

УДК 576.312.6

**ПОГОНЯ ЗА КЛЕТОЧНЫМ БЕССМЕРТИЕМ, ТЕЛОМЕРЫ,
ТЕЛОМЕРАЗА И МЕРА ЗДОРОВЬЯ
(размышления в связи с присуждением Алексею Матвеевичу Оловникову
Демидовской премии в области биологии за 2009 год)**

© 2011 г. Е. Е. Егоров, А. В. Зеленин

*Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991 Москва, ул. Вавилова, д. 32
E-mail: azel@eimb.ru*

Поступила в редакцию 15.07.10 г.

Присуждение А.М.Оловникову Демидовской премии — важное событие для отечественной биологической науки в целом и для журнала “Онтогенез”, в частности.

Значение этого события для российской науки обусловлено широким признанием работы А.М. Оловникова мировым научным сообществом, значение для нашего журнала — тем, что он — многолетний член его Редакционной коллегии, своей активной работой способствующий успехам журнала.

Незаурядность разбираемого события связана также с тем, что оно в некоторой степени явилось “российским ответом” на присуждение Нобелевской премии группе американских ученых за достижения в исследовании теломер и теломеразы.

Это решение Нобелевского комитета широко обсуждалось в России в научных и совсем ненаучных кругах. Многие ученые высказывали недоумение по поводу того, что Оловников не оказался в числе лауреатов этой сверхпрестижной премии. В ненаучных или околонуучных кругах по этому поводу шутили, причем не всегда доброжелательно.

Вряд ли имеет смысл обсуждать мотивы и обоснованность решений Нобелевского комитета, хотя к этому вопросу мы еще вернемся. Следует рассмотреть суть работы Оловникова.

Согласно решению Демидовского комитета, премия Оловникову присуждена за цикл теоретических работ, в которых впервые в мире было предсказано укорочение хромосом при старении, описан эффект концевой недорепликации линейных молекул ДНК и, кроме того, предсказано существование теломеразы как фермента, компенсирующего укорочение теломер (концевых участков хромосом).

Если бросить ретроспективный взгляд на проведение этих исследований то, безусловно, можно выделить двух человек, вклад которых явно недооценен мировым научным сообществом. Это Леонард Хейфлик и Алексей Оловников.

Работа Хейфлика 1961 года (Hayflick, Moorhead, 1961) до сих пор одна из самых цитируемых в биологии. Она не только выявила до того неизвестный факт, но пробудила творческую энергию многих ученых в попытках объяснения, того, каким образом клетки подсчитывают свои деления. Хэйфлик, в результате многолетней работы, показал, что клетки человека делятся в культуре лишь ограниченное число раз, после чего сначала перестают делиться, а потом погибают. Хейfliку с большим трудом удалось опубликовать свои результаты. Рассказывая об истории своего открытия на совещании, посвященном теломерам и теломеразе (“Telomeres and telomerase: implications for cell immortality, cancer and related diseases”, Redwood City, CA, June 1–3, 1998) в Редвуд Сити в июне 1998 года Хейфлик упомянул о том, что когда его статья попала на рецензию к будущему Нобелевскому лауреату Пейтону Раусу (открывателю саркомы Рауса), тот отверг ее. В общественном мнении того времени господствовало убеждение, что в руках умелого исследователя клетки бессмертны, т.е. число их делений не ограничено. Оно было основано на непререкаемом авторитете Нобелевского лауреата Алексиса Карреля, который в начале двадцатого века убедил широкие массы исследователей в том, что клетки можно перевивать десятилетиями (Carrel, 1912).

Статья Хэйфлика получила большой общественный резонанс. Возникло и вошло в словари понятие “предел Хейфлика”. Основную роль в процессе “заинтересовывания” широких масс сыграла не сама статья, а ее бесчисленные комментарии, упростившие предел числа репликативных событий до пресловутых 50-ти делений, будто бы свойственных клеткам человека, хотя непосредственно в статье были приведены многочисленные данные о количестве удвоений популяции клеток человека варьирующие от 30 до 70. Возникли теории старения, связанные с ограниченной способностью клеток делиться (Comfort, 1964). Было показано, что коли-

чество делений клеток в культуре обратно коррелирует с возрастом донора клеток; клетки короткоживущих видов делятся в культуре меньшее число раз, чем долгоживущих и т.п.

