

ISSN 1561-9125

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК  
ГЕРОНТОЛОГИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО

№ 5 2017  
Том  
Vol. 30

# Успехи ГЕРОНТОЛОГИИ

Advances in Gerontology

Демография старения  
Молекулярные механизмы  
старения  
Патогенез заболеваний,  
ассоциированных с возрастом



САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

Н. В. Фридман<sup>1</sup>, Н. С. Линькова<sup>1,2</sup>, В. О. Полякова<sup>3,4</sup>, А. О. Дробинцева<sup>3,5</sup>,  
С. В. Трофимова<sup>1</sup>, И. М. Кветной<sup>3,4</sup>, В. Х. Хавинсон<sup>1,6</sup>

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АСПЕКТЫ ГЕРОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ ПЕПТИДА KE В КУЛЬТУРЕ ФИБРОБЛАСТОВ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, 197110, Санкт-Петербург, пр. Динамо, 3; e-mail: linkova@gerontology.ru; <sup>2</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29; <sup>3</sup> НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д. О. Отта, 199034, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, 3; <sup>4</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9; <sup>5</sup> Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, 194353, Санкт-Петербург, Литовская ул., 2; <sup>6</sup> Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6

Старение кожи является актуальной проблемой современной геронтокосметологии. Одним из перспективных методов замедления процесса возрастных изменений кожи является применение косметики с короткими пептидами. Цель работы — изучение влияния пептида KE (*Lys-Glu*, Вилон) на экспрессию маркеров старения фибробластов кожи человека в модели *in vitro*. Методом иммунофлюоресцентной конфокальной микроскопии в «молодых» и «старых» культурах фибробластов кожи изучена экспрессия коллагена 1-го типа и сиртуина-6. Установлено, что при старении в культурах фибробластов кожи площадь экспрессии коллагена 1-го типа и сиртуина-6 снижается, соответственно, в 3,5 и 3,6 раза. Пептид KE повышает площадь экспрессии коллагена 1-го типа в «старых» культурах фибробластов кожи на 83%, увеличивает площадь экспрессии сиртуина-6 в «молодых» и «старых» культурах фибробластов кожи, соответственно, в 1,6 и 2,6 раза. Таким образом, пептид KE повышает функциональную активность фибробластов кожи и замедляет их старение.

**Ключевые слова:** фибробласты кожи, клеточное старение, пептид KE

Процесс старения кожи обусловлен эпигенетическими и генетическими факторами. Генетические структурные изменения кожи являются следствием метилирования генов, кодирующих сигнальные молекулы, которые регулируют функциональную активность клеток кожи и носят индивидуальный характер. Генетические и эпигенетические факторы старения вызывают гистологические изменения кожи, которые заключаются в уплотнении эпидермальных гребней, ослаблении поверхностных контактов между эпидермисом и дермой, что приводит к ухудшению обмена питательными веществами и метаболитами между слоями кожи.

Скорость возрастных изменений в коже неодинакова у мужчин и женщин и зависит от гормонального фона организма. Эпигенетические факторы, включающие воздействие солнечных лучей, загрязнение окружающей среды, курение, повторяющиеся движения лицевых мышц, образ жизни, можно контролировать с помощью различных профилактических мер [3]. К препаратам, способствующим замедлению процессов старения кожи, относятся короткие пептиды. Так, методом иммунофлюоресцентной конфокальной микроскопии было изучено влияние пептидов KE (*Lys-Glu*, Вилон), KED (*Lys-Glu-Asp*, Везуген), AED (*Ala-Glu-Asp*, Карталакс) и AEDG (*Ala-Glu-Asp-Gly*, Эпиталон) на процессы пролиферации (Ki67), регенерации и старения (CD98hc), апоптоза (каспаза-3) и ремоделирования межклеточного матрикса (ММП-9) в фибробластах кожи при их старении в культуре. Все изученные пептиды снижали синтез ММП-9, возрастающий при старении фибробластов кожи крыс, и повышали экспрессию молекул Ki67, CD98hc, синтез которых снижается при клеточном старении. Пептиды AED и AEDG снижали выраженность каспаза-зависимого апоптоза, повышающегося при старении культур клеток [1].

