

На правах рукописи

ОРЛОВА

Оксана Анатольевна

**ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДОВ ЭПИФИЗА
НА ФИБРОБЛАСТЫ КОЖИ ПРИ СТАРЕНИИ**

14.01.30 – геронтология и гериатрия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2017

Работа выполнена в лаборатории молекулярных механизмов старения отдела биогеронтологии АНО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии»

Научный руководитель

доктор биологических наук
Линькова Наталья Сергеевна

Официальные оппоненты:

Виноградова Ирина Анатольевна, доктор медицинских наук, профессор, ВГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет», кафедра фармакологии, организации и экономики фармации медицинского института, заведующая кафедрой;

Смирнова Ирина Олеговна, доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет», кафедра инфекционных болезней, эпидемиологии и дерматовенерологии, профессор кафедры.

Ведущая организация:

ФГБУН Институт физиологии им. акад. И.П. Павлова РАН, г. Санкт-Петербург, Россия

Защита диссертации состоится « » 2017 г. в часов на заседании Диссертационного Совета в АНО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» по адресу: 197119, Санкт-Петербург, пр. Динамо, 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте АНО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» <http://www.gerontology.ru>.

Автореферат разослан « » 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного Совета,
доктор биологических наук,
профессор

Козина Людмила Семеновна

Актуальность темы

В последние годы большое число исследований посвящено изучению старения организма. Прогрессирующее увеличение доли лиц пожилого и старческого возраста в общей численности населения становится актуальной медицинской, социальной и экономической проблемой [Хавинсон В.Х., 2009; Сафарова Г.Л., 2009; Хавинсон В.Х., Анисимов В.Н., 2009]. Средняя продолжительность жизни людей за последние 20 лет в России увеличилась на 10%, а в Европе - на 15%. Первые признаки старения отмечаются в коже, выполняющей, прежде всего, барьерную функцию и наиболее подверженной неблагоприятному воздействию внешней среды [Хавинсон В.Х., Рыжак Г.А., 2010; Amaro-Ortiz A., et al., 2014]. Инволютивные изменения в коже характеризуются дисфункцией защитного барьера. Кроме того, старение кожи имеет выраженные внешние проявления и способствует возникновению неблагоприятного эстетического восприятия, что особенно важно для людей, работа которых связана с активной социальной жизнью. Таким образом, старение кожи имеет функционально-физиологическое и социальное значение, что обуславливает актуальность данной проблемы.

На клеточном уровне старение кожи и других органов и тканей проявляется в нарушении синтеза ряда сигнальных молекул, белков и пептидов. Темп возрастной инволюции кожи определяется изменением соотношения вступивших в апоптоз и пролиферацию клеток, что, в свою очередь, связано с балансом экспрессии про- и антиапоптотических белков [Хавинсон В.Х. др., 2011a]. Согласно современным представлениям, обновление клеточного состава кожи осуществляется за счет постоянно протекающих процессов пролиферации и дифференцировки полипотентных клеток, расположенных на базальной мембране эпидермиса и на волосяных фолликулах. Полипотентные клетки базального эпидермиса поддерживают пул кератиноцитов, клетки волосяного фолликула способны дифференцироваться в кератиноциты и в различные типы клеток дермы. Для активации и регуляции процессов клеточного обновления необходим каскад физиологических реакций, реализуемый цитокинами, факторами роста и другими сигнальными молекулами, синтез которых регулируется микроокружением и непосредственно фибробластами кожи [Akhlaya M.Y. et al., 2014; Gontijo Guerra S. et al., 2014]. Вследствие возрастного снижения функциональной активности клеток кожи количество синтезируемых в ней сигнальных молекул и эндогенных пептидов становится недостаточным для пролиферации и дифференцировки фибробластов кожи [Khavinson V.Kh., Malinin V.V., 2005]. То есть при старении на клеточном и субклеточном уровне организации наблюдается нарушение синтеза пептидов [Хавинсон В.Х. и др., 2005]. Кроме того, возрастная инволюция организма связана с потерей чувствительности к пептидам клеток-мишеней в различных органах и тканях [Гунин А.Г. др., 2011].

Поиск новых эффективных и безопасных низкомолекулярных веществ, стимулирующих процессы регенерации кожи, является актуальной задачей геронтокосметологии. Регуляция репаративных процессов в тканях организма может осуществляться короткими пептидами. Применение коротких пептидов является одной из инноваций в медицине и позволяет существенно замедлить темпы старения за счет стимуляции пролиферации и регенерации тканей [Хавинсон В.Х., 2013].

По данным ранее проведенных экспериментов в культурах клеток и на животных пептид AEDG обладает антиоксидантной активностью, регулирует синтез мелатонина, обладает иммуностимулирующими свойствами, снижает риск развития опухолевых заболеваний, регулирует функциональную активность

нейроиммуноэндокринной системы, способствует увеличению длины теломер в нормальных фибробластах и преодолению лимита Хейфлика [Anisimov V.N., Khavinson V.Kh., 2010]. Применение пептида AEDG у животных приводило к замедлению процессов старения, снижению темпов развития возрастной патологии и увеличению продолжительности жизни [Хавинсон В.Х., 2000]. На органотипических культурах клеток кожи крыс разного возраста было показано, что пептид AEDG стимулирует рост эксплантатов [Хавинсон В.Х., Анисимов В.Н., 2009].

Полипептидный комплекс эпифиза (ППЭ) выделен из эпифиза головного мозга телят, и является эффективным средством в лечении гормонозависимых опухолей, дисгормональной миокардиодистрофии, последствий стрессорных воздействий на организм, восстанавливает гистологическую структуру селезенки после эпифизэктомии и способствуют нормализации ее иммунной функции [Хавинсон В.Х. и др., 2001; Линькова Н.С. и др., 2011; Прилепская В.Н., и др., 2016]. Этот пептидный препарат в экспериментах способствовал достоверному увеличению средней и максимальной продолжительности жизни мышей и крыс, замедлению у них старения репродуктивной системы, повышению двигательной активности и физической выносливости [Хавинсон В.Х., Анисимов В.Н., 2009].

Таким образом, физиологическая стимуляция пептидами может способствовать восстановлению функционирования кожи на молекулярно-клеточном уровне. В основе молекулярного механизма действия коротких пептидов лежит их способность эпигенетически регулировать экспрессию генов, синтез белков и активировать пролиферацию и дифференцировку клеток [Khavinson V.Kh. et al., 2013]. Использование коротких пептидов в эстетической медицине с целью профилактики возрастных изменений организма может способствовать торможению дегенеративных изменений в коже [Anisimov V.N., Khavinson V.Kh., 2010]. Однако влияние пептида AEDG и ППЭ на процессы старения фибробластов кожи до сих пор изучено недостаточно.

Цель и задачи исследования

Целью диссертационного исследования явилось изучение молекулярных механизмов действия пептидов эпифиза на процессы старения фибробластов кожи. Для достижения указанной цели поставлены и последовательно решены следующие задачи:

1. Изучить влияние пептида AEDG и полипептидного комплекса эпифиза в концентрациях 10, 100 и 1000 нг/мл на рост фибробластов кожи и выявить для каждого пептида эффективную концентрацию.
2. Изучить влияние пептида AEDG и полипептидного комплекса эпифиза на экспрессию проапоптотических белков p53, p16, Caspase-3 в культурах фибробластов кожи при старении.
3. Изучить влияние пептида AEDG и полипептидного комплекса эпифиза на экспрессию «белков молодости» Sirtuin-6, CD98hc в культурах фибробластов кожи при старении.
4. Изучить влияние пептида AEDG и полипептидного комплекса эпифиза на экспрессию маркера ремоделирования межклеточного матрикса MMP9 в культурах фибробластов кожи при старении.
5. Изучить влияние пептида AEDG и полипептидного комплекса эпифиза на экспрессию пролифератропного белка Ki67 в культурах фибробластов кожи при старении.

Степень разработанности темы исследования

Основанием для диссертации служат данные экспериментов по геропротекторному действию пептида AEDG и ППЭ. Было показано, что применение пептида AEDG и ППЭ приводило к снижению темпов развития возрастной патологии нейроиммуноэндокринной, сердечно-сосудистой систем организма, увеличению средней и максимальной продолжительности жизни животных, преодолению лимита Хейфлика делящимися фибробластами [Хавинсон В.Х., 2000; Хавинсон В.Х. и др., 2001; Хавинсон В.Х., Анисимов В.Н., 2009]. На органотипических культурах клеток кожи крыс разного возраста было показано, что пептид AEDG стимулирует рост эксплантатов [Войцеховская М.А. и др., 2011]. При этом, на молекулярной уровне, влияние пептида AEDG и ППЭ на старение фибробластов кожи человека не изучено.

Научная новизна

При изучении кривой клеточного роста фибробластов кожи впервые установлено, что эффективная концентрация для пептида AEDG составляет 100 нг/мл, а для ППЭ - 1000 нг/мл. В работе впервые проведено сравнительное изучение влияния пептида AEDG и ППЭ на экспрессию сигнальных молекул (p53, p16, Caspase-3, Sirtuin-6, CD98hc, MMP9, Ki67) в культурах фибробластов кожи при их старении пассажами. Установлено, что пептид AEDG и ППЭ снижают уровень апоптоза в фибробластах кожи при их старении, оцениваемый по экспрессии белков p53, p16. При этом ППЭ оказывает более выраженное действие в «молодых» и «старых» культурах клеток кожи.

Впервые показано, что пептид AEDG повышает экспрессию белка репарации Sirtuin-6 в «молодых» культурах, а ППЭ стимулирует экспрессию Sirtuin-6 в «старых» культурах фибробластов кожи. Пептид AEDG и ППЭ повышают экспрессию гликопротеина CD98hc в «старых» культурах, не влияя на этот показатель в «молодых» культурах клеток кожи. ППЭ стимулирует снижающуюся при клеточном старении экспрессию транскрипционного фактора Ki67 в «молодых» и «старых» культурах фибробластов, причём его эффект более выражен, чем у пептида AEDG.

Впервые показано, что пептид AEDG повышает экспрессию белка MMP9, вовлеченного в ремоделирование межклеточного матрикса, в «молодых» и «старых» фибробластах кожи.

Практическая значимость

Полученные результаты позволили провести сравнительный анализ молекулярных механизмов биологической активности пептида AEDG и ППЭ в отношении пула сигнальных молекул – маркеров обновления и процессов клеточного старения - p53, p16, Caspase-3, Sirtuin-6, CD98hc, MMP9, Ki67. Полученные данные свидетельствуют о том, что использование пептида AEDG и ППЭ может являться эффективным методом повышения функциональной активности фибробластов кожи.

