

На правах рукописи

ДУДКОВ

Александр Владимирович

ПЕПТИДНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ АПОПТОЗА КЛЕТОК ПРИ СТАРЕНИИ

14.01.30 – геронтология и гериатрия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Санкт-Петербург – 2019

Актуальность темы

В настоящее время все более актуальным становится направление исследований, изучающее процессы старения организма, что обусловлено прогрессирующим увеличением доли лиц пожилого и старческого возраста в общей численности населения [Виноградова И.А. и др., 2014; Shah A.R., Kennedy P.M., 2018]. Средняя продолжительность жизни людей за последние 20 лет в России увеличилась на 10%, а в Европе - на 15%. Основные нарушения при старении организма наблюдаются, в первую очередь, в сердечно-сосудистой системе: независимо от места проживания, основными причинами смертности в пожилом возрасте становятся заболевания сердца и инсульт [ВОЗ, 2015]. Второй причиной высокой смертности в пожилом возрасте являются хронические заболевания легких. С возрастом также значительно снижается иммунная функция организма, повышается частота развития хронической почечной недостаточности, других патологий [Denic A. et al., 2016]. Все эти ассоциированные с возрастом заболевания существенно снижают качество жизни лиц пожилого и старческого возраста.

На молекулярно-клеточном уровне нарушения функций сердечно-сосудистой, дыхательной, иммунной и выделительной систем могут проявляться в изменении экспрессии ряда сигнальных молекул и транскрипционных факторов, участвующих в дифференцировке, пролиферации и апоптозе клеток [Назаров П.Г., 2005]. Темпы возрастной инволюции того или иного органа определяются, в частности, соотношением про- и антиапоптотических белков в клетках [Полякова В.О., Бенберин В.В., 2006; Хавинсон В.Х. и др., 2011]. Апоптоз играет важную роль в морфогенетических процессах и регуляции численности клеток. Наиболее информативными маркерами рецепторного апоптоза и клеточного старения являются белки p16, p21, p53 [Новик А.А. и др., 2005; Mahajan A., 2016; Read A.P., Strachan T., 1999; Pan R. et al., 2017]. Эти белки относятся к ингибиторам циклин-зависимых протеинкиназ, экспрессия которых тормозит клеточный рост и повышается при старении организма. Кроме того, в механизмах рецепторного апоптоза важную роль играют каспазы 8 и 9 [Li P. et al., 1997; Salmena L. et al., 2003]. К маркерам митохондриального апоптоза, связанным с клеточным старением, можно отнести AIF (apoptosis-inducing factor, который активирует нуклеазу, расщепляющую ядерную ДНК) и прохИБИТИН, который является многофункциональным белком, обладающим антипролиферативным действием, связанным с ингибирующей ролью в клеточном цикле и участием в регуляции активности ферментов дыхательной цепи [Baris O.R. et al., 2011; Farina V. et al., 2017]. Нарушения апоптотических процессов в различных органах и тканях при старении могут приводить к возникновению патологий, ассоциированных с возрастом, поэтому поиск геропротекторов, направленных на восстановление нарушающегося при старении баланса между пролиферацией и апоптозом, представляется актуальной задачей молекулярной геронтологии.

Биологически активными пептидами, обладающими тканеспецифическим действием, являются следующие ди- и трипептиды: KED и DS – вазопротекторы, EDG и AE – бронхопротекторы, EW и KE – иммунопротекторы, AED, EDL и DW – нефропротекторы. Ранее были продемонстрированы вазопротекторные свойства пептида KED, заключающиеся в коррекции метаболического сосудистого синдрома и заболеваний, сопровождающихся нарушением проницаемости сосудистой стенки и ломкостью капилляров [Китачёв К. В. и др., 2013]. Пептид DS также стимулировал процессы клеточного обновления в органотипических и диссоциированных культурах клеток сосудов молодых и старых животных [Хавинсон В.Х. и др., 2014 (г,д)]. Были продемонстрированы бронхопротекторные свойства пептида EDG, который снижал выраженность воспалительных и бронхоспастических проявлений при хроническом бронхите, а также увеличивал жизненную емкость, общий объем и экспираторную форсированную жизненную емкость легких. Пептид EW широко применяется в медицине как регулятор клеточного, гуморального иммунитета и неспецифической резистентности организма, а также в качестве стимулятора регенерации и кроветворения [Максимов И.Б. и др., 2003; Торховская Т. И. и др., 2015]. Пептид KE активирует клеточный иммунитет и неспецифическую резистентность организма [Щербак В.А., Патеюк А.В., 2004]. Пептид EDP может использоваться для профилактики и коррекции возрастных нарушений клеточного и гуморального иммунитета путем активации пролиферации и дифференцировки иммунных клеток [Хавинсон В.Х. и др., 2007]. Пептиды AED и EDL обладают нефропротекторными свойствами и эффективны при лечении экспериментального нефролитиаза у крыс. Применение этих трипептидов снижает концентрацию оксалат-ионов в моче, количество и размер кальциевых отложений в ткани почек, а также уменьшает интенсивность свободнорадикального окисления [Хавинсон В.Х. и др., 2014(а,б); Заморский И.И. и др., 2015; Заморский И.И. и др., 2017; Заморский И.И. и др., 2018]. Дипептид DW стимулирует пролиферацию клеток почки эмбриона человека линии НЕК-239 и снижает экспрессию генов ферментов, ассоциированных с хронической и острой почечной недостаточностью.

Таким образом, на основании ранее проведенных исследований следует заключить, что короткие пептиды могут способствовать восстановлению нарушающихся при старении функций сердечно-сосудистой, дыхательной, иммунной и выделительной систем на молекулярно-клеточном уровне. В основе молекулярного механизма действия коротких пептидов лежит их способность эпигенетически регулировать экспрессию генов и синтез белков. Есть данные, свидетельствующие о том, что эпигенетическая регуляция происходит за счет взаимодействия пептидов с гистоновыми белками [Федореева Л.И. и др., 2013; Khavinson V.Kh. et al., 2013]. Использование пептидов в качестве регуляторов апоптоза при репликативном старении клеток в культуре может способствовать изучению подходов к решению

задачи снижения частоты возникновения заболеваний, ассоциированных с возрастом. Однако влияние коротких пептидов на процессы рецепторного и митохондриального путей апоптоза, меняющиеся при старении сердечно-сосудистой, дыхательной, иммунной и выделительной систем, до сих пор изучено недостаточно.

Для изучения геропротекторных свойств различных веществ, в том числе коротких пептидов, в настоящее время используется несколько моделей клеточного старения. Первая модель, репликативное старение, в соответствии с теорией Л. Хейфлика, предполагает пересевание клеток в процессе культивирования [Stanley J.F. et al., 1975; Rohme D. et al., 1981]. Вторая модель – это стресс-индуцированное преждевременное старение. К третьей модели относят хронологическое («стационарное») старение клеток [Хохлов А.Н., 2009; 2013; Хохлов А.Н. и др., 2014]. В связи с тем, что вторая модель предполагает дополнительное неблагоприятное воздействие на клетки, а третья модель наиболее часто применяется для исследования бактерий, в нашем исследовании использовали метод репликативного старения клеток.

Цель и задачи исследования

Целью исследования являлось изучение молекулярных механизмов действия коротких пептидов на меняющиеся при репликативном старении рецепторные и митохондриальные пути реализации апоптоза в бронхиальных фибробластах, лимфоцитах и клетках почек и сосудов.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить влияние пептидов EDG и AE на экспрессию маркеров рецепторного (белки p16, p21, p53, Caspase-8, -9) и митохондриального (AIF, прохибитин) механизмов апоптоза в культурах фибробластов легкого человека при репликативном старении.
2. Изучить влияние пептидов EW, KE, EDP на экспрессию маркеров рецепторного (белки p16, p21, p53, Caspase-8, -9) и митохондриального (AIF, прохибитин) механизмов апоптоза в культурах лимфоцитов крови человека при репликативном старении.
3. Изучить влияние пептидов AED, EDL, DW на экспрессию маркеров рецепторного (белки p16, p21, p53, Caspase-8, -9) и митохондриального (AIF, прохибитин) механизмов апоптоза в культурах клеток почек крыс при репликативном старении.
4. Изучить влияние пептидов KED, DS на экспрессию маркеров рецепторного (белки p16, p21, p53, Caspase-8, -9) и митохондриального (AIF, прохибитин) механизмов апоптоза в культурах клеток сосудов крыс при репликативном старении.
5. С помощью молекулярного моделирования провести анализ взаимодействия коротких пептидов с гистонами H1/1, H1/3, H1/6, H2b, H3, H4.

6. Сформулировать концепцию молекулярного механизма влияния коротких пептидов на рецепторный и митохондриальный пути апоптоза в клетках.

Степень разработанности темы исследования

Основанием для разработки темы диссертации служат данные экспериментов по бронхопротекторному действию пептидов EDG и AE, иммунопротекторным и противоопухолевым свойствам пептидов EW, KE и EDP, нефропротекторным свойствам пептидов AED, EDL, DW и вазопротекторному действию пептидов KED, DS. Было показано улучшение состояния пациентов с хроническим бронхитом под действием пептида EDG. Пептиды KE, EW и EDP применяются как регуляторы клеточного и гуморального иммунитета, а также для профилактики старения иммунной системы [Максимов И.Б. и др., 2003; Щербак В.А., Патеюк А.В., 2004; Хавинсон В. Х. и др., 2007]. Пептиды AED и EDL демонстрировали эффективность в модели экспериментального нефролитиаза у крыс, а дипептид DW стимулировал пролиферацию клеток почки эмбриона человека. Пептиды KED и DS имели вазопротекторные свойства, проявлявшиеся в коррекции метаболического сосудистого синдрома и стимуляции процессов клеточного обновления в органотипических и диссоциированных культурах клеток сосудов молодых и старых животных [Китачёв К. В. и др., 2013; Хавинсон В.Х. и др., 2014 (г,д)].

Научная новизна

В работе впервые проведено сравнительное изучение влияния пептидов EDG, AE на экспрессию сигнальных молекул - маркеров рецепторного (белки p16, p21, p53, Caspase-8, -9) и митохондриального (AIF, прохибитин) механизмов апоптоза в «молодых» и «старых» культурах фибробластов легкого человека. Установлено, что пептиды EDG и AE снижают уровень рецепторного и митохондриального апоптоза в фибробластах легкого при репликативном старении. При этом пептид EDG оказывает более выраженное антиапоптотическое действие в «молодых» и «старых» культурах фибробластов легкого человека, чем пептид AE.

Впервые изучено влияние пептидов EW, KE и EDP на экспрессию маркеров рецепторного (белки p16, p21, p53, Caspase-8, -9) и митохондриального (AIF, прохибитин) механизмов апоптоза в культурах лимфоцитов крови человека. Установлено, что пептиды EW, KE и EDP снижают уровень рецепторного и митохондриального апоптоза в лимфоцитах крови при репликативном старении. Пептиды EW и KE оказывают более выраженное антиапоптотическое действие в «молодых» и «старых» культурах лимфоцитов крови, чем пептид EDP.

Впервые установлено, что пептиды AED, EDL и DW снижают уровень рецепторного апоптоза, оцениваемый по экспрессии белков p16, p21, p53, Caspase-8,-9. Пептид DW снижает уровень митохондриального апоптоза в «молодых» и «старых» клетках почек, оцениваемый по экспрессии прохибитина. Пептиды AED, EDL и DW в равной степени оказывают

выраженное антиапоптотическое действие в культурах клеток почек при репликативном старении.

Впервые показано, что пептиды KED и DS снижают уровень рецепторного апоптоза, оцениваемый по экспрессии белков p16, p21, p53, Caspase-8,-9. При этом пептид DS оказывает более выраженное антиапоптотическое действие в «молодых» и «старых» культурах клеток сосудов при старении по сравнению с пептидом KED.

В работе впервые с помощью молекулярного моделирования проверена гипотеза гистон-пептидных взаимодействий. Представляется возможным, что антиапоптотическое и геропротекторное действие пептидов может быть связано с изменением транскрипции генов апоптоза при изменении конформаций гистонов, связанных с короткими пептидами. Проведено исследование взаимодействия пептидов DW, DS, KE, EW с гистонами H1/1, H1/3, H1/6, H2b, H3, H4 с помощью молекулярного моделирования. Установлено, что пептиды предпочтительнее всего связываются с гистонами по сайтам, которые взаимодействуют с ДНК. С помощью докинга доказано, что наиболее энергетически выгодное взаимодействие с гистоном H1/3 образует пептид EW, с гистоном H1/6 – пептид DS.

Практическая значимость

Полученные результаты позволили провести сравнительный анализ молекулярных аспектов биологической активности пептидов EDG, AE, EW, KE, EDP, AED, EDL, DW, KED, DS в отношении пула сигнальных молекул – маркеров рецепторного (белки 16, p21, p53, Caspase-8, -9) и митохондриального (AIF, прохибитин) механизмов апоптоза. Полученные данные свидетельствуют о том, что использование коротких пептидов может являться эффективным методом снижения уровня апоптоза и восстановления функциональной активности клеток тканей сердечно-сосудистой, дыхательной, иммунной и выделительной систем при их старении. Важными с практической точки зрения являются данные о том, что ди- и трипептиды с различной структурой регулируют апоптоз в разных типах клеток при их репликативном старении. Пептидная регуляция экспрессии белков - маркеров рецепторного и митохондриального путей апоптоза может осуществляться через изменение экспрессии генов *p16*, *p21*, *p53*, *Caspase-8*, *-9*, *Aif*. Изменение доступности генов для транскрипции может происходить вследствие изменения конформации гистоновых белков при их взаимодействии с короткими пептидами. Информация о генах-мишенях действия коротких геропротекторных пептидов важна для разработки таргетной терапии ассоциированных с возрастом заболеваний, прежде всего тех, которые связаны с активацией запрограммированной клеточной гибели.

