

УДК 577.2.

## ГЕРОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА БЕЛКА GDF11

© 2015 г. В. Х. Хавинсон<sup>1,2,4</sup>, Б. И. Кузник<sup>3</sup>, С. И. Тарновская<sup>2</sup>, Н. С. Линькова<sup>1,2,5</sup>

<sup>1</sup>Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии

<sup>3</sup>Читинская государственная медицинская академия

<sup>4</sup>Северо-Западный государственный медицинский университет  
им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург

<sup>5</sup>Санкт-Петербургский государственный политехнический университет Петра Великого  
E-mail: linkova@gerontology.ru

Белок GDF11, дифференцировочный фактор роста 11 (growth differentiation factor-11), относящийся к суперсемейству TGF- $\beta$  трансформирующего фактора роста  $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ), обладает выраженным геропротекторным действием в отношении сердечно-сосудистой и нервной систем. Кардио- и миопротекторное действие белка GDF11 связано с регуляцией ряда сигнальных молекул, в том числе каскада MAPK – p38 – миоглианин. Нейропротекторное действие протеина GDF11 выражается в регуляции пролиферации и дифференцировки нейронов головного мозга путем изменения активности транскрипционных факторов p57 (Kip2) и p27 (Kip1). Белок GDF11 может рассматриваться как потенциальная мишень действия геропротекторных лекарственных средств, что показано на примере пептида Glu-Asp-Arg, обладающего нейро- и миопротекторными свойствами, сходными с GDF11. Для пептидов Glu-Asp-Arg, Ala-Glu-Asp-Gly, Lys-Glu найдены сайты связывания с соответствующими последовательностями CCTGC, ATTTC, GCAG в промоторной зоне гена *GDF11*.

*Ключевые слова:* дифференцировочный фактор роста 11, пептид Glu-Asp-Arg, геропротектор, нейропротектор, кардиопротектор.

Известно, что в прошлом спортсменам перед ответственными соревнованиями нередко вливали собственную заранее заготовленную кровь. При этом положительное действие такой процедуры в основном объясняется увеличением общей массы циркулирующей крови, и следовательно лучшим снабжением тканей кислородом. Но так ли это на самом деле? Увеличение общей массы циркулирующей крови создает дополнительную нагрузку на сердце, тогда как у спортсменов она и так очень велика. Более того, при интенсивной физической нагрузке кривая диссоциации оксигемоглобина сдвигается вправо и вниз с увеличением артерио-венозной разницы, но при этом не происходит полной отдачи кислорода кровью. Следовательно, при интенсивной физической нагрузке в венозной крови остается достаточно высокое резервное содержание кислорода (Колчинская, 1991). За 10 дней до соревнований у спортсмена берут до 400 мл крови и консервируют ее. Кровопускание вызывает не только легкую кислородную недостаточность, но и активацию пролиферации клеток крови. Кроме того, повышается активность симпатической

нервной системы, ретикуло-эндотелиальной и иммунной систем. При хранении крови в течение 10 сут в ней образуются биологически активные вещества. Вливание такой крови в день соревнований повышает результативность спортивных выступлений. К тому же вместе с переливанием крови возможно введение некоторых витаминов, энергизаторов, антигипоксантов и других биологически активных веществ (Pottgiesser et al., 2011).

Помимо аэробных циклических видов спорта, аутогемотрансфузия, как эффективный способ повышения устойчивости организма к недостатку кислорода, может быть использована для покорения горных вершин, в глубоководном нырянии, т.е. везде, где требуется такая устойчивость (Pottgiesser et al., 2011).

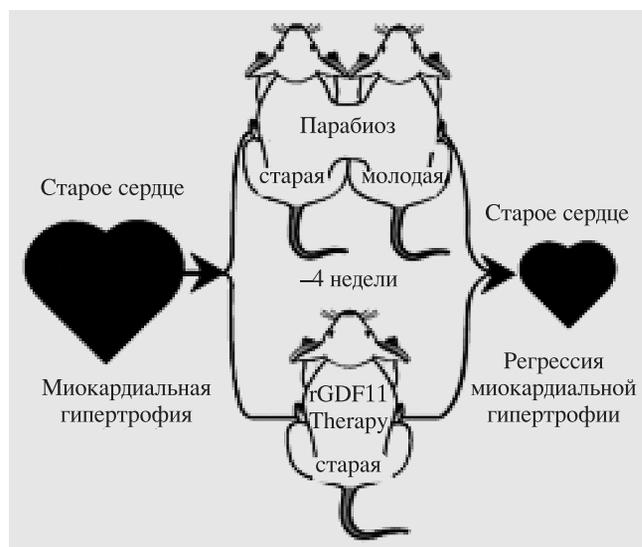
Вспомним трагическую историю проф. А.А. Богданова – создателя Института гематологии и переливания крови. Он предположил, что переливание крови пожилым людям от молодых может привести к их значительному омоложению. К тому времени были открыты четыре группы

крови и установлены законы их совместимости. Будучи уже пожилым человеком, А.А. Богданов решил поставить эксперимент на себе. С 1924 по 1928 г. он провел себе 11 переливаний крови, пять из которых были объемом по 900 мл. Переносил он эти операции без каких-либо реакций и отмечал вполне удовлетворительный эффект. К сожалению, в то время многие антигены, содержащиеся в эритроцитах, в том числе и резус-фактор, не были известны, а без их учета множественные переливания крови были небезопасны. Очередное переливание крови оказалось для Александра Александровича роковым (Донсков, Ягодинский, 2006).

