

О. М. Ивко¹, А. О. Дробинцева², Д. О. Леонтьева¹,
И. М. Кветной^{3,4}, В. О. Полякова^{2,4}, Н. С. Линькова^{1,5,6}

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДОВ AEDG И KE НА ОКРАСКУ МИТОХОНДРИЙ И ЭКСПРЕССИЮ БЕЛКА РИБОСОМ L7A ПРИ СТАРЕНИИ КЛЕТОК ЭПИФИЗА И ТИМУСА ЧЕЛОВЕКА IN VITRO

¹ Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, 197110, Санкт-Петербург, пр. Динамо, 3, e-mail: ibg@gerontology.ru; ² Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, 2; ³ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии, 191036, Санкт-Петербург, Лиговский пр., 2–4; ⁴ Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург, Университетская набережная, 7–9; ⁵ Академия постдипломного образования, 125371, Москва, Волоколамское шоссе, 91; ⁶ Белгородский национальный исследовательский государственный университет, 308009, Белгород, ул. Победы, 85

Методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии верифицированы новые молекулярные мишени действия геропротекторных пептидов AEDG (эпиталона) и KE (вилона). Показано, что при старении клеток эпифиза и тимуса *in vitro* окраска митохондрией *MitoTracker Red* снижается, а синтез рибосомального белка L7A компенсаторно возрастает. Пептид AEDG в 1,5 раза повышал площадь окрашивания митохондрий *MitoTracker Red* и на 22% снижал экспрессию белка рибосом L7A в культурах клеток эпифиза человека при их репликативном старении. Пептид KE в 1,5 раза повышал площадь окрашивания митохондрий *MitoTracker Red* и на 15% снижал экспрессию белка рибосом L7A в культурах клеток тимуса человека при их репликативном старении. Можно предположить, что пептиды AEDG и KE обладают тканеспецифическим свойством, нормализующим функции митохондрий и рибосом пинеалоцитов и тимоцитов.

Ключевые слова: короткие пептиды, эпифиз, тимус, старение, митохондрии, рибосомы

Современные представления позволяют рассматривать старение как процесс хронического, слабого воспаления (inflammaging) [22]. Этот процесс наблюдается у лиц пожилого возраста и выражается в повышении уровня медиаторов воспаления, таких как С-РБ, IL-6 и фибриноген в крови [22]. Тенденция к увеличению средней продолжительности жизни населения подчеркивает необходимость глубокого изучения механизмов, связанных с возрастным снижением функционирования иммунной системы. Известно, что возрастным изменениям наиболее подвержены Т-лимфоциты. Инволюция костного мозга и микроокружения тимуса приводит к снижению коли-

чества Т-лимфоцитов и угасанию функции адаптивной иммунной системы [18, 19].

Последние десятилетия активно обсуждается роль митохондрий в процессе старения. Митохондрии состоят из отдельных компартментов, матрикс окружен внутренней митохондриальной мембраной, которая отделена межмембранным пространством от наружной мембраны. Наружная митохондриальная мембрана содержит белки Tom70 или Tom20, несущие транспортную функцию. Оба белка являются ключевыми для идентификации митохондрий. Внутренняя мембрана митохондрий обладает мембранным потенциалом, который запускает синтез АТФ. Таким образом, функционирование внутренней мембраны, а именно поддержание потенциала, служит важным критерием оценки производительности данного органа и процессов старения [24].

Подробное изучение сигнальных внутриклеточных коммуникаций позволило выявить перспективный маркер L7A, с помощью которого визуализируется 60S рибосомальная субъединица. Белок L7A входит в состав данной субъединицы. Установлено, что его экспрессия способна отражать характер развития процессов опухолевого роста и старения [25, 27–29].

Роль митохондрий в старении клеток. *MitoTracker Red* как маркер функционального состояния митохондрий при старении

Разработка флуоресцентных красителей произвела революцию в исследовании органелл в раз-

личных экспериментальных условиях, так как эти красители способны непосредственно включаться в органеллы, позволяя им быть визуализированными под микроскопом. Одними из флюоресцентных красителей, используемых для маркировки митохондрий, являются зонды *MitoTracker*. Краситель *MitoTracker* является катионным флюорофором, который накапливается в митохондриях. В отличие от *TMRM* и родамина 123, краситель *MitoTracker* обладает реакционно-способной хлорметильной группой, которая образует ковалентную связь с тиолами белков и пептидов митохондрий [20].