Положения, выносимые на защиту

1. При репликативном старении фибробластов легкого человека в культуре уровень экспрессии маркеров рецепторного апоптоза (p16, p53, Caspase-9)

возрастает. Экспрессия маркера митохондриального апоптоза AIF также возрастает в «старых» фибробластах легкого, уровень экспрессии прохибитина - снижается. Пептиды EDG и AE снижают уровень экспрессии проапоптотического белка p16 как в «молодых», так и в «старых» культурах в 2,5—3 раза. Пептид EDG снижает экспрессию Caspase-9 в «старых» культурах клеток в 1,75 раза. Пептиды EDG и AE снижают экспрессию AIF в «старых» культурах фибробластов легкого в 1,5 и 2,8 раза. Пептид EDG повышает экспрессию прохибитина в «молодых» и «старых» культурах в 1,3-2,4 раза. Таким образом, пептиды EDG и AE способствуют снижению выраженности рецепторного и митохондриального апоптоза фибробластов легкого при их репликативном старении в культуре.

2. При репликативном старении лимфоцитов крови человека в культуре экспрессия маркеров рецепторного апоптоза p16, p21, p53, Caspase-8, -9 возрастает. Экспрессия маркера митохондриального апоптоза AIF возрастает в «старых» клетках, экспрессия прохибитина - снижается. Пептиды EW и KE снижают уровень экспрессии проапоптотического протеина p16 в «молодых» и «старых» культурах в 1,2 и 1,4 раза, а проапоптотического маркера p21 – в 1,9 и 2,1 раза. Пептид EW снижает экспрессию p21 в 1,4 раза, а экспрессию Caspase-8 - в 1,7 раза в «старых» культурах лимфоцитов. Пептиды EW, KE и EDP снижают экспрессию Caspase-9 в «старых» культурах лимфоцитов в 1,3 и 3,4 раза соответственно. Пептид KE снижает экспрессию AIF в 1,9 раза и повышает экспрессию прохибитина в 3,2 раза в «старых» культурах лимфоцитов. Таким образом, пептиды EW и KE способствуют снижению выраженности рецепторного и митохондриального апоптоза лимфоцитов крови при их репликативном старении в культуре.
3. При репликативном старении клеток почек в культуре экспрессия маркеров рецепторного апоптоза p16, p21, p53, Caspase-8, -9 возрастает. Пептиды AED, EDL, DW снижают уровень экспрессии проапоптотических маркеров p16, p21, Caspase-8, -9 в 1,4-2,5 раза в «старых» культурах. Пептиды AED и DW снижают экспрессию p53 в 2,7-3,2 раза в «старых» культурах клеток почек. Таким образом, пептиды AED, EDL, DW способствуют снижению выраженности рецепторного апоптоза клеток почек при их репликативном старении в культуре.
4. При старении клеток сосудов в культуре уровень экспрессии маркеров рецепторного (p16, p21, p53, Caspase-8, -9) и митохондриального (AIF) апоптоза возрастает. Пептиды KED и DS снижают уровень экспрессии проапоптотических маркеров p16, p21, p53 в 1,3-2,6 раза в «старых» культурах. Пептид DS снижает экспрессию Caspase-8, -9 в 1,9 и 1,8 раза в «старых» культурах клеток сосудов. Таким образом, пептиды KED и DS способствуют снижению выраженности рецепторного апоптоза клеток сосудов при их репликативном старении.

5. По результатам молекулярного моделирования пептиды DS, DW, KE, EW предпочтительно связываются с гистоном H4 по N-концевому домену по аминокислотной последовательности Lys-Arg-His-Val-Leu-Arg-Asp-Asn. Пептиды DS, DW, KE, EW с наибольшей вероятностью связываются с гистоном H3 по N-концевому домену по аминокислотной последовательности Lys-Ser-Thr-Lys-Arg-Lys. Пептиды DS, DW, KE, EW связываются с гистоном H2b по N-концевому домену по аминокислотной последовательности Val-Glu-Thr-Ser-Asn-Ser-Asn. По результатам докинга наиболее энергетически выгодное взаимодействие с гистоном H1/3 образует пептид EW, с гистоном H1/6 – пептид DS. Пептиды предпочтительнее всего связываются с гистонами по сайтам, которые взаимодействуют с ДНК. Предполагается, что в этих сайтах происходит конкурентное связывание пептидов и гистона с молекулой ДНК.
6. Ди- и трипептиды регулируют апоптоз по двум сигнальным путям: митохондриальному и рецепторному. Молекулярными мишенями коротких пептидов в каскаде рецепторного апоптоза являются Caspase-8, -9 и транскрипционные факторы p16, p21, p53. Влияние ди- и трипептидов на митохондриальный путь апоптоза реализуется через белок AIF. Предполагается, что пептидная регуляция экспрессии белков – маркеров апоптоза осуществляется через изменение экспрессии генов этих белков путем пептид-гистоновых взаимодействий.

Связь с научно-исследовательской работой института

Диссертационная работа является темой, выполняемой по основному плану научно-исследовательской работы Автономной научной некоммерческой организации высшего образования Научно-исследовательский центр «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии».

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликовано 53 работы: 16 статей в журналах по перечню ВАК, 2 главы в монографии, 4 статьи в других журналах, 31 тезисы докладов.

Апробация и реализация диссертации

Результаты диссертационного исследования доложены на всероссийской молодёжной конференции-школе «Нейробиология интегративных функций мозга» (Санкт-Петербург, 2011); конференции «Пушковские чтения» (Санкт-Петербург, 2011, 2014, 2018); научном форуме «Наука и общество» (Санкт-Петербург, 2011); XVI Российском национальном конгрессе «Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2011); Международном форуме «Старшее поколение» (Санкт-Петербург, 2011, 2013, 2018); XVI Международной Научно-практической конференции «Пожилой больной. Качество жизни» (Москва, 2011); международной

научной конференции «Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской приматологии» (Сочи-Адлер, 2011); 12th International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins (Beijing, China, 2011); Quantitative imaging and spectroscopy in neuroscience (SPb-Koltushi, 2012); конференции «генетика старения и долголетия» (Москва, 2012); III съезде геронтологов и гериатров (Новосибирск, 2012); конференции с международным участием «Здоровье – основа человеческого потенциала» (Санкт-Петербург, 2013); VI Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Санкт-Петербург, 2013); конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2013); конференции «Актуальные проблемы геронтологии и гериатрии: от теории к практике» (Киев, 2013); конференции «Медицинские проблемы пожилых» (Казань, 2013); конференции «Современные аспекты геронтологии и гериатрии: от теории к практике» (Киев, 2014); конференции с международным участием «Организация оказания медицинской помощи лицам пожилого и старческого возраста» (Уфа, 2016); научно-практической конференции «Инновационные российские технологии в геронтологии и гериатрии 2017» (Санкт-Петербург, 2017); XXIII съезде физиологического общества им. И.П. Павлова (Воронеж, 2017); конференции «Актуальные вопросы медицины» (Азербайджан, Баку, 2017); International Symposium of Experts “Effective current approaches in anti-aging medicine and gerontology” (Stockholm, Sweden, 2018).

Личный вклад автора

Личный вклад автора в диссертационное исследование состоял в составлении дизайна исследования, проведении экспериментов, статистической обработке и анализе данных сравнительного молекулярного механизма действия коротких пептидов на рецепторный и митохондриальный апоптоз в культурах клеток сосудов, почек, фибробластов легкого и лимфоцитов крови при репликативном старении. В ходе выполнения исследования автор применял методику диссоциированного культивирования клеток, методы иммуноцитохимического исследования, иммунофлуоресцентной конфокальной микроскопии, молекулярного моделирования. Автор принимал участие во всех экспериментах, включавших в себя культивирование клеток, выделение первичных культур, иммуноцитохимическое окрашивание, микроскопию, морфометрию, статистический анализ данных. Кроме того, автор работы участвовал в написании тезисов, статей и глав в монографиях по результатам проведенных исследований, неоднократно выступал с докладами на российских и международных конференциях по проблемам геронтологии.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, описания результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и указателя литературы. Текст диссертации изложен на 200 страницах и иллюстрирован

89 рисунками. Список литературы содержит 217 источников, из них на русском языке – 90, на английском – 127.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика исследуемых в работе пептидов

В работе были использованы пептиды AED, EDG, EDL, EDP, DW, DS, AE, EW, KE.

Пептиды EDG (Glu-Asp-Gly, T-34, хонлутен) и AE (Ala-Glu, D-8) - бронхопротекторны. Пептид EDG обладает также стресспротекторными свойствами [Хавинсон В.Х. и др., 2007].

Пептид EW (Glu-Trp, тимоген) - иммуномодулирующий лекарственный препарат. Пептид EW обладает иммуномодулирующим и противовоспалительным действием, применяется в медицине и ветеринарии, оказывает регулирующее влияние на реакции клеточного, гуморального иммунитета и неспецифическую резистентность организма, стимулирует процессы регенерации и кроветворения в случае их угнетения, улучшает клеточный метаболизм [Максимов И.Б. и др., 2003; Торховская Т.И. и др., 2015].

Пептид KE (Lys-Glu, АВ-0, вилон) – тимомиметик, стимулирует клеточный иммунитет и неспецифическую резистентность организма, оказывает активирующее действие на макрофаги и нейтрофилы [Щербак В.А. и др., 2004].

Пептид EDP (Glu-Asp-Pro, T-36, кристаген) – иммуномодулятор, активатор функций Т- и В-лимфоцитов [Хавинсон В.Х. и др., 2007].

Пептиды AED (Ala-Glu-Asp, T-31, карталакс) и EDL (Glu-Asp-Leu, T-35, оваген) – нефропротекторы, повышающие пролиферативную и антиапоптотическую активность клеток почек молодых и старых крыс [Чалисова Н.И., Линькова Н.С., Ничик Т.Е., Рыжак А.П., Дудков А.В., Рыжак Г.А. Пептидная регуляция процессов клеточного обновления в культурах тканей почек молодых и старых животных // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2015. № 1. С. 10-14].

Пептид DW (Asp-Trp, D-2) - нефропротектор, снижающий экспрессию маркера патологии почек MMP-9 в диссоциированных культурах клеток почек.

Пептид KED (Lys-Glu-Asp, T-38, везуген) – вазопротектор, обладающий антиатеросклеротическим действием [Китачёв К.В., и др., 2013].

Пептид DS (Asp-Ser, D-7) – вазопротектор, стимулирует процессы клеточного обновления в органотипических и диссоциированных культурах клеток сосудов молодых и старых животных [Хавинсон В.Х. и др., 2014г].

Характеристика исследуемых культур клеток

Материалом исследования служили: штамм нормальных эмбриональных диплоидных фибробластов легкого человека (FLECH), лимфоциты крови человека и первичные культуры клеток почек и сосудов крыс линии Wistar.

Клетки FLECH были получены из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН на 18-ом пассаже. Первичная культура лимфоцитов человека была получена из ФГБНУ "НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д. О. Отта".

Крысы для создания культур клеток почек и сосудов были предоставлены виварием Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Ткань почек и сосудов обрабатывали в стерильных условиях раствором диспазы II в концентрации 2,4 ЕД/мл в течение 18 ч при 4°C. Для получения суспензии клеток материал измельчали ножницами до кусочков размером 2-3 мм и помещали в раствор коллагеназы I в питательной среде M199. Полученную суспензию клеток осаждали при 1000 об/мин в течение 5 мин, после чего удаляли супернатант. Осадок клеток ресуспендировали в среде M199, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 1% L-глутамина, 1,5% буфера HEPES, пенициллин G (50000 ЕД) + стрептомицин – 50 мг и среду M199. Полученный материал переносили во флакон для культивирования и помещали в CO₂-инкубатор для дальнейшего культивирования.

Культуральная среда для лимфоцитов крови включала в себя: 4.5 мл среды RPMI 1640 с антибиотиком (гентамицин — 50 мкг/мл) и L-глутамином (конечная концентрация 0.2 мг/мл), 0.5 мл сыворотки эмбрионов коров, 0.5 мл гепаринизированной крови, 5.5 мг фитогемагглютина. Фитогемагглютинин добавляли в культуру лимфоцитов с целью активации деления клеток. Образцы крови были получены от мужчин в возрасте 23-25 лет.

Характеристика используемых в работе пептидов

Культуры клеток легкого человека (FLECH) для последующего иммуноцитохимического исследования были разделены на 3 группы: 1 (контроль) – добавление физиологического раствора; 2 – добавление пептида EDG; 3 – добавление пептида AE.

Культуры лимфоцитов крови человека были разделены на 4 группы: 1 (контроль) – добавление физиологического раствора; 2 – добавление пептида EW; 3 – добавление пептида KE; 4 – добавление пептида EDP.

Культуры клеток почек крысы были разделены на 4 группы: 1 (контроль) – добавление физиологического раствора, 2 – добавление пептида AED; 3 – добавление пептида EDL, 4 – добавление пептида DW.

Культуры клеток сосудов крысы были разделены на 3 группы: 1 (контроль) – добавление физиологического раствора, 2 – добавление пептида KED; 3 – добавление пептида DS.

Выбор соответствия пептидов определенным культурам клеток обусловлен тканеспецифическим действием пептидов [Хавинсон В.Х. и др., 2015]. Ранее было показано, что пептиды AED и EDL при добавлении в «молодые» и «старые» культуры клеток почек крыс линии Wistar в концентрации 20 нг/мл снижали выраженность апоптоза, оцениваемого по

экспрессии транскрипционных факторов p16, p21, p53 [Хавинсон В.Х. и др., 2014б]. При этом в другом исследовании на этой же экспериментальной модели пептид EDL не влиял на экспрессию бета p53 [Хавинсон В.Х. и др., 2014а]. Пептид EDG впервые исследовали в модели репликативного старения культуры клеток легкого человека FLECH, однако ранее эта модель успешно применялась для изучения бронхотекторных свойств тетрапептида [Хавинсон В.Х. и др., 2014 в]. Пептиды EW и пептид KE также впервые исследовали в модели старения лимфоцитов крови пассажирами, однако многочисленные данные об иммуно- и геропротекторных свойствах этих пептидов [Торховская Т. И. и др., 2015; Anisimov V.N., Khavinson V.Kh., 2010] позволяют предположить, что такая модель будет адекватной для решения поставленной в работе задачи. Пептид KED при добавлении в «молодые» и «старые» культуры клеток сосудов крыс линии Wistar в конечной концентрации 10, 20 и 100 нг/мл повышал экспрессию маркера пролиферации Ki67 и снижал экспрессию проапоптотического белка p53 [Хавинсон В.Х. и др., 2014г,д]. При этом максимальный эффект пептида KED наблюдался в концентрации 100 нг/мл. Все пептиды, кроме EW, были получены в виде стерильных растворов, расфасованных в ампулы в концентрации 100 мкг в 1 мл. Для стерильного раствора EW концентрация составила 25 мкг в 1 мл. Конечная концентрация пептидов при добавлении в культуры составила 100 нг/мл, т.к. ранее при изучении различных типов культур клеток эта концентрация оказывалась наиболее эффективной.

