



На правах рукописи



МЯКИШЕВА

Светлана Николаевна

**ПЕПТИДНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ
И СТАРЕНИЯ ХОНДРОЦИТОВ**

3.1.31. Геронтология и гериатрия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2023

Работа выполнена в отделе биogerонтологии автономной научной некоммерческой организации высшего образования научно-исследовательского центра «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии».

Научный руководитель:

заслуженный деятель науки РФ,
доктор медицинских наук, профессор
Рыжак Галина Анатольевна

Официальные оппоненты:

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

Ильницкий Андрей Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры терапии, гериатрии и антивозрастной медицины Академии постдипломного образования ФГБУ ФНКЦ ФМБА России

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится _____ 2023 г. в _____ часов на заседании Диссертационного Совета Д 75.2.020.01 в АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» по адресу: 197110, Санкт-Петербург, пр. Динамо, 3.

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

Автореферат разослан « _____ » _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 75.2.020.01,
доктор биологических наук,
профессор

Козина Людмила Семеновна

Актуальность темы

Патология опорно-двигательного аппарата является одной из наиболее часто встречающихся у лиц пожилого и старческого возраста. Известно, что остеоартрит (ОА) встречается у 60% лиц старше 60 лет и у 80% людей старше 75 лет. ОА приводит к нарушению двигательной активности, необходимости эндопротезирования и, в конечном итоге, к социальной дезадаптации и инвалидизации [Шукурова С.М., Хамроева З.Д., Почоджанова Ш.Ш., и др., 2015]. Поиск эффективных и безопасных пептидных биорегуляторов для нормализации функций хрящевой ткани у лиц старших возрастных групп является актуальной задачей биogerонтологии [Khatri S., Hansen J., Pedersen N.B., et al., 2022.; Wenhart C., Holthoff H.P., Reimann A., et al., 2021]. Перспективными геро- и хондропротекторами являются полипептидный комплекс хрящевой и костной тканей (ППКХ) и пептид AED (H-Ala-Glu-Asp-H), входящий в его состав.

ППКХ и входящий в его состав трипептид AED показали высокую эффективность в экспериментальных моделях заболеваний опорно-двигательного аппарата (ОА, остеопороз, остеохондроз и др.) *in vivo*. Пептид AED нормализовал плотность костной ткани при остеопорозе за счет регуляции функции кальцитонинпродуцирующих клеток щитовидной железы. Механизмом действия ППКХ и пептида AED является их способность снижать синтез проапоптотического белка p53 и повышать синтез белка пролиферации PCNA в хондроцитах [Рыжак Г.А., Попович И.Г., Хавинсон В.Х. и др., 2019]. Молекулярный механизм хондропротекторной активности пептидов при клеточном старении в настоящее время не изучен. В связи с этим изучение влияния ППКХ и пептида AED на функциональную активность хондроцитов при старении *in vitro* является актуальной задачей биogerонтологии.

Цель и задачи исследования

Целью исследования явилось изучение влияния полипептидного комплекса хрящевой и костной тканей и пептида AED на хондрогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток, а также секреторный фенотип хондроцитов, ассоциированный со старением (SASP).

Задачи:

1. Оценить влияние полипептидного комплекса хрящевой и костной тканей и пептида AED на пролиферацию хондроцитов, полученных от молодых и старых крыс.
2. Оценить влияние полипептидного комплекса хрящевой и костной тканей и пептида AED на экспрессию генов хондрогенной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток человека *SOX9*, *COL2A1*, *COMP*, *ACAN*.
3. Изучить влияние полипептидного комплекса хрящевой и костной тканей и пептида AED на синтез белков хондрогенной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток человека *SOX9*, агреккана, коллагена II типа, олигомерного матричного белка хряща *COMP*; полипептидного комплекса хрящевой и костной тканей и пептида AED на секреторный

фенотип хондроцитов, ассоциированный со старением (SASP): p16, p53, p21, сиртуин SIRT1, TNF- α , IL-1 α .

4. Провести сравнительную оценку влияния полипептидного комплекса хрящевой и костной тканей и пептида AED на дифференцировку и старение хондроцитов.

5. Выявить основные молекулярные мишени геропротекторного действия полипептидного комплекса хрящевой и костной тканей и пептида AED на хондроциты при старении *in vitro*.

Степень разработанности темы исследования

Основой для данного диссертационного исследования послужило актуальное направление молекулярной биологии и геронтологии, посвященное поиску эффективных и безопасных пептидных биорегуляторов для нормализации функций хрящевой ткани у лиц старших возрастных групп [Khatri S., Hansen J., Pedersen N.B., et al., 2022.; Wenhart C., Holthoff H.P., Reimann A., et al., 2021]. В настоящее время разрабатываются методы биоинженерии, способные стимулировать восстановление хрящевой ткани. Заболевания опорно-двигательного аппарата, включая ОА, являются одной из ведущих причин инвалидизации лиц среднего и пожилого возраста во всем мире. В Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии был разработан ППКХ крупного рогатого скота - регулятор репарации хрящевой и костной тканей [Khavinson V.Kh., Grigoriev E.I., Malinin V.V., et al., 2008]. В настоящее время в рамках II фазы клинических испытаний проводится оценка его эффективности и безопасности у больных гонартрозом второй и третьей степени [Рыжак Г.А., Попович И.Г., Хавинсон В.Х., 2019]. Это свидетельствует о перспективности исследования ППКХ в качестве вещества, которое потенциально может быть эффективно при ОА и обладать геропротекторными свойствами. В состав ППКХ входят короткие пептиды, в том числе пептид AED [Журкович И.К., Ковров Н.Г., Рыжак Г.А., и др., 2020].

Научная новизна

В работе впервые показано, что пептид AED в эффективной концентрации 200 нг/мл повышал количество хондроцитов в культурах, полученных от молодых и старых крыс, соответственно в 1,4-1,8 и 1,6-2,1 раза по сравнению с контролем. ППКХ в эффективной концентрации 2000 нг/мл стимулировал пролиферацию хондроцитов в культурах, полученных от молодых и старых крыс, соответственно в 1,7-2,2 и 1,8-2,5 раза по сравнению с контролем.

Впервые изучено влияние ППКХ и пептида AED на экспрессию генов SOX9, COL2A1, COMP, ACAN и синтез белков хондрогенной дифференцировки SOX9, агрекана, коллагена II типа и COMP в культуре МСК человека при репликативном старении. Пептид AED в концентрации 200 нг/мл активизирует экспрессию генов и синтез всех исследуемых белков при старении МСК. Для ППКХ этот эффект достигается в концентрации 2000 нг/мл.

Впервые охарактеризован SASP хондроцитов и проведена сравнительная оценка влияния пептида AED и ППКХ на этот показатель. Установлено, что SASP хондроцитов характеризуется повышением синтеза проапоптотических белков p16, p21, p53, провоспалительных цитокинов TNF α , IL-1 α , и снижением синтеза SIRT1. Впервые установлено, что пептиды AED и ППКХ нормализуют синтез молекул, формирующих секреторный фенотип хондроцитов, ассоциированный со старением. Установлено, что молекулярные механизмы геро- и хондропротекторного действия ППКХ и пептида AED обусловлены снижением синтеза проапоптотических белков p16, p21, p53, провоспалительных цитокинов TNF α , IL-1 α и повышением экспрессии гистоновой деацетилазы SIRT1 в хондроцитах.

Практическая значимость

Исследование влияния ППКХ и пептида AED на пролиферацию хондроцитов, полученных от молодых и старых крыс, на экспрессию генов и синтез белков хондрогенной дифференцировки МСК человека, а также влияния ППКХ и пептида AED на SASP хондроцитов позволило установить, что ППКХ и пептид AED обладают геро- и хондропротекторными свойствами в исследованиях *in vitro*. Эти эффекты пептидов достигаются за счет снижения синтеза проапоптотических белков p16, p21, p53, провоспалительных цитокинов TNF α , IL-1 α и увеличения экспрессии фермента SIRT1, регулирующего активность транскрипционных факторов в хондроцитах. Полученные результаты демонстрируют перспективы применения изученных веществ в качестве хондро- и геропротекторных препаратов нового поколения, эффективно стимулирующих репарацию хрящевой ткани при ее старении и ассоциированных с возрастом заболеваний, в том числе ОА.

