

## ВЛИЯНИЕ ВАЗОПРОТЕКТОРНЫХ ПЕПТИДОВ НА АПОПТОЗ ОРГАНОТИПИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЫ КОЖИ КРЫС

Линькова Н.С.<sup>1,2,3</sup>, Чалисова Н.И.<sup>1,4</sup>, Рыжак Г.А.<sup>1</sup>, Гутоп Е.О.<sup>1</sup>, Кожевникова Е.О.<sup>1</sup>,  
Фридман Н.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, Санкт-Петербург, e-mail: miayu@yandex.ru;

<sup>2</sup>Академия постдипломного образования ФГБУ ФНКЦ ФМБА России, Москва;

<sup>3</sup>Белгородский национальный исследовательский государственный университет, Белгород;

<sup>4</sup>ФГБУН «Институт физиологии им. И.П. Павлова» РАН, Санкт-Петербург

Замедление инволютивных процессов в коже является актуальной задачей геронтокосметологии. В статье рассматриваются пептиды и аминокислоты, регулирующие функциональную активность клеток кожи. Методом иммуноцитохимии изучено влияние аминокислот лизина (Lys), глутаминовой кислоты (Glu), аспарагиновой кислоты (Asp), пептида KED (Lys-Glu-Asp) и полипептидного комплекса сосудов на экспрессию проапоптотических белков p53, p21, p16, p65 в органотипической культуре кожи крыс. Полипептидный комплекс сосудов и пептид KED оказывали более сильный антиапоптотический эффект на клетки кожи по сравнению с L-аминокислотами. Полипептидный комплекс сосудов и пептид KED соответственно на 39-69% и на 40-65% снижали экспрессию белков p53, p21, p16, p65 в культуре клеток кожи, т.е. их влияние на клетки кожи было сопоставимо. Можно полагать, действие полипептидного комплекса сосудов на клетки кожи достигается за счет пептида KED в его составе. Уменьшение экспрессии проапоптотических протеинов может указывать на способность пептида KED и полипептидного комплекса сосудов поддерживать функциональную активность фибробластов кожи при старении. Полученные данные указывают на перспективность дальнейшего изучения полипептидного комплекса сосудов и пептида KED в качестве геропротекторов, поддерживающих функциональную активность клеток кожи.

Ключевые слова: апоптоз, кожа, культура клеток, пептид KED, полипептидный комплекс сосудов.

## EFFECT OF VASOPROTECTIVE PEPTIDES ON APOPTOSIS OF ORGANOTYPIC RAT SKIN CULTURE

Linkova N.S.<sup>1,2,3</sup>, Chalisova N.I.<sup>1,4</sup>, Ryzhak G.A.<sup>1</sup>, Gutop E.O.<sup>1</sup>, Kozhevnikova E.O.<sup>1</sup>,  
Fridman N.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Saint Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, St Petersburg, e-mail: miayu@yandex.ru;

<sup>2</sup>Academy of Postgraduate Education under FSBU FSCC of FMBA of Russia, Moscow;

<sup>3</sup>Belgorod National Research State University, Belgorod;

<sup>4</sup>Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg

Slowing down the involutive processes in the skin is a current task of gerontocosmetology. The article discusses peptides and amino acids that regulate the functional activity of skin cells. The effect of the amino acids lysine (Lys), glutamic acid (Glu), aspartic acid (Asp), KED peptide (Lys-Glu-Asp), and vascular polypeptide complex on the expression of proapoptotic proteins p53, p21, p16, and p65 in organotypic culture of rat skin was studied by immunocytochemistry. The vascular polypeptide complex and the KED peptide have a stronger anti-apoptotic effect on skin cells compared to the L-amino acids. The vascular polypeptide complex and the KED peptide reduced the expression of p53, p21, p16, and p65 proteins in skin cell culture by 39-69% and 40-65%, respectively. The effect of the vascular polypeptide complex and the KED peptide on skin cells was comparable. Probably, the effect of the vascular polypeptide complex on skin cells is achieved due to the KED peptide in its composition. A decrease in the expression of proapoptotic proteins may indicate the ability of the KED peptide and the vascular polypeptide complex to maintain the functional activity of skin fibroblasts during aging. The obtained data indicate the prospects for further study of the vascular polypeptide complex and the KED peptide as geroprotectors that support the functional activity of skin cells.