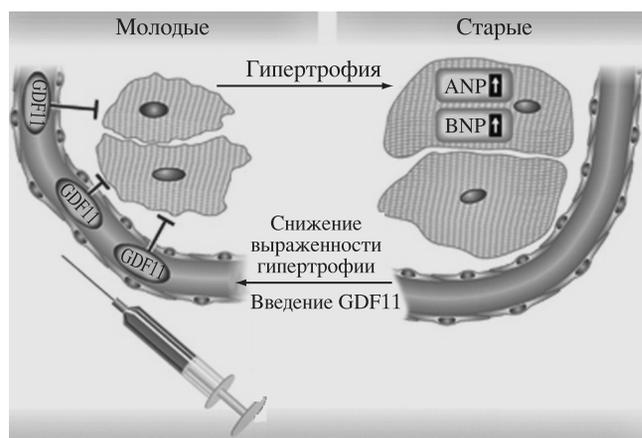
При применении гетерохронического парабиоза для исследования воздействия крови молодых мышей на старых (Loffredo et al., 2013), страдающих кардиальной гипертрофией (рис. 1), через четыре недели от начала эксперимента у старых мышей наблюдался регресс заболевания. При этом отмечалось уменьшение размеров кардиомиоцитов и увеличение их поперечной исчерченности. Снижение возрастной гипертрофии не было связано с полом животных, улучшением гемодинамики или наличием парабиоза. Речь шла о переносе с кровью молодых мышей неизвестного фактора (рис. 1).

Дальнейшие исследования показали, что циркулирующим соединением в крови молодых мышей является GDF11 (growth differentiation factor-11), относящийся к суперсемейству трансформирующего фактора роста  $\beta$  – TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ), содержание которого с возрастом уменьшается. Введение старым мышам крови молодых восстанавливало содержание GDF11, за счет чего полностью ликвидировалась возрастная гипертрофия сердца. При этом происходило удлинение диастолы, чему способствовало расслабление кардиомиоцитов. Аналогичные результаты получены при интерперитонеальных инъекциях старым мышам рекомбинантного белка GDF11. Таким образом, GDF11 может быть использован с терапевтической целью при гипертрофии сердца у пожилых людей (Loffredo et al., 2013).

При исследовании молекулярного механизма кардиальной гипертрофии установлено, что в возникновении этой патологии участвуют мозговой (BNP) и атривентрикулярный (ANP) натрий-уретические пептиды. Исходя из этих данных, была предложена схема (Brack, 2013), объясняющая кардиопротекторное действие GDF11 при кардиальной гипертрофии. При блокировании синтеза белка GDF11 происходит гипертрофия клеток, что способствует их ускоренному старе-



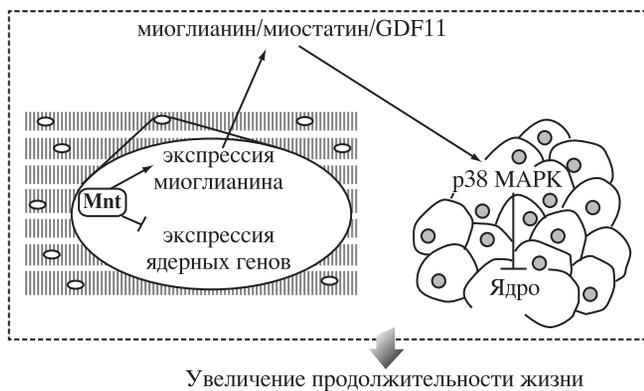
**Рис. 1.** Регрессия миокардиальной гипертрофии при гетерогенном парабиозе у мышей (с модификациями по Loffredo et al., 2013).



**Рис. 2.** Предполагаемый механизм кардиопротекторного действия GDF11 при миокардиальной гипертрофии (с модификациями по Brack, 2013).

нию (верхняя стрелка на рис. 2). При введении белка GDF11 в случае гипертрофических изменений наблюдается восстановление структуры и функции клеток.

Наиболее выраженная экспрессия GDF11 выявлена в тканях селезенки (Loffredo et al., 2013) и во вставочных дисках сердца у старых мышей. В связи с этим возникают вопросы, действительно ли селезенка является источником GDF11, и почему этот фактор, содержащийся в сердце, не способен защитить его от гипертрофии (Brack, 2013). Их разрешение, будучи важным в теоретическом плане, открывает новые перспективы в разработке методов терапии возрастной гипертрофии сердца.



**Рис. 3.** Влияние фактора транскрипции Mnt и белка GDF11 на функциональную активность мышцы (с модификациями по Demontis et al., 2014). Справа – адипоциты, слева – мышечное волокно.

В работах сотрудников Оксфордского и Гарвардского университетов переливание крови от молодых мышей старым и создание гетерохронического парабиоза (объединение систем кровообращения молодых и старых животных) повышало двигательную активность и когнитивные функции при старении организма. Переливание крови от одних старых мышей другим не вызывало положительного эффекта (Villeda et al., 2014). Обнаруженный феномен был связан с переносом из крови молодых мышей к старым белка GDF11, содержание которого с возрастом уменьшается.

### ВЛИЯНИЕ БЕЛКА GDF11 НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ СЕРДЕЧНОЙ И СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ ПРИ СТАРЕНИИ ОРГАНИЗМА

Протеин GDF11 был открыт 20 лет назад. К настоящему времени получен его рекомбинантный аналог rGDF11 – дисульфидно-связанный гомодимер, молекулярная масса которого равна 25 кДа, а каждая из цепей включает 109 аминокислотных остатков. rGDF11 оказывает такое же геропротекторное действие, как и переливание крови от молодых животных старым (Sinha et al., 2014).

При введении старым мышам rGDF11 наблюдался не только геропротекторный эффект, но и усиление функциональной активности скелетной мускулатуры (Sinha et al., 2014). Одновременно у старых мышей улучшались структурные и функциональные качественные характеристики мышцы и возрастала их прочность. На функциональном уровне старые мыши, получающие rGDF11, проявляли большую выносливость при физической нагрузке, легче переносили большие дозы

лактата и гриппозную инфекцию. Под влиянием rGDF11 значительно улучшались регенеративные процессы в мышечной ткани.

