

К. Л. Козлов<sup>1</sup>, И. И. Болотов<sup>1</sup>, Н. С. Линькова<sup>1,2</sup>, А. О. Дробинцева<sup>1</sup>, В. Х. Хавинсон<sup>1,3,4</sup>,  
М. М. Дьяконов<sup>1</sup>, Л. С. Козина<sup>1</sup>

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АСПЕКТЫ ДЕЙСТВИЯ ВАЗОПРОТЕКТОРНОГО ПЕПТИДА *KED* ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ И РЕСТЕНОЗЕ

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, 197110 Санкт-Петербург, пр. Динамо, 3; e-mail: kozlov\_kl@mail.ru; <sup>2</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 195251 Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29; <sup>3</sup> Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 199034 Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6; <sup>4</sup> Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова, 191015 Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 41

Пептид *KED* (*Lys-Glu-Asp*) обладает выраженными вазопротекторными свойствами и является эффективным средством в терапии атеросклероза и другой патологии сердечно-сосудистой системы у людей пожилого возраста. Одним из возможных механизмов действия пептида *KED* является эпигенетическая регуляция экспрессии генов, кодирующих белки-маркеры функциональной активности эндотелия. Целью работы явилось изучение влияния пептида *KED* на экспрессию сигнальных молекул в эндотелии сосудов *in vitro* в норме, при атеросклерозе и рестенозе. Установлено, что пептид *KED* нормализует повышенную при атеросклерозе экспрессию эндотелина-1 и восстанавливает клеточные взаимодействия эндотелиоцитов, осуществляемые коннексинами. Геропротекторное влияние пептида *KED* на эндотелий реализуется в повышении экспрессии сиртуина-1, белка, участвующего в репарации ДНК.

**Ключевые слова:** пептид *KED*, эндотелий, старение, атеросклероз, рестеноз

Одной из важных задач геронтологии и гериатрии является поиск новых, эффективных и безопасных способов лечения сердечно-сосудистой патологии у лиц старших возрастных групп. Одним из перспективных вазопротекторов является пептид «Везуген» (*KED*, *Lys-Glu-Asp*) [9].

Эффективность пептида *KED* оценивали у больных пожилого и старческого возраста, прооперированных по поводу облитерирующего атеросклероза нижних конечностей. Везуген при пероральном применении способствовал увеличению дистанции безболевого ходьбы на 40 % по сравнению с контрольной группой [1]. Кроме того, у этих же пациентов Везуген был эффективен в терапии васкулогенной эректильной дисфункции. После применения Везугена, по сравнению с контрольной группой, систолическая скорость кровотока *по aa*.

*dorsalis* и *dorsalis profunda penis* возрастала на 61 % [2].

В экспериментах было установлено, что пептид *KED* нормализует микроциркуляцию у крыс с индуцированным пародонитом. Применение этого пептида оказывает нормализующее влияние на состояние стенок капилляров, повышая их резистентность и проницаемость, а также на состояние микроциркуляторного русла слизистой оболочки десны и пародонта [7]. В органотипических культурах клеток, полученных от молодых и старых животных, и в диссоциированных культурах эндотелиоцитов сосудов при их старении пептид *KED* стимулировал синтез пролиферотропного белка *Ki67*, экспрессия которого при старении клеток снижалась. Методами молекулярного докинга выявлена возможность связывания пептида *KED* с промоторными участками гена *MKI67* (гена белка *Ki67*). Найден сайт связывания *CATC* для пептида, локализованный в корковом промоторе 5'-*agcctcaaccatcaggaacaagagt-3'*, находящемся в диапазоне от 14 до +12 пар нуклеотидов относительно стартовой точки транскрипции гена *MKI67* (*ENSG00000148773*) [10]. Пептид *KED* снижает синтез *E*-селектина — молекулы адгезии, участвующей в формировании атеросклеротических бляшек, при старении эндотелия сосудов *in vitro* [8].

Целью работы явилось изучение влияния пептида *KED* на экспрессию сигнальных молекул в эндотелии сосудов *in vitro* в норме, при атеросклерозе и рестенозе.

