



На правах рукописи

ФРИДМАН

Наталья Владимировна

**ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДОВ НА ФИБРОБЛАСТЫ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА
ПРИ РЕПЛИКАТИВНОМ СТАРЕНИИ**

14.01.30 — геронтология и гериатрия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2021

Работа выполнена в лаборатории молекулярных механизмов старения отдела биogerонтологии автономной научной некоммерческой организации высшего образования научно-исследовательского центра «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии».

Научный руководитель:

доктор биологических наук, доцент

Линькова Наталья Сергеевна

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор

Трофимова Светлана Владиславовна

Официальные оппоненты:

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

Королькова Татьяна Николаевна – доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» МЗ РФ, заведующая кафедрой косметологии.

Ведущая организация:

ВГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет», г. Петрозаводск

Защита диссертации состоится «__» _____ 2021 г. в ____ часов на заседании Диссертационного совета Д 521.103.01 в АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» по адресу: 197110, Санкт-Петербург, пр. Динамо, д. 3.

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

Автореферат разослан «__» _____ 2021 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 521.103.01,

доктор биологических наук,

профессор



Козина Людмила Семеновна

Актуальность исследования

По данным Всемирной организации здравоохранения, в мире с каждым годом увеличивается число людей пожилого и старческого возраста. В Санкт-Петербурге с 1990 по 2005 г. доля населения старше трудоспособного возраста выросла на 14,5%. В Российской Федерации ожидается значительное увеличение численности населения в возрасте 60 лет и старше в предстоящее десятилетие: до 30,8 млн человек в 2025 г. и до 36,2 млн в 2050 г [Эрнандес Е., Марголина А., 2014].

Частота обращений пациентов пожилого возраста к врачам растет. Не исключением является и обращение лиц старше 60 лет к дерматологам-косметологам, что еще 10–15 лет назад было редкостью. В настоящее время люди этой возрастной категории все чаще ведут активную социальную жизнь, востребованы на работе и в семье, занимаются спортом. Желание быть полноценными участниками событий современного общества закономерно приводит к стремлению вести здоровый образ жизни и привлекательно выглядеть. Результатом этого является визит к специалисту косметологического профиля. Правильный выбор процедуры с учетом возрастных особенностей является залогом не только привлекательной внешности, но и улучшения качества жизни. Необходимость коррекции не только видимого старения кожи, но и патологических процессов, развивающихся в организме в целом, позволяет рассматривать кожу как часть стареющего организма.

Известно, что старение характеризуется накоплением макромолекулярных повреждений, нарушением обновления тканей и прогрессирующей потерей физиологической целостности. Одним из таких признаков является клеточное старение, которое активируется различными внутренними (укорочением теломер, избыточным производством активных форм кислорода (АФК)) и внешними (УФ-излучение, недостаток питательных веществ, воспаление) стимулами, ведущими к остановке клеточного роста и специфическим фенотипическим изменениям [van Deursen J.M., 2014; Muñoz-Espín D., Serrano M., 2014]. Выделяют естественное и ускоренное старение кожи, обусловленные соответственно внутренними и внешними стимулами. Как при естественном, так и при ускоренном старении кожи в патогенез этого процесса вовлечено большое количество различных клеточных и молекулярных факторов, основными из которых являются компоненты внеклеточного матрикса (коллаген, эластин, гликопротеины), транскрипционные факторы (p16, p53, p63, NF-κB), матриксные металлопротеиназы, цитокины, регуляторы окислительно-восстановительного баланса [Arseni L. et al., 2018]. Основным типом клеток, обеспечивающих метаболизм в коже, являются фибробласты. В них происходит синтез коллагена, выработка факторов роста, регуляция продукции провоспалительных цитокинов. При старении секреторный фенотип фибробластов изменяется, снижается способность синтезировать коллаген и эластин, что приводит к проявлению внешних признаков старения кожи [Krutmann J. et al., 2017]. Таким образом, целесообразным является поиск веществ, способных осуществлять регуляцию физиологической активности фибробластов кожи и предотвращать их преждевременное старение.

В настоящее время в геронтокосметологии возрастает интерес к препаратам, содержащим в своем составе пептиды или их комплексы. Выделяют сигнальные пептиды, энзимные ингибиторы, нейротрансмиттерные ингибиторы и транспортные пептиды. Короткие ди- и трипептиды, разработанные в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии, обладают тканеспецифическим и иммуномодулирующим действием, благодаря чему их возможно применять при

различных патологических процессах, в том числе при преждевременном старении кожи. Пептиды AED и KE демонстрировали пролиферативное (повышение синтеза белка Ki67) и антиапоптотическое (снижение синтеза каспазы-3) действие в культурах фибробластов кожи при репликативном старении. Добавление этих пептидов в культуру фибробластов кожи приводило к повышению их функциональной активности путем стимуляции экспрессии фактора CD98hc [Линькова Н.С. и др., 2016]. Пептид KE обладает иммуномодулирующим действием, восстанавливая баланс про- и противовоспалительных цитокинов в моделях *in vitro* и *in vivo*. Кроме того, *in silico* пептид KE демонстрирует высокую степень связывания с двуцепочечной ДНК [Kolchina N. et al., 2019], что позволяет предположить наличие эпигенетического механизма регуляции экспрессии генов короткими пептидами. В связи с наличием большого количества литературных данных, свидетельствующих о возможности пептидов AED и KE регулировать функциональную активность клеток, актуальным является изучение их влияния на репликативное старение фибробластов кожи человека.

Цель и задачи исследования

Цель исследования — изучить влияние пептидов AED и KE на репликативное старение фибробластов кожи человека.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Оценить влияние пептидов AED и KE на синтез гистоновых деацетилаз SIRT1, SIRT6 при репликативном старении фибробластов кожи человека.
2. Изучить влияние пептидов AED и KE на процессы ремоделирования межклеточного матрикса (синтез коллагена I типа и белка MMP1) при репликативном старении фибробластов кожи человека.
3. Оценить влияние пептидов AED и KE на синтез цитокина IL-1 и транскрипционного фактора NF-κB при репликативном старении фибробластов кожи человека.
4. Изучить влияние пептидов AED и KE на синтез фактора роста TGF-β при репликативном старении фибробластов кожи человека.
5. Изучить влияние пептидов AED и KE на синтез белка-регулятора окислительно-восстановительного баланса COX-2 при репликативном старении фибробластов кожи человека.

Научная новизна

При репликативном старении фибробластов кожи человека в них снижается экспрессия сиртуинов 1, 6, что свидетельствует о снижении активности системы репарации ДНК и антиоксидантной функции клеток. Показано, что при старении фибробластов кожи в них снижается синтез коллагена и повышает экспрессия матриксной металлопротеиназы-1, что является одним из ключевых факторов, способствующих визуальному проявлению старения этой ткани. Впервые установлено, что при старении фибробластов дермы человека в них повышается экспрессия фермента COX-2 и фактора роста TGF-β. Впервые показано, что при старении фибробластов кожи повышается синтез провоспалительных цитокинов IL-1 и NF-κB, что согласуется с теорией развития inflamm-aging (ограниченного слабо выраженного воспалительного процесса). В работе впервые доказана способность пептидов AED и KE замедлять процесс репликативного старения дермальных фибробластов. Этот эффект достигается пептидной регуляцией синтеза цитокинов, транскрипционных факторов, факторов роста и регуляторов окислительно-восстановительного баланса. Установлено, что пептид KE предотвращает

воспалительные процессы, возникающие при репликативном старении фибробластов кожи человека. Это выражается в снижении экспрессии цитокина IL-1 и транскрипционного фактора NF-κB в фибробластах кожи при действии пептида KE. Установлено, что пептид AED активирует синтез коллагена I типа и ингибирует экспрессию MMP1. Впервые показано, что при репликативном старении фибробластов кожи человека пептиды KE и AED обладают антиоксидантным (регуляция синтеза фермента COX-2) и геропротекторным действием (регуляция синтеза сиртуинов 1 и 6).

Практическая значимость

Исследование влияния пептидов AED и KE на репликативное старение дермальных фибробластов *in vitro* позволило установить, что изученные пептиды могут оказывать геропротекторное, противовоспалительное и антиоксидантное действие. Пептиды AED и KE регулируют синтез гистоновых деацетилаз SIRT1, 6, участвующих в репарации ДНК и влияющих на продолжительность жизни. Пептид AED снижает синтез фермента MMP1, способствующего гидролизу белков межклеточного матрикса, в том числе коллагена и эластина. Поскольку повышенное разрушение этих белков наблюдается при старении не только дермы, но и соединительной ткани, расположенной в других органах, это указывает на геропротекторный эффект пептида AED в отношении соединительной ткани. Антиоксидантное действие пептидов AED и KE, выражающееся в регуляции синтеза фермента COX-2, играет важную роль в поддержании функций дермы при ее естественном и стресс-индуцированном старении.

Положения, выносимые на защиту

1. При репликативном старении фибробластов кожи человека экспрессия SIRT1 в них снижается в 1,8 раза. Пептид AED повышает синтез SIRT1 в «старых» фибробластах кожи до значений, превышающих этот показатель у «молодых» клеток. Увеличение экспрессии SIRT1 в дермальных фибробластах при их репликативном старении под действием пептида AED указывает на активацию транскрипции и репарации ДНК, нарушающуюся при клеточном старении.

2. При репликативном старении фибробластов кожи человека экспрессия SIRT6 в них снижается в 3,6 раза. Пептиды AED и KE повышают синтез SIRT6 в «старых» фибробластах кожи. Это может указывать на повышение их репликативного потенциала.

3. При репликативном старении фибробластов кожи человека экспрессия коллагена I типа в них снижается в 3,5 раза, а синтез MMP1 возрастает в 2,5 раза. Пептид AED повышает синтез коллагена I типа и снижает экспрессию MMP1 в «старых» фибробластах кожи. Пептид KE повышает синтез коллагена I типа в «старых» фибробластах кожи, но не влияет на синтез MMP1. Пептиды AED и KE снижают интенсивность ремоделирования межклеточного матрикса и активируют синтез коллагена I типа при старении фибробластов дермы.

4. При репликативном старении фибробластов кожи человека экспрессия провоспалительных белков IL-1 и NF-κB возрастает соответственно в 1,7 и 1,5 раза. В «старых» фибробластах пептид KE снижает синтез провоспалительного цитокина IL-1 до уровня «молодых» культур и транскрипционного фактора NF-κB в 2 раза. Пептид KE может предотвращать развитие локальной слабо выраженной воспалительной реакции (inflamm-aging) при старении кожи.

5. При репликативном старении фибробластов кожи человека экспрессия фактора роста TGF- β повышается в 4,8 раза. Пептид KE снижает синтез TGF- β в «старых» фибробластах кожи. Снижение экспрессии фактора роста TGF- β под влиянием пептида KE может способствовать нормализации метаболизма коллагена в дерме при ее старении.

