

**ПЕПТИДЫ В ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОМ
КОНТРОЛЕ СТАРЕНИЯ**
Открытия и перспективы

**Владимир Хавинсон, доктор медицинских наук
Фил Миканс, магистр наук, бакалавр фармации
Александр Марьянович, доктор биологических наук**

2020

Vladimir KHAVINSON, Phil MICANS, and Alexander MARYANOVICH

PEPTIDES IN THE EPIGENETIC CONTROL OF AGEING

Discoveries and Prospects

Profound Health Ltd., UK

2017

ISBN: 1999736702

Владимир Хацкелевич Хавинсон

Президент (2011-2015 гг.) Европейского отделения Международной ассоциации геронтологии и гериатрии (IAGG-ER), директор Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии, вице-президент Геронтологического общества Российской академии наук, член-корреспондент Российской академии наук, профессор, доктор медицинских наук.

Фил Миканс

Главный редактор журнала "Вопросы старения", помощник редактора журнала «Медицина продолжительности жизни» (Lifespan Medicine Journal), директор Британского общества долголетия (British Longevity Society), вице-президент группы «Международные системы противодействия старению» (International Antiageing Systems — IAS). Магистр наук, бакалавр фармации.

Александр Тимурович Марьянович

Заведующий кафедрой нормальной физиологии Северо-Западного государственного медицинского университета им. И. И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия, профессор, доктор биологических наук.

В монографии обобщены результаты более чем сорокалетнего поиска эндогенных веществ, способных замедлять процессы старения. Такие вещества были обнаружены среди короткоцепочечных пептидов, которые способны проникать сквозь клеточные и ядерные мембраны, связываться с ДНК и производить эпигенетические эффекты, приводящие к восстановлению нарушенных функций клеток. Синтетические аналоги таких пептидов в настоящее время используются в качестве пероральных геропротекторных препаратов. В книге приведены экспериментальные и клинические доказательства влияния этих пептидов на пролиферацию клеток, регенерацию тканей, врожденный и приобретенный иммунитет, метаболический гомеостаз, перекисное окисление липидов, антирадикальную защиту и другие функции.

Предисловие

Настоящая монография развивает гипотезы, выдвинутые более десяти лет назад в книге В.Х. Хавинсона и В.В. Малинина «Геронтологические аспекты пептидной регуляции генома» (изд-во Karger, 2005). Гипотезы касаются тканеспецифических эффектов короткоцепочечных пептидов — геропротекторов и эпигенетического механизма этих эффектов. Здесь, в главах 2 и 4, соответственно, мы приводим дополнительные доказательства в пользу обеих гипотез.

Во вступительной главе кратко описаны общие контуры пептидной регуляции физиологических функций. На наш взгляд, эта тема сейчас неоправданно упускается из виду.

В главе 3 представлены некоторые теории и результаты анализа, подтверждающие возможность прямого взаимодействия короткоцепочечных пептидов с ДНК.

Наши исследования расширили имеющиеся данные о влиянии пептидов на такие важные функции, как пролиферация клеток и регенерация тканей, врожденный и приобретенный иммунитет, метаболический гомеостаз, перекисное окисление липидов, антирадикальная защита и другие.

Монографию завершает компендиум (главы 4 и 5) данных о перспективах применения короткоцепочечных пептидов в здравоохранении — от неврологии до дерматологии, с акцентом на замедление старения человека и увеличение продолжительности его жизни.

Мы считаем, что данная работа будет полезна для решения одной из главных проблем здравоохранения XXI века — увеличения продуктивной продолжительности жизни человека.

СОДЕРЖАНИЕ

Глава 1. РЕГУЛЯТОРНЫЕ ПЕПТИДЫ: ИХ ПРОДУКЦИЯ, ТРАНСПОРТ И ЭФФЕКТЫ

- 1.1. Пептидная регуляция: ключевые вопросы
- 1.2. Синтез регуляторных пептидов
- 1.3. Продуценты регуляторных пептидов
- 1.4. Рецепторные и нерепеорторные взаимодействия пептидов с клетками-мишенями

Резюме

Литература

Глава 2. ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ПЕПТИДОВ

- 2.1. Пептидные препараты, полученные из организма животных
- 2.2. Короткоцепочечные пептиды Хавинсона

Резюме

Литература

Глава 3. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ПЕПТИДОВ С ДНК

- 3.1. Взаимодействия белков и пептидов с ДНК
- 3.2. Моделирование взаимодействия короткоцепочечных пептидов с ДНК