Пассирование производили через 3 сут на 4-е, когда культуры достигали монослоя. Культивирование проводили до 3 пассажа («молодые» культуры) и до 14 пассажа («старые» культуры), на которых клетки были рассеяны на планшеты и было произведено иммуноцитохимическое окрашивание. Первичные культуры почек и сосудов крыс к 14 пассажиру теряли способность к пролиферации, а уровень апоптоза в них возрастал, в связи с чем именно этот пассаж был выбран в качестве модели «старых» клеток. Поскольку снижение пролиферации и повышение выраженности апоптоза не характерно для трансформированных клеток, можно предположить, что исследуемые культуры спонтанно не трансформировались.

Иммуноцитохимическое исследование

В работе использовали первичные моноклональные антитела к p16 («Novocastra», 1:100), p21 («Novocastra», 1:50), p53 («Novocastra», 1:50), Caspase-8 («Novocastra», 1:75), Caspase-9 («Abcam», 1:100), AIF («Novocastra», 1:150), Prohibitin («Novocastra», 1:100). На культуры клеток наносили 20-30 мкл первичных антител на 60 мин при температуре 37°C, затем клетки промывали буферным раствором. Инкубацию клеток со вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромом Alexa Fluor 488 (зеленая флуоресценция) или Alexa Fluor 647 (розовая или красно-коричневая флуоресценция) (1:1000, Abcam) проводили в течение 30 мин при комнатной температуре, в темноте. Затем клетки промывали буферным

раствором и докрашивали ядра Hoechst 33258 в течение 1 мин (голубая флуоресценция).

Апоптотические процессы в организме протекают по двум путям: рецепторному и митохондриальному, каждый из которых характеризуется активацией специфических сигнальных молекул, ключевыми из которых являются: белки p53, p16, p21, Caspase-8, Caspase-9, AIF, прохибитин.

p53 – маркер рецепторного апоптоза, транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл. Активация p53 приводит к остановке клеточного цикла и репликации поврежденной ДНК. Получая сигналы о клеточном повреждении, белок p53 либо останавливает клеточный цикл для репарации генома, либо индуцирует апоптоз. Известно, что ген *P53* осуществляет контроль репликативного старения клеток [Read A.P., Strachan T., 1999; Pan R. et al., 2017]. Под влиянием белка p53 находится экспрессия ингибиторов циклин-зависимых киназ p16 и p21.

p16 – маркер рецепторного апоптоза, тормозящий клеточный цикл путем инактивации циклин-зависимой киназы-2A, вовлеченной в фосфорилирование белка pRb [Mahajan A., 2016].

p21 совместно с p53 блокирует последующие повреждения ДНК посредством участия в запуске процессов репарации [Новик А.А. и др., 2005].

Caspase-8 - инициирующая каспаза при передаче сигнала от всех типов рецепторов клеточной гибели. Показана ключевая роль каспазы-8 в формировании иммунитета в процессе исследования линии трансгенных мышей, содержащих мутацию в гене *CASP8*, приводящую к деактивации каспазы-8. Мутация была ограничена популяцией Т-клеток. У исследуемых мышей наблюдалось уменьшение количества периферических Т-лимфоцитов по сравнению с контрольной группой и нарушение реакции Т-клеток на стимулы активации, что приводило к формированию иммунодефицитных состояний [Salmena L. et al., 2003].

Caspase-9 - «верхний» узел протеазного каскада цепочки рецепторного апоптоза после сборки апоптосомы. Показано участие инициирующих каспаз-8, -9 в ганглиозид-опосредованном апоптозе Т-лимфоцитов [Li P. et al., 1997].

AIF (apoptosis inducing factor) – один из проапоптотических факторов, реализующих апоптоз по митохондриальному пути [Farina B. et al., 2017]. Индуцирует гибель клеток в ответ на окислительный стресс, повреждение ДНК, гипоксию и т.д. Повышение экспрессии *AIF* продемонстрировано при диабетической нефропатии и хронической болезни почек [Thal S.E. et al., 2011].

Prohibitin (прохибитин) - многофункциональный белок, вовлеченный в регуляцию апоптоза, контроль клеточного цикла и стабилизацию митохондриальных белков. Повышенная экспрессия прохибитина индуцирует устойчивость клеток к различным стимулам через

митохондриальный апоптотический путь, а нокдаун гена *phb* повышает восприимчивость к апоптозным стимулам [Baris O.R. et al., 2011].

Морфометрия и компьютерный анализ изображений

Для оценки результатов иммуноцитохимического окрашивания проводили морфометрическое исследование с использованием системы компьютерного анализа микроскопических изображений, состоящей из микроскопа Olympus BX40, цифровой камеры Olympus, персонального компьютера на базе Intel Pentium 4 и программного обеспечения «Videotest Morphology 5.2». В каждом случае анализировали 10 полей зрения при увеличении 200х. Проводили измерение площади экспрессии. Площадь экспрессии рассчитывали, как отношение площади, занимаемой иммунопозитивными клетками, к общей площади клеток в поле зрения, для маркеров с цитоплазматическим окрашиванием, и как отношение площади, занимаемой иммунопозитивными ядрами, к общей площади ядер в поле зрения, для маркеров с ядерной экспрессией. Площадь экспрессии выражали в процентах.

Статистическая обработка данных

Статистическая обработка экспериментальных данных включала в себя подсчет среднего арифметического, стандартного отклонения и доверительного интервала для каждой выборки и проводилась в программе Statistica 8.0. Для анализа принадлежности выборок к нормальному распределению использовали критерий Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk's W-test). Для проверки статистической однородности нескольких выборок были использованы непараметрические процедуры однофакторного дисперсионного анализа (критерий Краскела-Уоллиса). В случаях, когда дисперсионный анализ выявлял статистически значимую неоднородность нескольких выборок, для последующего выявления неоднородных групп (путем их попарных сравнений) применяли процедуры множественных сравнений с помощью U-критерия Манна-Уитни. Критический уровень достоверности нулевой гипотезы (об отсутствии различий) принимали равным 0,05.

Моделирование взаимодействий коротких пептидов с гистоновыми белками

Взаимодействие коротких пептидов с гистонами рассчитывали при помощи программного обеспечения Molecular Operating Environment 2016 методом докинга.

Для построения модели взаимодействия пептидов DW, DS, KE и EW с гистонами пшеницы необходимо создать гомологичные модели гистонов. Для создания таких моделей гистонов H1, H2b, H3 и H4 были соответственно использованы структуры гистонов из базы данных белковых структур (Protein Data Bank).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Пептидная регуляция апоптоза фибробластов легкого при репликативном старении

Площадь экспрессии p16, p53 статистически значимо ($p < 0,05$) увеличивалась в контроле «старых» фибробластов легкого, соответственно, в 5,37 и 1,94 раза по сравнению с «молодыми» культурами (рис. 1А, В). В «старых» культурах пептид EDG снижал экспрессию p16 в 3,02 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$). В «старых» культурах добавление пептида АЕ способствовало снижению экспрессии p16 в 2,59 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$, рис. 1А). Площадь экспрессии p21 не изменялась во всех исследуемых группах (рис. 1Б).

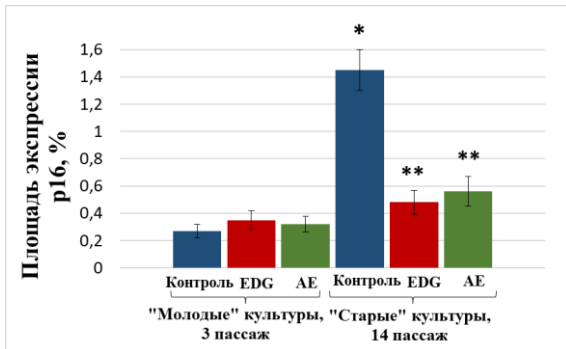
Площадь экспрессии Caspase-8 в контроле «старых» культур не отличалась от этого показателя в «молодых» культурах (рис. 1Г). Площадь экспрессии Caspase-9 в контроле «старых» культур фибробластов легкого была в 1,88 раза выше ($p < 0,05$) соответствующего показателя в «молодых» культурах. Добавление пептида EDG в «старые» культуры привело к статистически значимому ($p < 0,05$) снижению экспрессии Caspase-9 в 1,75 раза по сравнению с контролем. Добавление пептида АЕ к фибробластам легкого вызвало увеличение экспрессии Caspase-9 в 1,41 раза по сравнению с контролем в «старых» культурах ($p < 0,05$, рис. 1Д).

Площадь экспрессии AIF в контроле «старых» культур фибробластов легкого была статистически значимо в 18,25 раза выше по сравнению с «молодыми» культурами ($p < 0,05$). В «старых» культурах пептид EDG снижал экспрессию этого маркера в 2,28 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$). В «старых» культурах фибробластов легкого пептид АЕ достоверно снижал экспрессию AIF в 1,53 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$, рис. 1Е).

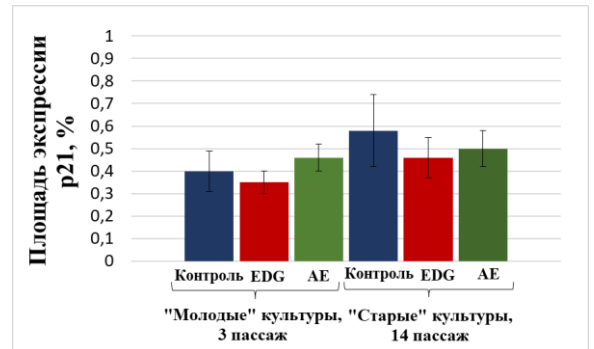
Экспрессия прохибитина в «старых» культурах была снижена в 3,24 раза по сравнению с «молодыми» культурами ($p < 0,05$). Пептид EDG статистически значимо повышал экспрессию этого маркера по сравнению с контролем в «молодых» и «старых» культурах в 1,33 и 2,41 раза соответственно (рис. 1Ж).

Учитывая значительные различия между экспрессией маркера AIF в «молодых» и «старых» культурах фибробластов легкого, можно предположить ведущую роль митохондриального механизма апоптоза, и, в частности, AIF, в репликативном старении данного типа клеток. Добавление пептидов EDG и АЕ приводило к значительному снижению уровня экспрессии AIF в «старых» культурах, что, вероятно, свидетельствует о том, что эти пептиды, помимо влияния на рецепторный апоптоз, вызывают также торможение митохондриального апоптоза, замедляя старение клеток легкого. Добавление пептида EDG также оказывало влияние на экспрессию другого маркера митохондриального апоптоза – прохибитина.

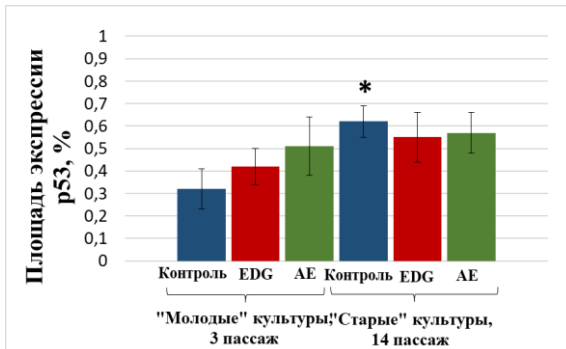
А



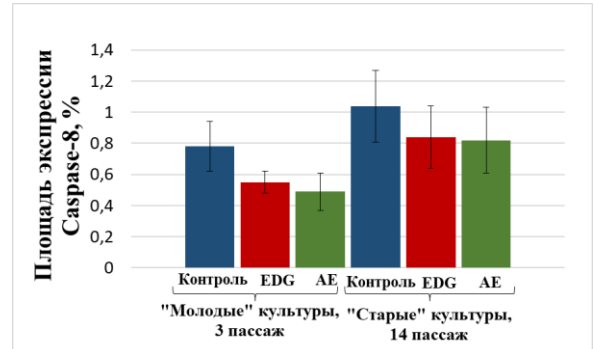
Б



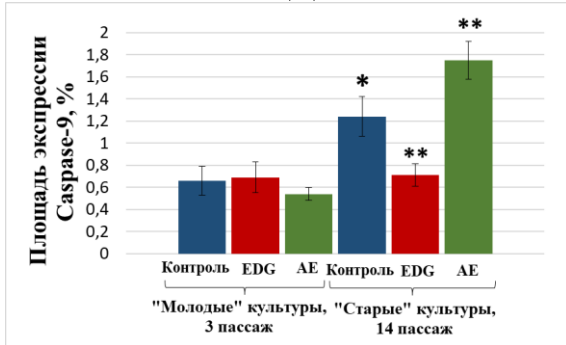
В



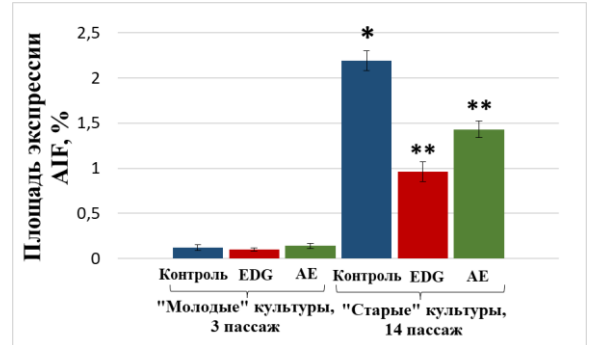
Г



Д



Е



Ж

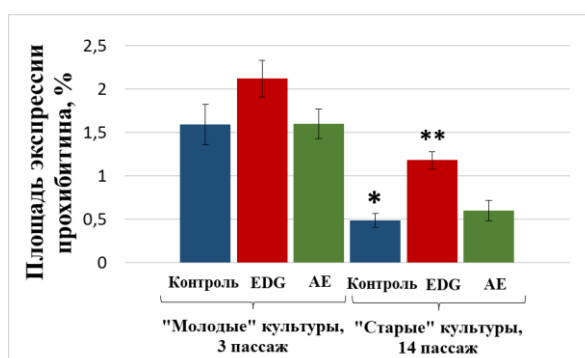


Рис. 1. Влияние пептидов на экспрессию маркеров апоптоза (А - p16, Б – p21, В –p53, Г - Caspase-8, Д - Caspase-9, Е – AIF, Ж - проингибин) в «молодых» и «старых» культурах фибробластов легкого человека.

