

# СРАВНИТЕЛЬНОЕ ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДОВ KE И AED НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ФИБРОБЛАСТОВ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ИХ РЕПЛИКАТИВНОМ СТАРЕНИИ

Н.В.Фридман<sup>1</sup>, Н.С.Линькова<sup>1,2</sup>, Е.О.Кожевникова<sup>1</sup>, Е.О.Гутоп<sup>1</sup>, В.Х.Хавинсон<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Отдел биогеронтологии АНО НИЦ Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии, Санкт-Петербург, РФ;

<sup>2</sup>Кафедра терапии, гериатрии и антивозрастной медицины Академии постдипломного образования ФГБУ ФНКЦ ФМБА России, Москва

Исследовали влияние пептидов KE и AED на экспрессию сиртуина-1, сиртуина-6, коллагена I типа, цитокинов (IL-1, TGF- $\beta$ ) и транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B в фибробластах кожи человека при их репликативном старении. Методами иммуноцитохимии и конфокальной микроскопии показано, что пептид KE снижает синтез стимуляторов воспалительной реакции (IL-1, NF- $\kappa$ B, TGF- $\beta$ ) и стимулирует синтез сиртуина-6. Пептид KE нормализует иммунологическую функцию фибробластов кожи человека при их "старении". Пептид AED активирует синтез сиртуина-1, сиртуина-6, коллагена I типа в фибробластах кожи человека при их репликативном старении. Это указывает на геропротективное действие пептида AED.

**Ключевые слова:** *короткие пептиды; репликативное старение; фибробласты кожи человека; сиртуины; коллаген I типа*

Инволютивные изменения в организме человека начинаются на клеточном уровне, когда клетки теряют функциональную активность, способность к пролиферации, миграции, синтезу тканеспецифических белков [9]. Наиболее выраженные возрастные изменения наблюдаются в клетках кожи. Кожа участвует в реализации барьерной, экскреторной, иммунной и рецепторной функции организма, терморегуляции и поддержании водно-солевого обмена. Возрастные изменения кожи связаны в том числе с нарастающей деградацией межклеточного вещества дермы. С одной стороны, снижается способность фибробластов синтезировать белки межклеточного матрикса, с другой — происходит активация ферментов, разрушающих его. Фибробласты широко применяют в изучении механизмов репарации и анализа механизмов онтогенеза в геронтологии. Они являются основным типом клеток дермы кожи, ответственных за синтез и секрецию основных компонентов дермальной матрицы, таких как коллаген, эластин и гликозаминогликаны [15]. Репликативное старение фибробластов кожи прежде всего связано

со снижением синтеза коллагена, гиалуроновой кислоты и других биологически активных веществ [4].

Старение кожи является актуальной проблемой современной геронтокосметологии. Дисбаланс между синтезом межклеточного матрикса фибробластами и его распадом можно нивелировать с помощью пептидных геропротекторов [1,3]. Одним из перспективных методов замедления процесса возрастных изменений кожи является использование коротких пептидов. Короткие пептиды обладают геропротективными и иммунопротективными свойствами [2,3,5] и могут играть важную роль в восстановлении функций фибробластов кожи при их репликативном старении.

Биологическая активность пептида KE, синтезированного на основе аминокислотного анализа полипептидного комплекса тимуса, направлена на активизацию пролиферации и дифференцировки эпителиальных и иммунных клеток тимуса [3,5], стимуляцию клеточного иммунитета [5]. Пептид KE продемонстрировал иммуномодулирующее, антиканцерогенное, антиоксидантное и геропротективное действие в исследованиях *in vitro* и *in vivo* [3,5]. Кроме того, пептид KE может связываться со специфической последовательностью двунизовой ДНК и

Адрес для корреспонденции: miayy@yandex.ru. Линькова Н.С.

doi: 10.47056/1814-3490-2020-3-197-201



регулировать экспрессию генов и синтез белков цитоскелета, пролиферации и метаболизма клетки, что объясняет его высокую биологическую активность [11,12].

Пептид AED, сконструированный на основе полипептидного комплекса, выделенного из хрящевой ткани, в экспериментальных моделях у животных регулировал метаболизм соединительной ткани [1]. На основании этих данных можно предположить, что пептиды KE и AED могут участвовать в регуляции функций фибробластов кожи.