Исследования *in vitro* во многом помогли понять, с чем связаны эти изменения. Под влиянием rGDF11 в культуре мышечных клеток старых мышей возрастало количество митохондрий и формировались многоядерные мышечные волокна, составляющие синцитий из миобластов. Предполагается, что rGDF11 не только стимулировал митохондриальный ответ, но и способствовал удалению поврежденных митохондрий из волокон мышцы старых мышей (Bitto, Kaeberlein, 2014; Sinha et al., 2014).

Каков же механизм восстановления физиологической активности скелетных и сердечной мышц при их старении под влиянием белка GDF11?

Известно, что скелетная мышца является источником цитокинов (миокинов), синтез которых при старении снижается. Опыты на дрозофилах показали, что при гиперэкспрессии Mnt, фактора транскрипции мышечной ткани, увеличивается продолжительность жизни. Гиперэкспрессия Mnt в мышце уменьшает экспрессию ядрышковых компонентов и снижает уровень рНК и размеры ядрышка в адипоцитах. Этот процесс происходит при участии миоглианина, миостатина и GDF11 (рис. 3). Белок миоглианин, синтезируемый миоцитами, способен связываться с миостатином и GDF11 и влиять на экспрессию транскрипционного фактора p38 в адипоцитах.

Чрезмерная экспрессия миоглианина в мышце увеличивает продолжительность жизни и уменьшает размер ядрышек в адипоцитах. При этом стимулированная митогеном протеинкиназа MAPK активирует белок p38, тогда как миоглианин в мышце вызывает противоположный эффект. Предполагается, что в пути интеграции сигнальных событий в мышце и других тканях при старении ключевая роль принадлежит миоглианину (Demontis et al., 2014).

В регуляции массы мышцы участвуют рецепторы миостатина и активина – ActRII. GDF11 и активины оказывают воздействие на скелетные мышцы через эти рецепторы (Lach-Trifilieff et al., 2014). В работе Лак-Трифилев и соавт. (Lach-Trifilieff et al., 2014) с помощью антител bimagrumab или ВУМ338 блокировали ActRII и таким образом ингибировали передачу сигналов к органам-мишеням. ВУМ338 индуцировал дифференцировку первичных человеческих скелетных миобластов и противодействовал торможению дифференцировки, вызванной миостатином или активином А. Кроме того, ВУМ338 предотвращает

щел атрофию, спровоцированную ActRII, через торможение фосфорилирования Smad2/3 и препятствовал деградации тяжелой цепи миозина. ВУМ338 увеличивал массу скелетной мышцы у мышей. Введение мышинных антител к ActRII сопровождалось гипертрофией мышц у миостатин-мутантных мышей. ВУМ338 защищал мышцы от атрофии при введении глюкокортикоидов и предупреждал развитие мышечной слабости. Таким образом, ВУМ338 может быть использован для лечения заболеваний, сопровождающихся атрофией скелетных мышц.

Ингибитор членов семейства TGF- $\beta$  – фоллистатин – экспрессируется на производных миосферы клетках-предшественниках MDPCs (myosphere-derived progenitor cells), которые могут дать начало кардиомиоцитам (Nomura et al., 2008). В то же время миостатин был главным образом представлен в миогенных клетках и зрелой скелетной мышце. Под его влиянием увеличивался репликационный рост MDPCs через инактивацию Smad 2/3 и прогрессию клеточного цикла. Ингибирование актина А или GDF11 индуцировало пролиферацию MDPC через торможение p21 и повышение уровня Cdk 2/4 и циклина D1.

Представленные данные свидетельствуют о том, что фоллистатин, нейтрализуя ActA и GDF11, приводит к увеличению числа клеток-предшественников и тем самым регулирует рост MDPCs в скелетной мышце.

Известно, что старение многоклеточных организмов сопровождается нарушениями репарации, влияющими на кроветворение. Вместе с тем в модели гетеропарабиоза у старых мышей процесс кроветворения улучшается, тогда как у молодых животных отмечается противоположный эффект (Villeda et al., 2011). В то же время у мышей линии 536, страдающих миелодиспластическим синдромом (MDS) и анемией, нарушение процессов кроветворения в заключительной стадии связано с ингибированием передачи сигнала Smad2/3 и низким содержанием GDF11. При этом анемия у таких мышей не ликвидируется введением эритропоэтина, тогда как инъекции (trapping fusion) белка ACE 536 полностью справились с анемией путем восстановления сигнала Smad2/3 для GDF11 (Suragani et al., 2014).

Доказано, что цитокин GDF11 блокирует у больших  $\beta$ -талассемией окончательное созревание эритроцитов на стадии эритробластов и вызывает их преждевременный апоптоз. Эта реакция осуществляется через аутокринную петлю усиления, создающую оксидативный стресс и преципитацию  $\alpha$ -глобина. Экспрессия GDF11 в эрит-

робластах селезенки у талассемических мышей и в сыворотке крови пациентов с  $\beta$ -талассемией повышалась. Инактивация GDF11 уменьшала оксидативный стресс и преципитацию мембранного  $\alpha$ -глобина, что сопровождалось усилением эритропоэза (Dussiot et al., 2014).

### НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА БЕЛКА GDF11

Установлено, что после трехнедельного курса “парабиотической терапии” старые мыши стали гораздо успешнее обучаться и запоминать информацию. Инъекции крови трехмесячных мышей омолаживают мозг старых особей на уровне нейронов, повышая их функциональную активность, и одновременно увеличивают содержание биохимических “маркеров молодости”. При этом у старых мышей значительно улучшалась долговременная память; одновременно возростала познавательная деятельность (животные быстрее находили платформу в водном лабиринте) и уменьшалось чувство страха. Структурные изменения и познавательные процессы под влиянием “молодой” крови и плазмы частично обусловлены активацией циклического аденозинмонофосфата (сАМР) и сАМР-элемент-связывающим белком (CREB) в гиппокампе. Следовательно, под воздействием “молодой” крови и плазмы у старых мышей происходит повышение синаптической пластичности и познавательной активности. Таким образом, нейродегенеративные процессы в мозге старых мышей обратимы и могут быть компенсированы с помощью GDF11 (Andersen, Lim, 2014).