Положения, выносимые на защиту

1. Пептид AED в эффективной концентрации 200 нг/мл повышает количество хондроцитов в культурах, полученных от молодых и старых крыс, соответственно в 1,4-1,8 и 1,6-2,1 раза по сравнению с контролем. Полипептидный комплекс хрящевой и костной тканей в эффективной концентрации 2000 нг/мл стимулирует пролиферацию хондроцитов в культурах, полученных от молодых и старых крыс, соответственно в 1,7-2,2 и 1,8-2,5 раза по сравнению с контролем.
2. Пептид AED в концентрации 200 нг/мл активизирует экспрессию генов SOX9, COL2A1, COMP, ACAN и синтез белков SOX9, коллагена II типа, COMP, агрекана хондрогенной дифференцировки при старении мезенхимальных стволовых клеток. Для полипептидного комплекса хрящевой и костной тканей этот эффект достигается в концентрации 2000 нг/мл.
3. Секреторный фенотип хондроцитов, ассоциированный со старением, характеризуется повышением синтеза проапоптотических белков p16, p21, p53, провоспалительных цитокинов TNF α , IL-1 α , и снижением синтеза SIRT1. Пептид AED и полипептидный комплекс хрящевой и костной тканей нормализуют синтез молекул, формирующих SASP хондроцитов.

4. Полипептидный комплекс хрящевой и костной тканей и пептид AED обладают геро- и хондропротекторными свойствами, обусловленными снижением синтеза проапоптотических белков p16, p21, p53, провоспалительных цитокинов TNF α , IL-1 α и повышением экспрессии гистоновой деацетилазы SIRT1 в хондроцитах.

Связь с научно-исследовательской работой института

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

Соответствие диссертации заявленной специальности

Диссертация «Пептидная регуляция дифференцировки и старения хондроцитов» соответствует паспорту специальности 3.1.31. Геронтология и гериатрия, и областям исследования: пункту 2 - Изучение процессов формирования биологического и хронологического возраста, старения и старости. Основные механизмы физиологического, преждевременного, патологического старения, а также пункту 4 - Разработка принципов профилактической геронтологии и гериатрии, методов и средств профилактики преждевременного старения. Обоснование принципов, разработка методов и средств увеличения продолжительности жизни и продления активного периода жизни.

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликованы 10 научных работ, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для опубликования материалов диссертационных исследований и международных журналах, входящих в базы данных PubMed, Web of Science, Scopus, 1 статья в сборнике и 5 тезисов докладов.

Апробация и реализация диссертации

Основные результаты диссертационного исследования были доложены на XV Научно-практической конференции «Пушковские чтения – 2019. Актуальные вопросы геронтологии и гериатрии» (Санкт-Петербург, 2019); на IV международной научной конференции «Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской приматологии» (Сочи, 2021); на XV Международном форуме «Старшее поколение» (Санкт-Петербург, 2022); на Юбилейной научно-практической конференции «ИЭПиТ 2022. Вчера, сегодня, завтра» (Сухум, Абхазия, 2022).

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, выводов, практических рекомендаций и указателя литературы. Текст диссертации изложен на 97 страницах, содержит 15 рисунков, 2 таблицы.

Список литературы содержит 135 источников, из них на русском языке – 14, на английском языке – 121.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дизайн эксперимента. Характеристика исследуемых клеточных линий

В качестве объектов в диссертационном исследовании были использованы первичная культура хондроцитов, полученных от беспородных белых крыс и мезенхимальных стволовых клеток (МСК) человека линии SC5-MSK.

Первичную культуру хондроцитов получали из межпозвонковых дисков молодых (3 мес.) и старых (20 мес.) беспородных белых крыс. Хрящи межпозвонковых дисков нарезали на фрагменты размером около 1 мм² и помещали в чашки Петри диаметром 35 мм с адгезионным покрытием в среде α MEM (модифицированная среда Игла, Sigma, США) с добавлением 10% сыворотки эмбрионов коров (HyClone, США) и гентамицина (50 мкг/мл). Через 4-7 суток из фрагментов хряща начинали выселяться клетки. При достижении клетками 80% монослоя их пассировали с помощью смеси трипсина и версена в соотношении 1:3 по ранее описанной методике [Сахенберг Е.И., Николаенко Н.С., Пинаев Г.П., 2014]. Клетки на 4 пассаже разделяли на 7 групп: 1 – контроль, 2, 3, 4 – добавление пептида AED в концентрациях 20 нг/мл, 200 нг/мл и 2000 нг/мл, 5, 6, 7 – добавление ППКХ в концентрациях 20 нг/мл, 200 нг/мл и 2000 нг/мл. Ранее в исследовании биологической активности пептида AED в культурах фибробластов кожи при их репликативном старении эффективной оказалась концентрация 400 нг/мл [Гутоп Е.О., Линькова Н.С., Фридман Н.В., и др., 2022]. Пептид AED в концентрации 20 нг/мл стимулировал синтез факторов транскрипции в мезенхимальных стволовых клетках человека при стационарном и репликативном старении [Ashapkin V., Khavinson V., Shilovsky G., et al., 2020]. 4 пассаж были выбран для исследования, т.к. на этом этапе репарационные системы клетки успевают восстановить их функциональную активность после повреждений.

МСК человека линии SC5-MSK были доставлены из ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных» Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Эта линия фибробластоподобных клеток получена из эмбриональных стволовых клеток человека. Исследуемая линия имеет ограниченный срок жизни - до 59 удвоений клеточной популяции не наблюдается снижения пролиферативной активности. Она обладает фенотипом и способностью к мультипотентной дифференцировке, характерными для МСК, т.е. экспрессия поверхностных антигенов, характерных для мезенхимных стволовых клеток: CD44, CD73, CD90, CD105 и HLA-ABC; отсутствие экспрессии антигенов CD34 и HLA-DR, а также направленная дифференцировка в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях. SC5-MSK является источником большого количества генетически однородного клеточного материала, необходимого для проведения разнообразных исследований. Характеристики данной линии свидетельствуют о широких возможностях ее для использова-

ния в регенеративной медицине, кроме того, в исследованиях клеточной биологии и биотехнологии.

Клетки выращивали в среде α -MEM с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки. Пересев культуры осуществляли, используя раствор трипсина (0,25%) и версена (0,02%) (1:3), кратность посева 1:4, плотность 4,0-5,0 x 10⁴ клеток/см². Клетки культивировали до 18 пассажа и разделяли на 5 групп: 1 – контроль, 2, 3 – добавление пептида AED в концентрациях 200 нг/мл и 2000 нг/мл, 4, 5 – добавление ППКХ в концентрациях 200 нг/мл и 2000 нг/мл. В ранее проведенном исследовании пролиферативной активности культур хондроцитов было показано, что указанные концентрации пептида AED и ППКХ являются наиболее эффективными. На 18 пассаже наблюдали статистически значимое снижение скорости удвоения клеток. Это указывает на репликативное старения МСК [Khokhlov A.N., 2013; Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Karmushakov A.F., et al., 2014]. Таким образом, клетки 18 пассажа рассматривались как «старые», т.е. подвергнутые репликативному старению.

Построение кривой клеточного роста

Для построения кривой роста клетки первичной культуры хондроцитов, полученных от беспородных белых крыс, рассеивали в 24-луночные планшеты. 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 культур 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 квадрате).

Полимеразная цепная реакция

Для оценки экспрессии генов, кодирующих белки SOX9, агрекан, коллаген II типа, COMP в МСК человека линии SC5-MSC применяли метод постановки ПЦР. Суммарную РНК выделяли из клеток с использованием раствора для стабилизации РНК IntactRNA («Евроген», Москва). Выделение РНК осуществляли, используя набор RNeasy MiniKit («Qiagen», FRG). Первую нить кДНК синтезировали с Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit («Thermo Fisher Scientific Inc», USA), используя 100 нг РНК на 20 мкл реакционной смеси. Полученную кДНК использовали как матрицу для количественной ПЦР из расчета 1 мкл на 24 мкл реакционной смеси. Количественную ПЦР проводили, используя набор для амплификации qPCRmix-HS SYBR+ROX («Евроген», Россия). Уровень экспрессии относительно референсного гена GAPDH определяли методом $\Delta\Delta C_q$. В экспериментах использовали по три независимых образца клеток каждой группы (биологические параллели). Для каждого образца кДНК проводили минимум три параллельные реакции в соседних лунках прибора (технические параллели).

Иммуноцитохимическое исследование и морфометрия

Для сравнительного анализа синтеза белков, составляющих SASP хондроцитов, в первичной культуре хондроцитов, полученных от беспородных белых крыс было проведено иммуноцитохимическое окрашивание культур. Для пермеабиллизации клеточных мембран в течение 10 минут применяли 0,1% Тритон X-100 (Биолот, Россия), растворенный в фосфатно-солевом буфере. Культуры хондроцитов инкубировали в 1% фосфатно-солевом буфере (pH 7,5) в течение 45 мин для блокировки неспецифического связывания антител. Инкубацию с первичными антителами проводили в течение 45 мин. при комнатной температуре. В работе использовали первичные моноклональные антитела к p16 (1:100), p21 (1:150), p53 (1:100), IL-1 α (1:50), TNF α (1:200), Sirt1 (1:100) (Thermo Fisher Scientific, США).