6. При репликативном старении фибробластов кожи человека экспрессия фермента СОХ-2 повышается в 4,8 раза. Пептиды AED и KE снижают экспрессию СОХ-2 в «старых» фибробластах кожи практически до уровня, характерного для «молодых» клеток. Пептиды AED и KE способствуют нормализации уровня свободных радикалов при старении дермальных фибробластов.

7. Пептиды AED и KE регулируют процесс репликативного старения фибробластов кожи человека. Пептид AED регулирует ремоделирование межклеточного матрикса, обладает антиоксидантным действием, оказывает геропротекторные эффекты на фибробласты кожи человека через белки семейства сиртуинов. Пептид KE также регулирует антиоксидантную активность дермальных фибробластов и нормализует синтез сиртуинов при старении этих клеток. Кроме того, пептид KE восстанавливает иммунную функцию фибробластов кожи человека при репликативном старении.

Связь с научно-исследовательской работой института

Диссертационная работа является научной темой, выполняемой по основному плану научно-исследовательских работ АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии».

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликовано 12 научных работ, в том числе 6 статей в журналах, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации для опубликования материалов диссертационных исследований (в том числе 3 статьи в журналах, реферируемых в базе данных Scopus), 1 глава в монографии, 5 тезисов докладов.

Апробация и реализация диссертации

Основные материалы диссертации доложены на XXIII съезде физиологического общества им. И.П. Павлова (Воронеж, 2017), Международной научной конференции по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова», VII Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Москва, 2017), IV International Dermaesthetic Medical Day «Ageless Generation — симбиоз геронтологии и эстетической медицины» (Москва, 2017), International Symposium of Experts “Regenerative medicine and ageing” (Dubai, 2020); Международная научная конференция «Инновационные исследования в биологии и медицине» (Сочи, 2020).

Личный вклад автора

Личный вклад автора в диссертационное исследование состоял в разработке дизайна исследования, проведении экспериментов, статистической обработке и анализе данных. Автор принимала участие во всех исследованиях, включавших в себя культивирование дермальных фибробластов, иммуофлуоресцентное окрашивание, лазерную сканирующую конфокальную микроскопию, морфометрию. Автор также

принимала участие в анализе данных, статистической обработке полученных результатов исследования, написании статей, тезисов, выступлении с докладами на международных и отечественных конференциях.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, содержащего актуальность проведенной работы, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждений, заключения, выводов, практических рекомендаций и указателя литературы. Текст диссертации изложен на 113 страницах, иллюстрирован 23 рисунками. Список литературы содержит 166 источников, из них на русском языке — 26, на английском — 140.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение и культивирование фибробластов кожи

В работе были использованы фибробласты кожи женщины (дата рождения 16.03.1970), выделенные из околоушной области лица. Материал для исследования был получен в результате операции по круговой подтяжке лица. Пациентка дала информированное согласие на использование операционного материала в научных исследованиях. Кожу после взятия обрабатывали в стерильных условиях раствором диспазы II (Gibco, США) в концентрации 2,4 ЕД/мл в течение 18 ч при температуре 4 °С, затем механически отделяли эпидермис от дермы. Для получения суспензии клеток дерму измельчали и помещали в раствор коллагеназы I типа (Gibco, США) в среду M199 (Gibco, США). Питательная среда для культивирования состояла из среды M199, 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco, США), 1% L-глутамина (Биолот, Россия), 1,5% Непес-буфера и раствора пенициллина и стрептомицина (Биолот, Россия). Через 5 суток первичная культура достигала монослоя, и ее пересеивали в соотношении 1:3. Для снятия клеток с подложки использовали раствор трипсин-версена (Gibco, США). Концентрация клеток для нулевого пассажа составила 50 тыс. клеток на 1 мл среды. Пассирование производили через 3 суток на 4-е, когда культура достигала монослоя.

Моделирование репликативного старения культуры фибробластов кожи

Старение культивируемых клеток изучали по методу Швайгерта [Sweigert S.E. et al., 1989] с модификациями. Для моделирования репликативного старения клетки выращивали до 3-го и 14-го пассажей. На 3-м пассаже число клеток за 3 суток удваивалось, что указывает на фазу их активного роста. В связи с этим клетки 3-го пассажа были обозначены как «молодые». На 14-м пассаже наблюдали статистически значимое снижение скорости удвоения клеток. Удвоение клеточной популяции наблюдали на 5-е сутки. Процент мертвых клеток определяли по окрашиванию их трипановым синим. Снижение скорости удвоения клеток указывает на проявление репликативного старения культуры. В связи с этим культуры 14-го пассажа рассматривались нами как «старые клетки» [Khokhlov A.N., 2013; Khokhlov A.N. et al., 2014].

Дизайн эксперимента и обоснование выбора пептидов для исследования

Клетки 3-го и 14-го пассажей были разделены на 4 группы: 1 — контроль (культуры с добавлением питательной среды); 2 — культуры с добавлением пептида

KE в концентрации 20 нг/мл; 3 — культуры с добавлением пептида AED в концентрации 20 нг/мл; 4 — культуры с добавлением пептида KEDW (контрольный пептид, не оказывающий тканеспецифического действия на фибробласты) в концентрации 20 нг/мл. Концентрацию пептидов 20 нг/мл выбрали, так как в предыдущих исследованиях она оказалась наиболее эффективной в отношении фибробластов кожи для других коротких пептидов [Линькова Н.С. и др., 2016].

Ранее установлено, что пептиды KE и AED нормализуют экспрессию сигнальных молекул в культуре фибробластов кожи при их репликативном старении. При старении фибробластов кожи пассажами экспрессия проапоптотических белков p53, p16 и каспазы-3 повышается. Пептиды KE и AED снижают экспрессию маркеров апоптоза при достижении клетками лимита Хейфлика. В «старых» культурах фибробластов кожи под действием указанных пептидов повышается экспрессия белков CD98hc, MMP-9 и Ki67. Таким образом, пептиды KE и AED стимулируют пролиферацию и функциональную активность фибробластов кожи при их репликативном старении [Линькова Н.С. и др., 2016].

В экспериментах на животных пептид KE способствовал заживлению ран. пептид KE стимулирует клеточный иммунитет и неспецифическую резистентность организма, оказывает активирующее действие на макрофаги, лимфоциты крови, тимоциты и нейтрофилы [Щербак В.А., Патеюк А.В., 2004; Севостьянова Н.Н. и др., 2012].

Пептид KE при введении в организм трансгенных мышей подавляет экспрессию онкогена HER-2/neu в 2 раза, что сопровождается уменьшением диаметра опухоли [Хавинсон В.Х., 2010]. Пептид KE способствует увеличению доли транскрибируемого эухроматина и снижению количества гетерохроматина в лимфоцитах крови людей разного возраста, что указывает на его геропротекторные свойства [Хавинсон В.Х. и др., 2004; Хавинсон В.Х. и др., 2019]. Пептид AED в экспериментах у животных регулировал метаболизм соединительной ткани, что указывает на его хондропротекторные свойства и возможность регуляции функций фибробластов кожи [Хавинсон В.Х. и др., 2006]. Пептид KEDW регулирует функции клеток поджелудочной железы, в связи с чем его использовали в исследовании в качестве контрольного [Khavinson V.Kh. et al., 2019].

Иммуноцитохимическое исследование экспрессии сигнальных молекул в культурах фибробластов кожи

Для визуализации фибробластов и дальнейшего морфофункционального анализа было произведено иммуноцитохимическое окрашивание культур. Для проведения пермеабиллизации использовали 0,1% Тритон X-100 (Биолот, Россия), растворенный в фосфатно-солевом буфере (PBS). Культуры клеток инкубировали в 1% PBS (pH 7,5) в течение 30 мин для блокировки неспецифического связывания. Инкубацию с первичными антителами проводили в течение 60 мин. В работе использовали первичные моноклональные антитела к коллагену I типа (1:100, Abcam, США), SIRT1 (1:100, Abcam, США), SIRT6 (1:200, Abcam, США), IL-1 (1:75, Abcam, США), NFκB (1:100, Abcam, США) и TGF-β (1:75, Abcam, США). Указанные сигнальные молекулы были выбраны в связи с тем, что они играют ведущую роль в процессах клеточного старения и поддержания функциональной активности фибробластов кожи.

Сиртуины представляют собой семейство НАД-зависимых белков, регулирующих транскрипцию и клеточное старение при помощи деацетилирования гистоновых и негистоновых белков-мишеней [Singh C.K. et al., 2018]. Экспрессия

SIRT1 снижается при старении, что приводит к митохондриальной дисфункции, развитию воспалительных реакций, нейродегенеративных и других ассоциированных с возрастом заболеваний. SIRT1 может активировать транскрипционные факторы PGC-1 α и HIF-1 α , синтез которых коррелирует с продолжительностью жизни [Yuan Y. et al., 2016]. SIRT1 снижает активность NF κ B, COX-2 и продукцию iNOS, оказывая противовоспалительный эффект [Mendes K.L. et al., 2017]. SIRT6 замедляет репликативное старение клеток и способствует увеличению продолжительности жизни: участвует в репарации ДНК, ингибирует патологические сигнальные каскады, связанные с IGF-1 и нарушением функций антиоксидантной системы, активирует метаболизм [Strub T. et al., 2018; Tian X. et al., 2019]. **Белок NF- κ B** — универсальный фактор транскрипции, контролирующий экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла. Нарушение синтеза NF κ B вызывает воспаление, аутоиммунные заболевания, развитие вирусных инфекций и рака [Simmonds R.E., Foxwell B.M., 2008]. **Белок TGF- β** представляет собой цитокин, который регулирует рост, дифференцировку, морфогенез и апоптоз клеток. TGF- β является стимулятором роста фибробластов [Khalil H. et al., 2017]. **Белок IL-1** — цитокин, медиатор воспаления и иммунитета, синтезируется активированными макрофагами, кератиноцитами, стимулированными В-клетками и фибробластами. **Коллаген I типа** является одним из основных структурных белков, синтезируемых фибробластами кожи, который указывает на высокую функциональную активность этих клеток [Borges J. et al., 2020].

Морфометрический и статистический анализ данных

Для анализа полученных результатов использовали конфокальный микроскоп Olympus FluoView 1000 (Япония) и программное обеспечение Видеотест Морфология 5.2 (Россия). В каждом случае анализировали 5 полей зрения при увеличении 200 по показателям площади экспрессии и оптической плотности. Площадь экспрессии рассчитывали как отношение площади, занимаемой иммунопозитивными клетками, к общей площади клеток в поле зрения и выражали в процентах. Этот параметр характеризует количество клеток, в которых экспрессируется исследуемый маркер. Оптическая плотность отражает концентрацию исследуемого маркера в одной клетке.