Пептид KE — один из представителей пептидных тимомиметиков, который был обнаружен в составе тималина. При изучении иммуномодулирующих свойств пептида KE было установлено, что он стимулирует клеточный иммунитет и неспецифическую резистентность организма, а также оказывает стимулирующее действие на макрофаги и нейтрофилы [4, 5]. Пептид KE усиливает процессы дифференцировки лимфоидных клеток, кроме того, он проявил выраженные геропротек-

торные свойства в модели ускоренного (радиационного) старения организма и способствовал увеличению продолжительности жизни животных [8]. При этом молекулярно-клеточные аспекты геронпротекторного действия пептида *KE* в отношении фибробластов кожи человека в настоящее время изучены недостаточно.

Цель работы — изучение влияния пептида *KE* на экспрессию маркеров старения фибробластов кожи человека в модели *in vitro*.

### Материалы и методы

Фибробласты выделяли из кожи окологубной области, полученной в результате операции по круговой подтяжке лица у женщины (1970 г. р.). После получения кожу обрабатывали в стерильных условиях раствором диспазы II в концентрации 2,4 ЕД/мл в течение 18 ч при 4 °С, затем механически отделяли эпидермис от дермы. Для получения суспензии клеток дерму измельчали ножницами до кусочков размером 2–3 мм и помещали в раствор коллагеназы I типа в среду M199. Полученную суспензию клеток осаждали при 1000 об/мин в течение 5 мин, после чего осадок клеток ресуспендировали в питательной среде. Питательная среда состояла из среды M199, 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 1% *L*-глутамин, 1,5% *Neres*-буфера и раствора пенициллина и стрептомицина (пенициллин—стрептомицин, 100-кратный раствор, «ПанЭко», флакон 5 мл содержит: пенициллина — 5000 ед/мл, стрептомицина — 5000 мкг/мл, растворитель — 0,9% *NaCl*). Через 5 дней первичная культура достигала монослоя и ее пересеивали в соотношении 1:3. Для снятия клеток с подложки использовали раствор трипсина—версена (соотношение трипсина и версена 1:1, стерильный, готовый к использованию во флаконах по 200 мл, «Биолот»), который добавляли по 500 мкл на флакон (объем 50 мл, площадь 25 см<sup>2</sup>, стерильный, с адгезивной поверхностью и вентилируемой крышкой, CellATTACH, «Jet Biofil»), время действия — 3 мин при  $t=37$  °С. Открепление клеток от подложки контролировали под микроскопом. Для блокирования ферментативной реакции добавляли полную питательную среду по 5 мл на флакон. Затем суспензию клеток центрифугировали 5 мин при 1000 об/мин. Концентрация клеток для нулевого пассажа составила 50 тыс. клеток на 1 мл среды в одной лунке 24-луночного планшета (стерильный, с адгезивной поверхностью, CellATTACH, «Jet Biofil»). Пассирование

производили через 3 сут на 4-е, когда культура достигала монослоя. Культивирование проводили до 3-го и 14-го пассажа, на котором клетки были рассеяны на планшет.

Клетки 3-го и 14-го пассажа были разделены на три группы: 1-я — контрольные культуры (без добавления пептида); 2-я — культуры с добавлением пептида *KE* в концентрации 20 нг/мл; 3-я — культуры с добавлением контрольного панкреопротекторного пептида *KEDW* (Панкраген, *H-Lys-Glu-Asp-Trp-NH<sub>2</sub>*) в концентрации 20 нг/мл [7]. Концентрацию пептидов 20 нг/мл выбрали потому, что в предыдущих исследованиях она оказалась наиболее эффективной в отношении фибробластов кожи для других коротких пептидов [1]. В соответствии с рекомендацией Международной ассоциации исследований клеточных культур (Сан-Франциско, 2007), 3-й пассаж расценивали как «молодые», а 14-й — как «старые» культуры. Затем было произведено иммуноцитохимическое окрашивание культур. Для проведения пермеабилзации использовали 0,1% Тритон X-100 («Биолот»), растворенный в фосфатно-солевом буфере. Затем культуры клеток инкубировали в 1% фосфатно-солевом буфере ( $pH$  7,5) в течение 30 мин для блокировки неспецифического связывания. Инкубацию с первичными антителами проводили в течение 60 мин. В работе использовали первичные моноклональные антитела к коллагену 1-го типа (1:100, «Abcam», США) и сиртуину-6 (1:200, «Abcam», США).

