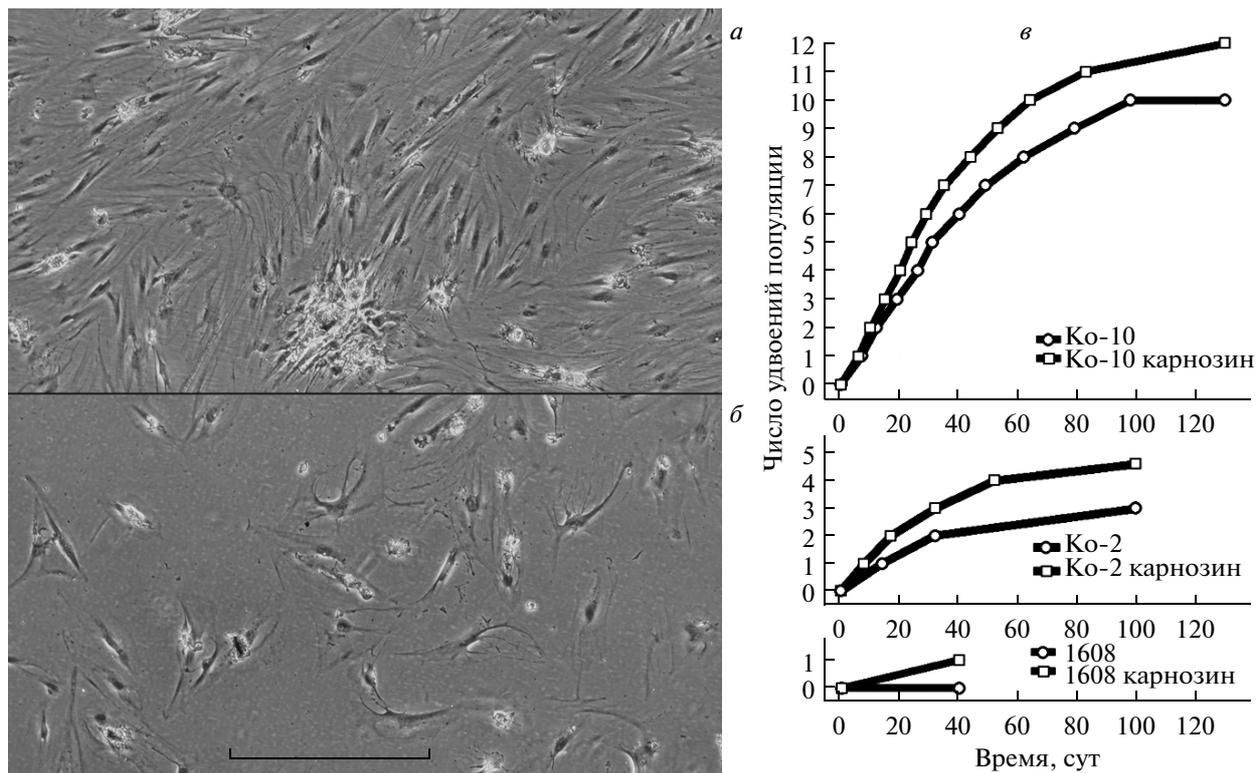


Рис. 2. Влияние карнозина на пролиферативный потенциал клеток человека. Конечная стадия культивирования клеток Ко-2: *а* – клетки, культивировавшиеся в присутствии 10 мМ карнозина около 100 сут (часть клеток сохраняет способность к делению); *б* – контроль (клетки терминально состарившиеся и неспособные к дальнейшим делениям). *в* – Кривые роста различных клеток в присутствии 10 мМ карнозина. Карнозин добавлен в нулевой точке. Масштаб 250 мкм.