Статистическая обработка данных включала подсчет среднего арифметического, стандартного отклонения и доверительного интервала для каждой выборки и проводилась в программе Statistica 6.0. Для анализа вида распределения использовали критерий Шапиро-Уилка. 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 на экспрессию SIRT1 в фибробластах кожи при репликативном старении

Площадь экспрессии SIRT1 в контроле в «старых» культурах была в 1,8 раза ниже, чем в «молодых» культурах. Под действием пептида AED происходило статистически значимое увеличение площади экспрессии SIRT1 в «молодых» культурах в 2,4 раза, а в «старых» культурах — в 2 раза (рис. 1А). Оптическая плотность экспрессии SIRT1 в фибробластах кожи человека при их репликативном старении в «старой» культуре была в 1,9 раза ниже, чем в «молодой» культуре фибробластов кожи человека. Под действием пептида AED наблюдалось статистически значимое увеличение оптической плотности SIRT1 в «молодых» культурах в 1,9 раза, а в «старых» культурах — в 2,6 раза по сравнению с соответствующим контролем (рис. 1Б). Контрольный пептид KEDW не влиял на площадь и оптическую плотность экспрессии SIRT1 в «молодых» и «старых» фибробластах кожи (рис. 1А, Б).

Установлено, что в период от рождения до 85 лет происходит снижение уровня SIRT1 в фибробластах дермы [Голубцова Н.Н. и др., 2017]. Это сопровождается уменьшением пролиферативной активности и численности данной субпопуляции клеток. Уменьшение содержания SIRT1 в фибробластах дермы с возрастом коррелирует со снижением их пролиферативной активности и может рассматриваться в качестве одного из проявлений репликативного старения клеток кожи. Кроме того, SIRT1 защищает фибробласты кожи от апоптоза, индуцированного АФК, содержание которых в клетке повышается при старении. Возрастное снижение экспрессии SIRT1 в фибробластах дермы может приводить к нарушению деацетилирования гистонов, нестабильности генома, снижению эффективности репарации ДНК, что приводит к апоптозу клеток кожи или снижению их функциональной активности.

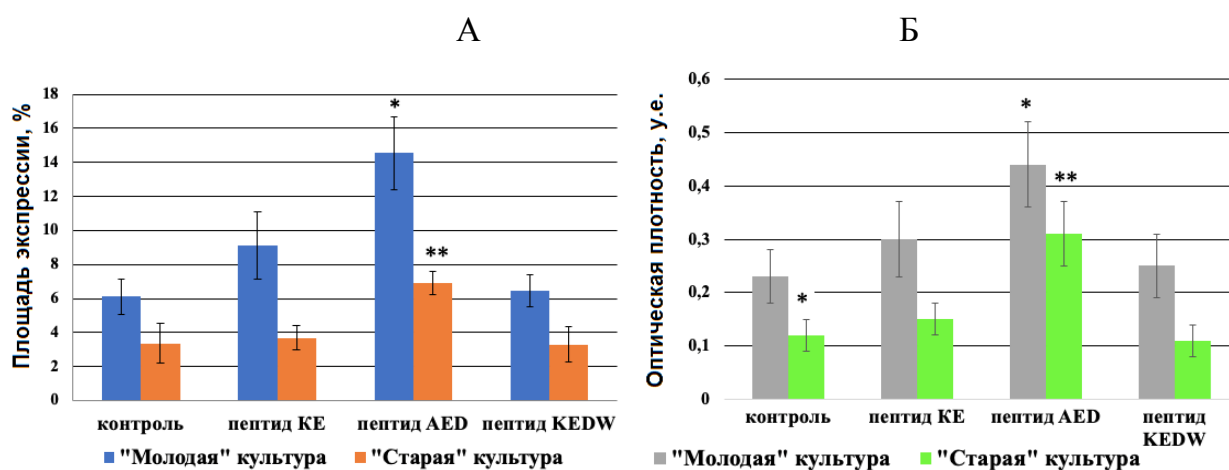


Рисунок 1. Влияние пептидов на экспрессию SIRT1 в фибробластах кожи человека при репликативном старении: А — площадь экспрессии, Б — оптическая плотность

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

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

Пептид AED стимулирует экспрессию SIRT1 в фибробластах кожи человека при их старении, что способствует снижению выраженности их апоптоза и повышению способности к пролиферации [Линькова Н.С. и др., 2016].

Влияние пептидов на экспрессию SIRT6 в фибробластах кожи при репликативном старении

При репликативном старении фибробластов кожи человека в контрольных культурах площадь экспрессии SIRT6 уменьшалась в 3,6 раза. Добавление пептида KE способствовало повышению площади экспрессии SIRT6 в «молодых» культурах в 1,6 раза, а в «старых» культурах — в 2,6 раза. Пептид AED увеличивал площадь экспрессии SIRT6 в «молодых» фибробластах кожи в 1,7 раза и в «старых» культурах — в 11,5 раза. Влияние пептида AED на площадь экспрессии SIRT6 при репликативном старении фибробластов кожи человека было сильнее, чем действие пептида KE (рис. 2А). Оптическая плотность экспрессии SIRT6 при старении фибробластов кожи человека уменьшалась в 2 раза. При добавлении пептида KE происходило увеличение оптической плотности экспрессии SIRT6 в «молодых» культурах в 1,5 раза, а в «старых» культурах — в 2 раза по сравнению с этими же показателями в контрольных «молодой» и «старой» культурах. Еще более сильный эффект выявлен при добавлении пептида AED к дермальным фибробластам. Установлено увеличение оптической плотности экспрессии SIRT6 в «молодых» культурах в 1,9 раза, а в «старых» культурах — в 2,6 раза (рис. 2Б). Контрольный пептид KEDW не влиял на площадь и оптическую плотность экспрессии SIRT6 в «молодых» и «старых» фибробластах кожи (рис. 2А, Б).

Полученные данные показали, что при репликативном старении происходит снижение экспрессии SIRT6 в фибробластах кожи человека. Это согласуется с литературными данными и указывает на уменьшение способности клеток к репарации ДНК, их повышенной чувствительности к стрессорным воздействиям и различным факторам внешней среды. Пептиды KE и AED способствуют восстановлению уровня экспрессии SIRT6, замедляя репликативное старение фибробластов кожи человека.

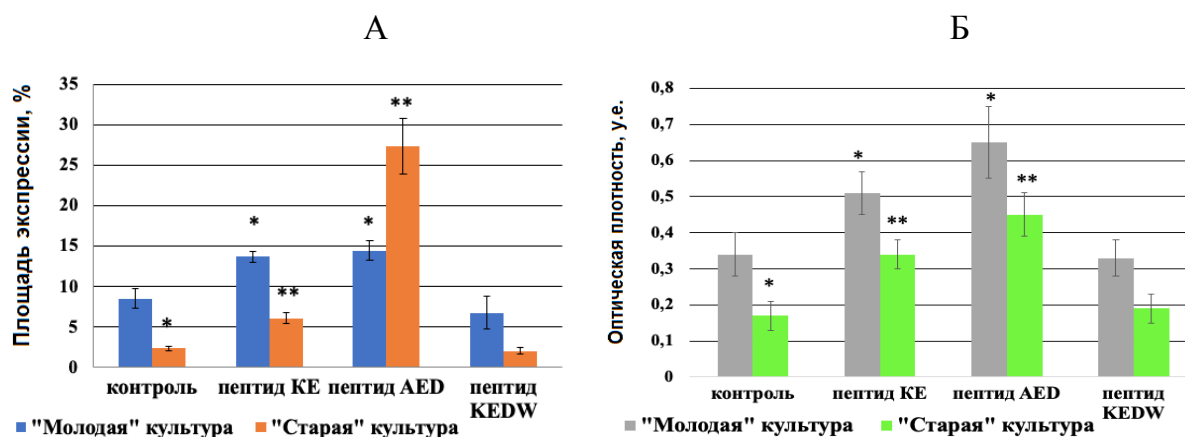


Рисунок 2. Влияние пептидов на экспрессию SIRT6 в фибробластах кожи человека при репликативном старении: А — площадь экспрессии, Б — оптическая плотность
* — $p < 0,05$ по сравнению с контролем в «молодых» культурах.
** — $p < 0,05$ по сравнению с контролем в «старых» культурах.

Известно, что при старении фибробластов кожи под действием ультрафиолетового излучения в них снижается экспрессия SIRT6. SIRT6 регулирует экспрессию гена *COL1A1*, ответственного за синтез коллагена типа $\alpha 1$. Таким образом, возрастное снижение экспрессии SIRT6 в дермальных фибробластах не только способствует их ускоренному старению и апоптозу, но и снижает функциональную активность этих клеток, например, синтез коллагена. Кроме того, возрастное снижение экспрессии SIRT6 в дермальных фибробластах снижает способность репрограммирования фенотипа этих клеток с участием микроРНК miR-766, что является одной из причин их ускоренного старения. Увеличение экспрессии SIRT6 под действием пептидов KE и AED в фибробластах кожи человека указывает на повышение синтеза этого белка. В свою очередь, повышение синтеза SIRT6 свидетельствует о замедлении процесса старения дермальных фибробластов.

Влияние пептидов на экспрессию коллагена I типа в фибробластах кожи при репликативном старении

Площадь экспрессии коллагена I типа в «старых» культурах фибробластов была в 3,5 раза ниже, чем в «молодых» культурах. Пептид KE повышал площадь экспрессии коллагена I типа в 1,8 раза в «старых» культурах. Пептид AED увеличивал площадь экспрессии коллагена I типа в «молодых» и «старых» дермальных фибробластах соответственно в 2,3 и 2,7 раза (рис. 3А).

Оптическая плотность экспрессии коллагена I типа в «старых» культурах фибробластов была в 4,6 раза ниже, чем в «молодых» культурах. Добавление пептида KE способствовало повышению оптической плотности экспрессии коллагена I типа в 3,5 раза в «старых» культурах, а в «молодых» культурах — в 1,6 раза. Пептид AED увеличивал оптическую плотность экспрессии коллагена I типа в «молодых» и «старых» фибробластах кожи человека соответственно в 2 и 5,5 раза (рис. 3Б). Контрольный пептид KEDW не влиял на площадь и оптическую плотность экспрессии коллагена I типа в «молодых» и «старых» фибробластах кожи (рис. 3А, Б).