Важным достоинством зонда *MitoTracker* является его способность окрашивать живые и фиксированные клетки. Органоиды сохраняют краситель *MitoTracker* после потери их мембранного потенциала [9]. Благодаря данному свойству *MitoTracker* стало возможным изучать морфологию митохондрий, их количество и биоэнергетику [24]. Так как отличительной чертой ранних стадий апоптоза является разрушение митохондрий, включая изменения мембранного и окислительно-восстановительного потенциала, *MitoTracker Red* специально предназначен для анализа потенциала мембран митохондрий в живых клетках с помощью проточной цитометрии и конфокальной микроскопии [9].

Наряду с этим, *T*-клетки подвергаются метаболическому перепрограммированию во время их дифференцировки [26]. Было показано, что покоящиеся *T*-клетки, такие как наивные *T*-лимфоциты и клетки памяти, прежде всего используют высокоэффективное окислительное фосфорилирование, тогда как в эффекторных *T*-лимфоцитах катаболические реакции представлены аэробным гликолизом. Таким образом, модуляция метаболических путей и потребностей *T*-клеток зависит от конкретных субпопуляций *T*-клеток. В присутствии кислорода образуется пируват, который полностью окисляется в митохондриях для получения энергии во многих типах клеток [17]. В *T*-клетках значительная часть глюкозы не окисляется, а ферментируется в лактат лактатдегидрогеназой. Этот процесс, несмотря на присутствие кислорода, называется аэробным гликолизом, или варбургским метаболизмом. Хотя данный метаболизм рассматривается как энергетически неэффективный, скорость гликолиза в 10–100 раз выше, чем окисление глюкозы митохондриями, что дает эквивалентные количества АТФ [13]. Дополнительная выгода метаболизма Варбурга лежит в путях, которые являются точками разветвления гликолиза (например,

пентозофосфатного пути). Высокая продукция АТФ, синтезированной за счет усиленного гликолиза, индуцирует пролиферацию *T*-клеток.

Помимо энергетического обмена, митохондрии участвуют в активации *T*-клеток через влияние вторичных мессенджеров. При активации *T*-клеток митохондрии локализуются в иммунном синапсе и в локусе, где они регулируют транспорт ионов кальция [19]. При проникновении ионов кальция в клетку усиливается выработка АФК при функционировании комплекса III дыхательной цепи, что приводит к усилению работы ядерного фактора активированных *T*-клеток (*NFAT*) и последующего синтеза *IL-2*. У стареющих *T*-клеток наблюдается снижение транспорта ионов кальция, что может быть отчасти связано с дефицитом регуляции митохондриального кальциевого обмена [17]. Это приводит к нарушениям в работе иммунного синапса и ведет к снижению передачи сигналов и активации *T*-клеток.

Функционирование рибосом при старении. Ribosomal protein L7A

Человеческий рибосомальный белок *L7A* является высоко консервативным, содержит 266 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу 30 кДа. *L7A* состоит из трех различных доменов ядерной локализации: аминокислотные остатки 23–51 (домен I), аминокислотные остатки 52–100 (домен II) и аминокислотные остатки 101–220 (домен III) [8]. Установлена связь между миокином (*Mnt*), ядрышковой функцией и старением у дрозофил. Избыточная экспрессия *Mnt* подавляет экспрессию генов, кодирующих нуклеолярные белки, которые, в свою очередь, снижают уровень *ρ*РНК. Нокаунт белков, участвующих в синтезе *ρ*РНК и биогенезе рибосом, продлевает среднюю продолжительность жизни [25].

Описаны механизмы регуляции трансляции, которые могут влиять на продолжительность жизни организмов [6, 10]. Продолжительность жизни организмов может увеличиваться при снижении интенсивности процессов трансляции, которой можно добиться путем воздействия на рибосомальные белки [23, 27]. Таким образом, исследование экспрессии протеинов, входящих в состав субъединиц рибосом, будет способствовать лучшему пониманию механизмов, лежащих в основе старения.

Рибосомальные белки представляют собой разнообразную группу протеинов, которые, помимо общего участия в сборке рибосом, могут выполнять другие функции. Одним из рибосомальных

белков, связанных со старением, является протеин *L7A*. Данный белок входит в состав большой субъединицы рибосом (60S) и играет критическую роль в их стабилизации путем связывания с иРНК. Этот белок может участвовать в росте и дифференцировке клеток, взаимодействуя с рецептором *TNR* гормонов щитовидной железы человека и рецептором *RAR* ретиноевой кислоты [11].