Для сравнительного анализа синтеза белков, участвующих в хондрогенной дифференцировке, было также проведено иммуноцитохимическое исследование МСК человека линии SC5-MSC. Использовали первичные моноклональные антитела к SOX9 (1:150), агрекану (1:100), коллагену II типа (1:100) и COMP (1:150) фирмы Thermo Fisher Scientific, США.

В обеих частях исследования ядра клеток докрасивали Hoechst 33258 (Thermo Fisher Scientific, США). Зеленая и красная флуоресценция характеризовала экспрессию исследуемых молекул (инкубация со вторичными антителами, конъюгированными с флюорохромом Alexa Fluor 488 или Alexa Fluor 647 (1:2000, Thermo Fisher Scientific, США), в течение 45 мин при комнатной температуре, в темноте). Исследование проводили на конфокальном микроскопе LSM 710 (Zeiss GmbH, Германия). Микрофотографии анализировали с помощью программы ImageJ (National Institutes of Health, США). В каждом случае просматривали 5 полей зрения при увеличении 200. Площадь экспрессии рассчитывали, как отношение площади иммуноокрашенных клеток или их ядер к общей площади клеток или их ядер в поле зрения и выражали в %.

Количественный метод анализа результатов иммунофлуоресцентного окрашивания клеток широко распространен в молекулярно-биологических исследованиях и позволяет проводить более точное сравнение данных в исследуемых группах по сравнению с визуальной оценкой [Young K., Morrison H., 2018; Thomas N., Krishnapillai R., Bindhu P.R., Thomas P., 2019; Gutov E.O., Linkova N.S., Kozhevnikova E.O., et al., 2022].

Статистический анализ данных

Статистическая обработка данных, полученных при изучении влияния пептида AED и ППКХ на экспрессию генов и синтез белков хондрогенной дифференцировки МСК человека при репликативном старении, включала подсчет среднего арифметического, стандартного отклонения и доверитель-

ного интервала и проводилась в программе «Statistica 7.0». Для анализа вида распределения применяли критерий Шапиро-Уилка. Для проверки статистической однородности нескольких выборок использовали критерий Крускала-Уоллиса. Для попарного сравнения групп применяли двусторонний t-критерий Стьюдента. Критический уровень достоверности нулевой гипотезы (об отсутствии различий) принимали равным 0,01.

Статистическая обработка данных, полученных при оценке влияния ППКХ и входящего в его состав пептида AED на пролиферацию хондроцитов, полученных от молодых и старых животных, включала в себя подсчет среднего арифметического, стандартного отклонения и доверительного интервала для каждой выборки в программе Statistica 10.0. Для того, чтобы подтвердить нормальное распределение данных в выборке, использовали критерий Шапиро-Уилка. Критический уровень достоверности нулевой гипотезы (об отсутствии различий) принимали равным 0,01.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние пептидов на пролиферацию хондроцитов, полученных от молодых и старых крыс

Пептид AED в концентрации 20 нг/мл на 22% статистически значимо повышал пролиферацию хондроцитов, полученных от молодых крыс, только на 3 сутки культивирования. В концентрациях 200 и 2000 нг/мл пептид AED оказывал одинаковый стимулирующий эффект на пролиферацию хондроцитов молодых животных. На 2, 3, 4 и 5 сутки культивирования пептид AED в концентрациях 200 и 2000 нг/мл повышал количество клеток соответственно в 1,4, 1,8, 1,7 и 1,8 раза по сравнению с контролем (рис. 1А).

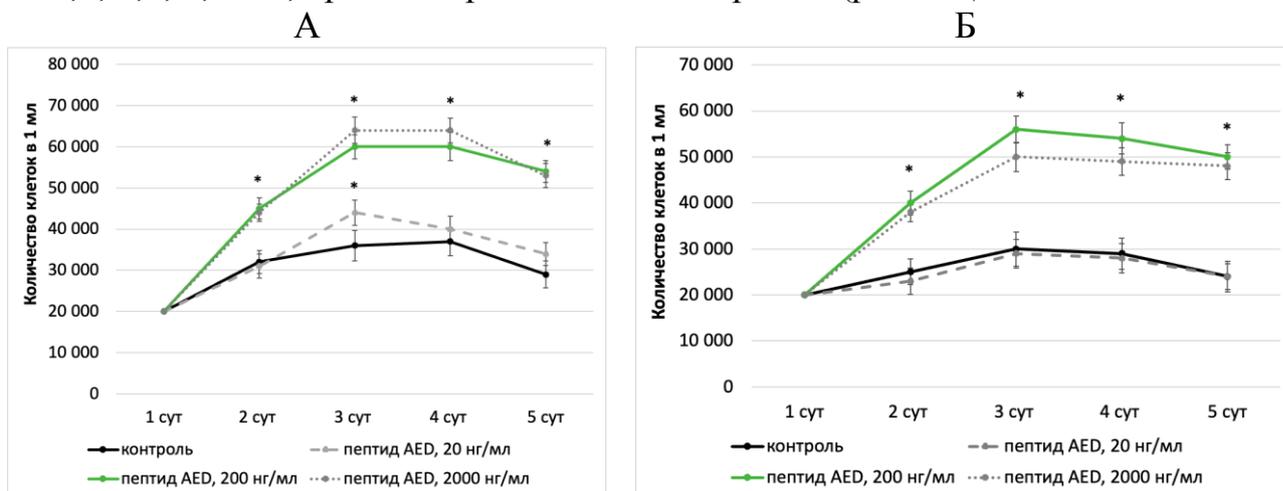


Рисунок 1. Кривая роста хондроцитов, полученных от молодых (А) и старых (Б) крыс. * - $p < 0,01$ по сравнению с контролем (без добавления пептида AED)

Пептид AED в концентрации 20 нг/мл не оказывал влияния на пролиферацию хондроцитов, полученных от старых крыс. В концентрациях 200 и 2000 нг/мл пептид AED оказывал одинаковый стимулирующий эффект на пролиферацию хондроцитов старых животных. На 2, 3, 4 и 5 сутки культивирования пептид AED в концентрациях 200 и 2000 нг/мл повышал количество

клеток соответственно в 1,6; 1,9; 1,9 и 2,1 раза по сравнению с контролем (рис. 1Б).

ППКХ в концентрации 200 нг/мл на 44% статистически значимо повышал пролиферацию хондроцитов, полученных от молодых крыс, только на 5 сутки культивирования. В концентрации 2000 нг/мл ППКХ оказывал выраженный стимулирующий эффект на пролиферацию хондроцитов молодых животных. На 2, 3, 4 и 5 сутки культивирования ППКХ в концентрации 2000 нг/мл повышал количество клеток соответственно в 2,2; 1,9; 1,7 и 2,1 раза по сравнению с контролем (рис. 2А).

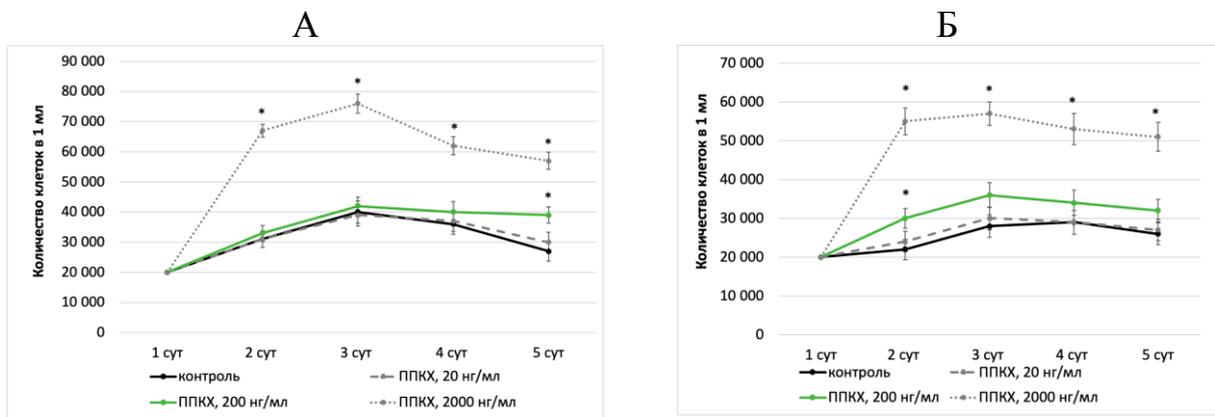


Рисунок 2. Кривая роста хондроцитов, полученных от молодых (А) и старых (Б) крыс. * - $p < 0,01$ по сравнению с контролем (без добавления ППКХ)

ППКХ в концентрации 200 нг/мл достоверно на 36% повышал пролиферацию хондроцитов, полученных от старых крыс, на 2 сутки культивирования. В концентрации 2000 нг/мл ППКХ оказывал сильный стимулирующий эффект на пролиферацию хондроцитов старых животных. На 2, 3, 4 и 5 сутки культивирования ППКХ в концентрации 2000 нг/мл повышал количество клеток соответственно в 2,5; 2; 1,8 и 2 раза по сравнению с контролем (рис. 2Б).