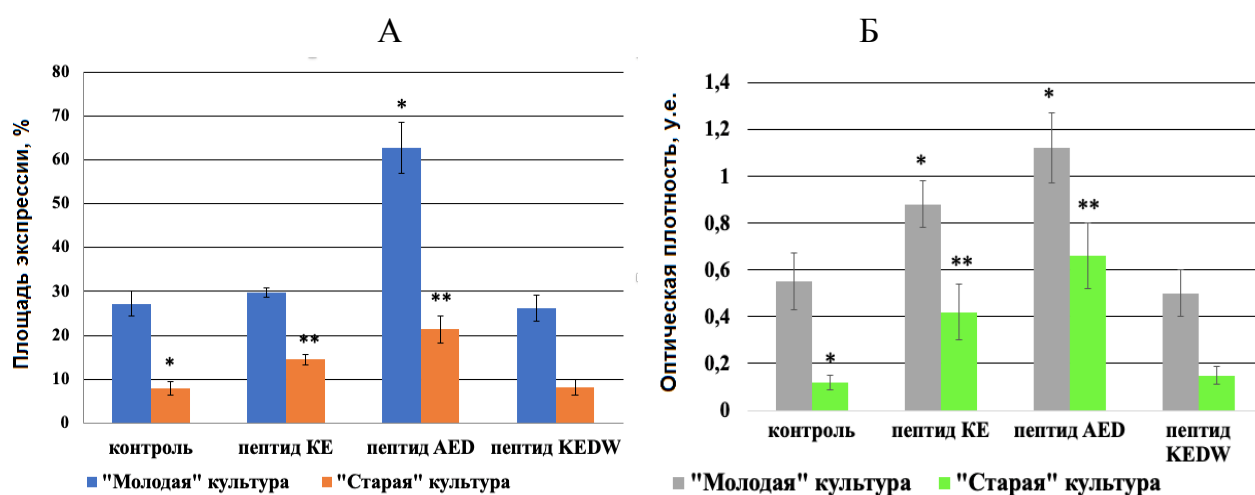


Рисунок 3. Влияние пептидов на экспрессию коллагена I типа в фибробластах кожи человека при репликативном старении: А — площадь экспрессии, Б — оптическая плотность

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

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

При морфометрическом исследовании кожи пациентов разных возрастных групп установлено, что с возрастом происходит прогрессивное уменьшение доли соединительной ткани, содержащей коллагеновые волокна [Смирнова Г.О. и др., 2012].

Изменения были наиболее выражены в средней части дермы у лиц в возрасте 50 лет и старше. Эти данные согласуются с полученными нами данными по снижению экспрессии коллагена I типа при репликативном старении фибробластов кожи *in vitro*. Обобщая данные по исследованию экспрессии сиртуинов и коллагена I типа при репликативном старении фибробластов кожи человека, можно сделать вывод о том, что геропротекторный эффект пептида AED заключается в активации синтеза SIRT-1, SIRT-6 и коллагена I типа в дермальных фибробластах.

Влияние пептидов на экспрессию матриксной металлопротеиназы-1 в фибробластах кожи при репликативном старении

При репликативном старении фибробластов кожи наблюдается увеличение экспрессии MMP-1. Площадь экспрессии данного маркера в «старых» культурах фибробластов была в 2,5 раза выше, чем в «молодых» культурах. Пептид AED снижал площадь экспрессии MMP-1 в «молодых» культурах дермальных фибробластов в 2,2 раза и в «старых» культурах — в 1,6 раза (рис. 4А). При репликативном старении фибробластов кожи человека наблюдается увеличение оптической плотности экспрессии MMP-1. Оптическая плотность экспрессии данного маркера в «старых» культурах фибробластов была в 2,9 раза выше, чем в «молодых» культурах. Пептид AED снижал оптическую плотность экспрессии MMP-1 в «молодых» культурах дермальных фибробластов в 3,1 раза и в «старых» культурах — в 2,6 раза (рис. 4Б). Контрольный пептид KEDW не влиял на площадь и оптическую плотность экспрессии MMP-1 в «молодых» и «старых» фибробластах кожи (рис. 4А, Б).

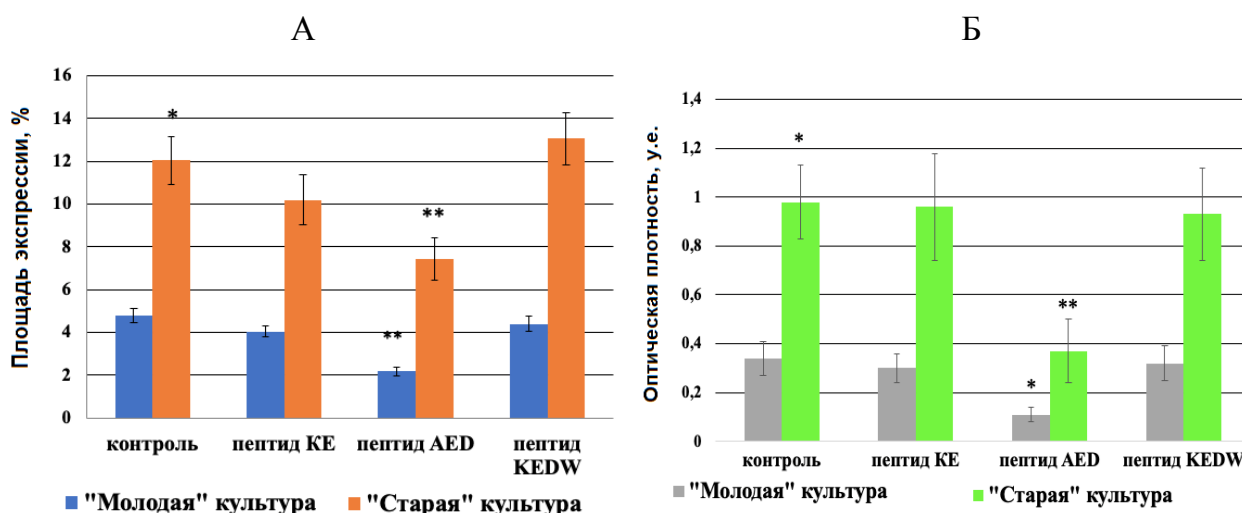


Рисунок 4. Влияние пептидов на экспрессию MMP-1 в фибробластах кожи человека при репликативном старении: А — площадь экспрессии, Б — оптическая плотность
* — $p < 0,05$ по сравнению с контролем в «молодых» культурах.
** — $p < 0,05$ по сравнению с контролем в «старых» культурах.

УФ-излучение стимулирует генерацию избыточного количества АФК (синглетный кислород, супероксид-анион, пероксид водорода, гидроксильные

радикалы) в фибробластах дермы. АФК активируют семейство MAPK протеинкиназ, стимулирующих синтез белков c-Fos и c-Jun. C-Jun в сочетании с c-Fos образуют фактор транскрипции AP-1, который играет важную роль в регуляции транскрипции MMP-1, MMP-3 и MMP-9, что и приводит к деградации коллагена.

Кроме того, AP-1 ингибирует передачу сигналов TGF- β , основного регулятора выработки проколлагена I типа в коже человека. Нарушение сигнального пути TGF- β приводит к снижению синтеза проколлагена. Активное ремоделирование межклеточного матрикса под действием MMP-1 и других протеиназ приводит к снижению содержания коллагена и эластина в коже, что способствует образованию морщин. Таким образом, пептид AED, снижая экспрессию MMP-1, препятствует активному ремоделированию межклеточного матрикса фибробластами кожи при репликативном старении.

Влияние пептидов на экспрессию IL-1 в фибробластах кожи при репликативном старении

При репликативном старении фибробластов кожи наблюдается увеличение площади экспрессии IL-1 в 1,7 раза. При добавлении пептида KE в культуру не наблюдалось достоверного изменения площади экспрессии IL-1 в «молодых» культурах. В «старых» дермальных фибробластах под влиянием пептида KE площадь экспрессии IL-1 снижалась в 1,6 раза до уровня экспрессии IL-1 в контрольных «молодых» культурах фибробластов (рис. 5А). При старении дермальных фибробластов выявлено увеличение оптической плотности экспрессии IL-1 в 4,7 раза. В «старых» дермальных фибробластах под влиянием пептида KE оптическая плотность экспрессии IL-1 снижалась в 2,4 раза (рис. 5Б). Контрольный пептид KEDW не влиял на площадь и оптическую плотность экспрессии IL-1 в «молодых» и «старых» фибробластах кожи (рис. 5А, Б).

Увеличение концентрации цитокинов в крови в пожилом и старческом возрасте является приспособительной реакцией, направленной на активацию иммунитета. Кроме того, при старении во всех тканях и органах развивается слабо выраженный воспалительный процесс (inflamm-aging), в котором участвует IL-1. Имеются данные о том, что IL-1 играет важную роль в деградации коллагена в дерме. Активация синтеза IL-1 фибробластами дермы при ускоренном старении, вызванном ультрафиолетовым излучением, может приводить к расщеплению коллагена и преждевременному старению кожи. Кроме того, преждевременное старение кожи может быть вызвано примесями в загрязненном воздухе, что особенно важно для жителей крупных городов. Показано, что IL-1 является одним из посредников, обеспечивающих развитие воспалительной реакции в коже при воздействии на нее твердых примесей, что приводит к ее ускоренному старению.

Пептид KE является регулятором функций иммунной системы при ее старении [Щербак В.А., Патеюк А.В., 2004; Хавинсон В.Х. и др., 2004; Севостьянова Н.Н. и др., 2012; Хавинсон В.Х. и др., 2019]. Вероятно, поэтому он оказывает влияние на экспрессию IL-1 в отличие от хондропротекторного пептида AED. Можно предположить, что пептид KE нормализует иммунную функцию фибробластов кожи человека при репликативном старении.

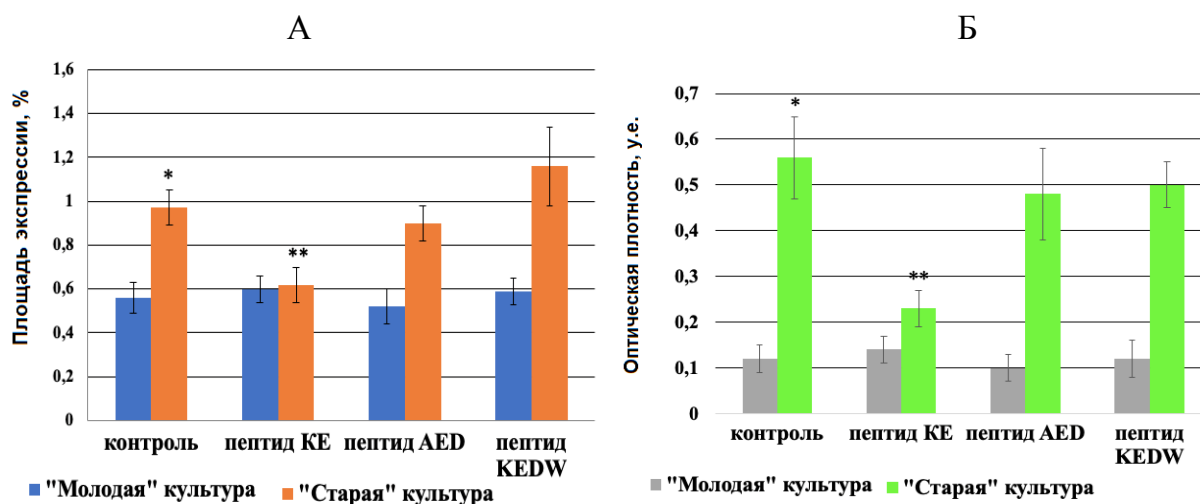


Рисунок 5. Влияние пептидов на экспрессию IL-1 в фибробластах кожи человека при репликативном старении: А — площадь экспрессии, Б — оптическая плотность
 * — $p < 0,05$ по сравнению с контролем в «молодых» культурах.
 ** — $p < 0,05$ по сравнению с контролем в «старых» культурах.