Keywords: apoptosis, skin, cell culture, KED peptide, vascular polypeptide complex.

Оценка молекулярных основ поддержания гомеостазиса клеток, органов, тканей и  
целого организма является актуальным направлением медико-биологических исследований. В

связи с этим поиск веществ для активации компенсаторно-восстановительных процессов, способных повышать защитные и регенерационные функции организма, управляя процессами клеточного цикла, становится актуальной задачей биомедицинских исследований.

Кожа выполняет барьерную, иммунную и эндокринную функции и снижение ее функциональной активности может отрицательно сказываться на поддержании гомеостаза организма и состоянии здоровья лиц старших возрастных групп [1]. Кроме того, возрастная инволюция кожи является медико-социальной проблемой, т.к. неудовлетворенность пациентов внешним видом может привести к снижению их социальной активности и качества жизни. В связи с этим важной задачей медицинской косметологии является обнаружение субстанций, обладающих регуляторными свойствами, эффективно и безопасно нормализующих гомеостаз и улучшающих внешний вид кожи.

В АНО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» создана технология выделения полипептидных комплексов из различных органов и тканей молодых животных. Эти полипептиды оказывают тканеспецифическое действие, стимулируя пролиферацию и замедляя апоптоз клеток в органотипических культурах различных тканей. Таким образом, появилась инновационная группа пептидных препаратов (цитомединов), которые тканеспецифически способствуют нормализации функций органов и тканей при старении и различной патологии. Активным началом цитомединов являются ди-, три и тетрапептиды в их составе. В условиях нарушения клеточного гомеостаза при патологии и старении пептиды стимулируют биосинтез белков и репарацию ДНК.

Полипептидный комплекс сосудов нормализует функции сердечно-сосудистой системы, предотвращая развитие атеросклеротического поражения сосудов и гипертонической болезни. Из неспецифических биологических активностей полипептидного комплекса сосудов следует отметить нормализующее действие на гемостаз, иммунную и антиоксидантную систему. При ранговом анализе в полипептидном комплексе сосудов телят было определено наибольшее количество аминокислот Lys, Glu, Asp, из которых затем был синтезирован пептид KED (Lys-Glu-Asp). Пептид KED при использовании у пациентов с сердечно-сосудистой патологией *per os*, при изучении в моделях сердечно-сосудистых заболеваний *in vivo* и *in vitro* проявлял вазопротекторный эффект, активировал метаболизм эндотелиальных клеток и дермальных фибробластов [2; 3].

За последние десятилетия усилился интерес к изучению влияния кодируемых аминокислот на функции клеток. При оценке различных параметров специфической и неспецифической резистентности организма показано, что глутаминовая (Glu), аспарагиновая (Asp) кислоты и лизин (Lys) стимулируют фагоцитоз, обладают иммуномодулирующим и противотоксическим действием [4]. В экспериментальной модели на животных выявлено, что

на различных этапах эмбриогенеза потребление разных типов аминокислот отличается [5]. Кроме того, в литературе имеется информация о воздействии аргинина на процессы клеточного обновления [6]. Аргинин также способствует снижению выраженности апоптоза клеток сетчатки в исследовании *in vitro*.

Цель исследования - изучить влияние полипептидного комплекса сосудов, аминокислот (Lys, Glu, Asp) и пептида KED (Lys-Glu-Asp) на апоптоз клеток дермы крыс в условиях органотипического культивирования.

### **Материалы и методы исследования**

Исследование проведено на самцах крыс линии Wistar массой 200-250 г в возрасте 3 месяцев, полученных из биокolleкции «Коллекция лабораторных млекопитающих разной таксономической принадлежности» Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, которая поддерживается программой биоресурсных коллекций ФАНО России. Крыс умерщвляли путем помещения в эксикатор с высокой концентрацией паров эфира с хлороформом. При проведении исследования по органотипическому культивированию дермы оценивали рост 1200 эксплантатов кожи животных. Органотипическая культура является оптимальным объектом для оценки активности субстанций потому, что в ней нет нервных, гуморальных и других регуляторных воздействий, присущих целому организму. Это позволяет оценить непосредственное влияние изучаемых аминокислот и пептидов на клетки кожи.