### Материалы и методы

Для создания культур клеток материал аорты без патологических изменений был получен от эмбриона человека (21-я неделя гестации) в НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д. О. Отта. Ткань атеросклеротической аорты человека (диаметр 0,2 см, четыре фрагмента) была получена при операции аортокоронарного шунтирования у пациента пожилого возраста (68 лет). Ткань аорты человека при рестенозе (диаметр 0,2 см, четыре фрагмента) была получена при операции аортокоронарного шунтирования у пациента пожилого возраста (71 год). Операции проводили в клинике сердечно-сосудистой хирургии Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова (Санкт-Петербург).

Культуры эндотелиоцитов выращивали в среде, содержащей 87,5 % M199, 10 % эмбриональной бычьей сыворотки, 1,5 % HEPES, 1% PES, L-глутамин. Выделение первичной культуры проводили на чашках Петри («Sarstedt»), обработанных раствором фибриногена («Gibco»), последующее культивирование проводили во флаконах с обработанной поверхностью объемом 50 мл. Пассирование производили через 3 дня на 4-й, когда культура достигала состояния монослоя. Клетки культивировали до 3-го пассажа. Все культуры было разделены на две группы: 1-я — контрольная (добавление физраствора в культуральную среду), 2-я — с добавлением пептида KED в концентрации 20 нг/мл.

Для оценки функциональной активности эндотелия нами были выбраны сигнальные молекулы, наиболее полно отражающие функциональное состояние эндотелия, — коннексин-37 (*Connexin-37*, *Cx37* — маркер межклеточных контактов в эндотелии), эндотелин-1 (*Endothelin-1*), сиртуин-1 (*Sirt-1*). Коннексины представляют собой мембранные белки, образующие канал, который осуществляет молекулярные взаимодействия клеток. Ген белка *Cx37* выбран среди недавно обсуждаемых генов-кандидатов, влияющих на развитие сердечно-сосудистых заболеваний [13, 14]. Установлено, что у больных с рестенозом коронарных артерий в периферической крови повышается концентрация *Endothelin-1*, поскольку известно, что именно это вещество ингибирует высвобождение NO гладкомышечными клетками сосудов после их стимуляции [15]. Выявлено, что снижение концентрации эндотелина-1, индуцированной инфузией L-аргинина, приводило к возобновлению

инсулин-индуцированного высвобождения NO у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями и метаболическим синдромом [5, 17]. Необходимо отметить, что сиртуины (*Silent Information Regulator proteins*) представляют собой семейство эволюционно консервативных НАД-зависимых белков, обладающих деацетилазной или АДФ-рибозилтрансферазной активностью [11, 16]. Сиртуины не только регулируют экспрессию различных генов, используя эпигенетические механизмы (меняя степень конденсации хроматина), но и непосредственно участвуют в устранении повреждений ДНК [12]. Исследование экспрессии указанных молекул проводили методом иммунофлюоресцентной микроскопии.

Для иммунофлюоресцентного окрашивания клетки помещали в 24-луночный планшет («Биолот»). В работе использовали первичные моноклональные антитела к *Connexin-37* («Dako», 1:200), *Endothelin-1* («Abcam», 1:300), *Sirt-1* («Abcam», 1:200). Для пермеабиллизации использовали 0,1% Triton X-100 («Биолот»), растворенный в PBS. Далее культуры клеток инкубировали в 1% FBS ( $\rho H=7,5$ ) в течение 30 мин для блокировки неспецифического связывания. Инкубацию с первыми антителами проводили в течение 60 мин. Конфокальную микроскопию клеток проводили в инвертированном конфокальном микроскопе «Olympus Fluoview CM FV300-IX70» с использованием апохроматического объектива «606 UPlan». Для спецификации флюоресценции исследуемых маркеров использовали волну возбуждения аргонового лазера 488 нм. Ядра клеток докрашивали Hoechst 33258 («Sigma»), в результате чего они флюоресцировали синим цветом, красная флюоресценция показывала экспрессию исследуемых маркеров (инкубация со вторичными антителами, конъюгированными с флюорохромом Alexa Fluor 568 (1:1000, «Abcam») в течение 30 мин при комнатной температуре, в темноте).