Влияние пептидов на экспрессию NF-κB в фибробластах кожи при репликативном старении

При репликативном старении наблюдается увеличение площади экспрессии NF-κB в фибробластах кожи человека. Площадь экспрессии этого маркера в «старых» культурах была в 5 раз выше, чем данный показатель в «молодых» культурах. Пептид KE снижал площадь экспрессии NF-κB в «старых» культурах фибробластов кожи человека по сравнению с контролем в 1,9 раза, но не влиял на экспрессию этого белка в «молодых» культурах (рис. 6А). При репликативном старении дермальных фибробластов человека наблюдается увеличение оптической плотности экспрессии NF-κB. Оптическая плотность экспрессии этого маркера в «старых» культурах была в 5,7 раза выше, чем в «молодых» культурах. Пептид KE снижал оптическую плотность экспрессии NF-κB в «старых» культурах фибробластов кожи человека по сравнению с контролем в 2,2 раза (рис. 6Б). Контрольный пептид KEDW не влиял на площадь и оптическую плотность экспрессии NF-κB в «молодых» и «старых» фибробластах кожи (рис. 6А, Б).

Известно, что пептид KE активирует клеточный иммунитет и неспецифическую резистентность организма [Щербак В.А., Патенюк А.В., 2004; Севостьянова Н.Н. и др., 2012]. NF-κB является универсальным фактором транскрипции, который контролирует экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла. Установлено, что подавление экспрессии SIRT6 при ускоренном старении фибробластов кожи под действием ультрафиолетового излучения приводит к повышению экспрессии NF-κB.

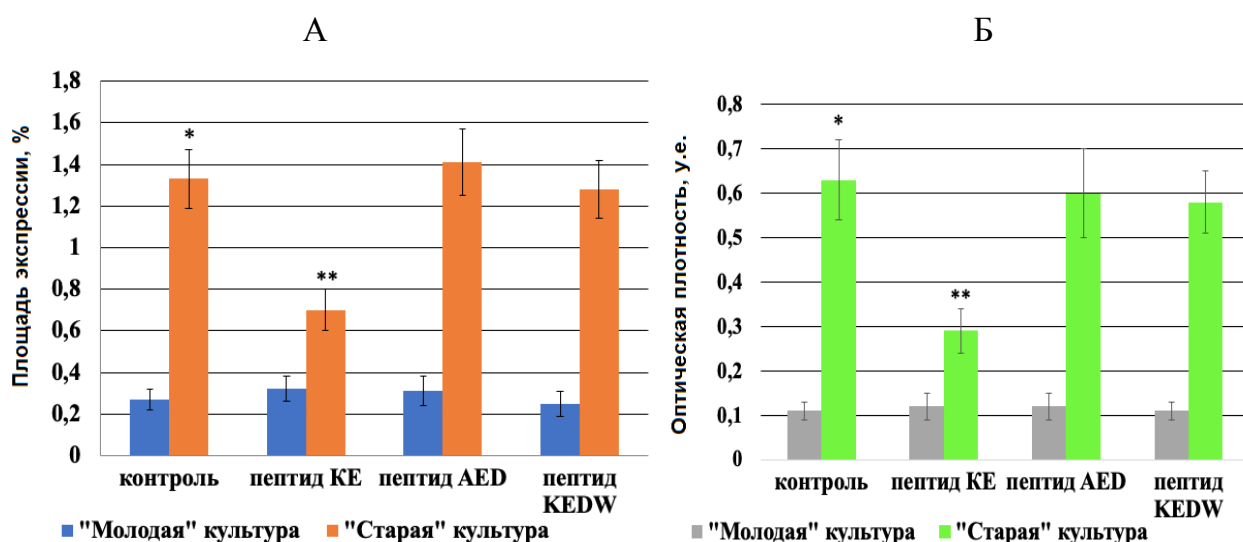


Рисунок 6. Влияние пептидов на экспрессию NF-κB в фибробластах кожи человека при репликативном старении: А — площадь экспрессии, Б — оптическая плотность
 * — $p < 0,05$ по сравнению с контролем в «молодых» культурах.
 ** — $p < 0,05$ по сравнению с контролем в «старых» культурах.

Этот процесс можно рассматривать как связанное со старением развитие воспалительной иммунной реакции в дерме. Кроме того, предполагается, что под действием УФ-излучения происходит повышение синтеза фактора NF-κB и MAPK-киназ, что приводит к активации TNF-α и MMP-1 и деградации коллагена и эластина. Эти процессы способствуют фотостарению. Известно, что стареющая ткань кожи создает перmissive микроокружение, которое способствует пролиферации и миграции раковых клеток и секреторному фенотипу, связанному со старением (SASP). Предполагается, что NF-κB играет ключевую роль в SASP. При получении сигналов, вызывающих клеточное старение (например, обнаружении двунитевых разрывов ДНК или деградации хроматина), серин-треониновые протеинкиназы ATM и ATR блокируют p53-зависимую аутофагическую деградацию транскрипционного фактора GATA4, способствуя активации NF-κB и индукции SASP. Снижение экспрессии NF-κB под действием пептида KE при репликативном старении фибробластов кожи можно рассматривать как нормализацию локальной иммунной реакции.

Влияние пептидов на экспрессию TGF-β в фибробластах кожи при репликативном старении

При репликативном старении фибробластов кожи человека площадь экспрессии TGF-β увеличивается в 4,8 раза. Пептид KE снижал площадь экспрессии TGF-β в «старых» культурах фибробластов в 2 раза, но не влиял на этот показатель в «молодых» культурах (рис. 7А). При репликативном старении дермальных фибробластов человека оптическая плотность экспрессии TGF-β увеличивается в 4,9 раза. Пептид KE снижал оптическую плотность экспрессии TGF-β в «старых» культурах фибробластов в 2,5 раза, но не влиял на этот показатель в «молодых» культурах (рис. 7Б). Контрольный пептид KEDW не влиял на площадь и оптическую плотность экспрессии TGF-β в «молодых» и «старых» фибробластах кожи (рис. 7А, Б).

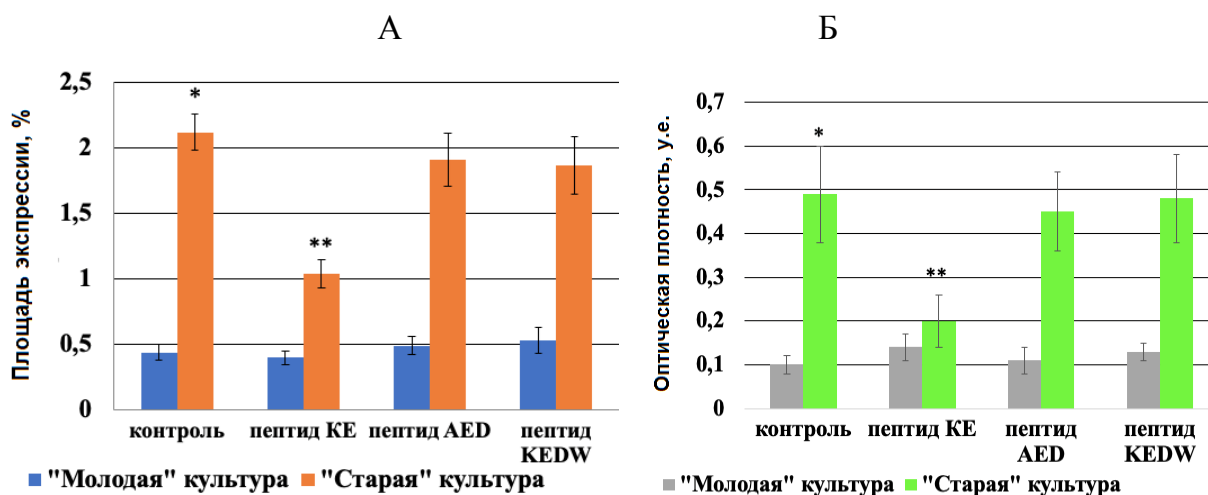


Рисунок 7. Влияние пептидов на экспрессию TGF- β в фибробластах кожи человека при репликативном старении: А — площадь экспрессии, Б — оптическая плотность
 * — $p < 0,05$ по сравнению с контролем в «молодых» культурах.
 ** — $p < 0,05$ по сравнению с контролем в «старых» культурах.

Известно, что при фотостарении фибробластов кожи реактивные формы кислорода активируют экспрессию транскрипционных факторов MAPK, AP-1 и NF κ B. Это приводит к активации экспрессии MMP и ингибированию TGF- β . С одной стороны, такой механизм является защитным, так как подавление синтеза TGF- β препятствует биодegradации коллагена. С другой стороны, активация MMP может являться другим фактором, стимулирующим расщепление коллагена. Напротив, показано, что пептиды Ile-Hyp и Ala-Hyp-Gly проявляли репаративный эффект за счет активации пути TGF- β /Smad и стимуляции синтеза проколлагена в фибробластах кожи, подверженных УФ-излучению, посредством снижения экспрессии белков AP-1, MMP-1 и MMP-3.

Кроме того, данные пептиды способствовали снижению содержания АФК в клетках и сохранению эндогенных систем антиоксидантной защиты. Поэтому данные о влиянии пути TGF- β на репликативное старение фибробластов кожи в настоящее время противоречивы. Можно предположить, что при репликативном старении фибробластов кожи человека пептид KE препятствует развитию воспалительной реакции в дерме и снижает интенсивность деградации коллагена путем уменьшения экспрессии TGF- β .