Фрагменты дермы крыс диаметром 1 мм<sup>3</sup> выделяли в стерильном боксе. Затем их помещали в чашки Петри с поли-L-лизинным покрытием. Для культивирования ткани кожи готовили питательную среду, которая состояла из 35% среды ИМЕМ, 35% раствора Хенкса, 25% фетальной бычьей сыворотки. В культуральную среду также добавляли 0,6% раствор глюкозы, 0,5 ед/мл инсулина и 4 ед/мл гентамицина. К исследуемым эксплантатам дермы добавляли 3 мл питательной среды с полипептидным комплексом сосудов в концентрации 20 нг/мл, пептидом KED в концентрации 0,05 нг/мл или с одной из аминокислот (Lys, Glu, Asp) в концентрации 0,05 нг/мл. Эти концентрации изучаемых веществ были выбраны как наиболее активные по результатам предварительно проведенного исследования. В контрольные образцы органотипических культур дермы добавляли 3 мл культуральной среды. При таком дизайне эксперимента эксплантаты кожи опытных и контрольной групп развивались в одинаковом количестве среды. Культивирование осуществляли в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37 °С. На 3-й день культивирования осуществляли морфометрию и проводили иммуноцитохимическое исследование. Для каждой группы анализировали 25 эксплантатов дермы.

В формировании зоны роста культивируемых фрагментов кожи участвуют пролиферационные и миграционные механизмы. Характерной структурной организацией

периферической зоны дермальных эксплантатов является подкапсульная область, в которой и проводился морфометрический анализ данных иммуноцитохимии. Также определяется капсула эксплантата, которая состоит из нескольких слоев фибробластоподобных клеток продолговатой формы. Капсула покрыта однослойным плоским эпителием (мезотелием). При этом образование сплошного мезотелиального пласта не происходит. Мезотелиальные клетки нередко отходят друг от друга, приобретают овальную форму и отделяются от базальной мембраны. Дермальные фибробласты, макрофаги и некоторые другие типы клеток способны к миграции в разрывы мезотелиального пласта. Таким образом, происходит формирование периферической зоны роста.

Классическими маркерами клеточного старения, по данным базы PubMed, являются протеины p53, p21, p16. Фактор транскрипции p53 активирует сигнальные каскады каспаза-зависимого и митохондриального апоптоза. Белки p16 и p21 служат мишенями p53 и являются посредниками апоптотического каскада.

Протеин p53 участвует в обеспечении гомеостаза генома и поддерживает генетическую однородность клеток. Инициация сигнального каскада с участием p53 происходит в ответ на стрессорные сигналы: укорочение теломер, повреждение двунитевой ДНК, активацию онкогенов, гипоксию, недостаток питательных веществ. При активации нижележащих белков – мишеней может наблюдаться арест клеточного цикла, запрограммированная клеточная гибель, репарация двунитевой ДНК, дифференцировка, клеточное старение. Установлено, что белок p53 играет важную роль в старении кожи. При активации p53 наблюдается уменьшение толщины эпидермиса и дермы, снижение темпа роста волос и репарации дермы. Кроме того, транскрипционный фактор p53 регулирует секрецию сальных желез кожи и способствует уменьшению количества подкожных адипоцитов [7]. Протеин p21 или CDKN1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A) является основной мишенью p53 и осуществляет арест клеточного цикла в стадии G1. Белок p21 при участии p53 препятствует возникновению повреждений ДНК, активируя систему репарации. P21 ингибирует прохождение точек рестрикции клеточного цикла (G1-S, G2). Уменьшение активности транскрипционного фактора p21 коррелирует с повышением способности клеток к пролиферации и репарации тканей [8]. Протеин p16 относят к супрессорам опухолей, останавливающим клеточный цикл путем инактивации циклин-зависимой киназы-2A. RelA, или субъединица p65 - белок из семейства NF-κB/Rel класса II, одна из основных субъединиц фактора транскрипции NF-κB. Димер p50/p65 является самой распространённой формой NF-κB и универсальным фактором транскрипции, обнаруживаемым практически во всех типах клеток.