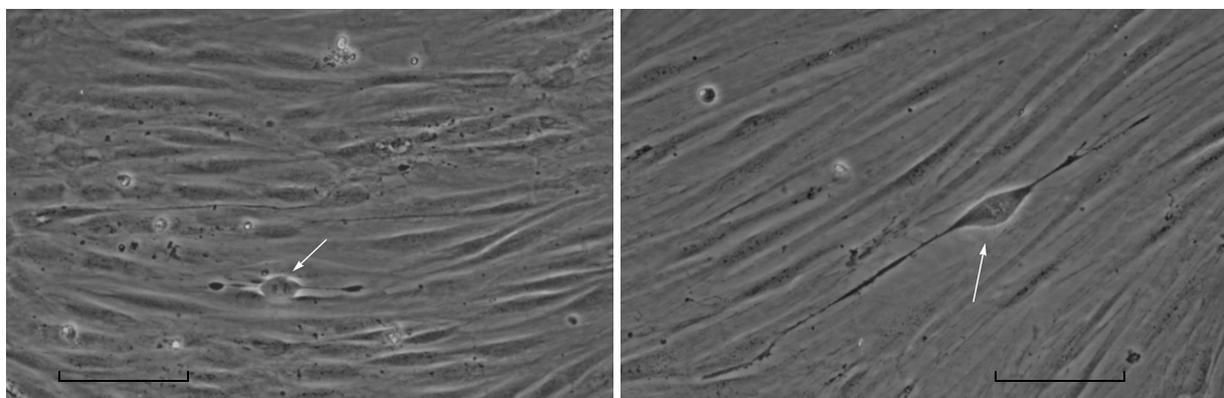


Рис. 3. Митотические клетки в присутствии карнозина через 96 ч сывороточного голодания (стрелки). Слева клетки 1608-hTERT, справа – 1608. Фазовый контраст. Цифровое контрастирование. Масштаб 100 мкм.

Замедление перехода клеток в покой при действии карнозина можно рассматривать как следствие стимулируемой им пролиферации.

Влияние карнозина на транскриптом клеток человека

В сущности, поведение любой клетки “задается” экспрессией ее генов. Транскриптомный анализ с помощью программы MetaCore с большой

достоверностью указывает на стимуляцию карнозином клеточного цикла (рис. 4). Из десяти наиболее значимых, обогащенных дифференциально экспрессируемыми генами процессов (Pathway Maps) девять относятся к стимуляции клеточного цикла на разных этапах. Один процесс описывает возрастание “задействованности” сигнального пути Wnt, что также относится к процессам роста и развития.

