Медицинская генетика 2022. Том 21. Номер 12
Medical genetics 2022. Vol. 21. Issue 12

https://doi.org/10.25557/2073-7998.2022.12.16-17

GC-богатые фрагменты в составе внеклеточной ДНК ускоряют репликативное старение культивируемых фибробластов кожи человека

Ершова Е.С., Каменева Л.А., Вейко Н.Н., Костюк С.В.

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»
115522, г. Москва, ул. Москворечье, д.1

Цель исследования: определить влияние GC-богатого фрагмента рибосомного повтора в среде культивирования на скорость репликативного старения клеток. Установлено, что GC-богатые фрагменты в составе внеклеточной ДНК ускоряют репликативное старение культивируемых фибробластов кожи человека и увеличивают уровень активных форм кислорода в клетках.

Ключевые слова: внеклеточная ДНК, репликативное старение, рибосомная ДНК.

Для цитирования: Ершова Е.С., Каменева Л.А., Вейко Н.Н., Костюк С.В. GC-богатые фрагменты в составе внеклеточной ДНК ускоряют репликативное старение культивируемых фибробластов кожи человека. *Медицинская генетика* 2022; 21(12): 16-17.

Автор для корреспонденции: Ершова Елизавета Сергеевна; **e-mail:** es-ershova@rambler.ru
Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 18-15-00437.
Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Поступила: 19.11.2022

GC-rich fragments in circulating free DNA accelerate replicative aging in cultured human skin fibroblasts

Ershova E.S., Kameneva L.V., Veiko N.N., Kostyuk S.V.

Research Centre for Medical Genetics
1, Moskvorechye str., Moscow, 115522, Russian Federation

Purpose of the study: to determine the impact of rDNA fragments in the culture medium on the rate of replicative cell aging. We found that GC-rich fragments in extracellular DNA accelerate the replicative aging of cultured human skin fibroblasts and increase the level of reactive oxygen species in cells.

Keywords: Circulating free DNA, replicative aging, ribosomal DNA.

For citation: Ershova E.S., Kameneva L.V., Veiko N.N., Kostyuk S.V. GC-rich fragments in circulating free DNA accelerate replicative aging in cultured human skin fibroblasts. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]* 2022; 21(12): 16-17. (In Russ.)

Corresponding author: Ershova E.S.; **e-mail:** es-ershova@rambler.ru
Funding. The Russian Science Foundation (Project No. 18-15-00437) supported this research.
Conflict of interest. The authors declare no conflicts of interest.
Accepted: 19.11.2022

Введение

Многофакторные хронические заболевания (например, ревматоидный артрит, ишемическая болезнь сердца и шизофрения), сопровождаются увеличением содержания GC-богатых фрагментов (рибосомной ДНК, рДНК) в составе циркулирующей внеклеточной ДНК (вкДНК) плазмы крови [1,2]. Модельные фрагменты рДНК и вкДНК больных с высоким содержанием рДНК проявляют выраженную биологическую активность в отношении различных типов стволовых и дифференцированных клеток человека, стимулируя сигнальный путь TLR9-NF-kB-провоспалительные цитокины (обзор [2]). Повышенная активность фактора NF-kB ассоциирована с процессами естественного старения [3]. Репликативное старение моделирует некоторые аспекты естественного старения клеток в организме. Цель исследования: определить влияние фрагментов рДНК в среде культивирования на скорость репликативного старения клеток.

Методы

Культивировали фибробласты кожи, полученные от трех взрослых доноров (практически здоровые женщины 35, 42 и 50 лет). Клетки культивировали в од-

норазовых пластиковых флаконах в условиях насыщающей влажности в атмосфере 5% CO_2 в среде 199 (Кат. №: С230п, «ПанЭко», Россия), которая содержала 20% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClon, Кат. № SH30070.03), пенициллин (50 ед/мл), стрептомицин (50 мкг/мл), гентамицин (10 мкг/мл), 20 мкМ HEPES, pH 7,4. Клетки пересевали каждые три дня. В среду культивирования при каждом пересеве добавляли плазмиду pBR322-rDNA (50 нг/мл), которая включала фрагмент рДНК длиной 5836 п.н. (GenBank No. U13369, позиция от -515 до 5321, содержит 70% GC-пар). Культивирование прекращали при достижении остановки деления. В контроль рДНК не добавляли.

Уровень активных форм кислорода (АФК) в клетках каждого пассажа определяли методом проточной цитометрии с использованием флуоресцентного красителя дихлорфлуоресцеина на приборе CytoFLEX S (Beckman Coulter). Для визуального анализа клеток применили микроскоп Axio Scope.A1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Содержание теломерного повтора в ДНК определяли методом нерадиоактивной количественной гибридизации, как описано ранее [4].

Результаты

Максимальное число пассажей для исследуемых линий клеток составляло: 45, 61 и 66. В присутствии фрагментов рДНК максимальное число пассажей, после чего клетки переставали делиться, составило соответственно: 15, 20 и 22. В присутствии фрагментов рДНК клетки быстрее приобретают фенотип старых клеток: становятся больше в размерах, имеют более плоскую форму. Содержание в ДНК клеток теломерного повтора (маркер старения) в присутствии рДНК на терминальных 15, 20 и 22 пассажах снижалось в несколько раз (с 4, 5 и 7 пг/нг ДНК до 0,5, 1 и 3 пг/нг ДНК) по сравнению с соответствующими контролями (клетки 15, 20 и 22 пассажей, культивируемые без добавления в среду рДНК). В присутствии рДНК в клетках в 2-3 раза возрастал уровень АФК по сравнению с соответствующим контролем.

Выводы

GC-богатые фрагменты в составе вкДНК ускоряют репликативное старение культивируемых фибробластов кожи человека и увеличивают уровень АФК в клетках. Высокое содержание рДНК в циркулирующей ДНК крови больных с хроническими заболеваниями потенциально может быть одной из причин окислительного стресса и сокращения продолжительности жизни. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы разработать способы снижения уровня GC-богатых фрагментов в составе циркулирующей ДНК.

Литература/References

1. Kustanovich A., Schwartz R., Peretz T., Grinshpun A. Life and death of circulating cell-free DNA. Cancer Biol Ther. 2019;20(8):1057-1067. doi: 10.1080/15384047.2019.1598759.
2. Ershova E.S., Konkova M.S., Malinovskaya E.M., Kutsev S.I., Veiko N.N., Kostyuk S.V. Noncanonical functions of the human ribosomal repeat Russian Journal of Genetics. 2020;56(1):30-40.
3. Wang Y., Wang L., Wen X., Hao D., Zhang N., He G., Jiang X. NF-κB signaling in skin aging. Mech Ageing Dev. 2019; 184:111160. doi: 10.1016/j.mad.2019.111160.
4. Umriukhin P.E., Ershova E.S., Filev A.D., et al. The Psychoemotional Stress-Induced Changes in the Abundance of SatIII (1q12) and Telomere Repeats, but Not Ribosomal DNA, in Human Leukocytes. Genes (Basel). 2022;13(2):343. doi: 10.3390/genes13020343.