* - $p < 0,05$ по сравнению с контролем в «молодых» культурах

** - $p < 0,05$ по сравнению с контролем в «старых» культурах

На рисунках 2-4 те же обозначения.

Таким образом, пептид EDG по сравнению с пептидом AE оказывает более выраженное антиапоптотическое действие на фибробласты легкого, влияя на факторы как рецепторного апоптоза (p16, Caspase-9), так и митохондриального апоптотического пути (AIF и проингибин).

Пептидная регуляция апоптоза лимфоцитов крови при репликативном старении

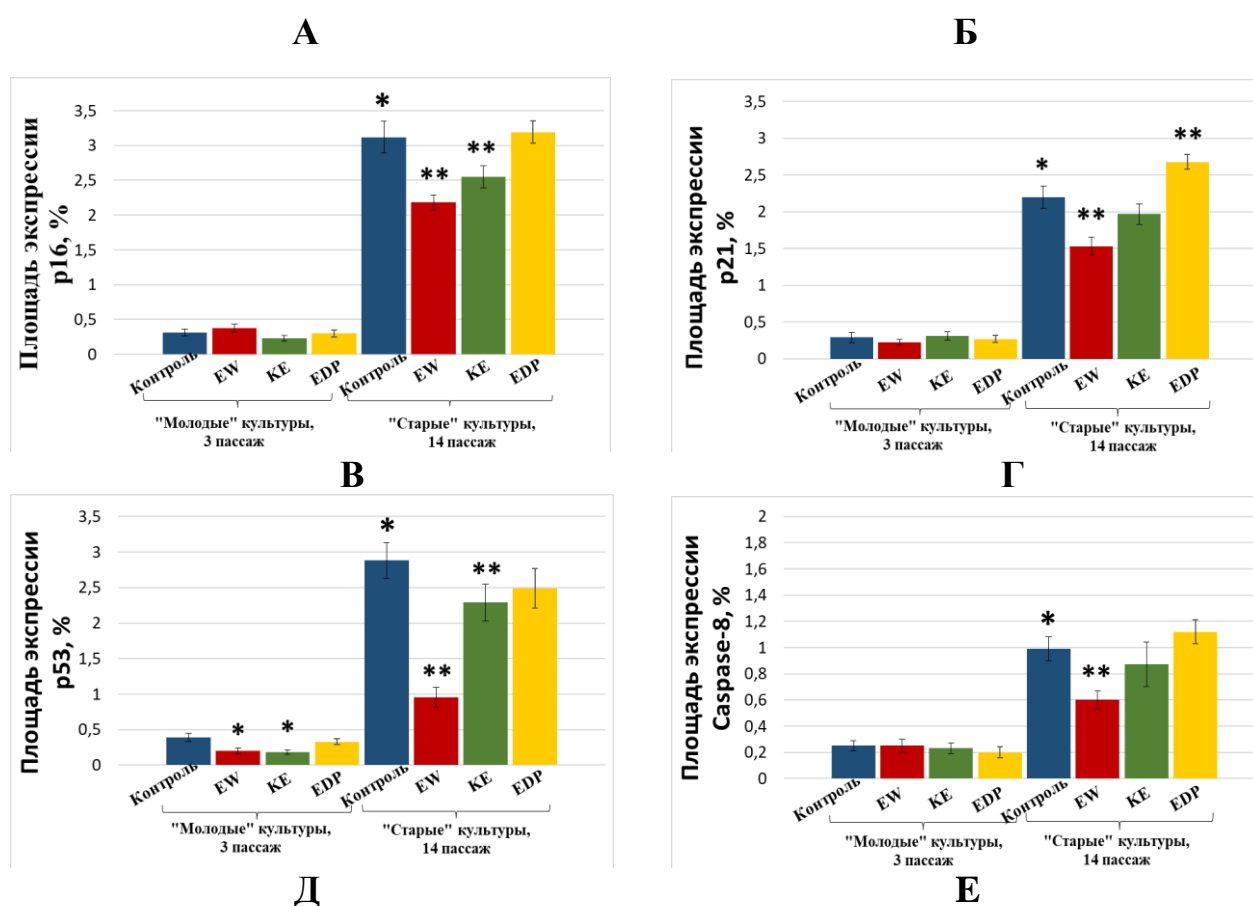
Площадь экспрессии белка p16 в контрольной группе «старых» культур лимфоцитов крови человека статистически значимо повышалась в 10,10 раза по сравнению с контрольными «молодыми» культурами ($p < 0,05$). При добавлении пептида EW площадь экспрессии p16 в «старых» культурах снижалась в 1,43 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Добавление пептида KE статистически значимо снижало экспрессию p16 в «старых» культурах лимфоцитов в 1,22 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$, рис. 2А).

Площадь экспрессии p21 в контроле «старых» культур статистически значимо увеличивалась в 7,59 раза по сравнению с «молодыми» культурами ($p < 0,05$). Добавление пептида EW приводило к снижению экспрессии p21 в 1,44 раза в «старых» культурах по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Пептид EDP статистически значимо повышал экспрессию p21 в 1,42 раза в «старых» культурах по сравнению с контролем ($p < 0,05$, рис. 2Б).

Площадь экспрессии p53 в «старых» культурах увеличивалась в 7,38 раза по сравнению с «молодыми» культурами ($p < 0,05$). Добавление пептида EW статистически значимо снижало экспрессию p53 в «молодых» и «старых» культурах соответственно в 1,95 и 3,03 раза. Добавление пептида KE вызывало снижение экспрессии p53 в «молодых» культурах в 2,17 раза и в 1,26 раза – в «старых» культурах по сравнению с контролем ($p < 0,05$, рис. 2В).

Площадь экспрессии Caspase-8 в «старых» культурах статистически значимо увеличивалась в 3,96 раза по сравнению с «молодыми» культурами ($p < 0,05$). Добавление пептидов не приводило к изменению экспрессии Caspase-8 в «молодых» культурах. В «старых» культурах под действием пептида EW наблюдалось уменьшение экспрессии Caspase-8 в 1,65 раза ($p < 0,05$, рис. 2Г). Площадь экспрессии Caspase-9 в «старых» культурах статистически значимо увеличивалась в 3,70 раза по сравнению с «молодыми» культурами ($p < 0,05$). При добавлении пептидов EW, KE и EDP в «старых» культурах экспрессия этого маркера снижалась в 3,38, 1,41 и 1,32 раза соответственно ($p < 0,05$, рис. 2Д).

Площадь экспрессии AIF в контроле «старых» культур лимфоцитов крови была статистически значимо в 2,70 раза выше по сравнению с этим показателем в «молодых» культурах ($p < 0,05$).



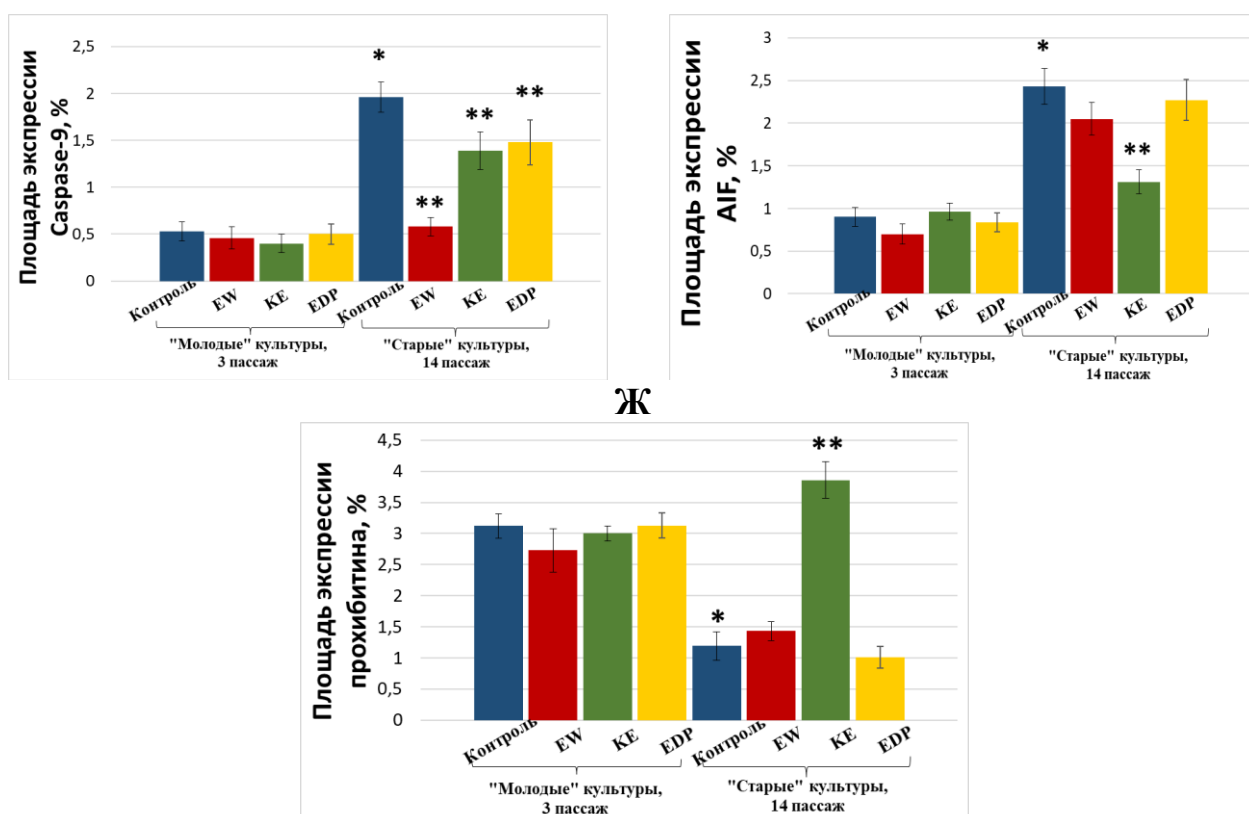


Рис. 2. Влияние пептидов на экспрессию маркеров апоптоза (А - p16, Б – p21, В – p53, Г - Caspase-8, Д - Caspase-9, Е – AIF, Ж - прохибитин) в «молодых» и «старых» культурах лимфоцитов крови человека.

Площадь экспрессии AIF в контроле «старых» культур лимфоцитов крови была статистически значимо в 2,70 раза выше по сравнению с этим показателем в «молодых» культурах ($p < 0,05$). Добавление пептида KE вызвало снижение экспрессии AIF в «старых» культурах лимфоцитов крови в 1,85 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$, рис. 2Е). Площадь экспрессии прохибитина в контроле «старых» культур лимфоцитов крови была в 2,62 раза ниже по сравнению с этим показателем в «молодых» культурах ($p < 0,05$). Пептид KE статистически значимо повышал экспрессию прохибитина в «старых» культурах лимфоцитов крови в 3,24 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$, рис. 2Ж).

Таким образом, при добавлении пептида EW наблюдалось снижение экспрессии AIF и повышение экспрессии прохибитина в «старых» культурах лимфоцитов крови человека по сравнению с контролем. По-видимому, иммунопротекторное действие EW реализуется не только посредством воздействия на транскрипционные факторы и каспазы апоптоза, но и путем воздействия на митохондриальный путь апоптоза.

Пептидная регуляция апоптоза клеток почек при репликативном старении

В контроле «старых» культур клеток почек площадь экспрессии p16 была статистически значимо в 3,89 раза выше, чем в «молодых» культурах

($p < 0,05$). Пептид AED снижал этот показатель в «молодых» и «старых» культурах, соответственно, в 1,81 и 1,95 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$). В «старых» культурах экспрессия p16 под действием пептидов EDL и DW снижалась, соответственно, в 1,59 раза и 2,56 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$, рис. 3А).

В контроле «старых» культур клеток почек площадь экспрессии p21 была статистически значимо в 2,47 раза выше, чем в «молодых» культурах ($p < 0,05$). Добавление пептида AED снижало этого показатель в «молодых» и «старых» культурах, соответственно, в 2,61 и 2,21 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$). При добавлении пептида EDL в «молодых» и «старых» культурах клеток почек наблюдалось снижение экспрессии p21, соответственно, в 2,21 и 1,46 раза ($p < 0,05$). Пептид DW снижал этот показатель в «старых» культурах в 2,41 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$, рис. 3Б).

В контроле «старых» культур клеток почек площадь экспрессии p53 была статистически значимо в 4,17 раза выше, чем в «молодых» культурах ($p < 0,05$). В «старых» культурах под действием пептида AED экспрессия p53 снижалась в 3,24 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$). В «старых» культурах клеток почек добавление пептида DW снижало экспрессию p53 в 2,73 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$, рис. 3В).