Положения, выносимые на защиту

1. При старении фибробластов кожи в культуре экспрессия проапоптотических белков p53, p16 и Caspase-3 возрастает. Пептид AEDG и полипептидный комплекс эпифиза снижают уровень экспрессии проапоптотического протеина p53 в 3-7 раза и уровень экспрессии протеина p16 - в 1,7-7,5 раза. Полипептидный комплекс эпифиза снижает экспрессию Caspase-3 в «молодых» и «старых»

- культурах фибробластов в 1,4 - 2,3 раза. Таким образом, пептиды эпифиза способствуют снижению выраженности апоптоза клеток кожи.
2. Экспрессия маркера репарации Sirtuin-6 снижается в 2 раза в фибробластах кожи человека при их старении в культуре, а экспрессия гликопротеина CD98hc не изменяется. Пептид AEDG повышает экспрессию Sirtuin-6 в «молодых» культурах фибробластов, а полипептидный комплекс эпифиза – в «старых» культурах. Пептид AEDG и полипептидный комплекс эпифиза стимулируют экспрессию белка CD98hc в «старых» культурах фибробластов кожи.
 3. Экспрессия пролифератропного белка Ki67 при старении фибробластов кожи человека снижается. Пептид AEDG и полипептидный комплекс эпифиза повышают экспрессию транскрипционного фактора Ki67 в «молодых» и «старых» культурах фибробластов кожи.
 4. Пептид AEDG и полипептидный комплекс эпифиза обладают выраженными герпротекторными свойствами в отношении фибробластов кожи, а в основе молекулярного механизма их действия лежит регуляция синтеза белков – маркеров функциональной активности фибробластов.

Связь с научно-исследовательской работой института

Диссертационная работа является темой, выполняемой по основному плану Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии.

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликовано 30 научных работ: 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, 4 главы в монографиях, 4 статьи в других журналах, 18 тезисов докладов.

Апробация и реализация диссертации

Результаты диссертационного исследования доложены на Международном форуме «Старшее поколение» (Санкт-Петербург, 2014, 2017); конференции «Актуальные аспекты геронтологии и гериатрии: от теории к практике» (Киев, 2014); конференции «Пожилой больной. Качество жизни» (Москва, 2014); конференции «Пушковские чтения» (Санкт-Петербург, 2014); 13th Aesthetic & Anti-aging Medicine World Congress “Euromedicom” (Monako, Spain, 2015); республиканской международной конференции с международным участием «Организация оказания медицинской помощи лицам пожилого и старческого возраста» (Уфа, 2016); научно-практической конференции с международным участием «Проблемы возрастной патологии в Арктическом регионе: биологические, клинические и социальные аспекты» (Якутск, 2016); Сочинской третьей международной конференции «Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской приматологии» (Сочи, 2016); V European Congress of Preventive, Regenerative and Anti-Aging Medicine (Санкт-Петербург, 2016); International symposium Expert’s opinion on current approaches in anti-ageing medicine and gerontology (Geneva, Switzerland, 2017); VI Ежегодной международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы медицины» (Азербайджан, Баку, 2017); Aesthetic & Anti-aging Medicine World Congress (Monako, Spain, 2017).

Личный вклад автора

Личный вклад автора в диссертационное исследование состоял в составлении плана работы, проведении опытов, статистической обработке и анализе данных

сравнительного молекулярного механизма действия пептида AEDG и ППЭ в культурах фибробластов кожи при их старении. В ходе выполнения исследования автором освоена методика диссоциированного культивирования фибробластов кожи, метод иммуноцитохимического исследования, метод иммунофлуоресцентной конфокальной микроскопии, метод иммуноферментного анализа. Автор принимала участие во всех экспериментах, включавших в себя культивирование клеток, иммуноцитохимическое окрашивание, микроскопию, морфометрию и статистический анализ данных. Кроме того, автор работы принимала участие в написании тезисов, статей и глав в монографиях по результатам проведенных исследований, неоднократно участвовала с устными докладами на российских и международных конференциях по проблемам геронтологии и косметологии.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания результатов собственных исследований, выводов, практических рекомендаций и указателя литературы. Текст диссертации изложен на 115 страницах и иллюстрирован 22 рисунками. Список литературы содержит 193 источника, из них на русском языке – 58, на английском – 135.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Культивирование фибробластов кожи крыс

В работе исследовали влияние пептидных биорегуляторов на первичные культуры клеток кожи крыс при их старении. Фибробласты кожи выделяли у молодых (3 мес) крыс линии Wistar. Крысы были получены из вивария Института физиологии имени И.П. Павлова РАН (Санкт-Петербург).

Кожу обрабатывали в стерильных условиях раствором диспазы II, отделяли и механически измельчали дерму. Дерму помещали в раствор коллагеназы I типа в питательной среде M199 и центрифугировали. Клетки выращивали в CO₂-инкубаторе в среде, содержащей: 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 1% L-глутамина, 1,5% Нерес-буфера, пенициллин G (50000 ЕД) + стрептомицин – 50 мг и среду M199. Через 5-7 сут первичная культура достигала монослоя и ее пересеивали. Пассирование проводили через 3 сут на четвертые. 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. 3 пассаж расценивали как «молодые» культуры, а 14 пассаж – как «старые» культуры в соответствии с моделью клеточного старения пассажами. Кроме того, клетки 3 пассажа забирали для исследования кривой клеточного роста.

Еще с 80-ых годов XX в. для исследования геропротекторных веществ используется две модели клеточного старения: пассажами и стационарного старения путем контактного торможения [Чирикова Е.Ю. и др., 1984]. Границы и условия применимости этих моделей постоянно обсуждаются и в современной литературе [Хохлов А.Н., 2009; 2013; Хохов А.Н. и др., 2014]. Это связано с тем, что в работе с каждой культурой клеток приходится на основе общих рекомендаций подбирать индивидуальные условия культивирования и клеточного старения. Такое предварительное исследование, направленное на соблюдение общих рекомендаций и создания оптимальных условий старения первичной культуры фибробластов крысы, было проведено и в нашей работе.

Культуры для иммуноцитохимического исследования были разделены 3 группы: 1 группа – контроль (культура клеток без добавления пептида), 2 группа – культура клеток, в которую добавляли пептид AEDG в концентрации 100 нг/мл; 3 группа – культура клеток, в которую добавляли ППЭ в концентрации 1000 нг/мл. Указанные концентрации пептидов были выбраны как наиболее эффективные по результатам кривой клеточного роста.

Используемые в исследовании пептиды

Пептид AEDG обладает антиоксидантной активностью, регулирует синтез мелатонина, обладает иммуностимулирующими свойствами, снижает риск развития опухолевых заболеваний, регулирует функциональную активность нейроиммуноэндокринной системы, способствует увеличению длины теломер в нормальных фибробластах и преодолению лимита Хейфлика [Хавинсон В.Х., 2000; Anisimov V.N., Khavinson V.Kh., 2010]. Пептид AEDG способствует регенерации сетчатки при различных дистрофических поражениях и индуцирует восстановление ее световой чувствительности при зрительной дезадаптации [Линькова Н.С. и др., 2013]. Пептид AEDG оказывает нормализующее влияние на свободно-радикальные процессы, большинство гормонально-метаболических и поведенческих показателей у крыс. Применение пептидов AEDG у животных приводило к замедлению процессов старения, снижению темпов развития патологии и увеличению продолжительности жизни [Хавинсон В.Х., Анисимов В.Н., 2009]. На органотипических культурах клеток кожи крыс разного возраста было показано, что пептид AEDG стимулирует рост эксплантатов [Чалисова Н.И. и др., 2014].

ППЭ выделен из эпифиза головного мозга телят и является эффективным средством в лечении гормонозависимых опухолей, дистормональной миокардиодистрофии, последствий стрессорных воздействий на организм, восстанавливает функции иммунной и эндокринной систем при их старении [Хавинсон В.Х. и др., 2001; Линькова Н.С. и др., 2011; Прилепская В.Н., и др., 2016]. ППЭ способствовал достоверному увеличению средней и максимальной продолжительности жизни мышей и крыс, замедлению у них старения репродуктивной системы, повышению двигательной активности и физической выносливости [Хавинсон В.Х., Анисимов В.Н., 2009].

Построение кривой клеточного роста

Для построения кривой клеточного роста фибробласты кожи 3 пассажа рассеивали в три 24-луночных планшета. В восьми лунках планшета выращивали контрольные образцы культуры, в 8 лунках к культуре добавляли пептид AEDG и в 8 лунках - ППЭ. В первом планшете концентрация пептидов составила 10 нг/мл, во втором планшете - 100 нг/мл, в третьем планшете - 1000 нг/мл. В каждую ячейку планшета добавляли клетки в концентрации 20 000 на 2 мл, среду и пептиды добавляли таким образом, чтобы общий объем раствора в ячейке составлял 2 мл. В контрольных образцах культуры клеток вместо пептида добавляли аналогичное количество питательной среды. На 2-5 сутки культивирования клетки снимали с поверхности ячеек планшетов трипсин-версеном. Подсчет клеток осуществляли из расчета на 1 мл в камере Горяева в 16 квадратах (по полученным данным рассчитывали среднее значение клеток в 1 квадрате).

Иммуноцитохимическое исследование

В работе использовали первичные моноклональные антитела к Caspase-3 («Novocastra», 1:75), Ki67 («Novocastra», 1:50), CD98hc («Novocastra», 1:125), матриксной металлопротеиназе-9 (MMP9) («Novocastra», 1:75), SIRT-6 («Abcam», 1:200), p53 («Novocastra», 1:50), p16 («Novocastra», 1:100). Наиболее широко используемыми маркерами для оценки процессов пролиферации и апоптоза клеток кожи являются молекулы Caspase-3, Ki67, CD98hc, SIRT-6, p53, p16. Молекула MMP9 является маркером ремоделирования межклеточного матрикса фибробластами кожи.

Caspase-3 является компонентом каскада апоптоза и участвует в апоптотической конденсации хроматина и фрагментации ДНК во всех типах клеток, в том числе и в фибробластах кожи. Под действием Caspase-3 гидролизу подвергаются белки ядерной ламины, разрушается цитоскелет, расщепляются белки, регулирующие клеточную адгезию. Экспрессия Caspase-3 обнаруживается в клетке на стадии обратимого апоптоза. Таким образом, определение уровня экспрессии Caspase-3 может быть использовано для количественной оценки наличия этапов апоптоза в фибробластах кожи [Ulakcsai Z. et al., 2015].

