

## **БИОГЕРОНТОЛОГИЯ**

УДК 577.24

### **СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ И КОРОТКИЕ ПЕПТИДЫ: ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ В ГЕРОНТОЛОГИИ**

**Линькова Н.С., Тарновская С.И., Костылев А.В., Елашкина Е.В., Ничик Т.Е., Морозова Е.А., Гутоп Е.О.**

Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН, г. Санкт-Петербург, Россия, e-mail: miayu@yandex.ru

Известно, что стволовые клетки (СК) способны давать начало клеткам гемопоэтического ряда, что было установлено при совместном культивировании эмбриональных клеток человека с линиями стромальных фибробластов, а также используя факторы роста гемопоэтических клеток. Оптимальный подбор условий направленной дифференцировки СК является важнейшей задачей современной молекулярной биологии и позволяет открыть перспективы применения СК в терапии важнейших возрастных заболеваний: болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, ишемической болезни сердца и сердечнососудистой патологии. Одной из групп веществ, способных регулировать активность стволовых клеток, являются короткие пептиды. Установлена способность пептидов индуцировать дифференцировку полипотентных клеток. В опытах на животных и клеточных культурах было установлено, что эти пептиды способствуют индукции синтеза регуляторных белков, влияют на пролиферацию и дифференцировку клеток, проявляют тканеспецифичность. В связи с этим, целью нашего исследования явилось изучение влияния коротких синтетических пептидов на пролиферацию мезенхимальных стволовых клеток человека (МСК). В результате проведенной работы было выяснено, что короткие пептиды в зависимости от их структуры способны активировать пролиферацию МСК, способствуя поддержанию резервных возможностей организма, что особенно важно при ускоренном и естественном старении различных органов и тканей.

Ключевые слова: стволовые клетки, короткие пептиды, пролиферация, дифференцировка, мезенхимальные стволовые клетки.

### **STEM CELLS AND SHORT PEPTIDES: APPLICATION PROSPECTS IN GERONTOLOGY**

**Linkova N.S., Tarnovskaya S.I., Kostylev A.V., Elashkina E.V., Nichik T.E., Morozova E.A. Gutop E.O.**

S.-Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology of North-Western Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, S.-Petersburg, Russia, e-mail: miayu@yandex.ru

It is known that stem cells (SC) are able to give rise to a number of hematopoietic cells that has been established by cocultivation of human embryonic stem cells with the stromal fibroblast lines and using the hematopoietic growth factors. Optimal Selection of conditions aimed SC differentiation is the major problem in modern molecular biology and opens perspectives of SC therapy in major age-related diseases: Alzheimer's disease, Parkinson's disease, ischemic heart disease and cardiovascular disease. One group of substances capable of regulating the activity of stem cells are short peptides. Installed capacity of the peptides to induce the differentiation of pluripotent cells. In experiments in animals and cell cultures it has been found that these peptides contribute to the induction of the synthesis of regulatory proteins influence the proliferation and differentiation of cells that exhibit tissue specificity. In this context, the aim of our study was to investigate the effect of short synthetic peptides on the proliferation of human mesenchymal stem cells (MSCs). As a result of this work, it was found that short peptides, depending on their structure, are able to activate the proliferation of MSCs, helping to maintain reserve capacity of the body, which is especially important in an accelerated and natural aging of various organs and tissues.

Keywords: stem cells, small peptides, proliferation, differentiation, mesenchymal stem cells.

**Введение.** Одним из современных направлений клеточной геронтологии является исследование возможности применения стволовых клеток для восстановления тканей и органов. Наряду с эндогенным введением стволовых клеток, важным является подход, заключающийся в поиске веществ, активирующих собственные стволовые (полипотентные) клетки организма.