Парабиоз между молодыми и старыми животными приводит к изменениям в различных структурах нервной системы пожилых мышей: нейроны быстрее образуют дендритные шипики, которые усиленно растут при обучении животных, и ассоциированы с развитием памяти; в гиппокампе, ответственном за долговременную память, также наблюдается образование новых связей между нейронами (Villeda et al., 2014). Факторы, способствующие развитию сосудистой сети в мозге у молодых животных, у старых мышей индуцируют дифференцировку нейронов и способствуют улучшению обоняния. Введение GDF11 старым мышам, как и крови молодых мышей, способствует увеличению сосудистой сети в центральной нервной системе с одновременным развитием нейронов. Таким образом, подавление возрастной неврогенной деградации под влиянием GDF11 является основанием для разработки новых методов терапии нейродегенеративных и нервно-сосуди-

стных заболеваний у пожилых людей (Katsimpardi et al., 2014). Не исключено, что лечением болезни Альцгеймера в будущем могла бы стать комбинация терапевтических воздействий с помощью антител на амилоидный пептид  $\beta$  и усиления экспрессии гена, кодирующего синтез GDF11. По всей видимости, такой терапевтический подход к лечению болезни Альцгеймера вполне обоснован, так как при данной патологии содержание GDF11 значительно снижено (Sinha et al., 2014).

В исследованиях на эмбрионных мышках фенотипа GDF11 ( $-/-$ ) установлено, что дифференцировка нейронов в спинном мозге на стадии предшественников без GDF11 происходит медленнее, чем в норме (Shi, Liu, 2011), а в мозге мышей GDF11 ( $-/-$ ) наблюдается задержка развития глиальных клеток. Пролиферация нейронов у таких мышей усиливается в период пика экспрессии GDF11. Аналогичные изменения в свойствах предшественников нейронов могут быть вызваны *in vitro* внесением GDF11 в культуру клеток. Обнаруженные свойства GDF11 в клетках-предшественниках нейронов связаны со способностью индуцировать экспрессию p57 (Kip2) и p27 (Kip1) (Shi, Liu, 2011).

В настоящее время исследователи пытаются объяснить механизмы, благодаря которым факторы “молодой” крови, включая GDF11, вызывают геропротекторные эффекты у старых мышей. Из представленных данных литературы можно сделать вывод о том, что белок GDF11 обладает свойствами нейропротектора, а также активирует функции скелетной и сердечной мышц. Однако значительное улучшение познавательных процессов, вызванное GDF11, по-видимому, в большей степени обусловлено восстановлением синаптической пластичности, чем усиленным развитием нервных клеток.

Белок GDF11 в течение нескольких часов после введения способен изменять экспрессию около 4700 генов транскриптов. В частности, GDF11 регулирует экспрессию генов клеточного цикла. Кроме того, GDF11 ингибирует экспрессию генов, связанных с цитоскелетным регулированием, включая фасцин и LIM, а также белок области SH3 1 (LASP1) (Williams et al., 2013).

GDF11 регулирует генез обонятельных рецепторных нейронов, ингибируя пролиферацию непосредственных нейронных предшественников (INPs), дающих начало этим клеткам (Gokoffski et al., 2011; Sinha et al., 2014; Wu et al., 2003). Сигналы от нейронов-предшественников препятствуют генерации новых нейронов в обонятельном эпителии. GDF11 и его рецепторы экспрессируются

в большом количестве в обонятельных клетках. В опытах *in vitro* GDF11 подавляет нейрогенез в обонятельных клетках, ингибируя p27 (Kip1). У мышей, испытывающих недостаток GDF11, в обонятельном эпителии значительно больше клеток-предшественников и нейронов, тогда как у мышей с дефицитом фоллистатина, антагониста GDF11, задерживается развитие нервных клеток (Wu et al., 2003). Высказывается предположение, что GDF11 является регулятором состава клеток в ретинальном ганглии (Kim et al., 2005). При моделировании парабиоза у старых мышей не только развивается сосудистая сеть мозга, но и активизируется пролиферация невральные исходных клеток, а также увеличивается развитие обонятельных клеток, что приводит к улучшению нюха (Katsimpardi et al., 2014).

Известно, что Foxg1 (транскрипционный фактор семейства Winged Helix) способствует развитию предшествующих невральным структурам. У мышей, испытывающих недостаток Foxg1, нарушается развитие больших полушарий головного мозга и обонятельного эпителия. Предполагалось, что это влияние может быть связано с увеличением экспрессии GDF11, действующего по механизму обратной связи на развитие нервных структур и обонятельного эпителия. Однако у мышей Foxg1 ( $-/-$ ) дефекты в развитии полушарий головного мозга и обонятельного эпителия не сопровождается повышенной экспрессией GDF11. Следовательно, GDF11 не является основным фактором, причастным к нарушениям в деятельности нервной системы и обонятельного эпителия, которые наблюдаются у дефицитных по Foxg1 мышей (Kawauchi et al., 2009).

У мышей, дефектных по фоллистатину Fst ( $-/-$ ), нарушение развития нервных клеток может быть лишь частично объясняется повышенной активностью GDF11 (Gokoffski et al., 2011). GDF11, ActA и Fst являются основными факторами, определяющими развитие нейронных и глиальных клеток, в том числе рецепторного аппарата обонятельного эпителия.

#### *Влияние белка GDF11 на активацию полипотентных клеток*

В исследованиях, выполненных под руководством проф. Гарвардского университета Эми Вагерс (Sinha et al., 2014), показано, что белок GDF11 способен индуцировать функциональную активность полипотентных клеток при старении организма. После переливания крови старым мышам от молодых полипотентные клетки

дифференцировались в миоидном направлении, активируя не только работу мышц, включая сердечную, но и функции других органов. При этом отмечалось повышение синтеза GDF11 – “белка молодости”.