Ki67 является негистоновым ядерным белком, регулирующим пролиферацию клеток. Ki67 экспрессируется во всех типах пролиферирующих клеток и отсутствует в покоящихся клетках. Ki67 верифицируется в ядрах пролиферирующих клеток кожи и других типах клеток в G1, G2, S и M-фазах клеточного цикла с максимальной экспрессией в фазах G2 и M. Таким образом, уровень экспрессии Ki67 является информативным показателем для определения интенсивности деления фибробластов кожи [Fernandez T.L. et al., 2014].

Гликопротеин CD98hc принимает участие в процессах обновления клеток кожи. Мутации гена, кодирующего белок CD98hc, приводят к нарушению пролиферации и миграции клеток кожи и заживления ран [Boulter E. et al., 2013]. Белок CD98hc усиливает передачу межклеточного сигнала интегринами, которые участвуют в регуляции клеточного цикла [de la Ballina L.R. et al., 2016]. Таким образом, CD98hc участвует в обновлении клеток кожи. Снижение синтеза белка CD98hc, наблюдаемое у старых мышей, подтверждает его роль в сохранении барьерной функции кожи и процессах ее старения.

MMP-9 является ферментом семейства цинк-металлопротеиназ, реализующим ремоделирование межклеточной среды фибробластами кожи. Индуцируемый ультрафиолетом синтез MMP-9 способствует разрушению фибриллярного коллагена типа I и III в дерме. Коэкспрессия MMP-2, 3, 9 приводит к деградации неколлагеновых компонентов дермы, в том числе гликопротеинов и протеогликанов базальной мембраны. При старении клеток кожи уровень тканевых ингибиторов MMP снижается, что способствует активации ремоделирования межклеточного матрикса [Wong V.W. et al., 2014; Xue S.N. et al., 2014].

Sirtuin-6 является деацетилазой гистона H3K9 и участвует в репарации ДНК, регуляции функции теломер и экспрессии генов, ассоциированных с клеточным старением. Снижение синтеза Sirtuin-6 в клетках вызывает их ускоренное старение. Деацетилаза Sirtuin-6 стимулирует активность белков репарации ДНК в ответ на стресс. У мышей с мутацией гена sirt-6 наблюдали признаки ускоренного старения, а самцы со сверхэкспрессией sirt-6 жили дольше контрольных животных [McCord R.A. et al., 2009]. Кроме снижения продолжительности жизни, недостаток белка Sirtuin-6 у мышей вызывал истончение кожи, остеопороз, метаболические и им-

мунные нарушения. В культурах клеток фибробластов человека было показано, что выключение гена *sirt-6* ингибирует синтез коллагена 1 типа и стимулирует синтез MMP-1 [Baohua Y., Li L., 2012].

Белок p53 является супрессором образования злокачественных опухолей, активируя апоптоз во всех тканях организма, в том числе и в коже. Нарушение механизма регуляции апоптоза приводит к накоплению поврежденных клеток, что является одной из составляющих процесса естественного старения кожи. Получая сигналы о клеточном повреждении, белок p53 либо останавливает клеточный цикл для репарации генома, либо индуцирует апоптотическую гибель клетки. Известно, что ген P53 осуществляет контроль репликативного старения клеток. В «старых» клетках наблюдается активация гена P53 [Donehower L.A., 2002].

Белок p16 является внутриклеточным белком-ингибитором циклин-зависимой киназы CDK2A. В отсутствие p16 циклинзависимые киназы CDK4 и CDK6 связываются с циклином D1 и происходит фосфорилирование белка pRb (белок ретинобластомы), что приводит к его инактивации в контрольной точке G1/S и активации пролиферации клеток. При старении фибробластов кожи *in vitro* синтез белка p16 повышается. Белок p16 почти не определяется в логарифмической фазе роста культуры фибробластов. В культурах стареющих фибробластов белок p16 находится в гипофосфорилированном состоянии [Ressler S. et al., 2006].

Для постановки реакции иммуноцитохимии клетки фиксировали 4% параформальдегидом, проводили пермеабиллизацию с 0,5% Triton X100. Для блокировки неспецифического связывания антигенов с антителами клетки инкубировали с 1% бычьим сывороточным альбумином. Далее клетки инкубировали с первичными (специфичными) антителами. Затем проводили 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). Ядра клеток окрашивали Hoechst 33258 (голубая флуоресценция).

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 200. Проводили измерение площади экспрессии. Площадь экспрессии рассчитывали, как отношение площади, занимаемой иммунопозитивными клетками, к общей площади клеток в поле зрения, и выражали в процентах для маркеров с цитоплазматическим окрашиванием и как отношение площади, занимаемой иммунопозитивными ядрами к общей площади ядер в поле зрения для маркеров с ядерной экспрессией.

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 вида распределения использовали критерий Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk's W-test). Для проверки статистической однородности нескольких выборок были использованы непараметрические процедуры однофакторного дисперсионного

анализа (критерий Крускала–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.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние пептидов эпифиза на рост фибробластов кожи

Пептид AEDG. На 2 сут культивирования в контроле количество фибробластов достоверно возросло на 58%. Под действием пептида AEDG в концентрации 10 нг/мл количество клеток имело тенденцию к повышению, но достоверно от контроля не отличалось. Пептид AEDG в концентрации 100 нг/мл достоверно повышал число фибробластов на 49% относительно контроля. Под действием пептида AEDG в концентрации 1000 нг/мл количество клеток имело тенденцию к увеличению на 14%, но достоверно от контроля не отличалось.

На 3 сут культивирования в контроле количество клеток возросло на 78% по сравнению со 2 сут. Под действием пептида AEDG в концентрации 10 нг/мл количество фибробластов достоверно не изменялось относительно контроля. Пептид AEDG в концентрации 100 нг/мл достоверно повышал количество клеток на 71% по сравнению с контролем, а в концентрации 1000 нг/мл - на 30% (рисунок 1).

На 4 сут культивирования в контроле количество клеток снизилось на 5% по сравнению с 3 сут (различия статистически недостоверны).

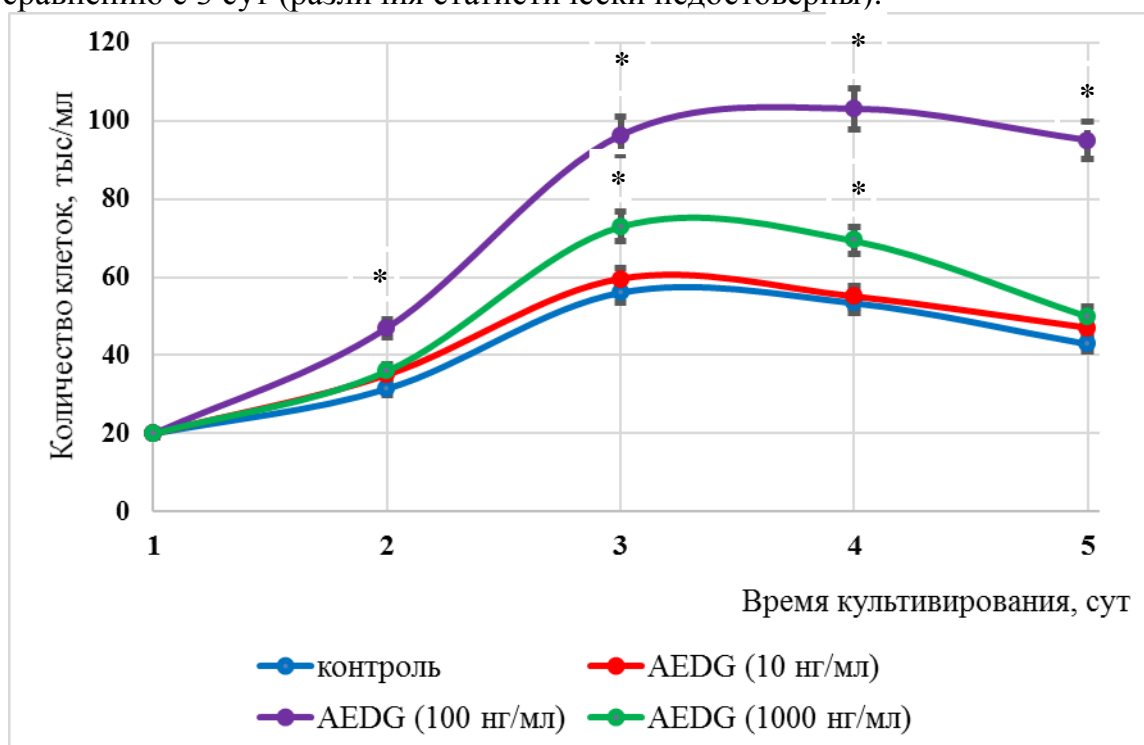


Рисунок 1. Влияние пептида AEDG на ход кривой клеточного роста фибробластов кожи. * - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим значением в контроле.

Пептид AEDG в концентрации 10 нг/мл не влиял на количество фибробластов, а в концентрации 100 нг/мл достоверно повышал этот показатель на

92%. Пептид AEDG в концентрации 1000 нг/мл достоверно повышал количество фибробластов на 30% относительно контроля.

На 5 сут культивирования в контроле количество клеток достоверно снизилось на 24% по сравнению с 4 сут. Под действием пептида AEDG в концентрации 10 нг/мл количество фибробластов достоверно не изменилось по сравнению с контролем. Пептид AEDG в концентрации 100 нг/мл достоверно повышал количество клеток на 121% относительно контроля. Под действием пептида AEDG в концентрации 1000 нг/мл количество фибробластов имело тенденцию к увеличению на 16%.

ППЭ. На 2 сут культивирования в контроле количество клеток достоверно возросло на 58%. ППЭ в концентрации 10 нг/мл не влиял на количество клеток, а в концентрации 100 нг/мл повышал этот показатель на 11%. Под действием ППЭ в концентрации 1000 нг/мл количество клеток достоверно повысилось на 62% относительно контроля.

На 3 сут культивирования в контроле количество клеток возросло на 78% по сравнению со 2 сут. Под действием ППЭ в концентрации 10 нг/мл количество клеток достоверно не изменилось. ППЭ в концентрации 100 нг/мл повышал исследуемый показатель на 20% относительно контроля, а в концентрации 1000 нг/мл - на 82%.