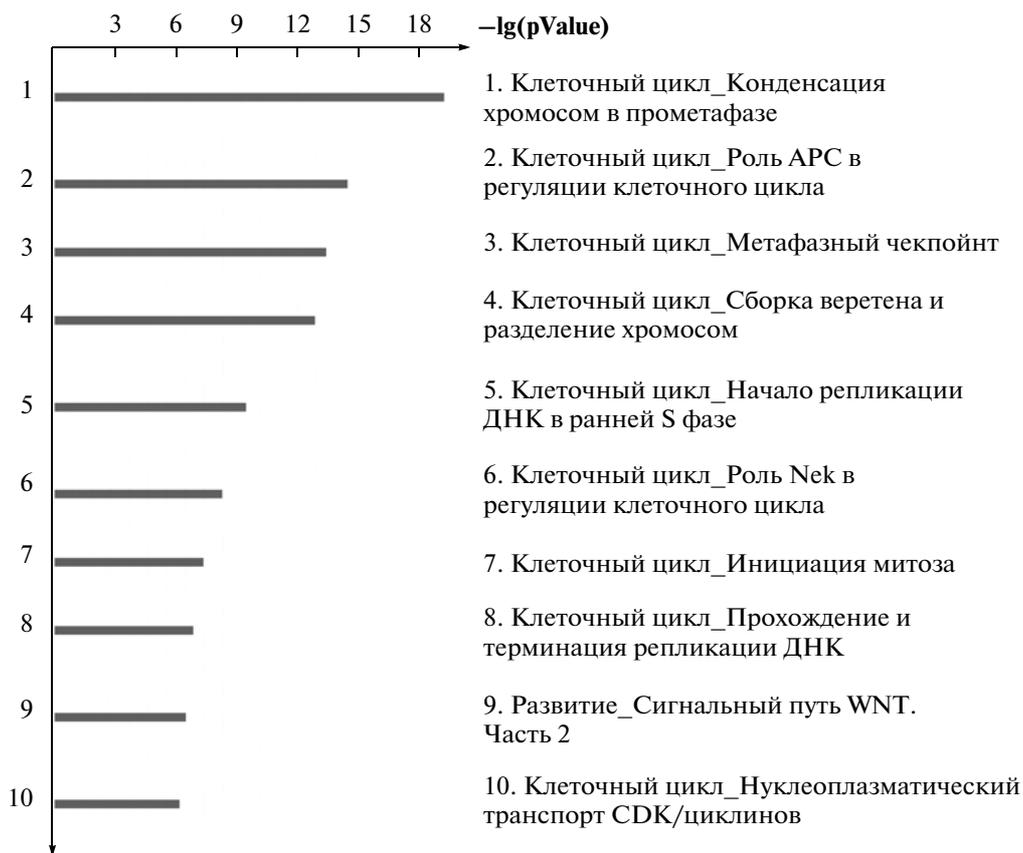


Рис. 4. Транскриптомный анализ влияния карнозина на клеточные процессы. Представлены наиболее значимые обогащенные дифференциально экспрессируемыми генами клеточные процессы (Pathway Maps).

При анализе сетей (Process Networks) самым значимым из обогащенных процессов оказался клеточный цикл: основа клеточного цикла [$-\lg(p\text{Value}) = 24$] и митоз [$-\lg(p\text{Value}) = 19$].

При анализе метаболических сетей (Metabolic Networks) выявлена активация сфингомиелинового пути [$-\lg(p\text{Value}) = 4$]; а анализ сущности процессов GO (GO Processes) вновь указал на клеточный цикл [$-\lg(p\text{Value}) = 56$].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Одно из хорошо известных свойств карнозина — это его антиоксидантная активность. И результаты, полученные в опытах по колониеобразованию, могут быть объяснены именно этим свойством карнозина. Так, по сравнению с клетками целостного организма, в клеточной культуре содержание кислорода повышено, и это может приводить к развитию окислительного стресса [49–51], а значит, к увеличению уровня повреждений, торможению пролиферации и уменьшению выживаемости клеток. Известно, что карнозин в использованных нами концентрациях способен, примерно на 20%, снижать концентрацию АФК в клетках *in vitro* [52], тем самым уменьшая риск развития окислитель-

ного стресса. Действительно, нами показано, что действие карнозина приводит к увеличению выживаемости (для клеток 1608-hTERT) и усилению пролиферации всех клеток. Нами не выявлено влияние карнозина на выживаемость большинства клеток — и это, по-видимому, связано с тем, что в условиях эксперимента большинство клеток выживало практически полностью, так что увеличения этого показателя зафиксировать не представлялось возможным.

С другой стороны, ранее нами показано, что карнозин стимулирует колониеобразование фибробластов человека при различных уровнях кислорода [46]: по сравнению с опытами, проводившимися при 21% кислорода (уровень атмосферного воздуха), при 5% кислорода (соответствует уровню кислорода в венозной крови) стимулирующий эффект карнозина хотя и уменьшается, но остается весьма значительным. Можно предположить, что в этом случае стимуляция карнозином пролиферации обусловлена не только его антиоксидантными свойствами. Известно, что активация MAPKs (митоген активируемых протеинкиназ, отвечающих за запуск пролиферации) происходит не только после активации рецепто-

ров факторов роста, но и при окислительном стрессе и в процессе воспаления [53, 54].

Нами выявлено, что карнозин увеличивает пролиферативный потенциал клеток (рис. 2). В настоящее время считают, что пролиферативный потенциал (предел Хейфлика) определяется укорачиванием теломер. И, действительно, про карнозин известно, что он замедляет укорачивание теломер [38].

На первый взгляд эта гипотеза вполне объясняет механизм действия карнозина на пролиферацию клеток, но она не объясняет способности карнозина влиять на уже состарившуюся культуру клеток, когда укорочение теломер уже произошло (рис. 2в). Похоже, в этом случае более логично предположить, что карнозин прямо стимулирует пролиферацию. Сходный результат, а именно, “быстрое” омолаживающее действие карнозина, проявляющееся в увеличении репликативной способности и в изменении морфологии клеток, описан МакФарландом еще в 1999 году [44].

Выявленное нами влияние карнозина на выход из клеточного цикла можно объяснить, с одной стороны, тем, что карнозин частично заменяет сыворотку и поэтому стимулирует пролиферацию; а с другой — его антиоксидантным действием (уменьшение вредного влияния АФК и соответствующее усиление пролиферации). Сама по себе сыворотка содержит антиоксиданты [55], в том числе ферменты антиоксидантной защиты [56], и ее удаление может вызывать стресс, а карнозин как антиоксидант его купирует и тем самым удлиняет динамику выхода из клеточного цикла. Кроме того, культуральная среда без сыворотки обычно содержит прооксиданты (в данном случае — нитрат железа), а сыворотка содержит трансферрин. Удаление трансферрина может увеличивать вероятность реакции Фентона и тем самым способствовать повышению концентрации АФК и развитию окислительного стресса.