По результатам исследования влияния пептида AED и ППКХ на пролиферацию хондроцитов крыс, полученных от молодых и старых животных, для дальнейшего изучения были выбраны две эффективные концентрации исследуемых веществ: 200 нг/мл и 2000 нг/мл.

Влияние пептидов на хондрогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток человека при репликативном старении

Установлено, что при добавлении в культуру SC5-MSC пептида AED в концентрации 200 нг/мл на 18-м пассаже (модель репликативного старения) происходит повышение уровня мРНК *Sox9* в 2,4 раза по сравнению с контрольными культурами. Пептид AED в концентрации 2000 нг/мл повышает

уровень мРНК *Sox9* в МСК при их репликативном старении в 2,6 раза по сравнению с контролем. ППКХ в концентрации 200 нг/мл не оказывает значимого влияния на уровень мРНК *Sox9* в клетках SC5-MSC, а в концентрации 2000 нг/мл вызывает статистически значимое увеличение уровня этого показателя в 3,4 раза по сравнению с контролем (рис. 3А). Схожая тенденция наблюдалась и для синтеза белка SOX9 клетками SC5-MSC, оцениваемая по параметру площади экспрессии. Пептид AED в концентрациях 200 нг/мл и 2000 нг/мл повышает площадь экспрессии SOX9 в МСК при репликативном старении в 2,5 и 2,2 раза соответственно. ППКХ в концентрации 200 нг/мл не оказывает влияния на площадь экспрессии SOX9, а в концентрации 2000 нг/мл увеличивает площадь экспрессии SOX9 в 2,9 раза при старении МСК (рис. 3Б). Таким образом, пептид AED индуцирует экспрессию гена и синтез белка SOX9 в МСК человека при старении *in vitro* в обеих исследуемых концентрациях. ППКХ индуцирует экспрессию гена и синтез белка SOX9 в стареющих МСК более выражено по сравнению с пептидом AED, но только в концентрации 2000 нг/мл.

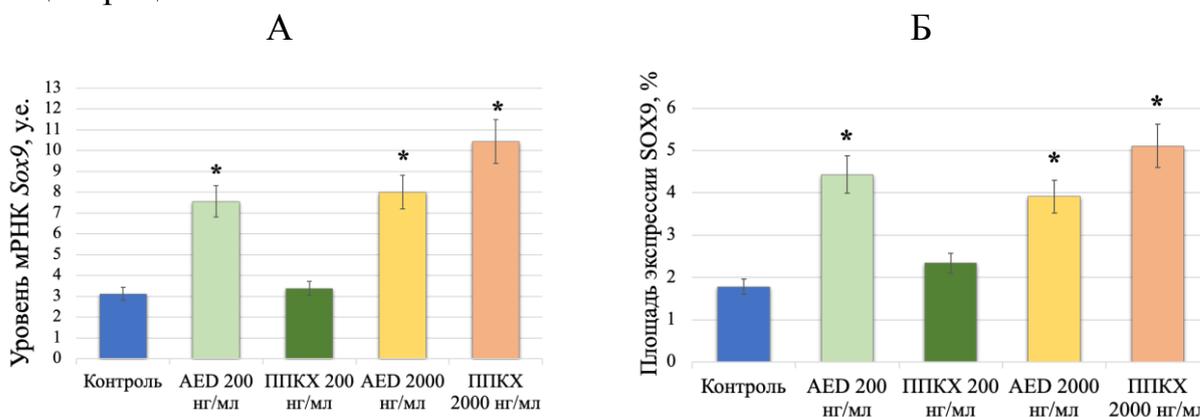


Рисунок 3. Уровень мРНК *Sox9* (А) и площадь экспрессии SOX9 (Б) в МСК человека при репликативном старении при воздействии пептидов в разных концентрациях. * $p < 0,01$ – по сравнению с контролем.

При добавлении в культуру клеток SC5-MSC при репликативном старении пептида AED в концентрации 200 нг/мл происходит статистически значимое повышение уровня мРНК агрекана в 1,4 раза по сравнению с контролем. При этом добавление пептида AED в концентрации 2000 нг/мл и ППКХ в концентрации 200 нг/мл не влияет на этот показатель в МСК человека при их старении. ППКХ в концентрации 2000 нг/мл вызывает повышение уровня мРНК агрекана в стареющих МСК в 2,1 раза по сравнению с контролем (рис. 4А). Такая же зависимость проявляется и при определении синтеза белка агрекана клетками SC5-MSC. Добавление пептида AED в концентрации 200 нг/мл и ППКХ в концентрации 2000 нг/мл вызывает увеличение площади экспрессии агрекана соответственно в 1,6 и 2,4 раза по сравнению с контролем в МСК в модели репликативного старения. В то же время пептид AED в концентрации 2000 нг/мл и ППКХ в концентрации 200 нг/мл не оказывают влияния на синтез агрекана (рис. 4Б). Таким образом, действие пептида AED и ППКХ на экспрессию гена и синтез белка агрекана

отличаются от рассмотренного выше действия этих комплексов на белок SOX9 при репликативном старении МСК человека. Наблюдается зависимость эффекта от концентрации, причем для АЕД наиболее эффективной оказалась меньшая концентрация (200 нг/мл), а для ППКХ – большая (2000 нг/мл).

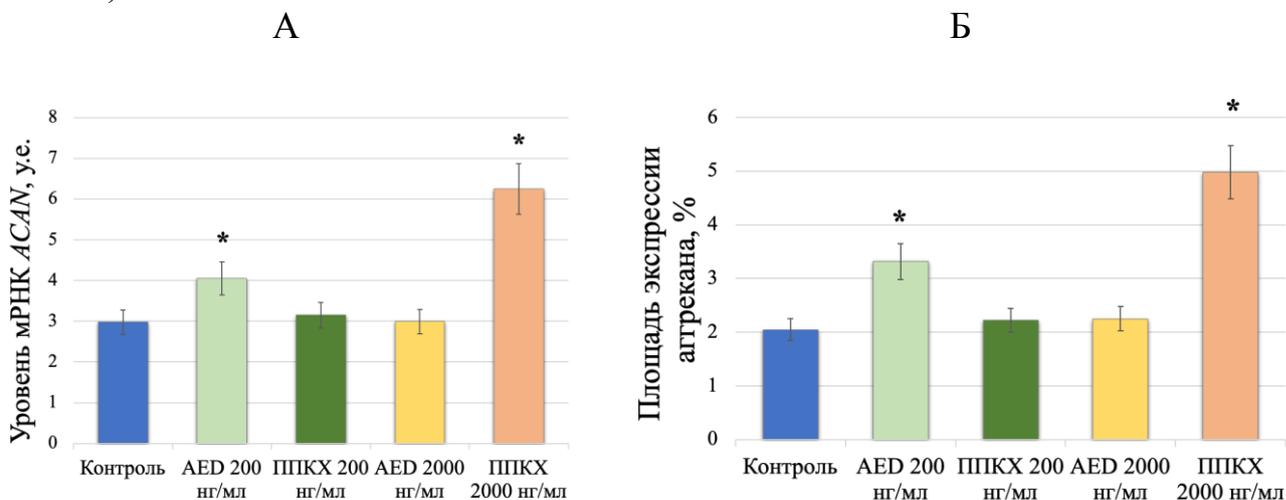


Рисунок 4. Уровень мРНК ACAN (А) и площадь экспрессии агрекана (Б) в МСК человека при репликативном старении при воздействии пептидов в разных концентрациях. * $p < 0,01$ – по сравнению с контролем.

Добавление в культуру клеток SC5-MSC при репликативном старении пептида АЕД и ППКХ в дозах 200 нг/мл и 2000 нг/мл вызывало повышение экспрессии гена и синтеза коллагена II типа (рис. 5). Наиболее выраженный эффект оказывал ППКХ в концентрации 2000 нг/мл, повышая уровень мРНК *Coll2* в 3,1 раза и площадь экспрессии коллагена II типа в 3,8 раза по сравнению с контрольными культурами. ППКХ в концентрации 200 нг/мл оказывал менее выраженное влияние на эти показатели: уровень мРНК *Coll2* повышался в 2 раза, а площадь экспрессии – в 2,2 раза по сравнению с контролем. Пептид АЕД оказывал на экспрессию и синтез коллагена II типа в стареющих МСК человека одинаковое влияние в концентрациях 200 и 2000 нг/мл, повышая исследуемые показатели в среднем в 2,5 раза.