Известно, что стволовые клетки способны давать начало клеткам гемопоэтического ряда, что было установлено при совместном культивировании эмбриональных клеток человека с линиями стромальных фибробластов, а также используя факторы роста гематопоэтических клеток [12, 13]. Помимо этого, в эмбрионных тельцах были обнаружены популяции клеток, обладающие свойствами предшественников гематопоэтических и эндотелиальных клеток [7, 8]. Таким образом, СК способны дифференцироваться в направлении различных субпопуляций функционально активных клеток: кардиомиоцитов, нейронов, эндотелиоцитов капилляров. Оптимальный подбор условий направленной дифференцировки СК является важнейшей задачей современной молекулярной биологии и позволяет открыть перспективы применения СК в терапии важнейших возрастных заболеваний: болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, ишемической болезни сердца и сердечнососудистой патологии [4].

Одной из групп веществ, способных регулировать активность стволовых клеток, являются короткие пептиды. Природные пептиды постоянно синтезируются во всех живых организмах для регулирования физиологических процессов и передачи биологической информации и классифицируются в зависимости от характера действия и происхождения на 4 группы.

К первой группе относятся пептиды, обладающие гормональной активностью (окситоцин, вазопрессин, кортикотропин и др.). Вторая группа представлена пептидами, регулирующими пищеварительный процесс (гастрин, секретин и др.). Пептиды, источник которых –  $\alpha$ 2-глобулиновая фракция сыворотки крови (ангиотензин, брадикинин и каллидин), относят к третьей группе природных биорегуляторов. Четвертая группа представлена классом нейропептидов – макромолекул, синтезирующихся в центральной и периферической нервной системе и участвующих в процессах регуляции нервной деятельности (опиоиды, тахикинины, некоторые гипоталамические гормоны).

В последнее время большой интерес представляет изучение функциональной активности коротких регуляторных пептидов, происхождение которых было доказано А. Чихановецким, А. Гершко и И. Роузом после открытия убиквитин-опосредованной деградации белков в протеосомах. Они установили, что короткие пептиды играют важную роль в передаче биологической информации. Основным механизмом образования коротких пептидов является гидролиз высокомолекулярных белков, в результате которого образуются пептиды, имеющие различные биологические функции.

С. Карлином было показано, что макромолекулы белков в своем составе содержат несколько повторяющихся блоков аминокислотных остатков с заряженными боковыми группами. Наибольшее количество таких блоков содержится в ядерных белках: факторах транскрипции, белках центромеров и группе белков высокой подвижности. В результате протеосомного гидролиза этих макромолекул может образоваться достаточный набор пептидов с заряженными боковыми группами.

В Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии были получены природные полипептидные экстракты, выделенные из органов крупного рогатого скота, и синтезированы их короткие аналоги, обладающие выраженной тканеспецифической активностью [1, 3]. Регуляторная активность природных и синтетических пептидов была изучена на клеточных культурах и в экспериментальных моделях на животных различного возраста [5, 6]. Установлено, что пептиды тканеспецифически стимулируют синтез белка в клетках тех органов, из которых они были выделены. Например, после введения обезьянам препарата эпیتالамина и синтетического пептида эпیتالона было отмечено увеличение секреции мелатонина [11].

На уровне организма у различных животных выявлено увеличение средней продолжительности жизни и усиление активности клеточного иммунитета. В частности, после введения мышам СВА пептидного препарата эпифиза максимальная продолжительность жизни животных возросла на 42,3%. Важно отметить, что максимальное увеличение средней продолжительности жизни было во многом обусловлено противоопухолевой активностью низкомолекулярных пептидов. Были получены экспериментальные данные, подтверждающие снижение в 1.4-7 раз частоты возникновения как спонтанных, так и индуцированных опухолей у животных [5, 6].

При исследовании биологического действия пептидных препаратов на уровне клеточных структур было установлено, что короткие пептиды способствуют трансформации гетерохроматина в функционально активный эухроматин, усиливая транскрипцию генов [4, 9].