Для оценки результатов иммуноцитохимического окрашивания проводили морфометрическое исследование с использованием системы компьютерного анализа микроскопических изображений, состоящей из микроскопа «Olympus BX40», цифровой камеры «Olympus», персонального компьютера на базе Intel Pentium 5 и программного обеспечения Videotest Morphology 5.2. В каждом случае анализировали пять полей зрения при ув. 200. Измеряли площадь экспрессии, ее рассчитывали как отношение площади, занимаемой иммунопозитивными клетками, к общей площади клеток в

поле зрения и выражали в процентах для маркеров с цитоплазматическим окрашиванием, и как отношение площади, занимаемой иммунопозитивными ядрами, к общей площади ядер в поле зрения для маркеров с ядерной экспрессией.

Статистическая обработка всех экспериментальных данных включала подсчет среднего арифметического, стандартного отклонения и доверительного интервала для каждой выборки, ее проводили в Statistica 7.0. Для анализа вида распределения использовали критерий Шапиро—Уилка (*W*-test). Было установлено, что все выборки соответствуют нормальному распределению. Для проверки статистической однородности нескольких выборок были использованы непараметрические процедуры однофакторного дисперсионного анализа (критерий Крускала—Уоллиса). Во всех выборках, кроме «рестеноз, контроль, экспрессия *Sirt-1*» и «рестеноз, пептид, экспрессия *Sirt-1*», разброс значений был невелик. Для двух выборок, где разброс был значительным, применяли процедуры множественных сравнений с помощью критерия Манна—Уитни. Для групп с незначительным разбросом применяли *t*-критерий Стьюдента. Критический уровень достоверности нулевой гипотезы (об отсутствии различий) принимали равным 0,01.

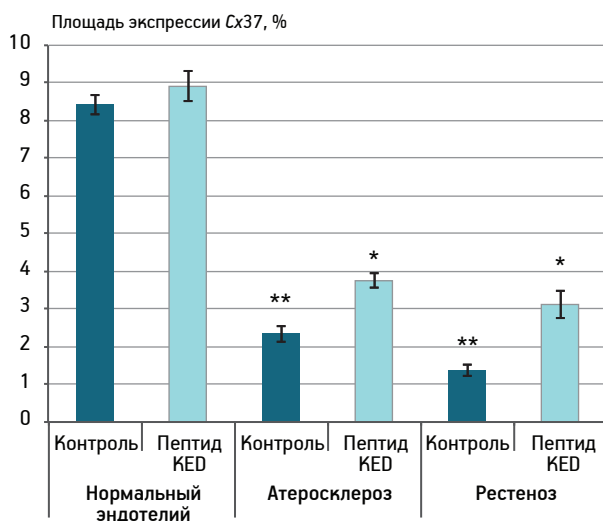


Рис. 1. Площадь экспрессии Connexin-37 в культуре эндотелия в норме, при атеросклерозе и рестенозе.

Здесь и на рис. 3: \*  $p < 0,01$  по сравнению с соответствующим контролем; \*\*  $p < 0,01$  по сравнению с выборкой «контроль, нормальный эндотелий, без добавления пептида» (сравнение между группами проведено по *t*-критерию Стьюдента)

## Результаты и обсуждение

В культуре нормального эндотелия экспрессия *Connexin-37* под действием пептида *KED* не изменялась. При этом в контрольной культуре эндотелия, полученной от пациентов с атеросклерозом, площадь экспрессии *Connexin-37* была в 3,6 раза ниже, чем в нормальном эндотелии. Пептид *KED* способствовал повышению в 1,6 раза экспрессии *Connexin-37* в культуре, пораженной атеросклерозом. В контрольной культуре эндотелия, взятого у пациента с рестенозом, площадь экспрессии *Connexin-37* была в 6,2 раза ниже, чем в нормальном эндотелии. Под действием пептида *KED* этот показатель возрастал в 2,3 раза (рис. 1).