В контроле «старых» культур клеток почек площадь экспрессии Caspase-8 была статистически значимо в 2,44 раза выше, чем в «молодых» культурах ($p < 0,05$). В «старых» культурах экспрессия Caspase-8 под действием пептида AED снижалась в 1,49 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

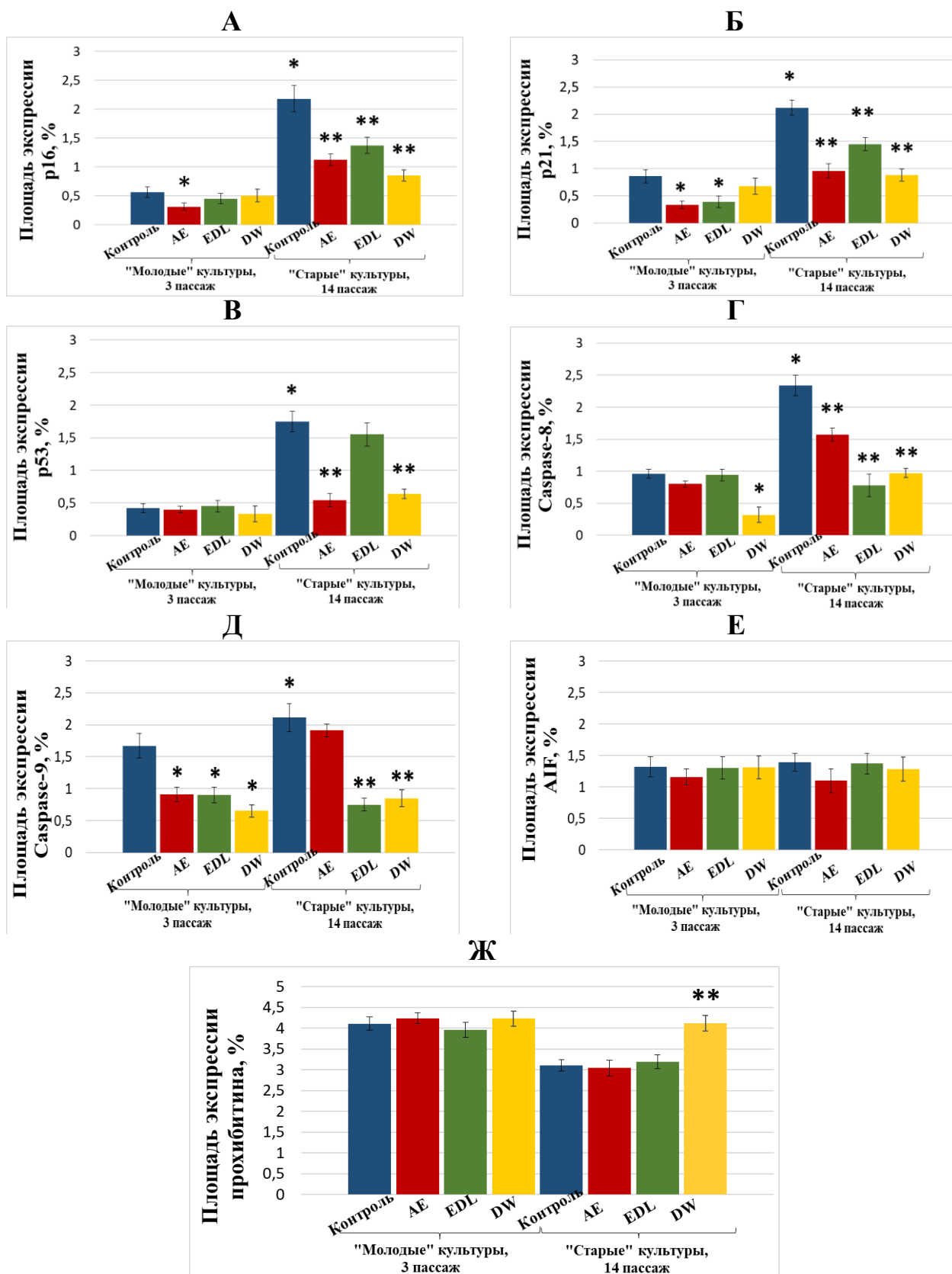


Рис. 3. Влияние пептидов на экспрессию маркеров апоптоза (А - p16, Б – p21, В – p53, Г - Caspase-8, Д - Caspase-9, Е – AIF, Ж - проингибитин) в «молодых» и «старых» культурах клеток почек крысы.

В «старых» культурах добавление пептида EDL приводило к снижению экспрессии Caspase-8 в 3 раза ($p < 0,05$). Добавление пептида DW приводило к снижению экспрессии Caspase-8 в «молодых» культурах клеток почки в 3 раза, а в «старых» культурах - в 2,41 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$, рис. 3Г).

В контрольной группе «старых» культур клеток почек площадь экспрессии Caspase-9 была статистически значимо в 1,26 раза выше, чем в «молодых» культурах ($p < 0,05$). Добавление пептида AED привело к снижению этого показателя в 1,84 раза в «молодых» культурах по сравнению с контролем ($p < 0,05$). При добавлении пептида EDL наблюдалось снижение площади экспрессии Caspase-9 в «молодых» культурах в 1,86 раза, а в «старых» культурах – в 2,81 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Добавление пептида DW приводило к снижению площади экспрессии Caspase-9 в «молодых» культурах клеток почки в 2,57 раза, а в «старых» культурах – в 2,48 раза ($p < 0,05$, рис. 3Д).

Площадь экспрессии AIF не изменялась ни в одной из исследуемых групп (рис. 3Е). Площадь экспрессии прохибитина статистически значимо снижалась в 1,33 раза в «старых» культурах клеток почек по сравнению с «молодыми» культурами ($p < 0,05$). При добавлении пептида DW в «старых» культурах экспрессия прохибитина возрастала в 1,33 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$, рис. 3Ж).

Таким образом, нефропротекторное действие пептидов AED, EDL и DW можно связать с их способностью регулировать экспрессию рецепторного механизма апоптоза в клетках почек при их старении.

Пептидная регуляция апоптоза клеток сосудов при репликативном старении

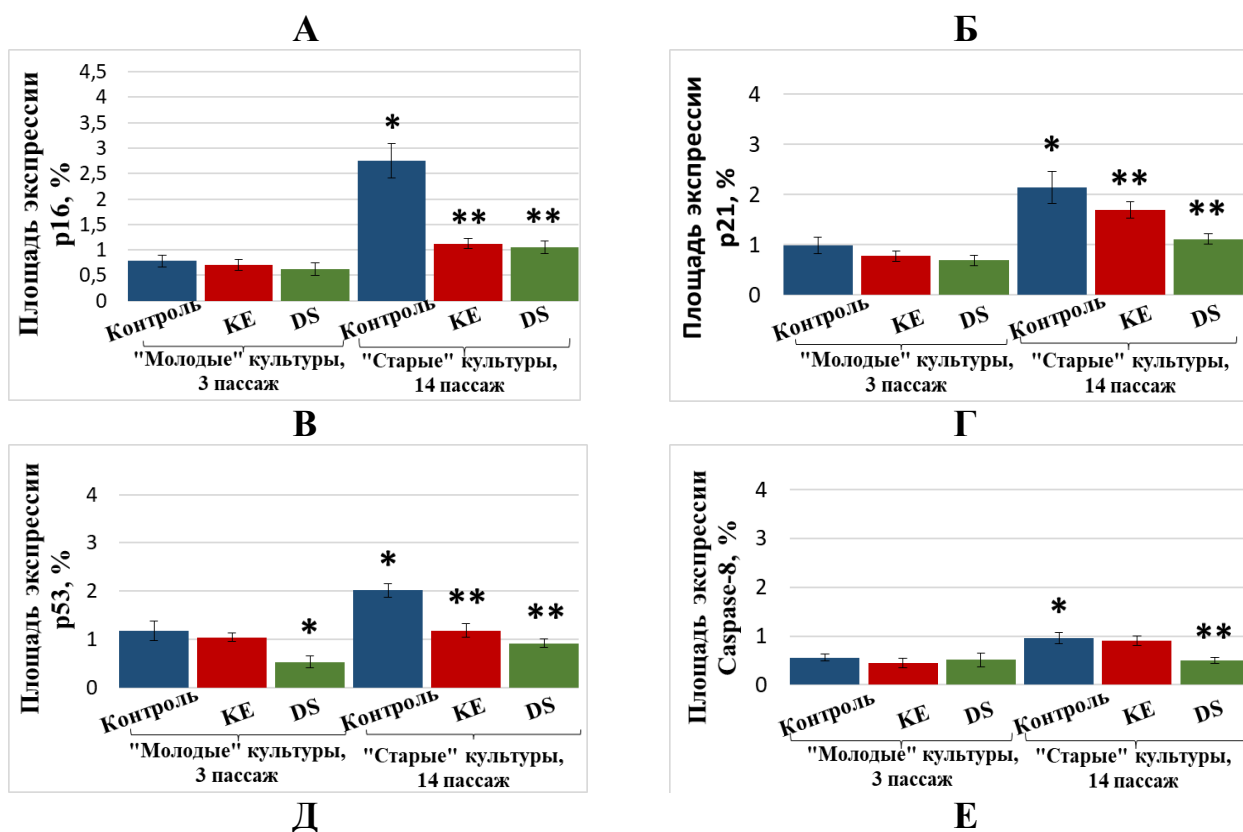
Площадь экспрессии p16 в контроле «старых» культур клеток сосудов была статистически значимо в 3,53 раза выше по сравнению с «молодыми» культурами ($p < 0,05$). При добавлении пептидов KED и DS в «старых» культурах экспрессия p16 снижалась, соответственно, в 2,46 и 2,62 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$, рис. 4А). Площадь экспрессии p21 в контроле «старых» культур клеток сосудов была в 2,17 раза выше по сравнению с «молодыми» культурами ($p < 0,05$). При добавлении пептидов KED и DS в «старых» культурах экспрессия p21 снижалась, соответственно, в 1,26 и 1,92 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$, рис. 4Б). Площадь экспрессии p53 в контроле «старых» культур клеток сосудов была в 1,71 раза выше по сравнению с «молодыми» культурами ($p < 0,05$). Пептид KED снижал экспрессию p53 в «старых» культурах в 1,71 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Добавление пептида DS приводило к снижению экспрессии p53 в «молодых» культурах в 2,23 раза, в «старых» культурах – в 2,20 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$, рис. 4В).

Площадь экспрессии Caspase-8 в контроле «старых» культур клеток сосудов была в 1,71 раза выше по сравнению с «молодыми» культурами

($p < 0,05$). Добавление пептида DS приводило к статистически значимому снижению экспрессии Caspase-8 в «старых» культурах в 1,92 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$, рис. 4Г). Площадь экспрессии Caspase-9 в контроле «старых» культур клеток сосудов была в 2,45 раза выше по сравнению с «молодыми» культурами ($p < 0,05$). Добавление пептида DS приводило к снижению экспрессии Caspase-9 в «старых» культурах в 1,76 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$, рис. 4Д).

Площадь экспрессии AIF повышалась в 1,70 раза в контрольных «старых» культурах клеток сосудов по сравнению с «молодыми» ($p < 0,05$). Добавление пептидов KED и DS не приводило к статистически значимому изменению экспрессии AIF ни в «молодых», ни в «старых» культурах (рис. 4Е). Площадь экспрессии прохибитина не изменялась во всех исследуемых группах (рис. 4Ж).

Для пептидов KED и DS не было обнаружено выраженного влияния на экспрессию маркеров митохондриального пути апоптоза ни в «молодых», ни в «старых» культурах клеток сосудов. Вероятно, это связано с воздействием KED и DS только на факторы, запускающие рецепторный механизм апоптоза.



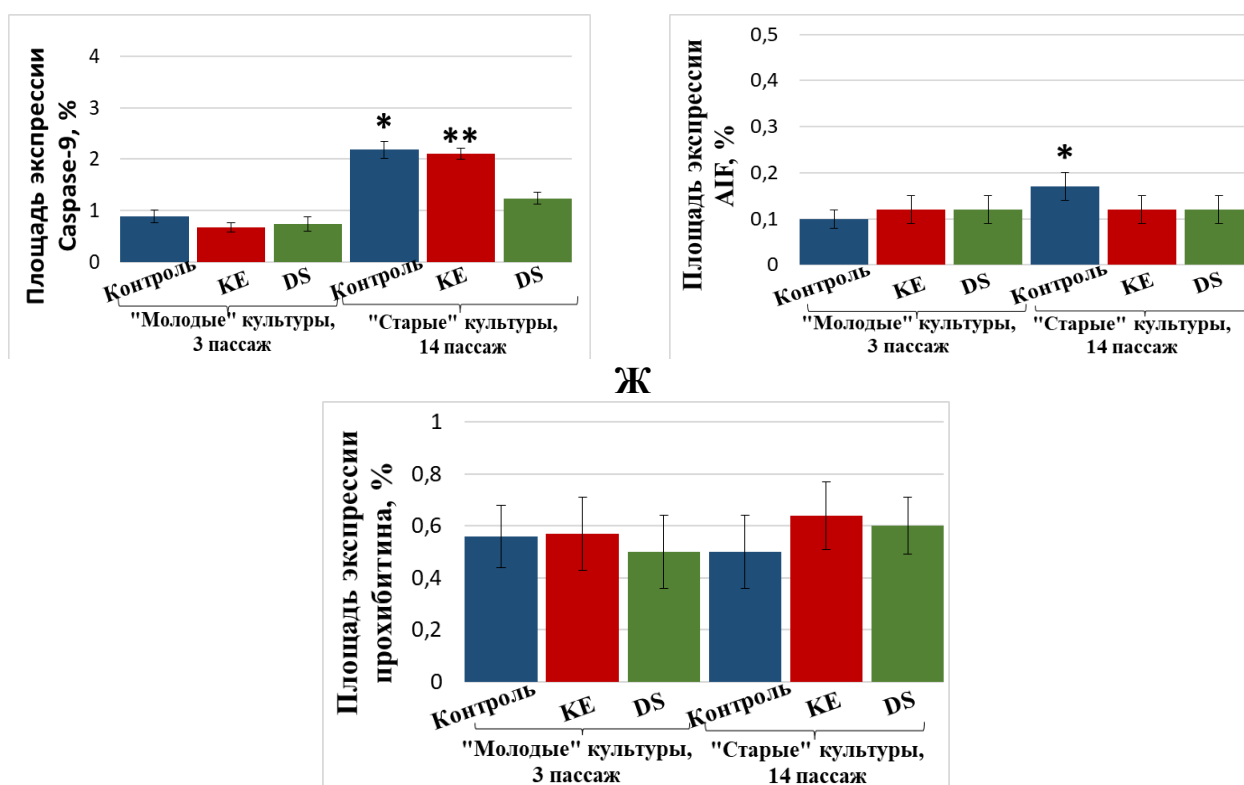


Рис. 4. Влияние пептидов на экспрессию маркеров апоптоза (А – p16, Б – p52, В – p21, Г - Caspase-8, Д - Caspase-9, Е – AIF, Ж - прохИБитин) в «молодых» и «старых» культурах клеток сосудов крысы.