Дипептид вилон стимулирует клеточный иммунитет и неспецифическую резистентность организма, а также оказывает стимулирующее действие на макрофаги и нейтрофилы [1, 2]. Механизм действия пептида *KE* связан с его активирующим действием на *T*-клетки, что способствует распознаванию комплекса пептидного эпитопа с молекулой главного комплекса гистосовместимости, расположенной на поверхности макрофагов. Применение вилона оказывало угнетающее влияние на спонтанный канцерогенез у самок мышей линии *СВА*, что характеризовалось снижением в 1,5 раза частоты развития опухолей [1]. Иммуномодулирующее, антиканцерогенное, антиоксидантное и геропротекторное действие пептида *KE* в исследованиях *in vitro* и *in vivo* может быть связано с его способностью взаимодействовать со специфической последовательностью ДНК *TSCA* и регулировать экспрессию вовлеченных в эти процессы генов [15].

Тетрапептид эпиталон в исследованиях *in vivo* и *in vitro* обладает антиоксидантной активностью, регулирует функции эпифиза и синтез мелатонина, стимулирует дифференцировку нейронов, обладает иммуностимулирующими свойствами, снижает риск развития опухолевых заболеваний, регулирует функциональную активность нейроиммуноэндокринной системы, способствует увеличению длины теломера в нормальных фибробластах и лимфоцитах крови и преодолению лимита Хейфлика [3, 5, 7, 14, 21]. Цель исследования — изучение влияния пептидов вилона (*KE*) и эпиталона (*AEDG*) на экспрессию белка рибосом *L7A* и площадь окрашивания митохондрий *MitoTracker Red* в культурах клеток тимуса и эпифиза человека.

Материалы и методы

Исследование проводили на культурах тимоцитов и пинеалоцитов человека. Образцы ткани тимуса размером 1–2 мм³ получали во время операции по устранению врожденных пороков сердца у ребенка 3,5 лет, так как при обеспечении операционного доступа к сердцу удаляется часть тимуса.

Ткань эпифиза была получена у мужчины 25 лет при операции по удалению пинеаломы. В обоих случаях было получено информированное согласие пациентов или их родственников на использование оперативного материала в научных исследованиях. Сразу после получения ткани тимуса и эпифиза помещали в транспортную среду [среда *DMEM*+1% антибиотика/антимикотика («Gibco», США)]. Перед выделением клеток ткани промывали раствором Дальбекко без ионов кальция и магния. Фрагменты тимуса и эпифиза помещали в раствор коллагеназы I и II в пропорции 1:1 («Gibco», США).

Клетки тимуса выращивали в CO_2 -инкубаторе в стандартных условиях (5% CO_2 , 37 °C), в среде, содержащей 15% *FBS* (фетальной бычьей сыворотки), 82,5% *RPMI*, 1,5% *HEPES*-буфера с добавлением 0,5 мМ *L*-глутамин. Клетки эпифиза культивировали в тех же условиях в среде, содержащей *Neurobasal-A* («Gibco», США), 1% *FBS*, 0,5 мМ *L*-глутамин, 2% бессывороточную добавку *B-27* («Gibco», США). Для пересева клеток в соотношении 3:1 использовали раствор трипсин-версена. Культуры выращивали до 3-го пассажа («молодые» культуры) и до 14-го пассажа («старые» культуры). Культуры клеток тимуса и эпифиза 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 репликативного старения клеток.

Все образцы культур клеток были разделены на три группы: 1-я (контрольная) — добавление физиологического раствора; 2-я — добавление дипептида вилона (*KE*) в концентрации 100 нг/мл; 3-я — добавление тетрапептида эпиталона (*AEDG*) в концентрации 100 нг/мл. Физиологический раствор и исследуемые пептиды вводили в культуры при каждом пересеве клеток.

Верификацию белка *L7A* осуществляли иммунофлюоресцентным методом с использованием первичных антител *Anti-RPL7A antibody (rabbit polyclonal, 1:100, «Abcam», США)*. Митохондрии выявляли с помощью красителя *MitoTracker Red FM* («Thermo Fisher Scientific», США). Окрашивание препаратов проводили по стандартной методике. Для анализа полученных результатов использовали конфокальный лазерный сканирующий микроскоп «Olympus FluoView 1000» («Olympus», Япония) и программное обеспечение *Olympus FluoView ver 3.1b*. В каждом случае анализировали 10 полей зрения при ув. 400. Для оценки результата высчитывали относительный

уровень экспрессии (%) в программе Морфология 5.2. («ВидеоТест», Россия). Уровень экспрессии определяли как отношение площади иммуноокрашенных клеток к общей площади клеток в поле зрения и выражали в процентах. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили в программе Statistica 6.0 по критерию Стьюдента ($p < 0,05$) с оценкой среднего значения, стандартного отклонения и доверительного интервала. Для анализа вида распределения и проверки нулевой гипотезы использовали критерий Шапиро—Уилка. Для оценки статистической однородности нескольких выборок был использован критерий Крускалла—Уоллиса.