В культуре нормального эндотелия экспрессия фактора транскрипции *Sirt-1* под действием пептида *KED* не изменялась. При этом в контрольной культуре эндотелия, полученной от пациентов с атеросклерозом, площадь экспрессии *Sirt-1* была в 2 раза ниже, чем в нормальном эндотелии. Пептид *KED* способствовал повышению в 1,5 раза экспрессии *Sirt-1* в культуре, пораженной атеросклерозом. В контрольной культуре эндотелия, взятого у пациентов с рестенозом, площадь экспрессии *Sirt-1* была в 2 раза ниже, чем в нормальном эндотелии. Под действием пептида *KED* этот показатель возрастал в 1,5 раза (рис. 2).

В культуре эндотелия в норме экспрессия *Endothelin-1* под действием пептида *KED* не из-

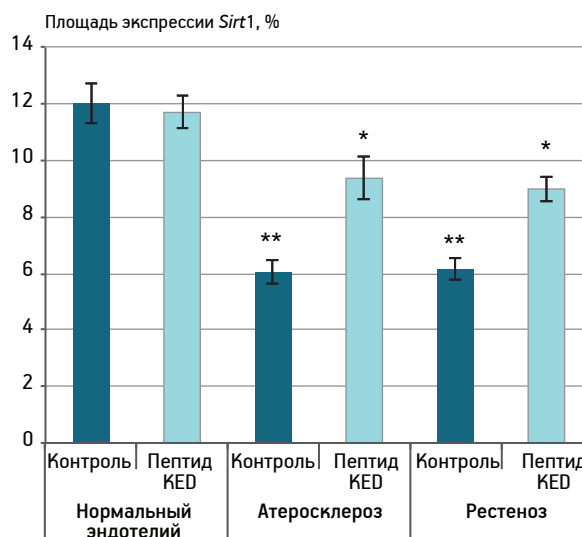


Рис. 2. Площадь экспрессии Sirt-1 в культуре эндотелия в норме, при атеросклерозе и рестенозе.

\*  $p < 0,01$  по сравнению с соответствующим контролем; \*\*  $p < 0,01$  по сравнению с выборкой «контроль, нормальный эндотелий, без добавления пептида» (сравнение между группами проведено по критерию Манна—Уитни)

менялась. В контрольных культурах эндотелия, полученных от пациентов с атеросклерозом и рестенозом, площадь экспрессии *Endothelin-1* была, соответственно, в 2,2 и 2,7 раза выше, чем в нормальном эндотелии. Пептид *KED* способствовал восстановлению экспрессии *Endothelin-1* в культурах, пораженных атеросклерозом и рестенозом, до уровня нормы (рис. 3).

### Заключение

Ранее было выдвинуто предположение, что возрастное снижение экспрессии сиртуинов *Sirt-1* и *Sirt-6* может служить маркером старения сердечно-сосудистой системы и предиктором развития атеросклероза [6]. Полученные нами данные подтверждают эту гипотезу, так как нами выявлено снижение экспрессии *Sirt-1* в эндотелии, пораженном атеросклерозом. Кроме того, восстановление синтеза этого белка, участвующего в репарации ДНК, под действием пептида *KED*, подтверждает ранее показанную эффективность его применения у пожилых пациентов с патологией сердечно-сосудистой системы. В другой работе было установлено, что атеросклеротическое поражение аорты человека характеризуется нарушением межклеточных контактов, что выражается в снижении экспрессии *Cx37* [4]. Полученные нами результаты полностью согласуются с этими данными и указывают на роль пептида *KED* в восстановлении межклеточных контактов эндотелиоцитов.