Результаты транскриптомного анализа совершенно определенно показали, что основное действие карнозина заключается в стимуляции клеточного цикла. Девять из десяти самых активируемых путей относятся к различным составным частям механики клеточного цикла, начиная с инициации репликации ДНК, конденсации хромосом в прометафазе, начала митоза, транспорта циклинов и CDK, формирования веретена и т.д. (рис. 4).

Карнозин в концентрации, которая стимулирует пролиферацию, присутствует в организме человека лишь в мышечной и нервной ткани — так что его пролиферативное действие реализуется, скорее всего, только в этих тканях. Именно эти два типа тканей в основном состоят из неделящихся клеток и для них характерен самый сильный окислительный метаболизм. Можно предположить, что

в добавление к известным активностям по отношению к мышечной ткани [57] карнозин может способствовать регенераторному ответу, который развивается в мышечной ткани после чрезмерных нагрузок. Майер (Maier A.V.) и соавт. [58] изучали влияние карнозина (20 мМ) на пролиферацию клонов скелетных миобластов человека. Показано стимулирующее действие на пролиферацию вместе со снижением экспрессии ассоциированной со старением β -галактозидазы.

Итак, из результатов, полученных нами в четырех экспериментальных подходах, следует, что карнозин стимулирует пролиферацию нормальных (неопухольных) клеток человека. Скорее всего, именно эта способность карнозина и обуславливает присущее ему “омолаживающее” действие. Можно предположить, что высокие концентрации карнозина в мышечной ткани необходимы не только для обеспечения физиологических условий среды (выполняет роль буфера), но и для регенерации мышц после чрезмерных нагрузок.

Таким образом, полученные результаты опровергают достаточно распространенное в современной литературе мнение об “общей” антипролиферативной активности карнозина [59–62] и могут стать базой для исследования карнозина в прикладных целях.

Авторы выражают благодарность А.А. Докторову, С.М. Терехову и Э.Б. Дашинимaeву за предоставленные клетки.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (гранты №№ 13-04-01178 и 12-04-33094). Часть экспериментов выполнена на приборной базе ЦКП “ГЕНОМ” ИМБ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gulewitsch W.S., Amiradzibi S. 1900. Uber das carnosin, eine neue organische base des fleischextraktes. *Ber. Deutsch Chem. Ges.* **33**, 1902–1903.
2. Aldini G., Facino R.M., Beretta G., Carini M. 2005. Carnosine and related dipeptides as quenchers of reactive carbonyl species: from structural studies to therapeutic perspectives. *Biofactors*. **24**, 77–87.
3. Severin S.E. 1964. Problems concerned with the biological activity of naturally occurring imidazole compounds. *Proc. 7th Int. Biochem. Cong.* N.Y., p. 45–61.
4. Boldyrev A.A., Severin S.E. 1990. The histidine-containing dipeptides, carnosine and anserine: distribution, properties and biological significance. *Adv. Enzyme Regul.* **30**, 175–194.
5. Quinn P.J., Boldyrev A.A., Formazuyk V.E. 1992. Carnosine: Its properties, functions and potential therapeutic applications. *Mol. Aspects Med.* **13**, 379–444.
6. Teuscher N.S., Shen H., Shu C., Xiang J., Keep R.F., Smith D.E. 2004. Carnosine uptake in rat choroids plexus primary cell cultures and choroids plexus whole tissue from PEPT2 null mice. *J. Neurochem.* **89**, 375–382.