Кроме того, установлена способность пептидов индуцировать дифференцировку полипотентных клеток. При добавлении пептидов сетчатки к полипотентным клеткам ранней гастрюлы лягушки *Xenopus laevis* привело к образованию клеток сетчатки и пигментного эпителия. На этой же экспериментальной модели было показано, что добавление других коротких пептидов приводит к образованию различных тканей, в зависимости от структуры добавляемого вещества [9]. Таким образом, система коротких пептидов является генетически детерминированной совокупностью сигнальных молекул, участвующих в регуляции гомеостаза.

В нашем исследовании были использованы короткие пептиды Н-Glu-Asp-Arg-ОН (пинеалон) и Н-Lys-Glu-Asp-ОН (везуген), полученные на основе анализа аминокислотных последовательностей природных полипептидных экстрактов, выделенных из органов крупного рогатого скота. В опытах на животных и клеточных культурах было установлено, что эти пептиды способствуют индукции синтеза регуляторных белков, влияют на пролиферацию и дифференцировку клеток, проявляют тканеспецифичность [2, 10, 11]. В частности, пептид Н-Glu-Asp-Arg-ОН способствует регенерации нейронов центральной нервной системы (ЦНС) за счет стимуляции синтеза тканеспецифических антиоксидантных белков, нормализации метаболизма и электрической активности нейронов. Пептид Н-Lys-Glu-Asp-ОН стимулирует пролиферацию клеток сосудов крыс в органотипической культуре.

В связи с этим, **целью нашего исследования** явилось изучение влияния коротких синтетических пептидов на пролиферацию мезенхимальных стволовых клеток человека (МСК).

**Материалы и методы.** Первым этапом эксперимента явилось исследование влияния трипептидов H-Glu-Asp-Arg-OH и H-Lys-Glu-Asp-OH на культуру МСК человека. На втором этапе был проведен конформационный анализ структур трипептидов методом конформационного поиска с использованием компьютерной программы Molecular Operating Environment 2012.10 для оценки влияния H-Glu-Asp-Arg-OH и H-Lys-Glu-Asp-OH на пролиферативный потенциал в зависимости от их структурных характеристик.

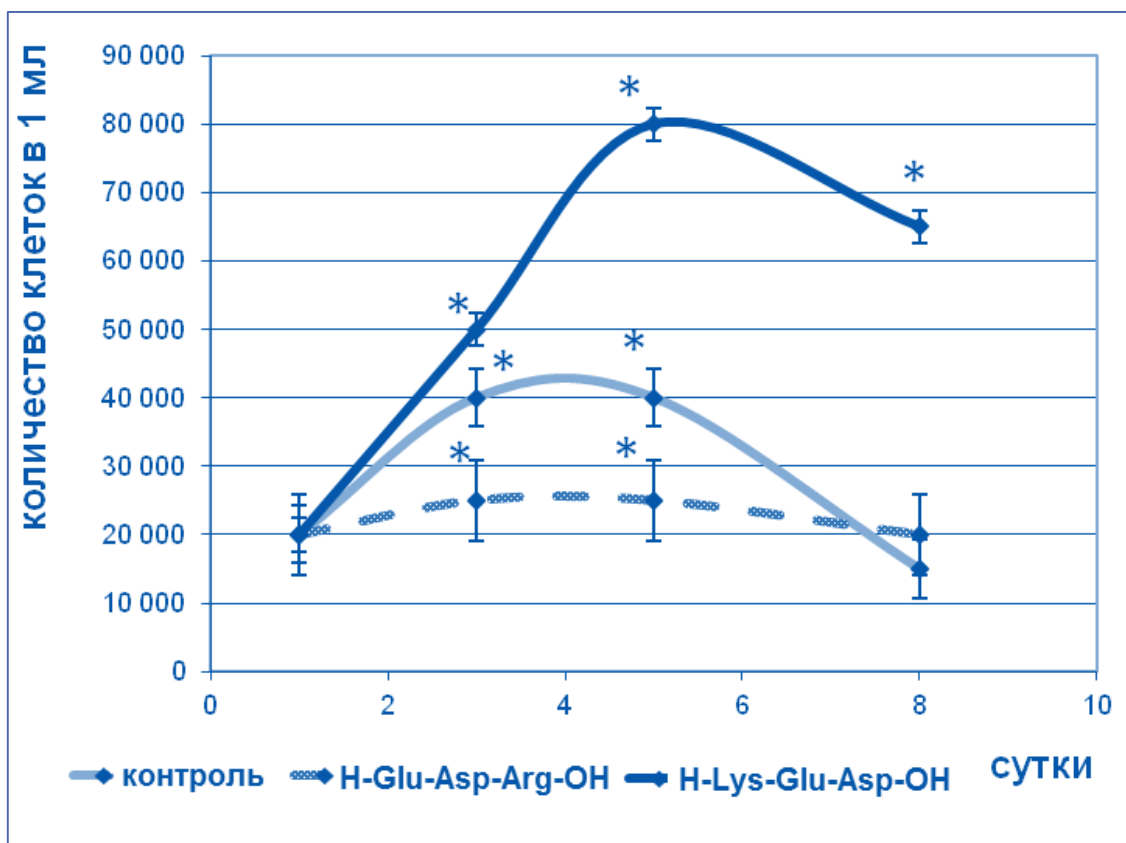
Материалами для исследования явились препараты пептидов H-Glu-Asp-Arg-OH и H-Lys-Glu-Asp-OH, полученные в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии и культура МСК человека.