Моделирование взаимодействия коротких пептидов с гистоновыми белками

На основании данных, полученных в ходе иммуноцитохимического исследования, было проведено исследование пептидов DW, DS, KE и EW, продемонстрировавших наибольшее влияние на экспрессию маркеров рецепторного и митохондриального механизмов апоптоза, с помощью молекулярного моделирования с целью исследования взаимодействия этих пептидов с гистоновыми белками.

Ранее было показано, что короткие пептиды способны связываться с гистонами H1/1, H1/3, H1/6, H2b, H3 и H4 [Федорева Л.И. и др., 2013]. Связывание пептидов с гистонами зависит от природы гистона и первичной структуры пептида, т.е. существует сайт-специфическое взаимодействие коротких пептидов с гистонами. Предполагается, что сайт-специфическое связывание коротких пептидов с гистонами может модулировать действие различных ферментов на гистоны хроматина и существенно влиять на множественные известные энзиматические модификации «хвостов» гистонов, вовлеченных в эпигенетические механизмы регуляции генетических процессов. Т.е. пептиды могут не только взаимодействовать с ДНК, но и регулировать активность генов посредством взаимодействия с гистонами.

При моделировании взаимодействия пептидов DW, DS, KE и EW с гистонами H1/1, H1/3, H1/6, H2b, H3, H4 были получены следующие данные. Пептиды DW и EW имели малую специфичность связывания с гистонами из-за наличия стерического препятствия за счет остатка триптофана. Пептиды DW, DS, KE и EW связывались с гистонами H4 по N-концевому домену по последовательности Lys-Arg-His-Val-Leu-Arg-Asp-Asn. Пептиды DW, DS, KE и EW связывались с гистонами H3 по N-концевому домену по последовательности Lys-Ser-Thr-Lys-Arg-Lys. Все пептиды связывались с гистонами H2b по N-концевому домену по последовательности Val-Glu-Thr-Ser-Asn-Ser-Asn. По результатам докинга мы заключили, что наиболее выгодное взаимодействие с гистонами H1/3 создает пептид EW, с гистонами H1/6 – пептид DS (рис. 5 А,Б).

Таким образом, используя молекулярное моделирование, мы показали, что пептиды DW, DS, KE, EW предпочитают связываться с гистонами по сайтам, которые взаимодействуют с ДНК. Предполагается, что в этих сайтах происходит конкурентное связывание пептидов и гистона с молекулой ДНК. В связи с этим выдвинуто предположение, что связывание пептида с гистонами может служить механизмом, через который реализуется антиапоптотический эффект дипептидов.

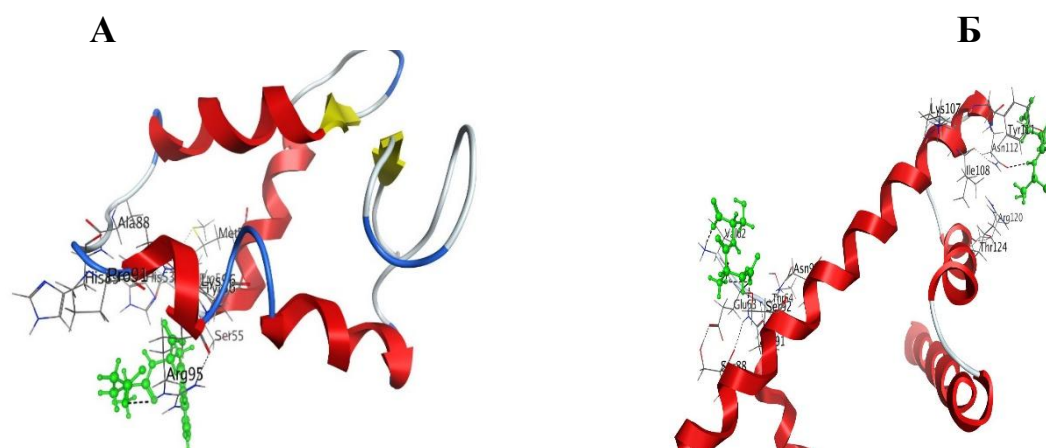


Рис. 5. Пептид-гистоновые взаимодействия. **А.** Взаимодействие пептида EW с гистонами H1/3. **Б.** Взаимодействие пептида DS с гистонами H1/6. Молекула гистона изображена в виде α -спиральных доменов и петель. Красным цветом изображены атомы кислорода, синим цветом – атомы азота, черным цветом – атомы углерода, светло-серым цветом – атомы водорода. Пептид выделен зеленым цветом. Пунктиром изображены водородные связи.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе впервые изучено влияние пептидов EDG, AE, EW, KE, EDP, AED, EDL, DW, KED и DS на процессы рецепторного и митохондриального механизмов апоптоза в претерпевающих репликативное старение культурах фибробластов легкого, лимфоцитов крови, почек и сосудов.

В результате сравнительного изучения влияния этих пептидов на экспрессию маркеров рецепторного (p16, p21, p53, Caspase-8,-9) и митохондриального (AIF, прохибитин) механизмов апоптоза установлено, что пептиды EDG и AE снижают уровень рецепторного и митохондриального апоптоза как в «молодых», так и в «старых» культурах фибробластов легкого. При этом пептид EDG вызывает более выраженный антиапоптотический эффект.

В работе впервые продемонстрированы бронхопротекторные свойства пептидов EDG и AE на молекулярном и клеточном уровнях: ранее влияние этих пептидов на бронхо-легочную систему было показано только на уровне организма. Вероятно, бронхопротекторный эффект пептидов EDG и AE реализуется посредством антиапоптотического действия. Согласно данным литературы, повышенная экспрессия маркеров апоптоза в тканях бронхо-легочной системы зачастую коррелирует с риском возникновения патологий бронхо-легочной системы, ассоциированных со старением [Álvarez D. et al., 2017; Jiang C. et al., 2017]. Применение пептидов EDG и AE, как было показано в данной диссертации, приводит к снижению экспрессии проапоптотических факторов p16, Caspase-9, AIF, замедляя апоптотические процессы в фибробластах легких. Интересно, что антиапоптотическое действие этих пептидов направлено как на рецепторный, так и на митохондриальный пути апоптоза.

В работе было продемонстрировано, что пептиды EW, KE и EDP достоверно снижали экспрессию проапоптотических факторов p16, p21, p53, Caspase-8,-9 в 1,2-3,1 раза в «старых» культурах лимфоцитов крови человека. При этом пептид KE оказывал наиболее комплексное антиапоптотическое действие, снижая также экспрессию маркера митохондриального апоптоза AIF в 1,85 раза и повышая экспрессию антиапоптотического фактора прохибитина в 3,24 раза в «старых» культурах лимфоцитов крови. Это хорошо согласуется с имеющимися в литературе данными, согласно которым пептид KE обладает выраженным иммунопротекторным действием, стимулируя клеточный иммунитет и оказывая активирующее воздействие на макрофаги и нейтрофилы [Щербак В.А., Патеюк А.В., 2004]. По данным других исследований, пептид KE стимулирует дифференцировку и активацию Т- и В-лимфоцитов, а также повышает неспецифическую резистентность организма [Линькова Н.С. и др., 2011; Anisimov V.N., Khavinson V.Kh., 2010]. При старении функциональность иммунной системы организма снижается, а уровень апоптотических процессов, как показано в диссертации, увеличивается. Пептид KE снижает уровень рецепторного и митохондриального апоптоза при старении, повышая тем самым активность иммунной системы организма, что может являться механизмом иммунопротекторного действия данного пептида.

Установлено, что пептиды AED, EDL, DW уменьшают выраженность рецепторного апоптоза в «старых» культурах клеток почек, снижая экспрессию проапоптотических факторов p16, p21, p53, Caspase-8,-9 в 1,4-3,2

раза. Ранее было продемонстрировано, что пептиды AED и EDL в несколько раз снижают экспрессию маркера p53 в культурах тканей почки старых крыс [Чалисова Н.И. и др., 2015], что было подтверждено в настоящей работе. Согласно данным литературы, интенсивность рецепторного апоптоза, определяемая по экспрессии p53, повышается при острой почечной недостаточности, причем наиболее интенсивно этот процесс происходит при старении организма [Clements M.E. et al., 2013; Han J. et al., 2013]. Нефропротекторные свойства пептидов AED и EDL, вероятно, реализуются посредством ингибирующего влияния на экспрессию маркеров рецепторного апоптоза.

Установлено, что пептиды KED и DS снижают выраженность рецепторного апоптоза в культурах клеток сосудов, подавляя экспрессию проапоптотических факторов p16, p21, p53, Caspase-8 в 1,3-2,6 раза. Согласно данным литературы, пептиды KED и DS демонстрировали вазопротекторные свойства на уровне организма, повышая резистентность капилляров и нормализуя микроциркуляцию крови. Однако механизм действия этих пептидов оставался неясным [Китачёв К. В. и др., 2013; Хавинсон В. Х. и др., 2013]. В нашей работе показано, что под действием пептидов KED и DS в культурах клеток сосудов снижается интенсивность рецепторного апоптоза, ассоциированного с клеточным старением. Интересно, что под действием KED и DS снижается экспрессия Caspase-8, но не Caspase-9. Вероятно, действие пептидов в этом случае реализуется через какую-либо другую эффекторную каспазу.

Предполагается, что короткие пептиды осуществляют сайт-специфическое взаимодействие с ДНК, что приводит к изменению характера экспрессии генов. Таким образом, специфические ДНК-пептидные взаимодействия могут эпигенетически контролировать экспрессию генов, и, возможно, этот механизм играет важную роль уже на самых ранних этапах эволюции живой материи. Также существует гипотеза, согласно которой сайт-специфичное связывание коротких пептидов с гистонами может модулировать действие различных ферментов на гистоны хроматина и служить эпигенетическим механизмом регуляции генетических процессов, то есть пептиды могут обеспечивать регуляцию активности генов посредством взаимодействия не только с ДНК, но и с гистонами [Федорева Л.И. и др., 2013].

С помощью молекулярного моделирования было проведено исследование взаимодействия пептидов DS, DW, KE, EW с гистоновыми белками. Показано, что пептиды DW и EW имеют малую специфичность связывания с гистонами из-за наличия стерического препятствия за счет остатка триптофана. Пептиды DS, DW, KE, EW связываются с гистоном H4 по N-концевому домену по последовательности Lys-Arg-His-Val-Leu-Arg-Asp-Asn. Также исследованные дипептиды связываются с гистоном H3 по N-концевому домену по последовательности Lys-Ser-Thr-Lys-Arg-Lys и с гистоном H2b – по N-концевому домену по последовательности Val-Glu-Thr-

Ser-Asn-Ser-Asn. По результатам докинга мы заключили, что наиболее энергетически выгодное взаимодействие с гистоном H1/3 обеспечивает пептид EW, с гистоном H1/6 – пептид DS. Установлено, что пептиды предпочтительнее всего связываются с гистонами по сайтам, которые взаимодействуют с ДНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе продемонстрировано выраженное антиапоптотическое действие коротких пептидов для различных тканей. Полученные данные хорошо согласуются с имеющимися данными литературы и дополняют их, объясняя молекулярные механизмы бронхопротекторных свойств пептидов EDG и AE, иммунопротекторных свойств пептидов EW, KE и EDP, нефропротекторных свойств пептидов AED, EDL и DW, вазопротекторных свойств пептидов KED и DS.

Полученные результаты исследования позволяют сформулировать концепцию влияния пептидной регуляции апоптоза на старение клеток. Короткие пептиды регулируют апоптоз по двум сигнальным путям: митохондриальному и рецепторному. Молекулярными мишенями действия ди- и трипептидов в реализации рецепторного механизма апоптоза являются некоторые каспазы и транскрипционные факторы – маркеры клеточного старения p16, p21, p53. Влияние ди- и трипептидов на митохондриальный путь апоптоза реализуется через белок AIF. Предполагается, что короткие пептиды взаимодействуют с гистонами H3, H4, H1/3, H1/6, в результате чего происходит изменение силы связывания ДНК и гистонов, и гены, кодирующие апоптотические белки, становятся менее доступными для транскрипции.

ВЫВОДЫ

1. Репликативное старение фибробластов легкого человека в культуре сопровождается возрастанием экспрессии маркеров рецепторного (p16, p53, Caspase-9) и митохондриального (AIF) апоптоза, а также снижением экспрессии прохибитина. Добавление в культуру пептидов EDG и AE способствует снижению уровня экспрессии проапоптотического протеина p16 – в 2,5-3 раза, Caspase-9 – в 1,75 раза, AIF – в 1,5-2,8 раза. При этом пептид EDG повышает экспрессию прохибитина в «молодых» и «старых» культурах в 1,3-2,4 раза.
2. Репликативное старение лимфоцитов крови человека в культуре сопровождается повышением экспрессии маркеров рецепторного (p16, p21, p53, Caspase-8,-9) и митохондриального (AIF) апоптоза и снижением экспрессии прохибитина. Добавление в культуру пептидов EW, KE, EDP способствует снижению уровня экспрессии белка p16 – в 1,2-1,4 раза, белка p21 – в 1,4-2,1 раза, Caspase-8 – в 1,3-3,4 раза, AIF – в 1,85 раза. Пептид KE повышает экспрессию прохибитина в 3,24 раза в «старых» культурах лимфоцитов.