7. Lenney J.F. 1976. Specificity and distribution of mammalian carnosinase. *Biochim. Biophys. Acta.* **429**, 214–219.
8. Jackson M.C., Kucera C.M., Lenney J.F. 1991. Purification and properties of human serum carnosinase. *Clin. Chim. Acta.* **196**, 193–205.
9. Lenney J.F. 1990. Separation and characterization of two carnosine-splitting cytosolic dipeptidases from hog kidney (carnosinase and non-specific dipeptidase). *Biol. Chem. Hoppe Seyler.* **371**, 433–440.
10. Kunze N., Kleinkauf H., Bauer K. 1986. Characterization of two carnosine-degrading enzymes from rat brain. Partial purification and characterization of a carnosinase and a beta-alanyl-arginine hydrolase. *Eur. J. Biochem.* **160**, 605–613.
11. Jones G.A., Harris R.C., Nixey C. 2007. Distribution of the histidine-containing dipeptides, anserine and carnosine, within turkey muscle. In: *10th International Congress on Amino Acids and Proteins (ICAAP)*, Kallithea, Greece, vol. **33**, pLII abstract.
12. Sale C., Artioli G.G., Gualano B., Saunders B., Hobson R.M., Harris R.C. 2013. Carnosine: from exercise performance to health. *Amino Acids.* **44**, 1477–1491.
13. de Marchis S., Modena C., Peretto P., Migheli A., Margolis F.L., Fasalo A. 2000. Carnosine-related dipeptides in neurons and glia. *Biochemistry.* **65**, 824–833.
14. Huang Y., Duan J., Chen H., Chen M., Chen G. 2005. Separation and determination of carnosine-related peptides using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis.* **26**, 593–599.
15. Holliday R., McFarland G.A. 1996. Inhibition of the growth of transformed and neoplastic cells by the dipeptide carnosine. *Br. J. Cancer.* **73**, 966–971.
16. Babizhayev M.A., Yegorov Y.E. 2010. Therapeutic uses of drug carrier systems for imidazole-containing dipeptide compounds which act as pharmacological chaperones and have significant impact on the treatment of chronic diseases associated with increased oxidative stress and the formation of advanced glycation end products. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **27**, 85–154.
17. Temperini C., Scozzafava A., Puccetti L., Supuran C. 2005. Carbonic anhydrase activators: X-ray crystal structure of the adduct of human isozyme II with histidine as a platform for the design of stronger activators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**, 5136–5141.
18. Aldini G., Facino R.M., Beretta G., Carini M. 2005. Carnosine and related dipeptides as quenchers of reactive carbonyl species: from structural studies to therapeutic perspectives. *Biofactors.* **24**, 77–87.
19. Orioli M., Aldini G., Beretta G., Facino R.M., Carini M. 2005. LC-ESI-MS/MS determination of 4-hydroxy-trans-2-nonenal Michael adducts with cysteine and histidine-containing peptides as early markers of oxidative stress in excitable tissues. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **827**, 109–118.
20. Rashid I., van Reyk D.M., Davies M.J. 2007. Carnosine and its constituents inhibit glycation of low-density lipoproteins that promotes foam cell formation *in vitro*. *FEBS Lett.* **581**, 1067–1070.