МСК выделяли из липоаспирата, полученного из абдоминальной жировой ткани человека. После выделения МСК из липоаспирата их культивировали в среде, содержащей 15% фетальной бычьей сыворотки, 82.5% DMEM, 1.5% HEPES, L-глутамин и гентамицин, до 3 пассажа, после чего клетки 1 пассажа разделяли на 3 группы: 1 – контроль (введение физраствора), 2 – введение пептида H-Lys-Glu-Asp-OH и 3 – введение пептида H-Glu-Asp-Arg-OH и пассаживали в 24-луночный планшет. На 1, 3, 5 и 8 сутки клетки подсчитывали в камере Горяева.

**Результаты и обсуждение.** Под влиянием пептида H-Lys-Glu-Asp-OH на 3 сутки количество МСК возросло на 25% по отношению к контролю (рис. 1). При этом введение пептида H-Glu-Asp-Arg-OH в культуру МСК на 3 сутки приводило к снижению численности клеток на 65%. На 5 сутки полученный эффект был выражен еще более сильно.

Так, под действием пептида H-Lys-Glu-Asp-OH численность МСК возросла в 2 раза по отношению к контролю и снижалась под влиянием пептида H-Glu-Asp-Arg-OH в 1,6 раза. К 8 суткам эффект пептида H-Lys-Glu-Asp-OH сохранялся, а действие пептида H-Glu-Asp-Arg-OH нивелировалось.

Таким образом, пептид H-Lys-Glu-Asp-OH стимулировал пролиферативную активность МСК, а пептид H-Glu-Asp-Arg-OH обладал ингибирующим действием.