Сигнальными молекулами, регулирующими гомеостаз клеток кожи, являются сиртуин-1 (SIRT1), фактор транскрипции NF-κB, трансформирующий фактор роста TGF-β и IL-1. SIRT1 — многофункциональный белок, который участвует в ответе на стресс, клеточном метаболизме и старении посредством деацетилирования различных субстратов, включая гистоны и транскрипционные факторы. SIRT1 регулирует энергетический гомеостаз, клеточный цикл, апоптоз, воспалительные реакции и уровень АФК в клетке [7]. NF-κB — универсальный фактор транскрипции, контролирующий экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла [14]. Нарушение синтеза NF-κB вызывает воспаление, аутоиммунные заболевания, развитие вирусных инфекций и рака. Сиртуин-6 (SIRT6), ослабляя действие NF-κB, ингибирует клеточное старение. SIRT6 подавляет репликативное старение клеток и способствует увеличению продолжительности жизни: участвует в репарации ДНК, ингибирует патологические сигнальные каскады, связанные с IGF-1 и нарушением функций антиоксидантной системы, активирует метаболизм. SIRT1 подавляет активность NF-κB, COX-2 и продукцию iNOS, оказывая противовоспалительный эффект [13]. TGF-β представляет собой цитокин, который регулирует рост клеток, дифференцировку, морфогенез и апоптоз, а также является стимулятором роста фибробластов [10]. Цитокин IL-1 — медиатор воспаления и иммунитета, синтезируется в первую очередь активированными макрофагами, кератиноцитами, стимулированными В-клетками и фибробластами. Коллаген I типа является одним из основных структурных белков, синтезируемых фибробластами кожи, который указывает на высокую функциональную активность этих клеток [6].

Цель данной работы — оценить влияние пептидов KE, AED на экспрессию сиртуинов, коллагена, цитокинов и транскрипционного фактора NF-κB в фибробластах кожи человека при их репликативном старении.

## Методика исследования

Фибробласты кожи женщины (дата рождения 16.03.1970 г.) выделяли из кожи околоушной области, полученной в результате операции по круговой подтяжке лица. Пациентка дала информированное согласие на использование операционного материала в научных исследованиях. Полученный образец кожи обрабатывали в стерильных условиях раствором диспазы II (2.4 ЕД/мл) в течение 18 ч при 4°C, затем механически отделяли эпидермис от дермы. Для получения суспензии клеток дерму измельчали и помещали в раствор коллагеназы I типа в среду M199. Питательная среда для культивирования состояла из среды M199, 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 1% L-глутамина, 1.5% HEPES-буфера и раствора пенициллина и стрептомицина. Через 5 сут первичная культура достигала монослоя и её пересевали в соотношении 1:3. Для снятия клеток с подложки использовали раствор трипсина-версена. Концентрация клеток для нулевого пассажа составляла 50 тыс. на 1 мл среды.

Пассирование проводили через 3 сут, когда культура достигала монослоя. Культивирование проводили до 3-го пассажа ("молодые" культуры) и до 14-го пассажа ("старые" культуры), после чего клетки высевали на планшеты и проводили иммуноцитохимическое окрашивание. Первичные культуры фибробластов кожи человека к 14-му пассажу теряли способность к пролиферации, а уровень апоптоза в них возрастал, в связи с чем именно этот пассаж был выбран в качестве модели "старых" клеток. Поскольку снижение пролиферации и повышение выраженности апоптоза не характерно для трансформированных клеток, можно предположить, что исследуемые культуры спонтанно не трансформировались. Для исследования "молодых" клеток был выбран 3-й пассаж, так как к этому времени они адаптируются к росту в культуре и могут применяться в научных исследованиях. Первый и второй пассажи — период "приспособления" клеток к росту в культуре после выделения из ткани. Представленная методика разработана нами на основании собственного опыта исследований клеточного старения в культуре и анализа литературы по этой тематике.

Клетки 3-го и 14-го пассажа были разделены на три группы: 1-я — контроль (культуры без добавления пептида), 2-я — культуры с добавлением пептида KE в концентрации 20 нг/мл, 3-я — культуры с добавлением пептида AED в концентрации 20 нг/мл. Выбор данной кон-



центрации обусловлен тем, что в предыдущих исследованиях она оказалась наиболее эффективной в отношении фибробластов кожи для других коротких пептидов [1]. Затем проводили иммуноцитохимическое окрашивание культур. Для проведения пермеабилзации использовали 0.1% Тритон X-100 ("БиолоТ"), растворённый в ФСБ. Культуры клеток инкубировали в 1% ФСБ pH 7.5 в течение 30 мин для блокировки неспецифического связывания. Инкубацию с первичными антителами проводили в течение 60 мин. Использовали первичные моноклональные антитела к коллагену I типа (1:100), SIRT1 (1:100), SIRT6 (1:200), IL-1 (1:75), NF-κB (1:100) и TGF-β (1:75) (Abcam). Указанные сигнальные молекулы играют ведущую роль в процессах клеточного старения и поддержании функциональной активности фибробластов кожи.