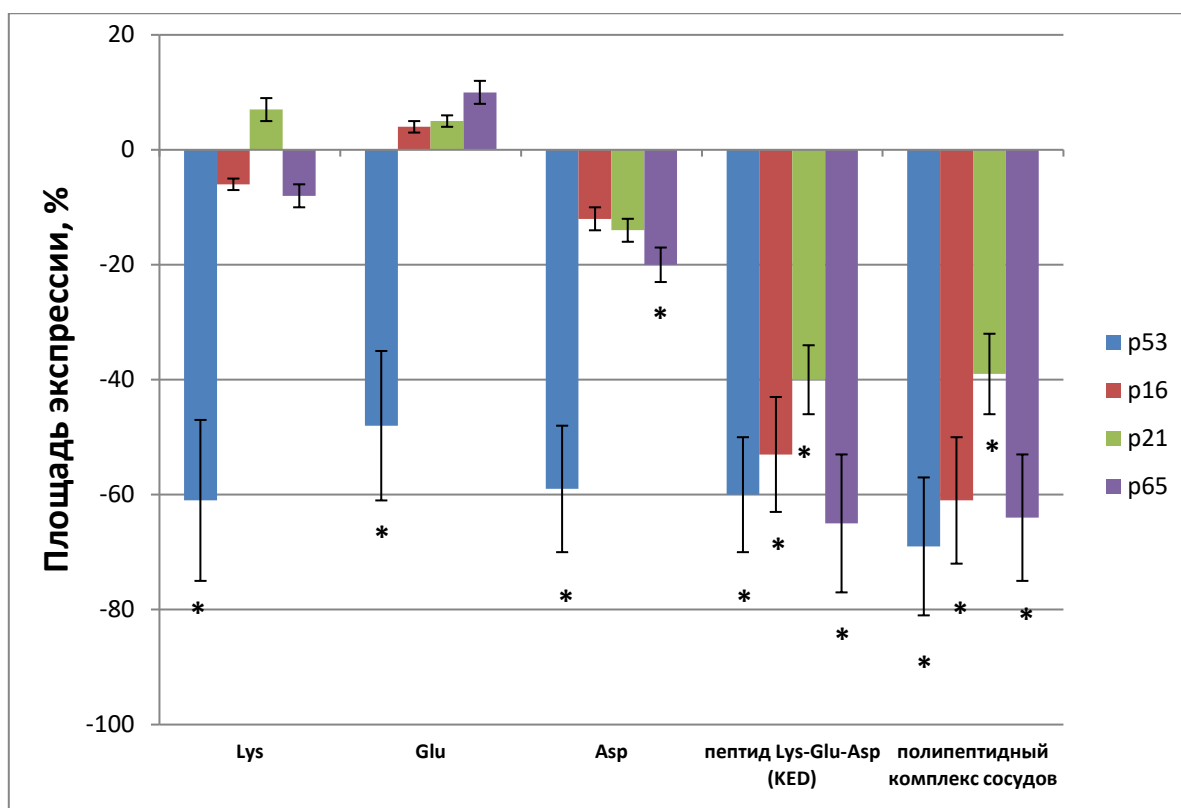
Иммуноцитохимическое исследование эксплантатов дермы осуществляли авидин-биотиновым методом. Синтез белков p53, p21, p16, p65 в клетках кожи визуализировали с

применением одноэтапного протокола для клеточных культур с фиксацией этиловым спиртом. Морфометрический анализ изображений культур фибробластов кожи проводили с использованием системы компьютерного анализа микрофотографий, включающей в себя микроскоп Nikon Eclipse E400, цифровую камеру Nikon DXM1200 и программу Videotest Morphology версии 4.0. Для каждой культуры анализировали 10 полей зрения при увеличении 400. Затем рассчитывали площадь экспрессии белков p53, p21, p16, p65. Этот показатель равен отношению площади, занимаемой иммунопозитивными клетками, к общей площади клеток в поле зрения и выражается в %. Полученные данные анализировали в программе Statistica 7.0. Для оценки статистических различий площади экспрессии между группами использовали t-критерий Стьюдента.

**Результаты исследования и их обсуждение.** При добавлении лизина в органотипическую культуру кожи крыс выявлено достоверное снижение площади экспрессии белка p53 на 61% по сравнению с контролем. Лизин не влиял на площадь экспрессии протеинов p16, p21, p65 в органотипической культуре кожи. При добавлении глутаминовой кислоты были получены схожие результаты. Наблюдалось достоверное уменьшение площади экспрессии белка p53 на 48%, а экспрессия белков p16, p21, p65 не изменялась. При воздействии аспарагиновой кислоты экспрессия проапоптотических белков p53 и p65 достоверно снизилась соответственно на 59% и 20% (рисунок).