Влияние пептидов на экспрессию COX-2 в фибробластах кожи при репликативном старении

Площадь экспрессии COX-2 в фибробластах кожи человека при репликативном старении увеличивается в 4,8 раза. Добавление пептида KE способствует снижению площади экспрессии изучаемого маркера в «старых» культурах фибробластов в 3 раза. Пептид AED уменьшает площадь экспрессии COX-2 в «старых» и в «молодых» культурах фибробластов в 2 раза по сравнению с контролем (рис. 8А). Оптическая плотность экспрессии COX-2 в фибробластах кожи человека при репликативном старении увеличивается в 5 раз. При добавлении пептида KE происходит снижение оптической плотности экспрессии изучаемого маркера в «старых» культурах фибробластов в 2,6 раза, а в «молодых» культурах — в 1,7 раза. Пептид AED

уменьшает оптическую плотность экспрессии СОХ-2 в «старых» и в «молодых» культурах фибробластов в 2,3 и 1,9 раза соответственно по сравнению с контролем (рис. 8Б).

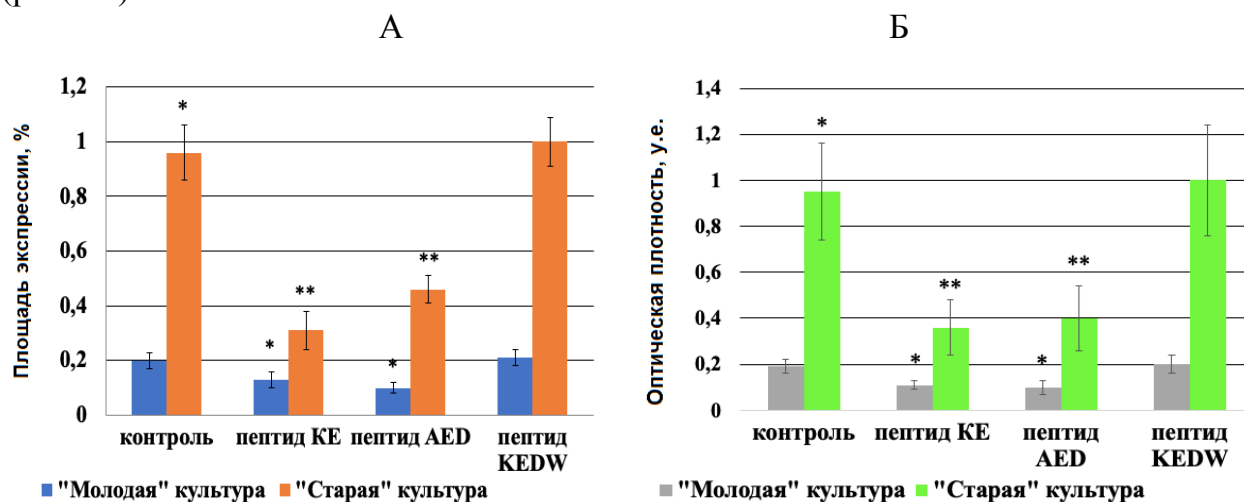


Рисунок 8. Влияние пептидов на экспрессию СОХ-2 в фибробластах кожи человека при репликативном старении: А — площадь экспрессии, Б — оптическая плотность
* — $p < 0,05$ по сравнению с контролем в «молодых» культурах.
** — $p < 0,05$ по сравнению с контролем в «старых» культурах.

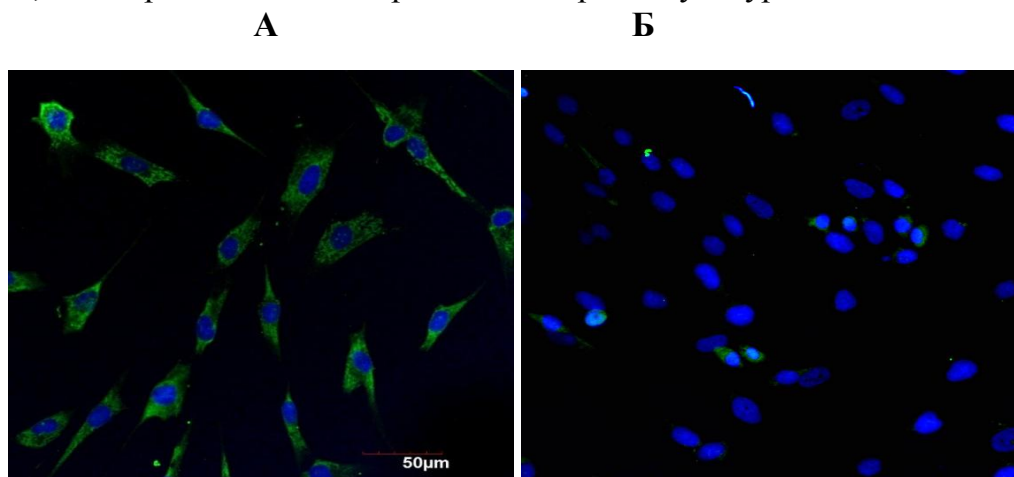


Рисунок 9. Экспрессия СОХ-2 в культуре фибробластов кожи на 14-м пассаже («старая» культура): А — контроль, Б — пептид AED. Конфокальная микроскопия, $\times 200$. Ядра клеток докрашены NucleoStain 33258 — темно-синяя флуоресценция, окрашивание на СОХ-2 — зеленая флуоресценция

На микрофотографии (рис. 9Б) в «старой» культуре фибробластов кожи видно, что при добавлении пептида AED происходит уменьшение зеленого свечения, что отражает снижение экспрессии СОХ-2 по сравнению с контрольной культурой фибробластов (рис. 9А). Контрольный пептид KEDW не влиял на площадь и оптическую плотность экспрессии СОХ-2 в «молодых» и «старых» фибробластах кожи (рис. 8А, Б).

Индукция синтеза фермента СОХ-2 происходит при повреждении тканей или при воспалении в ответ на действие цитокинов $IL-1\beta$, $TNF-\alpha$, $TGF-\beta$. При ускоренном старении фибробластов кожи под действием ультрафиолетового излучения наблюдается повышение количества свободных радикалов, что приводит к активации

синтеза СОХ-2 для компенсации реакции окислительного стресса и повреждения генома. Известно, что в биоптатах кожи, подверженной фотостарению, экспрессия СОХ-2 значительно более выражена, чем в биоптатах кожи при эндогенном старении и биоптатах, полученных от лиц молодого возраста. Кроме того, показано, что селективный ингибитор СОХ-2, NS-398, предотвращал старение фибробластов кожи человека посредством регуляции синтеза проколлагена-1 и кавеолина-1 и снижал синтез маркеров клеточного старения p16 и p53. Однако другие ингибиторы СОХ-2, такие как ибупрофен и аспирин, напротив, ускоряли клеточное старение, что свидетельствует о неоднозначности механизмов действия данных веществ.

При репликативном старении дермальных фибробластов также наблюдается компенсаторная активация экспрессии СОХ-2, что установлено в нашем исследовании. Снижение экспрессии СОХ-2 под действием пептидов KE и AED может указывать на антиоксидантное действие этих пептидов и нормализацию оксидативного статуса фибробластов кожи при репликативном старении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Увеличение продолжительности жизни населения неуклонно растет. Кроме того, возрастает доля людей пожилого и старческого возраста среди населения. Данный факт свидетельствует о необходимости большего внимания к геронтологическим аспектам здоровья. С одной стороны, это эстетические проблемы старения: растет частота обращений лиц старше 60 лет к дерматологам-косметологам, что обусловлено естественным желанием вести активную социальную жизнь, быть востребованным на работе, привлекательно выглядеть. С другой стороны, с возрастом увеличивается число неоплазий кожи и ее придатков. Многообразие факторов старения кожи и противоречивые сведения об их влиянии на патологию дермы требуют пристального внимания со стороны геронтокосметологии и определяют необходимость дальнейшего изучения этого вопроса, что позволит существенно повысить эффективность профилактических и своевременность лечебных мероприятий.

Патологические процессы в эндокринной, нервной, иммунной, сердечно-сосудистой системах, развивающиеся в организме при старении, влияют на состояние кожи. В настоящее время кожа рассматривается как орган, в котором ярко выражены структурно-функциональные нейроиммуноэндокринные взаимодействия, играющие ведущую роль в обеспечении ее функций [Рыжак Г.А. и др., 2006].

Внешние признаки естественного старения кожи включают в себя образование морщин, потерю эластичности и тургора кожи. При ускоренном старении, наблюдаемом под действием УФ-излучения, выражены сенильные лентиго и солнечный эластоз. Известно, что интенсивное УФ-облучение кожи может приводить к развитию рака [Barrandon Y. et al., 2012].

На молекулярном и клеточном уровнях старение кожи обусловлено снижением синтеза компонентов ВКМ — главным образом коллагена и эластина. Синтез компонентов ВКМ обеспечивают фибробласты — клетки дермального слоя кожи, главная функция которых заключается в обеспечении метаболизма других клеток эпидермиса и дермы. Естественное или преждевременное старение кожи приводит к снижению функциональной активности фибробластов, в результате чего наблюдается снижение синтеза коллагена и эластина, ростовых факторов, а также увеличение количества клеток, вступающих в апоптоз. Кроме того, клетки кожи при старении создают перmissive тканевое микроокружение, которое способствует

пролиферации и миграции раковых клеток, способствуя секреторному фенотипу, связанному со старением (SASP). При нарушении функции иммунной системы развитие SASP может приводить к образованию опухолей [Wang Y. и соавт., 2019]. Поддержание функциональной активности фибробластов кожи может предотвратить преждевременное старение, формирование SASP и развитие опухолей.

Косметологические средства и препараты на основе пептидов часто применяются в косметологической и дерматологической практике. Широко распространены пептиды, выделенные из коллагена и эластина. Короткие пептиды, синтезированные в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии, неоднократно демонстрировали тканеспецифические иммуномодулирующие свойства, в том числе в отношении клеток кожи [Рыжак Г.А. и др., 2006; Линькова Н.С. и др., 2016], поэтому их изучение в качестве биорегуляторов функций дермальных фибробластов при репликативном старении является актуальной задачей молекулярной геронтологии.

В работе использовали модель репликативного старения фибробластов дермы при их культивировании пассажами. 3-й пассаж считали «молодыми» культурами, 14-й пассаж — «старыми». В культуры добавляли пептиды KE и AED, ранее показавшие геропротекторные и иммуномодулирующие свойства в отношении фибробластов кожи, заключающиеся в стимуляции пролиферации и ингибировании апоптоза клеток [Линькова Н.С. и др., 2016]. В задачи работы входила оценка функциональной активности фибробластов кожи при их старении посредством изучения экспрессии ряда факторов: гистоновых деацетилаз SIRT1, SIRT6, коллагена I типа, фактора роста TGF, сиртуинов SIRT1,6, матриксной металлопротеиназы MMP1, цитокина IL-1 и транскрипционного фактора NF-κB.