**Рисунок 1.** Влияние пептидов H-Glu-Asp-Arg-OH и H-Lys-Glu-Asp-OH на пролиферацию МСК.

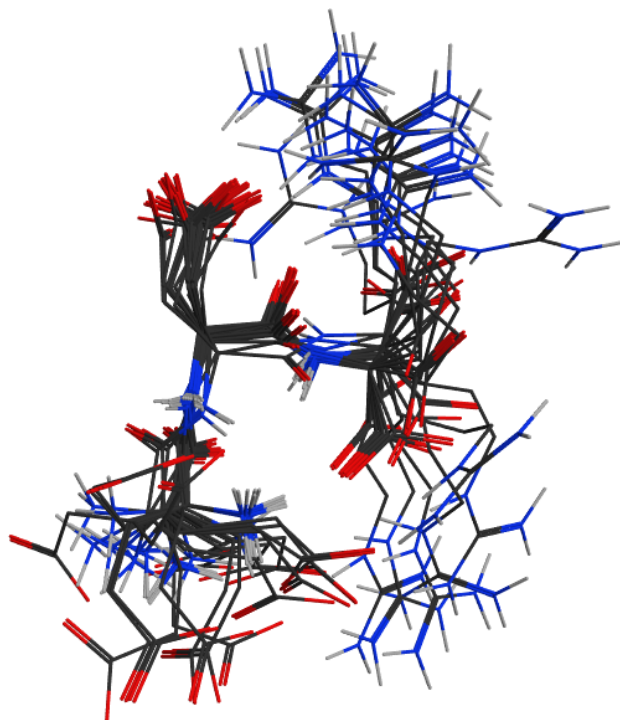
\* -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем. По оси абсцисс – сутки, по оси ординат – количество клеток в мл.

Главные результаты конформационного анализа получены в силовом поле MMFF94. Расчеты проводили по стандартным схемам молекулярной механики, как с учетом, так и без учета наличия растворителя. Влияние растворителя учитывали в генерализованном борновском приближении с введением внутренней диэлектрической константы равной 1, а внешней 80. Предполагается, найденные конформации пептидов обладают наибольшей биологической активностью.

Молекула пептида H-Glu-Asp-Arg-OH состоит из двух отрицательно заряженных аминокислотных остатка - глутаминовой и аспарагиновой кислот, и положительно заряженного аргинина. Масса молекулы цвиттер-иона составила 417,4 Да, а суммарный заряд -1. Индекс гидрофобности по таблице Кайта-Дуллита оказался равным -11.5.

Пептид H-Glu-Asp-Arg-OH содержит 6 доноров и 8 акцепторов протона. Методом конформационного поиска было найдено 96 наиболее энергетически выгодных конформаций пептида. На рисунке 2 показаны первые 25 конформеров, совмещенных по пептидным связям. Энергия оптимизации конформеров отличалась на 4,6 ккал/моль, среднеквадратичное отклонение пространственных структур конформеров составило 0,356 Å.

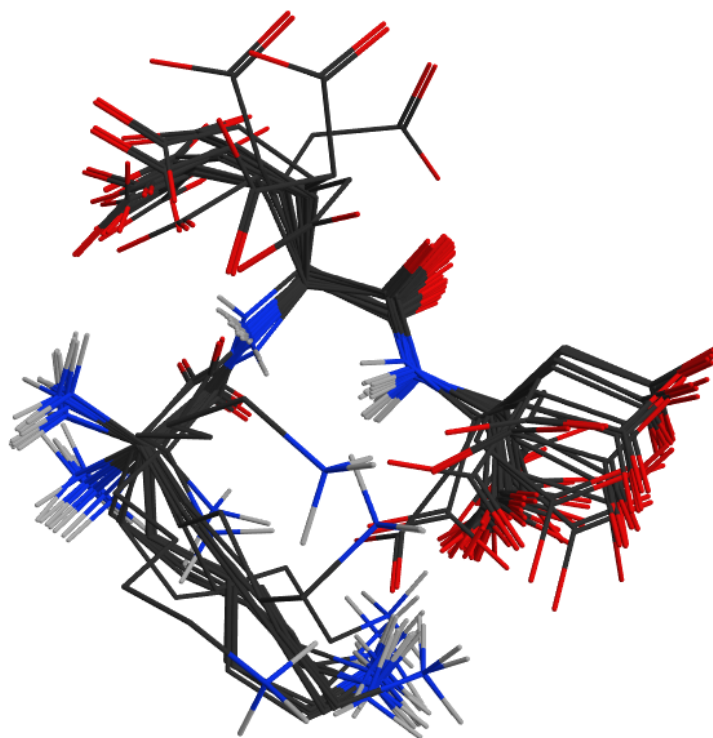
Молекула пептида H-Lys-Glu-Asp-OH состоит из положительно заряженного лизина и двух отрицательно заряженных аминокислотных остатка глутаминовой и аспарагиновой кислот. Масса молекулы цвиттер-иона составила 389.38 Да, суммарный заряд -1. Индекс гидрофобности по таблице Кайта-Дуллита оказался выше, чем у пептида H-Glu-Asp-Arg-OH и составил -10.9.