На 4 сут культивирования в контроле количество клеток недостоверно снизилось на 5% по сравнению с 3 сут. Под действием ППЭ в концентрации 10 нг/мл количество клеток не изменялось, а в концентрации 100 нг/мл этот показатель достоверно повышался на 34%. Под действием ППЭ в концентрации 1000 нг/мл количество клеток достоверно повысилось на 91% относительно контроля (рисунок 2).

На 5 сут культивирования в контроле количество клеток достоверно снизилось на 24% по сравнению с 4 сут. Под действием ППЭ в концентрации 10 нг/мл количество клеток не изменялось, а в концентрации 100 нг/мл - достоверно повысилось на 23% относительно контроля. Под действием ППЭ в концентрации 1000 нг/мл количество клеток достоверно повысилось на 134% относительно контроля.

Построение кривой клеточного роста является удобным и простым в реализации методом для оценки влияния пептидов на пролиферацию клеток. Кроме того, кривая клеточного роста наглядно показывает, какая из исследуемых концентраций пептида наиболее эффективна для используемой культуры клеток. Для пептида AEDG наиболее эффективной оказалась концентрация 100 нг/мл, а для ППЭ - 1000 нг/мл. В дальнейших экспериментах, проводимых методом иммуноцитохимии, использовали эффективную концентрацию для каждого пептида по данным кривой клеточного роста: 100 нг/мл для пептида AEDG и 1000 нг/мл для ППЭ.

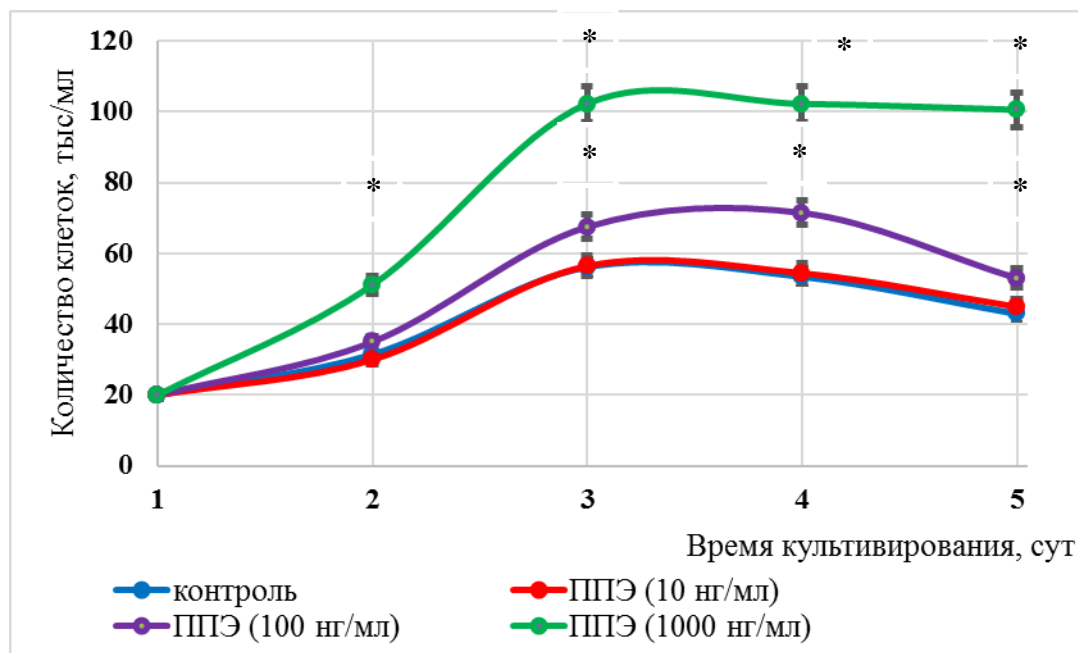


Рисунок 2. Влияние ППЭ на ход кривой клеточного роста.

* - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим значением в контроле.

Влияние пептидов эпифиза на экспрессию белков-маркеров функциональной активности фибробластов кожи при их старении

Экспрессия белка p53. В «старых» контрольных культурах фибробластов кожи крыс площадь экспрессии проапоптотического белка p53 была в 7,93 раза выше по сравнению с «молодыми» культурами фибробластов (рисунок 3). В «молодых» культурах фибробластов под действием пептида AEDG и ППЭ экспрессия p53 достоверно снижалась в 3,38 и 3,60 раза соответственно по сравнению с контролем. При добавлении пептида AEDG в культуральную среду «старых» фибробластов площадь экспрессии белка p53 уменьшилась в 4 раза по сравнению с контролем. ППЭ снижал площадь экспрессии белка p53 в «старых» фибробластах в 7,64 раза.

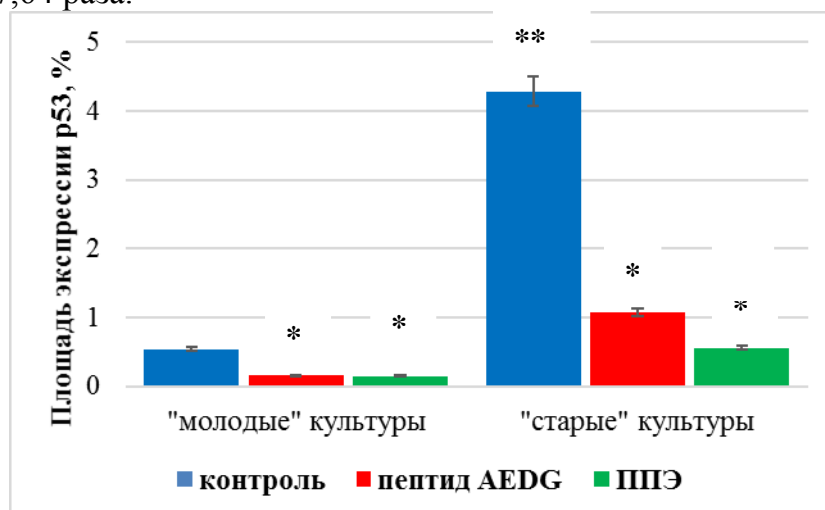


Рисунок 3. Влияние пептида AEDG и ППЭ на площадь экспрессии белка p53 в культурах фибробластов кожи крыс. * - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим контролем, ** - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим показателем в «молодых» культурах, # - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим показателем в культурах при добавлении пептида AEDG.

В «старых» контрольных культурах фибробластов крыс оптическая плотность экспрессии проапоптотического белка p53 составила $0,32 \pm 0,04$ у.е., что на 33% выше по сравнению с показателем в «молодых» культурах фибробластов, где эта величина была равна $0,24 \pm 0,04$ у.е. При добавлении пептида AEDG в культуральную среду клеток 14 пассажа оптическая плотность экспрессии белка p53 снизилась на 28% по сравнению с контролем и составила $0,25 \pm 0,04$ у.е. В «молодых» культурах пептид AEDG не влиял на оптическую плотность экспрессии белка p53. При добавлении ППЭ в «молодые» культуры оптическая плотность экспрессии белка p53 уменьшилась на 33% по сравнению с контролем и составила $0,18 \pm 0,03$ у.е. При добавлении ППЭ в «старые» культуры этот показатель уменьшился в 1,6 раза и составил $0,20 \pm 0,04$ у.е.

При старении фибробластов кожи выявлено повышение экспрессии проапоптотического белка p53 в 7,93 раза. Пептид AEDG и ППЭ снижали уровень апоптоза фибробластов кожи в 3-7 раза, причем ППЭ оказал более выраженное действие в «молодых» и «старых» культурах.

Белок p53 является транскрипционным фактором, индуцирующим апоптоз, экспрессия которого повышается в клетках при старении [Donehower L.A., 2002]. Таким образом, пептид AEDG и ППЭ обладают геропротекторным эффектом и способствуют снижению интенсивности апоптоза клеток кожи при их старении в культуре. Эти данные хорошо согласуются с полученными ранее данными о геропротекторном эффекте пептидов эпифиза на различные типы клеток, в том числе и клетки кожи [Чалисова Н.И. и др., 2014; Anisimov V.N., Khavinson V.Kh., 2010]. Более выраженный эффект ППЭ по сравнению с пептидом AEDG при однонаправленности действия обоих пептидных биорегуляторов можно объяснить следующим образом. Методами высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии было показано, что в составе ППЭ содержится пептид AEDG и, кроме того, большое количество других тетрапептидов, аминокислот, ди-, три- и пентапептидов [Хавинсон В.Х. и др., 2017]. Можно предположить, что аминокислоты и пептиды, содержащиеся в ППЭ, также оказывают влияние на апоптоз и другие аспекты функционирования фибробластов кожи, в результате чего эффект ППЭ более выражен, чем у пептида AEDG.

Экспрессия белка p16. В «старых» контрольных культурах фибробластов площадь экспрессии белка p16 была в 8,70 раза выше по сравнению с «молодыми» культурами (рисунок 4). При добавлении пептида AEDG в культуральную среду «молодых» фибробластов площадь экспрессии белка p16 уменьшилась в 2,52 раза по сравнению с контролем. При добавлении пептида AEDG в культуральную среду «старых» фибробластов площадь экспрессии белка p53 уменьшилась в 4 раза по сравнению с контролем.

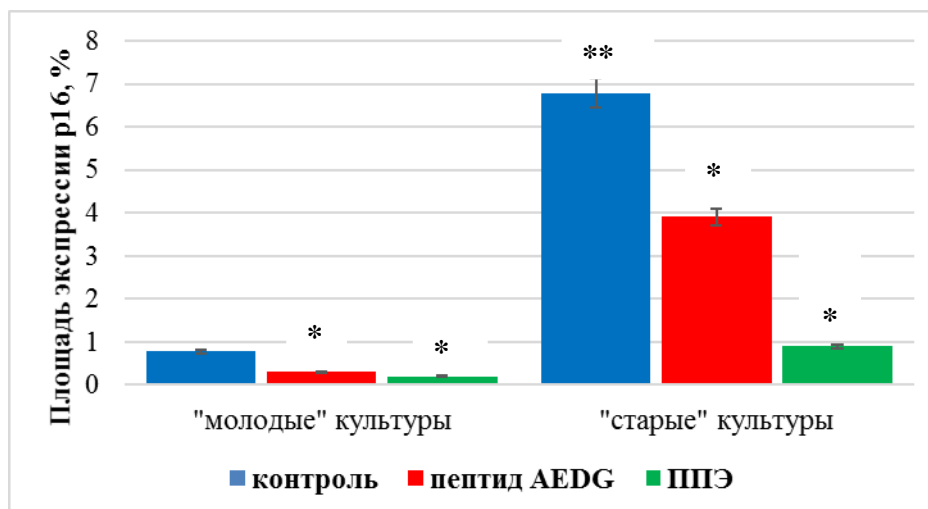


Рисунок 4. Влияние пептида AEDG и ППЭ на площадь экспрессии белка p16 в культурах фибробластов кожи крыс. * - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим контролем, ** - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим показателем в «молодых» культурах, # - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим показателем в культурах при добавлении пептида AEDG.