Установлено, что экспрессия SIRT1 в «старых» культурах фибробластов снижается, что согласуется с имеющимися литературными данными о роли SIRT1 в регуляции клеточного старения [Rivetti di Val Cervo P. et al., 2012]. Добавление пептида AED в культуру клеток приводило к увеличению экспрессии SIRT1 в «молодых» и в «старых» фибробластах дермы в 2–2,4 раза. В то же время добавление пептида KE не вызывало такого эффекта. Оптическая плотность, отражающая экспрессию маркера в каждой клетке, под действием пептида AED возрастала в 1,9–2,6 раза в «молодых» и «старых» фибробластах кожи.

Оба пептида повышали площадь и оптическую плотность экспрессии SIRT6 в «молодых» и в «старых» культурах фибробластов дермы. Наиболее эффективным было действие пептида AED в «старых» культурах, где наблюдалось увеличение площади экспрессии SIRT6 в 11,5 раза. Известно, что нормальная экспрессия SIRT6 связана со снижением скорости репликативного старения клеток [Strub T. et al., 2018; Tian X. et al., 2019], поэтому регуляция его экспрессии является важным геропротекторным свойством исследуемых пептидов.

Пептиды KE и AED стимулировали синтез коллагена I типа в «молодых» и «старых» культурах фибробластов кожи. Согласно литературным данным, синтез коллагена фибробластами снижается с возрастом [Yang H. et al., 2015], что было подтверждено в нашем исследовании. Добавление пептидов в культуры «старых» дермальных фибробластов приводило к увеличению площади экспрессии коллагена в 3,5–5,5 раза. Наибольший эффект достигался при добавлении пептида AED.

Пептид AED демонстрировал ингибирующий эффект по отношению к металлопротеиназе MMP-1, снижая ее синтез в «молодых» и в «старых» фибробластах кожи. Пептид KE не влиял на экспрессию MMP1. Совместно с

полученными данными о влиянии AED на синтез коллагена I типа можно предположить, что геропротекторное действие этого пептида основано на регуляции ремоделирования ВКМ посредством ингибирования коллагеназы MMP-1 и активации синтеза коллагена.

Добавление пептида AED не влияло на синтез провоспалительного цитокина IL-1 фибробластами кожи в «молодых» и в «старых» культурах. Пептид KE снижал синтез этого цитокина в 1,6 раза в «старых» дермальных фибробластах. Пептид AED не влиял на экспрессию транскрипционного фактора NF-κB, в то время как пептид KE снижал его синтез в «старых» фибробластах кожи в 1,9 раза. Пептид KE также снижал синтез ростового фактора TGFβ в «старых» фибробластах в 2 раза, в то время как AED не влиял на TGFβ. Оба пептида снижали синтез COX-2 в «старых» фибробластах в 2–3 раза.

Анализ полученных результатов позволяет предположить, что оба пептида оказывают геропротекторное действие в культурах фибробластов кожи, реализуемое разными механизмами. Пептид AED, по-видимому, стимулирует ремоделирование ВКМ, усиливая синтез одного из основных его компонентов — коллагена I типа, а также ингибируя синтез коллагеназы MMP1, способствующей деградации коллагена. Известно, что содержание MMP1 в тканях кожи повышается при естественном старении и при пагубном воздействии УФ-излучения, что вызывает снижение содержания коллагена в ВКМ [Park J.E. et al., 2014; Yang H. et al., 2015] и, как следствие, внешние проявления старения кожи.

Пептид KE действует как иммуномодулятор, подавляя провоспалительное действие IL-1 и модулируя экспрессию транскрипционного фактора NF-κB. Как известно, IL-1 наряду с другими противовоспалительными цитокинами, такими как IL-6 и TNFα, способствует развитию хронического воспаления при старении, а NF-κB в ответ на избыточное воздействие УФ-излучения запускает активацию MAPK-киназ. Это также может активировать провоспалительные цитокины и коллагеназы, приводя к развитию воспаления и деградации коллагена [Pittayapruet P. et al., 2016]. Пептид KE, по-видимому, регулирует сигнальный путь TGF-β, снижая его экспрессию. С одной стороны, такой механизм может являться защитным, так как подавление синтеза TGF-β препятствует биодegradации коллагена [Shim J.W. et al., 2019]. Однако некоторые авторы считают, что активация пути TGF-β/Smad вызывает синтез проколлагена в фибробластах кожи и оказывает репаративный эффект при фотостарении посредством снижения экспрессии белков AP-1, MMP-1 и MMP-3 [Liu Z. et al., 2019]. Данные о влиянии пути TGF-β на репликативное старение фибробластов кожи в настоящее время противоречивы, но можно предположить, что при репликативном старении фибробластов кожи человека пептид KE препятствует развитию воспалительной реакции в дерме и снижает интенсивность деградации коллагена путем уменьшения экспрессии TGF-β.

Наконец, пептиды AED и KE, вероятно, обладают антиоксидантным эффектом, стимулируя экспрессию SIRT1 в «молодых» и «старых» фибробластах кожи. SIRT1 является регулятором оксидативного стресса, и снижение его синтеза в клетках различных тканей ассоциировано с ускоренным старением [Rivetti di Val Cervo P. et al., 2012]. Кроме того, AED и KE снижают синтез фермента COX-2. Показано, что в биоптатах кожи, подверженной фотостарению, экспрессия COX-2 значительно более выражена чем при эндогенном старении и его отсутствии [Surowiak P. et al., 2014]. Регуляция экспрессии SIRT1, SIRT6, COX-2 пептидами AED и KE свидетельствует о нормализации оксидативного профиля фибробластов при их репликативном

старении. Это важно, так как окислительная гипотеза в настоящее время рассматривается в качестве одного из основных механизмов старения организма и ассоциированных с возрастом патологий.

Таким образом, пептиды KE и AED регулируют репликативное старение фибробластов кожи человека посредством нескольких эффектов: противовоспалительного, ремоделирующего и антиоксидантного. Применение данных пептидов в геронтокосметологии позволит замедлить темп клеточного старения дермы и предотвратить развитие различных патологических процессов в коже, ассоциированных со старением.

ВЫВОДЫ

- 1.** Площадь экспрессии SIRT1 в «старых» фибробластах кожи человека была в 1,8 раза ниже, чем в «молодых» культурах. Пептид AED повышал площади экспрессии SIRT1 в «молодых» культурах в 2,4 раза, а в «старых» культурах — в 2 раза. Пептид KE не влиял на экспрессию SIRT1 при репликативном старении фибробластов кожи человека. При клеточном старении экспрессия SIRT1 в фибробластах снижалась, что указывает на геропротекторные свойства пептида AED в отношении дермы.
- 2.** При репликативном старении фибробластов кожи человека площадь экспрессии SIRT6 уменьшалась в 3,6 раза. Пептид KE повышал площадь экспрессии SIRT6 в «молодых» культурах в 1,6 раза, а в «старых» культурах — в 2,6 раза. Пептид AED увеличивал площадь экспрессии SIRT6 в «молодых» фибробластах кожи в 1,7 раза, а в «старых» культурах — в 11,5 раза. Снижение экспрессии SIRT6 может приводить к нарушению экспрессии генов и репарации ДНК. Эффект пептидов указывает на их геропротекторные свойства.
- 3.** Площадь экспрессии MMP-1 в «старых» культурах фибробластов была в 2,5 раза выше, чем в «молодых» культурах. Пептид AED снижал площадь экспрессии MMP-1 в «молодых» культурах дермальных фибробластов в 2,2 раза и в «старых» культурах — в 1,6 раза. Площадь экспрессии коллагена I типа в «старых» культурах фибробластов кожи в 3,5 раза ниже, чем в «молодых» культурах. Пептид KE повышал площадь экспрессии коллагена I типа в 1,8 раза в «старых» культурах. Пептид AED увеличивал площадь экспрессии коллагена I типа в «молодых» и «старых» дермальных фибробластах соответственно в 2,3 и 2,7 раза. Пептид AED, снижая синтез MMP1, регулирует ремоделирование внеклеточного матрикса дермы, замедляя ее старение.
- 4.** При репликативном старении фибробластов кожи площадь экспрессии IL-1 повышается в 1,7 раза. Пептид KE снижает синтез провоспалительного цитокина IL-1 и транскрипционного фактора NF-κB соответственно в 1,6 и 1,9 раза в «старых» фибробластах кожи человека. Пептид AED не влияет на синтез IL-1 и NF-κB в дермальных фибробластах при их репликативном старении. Иммуномодулирующий пептид KE, регулирующий синтез IL-1, NF-κB, может рассматриваться как вещество, предотвращающее развитие воспалительной реакции в дерме при ее старении.
- 5.** При репликативном старении фибробластов кожи человека площадь экспрессии TGF-β увеличивается в 4,8 раза. Пептид KE в 2 раза снижает синтез фактора роста TGF-β в «старых» дермальных фибробластах. Подавление синтеза фактора роста TGF-β под действием пептида KE может препятствовать биодegradации коллагена в дерме при старении кожи.
- 6.** Площадь экспрессии COX-2 в фибробластах кожи человека при репликативном старении увеличивается в 4,8 раза. Пептиды AED и KE соответственно в 2 и 3 раза

снижают синтез фермента СОХ-2 в «старых» фибробластах кожи человека. Эти данные указывают на антиоксидантное действие пептидов АЕД и КЕ.

7. Пептиды АЕД и КЕ замедляют старение фибробластов кожи человека. В основе геропротекторного действия этих пептидов лежит их противовоспалительное, антиоксидантное действие, способность восстанавливать иммунную функцию дермы и ремоделирование межклеточного матрикса в ней при старении.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Рекомендовано дальнейшее исследование пептида АЕД в экспериментах *in vitro* и *in vivo* для стимуляции ремоделирования компонентов ВКМ и снижения выраженности внешних проявлений старения кожи.
2. Иммуномодулирующий пептид КЕ может быть рекомендован к исследованию на животных для оценки снижения уровня экспрессии провоспалительных цитокинов в коже, наблюдаемое при ее старении.
3. Рекомендовано сравнительное и совместное исследование пептидов АЕД и КЕ в экспериментах *in vitro* и *in vivo* в качестве антиоксидантных средств для восстановления оксидативного профиля кожи при ее старении.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации

1. Молекулярные аспекты геропротекторного действия пептида КЕ в культуре фибробластов кожи человека / **Н.В. Фридман**, Н.С. Линькова, В.О. Полякова, А.О. Дробинцева, С.В. Трофимова, И.М. Кветной, В.Х. Хавинсон // Успехи геронтологии. — 2017. — Т. 30. — № 5. — С. 698–702.
2. Сравнительное влияние пептидов КЕ и АЕД на функциональную активность фибробластов кожи человека при их репликативном старении / **Н.В. Фридман**, Н.С. Линькова, Е.О. Кожевникова, Е.О. Гутоп, В.Х. Хавинсон // Клеточные технологии в биологии и медицине. — 2020. — № 3. — С. 197–201.
3. **Фридман Н.В.** Обзор пептидов, применяемых в дерматокосметологии / **Н.В. Фридман**, Н.В. Фетисова // Успехи геронтологии. — 2015. — Т. 28. — № 4. — С. 769–774.
4. **Фридман Н.В.** Перспективы применения пептидных биорегуляторов для восстановления структуры кожи женщин среднего возраста / **Н.В. Фридман**, Л.В. Бойко, С.В. Трофимова // Врач. — 2020. — Т. 31. — № 9. — С. 62–66.
5. Экспрессия коллагена I типа, сиртуина-6 и матриксной металлопротеиназы-1 в фибробластах кожи человека при старении / **Н.В. Фридман**, Н.С. Линькова, В.О. Полякова, А.О. Дробинцева, А.В. Дудков, С.В. Трофимова, И.М. Кветной, В.Х. Хавинсон // Морфология. — 2018. — Т. 153. — № 1. — С. 39–44.
6. Влияние пептидных биорегуляторов на структурно-функциональные особенности кожи лица женщин пожилого возраста / **Фридман Н.В.**, Линькова Н.С., Бойко Л.В., Кахели М.А. // Молекулярная медицина. — 2021. — №3. — С. 38–42.