Результаты и обсуждение

Площадь окрашивания митохондрий MitoTracker Red и экспрессии белка рибосом L7A в культуре клеток эпифиза при их репликативном старении

Площадь окрашивания MitoTracker Red в контрольной группе «старых» культур клеток эпифиза была статистически значимо в 2 раза ниже по сравнению с «молодыми» культурами. Пептид AEDG в 1,5 раза повышал площадь окрашивания MitoTracker Red в «старых» культурах клеток эпифиза по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$), рис. 1, 2. Можно предположить, что при репликативном старении пинеалоцитов пептид

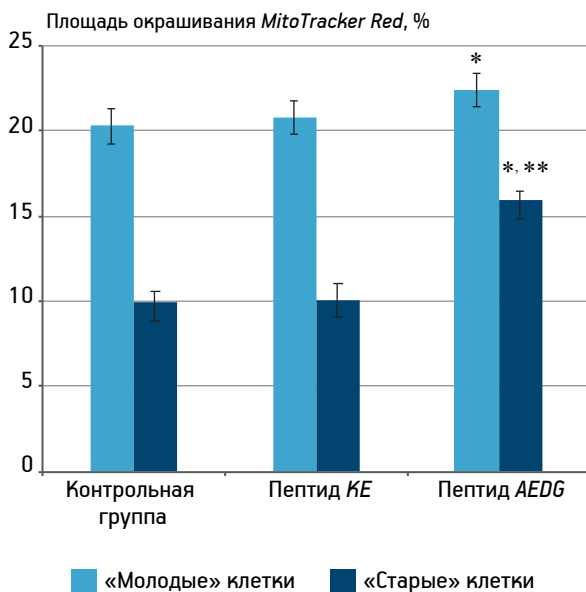


Рис. 1. Площадь окрашивания MitoTracker Red в «молодых» и «старых» клетках эпифиза человека. * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой «молодых» культур; ** $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой «старых» культур

AEDG повышает количество митохондрий в этих нейроэндокринных клетках.

Следующим этапом исследования была оценка экспрессии белка рибосом L7A в культуре пинеалоцитов человека при их репликативном старении. Белок рибосом L7A является компонентом большой субъединицы 60S и играет критическую роль в стабилизации рибосом путем связывания с рРНК.

При старении клеток эпифиза экспрессия рибосомального белка L7A в них не изменяется. Пептид AEDG статистически значимо снижает экспрессию белка L7A в «молодых» культурах на 30% и в «старых» — на 22% (рис. 3).

На данный момент проведен ряд исследований, направленных на изучение экспрессии белка L7A при различной патологии. Увеличение экспрессии данного рибосомального белка наблюдали во время реакции адаптации к травме, связанной с ишемической болезнью [12, 16]. Также существуют исследования, показавшие увеличение концентрации L7A при карциноме предстательной железы и колоректальной карциноме [27–29]. Исследование возрастных нарушений трансляционных процессов является крайне важной задачей для расширения знаний о процессах старения. При снижении интенсивности уровня репликации через воздействие на субъединицу 60S происходит увеличение продолжительности жизни живых организмов. Таким образом, снижение экспрессии рибосомального белка L7A в пинеалоцитах при их репликативном старении под действием пептида AEDG может являться одним из возможных механизмов геронотекторного действия этого вещества.

Площадь окрашивания митохондрий MitoTracker Red и экспрессии белка рибосом L7A в культуре клеток тимуса при их репликативном старении

Площадь окрашивания митохондрий MitoTracker Red в контроле «старых» культур клеток тимуса была статистически значимо в 1,7 раза ниже по сравнению с «молодыми» культурами. Пептид KE в 1,5 раза повышал площадь окрашивания MitoTracker Red в «старых» культурах клеток тимуса по сравнению с контрольными ($p < 0,05$), рис. 4. Можно предположить, что при репликативном старении тимоцитов пептид KE повышает количество митохондрий в иммунных клетках.

