

**Заключение экспертной комиссии диссертационного совета
Д 521.103.01 01 при Автономной научной некоммерческой
организации высшего образования Научно-исследовательский центр
«Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии»
по диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук ДУДКОВА Александра Владимировича
на тему: «Пептидная регуляция апоптоза клеток при старении»**

Для рассмотрения работы А.В. Дудкова была создана комиссия из членов диссертационного совета в составе: з.д.н. РФ, д.м.н., проф. Г.А. Рыжак (председатель); з.д.н. РФ, д.б.н., проф. А.В. Арутюнян; д.б.н. И.Г. Попович.

Комиссия ознакомилась с диссертацией и представленными документами.

Работа выполнена в лаборатории молекулярных механизмов старения Автономной научной некоммерческой организации высшего образования Научно-исследовательский центр «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» (АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии») при участии научных консультантов з.д.н. РФ, д.м.н., профессора И.М. Кветного и д.б.н., доцента Н.С. Линьковой.

Диссертация была апробирована 16 мая 2019 г. протокол №5 на совместном заседании отделов биogerонтологии, клеточной биологии и патологии, клинической геронтологии и гериатрии АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» и рекомендована к защите на Диссертационном совете Д 521.103.01 по защите докторских и кандидатских диссертаций по специальности 14.01.30 - геронтология и гериатрия.

Актуальность исследования. В настоящее время все более актуальным становится направление исследований, изучающее процессы старения организма, что обусловлено прогрессирующим увеличением доли лиц пожилого и старческого возраста в общей численности населения. Средняя продолжительность жизни людей за последние 20 лет в России увеличилась на 10%, а в Европе - на 15%. Основные нарушения при старении организма наблюдаются, в первую очередь, в сердечно-сосудистой системе: независимо от места проживания, основными причинами смертности в пожилом возрасте становятся заболевания сердца и инсульт. Второй причиной высокой смертности в пожилом возрасте являются хронические заболевания легких. С возрастом значительно ослабевает иммунная функция организма, повышается частота развития хронической почечной недостаточности. Ассоциированные с возрастом заболевания существенно снижают качество жизни лиц пожилого и старческого возраста.

На молекулярно-клеточном уровне нарушения функций сердечно-сосудистой, дыхательной, иммунной и выделительной систем могут проявляться в изменении экспрессии ряда сигнальных молекул и транскрипционных факторов, участвующих в дифференцировке, пролиферации и апоптозе. Темпы возрастной инволюции того или иного органа определяются, в частности, соотношением про- и антиапоптотических белков в клетках. Апоптоз играет важную роль в морфогенетических процессах и регуляции численности клеток. Наиболее информативными маркерами рецепторного апоптоза и клеточного старения являются белки p16, p21, p53. Эти белки являются ингибиторами

цАМФ-зависимых протеинкиназ, экспрессия которых тормозит клеточный рост и повышается при старении организма. Кроме того, в механизмах рецепторного апоптоза важную роль играют Caspase-8, Caspase-9. К маркерам митохондриального апоптоза, связанным с клеточным старением, можно отнести прохибитин и AIF. Прохибитин является многофункциональным белком, имеющим антипролиферативное действие, связанное с ингибирующей ролью в клеточном цикле и участием в регуляции активности ферментов дыхательной цепи. Нарушения апоптотических процессов в различных органах и тканях при старении могут приводить к возникновению патологий, ассоциированных с возрастом, поэтому поиск геропротекторов, направленных на восстановление баланса пролиферации и апоптоза при старении, представляется актуальной задачей молекулярной геронтологии.

Биологически активными пептидами, обладающими тканеспецифическим действием, являются следующие ди- и трипептиды: KED (Lys-Glu-Asp) и DS (Asp-Ser) – вазопротекторы, EDG (Glu-Asp-Gly) и AE (Ala-Glu) – бронхопротекторы, EW (Asp-Trp) и KE (Lys-Glu) – иммунопротекторы, AED (Ala-Glu-Asp), EDL (Glu-Asp-Leu) и DW (Asp-Trp) – нефропротекторы. Ранее были продемонстрированы вазопротекторные свойства пептида KED, заключающиеся в коррекции метаболического сосудистого синдрома и заболеваний, сопровождающихся нарушением проницаемости сосудистой стенки и ломкостью капилляров. Пептид DS также стимулировал процессы клеточного обновления в органотипических и диссоциированных культурах клеток сосудов молодых и старых животных. Пептид EDG демонстрировал бронхопротекторные свойства, снижая воспалительные и бронхоспастические проявления при хроническом бронхите и увеличивая показатели жизненной емкости, общего объема, экспираторной форсированной жизненной емкости легких. Пептид EW широко применяется в медицине как регулятор клеточного, гуморального иммунитета и неспецифической резистентности организма, а также стимулятор регенерации и кроветворения. Пептид KE активизирует клеточный иммунитет и неспецифическую резистентность организма. Пептид EDP предназначен для профилактики и коррекции возрастных