21. Torreggiani A., Trincherio A., Tamba M., Fini G. 2003. Vibrational characterisation and biological activity of carnosine and its metal complexes. *Ital. J. Biochem.* **52**, 87–97.
22. Баран Е.Ж. 2000. Комплексы металлов с карнозином. *Биохимия.* **65**, 928–937.
23. Cho C.H., Luk C.T., Ogle C.W. 1991. The membrane-stabilizing action of zinc carnosine (Z-103) in stress-induced gastric ulceration in rats. *Life Sci.* **49**, PL189–194.
24. Yoshikawa T., Naito Y., Tanigawa T., Yoneta T., Kondo M. 1991. The antioxidant properties of a novel zinc-carnosine chelate compound, N-(3-aminopropionyl)-L-histidinato zinc. *Biochim. Biophys. Acta.* **1115**, 15–22.
25. Babizhayev M.A., Seguin M.C., Gueyne J., Evstigneeva R.P., Ageyeva E.A., Zheltukhina G.A. 1994. L-carnosine (beta-alanyl-L-histidine) and carbinine (beta-alanylhistamine) act as natural antioxidants with hydroxyl-radical-scavenging and lipid-peroxidase activities. *Biochem. J.* **304**, 509–516.
26. Seiki M., Aita H., Ueki S., Yoneta T., Takemasa T., Hori Y., Morita H., Chaki K, Tagashira E. 1992. [Effect of Z-103 on wound healing by dermal incision in guinea pigs]. [Article in Japanese] *Nihon Yakurigaku Zasshi.* **100**, 165–172.
27. Матсакура Т., Танака Х. 2000. Применение комплексов L-карнозин–цинк для медицинских целей. *Биохимия.* **65**, 961–968.
28. Dobrota D., Fedorova T., Stvolinsky S.L., Babusikova E., Likavcanova K., Drgova A., Strapkova A., Boldyrev A.A. 2005. Carnosine protects the brain of rats and Mongolian gerbils against ischemic injury: After-stroke-effect. *Neurochem. Res.* **30**, 1283–1288.
29. Zaloga G.P., Siddiqui R.A. 2004. Biologically active dietary peptides. *Mini Rev. Med. Chem.* **4**, 815–821.
30. Babizhayev M.A., Yegorov Y.E. 2010. Telomere attrition in lens epithelial cells a target for N-acetylcarnosine therapy. *Front. Biosci.* **15**, 934–956.
31. Babizhayev M.A., Yegorov Y.E. 2011. Senescent phenotype of trabecular meshwork cells displays biomarkers in primary open-angle glaucoma. *Curr. Mol. Med.* **11**, 528–552.
32. Babizhayev M.A., Deyev A.I., Yegorov Y.E. 2011. Olfactory dysfunction and cognitive impairment in age-related neurodegeneration: prevalence related to patient selection, diagnostic criteria and therapeutic treatment of aged clients receiving clinical neurology and community-based care. *Curr. Clin. Pharmacol.* **6**, 236–259.
33. Babizhayev M.A., Lankin V.Z., Savel'yeva E.L., Deyev A.I., Yegorov Y.E. 2013. Diabetes mellitus: novel insights, analysis and interpretation of pathophysiology and complications management with imidazole-containing peptidomimetic antioxidants. *Recent. Pat. Drug Deliv. Formul.* **7**, 216–256.
34. Boldyrev A., Stvolisky S.L., Tyulina O.V., Koshelev V.B., Hori N., Carpenter D.O. 1997. Biochemical and physiological evidence that carnosine is an endogenous neuroprotector against free radicals. *Cell. Mol. Neurobiol.* **17**, 259–271.
35. Boldyrev A.A., Abe H., Stvolinsky S. 1995. Effects of carnosine and related compounds on generation of free oxygen species: a comparative study. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **112**, 481–485.