3. При репликативном старении клеток почек крыс в культуре экспрессия маркеров рецепторного апоптоза p16, p21, p53, Caspase-8,-9 возрастает. Пептиды AED, EDL, EW снижают уровень экспрессии проапоптотических маркеров p16, p21, Caspase-8,-9 в 1,4-2,7 раза в «старых» культурах клеток почек. Пептиды AED и EW снижают экспрессию p53 в 2,7-3,2 раза в «старых» культурах клеток почек.
4. При репликативном старении клеток сосудов крыс в культуре экспрессия маркеров рецепторного апоптоза p16, p21, p53, Caspase-8,-9 возрастает. Экспрессия маркера митохондриального апоптоза AIF также возрастает при старении культур клеток почек. Пептиды KED и DS снижают экспрессию проапоптотических белков p16, p21, p53 в 1,3-2,6 раза в «старых» культурах клеток сосудов. Пептид DS также снижает экспрессию Caspase-8,-9 в 1,9 и 1,8 раза в «старых» культурах клеток сосудов.
5. По данным молекулярного моделирования пептиды DS, DW, KE, EW связываются с гистоном H4 по N-концевому домену по последовательности Lys-Arg-His-Val-Leu-Arg-Asp-Asn. Пептиды DS, DW, KE, EW связываются с гистоном H3 по N-концевому домену по последовательности Lys-Ser-Thr-Lys-Arg-Lys. Пептиды DS, DW, KE, EW связываются с гистоном H2b по N-концевому домену по последовательности Val-Glu-Thr-Ser-Asn-Ser-Asn. Наиболее энергетически выгодное взаимодействие с гистоном H1/3 обеспечивает пептид EW, с гистоном H1/6 – пептид DS.
6. Ди- и трипептиды снижают выраженность рецепторного и митохондриального апоптоза в фибробластах легких и лимфоцитах крови человека, клетках почек и сосудов крыс при репликативном старении.
7. Предполагаемым механизмом антиапоптотического действия коротких пептидов может являться изменение доступности генов, кодирующих белки апоптоза, путем взаимодействия гистонов H3, H4, H1/3, H1/6 с пептидами.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Пептиды EDG и AE можно рекомендовать для исследования в качестве бронхотекторных средств у животных при естественном и ускоренном старении. Аналогичные рекомендации можно дать по пептидам EW, KE – для иммунопротекции, AED, EDL, DW – для нефропротекции и KED, DS – для вазопротекции.
2. Рекомендуется изучение взаимодействия пептида EW с гистоном H1/3 и пептида DS с гистоном H1/6 физико-химическими методами для более фундаментального понимания молекулярного механизма гистон-пептидных взаимодействий.
3. Данные о пептид-гистоновых взаимодействиях можно рекомендовать в качестве базы для разработки таргетной терапии возраст-ассоциированных заболеваний с помощью коротких геропротекторных пептидов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ***Статьи в журналах, включенных в Перечень ВАК Минобрнауки РФ***

1. Влияние аминокислот на экспрессию сигнальных молекул в органотипической культуре селезенки / Е.А. Концевая, Н.С. Линькова, Н.И. Чалисова, А.В. Дудков, Д.А. Синячкин // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2012. – № 2. – С. 102-105.
2. Влияние коротких пептидов на экспрессию сигнальных молекул в органотипической культуре клеток эпифиза / В.Х. Хавинсон, Н.С. Линькова, Н.И. Чалисова, А.В. Дудков, Е.А. Концевая // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2011. – № 3. – С. 151-154.
3. Влияние полипептидов на пролиферацию и апоптоз клеток при старении / А.П. Рыжак, Н.И. Чалисова, Н.С. Линькова, Т.Е. Ничик, А.В. Дудков, Н.В. Колчина, Г.А. Рыжак, Р.И. Халимов // Клеточные технологии в биологии и медицине. - 2016. - № 4. - С. 221-225.
4. Влияние трипептида на физиологическую активность клеток нейроиммуноэндокринной системы / Н.И. Чалисова, Н.Г. Лопатина, Н.Г. Камышев, Н.С. Линькова, Е.А. Концевая, А.В. Дудков, Л.С. Козина, В.Х. Хавинсон // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2012. – № 2. – С. 98-101.
5. Возрастная динамика дифференцировки иммунных клеток тимуса человека / В.Х. Хавинсон, Н.С. Линькова, В.О. Полякова, А.В. Дудков, И.М. Кветной // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – Т. 151. – № 5. – С. 569-572.
6. Дудков А.В. Пептидная регуляция каспаза-зависимого апоптоза при клеточном старении / А.В. Дудков // Современные проблемы науки и образования. – 2019. – №2. – С. 1-11. URL: <http://www.science-education.ru/article/view?id=28701>.
7. Компенсаторное действие пептидов эпифиза на органы иммунной и эндокринной системы у эпифизэктомированных крыс / Н.С. Линькова, В.Х. Хавинсон, А.В. Трофимов, А.В. Дудков // Научные ведомости БелГУ. Серия Медицина. Фармация. – 2011. – Вып. 13/1. – № 4 (99). – С. 86-90.
8. Линькова Н.С. Пептиды эпифиза и коры головного мозга стимулируют дифференцировку полипотентной эмбриональной ткани / Н.С. Линькова, А.В. Трофимов, А.В. Дудков // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2011. – № 2. – С. 97-98.
9. Молекулярные аспекты патологии почек / Т.Е. Ничик, Н.С. Линькова, Н.А. Красковская, А.В. Дудков, В.Х. Хавинсон // Успехи физиологических наук. – 2014. – Т. 45. – №1. – С. 95-102.
10. Молекулярные маркеры каспаза-зависимого и митохондриального апоптоза: роль в развитии патологии и процессах клеточного старения /

- А.С. Дятлова, А.В. Дудков, Н.С. Линькова, В.Х. Хавинсон // *Успехи современной биологии* – 2018. – Т. 138, №2. – С. 126-137.
11. Пептид эпифиза восстанавливает функциональную активность поджелудочной железы при индуцированном сахарном диабете / В.Х. Хавинсон, Н.С. Линькова, А.В. Трофимов, А.В. Дудков // *Научные ведомости БелГУ. Серия Медицина. Фармация.* – 2011. – Вып. 13/1. – № 4 (99). – С. 81-85.
 12. Пептидергическая регуляция экспрессии генов, кодирующих антиоксидантные и противовоспалительные белки / В.Х. Хавинсон, Н.С. Линькова, А.В. Дудков, В.О. Полякова, И.М. Кветной // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 2011. – Т. 152. – № 11. – С. 548-551.
 13. Пептидная регуляция процессов клеточного обновления в культурах тканей почек молодых и старых животных / Н.И. Чалисова, Н.С. Линькова, Т.Е. Ничик, А.П. Рыжак, А.В. Дудков, Г.А. Рыжак // *Клеточные технологии в биологии и медицине.* – 2015. – № 1. – С. 10-14.
 14. Сравнительное влияние пептидов KE и EW на рост нормальных и опухолевых клеток / Н.С. Линькова, Е.С. Миронова, О.М. Ивко, О.А. Орлова, А.В. Дудков // *Медицинский академический журнал.* 2019. Специальный выпуск. С. 174 – 176.
 15. Тетрапептид стимулирует функциональную активность клеток поджелудочной железы при старении / В.Х. Хавинсон, Н.Н. Севостьянова, А.О. Дурнова, Н.С. Линькова, С.И. Тарновская, А.В. Дудков, Т.В. Кветная // *Успехи геронтологии.* – 2012. – Т. 25. – № 4. – С. 680-684.
 16. Экспрессия коллагена I типа, сиртуина-6 и матриксной металлопротеиназы-1 в фибробластах кожи человека в процессе длительного культивирования / Н.В. Фридман, Н.С. Линькова, В.О. Полякова, А.О. Дробинцева, С.В. Трофимова, А.В. Дудков, В.Х. Хавинсон, И.М. Кветной // *Морфология.* – 2018. – Т. 153, №1. – С. 39-44.

Статьи в других журналах

17. Пептиды тканеспецифически стимулируют экспрессию сигнальных молекул в культурах клеток селезенки у животных разного возраста / Н.С. Линькова, Н.А. Червякова, А.В. Костылев, А.В. Дудков, С.М. Тендлер // *Геронтология. Научно-практический журнал.* – 2014. – Т. 2. – № 2. – С. 171-177.
18. Селезенка: онтогенез и старение / Е.П. Кузнецова, Н.С. Линькова, А.В. Дудков, М.А. Войцеховская // *Геронтологический журнал им. В.Ф. Купревича.* – 2011. – Т. 2. – № 2. – С. 9-16.
19. *Хавинсон В.Х.* Молекулярные механизмы пептидной регуляции старения / В.Х. Хавинсон, Н.С. Линькова, А.В. Дудков // *Вестник медицинского*

центра Управления делами президента Республики Казахстан. – 2015. – Т. 1. - № 58. – С. 15-24.

20. Peptides regulate cortical thymocytes differentiation, proliferation and apoptosis / V.Kh. Khavinson, V.O. Polyakova, N.S. Linkova, A.V. Dudkov, I.M. Kvetnoy // *J. Amino Acids*. – Vol. 2011. P. 1-5.

Главы в монографии

21. Влияние пептидов на дифференцировку полипотентной эмбриональной ткани и иммунных клеток человека / В.Х. Хавинсон, В.О. Полякова, И.М. Кветной, Н.С. Линькова, А.В. Дудков // В кн.: «Молекулярные основы пептидергической регуляции старения» - СПб.: Наука. – 2011. – С. 111-140.
22. *Тарновская С.И.* Исследование взаимодействия пептида EDR с гистоновыми белками *in silico* / С.И. Тарновская, А.Р. Ильина, А.В. Дудков // В кн.: Молекулярно-клеточные механизмы пептидергической регуляции функций мозга. М.: Наука, 2018. – 224 с.

Тезисы

23. *Башарина В.С.* Молекулярные механизмы пептидной регуляции функции бронхиального эпителия при патологии / В.С. Башарина, Н.С. Линькова, А.В. Дудков // VI Российский симпозиум «Белки и пептиды». – СПб, 2013. – С. 112.
24. Динамика экспрессии коннексинов при старении культур клеток сосудов / Е.В. Елашкина, А.В. Дудков, С.М. Тендлер, В.В. Бенберин, В.Х. Хавинсон // Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы геронтологии и гериатрии: от теории к практике». – 2013. - в журн. «Проблемы старения и долголетия», приложение, Т. 22. – С. 24-25.
25. Дипептид активизирует процессы клеточного обновления в почках при старении / В.Е. Проняева., Т.Е. Ничик, А.П. Рыжак, А.В. Дудков, С.М. Тендлер // Старшее поколение. - СПб, 2013. – С. 107.
26. Дипептиды снижают апоптоз лимфоцитов крови при их старении *in vitro* / Е.С. Миронова, А.В. Дудков, К.О. Ивко, В.В. Бенберин, В.Х. Хавинсон // XIV Научно-практическая геронтологическая конференция «Пушковские чтения». Специалист здравоохранения. 2018. №4(18). С. 6-7.
27. Дипептиды стимулируют иммуногенез в культуре клеток тимуса человека / Н.С. Линькова, Н.А. Червякова, А.В. Дудков, С.М. Тендлер // IV International symposium «Interactions of the nervous and immune systems in health and disease». – 2013. – С. 119-120.
28. *Дудков А.В.* Влияние пептида Ala-Glu-Asp-Leu на дифференцировку клеток бронхиального эпителия / А.В. Дудков // Матер. IV науч.-практ. конференции НИИ им. Алмазова. – СПб., 2012. – С. 19-20.

29. Дудков А.В. Восстановление иммуногенеза при старении / А.В. Дудков, Н.С. Линькова // Сб. тез. Санкт-Петербургского научного форума «Наука и общество». – Санкт-Петербург, 2011. – С. 18-19.
30. Дудков А.В. Пептиды восстанавливают иммуногенез при старении // А.В. Дудков, Н.С. Линькова / Сб. Матер. XVI Российского национального конгресса «Человек и его здоровье». – СПб, 2011. - С. 93.
31. Дудков А.В. Пептиды восстанавливают численность субпопуляции клеток D8+ в селезенке при старении / А.В. Дудков // Сб. Матер. Конф. «Пушковские чтения» в журнале «Российский семейный врач». – 2011. – Т. 15. - № 4. – С. 91-92.
32. Дудков А.В. Трипептид активирует экспрессию маркера CD68 в культуре иммунных клеток / А.В. Дудков // Медицинский академический журнал. Материалы всероссийской молодёжной конференции-школы: «Нейробиология интегративных функций мозга». – 2011. – С. 22-23.
33. Иммуномодулирующие пептиды снижают уровень апоптоза в клетках селезенки при ее старении / Н.А. Червякова, В.Е. Проняева, А.В. Дудков, А.В. Костылев // Научная конференция с международным участием «Актуальные проблемы геронтологии и гериатрии», посвященная памяти В.В. Фролькиса, 2013. Киев. – С. 65.
34. Короткие пептиды замедляют рост клеток лимфомы Беркитта / Е.С. Поправка, А.С. Дятлова, К.О. Ивко, А.В. Дудков // Материалы научно-практической конференции «Инновационные российские технологии в геронтологии и гериатрии 2017», посвященной 25-летию Санкт-Петербургского института геронтологии и гериатрии. 14-16 декабря 2017. С. 64-65.
35. Линькова Н.С. Роль митохондриального апоптоза в возрастной инволюции эпифиза / Н.С. Линькова, А.В. Дудков // Сб. матер. Международного форума «Старшее поколение». - С.-Петербург, 2011. – С. 58-59.
36. Механизм действия пептидных геропротекторов / Е.С. Поправка, А.В. Дудков // Республиканская международная конференция с международным участием «Организация оказания медицинской помощи лицам пожилого и старческого возраста». Уфа, 2016. – С. 92.
37. Молекулярные аспекты нефропротекторного действия пептидов / Т.Е. Ничик, Н.С. Линькова, Т.С. Салль, А.В. Дудков // VI Ежегодная международная научно-практическая конференция «Актуальные вопросы медицины». Азербайджан, Баку, 2017. – С. 31.
38. Молекулярные механизмы развития патологии при старении эндотелия / Н.А. Красковская, Е.В. Елашкина, Е.О. Гутоп, А.В. Дудков, В.Х. Хавинсон // Пушковские чтения. – СПб., 2014. – С. 88-89.
39. Пептидергическая регуляция экспрессии E-селектина в эндотелии сосудов при старении / Е.В. Елашкина, Е.О. Гутоп, А.В. Дудков, А.В. Костылев // Материалы межрегиональной научно-практической