После появления работ Хейфлика все клеточные культуры оказалось возможным разделить на две группы: с ограниченным пролиферативным потенциалом (смертные или мортальные) и бессмертные (иммортальные). К первой группе можно отнести клетки первичных культур человека, в вторую группу в основном составляют клетки перевиваемых опухолей. Однако оставался открытым вопрос, насколько такая классификация зависит от условий культивирования. Всегда можно было предположить, что какое-либо новое усовершенствование техники культивирования снимет ограничения пролиферативного потенциала, и клетки мортальные станут иммортальными. Для окончательного подтверждения этой классификации требовался фактический материал, объясняющий механизмы ограничения пролиферативного потенциала.

Помимо установления факта ограничения пролиферативного потенциала, опыты Хейфлика показали, что в ряде клеток (например, взятых из организма человека) существует некий счетчик, определяющий общее количество делений, отпущенных данной клетке. Однако природа этого счетчика оставалась непонятной.

Чрезвычайно важным этапом в процессе изучения закономерностей размножения клеток стала работа Оловникова, в кратком виде опубликованная на русском языке в 1971 года в Докладах Академии наук СССР (Оловников, 1971), а двумя годами позже в развернутом виде на английском языке в международном журнале теоретической биологии (Olovnikov, 1973), которую можно расценить как попытку молекулярного объяснения эффекта Хейфлика. Оловников предложил принцип работы счетчика делений. Его поистине провидческая гипотеза основывалась на том обстоятельстве, что при матричном синтезе любого линейного полинуклеотида (в частности хромосомы) каждая возникшая копия должна быть короче предыдущей, и что с этим связано ограничение количества клеточных делений, возможность которых исчерпывается тогда, когда достигается критическое укорочение молекулы ДНК. Почти одновременно с Оловниковым на феномен концевой недореплекации ДНК при ее удвоении обратил внимание Джеймс Уотсон (Watson, 1972), однако он не связал это явление с регуляцией пролиферации клеток. Вторым выдающимся предвидением Оловникова было предсказание существования специального фермента, удлиняющего концы хромосом в "бессмертных" (неограниченно пролиферирующих) клетках.

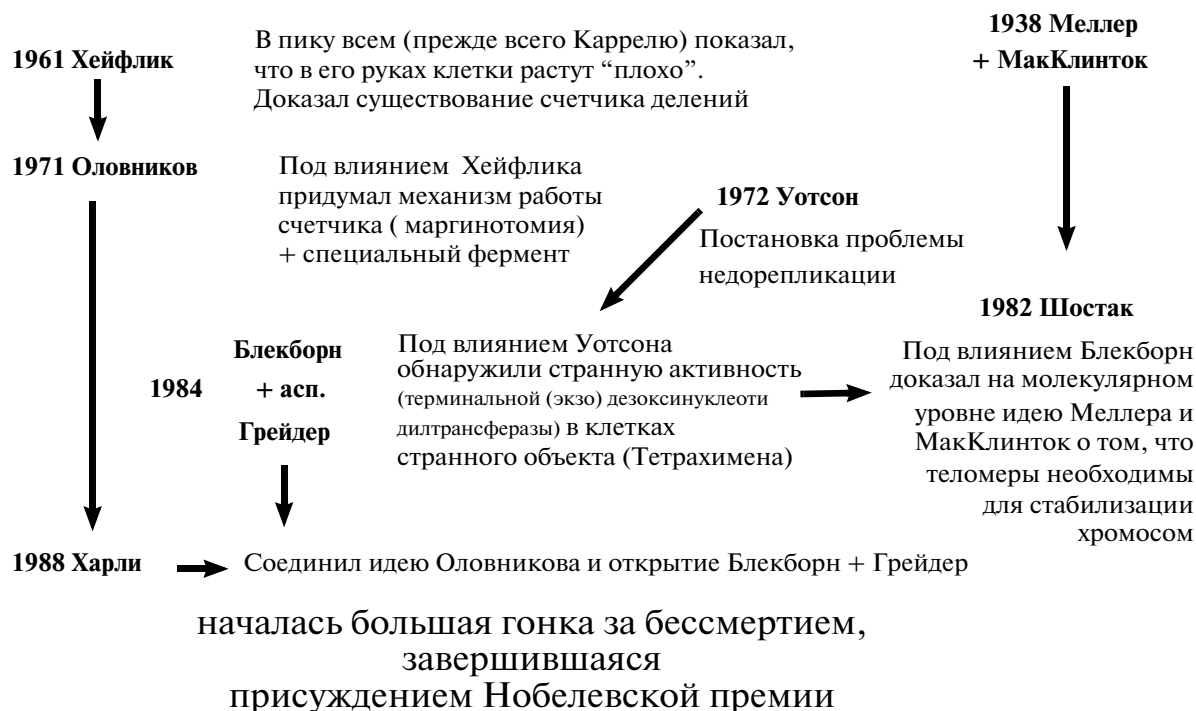
Исследования Блекборн, Грейдер и Шостака, которые удостоились Нобелевской премии, поначалу были разнонаправленными и объясняли различные феномены. Блекборн, изучая нуклеотидные последовательности на концах хромосом (в теломерах), предполагала, что эти странные теломерные последовательности, возможно, имеют какой-то особый механизм репликации, который и был открыт (при участии ее аспирантки Грейдер) в 1984 г. (Greider, Blackburn, 1985). Независимо от это Блекборн и Шостак нашли молекулярные подтверждения идей Меллера и МакКлинток 1938 г. (McClintock, 1938; Muller, 1938) о необходимости теломер для стабилизации хромосом (Szostak, Blackburn, 1982).