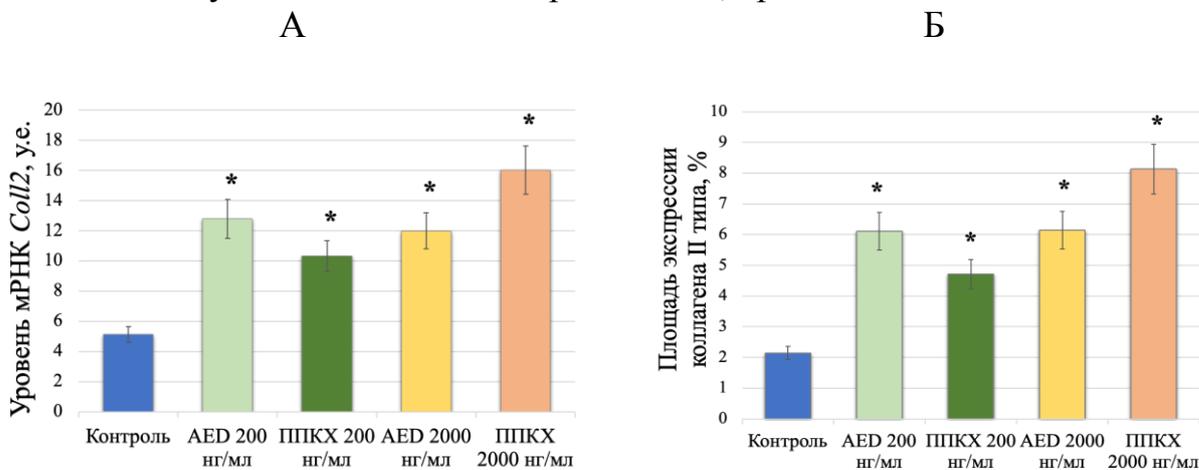


Рисунок 5. Уровень мРНК *Coll2* (А) и площадь экспрессии коллагена II типа (Б) в МСК человека при репликативном старении при воздействии пептидов в разных концентрациях. * $p < 0,01$ – по сравнению с контролем.

Определение уровней мРНК и площади экспрессии белка COMP в клетках SC5-MSC при репликативном старении и воздействии пептида AED и ППКХ показало, что паттерны экспрессии и синтеза в данном случае распределены практически так же, как и в случае агрекана. Однако наиболее выраженное действие на уровень мРНК COMP при старении МСК оказывает пептид AED в концентрации 200 нг/мл, повышая этот показатель в 3,5 раза по сравнению с контролем (рис. 6).

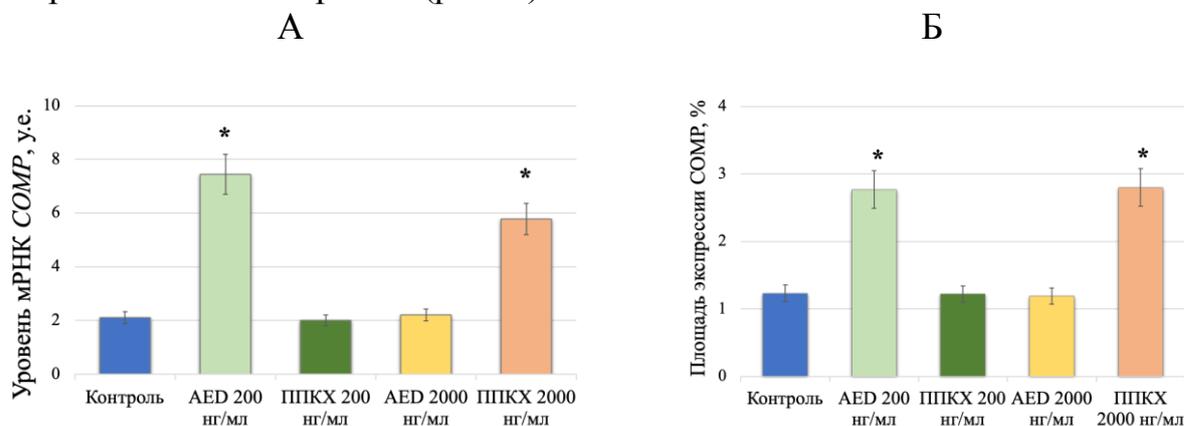


Рисунок 6. Уровень мРНК *COMP* (А) и площадь экспрессии белка *COMP* (Б) в МСК человека при репликативном старении при воздействии пептидов в разных концентрациях. * $p < 0,01$ – по сравнению с контролем.

ППКХ в дозе 2000 нг/мл вызывает повышение уровня мРНК *COMP* в стареющих МСК в 2,7 раза по сравнению с контролем. При этом пептид AED в концентрации 2000 нг/мл и ППКХ в концентрации 200 нг/мл не оказывают влияния на экспрессию гена *COMP* в клетках SC5-MSC при репликативном старении (рис. 6А). Пептид AED в концентрации 200 нг/мл и ППКХ в концентрации 2000 нг/мл вызывали повышение площади экспрессии *COMP* в 2,3 раза при старении МСК по сравнению с контролем (рис. 6Б).

Влияние пептидов на формирование секреторного фенотипа хондроцитов, ассоциированного со старением

Экспрессия p16 в культуре хондроцитов, полученных от старых животных, была в 4,3 раза выше по сравнению с этим показателем в культурах хондроцитов молодых крыс (табл. 1). Пептид AED в концентрации 200 нг/мл снижал экспрессию проапоптотического белка p16 в 3 раза, а в концентрации 2000 нг/мл - в 2,8 раза в культурах хондроцитов, полученных от старых животных. При добавлении ППКХ в культуру хондроцитов, выделенных у старых крыс, в концентрации 2000 нг/мл площадь экспрессии уменьшалась в 4,7 раза (табл. 1).

Экспрессия проапоптотического белка p21 в культуре хондроцитов, полученных от старых животных, была в 4,5 раза выше по сравнению с этим показателем в культурах хондроцитов, выделенных у молодых крыс (табл. 1). Пептид AED снижал экспрессию p21 при добавлении в культуру старых хондроцитов в обеих концентрациях в 5,1-5,2 раза по сравнению с контролем. При добавлении ППКХ в культуру хондроцитов, выделенных у старых крыс, в концентрации 2000 нг/мл площадь экспрессии p21 уменьшалась в 4,1 раза

по сравнению с этим показателем в культурах хондроцитов старых животных (табл. 1).

Таблица 1

Влияние пептидов на синтез проапоптотических белков в хондроцитах, полученных от молодых и старых животных

Группа	Площадь экспрессии, %					
	p16		p21		p53	
	Культуры хондроцитов от молодых животных	Культуры хондроцитов от старых животных	Культуры хондроцитов от молодых животных	Культуры хондроцитов от старых животных	Культуры хондроцитов от молодых животных	Культуры хондроцитов от старых животных
Контроль	0,55±0,09	2,35±0,12#	0,48±0,06	2,18±0,19#	0,69±0,15	3,47±0,22#
АЕД, 200 нг/мл	0,47±0,11	0,78±0,13*	0,49±0,05	0,43±0,06*	0,53±0,10	1,17±0,06*
ППКХ, 200 нг/мл	0,50±0,10	2,01±0,11	0,55±0,08	1,99±0,08	0,66±0,14	2,23±0,14*
АЕД, 2000 нг/мл	0,52±0,11	0,85±0,11*	0,50±0,06	0,42±0,05*	0,50±0,10	1,25±0,09*
ППКХ, 2000 нг/мл	0,49±0,08	0,51±0,10*	0,39±0,09	0,53±0,07*	0,47±0,09	0,90±0,05*

- $p < 0,01$ по сравнению с контролем в культурах хондроцитов молодых животных, * - $p < 0,01$ по сравнению с контролем в культурах хондроцитов старых животных.

Экспрессия p53 в культуре хондроцитов, полученных от старых животных, была в 5 раз выше по сравнению с этим показателем в культурах хондроцитов от молодых животных (табл. 1). Пептид АЕД в концентрации 200 нг/мл снижал экспрессию проапоптотического белка p53 в 2,2 раза, а в концентрации 2000 нг/мл - в 2,5 раза по сравнению с соответствующим контролем. ППКХ при добавлении в культуру хондроцитов, выделенных у старых крыс, в концентрации 200 нг/мл снижал экспрессию p53 в 1,6 раза, а в концентрации 2000 нг/мл - в 3,9 раза по сравнению этим показателем в культурах хондроцитов старых крыс (табл. 1). Пептиды АЕД и ППКХ не влияли на экспрессию всех трех проапоптотических белков в культурах хондроцитов, полученных от молодых животных (табл. 1).