Конфокальную микроскопию клеток проводили в инвертированном конфокальном микроскопе Olympus Fluoview CM FV300-IX70 с использованием апохроматического объектива 606 UPlan. Ядра клеток докрашивали Hoechst 33258 (Sigma), в результате чего они флюоресцировали тёмно-синим. Зелёная или красная флюоресценция характеризовала экспрессию исследуемых маркеров (инкубация со вторичными антителами, конъюгированными с флюорохромом Alexa Fluor 488 или Alexa Fluor 647 (1:1000; Abcam), в течение 30 мин при комнатной температуре, в темноте). Готовые препараты заключали под покровные стёкла в монтирующую среду Dako Fluorescent Mounting Medium (Dako).

Для анализа полученных результатов использовали программное обеспечение "Видео-Тест-Морфология 5.2". В каждом случае анализировали 5 полей зрения при увеличении 200. Площадь экспрессии рассчитывали как отношение площади, занимаемой иммунопозитивными клетками, к общей площади клеток в поле зрения и выражали в процентах. Этот параметр характеризует количество клеток, в которых экспрессируется исследуемый маркер.

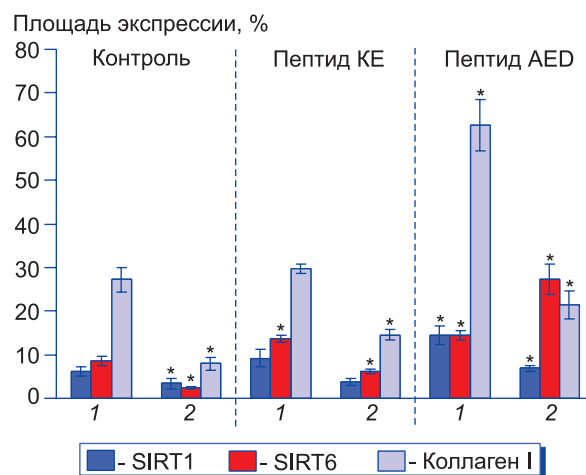
Статистическая обработка данных проводилась в программе Statistica 6.0 (StatSoft, Inc.) и включала подсчёт среднего арифметического, стандартного отклонения и доверительного интервала для каждой выборки. Для анализа вида распределения использовали критерий Шапиро—Уилка. Для проверки статистической однородности нескольких выборок были использованы непараметрические процедуры однофакторного дисперсионного анализа (критерий Крускала—Уоллиса). В случаях, когда дисперсионный анализ выявлял статистически значи-

мую неоднородность нескольких выборок, для последующего выявления неоднородных групп (путём их попарных сравнений) применяли процедуры множественных сравнений с помощью *U* критерия Манна—Уитни. Критический уровень достоверности нулевой гипотезы (об отсутствии различий) принимали равным 0.05.

## Результаты исследования

Экспрессия SIRT1, SIRT6, коллагена I в старых культурах была значимо меньше в 1.8, 3.6 и 3.5 раза соответственно, чем в молодых культурах (рис. 1). Полученные данные свидетельствуют о том, что при репликативном старении количество фибробластов кожи, в которых наблюдается активный синтез SIRT1, SIRT6 и коллагена I, снижается.

Пептид KE повышал площадь экспрессии коллагена I в старых культурах фибробластов в 1.8 раза ( $p < 0.05$ ) по сравнению с контролем. Пептид KE также значимо увеличивал площадь экспрессии SIRT6 в молодых и старых культурах фибробластов в 1.6 и 2.6 раза соответственно по сравнению с контролем (рис. 1). Пептид AED повышал экспрессию SIRT1 и коллагена I в старых культурах в 2 и 2.7 раза ( $p < 0.05$ ) соответственно, а экспрессию SIRT6 — в 11.5 раза по сравнению с контролем (рис. 1). Кроме того, при добавлении пептида AED экспрессия SIRT1, SIRT6 и коллагена I в молодых культурах значимо повышалась в 2.4, 1.7 и 2.3 раза по сравнению с соответствующим показателем в контроле.