ППЭ снижал площадь экспрессии белка p16 в «молодых» культурах в 3,90 раза и в «старых» культурах - в 7,54 раза.

В «старых» контрольных культурах клеток фибробластов оптическая плотность экспрессии белка p16 составила $0,34 \pm 0,04$ у.е., что на 26% выше по сравнению с «молодыми» культурами фибробластов, где этот показатель был равен $0,27 \pm 0,04$ у.е. При добавлении пептида AEDG в «молодых» культурах этот показатель снизился на 35% до $0,20 \pm 0,03$ у.е. ППЭ уменьшал оптическую плотность экспрессии белка p16 в «молодых» фибробластах в 1,69 раза до $0,16 \pm 0,03$ у.е. При добавлении пептида AEDG в «старые» культуры оптическая плотность экспрессии p16 снижалась на 26% и составила $0,27 \pm 0,05$ у.е. ППЭ снижал оптическую плотность экспрессии протеина p16 в «старых» фибробластах в 1,79 раза до $0,19 \pm 0,02$ у.е.

При старении фибробластов кожи выявлено повышение уровня экспрессии белка p16, что хорошо согласуется с данными литературного обзора. В работе Ressler S. et al. (2006) в культурах фибробластов кожи при их старении было показано повышение синтеза белка p16, что подтверждает полученные нами данные. Пептид AEDG и ППЭ при добавлении в культуральную среду клеток снижали уровень экспрессии p16 в 1,7-7,5 раза. При этом ППЭ оказал более выраженное действие по сравнению с пептидом AEDG в «молодых» и «старых» культурах, что подтверждает приведенные ранее данные для маркера старения и апоптоза p53.

Экспрессия Caspase-3. В «старых» культурах фибробластов в контроле площадь экспрессии Caspase-3 была на 83% выше по сравнению с «молодыми» культурами. При добавлении пептида AEDG в «молодые» культуры площадь экспрессии Caspase-3 не изменялась. ППЭ снижал площадь экспрессии Caspase-3 в «молодых» культурах на 42% по сравнению с контролем. При добавлении пептида AEDG в «старых» культурах площадь экспрессии Caspase-3 уменьшилась на 42%. ППЭ снижал площадь экспрессии Caspase-3 в «старых» культурах в 2,31 раза (рисунок 5).

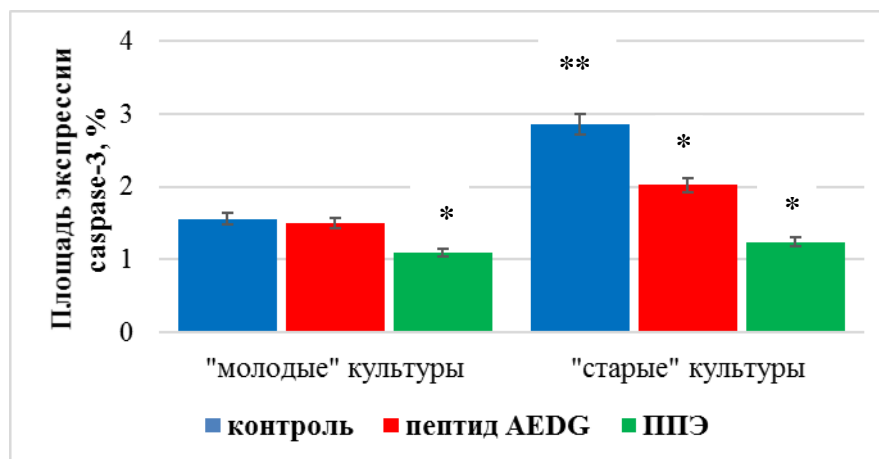


Рисунок 5. Влияние пептида AEDG и ППЭ на площадь экспрессии белка Caspase-3 в культурах фибробластов кожи крыс. * - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим контролем, ** - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим показателем в «молодых» культурах, # - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим показателем в культурах при добавлении пептида AEDG.

Оптическая плотность экспрессии Caspase-3 в «молодых» культурах фибробластов крыс в контроле составила $0,26 \pm 0,04$ у.е., что достоверно не отличалось от значения $0,30 \pm 0,04$ у.е. в «старых» культурах. Пептиды эпифиза при добавлении в культуральную среду достоверно не влияли на оптическую плотность экспрессии эффекторной Caspase-3.

Выше было показано, что пептид AEDG и ППЭ снижают уровень маркеров апоптоза и клеточного старения p16 и p53, в большей степени характеризующий митохондриальный путь запрограммированной клеточной гибели. Снижение экспрессии Caspase-3 под действием пептидов эпифиза характеризует их влияние на другой путь апоптоза – каспаза-зависимый [Льюин Б., 2011]. Таким образом, ППЭ в большей степени и пептид AEDG в меньшей степени при старении фибробластов кожи снижают выраженность не только митохондриального, но и каспаза-зависимого апоптоза.

Экспрессия Sirtuin-6. В «старых» культурах фибробластов крыс в контроле площадь экспрессии маркера репарации Sirtuin-6 была в 2,06 раза ниже по сравнению с «молодыми» культурами. При добавлении пептида AEDG в «молодые» культуры площадь экспрессии Sirtuin-6 увеличилась на 19% по сравнению с контролем. ППЭ не влиял на этот показатель в «молодых» культурах, а пептид AEDG - в «старых» культурах. ППЭ повышал площадь экспрессии Sirtuin-6 на 91% в «старых» культурах фибробластов кожи (рисунок 6).

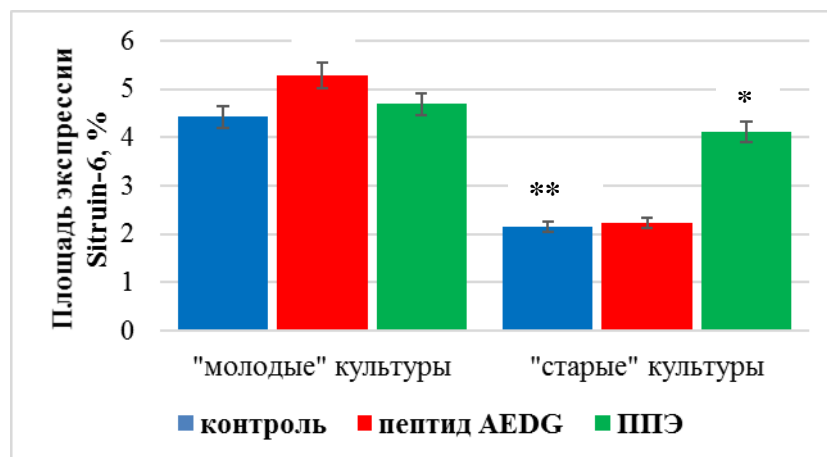


Рисунок 6. Влияние пептида AEDG и ППЭ на площадь экспрессии белка Sirtuin-6 в культурах фибробластов кожи крыс. * - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим контролем, ** - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим показателем в «молодых» культурах, # - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим показателем в культурах при добавлении пептида AEDG.

Оптическая плотность экспрессии Sirtuin-6 в «молодых» культурах фибробластов крыс в контроле составила $0,28 \pm 0,05$ у.е., что достоверно не отличалось от показателя в «старых» культурах - $0,31 \pm 0,03$ у.е. Пептид AEDG не влиял на оптическую плотность экспрессии этого маркера в «молодых» и «старых» культурах. ППЭ увеличивал оптическую плотность экспрессии белка Sirtuin-6 на 13% до $0,35 \pm 0,03$ у.е. только в «старых» культурах фибробластов.

Экспрессия белка «молодости» Sirtuin-6, участвующего в репарации ДНК, снижается при старении. В работе McCord R.A. et al. (2009) приводились данные о том, что признаки ускоренного старения сопровождались сниженным синтезом белка Sirtuin-6. В связи с индукцией ускоренного старения организма, в том числе и ткани кожи, при мутациях в гене бека Sirtuin-6 этот белок можно отнести к «белкам молодости». Недостаток белка Sirtuin-6 в фибробластах приводит к снижению синтеза коллагена, что выражается в видимых проявлениях старения кожи – она утрачивает упругость и эластичность, появляются морщины. Таким образом, ППЭ и пептид AEDG способствуют повышению экспрессии «белка молодости» Sirtuin-6 в фибробластах кожи, что препятствует старению клеток. При этом эффект ППЭ в «старых» культурах фибробластов более выражен по сравнению с пептидом AEDG, так же, как и в исследовании белков – маркеров митохондриального и каспаза-зависимого апоптоза.

Экспрессия CD98hc. В «старых» культурах фибробластов в контроле площадь экспрессии гликопротеина CD98hc достоверно не отличалась от «молодых» культур. Площадь экспрессии CD98hc в «молодых» культурах фибробластов достоверно не различались в контроле и при воздействии пептида AEDG и ППЭ. При добавлении пептида AEDG в «старые» культуры площадь экспрессии белка CD98hc увеличилась на 54% по сравнению с контролем. ППЭ повышал площадь экспрессии белка CD98hc в «старых» культурах в 2,31 раза (рисунок 7).

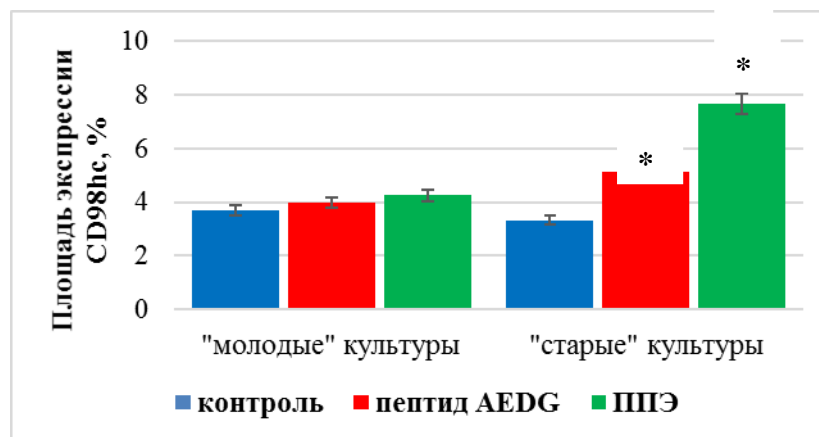


Рисунок 7. Влияние пептида AEDG и ППЭ на площадь экспрессии белка CD98hc в культурах фибробластов кожи крыс. * - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим контролем, # - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим показателем в культурах при добавлении пептида AEDG.