- конференции «Медицинские проблемы пожилых», Казань. – 2013. - С. 10-11.
40. *Поправка Е.С.* Короткие геропротекторные пептиды подавляют рост клеток лимфомы человека / Е.С. Поправка, А.В. Дудков // XIII Международный форум «Старшее поколение», 18-21 апреля 2018. СПб. – С. 91-92.
41. *Проняева В.Е.* Геропротекторное действие пептидов на цитотоксические Т-клетки / В.Е. Проняева, Н.С. Линькова, А.В. Дудков // XVI Межд. Научно-практич. конф. «Пожилкой больной. Качество жизни». – Москва, 2011. – С. 91-92.
42. Сравнительная характеристика иммунорегулирующего действия дипептидов в клетках тимуса / А.В. Дудков, А.В. Костылев, Н.С. Линькова, В.Х. Хавинсон // III съезд геронтологов и гериатров, 2012. - С. 98.
43. Трипептид – потенциальное лекарственное средство для молекулярной терапии атеросклероза / Е.В. Елашкина, Н.С. Линькова, А.В. Костылев, А.В. Трофимов, А.В. Дудков, С.С. Коновалов // Искусство профессионалов красоты. – 2013. – № 11. – С. 33.
44. Трипептид регулирует пролиферацию и дифференцировку эмбриональных клеток тимуса / В.Х. Хавинсон, С.В. Трофимова, Н.С. Линькова, А.В. Дудков // Матер. Второй международной научной конференции «Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской приматологии». – Сочи-Адлер, 2011. – Т. 2. - С. 137-143.
45. Трипептид регулирует функции эндотелия сосудов при рестенозе / К.Л. Козлов, И.И. Болотов, В.О. Полякова, А.О. Дробинцева, А.В. Дудков // Материалы XXIII съезда физиологического общества им. И.П. Павлова. Воронеж, 2017. С. 937-939.
46. Трипептид регулирует экспрессию гена MKi67 в клетках сосудов при старении / Е.О. Гутоп, Е.В. Елашкина, А.В. Дудков, А.В. Костылев // Материалы конференции «Современные аспекты геронтологии и гериатрии: от теории к практике». - Киев, 2014. – С. 13-14.
47. Фактор роста фибробластов FGF как потенциальная мишень терапии хронических заболеваний почек / Н.С. Линькова, Т.Е. Ничик, Р.И. Халимов, А.В. Дудков, А.В. Костылев, Г.А. Рыжак // Труды VIII науч.-практ. конф. с международным участием «Здоровье – основа человеческого потенциала». – СПб. – 2013. – Т. 8. - № 2. – С. 680-681.
48. *Червякова Н.А.* Сравнительное влияние пептида Lys-Glu и входящих в его состав аминокислот на иммуногенез в селезенке / Н.А. Червякова, А.В. Дудков, С.В. Трофимова // VI Российский симпозиум «Белки и пептиды». – СПб, 2013. – С. 286.
49. *Червякова Н.А.* Сравнительное иммунопротекторное действие пептидов на экспрессию маркера В-лимфоцитов в селезенке старых животных / Н.А. Червякова, А.В. Дудков, А.В. Костылев // Человек и лекарство. – Москва, 2013. - С. 463.

50. *Linkova N.S.* Mechanisms of the peptidergic regulation of immunogenesis: molecular modeling in silico / N.S. Linkova, A.V. Dudkov // Quantitative imaging and spectroscopy in neuroscience. - SPb-Koltushi, 2012. - P. 19-20.
51. Molecular mechanism of tetrapeptide geroprotection and its genomic regulation / V.Kh. Khavinson, S.I. Tarnovskaya, V.E. Pronyaeva, N.S. Linkova, A.V. Dudkov // Тезисы докладов 2-ой международной конференции «генетика старения и долголетия». – Москва, 2012. – С. 34.
52. Peptides regulate proliferative activity of stem cells / V.Kh. Khavinson, N.S. Linkova, A.V. Dudkov, A.V. Trofimov, S.V. Trofimova // Abstracts presented at the 12th International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins (Beijing, China). – J. Amino Acids. – 2011. – Vol. 41. – Suppl. 1. – P. S63.
53. *Popravka E.* Short peptides slow the grow of Burkitt's lymphoma cells / E. Popravka, A. Dudkov // International Simposium of Experts "Effective current approaches in anti-aging medicine and gerontology" 13-14 April 2018 (Stockholm, Sweden). P. 86-87.

ДУДКОВ Александр Владимирович ПЕПТИДНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ АПОПТОЗА КЛЕТОК ПРИ СТАРЕНИИ // Автореф. дис. докт. биол. наук: 14.01.30 – геронтология и гериатрия, СПб. – 2019. – 36 с.

Подписано в печать « » _____ 2019 г. Формат 60*84 1/16.

Бумага офсетная. Печать офсетная. Печ. л. 1,0.

Тираж 100 экз. Заказ _____.

Отпечатано с готового оригинал-макета
в типографии Издательства СПбГЭТУ «ЛЭТИ»

Издательство СПбГЭТУ «ЛЭТИ»
197376, С.-Петербург, ул. проф. Попова, 5.

УКАЗАТЕЛЬ ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Виноградова И.А. и др. Синтетический пептид эпифиза уменьшает заболеваемость и развитие возрастной патологии у самцов крыс в модельных системах ускоренного старения, вызванного нарушением фотопериодизма // *Journal of Biomedical Technologies*. 2014. N1. С. 25-36; *Заморский И.И. и др.* Пептиды восстанавливают функциональное состояние почек при цирпластиновой острой почечной недостаточности // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2015. Т. 159. № 6. С. 708-712; *Заморский И.И. и др.* Нефропротекторное действие пептида EDL при остром повреждении почек различного генеза // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2017. Т.163, №3. С. 376-380; *Заморский И.И. и др.* Влияние пептидов на морфофункциональное состояние почек у старых крыс // *Успехи геронтологии*. 2018. Т.31, №4. С. 498-504; *Китачёв К. В. и др.* Роль вазоактивного пептида в лечении хронической артериальной недостаточности нижних конечностей // *Успехи геронтологии*. 2013. Т. 26. № 2. С. 292–296; *Линькова Н.С. и др.* Пептидергическая стимуляция дифференцировки иммунных клеток эпифиза // *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2011. № 3. С. 136-139; *Максимов И.Б. и др.* Биорегулирующая терапия – новое направление в современной клинической офтальмологии // *Российские медицинские вести*. 2003. № 2. С. 17-21; *Назаров П.Г.* Врожденный иммунитет и защита от инфекций // *Российский иммунологический журнал*. 2005. Т.9, №2. С. 51; *Новик А.А. и др.* Введение в молекулярную биологию канцерогенеза. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. 224 с.; *Полякова В.О., Бенберин В.В.* Экспрессия ключевых регуляторных белков апоптоза и их роль в возрастной инволюции тимуса человека // *Успехи геронтологии*. 2006. № 19. С. 28; *Торховская Т. И. и др.* Нейропептиды, цитокины и тимические пептиды как эффекторы взаимодействия тимуса и нейроэндокринной системы // *Вестник РАМН*. 2015. №6. С. 727-733; *Федореева Л.И. и др.* Взаимодействие коротких пептидов с FITC – мечеными гистонами пшеницы и их комплексами с дезоксирибоолигонуклеотидами // *Биохимия*. 2013. Т. 78, № 2. С. 230-242; *Хавинсон В.Х. и др.* Пептид, обладающий стресспротекторным действием, фармацевтическая композиция на его основе и способы ее применения: Патент РФ 2304444 МПК А 61 К 38/06, А 61 Р 25/00. № 2006117586/15; Заявл. 23.05.2006; Оpubл. 20.06.2007 Бюл. № 23; *Хавинсон В.Х. и др.* Молекулярные аспекты антиатеросклеротического действия коротких пептидов // *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2014. № 3. С. 185-189; *Хавинсон В. Х. и др.* Пептид, обладающий иммуногеропротекторным действием, фармацевтическая композиция на его основе и способы ее применения: Патент РФ 2301074 МПК А 61 К 38/06, А 61 Р 37/02, № 2006118488/15. Заявл. 30.05.2006. Оpubл. 20.06.2007. Бюл. № 17; *Хавинсон В.Х. и др.* Морфофункциональные основы пептидной регуляции старения // *Успехи современной биологии*. 2011. Т. 131. № 2. С. 115-121; № 3. С. 185-189; *Хавинсон В.Х. и др.* Пептиды регулируют экспрессию сигнальных молекул в клеточных культурах почек при старении *in vitro* // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2014 (а). Т. 157, №2. С. 227-230; *Хавинсон В.Х. и др.* Трипептиды замедляют процесс старения в культурах клеток почек // *Успехи геронтологии*. 2014 (б). Т.27, №4. С. 651-656; *Хавинсон В.Х. и др.* Перспективы применения тетрапептида в лечении хронического бронхита: молекулярные механизмы // *Молекулярная медицина*. 2014 (в). №6. С. 14-20; *Хавинсон В.Х. и др.* Эпигенетические аспекты пептидной регуляции пролиферации эндотелия сосудов при его старении // *Успехи геронтологии*. 2014 (г). Т. 27. № 1. С. 108-114; *Хавинсон В.Х. и др.* Молекулярные аспекты антиатеросклеротического действия коротких пептидов // *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2014 (д). *Хавинсон В.Х. и др.*

Зависимость тканеспецифического действия пептидов от количества аминокислот, входящих в их состав // *Фундаментальные исследования. Серия Биология*. 2015. №2. С. 497-503; *Хохлов А.Н.* Тестирование геропротекторов в экспериментах на клеточных культурах: за и против // *Проблемы старения и долголетия*. 2009. Т. 18. № 1. С. 3236; *Хохлов А.Н.* Эволюция термина «cellular senescence» и ее влияние на состояние современных цитогеронтологических исследований // *Вестник Московского университета. Серия 16: Биология*. 2013. № 4. С. 18-22; *Хохлов А.Н. и др.* Тестирование геропротекторов в экспериментах на клеточных культурах: выбор оптимальной модельной системы // *Вестник Московского университета. Серия 16: Биология*. 2014. № 1. С. 13-18; *Чалисова Н.И. и др.* Пептидная регуляция процессов клеточного обновления в культурах тканей почек молодых и старых животных // *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2015. № 1. С. 10-14; *Щербак В.А., Памеюк А.В.* Влияние вилона на иммунный ответ при остром иммобилизационном стрессе у крыс // *Сибирский медицинский журнал*. 2004. Т. 44. № 3. С. 26-29; *Anisimov V.N., Khavinson V.Kh.* Peptide bioregulation of aging: results and prospects // *Biogerontology*. 2010. Vol. 11. P. 139-149; *Álvarez D. et al.* IPF lung fibroblasts have a senescent phenotype // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2017. Vol. 313(6). P. L1164-L1173; *Baris O.R. et al.* The mitochondrial electron transport chain is dispensable for proliferation and differentiation of epidermal progenitor cells // *Stem Cells*. 2011. № 29. P. 1459–1468; *Clements M.E. et al.* Increased cellular senescence and vascular rarefaction exacerbate the progression of kidney fibrosis in aged mice following transient ischemic injury // *PLoS One*. 2013. Vol. 8. N. 8. e70464. doi:10.1371/journal.pone.0070464; *Denic A. et al.* Structural and Functional Changes With the Aging Kidney // *Adv Chronic Kidney Dis*. 2016. 23(1). P. 19-28; *Farina B. et al.* Structural and biochemical insights of CypA and AIF interaction // *Scientific Reports*. 2017. № 7 (1). P. 1138–1145; *Jiang C. et al.* Serpine 1 induces alveolar type II cell senescence through activating p53-p21-Rb pathway in fibrotic lung disease // *Aging Cell*. 2017. 16(5). P. 1114-1124; *Han J. et al.* The molecular mechanism and potential role of heat shock-induced p53 protein accumulation // *Mol. Cell. Biochem*. 2013. Vol. 378, N 1 2. P. 161-169; *Khavinson V.Kh., et al.* Mechanism of biological activity of short peptides: Cell penetration and epigenetic regulation of gene expression // *Biology Bulletin Reviews*. 2013. V. 3. N. 6. P. 451-455; *Li P. et al.* Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 1997. Vol. 91. P. 479—489; *Mahajan A.* Practical issues in the application of p16 immunohistochemistry in diagnostic pathology // *Human Pathology*. 2016. Vol. 51. P.64-74; *Pan R. et al.* Synthetic Lethality of Combined Bcl-2 Inhibition and p53 Activation in AML: Mechanisms and Superior Antileukemic Efficacy // *Cancer Cell*. 2017. Vol. 32(6). P. 748-760; *Read A.P., Strachan T.* Human molecular genetics 2. N.Y.: Wiley-Liss, 1999. 576 p.; *Salmena L. et al.* Essential role for caspase-8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity // *Genes Development*. 2003. № 17 (7). P. 883–895; *Shah A.R., Kennedy P.M.* The Aging Face // *Med Clin North Am*. 2018. Vol. 102(6). P. 1041-1054; *Rohme D.* Evidence for a relationship between longevity of mammalian species and life spans of normal fibroblasts *in vitro* and erythrocytes *in vivo* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1981. Vol. 78(8). P. 5009-5013; *Stanley J.F. et al.* Comparison of doubling numbers attained by cultured animal cells with life span of species // *Nature*. 1975. Vol. 255. P. 158-159. *Thal S.E. et al.* Role of apoptosis inducing factor (AIF) for hippocampal neuronal cell death following global cerebral ischemia in mice // *Neuroscience Letters*. 2011. № 499. P. 1-3.