Глава в монографии

7. Молекулярные механизмы возраст-ассоциированной патологии (лекционные очерки) / М.А. Пальцев, Г.И. Гурко, И.М. Кветной, Н.С.

Линькова. — Санкт-Петербург: Эко-Вектор, 2020. 264 с. Очерк 3. Нейроиммунные механизмы старения и пептидной регуляции функций кожи. В соавторстве с О.А. Орловой, Н.В. Фридман, Е.О. Гутоп. С. 51-67.

Тезисы докладов

8. Геропротекторный эффект дипептида в культуре фибробластов кожи человека / Т.С. Салль, **Н.В. Фридман**, Н.С. Линькова, С.В. Трофимова // Материалы XXIII съезда физиологического общества им. И.П. Павлова. — Воронеж, 2017. — С. 1696–1698.
9. Пептиды эпифиза замедляют процессы старения фибробластов кожи / В.Х. Хавинсон, Н.С. Линькова, О.А. Орлова, Е.С. Поправка, А.В. Дудков, **Н.В. Фридман** // IV International Dermoaesthetic Medical Day «Ageless Generation — симбиоз геронтологии и эстетической медицины». Москва, 9 ноября 2017 г. С. 16.
10. Пептиды эпифиза регулируют экспрессию сиртуина-6 и гликопротеина CD98hc в фибробластах кожи при старении / Т.С. Салль, Н.С. Линькова, **Н.В. Фридман**, С.В. Трофимова // Международная научная конференция по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова», VII Российский симпозиум «Белки и пептиды», Москва, 2017. — С. 85–86.
11. **Фридман Н.В.** Пептид KE нормализует иммунологическую функцию фибробластов кожи человека при репликативном старении / Н.В. Фридман, Е.О. Гутоп, А.Н. Богатырев // Международная научная конференция «Инновационные исследования в биологии и медицине». Сочи, 25-27 ноября 2020. С. 116-117.
12. Peptide AED increases functional activity of senescent human skin fibroblasts / N. Linkova, **N. Fridman**, E. Gutop, I. Kvetnoy // International Symposium of Experts “Regenerative medicine and ageing”. Dubai, 01–02 February 2020. P. 25–26.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В АВТОРЕФЕРАТЕ

АФК	Активные формы кислорода
УФ	Ультрафиолет
ВКМ	Внеклеточный матрикс
AED	Ala-Asp-Glu, карталакс
IGF1	Инсулиноподобный фактор роста 1
KE	Lys-Glu, вилон
MMP	Матриксные металлопротеиназы
SASP	Секреторный фенотип, ассоциированный со старением
TGF- β	Трансформирующий фактор роста β
TNF α	Фактор некроза опухоли α

УКАЗАТЕЛЬ ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Голубцова Н.Н. и др. Возрастные изменения содержания сиртуина 1 в фибробластах дермы человека // Успехи геронтологии. 2017. № 3. С. 375–380; Линькова Н.С. и др. Пептидная регуляция функций фибробластов кожи при их старении *in vitro* // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2016. № 1. С. 40–44; Рыжак Г.А. и др. Геронтокосметология: профилактика и коррекция возрастных изменений кожи. Санкт-Петербург: ИПК БИОНТ, 2006. 158 с.; Севостьянова Н.Н. и др. Иммуномодулирующее действие вилона и его аналога в культурах клеток тимуса человека и животных // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2012. № 4. С. 220–223; Смирнова Г.О. и др. Прогнозирование результатов эстетических вмешательств по механизмам старения кожи и соотношению коллагена I/III типов // Фундаментальные исследования. 2012. № 7. С. 191–194; Щербак В.А., Патеев А.В. Влияние вилона на иммунный ответ при остром иммобилизационном стрессе у крыс // Сибирский медицинский журнал. 2004. Т. 44. № 3. С. 26–29; Хавинсон В.Х. Пептидная регуляция старения. Санкт-Петербург: Наука, 2010. 50 с.; Хавинсон В.Х. и др. Влияние коротких пептидов на хроматин в лимфоцитах лиц старческого возраста // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2004. Т. 137. № 1. С. 89–93; Хавинсон В.Х. и др. Пептид, нормализующий метаболизм в костной и хрящевой тканях, фармацевтическая композиция на его основе и способ ее применения. Патент РФ № 2299741 от 30.05.2006; Хавинсон В.Х. и др. Изучение влияния пептида КЕ на длину теломер хромосом ФГА-стимулированных лимфоцитов человека // Медицинский академический журнал. 2019. Специальный выпуск. С. 166–168; Эрнандес Е., Марголина А. Новая косметология. Москва: Косметика и медицина, 2014. 572 с.; Arseni L. et al. From Structure to Phenotype: Impact of Collagen Alterations on Human Health // Int. J. Mol. Sci. 2018. Vol. 19. № 5. P. 1407; Barrandon Y. et al. Capturing epidermal stemness for regenerative medicine // Semin. Cell Dev. Biol. 2012. Vol. 23. № 8. P. 937–944; Khalil H. et al. Fibroblast-specific TGF- β -Smad2/3 signaling underlies cardiac fibrosis // Journal of Clinical Investigation. 2017. Vol. 127. № 10. P. 3770–3783; Khokhlov A.N. Does aging need its own program, or is the program of development quite sufficient for it? Stationary cell cultures as a tool to search for anti-aging factors // Curr. Aging Sci. 2013. Vol. 6. P. 14–20; Khokhlov A.N. et al. Testing of geroprotectors in experiments on cell cultures: choosing the correct model system // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2014. Vol. 69. № 1. P. 10–14; Kolchina N. et al. Systematic search for structural motifs of peptide binding to double-stranded DNA // Nucleic Acids Research. Vol. 47, Is.20. P. 10553–10563; Krutmann J. et al. The skin aging exposome // J. Dermatol. Sci. 2017. Vol. 85. № 3. P. 152–161; Liu Z. et al. Collagen peptides promote photoaging skin cell repair by activating the TGF- β /Smad pathway and depressing collagen degradation // Food Funct. 2019. Vol. 10. № 9. P. 6121–6134; Pittayapruek P. et al. Role of Matrix Metalloproteinases

in Photoaging and Photocarcinogenesis // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. Vol. 17. № 6. P. 868; *Mendes K.L. et al.* Nuclear sirtuins and inflammatory signaling pathways // *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2017. Vol. 38. P. 98–105; *Muñoz-Espín D., Serrano M.* Cellular senescence: From physiology to pathology // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014. Vol. 15. P. 482–496; *Park S.Y. et al.* Air Pollution, Autophagy, and Skin Aging: Impact of Particulate Matter (PM₁₀) on Human Dermal Fibroblasts // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. Vol. 19. № 9. P. 2727; *Park J.E. et al.* The protective effect of *Kaempferia parviflora* extract on UVB-induced skin photoaging in hairless mice // *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2014. Vol. 30. № 5. P. 237–245; *Rivetti di Val Cervo P. et al.* p63-microRNA feedback in keratinocyte senescence // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. Vol. 109. № 4. P. 1133–1138; *Shim J.H.* Prostaglandin E2 Induces Skin Aging via E-Prostanoid 1 in Normal Human Dermal Fibroblasts // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Vol. 20. № 22. pii: E5555; *Simmonds R.E., Foxwell B.M.* Signalling, inflammation and arthritis: NFκB and its relevance to arthritis and inflammation // *Rheumatology (Oxford)*. 2008. Vol. 47. № 5. P. 584–590; *Singh C.K. et al.* The Role of Sirtuins in Antioxidant and Redox Signaling // *Antioxid Redox Signal.* 2018. Vol. 28(8). P. 643–661; *Strub T. et al.* SIRT6 haploinsufficiency induces BRAFV600E melanoma cell resistance to MAPK inhibitors via IGF signalling // *Nat. Commun.* 2018. Vol. 9. № 1:3440; *Surowiak P. et al.* Increase in cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in keratinocytes and dermal fibroblasts in photoaged skin // *J. Cosmet. Dermatol.* 2014. Vol. 13. № 3. P. 195–201; *Sweigert S.E. et al.* Repair of DNA single- and double-strand breaks in proliferating and quiescent murine tumor cells // *Int. J. Radiat. Biol.* 1989. Vol. 56. P. 253–264; *Tian X. et al.* SIRT6 Is Responsible for More Efficient DNA Double-Strand Break Repair in Long-Lived Species // *Cell.* 2019. Vol. 177. № 3. P. 622–638; *van Deursen J.M.* The role of senescent cells in ageing // *Nature.* 2014. Vol. 509. P. 439–446; *Wang Y. et al.* NF-κB signaling in skin aging // *Mech. Ageing Dev.* 2019. 184:111160; *Yuan Y. et al.* Regulation of SIRT1 in aging: Roles in mitochondrial function and biogenesis // *Mech Ageing Dev.* 2016. Vol. 155. P. 10–21; *Yang H. et al.* Role of CD14 and TLR4 in type I, type III collagen expression, synthesis and secretion in LPS-induced normal human skin fibroblasts // *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015. Vol. 8. № 2. P. 2429–2434.

ФРИДМАН Наталья Владимировна ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДОВ НА ФИБРОБЛАСТЫ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ РЕПЛИКАТИВНОМ СТАРЕНИИ // Автореф. дис. канд. биол. наук: 14.01.30 — геронтология и гериатрия, СПб. — 2021. — 24 с.

Подписано в печать «26» февраля 2021 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, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 5.