При старении хондроцитов наблюдается снижение синтеза Sirt1 в 4,3 раза (табл. 2). При добавлении пептида АЕД в концентрации 200 нг/мл происходит увеличение экспрессии Sirt1 в 3,6 раза, а в концентрации 2000 нг/мл - в 4,6 раза по сравнению с этим показателем в культурах хондроцитов, полученных от старых животных. При добавлении ППКХ в концентрации 200 нг/мл происходит увеличение экспрессии Sirt1 в культуре хондроцитов старых крыс в 3,3 раза, а в концентрации 2000 нг/мл - в 4,7 раза по сравнению с соответствующим контролем (табл. 2).

Экспрессия провоспалительного цитокина TNF α была выше в 2,1 раза в культурах хондроцитов, полученных от старых животных, по сравнению с этим показателем в культурах хондроцитов молодых животных (табл. 2). Только при добавлении ППКХ в культуру хондроцитов от старых животных в концентрации 2000 нг/мл происходило достоверное снижение площади экспрессии TNF α в 1,9 раз по сравнению с соответствующим контролем. При старении хондроцитов наблюдается увеличение синтеза IL-1 α в 3,8 раза (табл. 2). Снижение экспрессии IL-1 α в 1,6 и 1,9 раза в культурах хондроцитов старых животных наблюдалось при добавлении ППКХ в концентрациях 200 и 2000 нг/мл. Пептиды AED и ППКХ не влияют на синтез Sirt1 и провоспалительных цитокинов в хондроцитах, полученных от молодых животных (табл. 2).

Таблица 2

Влияние пептидов на синтез Sirt1 и провоспалительных цитокинов TNF α , IL-1 α в хондроцитах, полученных от молодых и старых животных

Группа	Площадь экспрессии, %					
	Sirt1		TNF α		IL-1 α	
	Культуры хондроцитов от молодых животных	Культуры хондроцитов от старых животных	Культуры хондроцитов от молодых животных	Культуры хондроцитов от старых животных	Культуры хондроцитов от молодых животных	Культуры хондроцитов от старых животных
Контроль	4,78 \pm 0,34	1,12 \pm 0,06#	0,37 \pm 0,06	0,78 \pm 0,08#	0,44 \pm 0,07	1,66 \pm 0,12#
AED, 200 нг/мл	5,15 \pm 0,30	4,02 \pm 0,08*	0,39 \pm 0,08	0,65 \pm 0,11	0,40 \pm 0,06	1,34 \pm 0,18
ППКХ, 200 нг/мл	4,65 \pm 0,27	3,66 \pm 0,11*	0,32 \pm 0,09	0,69 \pm 0,12	0,36 \pm 0,06	1,01 \pm 0,10*
AED, 2000 нг/мл	5,04 \pm 0,33	5,11 \pm 0,15*	0,34 \pm 0,06	0,73 \pm 0,07	0,44 \pm 0,08	1,40 \pm 0,17
ППКХ, 2000 нг/мл	4,99 \pm 0,29	5,31 \pm 0,13*	0,38 \pm 0,07	0,41 \pm 0,06*	0,35 \pm 0,06	0,87 \pm 0,10*

- $p < 0,01$ по сравнению с контролем в культурах хондроцитов молодых животных, * - $p < 0,01$ по сравнению с контролем в культурах хондроцитов старых животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Заболевания опорно-двигательного аппарата, включая ОА, являются одной из ведущих причин инвалидизации лиц среднего и пожилого возраста во всем мире. ОА представляет собой заболевание синовиальных суставов, которое характеризуется деградацией хряща и разрастанием кости в виде остеофитов и субхондрального утолщения. ОА постепенно прогрессирует, приводя к нарастанию болевого синдрома и потере подвижности. На молекулярно-клеточном уровне ОА характеризуется ускоренным старением хондроцитов и нарушением их функций. Нужно отметить, что для лечения ОА до сих пор не существует эффективной таргетной терапии.

Поскольку ОА является ассоциированным с возрастом заболеванием, большое внимание уделяется поиску биологически активных веществ, обладающих не только хондропротекторными, но и геропротекторными свойствами [Jiang Y., 2022]. В связи с этим активно разрабатываются методы биоинженерии, способные стимулировать восстановление хрящевой ткани. К ним относится хондрогенная дифференцировка стволовых клеток, для стимуляции которой применяют различные биомолекулы, в том числе короткие пептиды и полипептидные комплексы. Такими биорегуляторами являются полипептидный комплекс хрящевой ткани (ППКХ) и трипептид АЕД.

Минимальной эффективной концентрацией пептида АЕД, стимулирующей пролиферацию хондроцитов молодых и старых крыс, является 200 нг/мл. В культурах хондроцитов, полученных от старых крыс, эффект пептида был более выражен, чем в клетках, полученных от молодых животных. Это указывает на сочетанное хондро- и геропротекторное действие трипептида и согласуется с результатами ранее проведенных исследований. Ранее в органотипических культурах тканей хряща молодых и старых крыс пептид АЕД увеличивал зону роста эксплантатов на 18-25%, что коррелировало с повышением синтеза пролиферотропного протеина PCNA и снижением экспрессии проапоптотического белка p53 [Смирнов А.В., Чалисова Н.И., Рыжак Г.А., и др., 2011].

Полученные данные показали, что минимальной эффективной концентрацией ППКХ, стимулирующей пролиферацию хондроцитов молодых и старых крыс, является 2000 нг/мл. В культурах хондроцитов, полученных от старых крыс, эффект пептида был более выражен, чем в клетках, полученных от молодых животных. Это свидетельствует о хондро- и геропротекторной активности ППКХ. Ранее было установлено, что ППКХ тканеспецифически стимулирует рост органотипической культуры ткани хряща молодых и старых крыс [Смирнов А.В., Чалисова Н.И., Рыжак Г.А., и др., 2011]. Этот полипептидный комплекс препятствовал развитию дегенеративно-дистрофических изменений в хрящевой ткани суставной поверхности в модели посттравматического остеоартроза в эксперименте [Рыжак Г.А., Попович И.Г., Хавинсон В.Х., 2019].

Установлено, что пептид АЕД и ППКХ в различных концентрациях стимулируют экспрессию генов и синтез белков-регуляторов хондрогенной дифференцировки МСК человека при репликативном старении: SOX9, агрекана, коллагена II типа и СОМР. Пептид АЕД в концентрации 200 нг/мл активизирует экспрессию генов и синтез этих белков при старении хондроцитов *in vitro*, наиболее сильно влияя на коллаген II типа и СОМР. ППКХ в концентрации 2000 нг/мл также оказывает выраженное стимулирующее влияние на экспрессию генов и синтез всех исследуемых белков в МСК человека при старении *in vitro*.

Известно, что ППКХ стимулирует пролиферацию и дифференцировку клеток соединительной ткани при старении, однако до сих пор не было проведено исследований по оценке молекулярных механизмов его геро- и хондропротекторного действия. Результаты данного исследования демонстриру-

ют, что ППКХ имеет выраженный дозозависимый эффект: повышение его концентрации с 200 до 2000 нг/мл приводит к значительному увеличению экспрессии генов и экспрессии белков – факторов хондрогенеза. Интересно отметить, что даже в небольшой концентрации (200 нг/мл) ППКХ статистически значимо стимулирует экспрессию гена *Coll2* и синтез коллагена II типа. Поскольку снижение синтеза коллагена II типа является одним из основных признаков снижения функциональной активности хондроцитов при старении, эти данные указывают на геропротекторное действие ППКХ. Влияние ППКХ на все исследуемые молекулы, за исключением СОМР, более выражено, чем действие пептида АЕД, что может быть объяснено наличием других пептидных молекул в составе полипептидного комплекса, которые также вносят вклад в стимуляцию дифференцировки МСК. Учитывая, что ППКХ в концентрации 2000 нг/мл повышает экспрессию генов и синтез всех исследуемых белков, можно предположить, что ППКХ оказывает влияние на хондрогенез как на уровне регуляции транскрипционных факторов (в частности, регулируя синтез *Sox9*), так и на уровне белков ВКМ. Вероятно, повышенный синтез *Sox9* вызывает индукцию экспрессии генов и синтеза белков агрекана, коллагена II типа и СОМР. Это, в свою очередь, может способствовать восстановлению пролиферации хондроцитов и хондрогенезу, нарушающимся при старении [Posey K.L., Coustry F., Hecht J.T., 2018].

Влияние пептида АЕД на дифференцировку МСК имеет тенденцию, схожую с ППКХ. По-видимому, пептид АЕД индуцирует экспрессию гена *SOX9* и синтез белка *SOX9* в МСК человека при репликативном старении, что вызывает дальнейшую индукцию нижестоящих эффекторов хондрогенеза и белков ВКМ. При этом синтез агрекана и СОМР при репликативном старении МСК повышается только под действием трипептида в концентрации 200 нг/мл, а синтез коллагена II типа одинаково чувствителен как к концентрации пептида 200 нг/мл, так и 2000 нг/мл.