Конфокальную микроскопию клеток проводили в инвертированном конфокальном микроскопе «Olympus» Fluoview CM FV300-IX70 с использованием апохроматического объектива 60Б UPlan. Для спецификации флюоресценции исследуемых маркеров использовали волну возбуждения аргонового лазера 488 нм. Ядра клеток окрашивали Hoechst 33258 («Sigma»), в результате чего они флюоресцировали темно-синим. Зеленая или красная флюоресценция характеризовала экспрессию исследуемых маркеров (инкубация с вторичными антителами, конъюгированными с флюорохромом Alexa Fluor 488 (1:1000, «Abcam») или Alexa Fluor 647 (1:1000, «Abcam»), в течение 30 мин при комнатной температуре, в темноте). Готовые препараты заключали под покровные стекла в монтирующую среду Dako Fluorescent Mounting Medium («Dako», США).

Для анализа полученных результатов использовали программное обеспечение ВидеоТест-Морфология 5.2, как было описано ранее [6, 10].

В каждом случае анализировали пять полей зрения при ув. 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. Также в условных единицах (у. е.) оценивали оптическую плотность экспрессии, отражающую количество исследуемого маркера, синтезируемого в одной клетке.

В статистическую обработку данных был включен подсчет среднего арифметического, стандартного отклонения и доверительного интервала для каждой выборки, обработку проводили в программе Statistica 6.0. 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 значимую неоднородность нескольких выборок, для последующего выявления неоднородных групп (путем 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 и обсуждение

Площадь экспрессии коллагена 1-го типа в «старых» культурах фибробластов была в 3,5 раза ниже, чем в «молодых» культурах (табл. 1). При этом оптическая плотность экспрессии коллагена 1-го типа в «молодых» и «старых» культурах фибробластов кожи достоверно не различалась (табл. 2). Полученные данные свидетельствуют о том, что при старении количество фибробластов кожи, в которых происходит активный синтез коллагена 1-го типа, снижается. Пептид *KE* повышал площадь экспрессии коллагена 1-го типа в «старых» культурах фибробластов на 83%, но не влиял на этот показатель в «молодых» культурах (см. табл. 1, рисунок). При этом пептид *KE* повышал оптическую плотность экспрессии коллагена 1-го типа в «молодых» и «старых» культурах фибробластов, соответственно, на 9 и 21% (см. табл. 2). Пептид *KEDW*, тропный к ткани поджелудочной железы, не влиял на площадь и оптическую плотность экспрессии коллагена в культурах фибробластов кожи при их старении.

Площадь экспрессии сиртуина-6 в «старых» культурах фибробластов была в 3,6 раза ниже, чем в «молодых» культурах (см. табл. 1). Такую же тенденцию наблюдали и для оптической плотности. Оптическая плотность экспрессии сиртуина-6 в «старых» культурах фибробластов кожи