Резюме

Литература

Глава 4. ПЕПТИДЫ КАК ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

- 4.1. Эпигенетический подход к проблеме старения
- 4.2. Эпигенетическое действие короткоцепочечных пептидов на органы и ткани

Резюме

Литература

Глава 5. КОРОТКОЦЕПОЧЕЧНЫЕ ПЕПТИДЫ КАК ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА: ВЫВОДЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

- 5.1. Центральная нервная система
- 5.2. Сетчатка глаза
- 5.3. Сосудистая система
- 5.4. Дыхательная система
- 5.5. Пищеварительная система
- 5.6. Выделительная система
- 5.7. Иммунная система
- 5.8. Углеводный обмен
- 5.9. Опорно-двигательный аппарат
- 5.10. Старение кожи
- 5.11. Адаптация к интенсивным физическим нагрузкам

Резюме

Литература

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

СПИСОК ПАТЕНТОВ

Глава 1. РЕГУЛЯТОРНЫЕ ПЕПТИДЫ: ИХ ПРОДУКЦИЯ, ТРАНСПОРТ И ЭФФЕКТЫ

1.1. Пептидная регуляция: ключевые вопросы

В организме человека есть три источника белков: а) пища, б) кишечные бактерии и в) клетки самого организма. Любая белковая молекула, независимо от ее источника, в итоге расщепляется с помощью ферментов на ряд коротких пептидных фрагментов. Почти все фрагменты являются лишь промежуточными звеньями на пути к дальнейшему расщеплению. Лишь небольшая часть таких фрагментов участвует в регуляторных процессах, взаимодействуя с клетками-мишенями сквозь рецепторы или каким-либо иным способом.

Совокупность вопросов, связанных с пептидной регуляцией, можно свести к четырем ключевым вопросам:

А. Каковы механизмы синтеза регуляторных пептидов (рибосомальные и/или нерибосомальные)?

Б. Какие клетки, ткани и органы продуцируют регуляторные пептиды?

В. Как регуляторные пептиды проходят сквозь барьеры (кишечную стенку, клеточную и ядерную мембраны)?

Г. Каковы механизмы взаимодействия регуляторных пептидов с клетками-мишенями (рецепторные или нерецепторные)?

1.2. Синтез регуляторных пептидов

Размеры пептидных молекул, т. е. количества аминокислотных остатков в пептидных цепочках, определяют существенные различия в способах их проникновения сквозь биологические барьеры (В) и воздействия на клетки-мишени (Г). Ниже будет показано, что порог значительных изменений названных свойств пептидов составляет от четырех до пяти аминокислотных остатков. Поэтому в настоящей работе, в отличие от общепринятой классификации, мы будем обозначать пептиды как *короткие* (короткоцепочечные пептиды) только в том случае, если они состоят из *двух-четырех аминокислот*, т. е. если они являются ди-, три- и тетрапептидами. Все остальные пептиды будут рассматриваться как длинные (длинноцепочечные) пептиды.

Рибосомальный синтез белков-предшественников и их расщепление

Белки, синтезируемые в клетках макроорганизма и бактериальных клетках, в соответствии с Центральной догмой молекулярной биологии, т. е. ДНК → мРНК → (рибосома + тРНК + аминокислоты) → белок, расщепляются ферментами в определенных сайтах протеолиза. Это означает, что пептидные связи разрушаются в определенных мотивах (комбинациях аминокислотных остатков) [10] и в определенном порядке [12]. Этот процесс называется ограниченным протеолизом и состоит из следующих стадий:

А. Удаление гидрофобного N-концевого сигнального пептида, который отвечает за перенос молекулы белка, предназначенной для экспорта из полирибосомы, на поверхность грубого эндоплазматического ретикулула.

Б. Протеолитическое расщепление связей между некоторыми аминокислотными остатками и образование пептидов различного размера.

В. Посттрансляционные модификации некоторых аминокислотных остатков в образующихся пептидах (фосфорилирование, ацетилирование и др.)