нарушений клеточного и гуморального иммунитета путем активации пролиферации и дифференцировки иммунных клеток. Пептиды AED и EDL обладают нефропротекторными свойствами и эффективны в модели экспериментального нефролитиаза у крыс. Применение этих трипептидов снижает концентрацию оксалат-ионов в моче, количество и размер кальциевых отложений в ткани почек, а также уменьшает интенсивность свободнорадикального окисления. Дипептид DW стимулирует пролиферацию клеток почки эмбриона человека линии HEK-239 и снижает экспрессию ферментов, ассоциированных с патологией почек.

Таким образом, короткие пептиды могут способствовать восстановлению функций сердечно-сосудистой, дыхательной, иммунной и выделительной систем при старении на молекулярно-клеточном уровне. В основе молекулярного механизма действия коротких пептидов лежит их способность эпигенетически регулировать экспрессию генов и синтез белков. Существует гипотеза о том, что эпигенетическая регуляция происходит за счет взаимодействия пептидов с гистоновыми белками. Использование пептидов как регуляторов апоптоза при старении может способствовать снижению частоты возникновения заболеваний, ассоциированных с возрастом. Однако влияние коротких пептидов на процессы рецепторного и митохондриального апоптоза при старении сердечно-сосудистой, дыхательной, иммунной и выделительной систем до сих пор изучено недостаточно.

Наиболее значимые результаты, полученные в работе. При репликативном старении фибробластов легкого в культуре экспрессия маркеров рецепторного апоптоза (p16, p53, Caspase-9) возрастает. Экспрессия маркера митохондриального апоптоза AIF также возрастает при старении, экспрессия прохибитина - снижается. Пептиды EDG и AE снижают уровень экспрессии проапоптотического протеина p16 в «молодых» и «старых» культурах в 2,5 - 3 раза. Пептид EDG снижает экспрессию Caspase-9 в «старых» культурах клеток в 1,75 раза. Пептиды EDG и AE снижают экспрессию AIF в «старых» культурах клеток в 1,5 и 2,8 раза. Пептид EDG повышает экспрессию прохибитина в «молодых» и «старых» культурах в 1,3-2,4 раза. Таким образом, пептиды EDG и AE способствуют снижению выраженности рецепторного и митохондриального апоптоза фибробластов легкого при их старении в культуре.

При старении лимфоцитов крови человека в культуре экспрессия маркеров рецепторного апоптоза p16, p21, p53, Caspase-8, -9 возрастает. Экспрессия маркера митохондриального апоптоза AIF возрастает при старении, экспрессия прохибитина - снижается. Пептиды EW и KE снижают уровень экспрессии проапоптотического протеина p16 в «молодых» и «старых» культурах в 1,2 и 1,4 раза, а проапоптотического маркера p21 – в 1,9 и 2,1 раза. Пептид EW снижает экспрессию p21 в «старых» культурах лимфоцитов в 1,4 раза, экспрессию Caspase-8 в

«старых» культурах лимфоцитов – в 1,7 раза. Пептиды EW, KE и EDP снижают экспрессию Caspase-9 в «старых» культурах лимфоцитов в 1,3 и 3,4 раза. Пептид KE снижает экспрессию AIF в 1,9 раза и повышает экспрессию прохибитина в 3,2 раза в «старых» культурах лимфоцитов. Таким образом, пептиды EW, KE способствуют снижению выраженности рецепторного и митохондриального апоптоза лимфоцитов крови при их старении в культуре.

При старении клеток почек в культуре экспрессия маркеров рецепторного апоптоза p16, p21, p53, Caspase-8, -9 возрастает. Пептиды AED, EDL, DW снижают уровень экспрессии проапоптотических маркеров p16, p21, Caspase-8, -9 в 1,4-2,5 раза в «старых» культурах. Пептиды AED и DW снижают экспрессию p53 в 2,7-3,2 раза в «старых» культурах клеток почек. Таким образом, пептиды AED, EDL, DW способствуют снижению выраженности рецепторного апоптоза клеток почек при их старении в культуре.