36. Boldyrev A., Song R., Lawrence D., Carpenter D.O. 1999. Carnosine protects against excitotoxic cell death independently of effects on reactive oxygen species. *Neuroscience*. **94**, 571–577.
37. Boldyrev A.A., Fedorova T., Stepanova M., Dobrolvorskaya I., Kozlova E., Boldanova N., Bagyeva G., Ivanova-Smolenskaya I., Illarioshkin S. 2008. Carnosine increases efficiency of DOPA therapy of Parkinson's disease: a pilot study. *Rejuvenation Res.* **11**, 821–827.
38. Shao L., Li Q.H., Tan Z.M. 2004. L-carnosine reduces telomere damage and shortening rate in cultured normal fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **324**, 931–936.
39. Babizhayev M.A. 2011. Mitochondria induce oxidative stress, generation of reactive oxygen species and redox state unbalance of the eye lens leading to human cataract formation: disruption of redox lens organization by phospholipid hydroperoxides as a common basis for cataract disease. *Cell Biochem. Funct.* **29**, 183–206.
40. Babizhayev M.A. 2011. Designation of imidazole-containing dipeptides as pharmacological chaperones. *Hum. Exp. Toxicol.* **30**, 736–761.
41. Boldyrev A.A., Dupin A.M., Bunin A.Ya., Babizhayev M.A., Severin S.E. 1987. The antioxidative properties of carnosine, a natural histidine containing dipeptide. *Biochem. Int.* **15**, 1105–1113.
42. Corona C., Frazzini V., Silvestri E., Lattanzio R., La Sorda R., Piantelli M., Canzoniero L.M., Ciavardelli D., Rizzarelli E., Sensi S.L. 2011. Effects of dietary supplementation of carnosine on mitochondrial dysfunction, amyloid pathology, and cognitive deficits in 3xTg-AD mice. *PLoS One*. **6**, e17971. doi: 10.1371/journal.pone.0017971.
43. McFarland G.A., Holliday R. 1994. Retardation of senescence in cultured human diploid fibroblasts by carnosine. *Exp. Cell Res.* **212**, 167–175.
44. McFarland G.A., Holliday R. 1999. Further evidence for the rejuvenating effects of the dipeptide L-carnosine on cultured diploid fibroblasts. *Exp. Gerontol.* **34**, 35–45.
45. Yuneva A.O., Kramarenko G., Vetreshchak T.V. 2002. Effect of carnosine on *Drosophila melanogaster* lifespan. *Bull. Exp. Biol. Med.* **133**, 559–561.
46. Егоров Е.Е., Молдавер М.В., Вишнякова Х.С., Терехов С.М., Дашинимаев Э.Б., Чеглаков И.Б., Горопыгин И.Ю., Ярыгин К.Н., Чумаков П.М., Корочкин Л.И., Антонова Г.А., Рыбалкина Е.Ю., Сабурин И.Н., Бурнаевский Н.С., Зеленин А.В. 2007. Усиление контроля пролиферации в теломеризованных клетках. *Онтогенез*. **38**, 105–119.
47. Бурнаевский Н.С., Вишнякова Х.С., Сафенина А.В., Рыбалко Д.В., Попов К.В., Егоров Е.Е. 2010. Влияние парциального давления кислорода на эффективность колониеобразования и дифференцировки мезенхимальных стромальных клеток человека, полученных из различных источников. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. **5**, 24–30
48. Moldaver M.V., Yegorov Y.E. 2009. Sparse plating increases the heterogeneity of proliferative potential of fibroblasts. *Mech. Ageing Dev.* **130**, 337–342.
49. Halliwell B. 2003. Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem? *FEBS Lett.* **540**, 3–6.
50. Wright W.E., Shay J.W. 2002. Historical claims and current interpretations of replicative aging. *Nat. Biotechnol.* **20**, 682–688.
51. Von Zglinicki T. 2002. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biol. Sci.* **27**, 339–344.
52. Iovine B., Iannella M.L., Nocella F., Pricolo M.R., Bevilacqua M.A. 2012. Carnosine inhibits KRAS-mediated HCT116 proliferation by affecting ATP and ROS production. *Cancer Lett.* **315**, 122–128.
53. Jiang F., Zhang Y., Disting G.J. 2011. NADPH oxidase-mediated redox signaling: roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair. *Pharmacol. Rev.* **63**, 218–242.
54. Kyriakis J.M., Avruch J. 2001. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol. Rev.* **81**, 807–869.
55. Boehm J.K., Williams D.R., Rimm E.B., Ryff C., Kubzansky L.D. 2013. Association between optimism and serum antioxidants in the midlife in the United States study. *Psychosom. Med.* **75**, 2–10.
56. Fukuoka T., Folz R.J., Landmesser U., Harrison D.G. 2002. Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovascular Res.* **55**, 239–249.
57. Sale C., Artioli G.G., Gualano B., Saunders B., Hobson R.M., Harris R.C. 2013. Carnosine: from exercise performance to health. *Amino Acids*. **44**, 1477–1491.
58. Maier A.B., Cohen R., Blom J., van Heemst D., Westendorp R.G.J. 2012. Marked heterogeneity in growth characteristics of myoblast clonal cultures and myoblast mixed cultures obtained from the same individual. *Gerontology*. **58**, 150–155.
59. Рыбакова Ю.С., Болдырев А.А. 2012. Влияние карнозина и родственных соединений на пролиферацию клеток культуры феохромоцитомы крысы РС-12. *Клеточные технологии в биологии и медицине*. № 3, 143–147.
60. Hipkiss A.R., Gaunitz F. 2014. Inhibition of tumour cell growth by carnosine: some possible mechanisms. *Amino Acids*. **46**, 327–337.
61. Zhang Z., Miao L., Wu X., Liu G., Peng Y., Xin X., Jiao B., Kong X. 2014. Carnosine inhibits the proliferation of human gastric carcinoma cells by retarding Akt/mTOR/p70S6K signaling. *J. Cancer*. **5**, 382–389.
62. Iovine B., Oliviero G., Garofalo M., Orefice M., Nocella F., Borbone N., Piccialli V., Centore R., Mazonzone M., Piccialli G., Bevilacqua M.A. 2014. The anti-proliferative effect of L-carnosine correlates with a decreased expression of hypoxia inducible factor 1 alpha in human colon cancer cells. *PLoS ONE*. **9**(5): e96755.