**Рис. 1.** Влияние пептидов на площадь экспрессии SIRT1, SIRT6, коллагена I типа при репликативном старении фибробластов кожи.

1 — "молодая" культура, 2 — "старая" культура.

\* $p < 0.05$  по сравнению с соответствующим показателем в контроле.

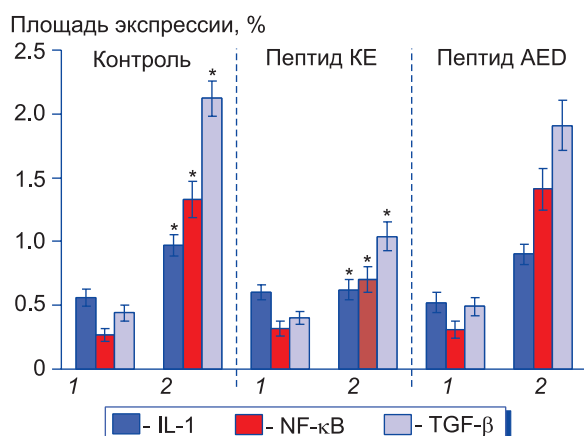


Экспрессия цитокинов IL-1, TGF- $\beta$ , фактора транскрипции NF- $\kappa$ B в старых культурах была достоверно выше, чем в молодых (рис. 2). Известно, что увеличение концентрации цитокинов в крови в пожилом и старческом возрасте является приспособительной реакцией, направленной на активацию иммунитета [2]. С возрастом происходит повышение активности NF- $\kappa$ B, что приводит к хроническому воспалению, оксидативному стрессу, дегенеративным заболеваниям.

Пептид KE значительно снижал экспрессию IL-1, NF- $\kappa$ B, TGF- $\beta$  в старых культурах фибробластов кожи в 1.6, 1.9 и 2 раза по сравнению с соответствующим показателем в контроле (рис. 2). Пептид AED не влиял на экспрессию белков IL-1, NF- $\kappa$ B, TGF- $\beta$  ни в молодых, ни в старых культурах фибробластов кожи человека.

В ранее проведённом исследовании пептиды KE и AED показали геропротективное действие в отношении фибробластов кожи крысы в модели репликативного старения. Оба этих пептида стимулировали экспрессию маркера пролиферации Ki-67 и белка CD98hc, характеризующего функциональную активность фибробластов при клеточном старении. Пептиды KE и AED в культурах кожи крыс снижали синтез фермента MMP-9, участвующего в биодegradации коллагена. При этом пептид AED снижал экспрессию маркера апоптоза, каспазы-3, а пептид KE не обладал таким эффектом [1].

В данном исследовании, выполненном на фибробластах кожи человека при их репликативном старении, ещё сильнее проявилось различие в действии пептидов KE и AED. Возможно, это связано с видовой специфичностью



**Рис. 2.** Влияние пептидов на площадь экспрессии IL-1, NF- $\kappa$ B, TGF- $\beta$  при репликативном старении фибробластов кожи.

1 — "молодая" культура, 2 — "старая" культура.

\* $p < 0.05$  по сравнению с соответствующим показателем в контроле.

фибробластов кожи. Пептид KE снижал синтез иммунных белков-стимуляторов воспалительной реакции IL-1, NF- $\kappa$ B, TGF- $\beta$  и стимулировал синтез SIRT6. Поскольку при старении во всех тканях организма развивается слабо выраженный воспалительный процесс (inflamm-aging) [8], можно предположить, что пептид KE нормализует иммунологическую функцию фибробластов кожи человека при их репликативном старении. Эти результаты согласуются с ранее выявленными в экспериментах *in vivo* и *in vitro* данными о нормализации функций клеток иммунной системы под действием пептида KE [3,6,11,12]. Пептид AED активировал синтез SIRT1, SIRT6, коллагена I в фибробластах кожи человека при их "старении". Известно, что с возрастом развивается оксидативный стресс, который способствует снижению синтеза белков-регуляторов функций клетки, активации апоптоза, нарушению структуры цитоскелета фибробластов и процессов ремоделирования межклеточного матрикса. Пептид AED, обладающий геропротективными свойствами, нивелирует возрастные изменения за счёт активации синтеза сиртуинов и коллагена I типа, способствуя нормализации функции фибробластов. При этом пептид KE стимулировал экспрессию SIRT6 и непосредственно снижал синтез NF- $\kappa$ B. Возможно, опосредованное сигнальными каскадами действие пептидов не имеет такой высокой биологической значимости, как их непосредственное действие на синтез тех или иных белков — маркеров старения и функциональной активности фибробластов кожи.