Но только в 1988 г., когда идея Оловникова соединилась с находками Блекборн-Грейдер, начался стремительный рывок в этом направлении науки. Сами Нобелевские лауреаты Блекборн и Грейдер так описывают эти события: "Мы не знали об идеях Оловникова до 1988 года, когда Кальвин Харли рассказал о них Грейдер. Заинтригованные, Грейдер, Харли и их коллеги решили выяснить, не происходит ли со временем укорочение хромосом в клетках человека" ("We were unaware of Olovnikov's ideas until 1988, when Calvin B. Harley, then at McMaster University, brought them to Greider's attention. Intrigued, Greider, Harley and their collaborators decided to see if chromosomes do get shorter in human cells over time") (Greider, Blackburn, 1996).

Схематически хронология этих событий представлена на схеме (рис. 1).

Уже в следующем 1989 году теломераза была обнаружена в клетках человека (Morin, 1989) и было обнаружено изменение длины теломер человека в процессе развития (Cross et al., 1989). Через год было выявлено укорочение теломер при старении клеток (Harley et al., 1990) и в США, прежде всего, для изучения теломеразы, была создана корпорация Герон (Geron), объединившая многих первоклассных ученых. В 1994 г. в корпорации был разработан чувствительный метод для детекции теломеразной активности (Kim et al., 1994) и, наконец, в 1998 г. было доказано, что индуцированная путем введения гена экспрессия теломеразы ведет к иммортализации клеток (Bodnar et al., 1998; Vaziri, Benchimol, 1998).

Необходимо отметить, что соматические клетки человека, в подавляющем большинстве лишены теломеразной активности. В результате генно-инженерного внедрения активного фермента теломеры клеток начинают удлиняться, и клетки обретают способность делиться в культуре неопределенно долго, многократно превосходя предел Хейфлика. Такие клетки получили название теломеризованных. Они имеют большой потенциал применения в



Взаимосвязь открытий в области теломер и теломеразы.

биотехнологии и медицине, поскольку, несмотря на снятие ограничений на пролиферацию, сама регуляция клеточных делений в них не изменяется. Однако, на использование таких клеток накладывает ограничение тот факт, что активация теломеразы является одним из этапов канцерогенеза, и поэтому требуются дальнейшие исследования для определения возможных рисков с этим связанных (Егоров, 1997).

Возвращаясь к Оловникову, можно утверждать, что его выдающееся предвидение 1971 г., не осталось на страницах никому не интересных журналов, а наоборот: идея непосредственно участвовала во всемирном научном процессе (рисунок), давшем прекрасный результат, удостоенный Нобелевской премии. И этот факт навсегда останется в истории науки.

Помимо всем известной работы Оловникова 1971 г., имеется и другая, весьма важная работа, значение которой начинает осознаваться только сейчас (Оловников, 1992).