**Рисунок 2.** Совмещение 25 конформеров пептида H-Glu-Asp-Arg-OH. Красным цветом выделены атомы кислорода, синим – азота, черным – атомы углерода, полярные атомы водорода – светло-серым цветом. Неполярные атомы водорода не отображены.

Пептид H-Lys-Glu-Asp-OH содержит 4 доноров и 8 акцепторов протона. Были найдены 139 наиболее энергетически выгодных конформаций пептида. На рисунке 3 показано совмещение первых 25 полученных конформаций. Энергия оптимизации

конформеров пептида H-Lys-Glu-Asp-OH отличалась на 3.7 ккал/моль, среднее квадратичное отклонение пространственных структур конформеров составило 0,143 Å.



**Рисунок 3.** Совмещение 25 конформаций пептида H-Lys-Glu-Asp-OH. Красным цветом выделены атомы кислорода, синим – азота, черным – атомы углерода, полярные атомы водорода – светло-серым цветом. неполярные атомы водорода не отображены.

Были рассчитаны наиболее энергетически выгодные конформации пептидов, которые они принимают в растворителе. При совмещении молекул было показано, что пептид H-Lys-Glu-Asp-OH является более стабильной молекулой, чем пептид H-Glu-Asp-Arg-OH.

Поскольку ранее было показано, что короткие пептиды влияют на пролиферативную активность и дифференцировку клеток через регуляцию экспрессии различных транскрипционных факторов, связываясь с промоторными зонами их генов, можно сделать следующее предположение [2]. Вероятно, трипептид H-Glu-Asp-Arg-OH, обладая рассчитанными характеристиками, образует стабильный комплекс с



промоторной зоной одного из генов, ответственных за пролиферацию МСК, ингибируя его, тогда как трипептид H-Lys-Glu-Asp-OH обладает обратным действием.

Таким образом, короткие пептиды в зависимости от их структуры способны активировать пролиферацию МСК, способствуя поддержанию резервных возможностей организма, что особенно важно при ускоренном и естественном старении различных органов и тканей.

#### Список литературы.

1. Хавинсон В.Х. Эпигенетические аспекты пептидной регуляции старения / В. Х. Хавинсон, А. Ю. Соловьёв, Д. В. Жилинский [и др.] // Успехи геронтологии. - 2012. - Т. 25, N 1. - С. 11-22.
2. Хавинсон В.Х. Плавление двойной спирали ДНК при связывании с геропротекторным тетрапептидом / В.Х. Хавинсон, А.Ю. Соловьёв, Л.К. Шатаева // Биogerонтология. - 2008. - Т. 146, N 11. - С. 561-562.
3. Хавинсон В.Х. Короткие пептиды, проникающие в клетку: модель взаимодействия с промоторными участками генов/ В.Х. Хавинсон, С.И. Тарновская, Н.С. Линькова [и др.] // Бюлл. эксп. биол. мед. – 2012, №10. - С. 391-396.
4. Шумаков В.И. Первый опыт клинического применения аутологичных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга для восстановления сократительной функции миокарда / В.И. Шумаков, Э.Н. Казаков, Н.А. Онищенко // Российский кардиологический журнал. - 2003. - N 5. - С. 232-238.
5. Anisimov V.N., Khavinson V. Kh. Peptide regulation of aging // Biogerontology. - 2010. - Vol. 11. - P. 251-255.
6. Anisimov V.N. Effect of synthetic thymic and pineal peptides on biomarkers of ageing, survival and spontaneous tumour incidence in female CBA mice / V.N. Anisimov, V. Kh. Khavinson, A.I. Mikhalski, A.I. Yashin // Mech. Ageing Dev. - 2001. - Vol. 122, N 1. - P. 41-68.
7. Dawn B. Bone marrow cells and regeneration / B. Dawn, R. Bolli // Basic Research in Cardiology. - 2005. - Vol. 100, N 6. - P. 494-501.
8. Ferrari G. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors / G. Ferrari, G. Cusella-De Angelis, M. Coletta [et al.] // Science. - 1998. N 279. - P. 1528-1530.