Исследования лимфоидной ткани при старении показывают развитие прогрессивно снижающейся митохондриальной дыхательной функции из-за снижения потенциала митохондриальной

мембраны и нарушенной митохондриальной функции [12]. В результате нарушения окислительного фосфорилирования снижается продукция АТФ, что ограничивает гликолиз, биосинтез, активацию и пролиферацию *T*-клеток при старении организма [10, 17]. Таким образом, выявленное ранее иммуномодулирующее и геропротекторное действие пептида КЕ на иммунные клетки [2, 4, 5] может реализовываться через повышение функциональной активности митохондрий.

При старении клеток тимуса экспрессия рибосомального белка *L7A* в них статистически значимо возрастает на 12%. Пептид КЕ достоверно ($p < 0,05$) снижает экспрессию белка *L7A* в «молодых» культурах на 24% и в «старых» — на 15% (рис. 5).

Установлено, что ядрышко участвует в поддержании стволовых клеток и регуляции продолжительности жизни, играет роль в различных клеточных функциях. На модели *Caenorhabditis elegans* было показано, что снижение уровня экспрессии

рибосомных протеинов, которые синтезируются в ядрышке, увеличивает продолжительность жизни модельных организмов. Кроме того, *C. elegans*, подвергнутые нокдауну *siRNA NOG-1*, который кодирует нуклеоллярную ГТФазу, необходимую для биогенеза рибосомы 60S, демонстрируют увеличение продолжительности жизни [20, 25]. Таким образом, снижение экспрессии рибосомального белка *L7A* в клетках тимуса человека при их «старении» под действием пептида КЕ может

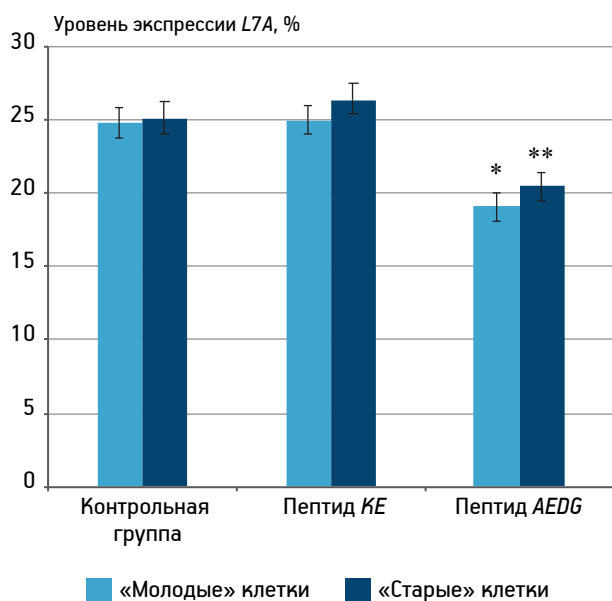


Рис. 3. Экспрессия белка рибосом *L7A* в «молодых» и «старых» клетках эпифиза человека. * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой «молодых» культур; ** $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой «старых» культур

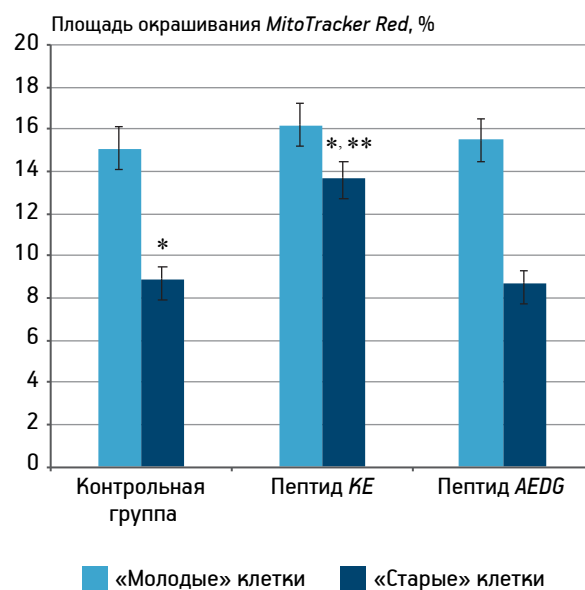


Рис. 4. Площадь окрашивания MitoTracker Red в «молодых» и «старых» клетках тимуса человека. * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой «молодых» культур; ** $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой «старых» культур