При старении клеток сосудов в культуре экспрессия маркеров рецепторного (p16, p21, p53, Caspase-8, -9) и митохондриального (AIF) апоптоза возрастает. Пептиды KED и DS снижают уровень экспрессии проапоптотических маркеров p16, p21, p53 в 1,3-2,6 раза в «старых» культурах. Пептид DS снижает экспрессию Caspase-8, -9 в 1,9 и 1,8 раза в «старых» культурах клеток сосудов. Таким образом, пептиды KED и DS способствуют снижению выраженности рецепторного апоптоза клеток сосудов при их старении.

По результатам молекулярного моделирования пептиды DS, DW, KE, EW предпочтительно связываются с гистоном H4 по N-концевому домену по аминокислотной последовательности Lys-Arg-His-Val-Leu-Arg-Asp-Asn. Пептиды DS, DW, KE, EW с наибольшей вероятностью связываются с гистоном H3 по N-концевому домену по аминокислотной последовательности Lys-Ser-Thr-Lys-Arg-Lys. Пептиды DS, DW, KE, EW связываются с гистоном H2b по N-концевому домену по аминокислотной последовательности Val-Glu-Thr-Ser-Asn-Ser-Asn. По результатам докинга наиболее энергетически выгодное взаимодействие с гистоном H1/3 образует пептид EW, с гистоном H1/6 – пептид DS. Пептиды предпочтительнее всего связываются с гистонами по сайтам, которые взаимодействуют с ДНК. Предполагается, что в этих сайтах происходит конкурентное связывание пептидов и гистона с молекулой ДНК.

Ди- и трипептиды регулируют апоптоз по двум сигнальным путям: митохондриальному и рецепторному. Молекулярными мишенями коротких пептидов в каскаде рецепторного апоптоза являются Caspase-8, -9 и транскрипционные факторы p16, p21, p53. Влияние ди- и трипептидов на митохондриальный путь апоптоза реализуется через белок AIF. Предполагается, что пептидная регуляция экспрессии белков – маркеров апоптоза осуществляется через изменение экспрессии генов этих белков путем пептид-гистоновых взаимодействий.

Достоверность работы обеспечена достаточным объемом экспериментальных исследований, применением адекватных поставленным задачам современных методов исследования (иммуноцитохимический метод, культивирование клеток, морфометрические исследования, компьютерный анализ микроскопических изображений, метод молекулярного моделирования) и методов математико-статистической обработки полученных данных.

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

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

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

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

В работе впервые методом молекулярного моделирования проверена гипотеза гистон-пептидных взаимодействий. Представляется возможным, что антиапоптотическое и геропротекторное действие пептидов может быть связано с изменением транскрипции генов апоптоза при изменении конформаций гистонов, связанных с короткими пептидами. Проведено исследование взаимодействия пептидов DW, DS, KE, EW с гистонами H1/1, H1/3, H1/6, H2b, H3, H4 методом молекулярного моделирования. Было выявлено, что пептиды предпочтительнее всего связываются с

гистонами по сайтам, которые взаимодействуют с ДНК. С помощью докинга было показано, что наиболее энергетически выгодное взаимодействие с гистоном H1/3 образует пептид EW, с гистоном H1/6 – пептид DS.

Теоретическая значимость. На основе проведенного А.В. Дудковым исследования объяснен молекулярный механизм тканеспецифической пептидной регуляции апоптоза различных типов клеток при их старении в культуре.

Практическая значимость. Полученные результаты позволили провести сравнительный анализ молекулярных аспектов биологической активности пептидов EDG, AE, EW, KE, EDP, AED, EDL, DW, KED, DS в отношении пула сигнальных молекул – маркеров рецепторного (p16, p21, p53, Caspase-8, -9) и митохондриального (AIF, прохибитин) апоптоза. Полученные данные свидетельствуют о том, что использование коротких пептидов может являться эффективным методом снижения апоптоза и повышения функциональной активности клеток сердечно-сосудистой, дыхательной, иммунной и выделительной систем при их старении. Важными с практической точки зрения являются данные о том, что ди- и трипептиды с различной структурой регулируют апоптоз в разных органах и тканях при их старении. Пептидная регуляция экспрессии белков – маркеров рецепторного и митохондриального апоптоза может осуществляться через изменение экспрессии генов p16, p21, p53, Caspase-8, -9, AIF. Изменение доступности генов для транскрипции может происходить вследствие изменения конформации гистоновых белков при их взаимодействии с короткими пептидами.

Результаты исследования используются в научно-исследовательской работе в АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» и ФГБУН «Институт физиологии им. И.П. Павлова» РАН.