Однако наибольший эффект пептид *KED* оказывал на экспрессию *Endothelin-1*, снижая ее до нормы. Вероятно, одним из основных механизмов действия пептида *KED* является регуляция экспрессии гена *Endothelin-1*, что приводит к реализации каскада реакций, предотвращающих развитие атеросклероза и рестеноза. Так, в норме в низких концентрациях *Endothelin-1* действует на эндотелиальные рецепторы, вызывая высвобождение факторов релаксации, а в более высоких — активирует рецепторы на гладкомышечных клетках, стимулируя вазоконстрикцию [3]. Таким образом, при помощи одного и того же фактора реализуются две противоположные сосудистые реакции, вызываемые различными механизмами. Высокие уровни *Endothelin-1* в плазме крови наблюдают при атеросклерозе, ишемии и гипертензии, следовательно, пептид *KED*, способствующий снижению синтеза этой молекулы, будет способствовать профилактике развития этой сердечно-сосудистой патологии.

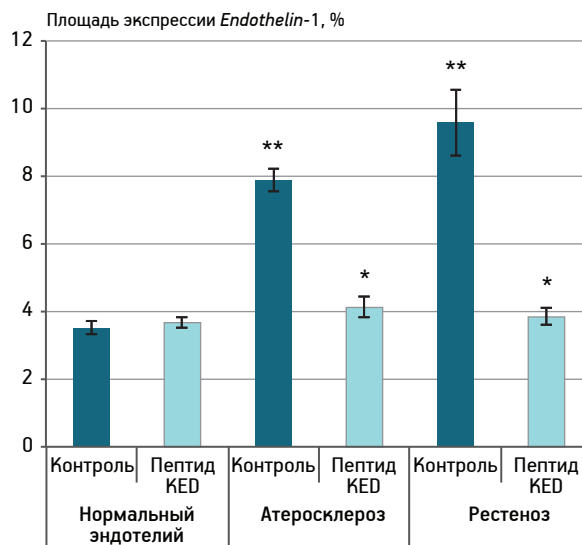


Рис. 3. Площадь экспрессии *Endothelin-1* в культуре эндотелия в норме, при атеросклерозе и рестенозе

### Литература

1. Китачев К.В., Сазонов А.Б., Козлов К.Л. и др. Роль вазоактивного пептида в лечении хронической артериальной недостаточности нижних конечностей // Успехи геронтол. 2013. Т. 26. № 2. С. 292–296.
2. Китачев К.В., Сазонов А.Б., Козлов К.Л. и др. Эффективность пептидного биорегулятора сосудов в комплексной терапии васкулогенной эректильной дисфункции у лиц старших возрастных групп // Успехи геронтол. 2014. Т. 27. № 1. С. 156–159.
3. Козлов К.Л., Солдатов В.М., Полякова В.О. и др. Молекулярные аспекты старения сосудов *in vitro* // Молекулярная мед. 2015. № 3. С. 53–56.
4. Пальцев М.А., Солдатов В.М., Козлов К.Л. и др. Экспрессия сигнальных молекул в эндотелии аорты при старении и атеросклерозе // Молекулярная мед. 2015. № 5. С. 12–15.
5. Савченко А.П., Чазова И.Е., Данилов Н.М. Факторы риска рестеноза после коронарного стентирования у больных с метаболическим синдромом // Кардиоваскулярная тер. и проф. 2007. № 2. С. 71–74.
6. Солдатов В.М., Козлов К.Л., Линькова Н.С. Возрастные особенности экспрессии сигнальных молекул в эндотелии сосудов человека и их роль в развитии сердечно-сосудистой патологии // Молекулярная мед. 2015. № 6. С. 33–37.
7. Хавинсон В.Х., Григорьев Е.И., Малинин В.В., Рыжак Г.А. Пептид, повышающий резистентность капилляров, фармацевтическая композиция на его основе и способ его применения: Патент РФ № 2295970, 2006.
8. Хавинсон В.Х., Линькова Н.С., Елашкина Е.В. и др. Молекулярные аспекты антиатеросклеротического действия коротких пептидов // Клеточные технологии в биол. и мед. 2014. № 3. С. 185–189.
9. Хавинсон В.Х., Линькова Н.С., Морозова Е.А. и др. Молекулярные механизмы сердечно-сосудистой патологии // Успехи физиол. наук. 2014. Т. 45. № 3. С. 57–63.
10. Хавинсон В.Х., Тарновская С.И., Линькова Н.С. и др. Эпигенетические аспекты пептидной регуляции пролиферации эндотелия сосудов при его старении // Успехи геронтол. 2014. Т. 27. № 1. С. 108–114.
11. Chen J., Xavier S., Moskowitz-Kassai E. et al. Cathepsin cleavage of sirtuin 1 in endothelial progenitor cells mediates stress-induced premature senescence // Amer. J. Pathol. 2012. Vol. 180. № 3. P. 973–983.