Оптическая плотность экспрессии белка CD98hc в «молодых» культурах фибробластов кожи в контроле составила $0,31 \pm 0,05$ у.е., что достоверно не отличалось от «старых» культур, где этот показатель составил $0,26 \pm 0,04$ у.е. Оптическая плотность экспрессии CD98hc в «молодых» и «старых» культурах достоверно не различалась в контрольной группе и при действии пептида AEDG и ППЭ.

Повышение площади экспрессии белка CD98hc в «старых» культурах фибробластов под действием пептидов эпифиза указывает на способность пептидов регулировать клеточный цикл и сохранять функциональную активность фибробластов клеток кожи при их старении. Это предположение основывается на том, что снижение синтеза белка CD98hc, наблюдаемое у старых мышей, приводит к снижению барьерной функции кожи. Отсутствие влияния пептидов эпифиза на экспрессию гликопротеина CD98hc в «молодых» клетках кожи может быть связано с тем, что в отсутствии старения и патологии биорегуляторный эффект пептидов не проявляется.

Экспрессия MMP9. В «старых» культурах фибробластов в контроле площадь экспрессии MMP9 достоверно не отличалась от «молодых» культур. При добавлении пептида AEDG в «молодые» и «старые» культуры клеток кожи площадь экспрессии MMP9 увеличилась на 33% и 17% по сравнению с контролем. Показатели площади экспрессии MMP9 в «молодых» и «старых» культурах достоверно не различались в контрольной группе и при добавлении ППЭ (рисунок 8).

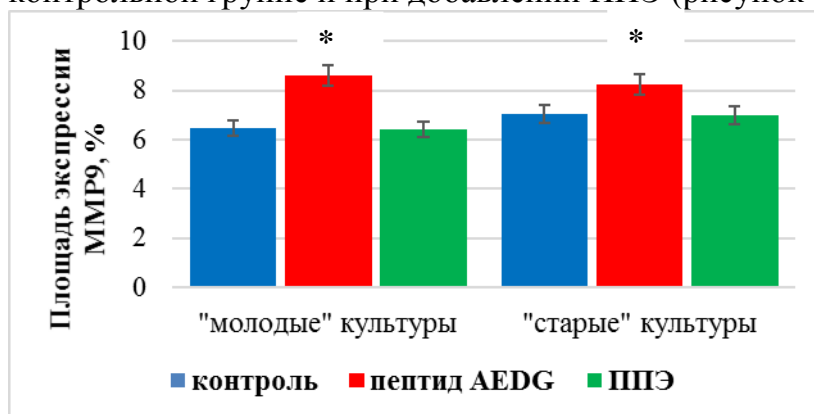


Рисунок 8. Влияние пептида AEDG и ППЭ на площадь экспрессии белка MMP9 в культурах фибробластов кожи крыс. * - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим контролем.

Оптическая плотность экспрессии белка MMP9 в «молодых» культурах фибробластов крыс в контроле составила $0,29 \pm 0,04$ у.е., что достоверно не отличалось от «старых» культур, где данный показатель составил $0,29 \pm 0,05$ у.е. Оптическая плотность экспрессии MMP9 в «молодых» и «старых» культурах достоверно не различались в контрольной группе и при действии пептида AEDG и ППЭ.

Отсутствие изменения экспрессии MMP9 при старении культур фибробластов может быть связано с тем, что повышение экспрессии MMP9 связывают с ускоренным старением фибробластов при повреждающем действии ультрафиолетового излучения [Wong V.W. et al., 2014; Xue S.N. et al., 2014]. Повышение экспрессии MMP9 в культурах фибробластов под действием пептида AEDG может быть связано с его способностью геноспецифически регулировать синтез данного белка, что было показано ранее в культурах клеток тимуса и эпифиза [Хавинсон В.Х. и др., 2011б; 2012]. Этот эффект может указывать на участие пептида AEDG в активации процессов ремоделирования межклеточного матрикса в различных тканях.

Экспрессия Ki67. В «старых» культурах в контроле площадь экспрессии пролиферативного белка Ki67 была на 45% ниже по сравнению с «молодыми» культурами фибробластов. При добавлении пептида AEDG в «старые» культуры площадь экспрессии белка Ki67 увеличилась на 44% по сравнению с контролем, тогда как в «молодых» культурах пептид AEDG не влиял на этот показатель. ППЭ повышал экспрессию белка Ki67 в «молодых» культурах на 16% и в «старых» культурах - на 75% по сравнению с контролем (рисунок 9).

В «старых» культурах фибробластов в контроле оптическая плотность экспрессии белка Ki67 составила $0,20 \pm 0,03$ у.е., что было на 75% ниже по сравнению с «молодыми» культурами фибробластов, где этот показатель составил $0,35 \pm 0,04$ у.е. При добавлении пептида AEDG в «старые» культуры оптическая плотность экспрессии белка Ki67 увеличилась на 75% по сравнению с контролем до $0,35 \pm 0,04$ у.е., тогда как в «молодых» культурах пептид AEDG не повлиял на этот показатель. ППЭ повышал оптическую плотность экспрессии белка Ki67 в «молодых» культурах на 23% до $0,43 \pm 0,03$ у.е. При добавлении ППЭ в «старые» культуры этот показатель увеличился на 85% до $0,37 \pm 0,05$ у.е.

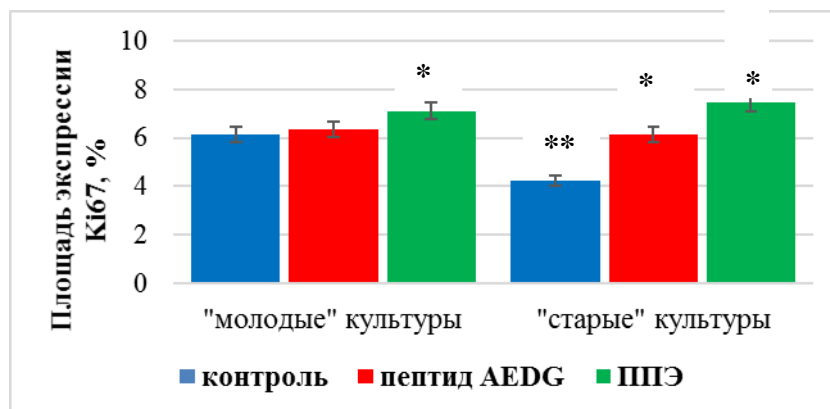


Рисунок 9. Влияние пептида AEDG и ППЭ на площадь экспрессии белка Ki67 в культурах фибробластов кожи крыс. * - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим контролем, ** - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим показателем в «молодых» культурах, # - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим показателем в культурах при добавлении пептида AEDG.

Полученные данные показали, что наряду со снижением выраженности апоптоза при старении фибробластов кожи, пептиды эпифиза активируют пролиферацию этих клеток. Транскрипционный фактор Ki67 является неспецифическим маркером пролиферации, который присутствует практически во всех типах клеток и ранее было показано влияние пептидов эпифиза на его экспрессию в других тканях [Хавинсон В.Х. и др., 2016]. Более сильно выраженный пролифератропный эффект ППЭ по сравнению с пептидом AEDG может быть связан с тем, что белок Ki67 является не только мишенью действия пептида AEDG, но и других коротких пептидов в составе ППЭ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время косметология является высоковостребованной, быстро развивающейся областью медицины [Смирнова И.О., 2005]. Поиск новых методов современной косметологии обусловлен развитием различных областей науки: геронтологии (исследования процессов старения кожи и организма в целом), нейроиммуноэндокринологии (физиологические механизмы поддержания иммунологической защиты и гормонального статуса клеток кожи), биофизики (физические аппаратные методы воздействия на кожу), молекулярной биологии и медицины (применение низкомолекулярных биологически активных веществ, в том числе коротких пептидов, для замедления процессов старения кожи). На основании обобщения знаний, накопленных всеми этими отраслями наук, возможно создание новых комплексных подходов к физиологическому и безопасному восстановлению функционального и визуального состояния кожи при ее возрастной инволюции. Одним из инновационных средств в косметологии является применение пептидов в составе различных косметологических средств [Виноградова И.А. и др., 2015; Кветной И.М. и др., 2015]. Одной из групп пептидов, обладающих геропротекторными свойствами и не имеющих побочных эффектов, являются пептиды, разработанные в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии.

Ранее было установлено, что пептид AEDG стимулирует рост эксплантатов клеток кожи крыс разного возраста и обладает геропротекторными свойствами [Войцеховская М.А. и др., 2011]. В культурах клеток и на животных пептид AEDG обладает антиоксидантной активностью, иммуностимулирующими свойствами, регулирует синтез мелатонина, снижает риск развития опухолевых заболеваний, регулирует функциональную активность нейроиммуноэндокринной системы, способствует увеличению длины теломер в нормальных фибробластах и преодолению лимита Хейфлика [Anisimov V.N., Khavinson V.Kh., 2010]. ППЭ в экспериментах способствовал нормализации иммунитета, увеличению средней и максимальной продолжительности жизни мышей и крыс, замедлению у них старения репродуктивной системы, повышению двигательной активности и физической выносливости [Чалисова Н.И. и др., 2014; Хавинсон В.Х., Анисимов В.Н., 2009].