Установлено, что у женщин с дисменореей, наряду с увеличением уровня провоспалительных цитокинов (IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL6, и IL8), отмечалось уменьшение концентрации факторов семейства TGF- $\beta$ , в том числе GDF11. В секреторную фазу менструального цикла также проявлялось увеличение уровня провоспалительных цитокинов и снижение факторов роста, однако эти сдвиги были менее выражены. Перечисленные факторы играют значительную роль в децидуальной перестройке оболочки матки, а также в процессах репарации и косвенно усиливают первичную дисменорею.

Из анализа представленных данных можно сделать вывод о том, что разнообразные геропротекторные эффекты белка GDF11 связаны с воздействием на геном, распространяющий свои функции на пролиферативные клетки. Возникает вопрос, нельзя ли эпигенетически регулировать содержание GDF11 в крови животных и человека. Отвечая на этот вопрос, Лавиано (Laviano, 2014) указывает, что применение белка GDF11 у пациентов с болезнью Альцгеймера может индуцировать нейрональную дифференцировку и модулировать синаптическую пластичность клеток. У пациентов с кахексией и атрофией мышечной ткани, вызванной онкологическими заболеваниями, под влиянием белка GDF11 может восстанавливаться масса и функциональная активность мышечной ткани.

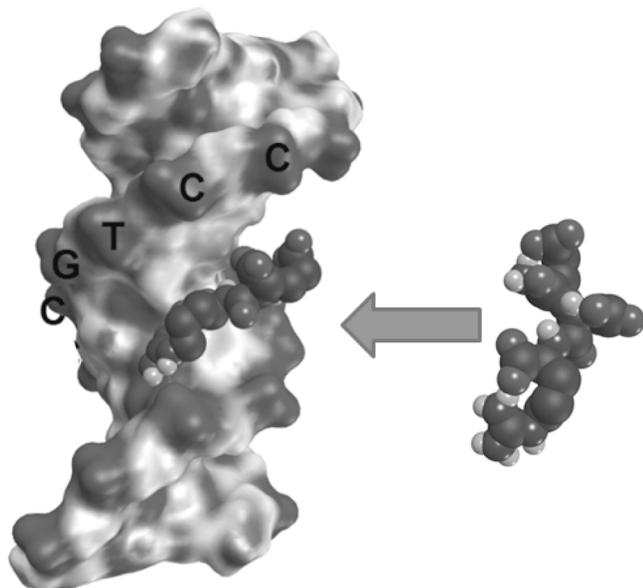
#### *Перспективные направления изучения геропротекторных свойств белка GDF11*

Несмотря на приведенные данные, механизм геропротекторного действия GDF11 изучен недостаточно полно (Demontis et al., 2014). Предполагается, что GDF11 – эволюционно сформировавшийся регулятор старения ткани. Геропротекторные эффекты, вызванные GDF11, могут быть связаны с каскадом ядерных белков p38 и MAPK, активирующих миостатин у млекопитающих и миоглинин у дрозофилы. Следовательно, GDF11 и миостатин, активизируя p38-MAPK-каскад, и регулируя функцию ядрышка, могут не только предотвратить сердечную гипертрофию, но и старение других тканей. Однако у мышей миостатин содержится прежде всего в скелетной мышце, в то время как GDF11 широко экспрессируется самыми различными тканями. И хотя в

селезенке отмечается самая высокая экспрессия GDF11, скелетная мышца является самой распространенной тканью в организме, составляющей приблизительно 40–50% всей массы тела. Отсюда одним из перспективных направлений является изучение вопроса о том, может ли экспрессия GDF11 в мышце быть отрегулирована фактором транскрипции Mnt, как это отмечается для миоглинина у дрозофилы.

Кроме того, важным представляется поиск эпигенетических механизмов регуляции экспрессии гена, кодирующего белок GDF11. Известно, что синтезированные на основе изучения аминокислотного состава полипептидных комплексов тимуса и пинеальной железы пептиды Lys-Glu и Ala-Glu-Asp-Gly являются эпигенетическими регуляторами экспрессии провоспалительных цитокинов, а также белка-маркера клеточного старения – хемокина CCL11 (Хавинсон и др. 2014). Эти короткие пептиды увеличивают продолжительность и качество жизни животных и длину теломера в культуре клеток (Anisimov, Khavinson, 2010; Khavinson et al., 2013). Для пептидов Lys-Glu и Ala-Glu-Asp-Gly были найдены сайты связывания с ДНК в промоторных зонах различных сигнальных молекул – GCAG и ATTTTC/G, соответственно.

Короткий пептид пинеалон, повышающий физическую и умственную работоспособность, т.е. обладающий эффектами, сходными с молекулой GDF11, имеет структуру Glu-Asp-Arg (Khavinson, Grigoriev, 2008). В клиническом исследовании пациенты с последствиями черепно-мозговой травмы и церебральной (72 чел. в возрасте 30–74 лет) дополнительно к стандартной терапии перорально ежедневно получали пинеалон по две капсулы 2 раза в день в течение 20–30 дн. (в капсуле – 0.1 мг активного вещества). Контрольную группу составили 37 чел. с аналогичным заболеванием, которым было назначено только общепринятое лечение. После применения пинеалона пациенты отмечали улучшение памяти, снижение длительности и интенсивности головных болей и появление эмоциональной уравновешенности. У пациентов с последствиями черепно-мозговой травмы после перорального применения трипептида наблюдался регресс очаговой симптоматики и улучшение речевой функции при моторной и сенсорной афазии. У пациентов с церебральной под влиянием перорального приема пинеалона уменьшалось количество ошибок при выполнении корректурной работы, и повышался интегральный показатель работоспособности (Морозов и др., 2011). Пероральное ежедневное применение пинеалона (две



**Рис. 4.** Трехмерная модель ДНК-пептидного комплекса и сайт связывания для пептида Glu-Asp-Arg. (В.Х. Хавинсон и др., 2014). Слева: молекула ДНК, где светло-серый цвет – области, заряженные положительно; темно-серый – отрицательно. Справа: молекула пептида, где светло-серый цвет – полярные атомы водорода; темно-серый цвет – атомы углерода и азота.