12. Donato A.J., Magerko K.A., Lawson B.R. et al. SIRT-1 and vascular endothelial dysfunction with ageing in mice and humans // *J. Physiol.* 2011. Vol. 589. (Pt. 18). P. 4545–4554.

13. Pitha J., Hubacek J.A., Pithova P. The connexin 37 (1019C>T) gene polymorphism is associated with subclinical atherosclerosis in women with type 1 and 2 diabetes and in women with central obesity // *Physiol. Res.* 2010. Vol. 59. № 6. P. 1029–1032.

14. Pitha J., Kralova Lesna I., Hubacek J.A. et al. Smoking impairs and circulating stem cells favour the protective effect of the T allele of the connexin 37 gene in ischemic heart disease — A multinational study // *Atherosclerosis*. 2016. Vol. 244. P. 73–78.

15. Pogoda K., Füller M., Pohl U. et al. NO, via its target Cx37, modulates calcium signal propagation selectively at myoendothelial gap junctions // *Cell Commun. Signal.* 2014. Vol. 12. P. 33.

16. Ruan Y., Dong C., Patel J. et al. SIRT-1 suppresses doxorubicin-induced cardiotoxicity by regulating the oxidative stress and p38MAPK pathways // *Cell. Physiol. Biochem.* 2015. Vol. 35. № 3. P. 1116–1124.

17. Yang Y., Guo S.X., Yang Z.Y. et al. Association between 1019C/T polymorphism of Connexin 37 gene and restenosis after coronary stenting // *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 2013. Vol. 30. № 4. P. 456–460.

*Adv. geront.* 2016. Vol. 29. № 4. P. 646–650

K. L. Kozlov<sup>1</sup>, I. I. Bolotov<sup>1</sup>, N. S. Linkova<sup>1,2</sup>, A. O. Drobintseva<sup>1</sup>, V. Kh. Khavinson<sup>1,3,4</sup>,  
M. M. Dyakonov<sup>1</sup>, L. S. Kozina<sup>1</sup>

#### MOLECULAR ASPECTS OF VASOPROTECTIVE PEPTIDE KED ACTIVITY DURING ATHEROSCLEROSIS AND RESTENOSIS

<sup>1</sup> Saint-Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, 3, pr. Dinamo, St. Petersburg 197110; e-mail: kozlov\_kl@mail.ru; <sup>2</sup> Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University, 29, ul. Polytehnicheskaya, St. Petersburg 195251; <sup>3</sup> Pavlov Institute of Physiology of RAS, 6, nab. Makarova, St. Petersburg 199034;

<sup>4</sup> I. I. Mechnikov North-Western State Medical University, 41, ul. Kirochnaya, St. Petersburg 191015

Peptide *KED* (*Lys-Glu-Asp*) has vasoprotective effects and is effective substance in treatment of atherosclerosis and other cardio-vascular disorders in elderly people. One of the probable mechanisms of biological activity of this peptide is epigenetic genes regulation. These genes can coding proteins, which are markers of endothelium functional activity. The goal of investigation was to study the *KED* peptide effect on signal molecules expression in normal, atherosclerotic and restenotic endothelium *in vitro*. It was shown, that *KED* peptide has normalized endothelin-1 expression, which increased during atherosclerosis and restenosis. *KED* peptide also restores cells interactions by connexin expression. Geroprotective effect of *KED* peptide is realized by increasing of sirtuin1 expression, which has took part in DNA reparation.

**Key words:** *KED peptide, endothelium, aging, atherosclerosis, restenosis*