В этой работе предсказано (опять!), что помимо феномена концевой недорепликации имеется еще и концевая недорепарация, которая точно так же способна укорачивать теломеры, но при этом может быть не связана с делением клетки. По прошествии нескольких лет факт недорепарации был экспериментально показан в работах фон Жглиницкого (von Zglinicki et al., 1995; Petersen et al., 1998). В работе 2000 г. фон Жглиницкий утверждает, что накопление

разрывов ДНК является главной (!) причиной укорачивания теломер.

Если посмотреть на проблему с высоты сегодняшнего дня, то можно утверждать, что недорепарация теломер действительно играет более важную роль, чем их недорепликация. Если недорепликация теломер вызывает так называемое репликативное старение и касается только делящихся клеток, то недорепарация “преследует” все клетки в организме на протяжении всей жизни человека. И именно недорепарация лежит в основе связи длины теломер с разнообразными патологиями и позволяет рассматривать длину теломер как универсальную меру здоровья.

Ряд наблюдений демонстрирует наличие такой зависимости.

В зонах атеросклеротических повреждений клетки эндотелия аорты имеют укороченные теломеры (Okuda et al., 2000). Также при болезнях коронарных сосудов теломеры эндотелиальных клеток становятся существенно короче (Ogami et al., 2004). Ряд случаев диабета 2-го типа объясняют старением и недостаточностью пролиферации бета-клеток (Yoon et al., 2003). Поседение волос объясняют старением меланобластов (Nishimura et al., 2005), помутнение хрусталика — старением эпителиальных клеток хрусталика (Babizhayev, Yegorov, 2010). Возрастные нарушения иммунной системы объясняют старением стволовых гематопоэтических клеток и т.д. В список таких теломер-связанных патологий при желании

можно включить фактически все болезни, связанные с возрастом.

Практически все патологии, так или иначе, связаны с развитием окислительного стресса и воспалительных реакций. Окислительный стресс может иметь локальный характер, но он способен распространяться практически по всему организму. Результатом может оказаться чрезмерное укорачивание теломер, которое на каком-то этапе становится не только следствием патологии, но и ее движущей силой, препятствующей клеточному размножению, а значит регенерации (Егоров, 2009). Известно, что теломеры клеток периферической крови укорачиваются с возрастом. Но также известно, что они преждевременно укорачиваются у пациентов с инфарктом миокарда, с развитым атеросклерозом, с болезнью Алцгеймера, с васкулярной деменцией, при развитии солидных опухолей, при действии эмоционального стресса (von Zglinicki, Martin-Ruiz, 2005), при курении (Babizhayev et al., 2010), при избыточном весе (Valdes et al., 2005). Длина теломер в клетках периферической крови имеет четкую корреляцию с прогнозом восстановления после инсульта (Martin-Ruiz et al., 2006).

В определенных рамках можно утверждать, что длина теломер может служить мерой здоровья человека. Соответственно, изменения длины теломер могут отражать эффективность предложенной терапии. А первым о недорепарации теломер заявил Оловников!

И, наконец, сравнительно недавно Алексей Матвеевич опубликовал свою новую, редуомную теорию старения (Оловников, 2003). На одной научной конференции, после прослушивания доклада Оловникова известный американский ученый (Dr. Michael West) сказал: “Ну что же, проживем еще 30 лет и узнаем правду”.