В нашем исследовании впервые изучены молекулярные аспекты геропротекторного действия пептида AEDG и ППЭ в отношении фибробластов кожи при их старении. В ходе изучения кривой клеточного роста фибробластов кожи показано, что, для пептида AEDG эффективной является концентрация 100 нг/мл, а для ППЭ - 1000 нг/мл. В установленных эффективных концентрациях пептидов эпифиза проведено сравнительное изучение их влияния на экспрессию сигнальных молекул (p53, p16, Caspase-3, Sirtuin-6, CD98hc, MMP9, Ki67) в диссоциированных первичных культурах фибробластов кожи при их старении пассажами. Установлено, что

пептид AEDG и ППЭ снижают уровень апоптоза (экспрессию белков p53, p16, Caspase-3) в фибробластах кожи человека при их старении, причем ППЭ оказал более выраженное действие в «молодых» и «старых» культурах по сравнению с пептидом AEDG. Пептид AEDG повышает экспрессию белка репарации Sirtuin-6 в «молодых» культурах фибробластов кожи. ППЭ повышает экспрессию Sirtuin-6 в «старых» культурах, но не влияет на этот показатель в «молодых» культурах клеток кожи. Пептид AEDG и ППЭ повышают экспрессию гликопротеина CD98hc в «старых» культурах в 1,5 – 2,3 раза. ППЭ стимулирует экспрессию пролиферотропного протеина Ki67 в «молодых» и «старых» культурах фибробластов, причём его эффект более выражен, чем у пептида AEDG.

Таким образом, одним из важнейших молекулярных аспектов геропротекторного действия пептидов AEDG и ППЭ является активация процессов пролиферации и репарации, снижение уровня апоптоза в фибробластах кожи, что делает перспективным их дальнейшее изучение в качестве веществ, замедляющих процессы старения кожи.

ВЫВОДЫ

1. Пептид AEDG и полипептидный комплекс эпифиза оказывали максимальный стимулирующий эффект на рост фибробластов кожи в культуре соответственно в концентрациях 100 нг/мл и 1000 нг/мл.
2. При старении фибробластов кожи в культурах клеток экспрессия проапоптотических белков p53, p16, Caspase-3 повышается. В «молодых» и «старых» культурах фибробластов под действием пептида AEDG и полипептидного комплекса эпифиза экспрессия белков p53 и p16 снижается в 1,7- 7,6 раза. Пептид AEDG и полипептидный комплекс эпифиза в «молодых» и «старых» культурах фибробластов кожи снижали экспрессию Caspase-3 в 1,4 -2,3 раза.
3. При старении фибробластов кожи в культурах экспрессия Sirtuin-6 снижается, а экспрессия CD98hc достоверно не изменяется. Полипептидный комплекс эпифиза повышает экспрессию Sirtuin-6 на 19% в «молодых» и на 91% в «старых» культурах фибробластов, а пептид AEDG не обладает таким эффектом. В «старых» культурах фибробластов под действием пептида AEDG и полипептидного комплекса эпифиза экспрессия CD98hc повышается, соответственно, на 54% и в 2,3 раза.
4. Экспрессия матричной металлопротеиназы MMP9 не изменяется при старении фибробластов кожи. Под действием пептида AEDG в «молодых» и «старых» культурах фибробластов площадь экспрессии MMP9 возрастает на 33% и 17% соответственно.
5. При старении фибробластов кожи в культурах клеток экспрессия пролифератропного белка Ki67 снижается. Под действием пептида AEDG в «старых» культурах фибробластов экспрессия Ki67 возрастает на 44%. Под действием полипептидного комплекса эпифиза в «молодых» и «старых» культурах фибробластов экспрессия Ki67 повышается соответственно на 16% и 75%.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Поскольку пептиды AEDG и полипептидный комплекс эпифиза способствуют нормализации экспрессии молекул - маркеров функциональной активности клеток кожи (p16, p53, Caspase-3, Sirtuin-6, CD98hc, MMP9, Ki67) при их старении, можно рекомендовать проведение гистологического исследования образцов кожи молодых и старых животных после применения указанных пептидов. Такое исследование является важным этапом для обоснования применения пептидов эпифиза для замедления старения кожи у человека.
2. Пептид AEDG и полипептидный комплекс эпифиза, нормализующие процессы пролиферации, апоптоза, ремоделирования межклеточного матрикса и замедляющие старение фибробластов кожи, могут в перспективе рассматриваться как компоненты косметологических средств, предназначенных для замедления возрастных изменений кожи.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, включенных в Перечень ВАК Минобрнауки РФ

1. Короткие пептиды стимулируют клеточную регенерацию в коже при старении / Н.И. Чалисова, Н.С. Линькова, А.Н. Жекалов, А.О. Орлова и соавт. // Успехи геронтологии. – 2014. – Т.27, №4. – С. 699-703.
2. Молекулярные механизмы снижения функциональной активности клеток кожи при ее старении / В.Х. Хавинсон, Н.С. Линькова, Е.О. Куканова, О.А. Орлова // Успехи физиологических наук. – 2016. – Т. 47, № 2. - С. 62-76.
3. Пептидная регуляция функций фибробластов кожи при их старении *in vitro* / Н.С. Линькова, А.О. Дробинцева, О.А. Орлова и соавт. // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2016. - №1. – С. 40-44.
4. Транскрипционный фактор p53 и старение кожи / Д.А. Гриценко, О.А. Орлова, Н.С. Линькова и соавт. // Успехи геронтологии. – 2017. – Т.30, №1. – С. 10-16.

Статьи в других журналах

5. Общие теории старения и частный случай: анализ старения кожи и достижения современной косметологии / О.А. Орлова, Н.С. Линькова, С.В. Трофимова и соавт. // Научно-практический журнал «Геронтология». – 2017. – Т.5, №1 . – С. 10-30.
6. Подсемейство факторов роста фибробластов FGF19, FGF21, FGF23 как факторы «молодости». Эпигенетические механизмы регуляции / В.Х. Хавинсон, Б.И. Кузник., Н.С. Линькова, Т.С. Салль, О.А. Орлова // Научно-практический журнал «Геронтология». – 2017. – Т.5, №1 . – С. 3-9.
7. Применение пептидов в дерматологии у лиц старшего возраста: эффективность и молекулярные механизмы действия / В.Х. Хавинсон, Н.С. Линькова, О.А. Орлова //Сборник научных трудов «Клинические и фундаментальные аспекты геронтологии». – Самара, 2014. - С. 244-249.
8. Применение физических методов и пептидных биорегуляторов в аппаратной косметологии у лиц старших возрастных групп / О.А. Орлова, Н.С. Линькова, С.В. Трофимова и соавт. // Журнал Эстетическая медицина. - 2014. – С.36-38.

Главы в монографии

9. Орлова, О.А. Глава 1.3. Старение кожи. / О.А. Орлова // В монографии Газитаева З.И., Чеонг Й., Линькова Н.С., Полякова В.О., Дробинцева А.О. Молекулярная

морфология кожи. Оптимизация диагностики старения и изучения пептидных геропротекторов. – Санкт-Петербург: Свое издательство, 2015. –122 с.

10. Орлова, О.А. Глава 2. Геронтокосметология и короткие пептиды. / О.А. Орлова, Д.А. Гриценко / В монографии Газитаева З.И., Чеонг Й., Линькова Н.С., Полякова В.О., Дробинцева А.О. Молекулярная морфология кожи. Оптимизация диагностики старения и изучения пептидных геропротекторов. – Санкт-Петербург: Свое издательство, 2015. –122 с.

11. Орлова, О.А. Глава 4.1. Стимуляция клеток кожи при старении под действием пептидов LK и AEDG. / О.А. Орлова, Е.П. Кузнецова // В монографии Газитаева З.И., Чеонг Й., Линькова Н.С., Полякова В.О., Дробинцева А.О. Молекулярная морфология кожи. Оптимизация диагностики старения и изучения пептидных геропротекторов. – Санкт-Петербург: Свое издательство, 2015. –122 с.

12. Орлова, О.А. Глава 4.2. Влияние пептидов AED, KED, KE, AEDG на процессы клеточного обновления и ремоделирование межклеточного матрикса в фибробластах кожи при их старении. / О.А. Орлова, Е.П. Кузнецова // В монографии. Газитаева З.И., Чеонг Й., Линькова Н.С., Полякова В.О., Дробинцева А.О. Молекулярная морфология кожи. Оптимизация диагностики старения и изучения пептидных геропротекторов. – Санкт-Петербург: Свое издательство, 2015. –122 с.

Тезисы

13. Влияние пептида на изменение уровня коллагена-1 и мелатонина в фибробластах кожи при их старении / Т.С. Салль, В.О. Полякова, Н.С. Линькова, И.М. Кветной, О.А. Орлова и соавт. // XII Международный форум «Старшее поколение». – 12-15 апреля 2017. – С. 78-79.

14. Геропротекторные пептиды: молекулярные механизмы действия и клиническая эффективность / В. Хавинсон, Н. Линькова, Т. Салль, О. Орлова и соавт. // V European Congress of Preventive, Regenerative and Anti-Aging Medicine – 2016. – С. 162-163.

15. Дипептид стимулирует клеточное обновление и оказывает стресспротекторный эффект при старении клеток кожи / О.А. Орлова, Н.С. Линькова, Т.С. Салль соавт. // Пушкинские чтения. - СПб, 2014. – С. 115.

16. Механизм действия пептидных геропротекторов / Т.С. Салль, Н.С. Линькова, О.М. Ивко, А.В. Дудков, Т.Е. Ничик, О.А. Орлова // Республиканская международная конференция с международным участием «Организация оказания медицинской помощи лицам пожилого и старческого возраста». Уфа, 2016. – С.92.

17. Орлова, О. Влияние пептидов эпифиза и методов аппаратной косметологии на экспрессию белка p53 в клетках эпидермиса кожи у женщин разного возраста / Орлова О. // V European Congress of Preventive, Regenerative and Anti-Aging Medicine – 2016. – С. 136-137.

18. Орлова, О.А. Влияние дипептида на развитие органотипической культуры кожи молодых и старых крыс / О.А. Орлова, Н.И. Чалисова, А.Н. Жекалов // Пожилой больной. Качество жизни. Москва, 6-7 октября 2014 г.-Клиническая геронтология, Т.2, №9-10. - С. 96.

19. Орлова, О.А. Перспективы применения полипептидного комплекса в косметологии у женщин разного возраста / О.А. Орлова, Н.С. Линькова, С.В. Трофимова // Сб. матер. конференции «Актуальные аспекты геронтологии и гериатрии: от теории к практике», Киев, 2014. – С. 63-64.