капсулы в день в течение двух недель) у спортсменов способствовало нормализации функций антиоксидантной системы, повышению уровня адаптации к физическим нагрузкам, тренированности организма и энергетического обмена. Повышение уровня энергетического обеспечения мышечной ткани под действием пинеалона коррелировало с увеличением экспрессии генов *PPARA* и *PPARG*, кодирующих белки, увеличивающие окислительную способность скелетных мышц. При этом пептидная регуляция адаптивных возможностей организма сопровождалась повышением экспрессии гена белка теплового шока HSPA1A. Следует отметить, что на фоне приема пинеалона у спортсменов наблюдалось снижение частоты возникновения острых респираторных заболеваний, что подтверждено данными исследования иммунного статуса. У спортсменов были отмечены также увеличение экспрессии маркеров активации иммунных клеток (CD71, CD25, HLA-DR) и нормализация содержания иммуноглобулинов класса М, G и E (Хавинсон и др., 2012). Пинеалон ежедневно перорально применяли у 75 пожилых людей (две капсулы в день в течение двух недель) для коррекции психоэмоционального и функционального состояния ЦНС (Балашова и др., 2008). После применения пинеалона у пациентов отмечалось повышение кратковременной и долго-

временной памяти и снижение индекса тяжести состояния.

В модели экспериментальной пренатальной гипергомоцистеинемии у крыс изучалось влияние пептида Glu-Asp-Arg на функциональную активность ЦНС. Известно, что индукция окислительного стресса *in vivo* сопряжена с повышением уровня содержания гомоцистеина в крови животных, снижением когнитивных способностей и нарушениями глутаматергической системы мозга. Внутримышечное введение пептида Glu-Asp-Arg крысам способствовало улучшению пространственной ориентации и обучаемости потомства при проведении теста “водный лабиринт Морриса”. Можно полагать, что защитное действие трипептида выражается в том, чтобы препятствовать накоплению АФК в нейронах, тем самым повышая их устойчивость к окислительному стрессу, и предотвращать взаимодействие гомоцистеина и его производных с рецепторами глутамата (Arutjunyan et al., 2012). В культуре гранулярных клеток мозжечка оценивали влияние пептида Glu-Asp-Arg на активацию MAP-киназы, временный профиль которой определяет экспрессию генов адаптации или генов апоптоза. При добавлении в культуру клеток трипептида лаг-период активации MAP-киназы удлиняется, что можно рассматривать как защитный эффект от токсического действия гомоцистеина. Затем было изучено влияние трипептида на окислительный стресс, вызываемый в нейронах убаином или пероксидом водорода. Пинеалон вызывал достоверное снижение уровня АФК в нейронах (Khavinson et al., 2011).

Возникает предположение, что аналогично указанным дипептиду и тетрапептиду нейропротекторный пептид Glu-Asp-Arg может иметь сайты связывания в промоторе гена *GDF11* (рис. 4). Пептид связывается с ДНК со стороны большой бороздки, образуя с азотистыми основаниями сеть водородных связей. Предположительно, пептид связывается с последовательностью CCTGC в гене *GDF11* и таким образом участвует в регуляции экспрессии этого гена.

Для проверки высказанного предположения была проанализирована последовательность гена *GDF11*, соответствующая ее промоторной области в диапазоне от –499 до +100 п.н. относительно сайта инициации транскрипции. Оказалось, что для белка GDF11 существуют два транскрипта и соответственно две промоторные области (таблица). В промоторах гена найдены предполагаемые сайты связывания для исследуемых пептидов: для пептида Ala-Glu-Asp-Gly сайты TAAAG, GTTTA, CAAAT, GAAAT (Хавин-

Возможные сайты связывания для пептидов Lys-Glu, Glu-Asp-Arg, Ala-Glu-Asp-Gly в промоторных участках гена *GDF11*, кодирующего “белок молодости и интеллектуальной деятельности”

<i>GDF11</i> (NM_005811)	Регуляторный участок гена в диапазоне от -499 до +100 п.н. (кДНК 5' → 3')
Транскрипт 1	TCTTCTTTTCCCTCCTTTGTCTCTCCCTCTCTCCTCCTCCTTTTCCCTATCTCTGTCT CTCCCCCTTATCTCTCTGATTCCTTTGGTCTCTCTGGCTCTGACTTTCCTCT ATATCCGCCCCCGCCCCCTCATATCTCTGTCTCTTCATCTCTCTCTGGCCCTT GCTCCCTCATCCCTCCCTCTCTCTATTCCCTCGGCTCTCTCCGGCTCCCTCTCTC GCCTCGGATGACAGCGCTGCCTCTTTTGTGGCTCCGAGCCAATCGCGGCCG CTGAGCACACGGGGGCCGGGGCTATAAAGGGCCTGGCCCGGGCTCGGGCCCC CCCAGCCGCCCGCCCCGGCCGCCCGCCCCGCCCGCCCGCGCGCCCGCCGCC CCGGCCCGGGTCCCCCTCGGCCGGGAGCCCAATCCCGCGCCGCC GGACCCCTCCTCCTCCCTCCCTCCTCCCTCCCGCCCCCTCCCCGCGGGACTCC GGCGTCCCGCCCCCAGTCCTCCCTCCCTCCCTCCAGCATGGTGCTCGCG GCCCGCTGCTGCTGGGCTTCTGCTCCTCGCCCTGGAGCTGCGGCCCGGGG GGAGGCGGCCG
Транскрипт 2	ACAGATGTATAGGAAGTGCTTGGATAGTTCCATTTTGTGGGTGTTATTCCTAA TGGGAGTGAGGCAAGAAGCCTAGATCTGAATTCTGGTTTACATAATGGGATAA ATTTAGCTCATGCTCCCTATCTGGACCCTGGGTTATCCCTCTCTGAGGCCATC TGTGTTATTTGTGGGGGAGGGATGTGCCAGGCTCTACCTGTCCAGCAGATAA ATCAGAGCAGATAGGGGAAAGGTGATGGAAGGGCAGCAGGTGTGATAAGAGG TATGGCTTCTATAAAGAGCTTCAAAGATTCAGAAAATGTTGGAGCCTTATATGC TGGGAAAAGTTGGACAGTAAGGATGGTGGTGGATGAATAATTTTGCAGGTAT CTGGTAGACAGGAACCTATATATTAGGGCAAATGGATTAGGAAATGGACACAG ATCAGTAAGGCCTTATAGGGCCATCATCCTAAAGAGGAAGTGCTGTTTTAGGT ACCGGAGACATGGTATAAGATAGGCATGGGAGAAGGGTAAAGAAGAACTGGA AAATCAGGCTGAGAAGTCCAAAATTGCCAGTGCCACCCAGGACTACTGATCC CCTACACAAACACCCTT