Обсуждать мотивы Нобелевского комитета, избравшего именно экспериментальные работы по теломерам и теломеразе объектом своего благосклонного внимания просто бессмысленно, тем более, что обоснованность и объективность решений этого сонма научных светил широко обсуждаются в печати почти ежегодно. Но из сказанного, очевидно, что Демидовскую премию Оловников действительно заслужил.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Егоров Е.Е. Теломеразы, старение, рак // Молекулярная биология. 1997. Т. 31. С. 16–25.
- Егоров Е.Е. Теломеры, теломеразы и стволовые клетки в механизмах патологии человека. В книге “Биология стволовых клеток и клеточные технологии”, под ред. акад. Пальцева, изд-во “Медицина”, Москва, С. 233–272. 2009, ISBN 5-225-03376-8.
- Оловников А.М. Принцип маргинотомии в матричном синтезе полинуклеотидов // Доклады АН СССР. 1971. Т. 201. С. 1496–1499.
- Оловников А.М. Старение является результатом укорочения “дифферотены” в теломерах благодаря концевой недорепликации и недорепарации ДНК // Известия АН СССР, серия биологическая. 1992. Т. 4. С. 641–643.
- Оловников А.М. Редуомная гипотеза старения и контроль биологического времени в процессе индивидуального развития // Биохимия. 2003. Т. 68. С. 2–33.
- Babizhayev M.A., Savel'yeva E.L., Moskvina S.N., Yegorov Y.E. Telomere length is a biomarker of cumulative oxidative stress, biological age and an independent predictor of survival and therapeutic treatment requirement associated with smoking behavior // Amer. J. Therap. 2010 (in press).
- Babizhayev M.A., Yegorov Y.E. Telomere attrition in lens epithelial cells – a target for N-acetylcarnosine therapy // Frontiers Biosciences. 2010. V. 15. P. 934–956.
- Bodnar A.G., Ouellette M., Frolkis M. et al. Extension of lifespan by introduction of telomerase into normal human cells // Science. 1998. V. 279. P. 349–352.
- Carrel A. On the permanent life of tissues outside of the organism // J. Exp. Med. 1912. V. 15. P. 516–528.
- Comfort A. Ageing, the biology of senescence. Holt, Rinehart and Winston, New York, 1964, 365p.
- Cross S.H., Allshire R.C., McKay S.J. et al. Cloning of human telomeres by complementation in yeast // Nature. 1989. V. 338. P. 771–774.
- Greider C.W., Blackburn E.H. // Cell. 1985. V. 43. P. 405–413.
- Greider C.W., Blackburn E.H. Telomeres, telomerase and cancer // Sci. Amer. 1996. V. 274. P. 92–97.
- Harley C.B., Futcher A.B., Greider C.W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts // Nature. 1990. V. 345. P. 458–460.
- Hayflick L., Moorhead P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains // Exp. Cell Res., 1961, V. 25. P. 585–621.
- Kim N.W., Piatyszek M.A., Prowse K.R. et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer // Science. 1994. V. 266. P. 2011–2014.
- Martin-Ruiz C., Dickinson H.O., Keys B. et al. Telomere length predicts poststroke mortality, dementia, and cognitive decline // Ann. Neurol. 2006. V. 60. P. 174–180.
- McClintock B. The fusion of broken ends of sister half-chromatids following chromatid breakage at meiotic anaphases. // Missouri Agric. Exp. Sta. Res. Bull. 1938. V. 290. P. 1–48.
- Morin G.B. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats // Cell. 1989. V. 59. P. 521–529.
- Muller H.J. The remaking of chromosomes // The Collecting Net. 1938. V. 8. P. 182–195.
- Nishimura E.K., Granter S.R., Fisher D.E. Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche // Science. 2005. V. 307. P. 720–724.
- Ogami M., Ikura Y., Ohsawa M. et al. Telomere shortening in human coronary artery diseases // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2004. V. 3. P. 546–550.
- Okuda K., Khan M.Y., Skurnick J. et al. Telomere attrition of the human abdominal aorta: relationships with age and atherosclerosis // Atherosclerosis. 2000. V. 152. P. 391–398.
- 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. 1973. V. 41. P. 181–190.

- Petersen S., Saretzki G., von Zglinicki T.* Preferential accumulation of single-stranded regions in telomeres of human fibroblasts // *Exp Cell Res.* 1998. V. 239. P. 152–160.
- Szostak J.W., Blackburn E.H.* Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors // *Cell.* 1982. V. 29. P. 245–255.
- Valdes A.M., Andrew T., Gardner J.P. et al.* Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women // *Lancet.* 2005. V. 366. P. 662–664.
- Vaziri H., Benchimol S.* Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span // *Current Biology.* 1998. V. 8. P. 279–282.
- von Zglinicki T., Saretzki G., Döcke W., Lotze C.* Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? // *Exp Cell Res.* 1995. V. 220. P. 186–193.
- von Zglinicki T., Pilger R., Sitte N.* Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts // *Free Radic. Biol. Med.* 2000. V. 28. P. 64–74.
- von Zglinicki T., Martin-Ruiz C.M.* Telomeres as biomarkers for ageing and age-related diseases // *Current Molec. Med.* 2005. V. 5. P. 197–203.
- Watson J.D.* Origin of concatemeric T7 DNA // *Nature.* 1972. V. 239. P. 197–201.
- Yoon K.H., Ko S.H., Cho J.H. et al.* Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003. V. 5. P. 2300–2308.