Клеточное старение хондроцитов включает в себя активацию апоптоза и формирование SASP [Childs B.G., Durik M., Baker D.J., van Deursen J.M., 2015]. SASP клеток хряща характеризуется секрецией сигнальных молекул, включая провоспалительные медиаторы и ферменты, разрушающие внеклеточный матрикс. SASP хондроцитов способствует развитию хронического системного воспаления. Воспаление, как известно, является одним из основных факторов риска развития возраст-ассоциированных заболеваний, включая ОА [Baker D.J., Wijshake T., Tchkonja T., et al., 2011]. Сенесцентные клетки накапливаются по мере старения организма, что приводит к снижению пролиферации и нарушению регенерации и функций тканей [He S., Sharpless N.E., 2017].

SASP характеризует функциональную активность и метаболизм клеток при старении [Wiley C.D., Campisi J., 2021] и может являться одной из причин развития ассоциированных с возрастом заболеваний, в частности, ОА. Изученные в диссертационном исследовании сигнальные молекулы, проапоптотические белки p16, p21, p53, провоспалительные цитокины TNF α , IL-1 α , а также белок Sirt1, участвуют в формировании и регуляции SASP [Liu

Y., Zhang Z., Li T., et al., 2022; Wu C.-J., Liu R.-X., Huan S.-W., et al., 2022]. При старении хондроцитов наблюдается увеличение продукции белков p16, p21, p53, TNF α , IL-1 α и снижение синтеза Sirt1. ППКХ и пептид AED способствовали нормализации синтеза указанных выше молекул при старении хондроцитов *in vitro*. Следует отметить, что наибольший геропротекторный эффект на синтез проапоптотических белков при формировании SASP хондроцитов оказывал пептид AED, а на продукцию провоспалительных цитокинов и Sirt1 - ППКХ. Эти данные способствуют пониманию молекулярных основ геро- и хондропротекторного действия ППКХ и пептид AED, описанных ранее при лечении заболеваний опорно-двигательного аппарата, в частности дегенеративно-дистрофических заболеваний суставов и позвоночника у людей старших возрастных групп [Повознюк В.В., Хавинсон В.Х., Макогончук А.В., и др., 2007].

Таким образом, ППКХ и пептид AED обладают геро- и хондропротекторными свойствами в исследовании *in vitro*. ППКХ в концентрации 2000 нг/мл и пептид AED в концентрации 200 нг/мл стимулируют пролиферацию хондроцитов, полученных от молодых и старых животных. Эффективность обоих исследуемых пептидов выше при действии на клетки старых животных, что отражает их геропротекторное действие.

Кроме того, полученные данные свидетельствуют о том, что ППКХ и пептид AED являются перспективными для дальнейшего изучения в качестве геропротекторных веществ, стимулирующих дифференцировку МСК человека при старении *in vitro* по хондрогенному пути. Этот геропротекторный эффект пептидов может быть важен с точки зрения поддержания пула функционально активных хондроцитов, снижение количества которых с возрастом является одним из факторов, приводящих к развитию ОА. Благодаря наличию множества коротких биологически активных пептидов, в том числе AED, ППКХ может рассматриваться как стимулятор репарации хрящевой ткани при ее старении и ассоциированных с возрастом заболеваниях, в том числе ОА. Поскольку снижение пролиферации хондроцитов является одним из клеточных механизмов развития ОА, полученные данные открывают перспективы для изучения хондропротекторных свойств ППКХ и пептида AED на молекулярном уровне с целью разработки средств для терапии ОА.

SASP хондроцитов характеризуется повышением синтеза проапоптотических белков p16, p21, p53, провоспалительных цитокинов TNF α , IL-1 α и снижением продукции гистоновой деацетилазы Sirt1. Пептид AED снижает синтез проапоптотических факторов при старении хондроцитов. ППКХ уменьшает продукцию провоспалительных цитокинов TNF α , IL-1 α и стимулирует синтез Sirt1, снижение экспрессии которого характерно для сенесцентных клеток. Эти молекулярные аспекты пептидной геропротекции могут лежать в основе хондропротекторных свойств ППКХ и пептида AED и объяснять их эффективность при ОА у людей пожилого возраста.

ВЫВОДЫ

1. Пептид AED в концентрациях 200 и 2000 нг/мл и полипептидный комплекс хрящевой и костной тканей в концентрации 2000 нг/мл в 2 раза повышают количество хондроцитов в культурах, полученных от молодых и старых крыс. Пептид AED и полипептидный комплекс хрящевой и костной тканей оказывают более выраженное пролифератропное действие в культурах хондроцитов, полученных от старых животных.
2. Пептид AED в концентрациях 200 и 2000 нг/мл и полипептидный комплекс хрящевой и костной тканей в концентрации 2000 нг/мл стимулируют экспрессию мРНК транскрипционного фактора Sox9 и синтез белка SOX9 в мезенхимальных стволовых клетках человека. Пептид AED в концентрации 200 нг/мл и полипептидный комплекс хрящевой и костной тканей в концентрации 2000 нг/мл активируют экспрессию мРНК гена ACAN и синтез белка агрекана в МСК человека.
3. Пептид AED и полипептидный комплекс хрящевой и костной тканей в концентрациях 200 и 2000 нг/мл повышают экспрессию мРНК и синтеза коллагена II типа в мезенхимальных стволовых клетках человека. Пептид AED в концентрации 200 нг/мл и полипептидный комплекс хрящевой и костной тканей в концентрации 2000 нг/мл стимулируют экспрессию мРНК гена *COMP* и синтез олигомерного матричного белка хряща в мезенхимальных стволовых клетках человека.
4. При старении в культурах хондроцитов выявлено повышение синтеза белков p16, p21, p53, TNF α , IL-1 α и снижение синтеза Sirt1. Пептид AED в концентрациях 200 и 2000 нг/мл и полипептидный комплекс хрящевой и костной тканей в концентрации 2000 нг/мл снижают синтез белков p16, p21, p53 и повышают синтез Sirt1 в культурах хондроцитов при старении. Наибольшее влияние на провоспалительные цитокины оказывал полипептидный комплекс хрящевой и костной тканей в концентрации 2000 нг/мл, снижая синтез TNF α , IL-1 α в хондроцитах, полученных от старых крыс.
5. Пептид AED в концентрациях 200 и 2000 нг/мл и полипептидный комплекс хрящевой и костной тканей в концентрации 2000 нг/мл стимулируют пролиферацию хондроцитов, полученных от старых животных. Пептид AED и полипептидный комплекс хрящевой и костной тканей активируют экспрессию молекул SOX9, COMP, агрекана и коллагена II типа, участвующих в хондрогенной дифференцировке мезенхимальных стволовых клеток человека. Пептид AED и полипептидный комплекс хрящевой и костной тканей снижают синтез проапоптотических белков p16, p21, p53 и повышают экспрессию Sirt1 при старении хондроцитов. Полипеп-

- тидный комплекс хрящевой и костной тканей снижает синтез провоспалительных цитокинов TNF α , IL-1 α в хондроцитах при их старении.
6. Мишенями геропротекторного действия пептида AED и полипептидного комплекса хрящевой и костной тканей являются проапоптотические протеины p16, p21, p53, сиртуин Sirt1 и маркеры хондрогенной дифференцировки SOX9, COMP, агрекан и коллаген II типа. Мишенями хондро-и геропотекторного действия полипептидного комплекса хрящевой и костной тканей также являются провоспалительные цитокины TNF α , IL-1 α .
 7. Пептидная регуляция функций хондроцитов заключается в нормализации синтеза сигнальных молекул, формирующих их секреторный фенотип, и предотвращении образования фенотипа, ассоциированного с клеточным старением.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Выявленные противовоспалительные и геропотекторные свойства позволяют рекомендовать полипептидный комплекс хрящевой и костной тканей и пептид AED для экспериментального изучения в качестве средств профилактики болезней опорно-двигательного аппарата при старении организма.
2. Для углубленного понимания молекулярных основ геро- и хондропотекторного действия полипептидного комплекса хрящевой и костной тканей и пептида AED рекомендуется дальнейшее их изучение в наиболее эффективных концентрациях в моделях остеоартроза у животных с целью последующей разработки на их основе лекарственных препаратов для лечения и профилактики заболеваний опорно-двигательного аппарата, ассоциированных со старением.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации диссертационных исследований

1. Влияние пептидов на хондрогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток человека при репликативном старении / *С.Н.Мякишева, Н.С. Линькова, А.С. Дятлова, В.О. Полякова, Г.А. Рыжак* // Успехи геронтологии. 2023. Т. 36. № 2. С. 383–390. doi: 10.34922/AE.2023.36.2.013.
2. *Мякишева, С.Н.* Секреторный фенотип хондроцитов, ассоциированный со старением: роль в патогенезе остеоартрита и перспективы пептидной биорегуляции / *С.Н. Мякишева, Н.С. Линькова, Г.А. Рыжак* // Успехи геронтологии. 2023. Т. 36. № 2. С. 313–323. doi: 10.34922/AE.2023.36.2.004

3. Пептиды предотвращают формирование секреторного фенотипа хондроцитов, ассоциированного со старением / *С.Н.Мякишева*, Н.С. Линькова, Е.О. Кожевникова, В.О. Полякова, Г.А. Рыжак // *Успехи геронтологии*. 2023. Т. 36. № 2. С. 234–238. doi: 10.34922/AE.2023.36.2.011.
4. Peptide Regulation of Chondrogenic Stem Cell Differentiation. / N. Linkova, V. Khavinson, A. Diatlova, S. Myakishева, G. Ryzhak // *Int. J. Mol. Sci. Special Issue «New Trend in the Research of Short Peptides»*. 2023. Vol. 24. P. 8415. <https://doi.org/10.3390/ijms24098415>.