Пептид KED статистически значимо снижал экспрессию белков p53, p16, p21 и p65 в органотипической культуре кожи крыс соответственно на 60%, 53%, 40% и 65% по сравнению с контролем. Полипептидный комплекс сосудов достоверно понижал экспрессию протеина p53 на 69%, p16 - на 61%, p21 - на 39% и p65 - на 64% в органотипической культуре кожи крыс (рисунок).

Таким образом, полипептидный комплекс сосудов и входящий в его состав трипептид KED проявляли более сильный антиапоптотический эффект в органотипической культуре дермы животных, чем аминокислоты, составляющие этот короткий пептид. Поскольку эффекты полипептидного комплекса сосудов и пептида KED были сопоставимы, можно предположить, что действие первого на клетки кожи достигается за счет пептида KED.



*Влияние аминокислот Lys, Glu, Asp, пептида Lys-Glu-Asp (KED) и полипептидного комплекса сосудов на площадь экспрессии белков – активаторов апоптоза p53, p21, p16, p65 в органотипической культуре дермы крыс. \* –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем. Все данные площади экспрессии приведены относительно контроля, который принят за 0*

Ранее для иммунопротекторного пептида Lys-Glu было показано, что его биологическая активность выше, чем у аминокислот, входящих в состав этого пептида [9]. Обобщая эти данные с результатами нашего исследования, можно предположить, что короткие пептиды, благодаря пептидным связям, могут связываться с нуклеосомой, гистоновыми белками или двунитевой ДНК [2] и регулировать экспрессию определенных генов (в нашем исследовании – генов *p16*, *p21*, *p53*, *p65*). Это предположение подтверждается данными о том, что пептид KED может быть использован в качестве компонента в культуральной среде для снижения экспрессии геронтогенов *p16* и *p21* и синтеза соответствующих белков при длительном культивировании стволовых клеток [10].

Известно, что транскрипционный фактор p65 экспрессируется при клеточном старении. В ядре p65 ко-локализуется с молекулой NF $\kappa$ B, вовлеченной в inflammaging (слабо выраженную воспалительную реакцию, развивающуюся при старении) [11]. Ранее для пептида KED было выявлено иммуномодулирующее действие. Таким образом, пептид KED, регулируя экспрессию белка p65, может не только снижать выраженность апоптоза фибробластов кожи, но и замедлять развитие воспалительных реакций в дерме.

Установлено, что экспрессия белков p16 и p21 возрастает в большинстве органов и тканей человека: в головном мозге, селезенке, печени, кишечнике, поджелудочной железе и коже. Предполагается, что эти молекулы важны для определения секреторного фенотипа клеток кожи, ассоциированного со старением (senescence-associated secretory phenotype) [12]. Кроме того, повышение экспрессии факторов транскрипции p16 и p21 выявлено при ускоренном старении фибробластов кожи, вызванном воздействием ультрафиолетового излучения. Авторы этого исследования полагают, что вещества, снижающие синтез этих молекул при ускоренном старении клеток кожи, являются перспективными геропротекторами [13]. Аналогичные эффекты выявлены для проапоптотического протеина p53. Белок p53 не только играет важную роль в старении клеток кожи, но и вовлечен в развитие патологии дермы. Установлено, что его синтез возрастает при псориазе. Пептид KED, снижая экспрессию циклин-зависимых киназ p16, p21, p53, предотвращает развитие секреторного фенотипа клеток кожи, ассоциированного со старением, что указывает на его геропротекторное действие.

Полученные данные дополняют результаты ранее проведенных исследований в диссоциированной культуре фибробластов кожи крыс при ее репликативном старении. В этой работе было установлено, что пептид KED уменьшает продукцию матриксной металлопротеиназы-9 (MMP9) и стимулирует синтез молекул, активирующих пролиферацию и замедляющих старение фибробластов кожи (Ki67, CD98hc) [3]. Кроме того, применение пептида KED в сочетании с другими пептидами путем электрофореза повышало толщину дермы и эпидермиса у женщин среднего возраста [14].