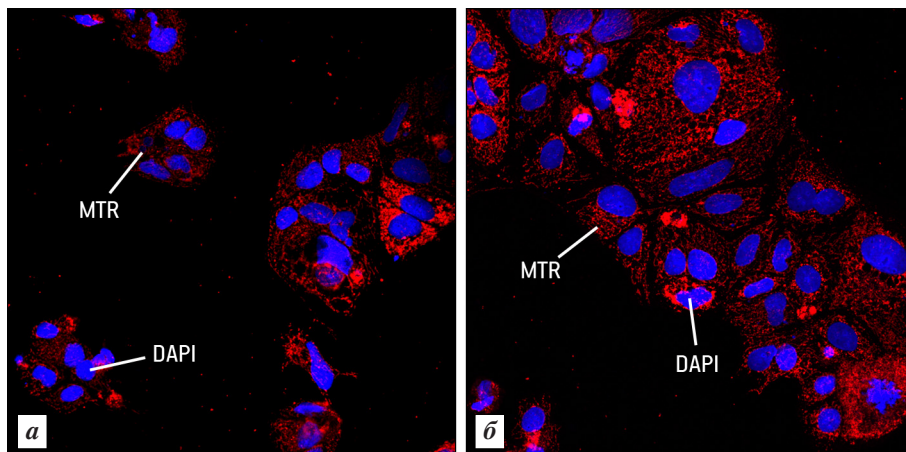


Рис. 2. Площадь окрашивания Mito Tracker Red (MTR) в «старых» клетках эпифиза человека, иммунофлуоресцентная конфокальная микроскопия, ув. 400: а — контрольная группа; б — пептид AEDG (ядра клеток докрашены DAPI)

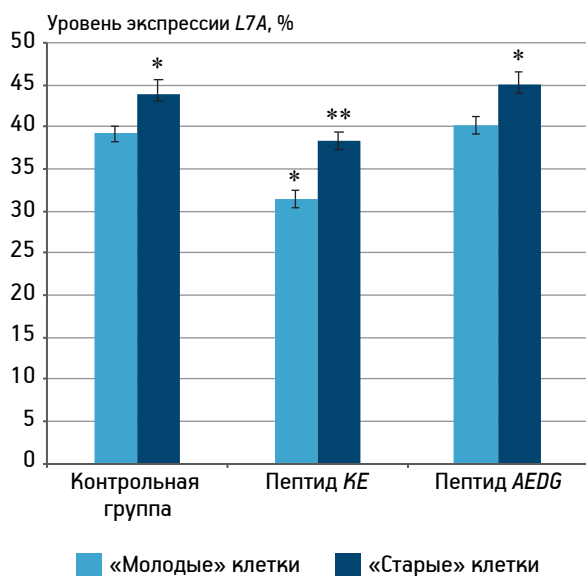


Рис. 5. Экспрессия белка рибосом L7A в «молодых» и «старых» клетках тимуса человека.

* $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой «молодых» культур; ** $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой «старых» культур

являться одним из проявлений геропротекторного действия этого пептида.

Закключение

Пептиды AEDG и KE обладают тканеспецифическими эффектами, реализуемыми через регуляцию экспрессии рибосомального белка L7A и влияние на митохондрии. В культурах клеток эпифиза человека при репликативном старении установлено снижение экспрессии белка рибосом L7A под действием пептида AEDG и увеличение площади окрашивания митохондрий MitoTracker Red по сравнению с контролем. Аналогичный эффект выявлен в культурах клеток тимуса человека при их «старении» при действии пептида KE. По литературным данным, повышение функции митохондрий и снижение количества рибосомальных белков является одним из факторов повышения клеточного метаболизма и замедления старения клеток. Таким образом, верифицированы новые возможные мишени действия пептидов AEDG и KE — белок рибосом L7A и митохондрии, что имеет важное значение для понимания фундаментальных основ геропротекции.

Конфликт интересов отсутствует.

Литература

1. Анисимов В.Н., Хавинсон В.Х. Применение пептидных биорегуляторов для профилактики рака: результаты 35-лет-

них исследований и перспективы // Вопр. онкол. 2009. Т. 55. № 3. С. 291–304.

2. Севостьянова Н.Н., Линькова Н.С., Полякова В.О. и др. Иммуномодулирующее действие вилона и его аналога в культурах клеток тимуса человека и животных // Клеточные технологии в биол. и мед. 2012. № 4. С. 220–223.