Таблица 1

Влияние пептидов на площадь экспрессии маркеров старения фибробластов кожи

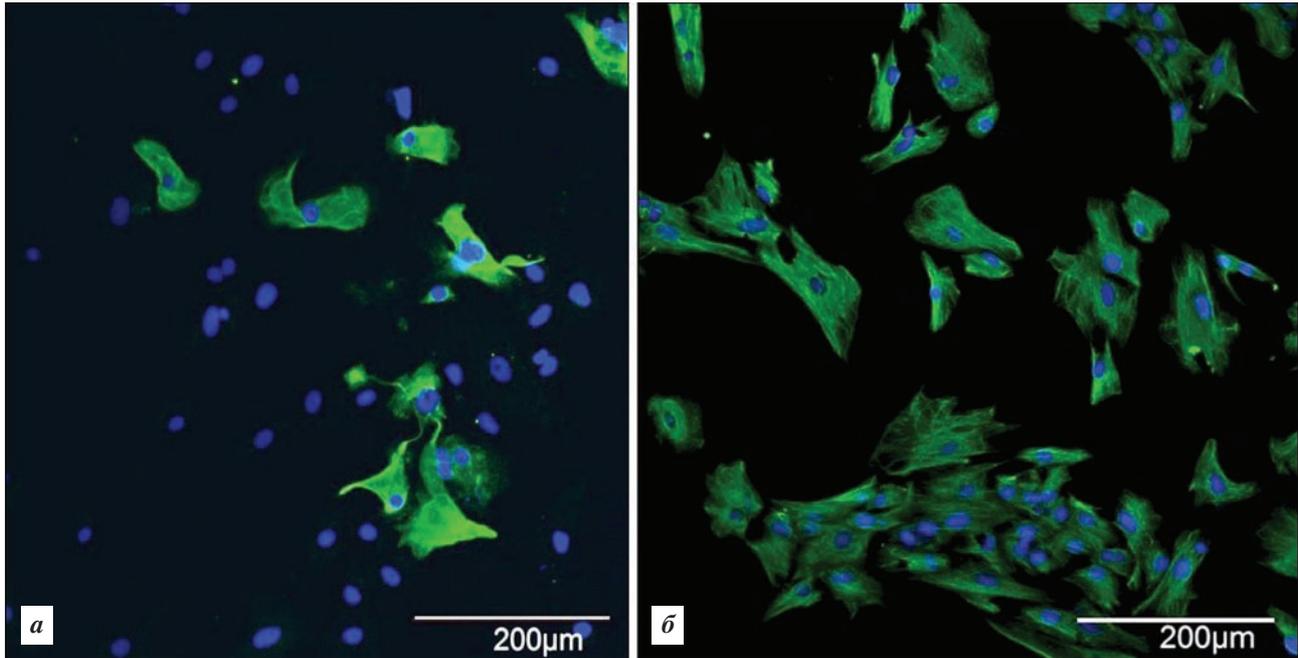
Маркер	Площадь экспрессии, %					
	«молодые» культуры			«старые» культуры		
	контрольные культуры	пептид <i>KE</i>	пептид <i>KEDW</i>	контрольные культуры	пептид <i>KE</i>	пептид <i>KEDW</i>
Коллаген 1-го типа	27,22±2,78	29,75±1,10	26,13±2,98	7,92±1,51*	14,54±1,17**	8,16±1,76
Сиртуин-6	8,54±1,16	13,69±0,73**	6,79±2,00	2,37±0,31*	6,12±0,63**	2,03±0,42

Примечание. Здесь и табл. 2: \*  $p < 0,05$  по сравнению с соответствующим показателем в контроле в «молодых» культурах; \*\*  $p < 0,05$  по сравнению с соответствующим показателем в контроле.

Таблица 2

Влияние пептидов на оптическую плотность экспрессии маркеров старения фибробластов кожи

Маркер	Площадь экспрессии, %					
	«молодые» культуры			«старые» культуры		
	контрольные культуры	пептид <i>KE</i>	пептид <i>KEDW</i>	контрольные культуры	пептид <i>KE</i>	пептид <i>KEDW</i>
Коллаген 1-го типа	34,7±1,8	37,9±0,9**	32,2±0,8	31,4±2,2	38,0±2,1**	31,6±1,8
Сиртуин-6	20,1±2,3	26,5±1,4**	21,3±1,4	7,6±0,5*	10,9±0,6**	7,3±0,7



Экспрессия коллагена 1-го типа в культуре фибробластов кожи на 14-м пассаже («старая» культура):  
а — контроль; б — пептид *KE*.