**Заключение.** Антиапоптотическое влияние полипептидного комплекса сосудов достигается за счет входящего в его состав пептида KED. Пептид KED способствует снижению экспрессии генов и синтеза проапоптотических белков p16, p21, p53, p65 и других протеинов (Ki67, CD98hc, MMP9), что выражается в нормализации толщины дермы и эпидермиса. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что полипептидный комплекс сосудов и пептид KED обладают антиапоптотическими свойствами в отношении клеток кожи и могут в дальнейшем изучаться в качестве активных компонентов средств, направленных на повышение функций и улучшение внешнего вида кожи при ее возрастной инволюции.

### Список литературы

1. Chambers E.S., Vukmanovic-Stejic M. Skin barrier immunity and ageing. *Immunology*. 2020. vol. 160. no 2. P. 116-125. DOI: 10.1111/imm.13152.

2. Хавинсон В.Х., Тарновская С.И., Линькова Н.С., Гутоп Е.О., Елашкина Е.В. Эпигенетические аспекты пептидной регуляции пролиферации эндотелия сосудов при его старении // Успехи геронтологии. 2014. Т. 27. № 1. С. 108-114.
3. Linkova N.S., Drobintseva A.O., Orlova O.A., Kuznetsova E.P., Polyakova V.O., Kvetnoy I.M., Khavinson V.K. Peptide regulation of skin fibroblast functions during their aging in vitro. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2016. vol. 16. P. 175-178. DOI: 10.1007/s10517-016-3370-x.
4. Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids*. 2009. vol. 37 (1). P. 1-17. DOI: 10.1007/s00726-009-0269-0.
5. Booth P.J., Humpherson P.G., Watson T.J. Leese H.J. Amino acid depletion and appearance during porcine preimplantation embryo development in vitro. *Reproduction*. 2005. vol. 130. no 5. P. 655–668. DOI: 10.1530/rep.1.00727.
6. Philip R., Campbell E., Wheatley D. N. Arginine deprivation, growth inhibition death: 2 Enzymatic degradation of arginine in normal and malignant cell cultures. *British Journal of Cancer*. 2003. vol. 88. no 4. P. 613-623. DOI: 10.1038/sj.bjc.6600681.
7. Kim J., Nakasaki M., Todorova D. P53 induces skin aging by depleting Blimp1+ sebaceous gland cells. *Cell Death and Disease*. 2014. vol. 5. no 3. P. 1-10. DOI: 10.1038/cddis.2014.87.
8. Bedelbaeva K., Snyder A., Gourevitch D. Lack of p21 expression links cell cycle control and appendage regeneration in mice. *PNAS USA*. 2010. vol. 30. P. 45-50.
9. Khavinson V.Kh., Tarnovskaya S.I., Linkova N.S., Chervyakova N.A., Nichik T.E., Elashkina E.V., Chalisova N.I. Role of peptide bond in the realization of biological activity of short peptides. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2015. vol. 158. no 4. P. 551-554. DOI: 10.1007/s10517-015-2805-0.
10. Sinjari B., Diomedede F., Khavinson V., Mironova E., Linkova N., Trofimova S., Trubiani O., Caputi S. Short peptides protect oral stem cells from ageing. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2020. vol. 16. P. 159-166. DOI: 10.1007/s12015-019-09921-3.
11. Zhang L., Zhao J., Gurkar A., Niedernhofer L.J., Robbins P.D. Methods to Quantify the NF- $\kappa$ B Pathway During Senescence. *Methods Mol Biol*. 2019. vol. 1896. P. 231-250. DOI: 10.1007/978-1-4939-8931-7\_18.
12. Lodde V., Munk R., Abdelmohsen K., Rossi M., Gorospe M., Idda M.L., McClusky W.G. Survey of senescent cell markers with age in human tissues. *Aging (Albany NY)*. 2020. vol. 12 (5). P. 4052-4066. DOI: 10.18632/aging.102903.
13. Lin J.R., Qin H.H., Wu W.Y., He S.J., Xu J.H. Vitamin C protects against UV irradiation-induced apoptosis through reactivating silenced tumor suppressor genes p21 and p16 in a Tet-



dependent DNA demethylation manner in human skin cancer cells. *Cancer Biother Radiopharm.* 2014. vol. 29 (6). P. 257-264. DOI: 10.1089/cbr.2014.1647.

14. Фридман Н.В., Бойко Л.В., Трофимова С.В. Перспективы применения пептидных биорегуляторов для восстановления структуры кожи женщин среднего возраста // *Врач.* 2020. Т. 31. № 9. С. 62-66.