3. Хавинсон В.Х., Линькова Н.С., Кветной И.М. и др. Молекулярно-клеточные механизмы пептидной регуляции синтеза мелатонина в культуре пинеалоцитов // Бюл. экспер. биол. и мед. 2012. Т. 153. № 2. С. 223–226.

4. Хавинсон В.Х., Линькова Н.С., Пендина А.А. и др. Изучение влияния пептида KE на длину теломер хромосом ФГА-стимулированных лимфоцитов человека // Мед. акад. журн. 2019 (спец. вып.). С. 166–168.

5. Anisimov V.N., Khavinson V.Kh. Peptide bioregulation of aging: results and prospects // Biogerontology. 2010. Vol. 11. P. 139–149.

6. Calamita P., Gatti G., Miluzio A. et al. Translating the Game: Ribosomes as Active Players // Front. Genet. 2018. Vol. 9. P. 533. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00533>

7. Caputi S., Trubiani O., Sinjari B. et al. Effect of short peptides on neuronal differentiation of stem cells // Int. J. Immunopathol. Pharmacol. 2019. Vol. 33. P. 1–12.

8. De Falco S., Russo G., Angiolillo A., Pietropaolo C. Human L7a ribosomal protein: sequence, structural organization, and expression of a functional gene // Gene. 1993. Vol. 126. № 2. P. 227–235. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90371-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90371-9)

9. Dudek J., Rehling P., Van Der Laan M. Mitochondrial protein import: common principles and physiological networks // Biochim. Biophys. Acta. 2013. Vol. 1833 № 2. P. 274–85. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.05.028>

10. Gonskikh Y., Polacek N. Alterations of the translation apparatus during aging and stress response // Mech. Ageing Dev. 2017. Vol. 168. P. 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2017.04.003>

11. Jang T.H., Park J.H., Jeon J.H. et al. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of the N-terminal domain of human ribosomal protein L7a (RPL7a) // Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun. 2011. Vol. 67. № 4. P. 510–512. <https://doi.org/10.1107/S1744309111006415>

12. Jiang Q., Wu G., Yang L. et al. Elucidation of the FKBP25–60S Ribosomal Protein L7a Stress Response Signaling During Ischemic Injury // Cell Physiol. Biochem. 2018. Vol. 47. № 5. P. 2018–2030. <https://doi.org/10.1159/000491470>

13. Jones R.G., Thompson C.B. Revving the engine: signal transduction fuels T cell activation // Immunity. 2007. Vol. 27. № 2. P. 173–178. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.07.008>

14. Khavinson V., Diomedea F., Mironova E. et al. AEDG Peptide (Epitalon) Stimulates Gene Expression and Protein Synthesis during Neurogenesis: Possible Epigenetic Mechanism // Molecules. 2020. Vol. 25. Т. 3. № 609. P. 1–17. <https://doi.org/10.3390/molecules25030609>

15. Kolchina N., Khavinson V., Linkova N. et al. Systematic search for structural motifs of peptide binding to double-stranded DNA // Nucl. Acids Res. 2019. Vol. 47. № 20. P. 10553–10563.

16. Lin H.C., Liu S.Y., Lai H.S., Lai I.R. Isolated mitochondria infusion mitigates ischemia-reperfusion injury of the liver in rats // Shock. 2013. Vol. 39. № 3. P. 304–310. Nucl.1097/SHK.0b013e318283035f

17. Mather M.W., Rottenberg H. The inhibition of calcium signaling in T lymphocytes from old mice results from enhanced activation of the mitochondrial permeability transition pore // Mech. Ageing Dev. 2002. Vol. 123. № 6. P. 707–724. [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(01\)00416-X](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(01)00416-X)

18. McGuire P.J. Mitochondrial dysfunction and the aging immune system // Biology. 2019. Vol. 8. № 2. P. 26. <https://doi.org/10.3390/biology8020026>

19. Quintana A., Schwindling C., Wenning A.S. et al. T cell activation requires mitochondrial translocation to the immunological synapse // Proc. nat. Acad. Sci. USA. 2007. Vol. 104. № 36. P. 14418–14423.

20. Shestov A. A., Liu X., Ser Z. et al. Quantitative determinants of aerobic glycolysis identify flux through the enzyme GAPDH as a limiting step // *Elife*. 2014. Vol. 3. P. e03342.