Имунофлуоресцентная конфокальная микроскопия, ув. 200; ядра клеток докрашены Hoechst 33258 — темно-синяя флуоресценция; зеленая флуоресценция — окрашивание на коллаген 1-го типа

была в 2,6 раза ниже, чем в «молодых» клетках (см. табл. 2). Полученные данные свидетельствуют о том, что при старении количество фибробластов кожи, в которых синтезируется сиртуин-6, снижалось. Пептид *KE* повышал площадь экспрессии сиртуина-6 в «молодых» и «старых» культурах фибробластов, соответственно, в 1,6 и 2,6 раза (см. табл. 1). Пептид *KE* повышал оптическую плотность экспрессии сиртуина-6 в «молодых» и «старых» культурах фибробластов, соответственно, в 1,3 и 1,4 раза (см. табл. 2). Пептид *KEDW* не влиял на площадь и оптическую плотность экспрессии сиртуина-6 в культурах фибробластов кожи при их старении.

### Закключение

Удельный вес коллагена в коже снижается при хронологическом старении и при фотостарении. В ходе морфометрических исследований кожи живота у пациентов разных возрастных групп (10–75 лет) выявлено прогрессивное уменьшение доли соединительной ткани, содержащей коллагеновые волокна, с возрастом. Эти изменения более выражены в средней части дермы и достигают существенных величин уже к 50 годам. При этом происходит снижение синтеза коллагена 1-го и 3-го типа [2]. Однако темпы снижения 1-го бо-

лее значимы, в связи с этим происходит изменение соотношения коллагена 3-го типа к коллагену 1-го типа (у молодых 15 и 80 %, соответственно), коррелирующее с возрастом пациентов [12]. Эти данные согласуются с полученными нами результатами, свидетельствующими о том, что площадь экспрессии коллагена 1-го типа в «старых» культурах фибробластов в 3,5 раза ниже, чем в «молодых» культурах. При этом пептид *KE* может частично замедлять возрастное снижение синтеза коллагена в фибробластах кожи человека, повышая их функциональную активность.

Белок сиртуин-6 (*SIRT6*) является критическим регулятором транскрипции стабильности генома, длины теломер, репарации ДНК и метаболического гомеостаза [11]. Сиртуин-6 модулирует теломерный хроматин, деацетилируя лизин 9 гистона *H3* и предотвращая теломерную дисфункцию и раннее клеточное старение [9]. Выявленное нами снижение синтеза сиртуина-6 в фибробластах кожи при их старении и повышение экспрессии этого белка под действием пептида *KE* может указывать на перспективность применения этого пептида в качестве геропротектора в косметологии.

