

УТВЕРЖДАЮ:

Директор  
Автономной научной  
некоммерческой организации  
высшего образования Научно-  
исследовательский центр  
"Санкт-Петербургский институт  
биорегуляции и геронтологии"  
Д.н. РФ, член-корр. РАН,  
доктор медицинских наук,  
профессор



*В.Х. Хавинсон* В.Х. Хавинсон

«19» июня 2019 г.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

**Автономной научной некоммерческой организации  
высшего образования Научно-исследовательского центра  
«Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии»**

Диссертация «Пептидная регуляция апоптоза клеток при старении» выполнена в лаборатории молекулярных механизмов старения отдела биogerонтологии и в лаборатории старения и профилактической медицины отдела клинической геронтологии и гериатрии АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии».

В период подготовки диссертации соискатель Дудков Александр Владимирович работает старшим научным сотрудником в АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии», сначала - в лаборатории старения и профилактической медицины отдела клинической геронтологии и гериатрии, затем был переведен в лабораторию молекулярных механизмов старения. В 2010 г. А.В. Дудков защитил кандидатскую диссертацию по специальности 14.03.30 – геронтологии и гериатрия (биологические науки) на тему «Коррекция психоэмоционального состояния cerebroактивными пептидами у мужчин пожилого возраста».

А.В. Дудков является соискателем АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» без окончания докторантуры. Научные консультанты – заслуженный деятель науки РФ, профессор, доктор медицинских наук Кветной Игорь Моисеевич – работает руководителем отдела клеточной биологии и патологии АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» по совместительству и доцент, доктор биологических наук Линькова Наталья Сергеевна - работает руководителем лаборатории молекулярных механизмов старения АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» по совместительству.

По итогам обсуждения диссертации Дудкова Александра Владимировича «Пептидная регуляция апоптоза клеток при старении» принято следующее заключение:

Представленная диссертационная работа Дудкова Александра Владимировича состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, описания результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и указателя литературы. Текст диссертации изложен на 200 страницах и иллюстрирован 89 рисунками. Список литературы содержит 217 источников, из них на русском языке – 90, на английском – 127.

Диссертационная работа Дудкова А.В. выполнена на высоком научном уровне с использованием современных экспериментальных методов и является новой концепцией пептидной регуляции клеточного старения.

Все результаты, представленные в диссертации, получены при непосредственном участии автора.

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

**Актуальность.** 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 снижается иммунная функция организма, повышается

частота развития хронической почечной недостаточности. Все эти ассоциированные с возрастом заболевания существенно снижают качество жизни лиц пожилого и старческого возраста.

На молекулярно-клеточном уровне нарушения функций сердечно-сосудистой, дыхательной, иммунной и выделительной систем могут проявляться в изменении экспрессии ряда сигнальных молекул и транскрипционных факторов, участвующих в дифференцировке, пролиферации и апоптозе. 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 p16, p21, p53. Эти белки являются ингибиторами цикли-зависимых протеинкиназ, экспрессия которых тормозит клеточный рост и повышается при старении организма. Кроме того, в механизмах рецепторного апоптоза важную роль играют каспазы 8 и 9. 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 и DS – вазопротекторы, EDG и AE – бронхопротекторы, EW и KE – иммунопротекторы, AED, EDL и DW – нефропротекторы. Ранее были продемонстрированы вазопротекторные свойства пептида KED, заключающиеся в коррекции метаболического сосудистого синдрома и заболеваний, сопровождающихся нарушением проницаемости сосудистой стенки и ломкостью капилляров. 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.

**Научная новизна.** 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 фибробластах 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, оцениваемый 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.

**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.

**Достоверность полученных результатов** подтверждается корректной, общепринятой статистической обработкой результатов экспериментальных измерений, а также положительными результатами практического использования данных, представленных в настоящем диссертационном исследовании.

**Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем**

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

журналах, 31 тезисы докладов. Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:

1. Влияние аминокислот на экспрессию сигнальных молекул в органотипической культуре селезенки / Е.А. Концевая, Н.С. Линькова, Н.И. Чалисова, А.В. Дудков, Д.А. Синячкин // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2012. – № 2. – С. 102-105.
2. Влияние коротких пептидов на экспрессию сигнальных молекул в органотипической культуре клеток эпифиза / В.Х. Хавинсон, Н.С. Линькова, Н.И. Чалисова, А.В. Дудков, Е.А. Концевая // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2011. – № 3. – С. 151-154.
3. Влияние полипептидов на пролиферацию и апоптоз клеток при старении / А.П. Рыжак, Н.И. Чалисова, Н.С. Линькова, Т.Е. Ничик, А.В. Дудков, Н.В. Колчина, Г.А. Рыжак, Р.И. Халимов // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2016. – № 4. – С. 221-225.
4. Влияние трипептида на физиологическую активность клеток нейроиммуноэндокринной системы / Н.И. Чалисова, Н.Г. Лопатина, Н.Г. Камышев, Н.С. Линькова, Е.А. Концевая, А.В. Дудков, Л.С. Козина, В.Х. Хавинсон // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2012. – № 2. – С. 98-101.
5. Возрастная динамика дифференцировки иммунных клеток тимуса человека / В.Х. Хавинсон, Н.С. Линькова, В.О. Полякова, А.В. Дудков, И.М. Кветной // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – Т. 151. – № 5. – С. 569-572.
6. Дудков А.В. Пептидная регуляция каспаза-зависимого апоптоза при клеточном старении / А.В. Дудков // Современные проблемы науки и образования. – 2019. – №2. – С. 1-11. URL: <http://www.science-education.ru/article/view?id=28701>.
7. Компенсаторное действие пептидов эпифиза на органы иммунной и эндокринной системы у эпифизэктомированных крыс / Н.С. Линькова, В.Х. Хавинсон, А.В. Трофимов, А.В. Дудков // Научные ведомости БелГУ. Серия Медицина. Фармация. – 2011. – Вып. 13/1. – № 4 (99). – С. 86-90.
8. *Линькова Н.С.* Пептиды эпифиза и коры головного мозга стимулируют дифференцировку полипотентной эмбриональной ткани / Н.С. Линькова, А.В. Трофимов, А.В. Дудков // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2011. – № 2. – С. 97-98.
9. Молекулярные аспекты патологии почек / Т.Е. Ничик, Н.С. Линькова, Н.А. Красковская, А.В. Дудков, В.Х. Хавинсон // Успехи физиологических наук. – 2014. – Т. 45. – №1. – С. 95-102.
10. Молекулярные маркеры каспаза-зависимого и митохондриального апоптоза: роль в развитии патологии и процессах клеточного старения / А.С. Дятлова, А.В. Дудков, Н.С. Линькова, В.Х. Хавинсон // Успехи современной биологии – 2018. – Т. 138, №2. – С. 126-137.
11. Пептид эпифиза восстанавливает функциональную активность поджелудочной железы при индуцированном сахарном диабете / В.Х. Хавинсон, Н.С. Линькова, А.В. Трофимов, А.В. Дудков // Научные ведомости БелГУ. Серия Медицина. Фармация. – 2011. – Вып. 13/1. – № 4 (99). – С. 81-85.
12. Пептидергическая регуляция экспрессии генов, кодирующих антиоксидантные и противовоспалительные белки / В.Х. Хавинсон, Н.С. Линькова, А.В. Дудков,