20. Пептидергическая регуляция функций клеток / В.Х. Хавинсон, Т.С. Салль, О.А. Орлова и соавт. // Материалы сочинской третьей международной конферен-

- ции «Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской приматологии». – 2016. - С. 189-192.
21. Пептидная регуляция клеточного старения / В.Х. Хавинсон, Н.С. Линькова, Т.Е. Ничик, Т.С. Салль, О.А. Орлова и соавт. // Научно-практическая конференция с международным участием «Проблемы возрастной патологии в Арктическом регионе: биологические, клинические и социальные аспекты». Якутск, 2016. - С. 156-158.
22. Пептиды в геронтокосметологии: молекулярные механизмы биологической активности / Н.С. Линькова, Е.П. Кузнецова, О.А. Орлова и соавт. // Пушкинские чтения – СПб., 2014. – С. 99-100.
23. Пептиды регулируют экспрессию молекулы CD98hc - маркера старения кожи / О.А. Орлова, Е.П. Кузнецова, А.В. Дудков и соавт. // Международный форум «Старшее поколение». 2015.– С. 106-107.
24. Пептиды эпифиза замедляют процесс старения клеток кожи в культуре / Е.П. Кузнецова, О.А. Орлова, И.В. Борзова и соавт. // Международный форум «Старшее поколение». – С. 92.
25. Применение пептида AED в геронтокосметологии: молекулярные механизмы действия / В. Хавинсон, О. Орлова, Н. Линькова и соавт. // V European Congress of Preventive, Regenerative and Anti-Aging Medicine – 2016. – С. 164-165.
26. Салль, Т.С. Пептиды KE и KED стимулируют процессы обновления в коже при старении / Т.С. Салль, О.А. Орлова, Н.С. Линькова // VI Ежегодная международная научно-практическая конференция «Актуальные вопросы медицины». Азербайджан, Баку, 2017. – С. 20-21.
27. Эффективность применения полипептидного комплекса эпифиза в геронтокосметологии / О.А. Орлова, Н.С. Линькова, А.П. Рыжак и соавт. // Международный форум «Старшее поколение» – СПб., 2014. – С. 101.
28. Orlova, O.A. Clinical aspects of Hayflick limit capability / O.A. Orlova // Aesthetic & Anti-aging Medicine World Congress, Monako, Spain, 2017. – P.46-47.
29. Orlova, O.A. Pineal gland peptides + Dosed Thermolysis = To overcome time / O.A. Orlova, N.S. Linkova, V.Kh. Khavinson // 13th Aesthetic & Anti-aging Medicine World Congress “Euromedicom”, Monako, Spain - 2015. - P. 143-144.
30. Pineal Gland peptides regulate apoptosis and proliferation of human skin fibroblasts during aging / O. Orlova, N. Linkova, S. Trofimova, S. et al. // International symposium Expert’s opinion on current approaches in anti-ageing medicine and gerontology. Geneva, Switzerland, 2017. – P.87-90.

УКАЗАТЕЛЬ ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Виноградова И.А. и др. Влияние функциональной активности эпифиза и геропротекторов на возрастные изменения физической работоспособности и некоторых биохимических показателей скелетных мышц крыс // В сборнике: Физическая культура, спорт, здоровье и долголетие IV международная научная конференция, посвящённая 100-летию ЮФУ. - 2015. - С. 205-213; *Войцеховская М.А. и др.* Влияние коротких пептидов на развитие органотипической культуры ткани кожи молодых и старых крыс // Профилактическая и клиническая медицина. — 2011. - Т. 2, № 1. - С. 110-113; *Гунин А.Г. и др.* Возрастные изменения численности и пролиферации фибробластов в коже человека // Успехи геронтологии. – 2011. – Vol. 24. – P. 43–47; *Кветной И.М. и др.* Meso-Wharton P199: клеточная регенерация возрастной кожи как результат пептидной регуляции активности собственных стволовых клеток // Метаморфозы. - 2015. - № 10. - С. 44-48; *Линькова Н.С. и др.* Компенсаторное действие пептидов эпифиза на органы иммунной и эндокринной систем у эпифизэктомированных крыс // Научные ведомости. – 2011. – Т. 13. - № 4. – С. 81-85; *Линькова Н.С. и др.* Молекулярные механизмы ретинопотекторного действия коротких пептидов // Российский семейный врач. – 2013. – Т. 17. - № 3. - С. 22-24; *Льюин Б.* Клетки. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. - 2011. - 951 с.; *Сафарова Г.Л.* Демография старения: современное состояние и приоритетные направления исследований // Успехи геронтологии. – 2009. – Т. 22. - № 1. – С. 49-59; *Смирнова И.О.* Фотостарение кожи и базально-клеточный рак: роль тучных клеток // Клиническая медицина. – 2005. – Т. 83. - №7. – С. 55-58; *Прилепская В.Н. и др.* Новое в профилактике и терапии климактерического синдрома // Гинекология. – 2016. – Т. 18. - № 1. – С. 7-12; *Хавинсон В.Х.* Тетрапептид, обладающий геропротекторной активностью, фармакологическое средство на его основе и способ его применения. Патент РФ № 2157233 от 10.10.2000; *Хавинсон В.Х.* Пептидная регуляция старения. СПб.: Наука, 2009. – 50 с.; *Хавинсон В.Х.* Перспективы применения пептидных биорегуляторов для увеличения ресурса жизнедеятельности организма // Российский семейный врач. – 2013. – Т. 17. - № 3. – С. 11-13; *Хавинсон В.Х., Анисимов В.Н.* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2009. – Т. 148. - № 7. – С. 108; *Хавинсон В.Х., Анисимов В.Н.* 35-летний опыт исследований пептидной регуляции старения // Успехи геронтологии. – 2009. – Т. 22. - № 1. – С. 11-23; *Хавинсон В.Х. и др.* Способ получения из животного сырья комплекса биологически активных полипептидов, обладающих антиоксидантным и геропротекторным действием, фармакологическое средство и способ его применения. Патент РФ № 2163129 от 20.02.2001; *Хавинсон В.Х. и др.* Пептидная регуляция генома и старение. М: Изд-во РАМН, 2005. – 208 с.; *Хавинсон В.Х. и др.* Морфофункциональные основы пептидной регуляции старения // Успехи современной биологии. – 2011а. - Т. 131. - № 2. - С. 115-121; *Хавинсон В.Х. и др.* Влияние коротких пептидов на экспрессию сигнальных молекул в органотипической культуре клеток эпифиза // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2011б. - № 3. – С. 151-154; *Хавинсон В.Х. и др.* Короткие пептиды, проникающие в клетку: модель взаимодействия с промоторными участками генов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. - №10. – С. 391-396; *Хавинсон В.Х. и др.* Идентификация пептида AEDG в полипептидном комплексе эпифиза // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2017. – Т.164, №7. – С. 52-55; *Хавинсон В.Х., Рыжак Г.А.* Пептидные биорегуляторы в коррекции возрастных изменений // Эстетическая медицина. - 2010. - Т. 9. - № 4. - С. 23-27; *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.* Короткие пептиды стимулируют клеточную регенерацию в коже при старении // Успехи геронтологии. - 2014. - Т. 27. - № 4. - С. 699 – 703; *Чиркова Е.Ю. и др.* Клеточно-кинетическая модель для изучения геропротекторов и

геропроторов // Доклады Академии наук. - 1984. - Т. 278. - № 6. - С. 1474; *Akhalaya M.Y. et al.* Molecular action mechanisms of solar infrared radiation and heat on human skin // *Ageing Res Rev.* - 2014. - P. 16C:1-11; *Amaro-Ortiz A. et al.* Ultraviolet radiation, aging and the skin: prevention of damage by topical cAMP manipulation // *Molecules.* - 2014. - Vol. 19. - N 5. - P. 6202-6219; *Anisimov V.N., Khavinson V.Kh.* Peptide bioregulation of aging: results and prospects // *Biogerontology.* - 2010. - N. 11. - P. 139-149; *Baohua Y., Li L.* Effects of SIRT6 silencing on collagen metabolism in human dermal fibroblasts // *Cell Biol. Int.* - 2012. - V. 36. - N 1. - P. 105-108; *Boulter E. et al.* CD98hc (SLC3A2) regulation of skin homeostasis wanes with age // *The journal of experimental medicine.* - 2013. - V. 210. - N 1. - P. 173-190; *de la Ballina L.R. et al.* Amino Acid Transport Associated to Cluster of Differentiation 98 Heavy Chain (CD98hc) Is at the Cross-road of Oxidative Stress and Amino Acid Availability // *J Biol Chem.* - 2016. - V. 291. - N 18. - P. 9700-9711; *Donehower L.A.* Does p53 affect organismal aging? // *J. Cell. Physiol.* 2002. V. 192, N 1. P. 23-33; *Fernandez T.L. et al.* Characterization of a Human Skin Equivalent Model to Study the Effects of Ultraviolet B Radiation on Keratinocytes // *Tissue Eng Part C Methods.* - 2014. - V. 20. - N 7. - P. 588-598; *Gontijo Guerra S. et al.* Skin conditions in community-living older adults: prevalence and characteristics of medical care service use // *J Cutan Med Surg.* - 2014. - V. 18. - P. 1-9; *Khavinson V.Kh., Malinin V.V.* Gerontological aspects of genome peptide regulation. Basel: Karger AG, 2005.- 104 p.; *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; *McCord R.A. et al.* SIRT6 stabilizes DNA-dependent Protein Kinase at chromatin for DNA double-strand break repair // *Aging (Albany NY)* - 2009. - V.1. - N 1. - P. 109-121; *Ressler S. et al.* p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin // *Aging Cell.* - 2006. - V. 5. - N 5. - P. 379-389; *Ulakcsai Z. et al.* Protective effect of resveratrol against caspase 3 activation in primary mouse fibroblasts // *Croat Med J.* - 2015. - Vol. 56. - N 2. - P. 78-84; *Wong V.W. et al.* Loss of keratinocyte focal adhesion kinase stimulates dermal proteolysis through upregulation of MMP9 in wound healing // *Ann Surg.* - 2014. - Vol. 260. - N 6. - P. 1138-1146; *Xue S.N. et al.* Changes in biological behaviors of rat dermal fibroblasts induced by high expression of MMP9 // *World J Emerg Med.* - 2014. - V. 5. - N 2. - P. 139-143.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, ИСПОЛЬЗОВАННЫХ В АВТОРЕФЕРАТЕ

ППЭ	полипептидный комплекс эпифиза
AEDG	тетрапептид Lys-Glu-Asp-Gly (Эпиталон)
CD	кластер дифференцировки
MMP	матриксные металлопротеиназы

ОРЛОВА Оксана Анатольевна ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДОВ ЭПИФИЗА НА ФИБРОБЛАСТЫ КОЖИ ПРИ СТАРЕНИИ // Автореф. дис. канд. биол. наук: 14.01.30 – геронтология и гериатрия, СПб. – 2017. – 26 с.

Подписано в печать « » _____ 2017 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