21. Sinjari B., Diomedea F., Khavinson V. et al. Short peptides protect oral stem cells from ageing // *Stem. Cell Rev. Rep.* 2019. <https://doi.org/10.1007/s12015-019-09921-3>

22. Soysal P., Stubbs B., Lucato P. et al. Inflammation and frailty in the elderly: a systematic review and meta-analysis // *Ageing Res. Rev.* 2016. Vol. 31. P. 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.08.006>

23. Steffen K.K., Dillin A. A Ribosomal Perspective on Proteostasis and Aging // *Cell Metab.* 2016. Vol. 23. № 6. P. 1004–1012. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.05.013>

24. Stochaj U., Kодиha M., Pié B. Detecting changes in the mitochondrial membrane potential by quantitative fluorescence microscopy // *Protocol Exchange*. 2015. Vol. 10. P. 1–11. <https://doi.org/10.1038/protex.2015.009>

25. Takada H., Kurisaki A. Emerging roles of nucleolar and ribosomal proteins in cancer, development, and aging // *Cell. molec. Life Sci.* 2015. Vol. 72. № 21. P. 4015–4025. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1984-1>

26. Tarasenko T. N., Pacheco S. E., Koenig M. K. Cytochrome c oxidase activity is a metabolic checkpoint that regulates cell fate decisions during T cell activation and differentiation // *Cell Metab.* 2017. Vol. 25. № 6. P. 1254–1268.

27. Turi Z., Lacey M., Mistrik M., Moudry P. Impaired ribosome biogenesis: mechanisms and relevance to cancer and aging // *Aging (Albany NY)*. 2019. Vol. 11. № 8. P. 2512–2540. <https://doi.org/10.18632/aging.101922>

28. Vaarala M. H., Porvari K. S., Kyllönen A. P. et al. Several genes encoding ribosomal proteins are over-expressed in prostate-cancer cell lines: confirmation of L7a and L37 over-expression in prostate-cancer tissue samples // *Int. J. Cancer*. 1998. Vol. 78. № 1. P. 27–32. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19980925\)78:1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19980925)78:1)

29. Wang Y., Cheong D., Chan S., Hooi S. C. Ribosomal protein L7a gene is up-regulated but not fused to the tyrosine kinase receptor as chimeric trk oncogene in human colorectal carcinoma // *Int. J. Oncol.* 2000. Vol. 16. № 4. P. 757–762.

Поступила в редакцию 01.03.2020

После доработки 23.03.2020

Принята к публикации 24.03.2020

Adv. geront. 2020. Vol. 33. № 4. P. 741–747

O. M. Ivko¹, A. O. Drobintseva², D. O. Leon'eva¹, I. M. Kvetnoy^{3,4},
V. O. Polyakova^{2,4}, N. S. Linkova^{1,5,6}

THE INFLUENCE OF AEDG AND KE PEPTIDES ON MITOCHONDRIES STAIN AND L7A RIBOSOMES PROTEIN EXPRESSION DURING HUMAN PINEAL GLAND AND THYMUS CELL SENESENCE *IN VITRO*

¹ Saint-Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, 3 pr. Dynamo, St. Petersburg 197110, e-mail: ibg@gerontology.ru; ² Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, 2 Litovskaya str., St. Petersburg 194100; ³ Saint-Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, 2–4 Ligovsky pr., St. Petersburg 191036; ⁴ Saint-Petersburg State University, 7–9 Universitetskaya nab., St. Petersburg 199034; ⁵ Academy of Postgraduate Education, 91 Volokolamskoye shosse, Moscow 125371; ⁶ Belgorod National Research University, 85 Pobedy str., Belgorod 308009

It was verified new molecular targets of geroprotective activity of AEDG (epitalon) and KE (vilon) peptides by the method of confocal laser scanning microscopy. It was shown that the MitoTracker Red mitochondries staining decreased and L7A ribosomal protein synthesis compensatory increased during pineal and thymic cell senescence *in vitro*. AEDG peptide increases in 1,5 times the square of MitoTracker Red mitochondries staining and decreases on 22% the expression of ribosomal protein L7A in cultures of human pineal gland cells during its senescence. KE peptide increases in 1,5 times the square of MitoTracker Red mitochondries staining and decreases on 15% the expression of ribosomal protein L7A in cultures of human thymic cells during its senescence. The square of MitoTracker Red mitochondries staining decreases and the expression of L7A ribosomal protein compensatory increases during pineal gland and thymic cells senescence. We can suppose that AEDG and KE peptides have a tissue-specific effect that normalizes the functions of mitochondria and ribosomes of pinealocytes and thymocytes.

Key words: short peptides, pineal gland, thymus, aging, mitochondries, ribosomes