9. Khavinson V.Kh., Malinin V.V. *Gerontological aspects of genome peptide regulation*. Basel (Switzerland), 2005. – P.104.
10. Khavinson V. Kh. Peptides Regulate Cortical Thymocytes Differentiation, Proliferation, and Apoptosis / V. Kh. Khavinson, V.O. Polyakova, N. S. Linkova, A.V. Dudkov, I.M. Kvetnoy // *J. of Amino Acids*. – 2011. - Article ID 517137. - doi:10.4061/2011/517137.
11. Lin'kova N.S. Peptides from the Pituitary Gland and Cortex Stimulate Differentiation of Polypotent Embryonic Tissue / N.S. Lin'kova, A.V. Trofimov, A.V. Dudkov // *Bull. Exp. Biol. Med.* - 2011. - Vol. 151, N.2. - P. 530-531
12. Mihara K. Development and functional characterization of human bone marrow mesenchymal cells immortalized by enforced expression of telomerase // *Hematol.* - 2003. - Vol. 120, N 5 - P. 846-849.
13. Vassilopoulos G. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion / G. Vassilopoulos, P.R. Wang, D.W. Russell // *Nature*. – 2003, N 422. - P. 901-904.

#### References.

1. Khavinson V. Kh., Solov'jov A. Ju., Zhilinskij D. V. et al., *Uspehi gerontologii*, 2012, Vol. 25, no. 1, pp. 11-22.
2. Khavinson V.Kh., Solov'jov A.Ju., Shataeva L.K. *Biogerontologija*, 2008, Vol. 146, no. 11. pp. 561-562.
3. Khavinson V.Kh., Tarnovskaja S.I., Lin'kova N.S., Pronjaeva V.E., Shataeva L.K., Jakuceni P.P. *Bjull. jeksp. biol. med*, 2012, no.10, pp. 391-396.
4. Shumakov V.I., Kazakov Je.N., Onishhenko N.A. *Rossijskij kardiologicheskij zhurnal*, 2003, no. 5, pp. 232-238.
5. Anisimov V.N., Khavinson V. Kh. *Biogerontology*, 2010, Vol. 11, pp. 251-255.
6. Anisimov V.N., Khavinson V. Kh., Mikhalski A.I., Yashin A.I. *Mech. Ageing Dev*, 2001, Vol. 122, no. 1, pp. 41-68.
7. Dawn B., Bolli R. *Basic Research in Cardiology*, 2005, Vol. 100, no 6, pp. 494-501.
8. Ferrari G., Cusella-De Angelis G., Coletta M. et al. *Science*, 1998, no. 279, pp. 1528-1530.
9. Khavinson V.Kh., Malinin V.V. *Gerontological aspects of genome peptide regulation*. Basel, 2005. 104 p.
10. Khavinson V. Kh., Polyakova V. O., Linkova N. S., Dudkov A. V., Kvetnoy I. M. *Journal of Amino Acids*, 2011, Article ID 517137, doi:10.4061/2011/517137

11. Lin'kova N.S., Trofimov A.V. and Dudkov A.V. Bull. Exp. Biol. Med, 2011, Vol. 151, no. 2, pp. 530-531.
12. Mihara K. Haematol, 2003, Vol. 120, no. 5, pp. 846-849.
13. Vassilopoulos G, Wang P.R., Russell D.W. Nature, 2003, no. 422, pp. 901-904.