## Литература

1. Линькова Н.С., Дробинцева А.О., Орлова О.А. и др. Пептидная регуляция функций фибробластов кожи при их старении *in vitro* // Клеточные технологии в биол. и мед. 2016. № 1. С. 40–44.
2. Смирнова Г.О., Мантурова Н.Е., Топчиева Г.В. и др. Прогнозирование результатов эстетических вмешательств по механизмам старения кожи и соотношению коллагена III типов // Фундаментальные исследования. 2012. № 7. С. 191–194.
3. Хавинсон В.Х., Линькова Н.С., Куканова Е.О. и др. Молекулярные механизмы снижения функциональной активности клеток кожи при ее старении // Успехи физиол. наук. 2016. Т. 47. № 2. С. 62–76.
4. Anisimov V.N., Khavinson V.Kh. Peptide bioregulation of aging: results and prospects // *Biogerontology*. 2010. Vol. 11. № 2. P. 139–149.
5. Khavinson V.Kh., Kuznik B.I., Ryzhak G.A. Peptide bioregulators: the new class of geroprotectors. Message 2. Clinical studies results // *Adv. Geront.* 2013. Vol. 26. № 1. P. 20–37.
6. Khavinson V.Kh., Polyakova V.O., Linkova N.S. et al. Peptides regulate cortical thymocytes differentiation, proliferation, and apoptosis // *J. Amino Acids*. 2011. Vol. 2011. P. 1–5.
7. Khavinson V.Kh., Tendler S.M., Kasyanenko N.A. et al. Tetrapeptide KEDW Interacts with DNA and Regulates Gene Expression // *Amer. J. Biomed. Sci.* 2015. Vol. 7. № 3. P. 156–169.
8. Linkova N.S., Poliakova V.O., Kvetnoi I.M. et al. Characteristics of the pineal gland and thymus relationship in aging // *Adv. Geront.* 2011. Vol. 24. № 1. P. 38–42.
9. Michishita E., McCord R.A., Berber E. et al. SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin // *Nature*. 2008. Vol. 452. № 7186. P. 492–496.
10. Paltsev M.A., Polyakova V.O., Kvetnoy I.M. et al. Morphofunctional and signaling molecules overlap of pineal gland and thymus: role and significance in aging // *Oncotarget*. 2016. Vol. 7. № 11. P. 11972–11983.
11. Sharma A., Diecke S., Zhang W.Y. et al. The role of SIRT6 protein in aging and reprogramming of human induced pluripotent stem cells // *J. Biol. Chem.* 2013. Vol. 288. № 25. P. 18439–1847.
12. Yang H., Li J., Wang Q.H. Role of CD14 and TLR4 in type I, type III collagen expression, synthesis and secretion in LPS-induced normal human skin fibroblasts // *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015. Vol. 8. № 2. P. 2429–2434.

*Adv. geront.* 2017. Vol. 30. № 5. P. 698–702

N. V. Fridman<sup>1</sup>, N. S. Linkova<sup>1,2</sup>, V. O. Polyakova<sup>3,4</sup>, A. O. Drobintseva<sup>3,5</sup>, S. V. Trofimova<sup>1</sup>,  
I. M. Kvetnoy<sup>3,4</sup>, V. Kh. Khavinson<sup>1,6</sup>

**MOLECULAR ASPECTS OF KE PEPTIDE GEROPROTECTIVE EFFECT  
IN THE CULTURE HUMAN SKIN FIBROBLASTS**

<sup>1</sup> Saint-Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, 3, Dynamo pr., St. Petersburg, 197110; e-mail: linkova@gerontology.ru; <sup>2</sup> Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University, 29, Polytechnicheskaya str., St. Petersburg, 195251; <sup>3</sup> D. J. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology, 3, Mendeleevskaya line, St. Petersburg, 199034; <sup>4</sup> Saint-Petersburg University, 7/9, Universitetskaya emb., St. Petersburg; <sup>5</sup> Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, 2, Litovskaya Str., St. Petersburg, 194353; <sup>6</sup> Pavlov Institute of Physiology of RAS, 6, Makarova emb., St. Petersburg, 199034

Skin aging is one of the topical issues in modern gerontocosmetology. Application of cosmetic products with short peptides is a promising measure for retardation of skin aging. This research is aimed at investigation of *KE* (*Lys-Glu*, *Vilon*) dipeptide influence on the expression of markers of aging in human skin fibroblasts *in vitro*. Collagen type I and sirtuin-6 expression in «young» and «old» skin cell fibroblasts cultures was studied using immunofluorescence confocal microscopy method. The areas of expression of collagen type I and sirtuin-6 are known to decrease in skin fibroblasts with aging by 3,5 and 3,6 times accordingly. *KE* dipeptide increases collagen type I expression area in «old» skin fibroblasts cultures by 83%. *KE* dipeptide increases expression area of sirtuin-6 in «young» and «old» skin fibroblasts cultures by 1,6 and 2,6 times correspondingly. Thus, *KE* dipeptide promotes functional activity of skin fibroblasts and inhibits their aging.

**Key words:** skin fibroblasts, cell senescence, *KE* peptide