Примечание. Сайты связывания: для пептида Ala-Glu-Asp-Gly (жирный шрифт), для пептида Lys-Glu (курсив с нижним подчеркиванием) и для пептида Glu-Asp-Arg (жирный курсив с нижним подчеркиванием). В скобках указан номер гена в базе данных GenBank. В участок, который длиннее, чем все остальные, попали два сайта.

сон и др., 2012); для Lys-Glu – GACG и GCAG (Хавинсон и др., 2012); для пинеалона – GCAGG, CGTCC и CCTGC (Хавинсон и др., 2014).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что в промоторных участках гена *GDF11* содержатся все возможные сайты связывания для пептидов Lys-Glu, Glu-Asp-Arg и Ala-Glu-Asp-Gly, предположительно, эпигенетически влияющих на экспрессию этого гена, без нарушения структуры ДНК.

Данные обзора литературы свидетельствуют, что белок GDF11, верифицированный в периферической крови животных и человека, обладает рядом геропротекторных свойств. GDF11 способствует повышению функциональной активности сердечной и скелетных мышц при старении, регулируя каскад MAPK-p38 – миоглианин. Кроме того, GDF11 обладает выраженными нейропро-

текторными свойствами, изменяя активность транскрипционных факторов p57 (Kip2) и p27 (Kip1), что указывает на его способность активировать процессы дифференцировки нейронов и повышать их нейропластичность. Поскольку ведущими возрастными патологиями являются заболевания сердечно-сосудистой системы и нейродегенеративная патология, белок GDF11 может рассматриваться как потенциальная мишень действия геропротекторных лекарственных средств или самостоятельное биологически активное вещество. В качестве вещества, потенциально стимулирующего синтез GDF11, можно рассматривать короткий пептид Glu-Asp-Arg, нейропротекторные эффекты которого на уровне организма и сигнальных молекул во многом сходны с действием GDF11.