Таким образом, действие дипептида KE направлено на снижение экспрессии иммунных белков (IL-1, NF- $\kappa$ B, TGF- $\beta$ ) в фибробластах кожи человека, предотвращение старения (inflamm-aging), а трипептид AED активирует синтез коллагена I типа, SIRT1, SIRT6. Надо полагать, что пептид AED оказывает геропротективное действие. Таким образом, пептиды KE и AED регулируют экспрессию сигнальных молекул в фибробластах кожи при её старении.

## Литература

1. Линькова Н.С., Дробинцева А.О., Орлова О.А., Кузнецова Е.П., Полякова В.О., Кветной И.М., Хавинсон В.Х. Пептидная регуляция функций фибробластов кожи при их старении *in vitro* // Клет. технол. в биологии и медицине. 2016, № 1. С. 40-44.
2. Хавинсон В.Х., Кузник Б.И., Линькова Н.С., Проняева В.Е. Влияние пептидных биорегуляторов и цитокинов на продолжительность жизни и возрастные изменения системы гемостаза (обзор литературы и собственных результатов) // Успехи физиол. наук. 2013. Т. 44, № 1. С. 39-54.



3. *Хавинсон В.Х., Рыжак Г.А.* Пептидные биорегуляторы в коррекции возрастных изменений // Эстетическая медицина. 2010. Т. 9, № 4. С. 409-413.
4. *Хавинсон В.Х., Тарновская С.И., Линькова Н.С., Гумон Е.О., Елашкина Е.В.* Эпигенетические аспекты пептидной регуляции пролиферации эндотелия сосудов при его старении // Успехи геронтол. 2014. Т. 27, № 1. С. 108-114.
5. *Anisimov V.N., Khavinson V.Kh.* Peptide bioregulation of aging: results and prospects // Biogerontology. 2010. Vol. 11, N 2. P. 139-149.
6. *Borges J., Araújo L., Cuzzi T., Martinez L., Gonzales Y., Manela-Azulay M.* Fractional laser resurfacing treats photoaging by promoting neocollagenesis and cutaneous edema // J. Clin. Aesthet. Dermatol. 2020. Vol. 13, N 1. P. 22-27.
7. *Chang H.C., Guarente L.* SIRT1 and other sirtuins in metabolism // Trends Endocrinol. Metab. 2014. Vol. 25, N 3. P. 138-145.
8. *Franceschi C., Campisi J.* Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases // J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. 2014. Vol. 69, Suppl. 1. P. S4-S9.
9. *Helmo F.R., Machado J.R., Guimarães C.S., Teixeira Vde P., dos Reis M.A., Corrêa R.R.* Fetal wound healing biomarkers // Dis. Markers. 2013. Vol. 35, N 6. P. 939-944.
10. *Khalil H., Kanisicak O., Prasad V., Correll R.N., Fu X., Schips T., Vagnozzi R.J., Liu R., Huynh T., Lee S.J., Karch J., Molkentin J.D.* Fibroblast-specific TGF- $\beta$ -Smad2/3 signaling underlies cardiac fibrosis // J. Clin. Invest. 2017. Vol. 127, N 10. P. 3770-3783.
11. *Khavinson V.Kh., Malinin V.V.* Gerontological aspects of genome peptide regulation. Basel, 2005.
12. *Kolchina N., Khavinson V., Linkova N., Yakimov A., Baitin D., Afanasyeva A., Petukhov M.* Systematic search for structural motifs of peptide binding to double-stranded DNA // Nucleic Acids Res. 2019. Vol. 47, N 20 P. 10 553-10 563.
13. *Mendes K.L., Lelis D.F., Santos S.H.S.* Nuclear sirtuins and inflammatory signaling pathways // Cytokine Growth Factor Rev. 2017. Vol. 38. P. 98-105.
14. *Simmonds R.E., Foxwell B.M.* Signalling, inflammation and arthritis: NF-kappaB and its relevance to arthritis and inflammation // Rheumatology (Oxford). 2008. Vol. 47, N 5. P. 584-590.
15. *Woodley D.T.* Distinct fibroblasts in the papillary and reticular dermis: implications for wound healing // Dermatol. Clin. 2017. Vol. 35, N 1. P. 95-100.

Получено 12.03.20