- В.О. Полякова, И.М. Кветной // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – Т. 152. – № 11. – С. 548-551.
13. Пептидная регуляция процессов клеточного обновления в культурах тканей почек молодых и старых животных / Н.И. Чалисова, Н.С. Линькова, Т.Е. Ничик, А.П. Рыжак, А.В. Дудков, Г.А. Рыжак // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2015. – № 1. – С. 10-14.
  14. Сравнительное влияние пептидов KE и EW на рост нормальных и опухолевых клеток / Н.С. Линькова, Е.С. Миронова, О.М. Ивко, О.А. Орлова, А.В. Дудков // Медицинский академический журнал. 2019. Специальный выпуск. С. 174-176.
  15. Тетрапептид стимулирует функциональную активность клеток поджелудочной железы при старении / В.Х. Хавинсон, Н.Н. Севостьянова, А.О. Дурнова, Н.С. Линькова, С.И. Тарновская, А.В. Дудков, Т.В. Кветная // Успехи геронтологии. – 2012. – Т. 25. – № 4. – С. 680-684.
  16. Экспрессия коллагена I типа, сиртуина-6 и матриксной металлопротеиназы-1 в фибробластах кожи человека в процессе длительного культивирования / Н.В. Фридман, Н.С. Линькова, В.О. Полякова, А.О. Дробинцева, С.В. Трофимова, А.В. Дудков, В.Х. Хавинсон, И.М. Кветной // Морфология. – 2018. – Т. 153, №1. – С. 39-44.

**Апробация работы.** Результаты диссертационного исследования доложены на всероссийской молодёжной конференции-школе «Нейробиология интегративных функций мозга» (Санкт-Петербург, 2011); конференции «Пушковские чтения» (Санкт-Петербург, 2011, 2014, 2018); научном форуме «Наука и общество» (Санкт-Петербург, 2011); XVI Российском национальном конгрессе «Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2011); Международном форуме «Старшее поколение» (Санкт-Петербург, 2011, 2013, 2018); XVI Международной Научно-практической конференции «Пожилой больной. Качество жизни» (Москва, 2011); международной научной конференции «Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской приматологии» (Сочи-Адлер, 2011); 12th International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins (Beijing, China, 2011); Quantitative imaging and spectroscopy in neuroscience (SPb-Koltushi, 2012); конференции «генетика старения и долголетия» (Москва, 2012); III съезде геронтологов и гериатров (Новосибирск, 2012); конференции с международным участием «Здоровье – основа человеческого потенциала» (Санкт-Петербург, 2013); VI Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Санкт-Петербург, 2013); конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2013); конференции «Актуальные проблемы геронтологии и гериатрии: от теории к практике» (Киев, 2013); конференции «Медицинские проблемы пожилых» (Казань, 2013); конференции «Современные аспекты геронтологии и гериатрии: от теории к практике» (Киев, 2014); конференции с международным участием «Организация оказания медицинской помощи лицам пожилого и старческого возраста» (Уфа, 2016); научно-практической конференции «Инновационные российские технологии в геронтологии и гериатрии 2017» (Санкт-Петербург, 2017); XXIII съезде физиологического общества им. И.П. Павлова (Воронеж, 2017); конференции «Актуальные

вопросы медицины» (Азербайджан, Баку, 2017); International Simposium of Experts “Effective current approaches in anti-aging medicine and gerontology” (Stockholm, Sweden, 2018).

**Соответствие диссертации специальности.**

По актуальности, новизне, научной и практической значимости, объему исследований, глубине анализа и обобщения материала диссертационная работа Дудкова Александра Владимировича полностью соответствует требованиям п. 9 и п. 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней...» утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в ред. Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 № 335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 14.01.30 – геронтология и гериатрия.

Диссертация «Пептидная регуляция апоптоза клеток при старении» Дудкова Александра Владимировича рекомендуется к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 14.01.30 – геронтология и гериатрия.

Заключение принято на заседании Проблемной комиссии АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии». Присутствовало на заседании - 13 чел. Результаты голосования: «за» - 13 чел., «против» - 0 чел., «воздержалось» - 0 чел., протокол №1 от «20» марта 2019 г.

Председатель Проблемной комиссии  
АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт  
биорегуляции и геронтологии»  
засл. деят. науки РФ, д.м.н., профессор



А. Рыжак

Ответственный секретарь Проблемной комиссии  
АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт  
биорегуляции и геронтологии»  
доктор биол. наук, профессор



Т.В. Кветная