Таким образом, можно предположить, что пептиды Lys-Glu, Glu-Asp-Arg и Ala-Glu-Asp-Gly могут претендовать на роль регуляторов концентрации в крови белка GDF11.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Балашова С.Н., Жернаков Г.Л., Дудков А.В. Применение пептидных биорегуляторов у лиц пожилого возраста с нарушениями психоэмоционального состояния // Успехи геронтол. 2008. Т. 21. № 3. С. 448–452.
- Донсков С.И., Ягодинский В.Н. Последние дни А.А. Богданова. Хроника трагических событий // Вестник службы крови России. 2006. Т. 1. С. 1–8.
- Колчинская А.З. Кислород. Физиологическое состояние. Работоспособность. Киев: Наукова думка, 1991. 208 с.
- Морозов В.Г., Рыжак Г.А., Малинин В.В., Рутковская В.Н. Цитогены. Биологически активные добавки к пище. Методические рекомендации. СПб.: Коста, 2011. 40 с.
- Хавинсон В.Х., Кузник Б.И., Тарновская С.И., Линькова Н.С. Пептиды и молекулярные маркеры старения // Успехи геронтол. 2014. Т. 27. № 3. С. 399–406.
- Хавинсон В.Х., Линькова Н.С., Тарновская С.И. и др. Короткие пептиды стимулируют экспрессию серотонина в клетках коры головного мозга // Бюлл. эксперим. биол. и мед. 2014. Т. 157. № 1. С. 89–93.
- Хавинсон В.Х., Тарновская С.И., Линькова Н.С. и др. Короткие пептиды, проникающие в клетку: модель взаимодействия с промоторными участками генов // Бюлл. эксперим. биол. и мед. 2013. Т. 154. № 9. С. 391–396.
- Хавинсон В.Х., Трофимова С.В., Винер И.А. Методика повышения резервных возможностей организма спортсменов высокой квалификации, специализирующихся в сложнокоординационных видах спорта, с помощью пептидных биорегуляторов. Методические рекомендации. СПб: Ин-т биорегуляции и геронтологии, 2012. 22 с.
- Andersen R.E., Lim D.A. An ingredient for the elixir of youth // Cell Research. 2014. V. 1–2. P. 1345–1356.
- Anisimov V.N., Khavinson V.K. Peptide bioregulation of aging: results and prospects // Biogerontology. 2010. V. 11. P. 139–149.
- Arutjunyan A., Kozina L., Stvolinskiy S. et al. Pinealon protects the rat offspring from prenatal hyperhomocysteinemia // Int. J. Clin. Exp. Med. 2012. V. 5. № 2. P. 179–185.
- Bitto A., Kaerberlein M. Rejuvenation: it's in our blood // Cell Metabolism. 2014. V. 20. № 1. P. 2–4.
- Brack A.S. Ageing of the heart reversed by youthful systemic factors! // EMBO J. 2013. V. 32. № 16. P. 2189–2190.
- Demontis F., Patel V.K., Swindell W.R., Perrimon N. Intertissue control of the nucleolus via a myokine-dependent longevity pathway // Cell Reports. 2014. V. 7. № 5. P. 1481–1494.
- Dussiot M., Maciel T.T., Fricot A. et al. An activin receptor II ligand trap corrects ineffective erythropoiesis in  $\beta$ -thalassemia // Nature Medicine. 2014. V. 20. № 4. P. 398–407.
- Gokoffski K.K., Wu H.H., Beites C.L. et al. Activin and GDF11 collaborate in feedback control of neuroepithelial stem cell proliferation and fate // Development. 2011. V. 138. № 19. P. 4131–4142.
- Katsimpardi L., Litterman N.K., Schein P.A. et al. Vascular and neurogenic rejuvenation of the aging mouse brain by young systemic factors // Science. 2014. V. 344. P. 630–634.
- Kawauchi S., Kim J., Santos R. et al. Foxg1 promotes olfactory neurogenesis by antagonizing Gdf11 // Development. 2009. V. 136. № 9. P. 1453–1464.
- Khavinson V.Kh., Grigoriev E.I., Malinin V.V., Ryzhak G.A. Peptide stimulating neurones regeneration, pharmacological substance based thereon and method of its application // Eurasia Patent. 2008. EA 010157.
- Khavinson V.K., Tarnovskaya S.I., Linkova N.S. et al. Short cell-penetrating peptides: a model of interactions with gene promoter sites // Bull. Exp. Biol. and Medicine. 2013. V. 154. № 3. P. 403–410.
- Khavinson V., Ribakova Y., Kulebiakin K. et al. Pinealon increases cell viability by supression of free radical levels and activating proliferative processes // Rejuven Res. 2011. V. 14. № 5. P. 535–541.
- Kim J., Wu H.-H., Lander A.D. et al. GDF11 controls the timing of progenitor cell competence in developing retina // Science. 2005. V. 308. P. 1927–1930.
- Lach-Trifilieff E., Minetti G.C., Sheppard K. et al. An antibody blocking activin type II receptors induces strong skeletal muscle hypertrophy and protects from atrophy // Mol. Cell. Biol. 2014. V. 34. № 4. P. 606–618.
- Laviano A. Young blood // N. Engl. J. Med. 2014. V. 371. P. 573–575.
- Loffredo F.S., Steinhauser M.L., Jay S.M. et al. Growth differentiation factor 11 is a circulating factor that reverses age-related cardiac hypertrophy // Cell. 2013. V. 153. № 4. P. 828–839.
- Nomura T., Ueyama T., Ashihara E. et al. Skeletal muscle-derived progenitors capable of differentiating into cardiomyocytes proliferate through myostatin-independent TGF-beta family signaling // Biochem. Biophysic. Res. Comm. 2008. V. 365. № 4. P. 863–869.
- Pottgiesser T., Sottas P.-E., Ehteler T. et al. Detection of autologous blood doping with adaptively evaluated biomarkers of doping: a longitudinal blinded study // Transfusion. 2011. V. 51. № 8. P. 1707–1715.
- Shi Y., Liu J.-P. Gdf11 facilitates temporal progression of neurogenesis in the developing spinal cord // J. Neurosci. 2011. V. 31. № 3. P. 883–893.
- Sinha M., Jang Y.C., Oh J. et al. Restoring systemic GDF11 levels reverses age-related dysfunction in mouse skeletal muscle // Science. 2014. V. 344. P. 649–652.

- Suragani R., Cadena S.M., Cawley S.M. et al. Transforming growth factor- $\beta$  superfamily ligand trap ACE-536 corrects anemia by promoting late-stage erythropoiesis // *Nat. Med.* 2014. V. 20. № 4. P. 408–414.
- Villeda S.A., Luo J., Mosher K.I. et al. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function // *Nature*. 2011. V. 477. P. 90–94.
- Villeda S.A., Plambeck K.E., Middeldorp J. et al. Young blood reverses age-related impairments in cognitive function and synaptic plasticity in mice // *Nature Medicine*. 2014. V. 20. № 6. P. 659–663.
- Williams G., Zentar M.P., Gajendra S. et al. Transcriptional basis for the inhibition of neural stem cell proliferation and migration by the TGF- $\beta$ -family member GDF11 // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 11. P. e78478.
- Wu H.H., Ivkovic S., Murray R.C. et al. Autoregulation of neurogenesis by GDF11 // *Neuron*. 2003. V. 37. № 2. P. 197–207.

## GDF11 Protein as a General Geroprotector

V. Kh. Khavinson<sup>1,2,4</sup>, B. I. Kuznik<sup>3</sup>, S. I. Tarnovskaya<sup>2</sup>, N. S. Linkova<sup>1,2,5</sup>

<sup>1</sup>*Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

<sup>2</sup>*St. Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, St. Petersburg, Russia*

<sup>3</sup>*Chita State Medical Academy, Chita, Russia*

<sup>4</sup>*Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russia*

<sup>5</sup>*Peter Great St. Petersburg State Polytechnical University, St. Petersburg, Russia*

*E-mail: linkova@gerontology.ru*

GDF11 protein (growth differentiation factor-11) belongs to the superfamily of transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) and acts as a geroprotector of the cardiovascular and nervous systems. The cardio- and neuroprotective action of GDF11 is related to the regulation of signaling molecules, including the MARK-p38-mioglianin pathway. The non-protective action of GDF11 is associated with the stimulation of proliferation and differentiation of neurons in brain by regulating the expression of p57 and p27 transcription factors. GDF11 protein can be identified as a target for geroprotectors with neuroprotective and cardioprotective effects that were shown recently. The site-specific sequences CCTGC, ATTTC, GCAG were found for Glu-Asp-Arg, Ala-Glu-Asp-Gly, Lys-Glu peptides in the promoter region of the *GDF11* gene.