Рекомендации для дальнейшего использования результатов, полученных в работе. Пептиды EDG и AE можно рекомендовать для исследования в качестве бронхопротекторных средств у животных при естественном и ускоренном старении. Аналогичные рекомендации можно дать по пептидам EW, KE – для иммунопротекции, AED, EDL, DW – для нефропротекции и KED, DS – для вазопротекции. Рекомендация дана на основе выявленного в работе антиапоптотического действия пептидов в культурах клеток при их старении. Для подтверждения данных моделирования рекомендуется изучение взаимодействия пептида EW с гистоном H1/3 и пептида DS с гистоном H1/6 физико-химическими методами.

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

диссертации научные работы полностью отражают основные научные результаты диссертационного исследования.

Заключение. На основании вышеизложенного, диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук Дудкова Александра Владимировича на тему: «Пептидная регуляция апоптоза клеток при их старении» может быть оценена как законченная самостоятельная научно-квалификационная работа, которая полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (в ред. Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 № 335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук, содержит решение актуальной для современной молекулярной геронтологии задачи: изучение влияния коротких пептидов на апоптоз различных типов клеток при их старении в культуре и может быть принята к защите по специальности 14.01.30 – геронтология и гериатрия (биологические науки).

В качестве официальных оппонентов предлагаются:

Хохлов Александр Николаевич, доктор биологических наук, старший научный сотрудник, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова». 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12.

Назаров Петр Григорьевич, доктор медицинских наук, профессор, ФГБУН «Институт экспериментальной медицины, 197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12.

Виноградова Ирина Анатольевна, доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», 185910, Россия, Республика Карелия, г. Петрозаводск, пр. Ленина, 33.

Предлагается направить работу Дудкова Александра Владимировича «Пептидная регуляция апоптоза клеток при старении» на отзыв Ведущего учреждения в Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук», 199034, Россия, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д.6.

Предлагается список специалистов, которым необходимо направить автореферат в дополнение к основному списку рассылки:

| | | |
|----|--|---|
| 1. | Марков Александр Георгиевич | Зав. кафедрой общей физиологии, Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Россия, Санкт-Петербург, Университетская наб. 7/9. |
| 2 | Гончарова Надежда Дмитриевна, доктор биологических наук, профессор | Зав. лабораторией эндокринологии ФГБНУ «Научно-исследовательский |

| | | |
|----|--|--|
| | | институт медицинской приматологии», 354376, Краснодарский край, г.Сочи, Адлерский р-он, с.Весёлое, ул.Мира, д.177 |
| 3 | Марьянович Александр Тимурович, доктор биологических наук, профессор | Профессор кафедры нормальной физиологии, Санкт-Петербургская государственная медицинская академия им. И.И. Мечникова, 195067, Россия, Санкт-Петербург, Пискаревский пр., д.47. |
| 4. | Ильницкий Андрей Николаевич, доктор медицинских наук, профессор | Зав. кафедрой терапии, гериатрии и антивозрастной медицины, Институт повышения квалификации ФМБА, 125371, Россия, Москва, Волоколамское шоссе, 91. |
| 5. | Авдалян Ашот Меружанович, доктор медицинских наук | Зав. лабораторией молекулярной диагностики Алтайского филиала ФГБУ «Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина» МЗ РФ, 656049, Барнаул, ул. Никитина, д.77. |
| 6. | Шишкин Александр Николаевич, доктор медицинских наук, профессор | Зав. кафедрой факультетской терапии, Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Россия, Санкт-Петербург, Университетская наб. 7/9. |
| 7. | Булгакова Светлана Викторовна, доктор медицинских наук, доцент | Зав. кафедрой гериатрии и возрастной эндокринологии, Самарский государственный медицинский университет, 443099, Россия, Самара, ул. Чапаевская, 89. |
| 8. | Воробьев Константин Владимирович, доктор биологических наук | Профессор кафедры «Медицинская физика ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский |

| | | |
|----|--|---|
| | | политехнический университет Петра Великого», 195251, Санкт-Петербург, ул. Хлопина д.11 |
| 9. | Внуков Валерий Валентинович доктор биологических наук, профессор | Зав. кафедрой биохимии, ФГАОУ ВПО «Южный федеральный университет», 344006 Ростов-на-Дону, ул. Б. Садовая, 105/42. e-mail: vvnukov@sfedu.ru |
| 10 | Кузник Борис Ильич, з.д.н. РФ, доктор медицинских наук, профессор | кафедра нормальной физиологии, Читинская государственная медицинская академия, 672000, Россия, Забайкальский край, г. Чита, ул. Горького, 39А |

Предполагаемый срок защиты:

1 ноября 2019 г.

Председатель комиссии:

з.д.н. РФ, доктор медицинских наук,
профессор



Г.А. Рыжак

Члены комиссии:

з.д.н. РФ, доктор биологических наук,
профессор

А.В. Арутюнян

доктор биологических наук

И.Г. Попович

22 июля 2019 г