Статья в сборнике

5. Ультракороткие пептиды: молекулярные и клинические аспекты биологической активности / Н.С. Линькова, Н.В. Фридман, Е.О. Гутоп, А.В. Дудков, С.Н. Мякишева, В.Х. Хавинсон // IV международная научная конференция «Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской приматологии». Сб. статей. Сочи, 2-3 ноября 2021г. С. 69-73.

Тезисы докладов

6. Геропротекторный пептид AEDG (эпиталон): эпигенетические механизмы регуляции нейрогенеза / Е.С. Миронова, О.М. Ивко, *С.Н. Мякишева*, В.Х. Хавинсон // В сб. XV Научно-практическая конференция «Пушковские чтения – 2019». Актуальные вопросы геронтологии и гериатрии. 15 ноября 2019. С. 23-24.
7. Остеоартрит и молекулярные аспекты старения клеток хрящевой ткани/ *С.Н. Мякишева*, Н.С. Линькова, Н.В. Фридман., Е.О. Гутоп, В.Х. Хавинсон // XV Международный форум «Старшее поколение». 28 сентября – 2 октября 2022. С.-Петербург. С. в журнале «Успехи геронтологии». Т. 35. №4. С. 620.
8. Пептид AED: влияние на оксидативный стресс, клеточное старение и перспективы применения при остеоартрозе у лиц старших возрастных групп / Н.С. Линькова, С.Н. Мякишева, Е.О. Гутоп, Н.В. Фридман, В.Х. Хавинсон // XV Международный форум «Старшее поколение». 28 сентября - 2 октября 2022. С.-Петербург. «Успехи геронтологии». Т. 35. №4. С. 608-609.
9. Пептид AED: регуляция дифференцировки клеток и перспективы применения при остеоартрите у людей разного возраста / С.Н. Мякишева, Н.С. Линькова, Н.В. Фридман, Е.О. Гутоп, D. Borkovic, В.Х. Хавинсон // В сб. Юбилейная научно-практическая конференция «ИЭПиТ 2022. Вчера, сегодня, завтра», г. Сухум, Абхазия, 26-28 октября 2022. С. 205-208.
10. Пептид AED стимулирует экспрессию факторов дифференцировки хондроцитов при репликативном старении. / Н.С. Линькова, С.Н., Мякишева, Е.О. Гутоп, Н.В. Фридман, В.Х. Хавинсон // В сб. Юбилейная научно-практическая конференция «ИЭПиТ 2022. Вчера, сегодня, завтра», г. Сухум, Абхазия, 26-28 октября 2022. С. 167-170.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

МСК	Мезенхимальные стволовые клетки
ОА	Остеоартрит
ППКХ	Полипептидный комплекс хрящевой и костной тканей
АСАН	Агрекан
АЕД	Пептид Н-Ala-Glu-Asp-Н
СОМР	Олигомерный матричный белок хряща
IL	Интерлейкин
SASP	Секреторный фенотип, ассоциированный со старением
SIRT	Сиртуин
TNF	Фактор некроза опухоли

Мякишева Светлана Николаевна ПЕПТИДНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И СТАРЕНИЯ ХОНДРОЦИТОВ // Автореф. дис. канд. биол. наук: 3.1.31 – геронтология и гериатрия. СПб. – 2023. – 23 с.

Подписано в печать « » 2023 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

Список цитируемой литературы

Гутоп Е.О., Линькова Н.С., Фридман Н.В. и др. Пептид АЕД активирует экспрессию генов и синтез белков дифференцировки фибробластов кожи человека при репликативном старении // Молекулярная медицина. 2022. Т. 20 (2). С. 32–38; Журкович И.К., Ковров Н.Г., Рыжак Г.А. и др. Идентификация коротких пептидов в составе полипептидных комплексов, выделенных из органов животных // Успехи современной биологии. 2020. Т. 140(2). С. 140–148; Повознюк В.В., Хавинсон В.Х., Макогончук А.В., и др. Изучение влияния пептидных регуляторов на структурно-функциональное состояние костной ткани крыс при старении // Успехи геронтологии. 2007. Т.20. №2. С. 134–137; Рыжак Г.А., Попович И.Г., Хавинсон В.Х. Перспективы применения пептидного биорегулятора для профилактики и лечения возраст-ассоциированных заболеваний опорно-двигательного аппарата (обзор экспериментальных данных) // Патогенез. 2019. Т. 17(3). С. 13–24; Сахенберг Е.И., Николаенко Н.С., Пинаев Г.П. Исследование распластывания и организации актинового цитоскелета стромальных клеток костного мозга и клеток хряща при их раздельном и совместном культивировании на разных белках внеклеточного матрикса // Цитология. 2014. Т. 56(10). С. 708–716; Смирнов А.В., Чалисова Н.И., Рыжак Г.А., и др. Геропротекторное действие аминокислот и трипептидов в культуре ткани хряща крыс // Успехи геронтологии. 2011. Т. 24(1). С. 139–142; Шукурова С.М., Хамроева З.Д., Почоджанова Ш.Ш., Шодиев Б.Р. Особенности клинического течения остеопороза у лиц пожилого и старческого возраста // Клиническая медицина. 2015. №4. С. 57–63; . P. 377–389; Ashapkin V., Khavinson V., Shilovsky G. et al. Gene expression in human mesenchymal stem cell aging cultures: modulation by short peptides //Molecular Biology Reports. 2020. Vol. 47(6). P. 4323–4329; Baker D.J., Wijshake T., Tchkonja T. et al. Clearance of P16Ink4a-Positive Senescent Cells Delays Ageing-Associated Disorders // Nature. 2011. Vol. 479. P. 232–236; Childs B.G., Durik M., Baker D.J., van Deursen J.M. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy // Nat Med. 2015. Vol. 21. № 12. P. 1424–1435; He S., Sharpless N.E. Senescence in health and disease // Cell. 2017. Vol. 169. P. 1000–1011; Jiang Y. Osteoarthritis year in review 2021: biology // Osteoarthritis Cartilage. 2022. Vol. 30(2). P. 207–215; Khatri S., Hansen J., Pedersen N.B. et al. Cyclic Citrullinated Peptide Aptamer Treatment Attenuates Collagen-Induced Arthritis // Biomacromolecules. 2022. Vol. 23(5). P. 2126–2137; Khavinson V.Kh., Grigoriev E.I., Malinin V.V. et al. Peptide normalizing osseous and cartilaginous tissue metabolism, pharmacological substance based thereon and method of its application. Eurasia Patent. EA 010574. 30.10.2008; 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 // Current Aging Science. 2013. № 1 (6). P. 14–20; Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Karmushakov A.F., et al. Testing of geroprotectors in experiments on cell cultures: Choosing the correct model system // Moscow University Biological Sciences Bulletin. 2014. № 1 (69). P. 10–14; Liu Y., Zhang Z., Li T., Xu H., Zhang H. Senescence in osteoarthritis: from mechanism to potential treatment // Arthritis Research & Therapy. 2022. Vol. 24(1). P. 174; Posey K.L., Coustry F., Hecht J.T. Cartilage oligomeric matrix protein: COMPathies and beyond // Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology. 2018. Vol. 71–72. P. 161–173; Wenhart C., Holthoff H.P., Reimann A., et al. A fructosylated peptide derived from a collagen II T cell epitope for long-term treatment of arthritis (FIA-CIA) in mice // Scientific Reports. 2021. Vol. 11(1). P. 17345; Wiley C.D., Campisi J. The metabolic roots of senescence: mechanisms and opportunities for intervention // Nature Metabolism. 2021. Vol. 3. P. 1290–1301; Wu C.-J., Liu R.-X., Huan S.-W., et al. Senescent skeletal cells cross-talk with synovial cells plays a key role in the pathogenesis of osteoarthritis // Arthritis Res Ther. 2022. Vol. 24. P. 59.