Классические участки ферментативного расщепления белковой молекулы представлены комбинациями двух положительно заряженных диаминомонокарбоновых кислот [60, 63], т. е. Lys-Arg (KR), Arg-Arg (RK) или Lys-Lys (KK). В различных тканях пропорции расщепления на таких участках варьируют от почти равных долей до значительного преобладания пептидных связей, расщепленных в сторону С-конца от аргинина (Lys-Arg или Arg-Arg) [16, 47, 65]. Иногда расщепление происходит внутри мотива Arg-X-Lys/Arg-Arg (RXK/RR) [47]. Реже расщепляются пептидные связи, включающие только одну основную аминокислоту, Arg или Lys [60]; однако такие случаи важны для образования короткоцепочечных регуляторных пептидов (см. ниже). Участки расщепления могут вообще не содержать аргинина, например, нейротензин расщепляется в мозге не в связях Arg-Arg (RR) и Pro-Arg (PR), но и в связях Pro-Тур (PY) [44].

Аминокислотный состав эндогенных регуляторных пептидов, как правило, обычно отличается от среднего состава белков. Мы сравнили [30] аминокислотный состав всех белков, включенных в базу данных NIH Protein (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>), которая квалифицируется как "совокупность последовательностей из нескольких источников, включая трансляции из аннотированных областей кодирования в GenBank, RefSeq и сторонних аннотациях, а также записи из SwissProt, PIR, PRF и PDB", с аминокислотным составом более чем 150 регуляторных пептидов человека [42, 43] (табл.1). Для этого мы объединили все доступные аминокислотные последовательности в одно "слово", состоящее из 11 млрд. «букв», и рассчитали процентное содержание каждой буквы, например, А (аланин), С (цистеин) и т. д. То же было сделано и с аминокислотными последовательностями 155 регуляторных пептидов.

Таблица 1. Средние аминокислотные составы (%) белков, включенных в базу данных NIH Protein, и регуляторных пептидов человека*

Аминокислота	Все белки	Регуляторные пептиды человека
лейцин, L	9,82	9,60
аланин, A	8,63	5,96
глицин, G	7,05	8,77
серин, S	6,86	7,54
валин, V	6,70	4,38
глутаминовая кислота, E	6,23	4,07
изолейцин, I	5,82	3,28
треонин, T	5,60	4,03
аргинин, R	5,51	7,66
аспарагиновая кислота, D	5,41	4,23
лизин, K	5,29	6,28
пролин, P	4,78	6,00
аспарагин, N	4,12	3,24
фенилаланин, F	3,99	5,73
глутамин, Q	3,94	4,78
тирозин, Y	3,05	4,38
метионин, M	2,39	2,41
гистидин, H	2,21	3,00
триптофан, W	1,30	1,94
цистеин, C	1,30	2,72

*Расчеты были выполнены д-ром Д.Ю. Кормильцем (Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург).

Обоснованность приведенного выше сравнения ограничена тремя соображениями:

А. Сравниваются два образца несопоставимых размеров: сумма аминокислотных остатков в белках в 10^6 раз больше, чем в регуляторных пептидах.

Б. Данные по всем белкам разных биологических видов сравниваются с данными по регуляторным пептидам только человека.

В. В используемых базах данных недостаточно представлены некоторые важные классы белков, например, мембранные, которые труднее изолировать, чем цитоплазматические белки [38].

Со всеми вышеперечисленными оговорками можно заключить следующее:

А. По сравнению с белками, регуляторные пептиды (в данном случае длинноцепочечные) содержат больше аминокислот G, S, R, K, P, F, Q, Y, H, M, W, C и меньше L, A, V, E, T, I, D, N.

Б. Аминокислоты, наиболее распространенные в белках, наименее распространены в регуляторных пептидах, и наоборот.

Наибольшая разница (1: 2) наблюдается в содержании цистеина (Cys, C), который необходим для образования дисульфидной (S-S) связи, необходимой для стабилизации конформации полипептида.

Причина относительно высокого содержания глицина (Gly, G) в регуляторных пептидах, вероятно, заключается в том, что благодаря своей простой структуре он не препятствует конформационным изменениям и тем самым облегчает формирование соответствующих пространственных конфигураций.

В целом можно сделать вывод о том, что основная масса наиболее распространенных аминокислот находится в функционально неактивных доменах белков.

Короткоцепочечные регуляторные пептиды, созданные в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии (пептиды Хавинсона[®]), содержат только семь из 20 протеиногенных аминокислот, и сравнительные показатели присутствия их в пептидах таковы: $E > D > G = K = W > A = R$. Наиболее распространенными, согласно этому рейтингу, являются отрицательно заряженные (при $pH = 7$) глутаминовая кислота (Glu, E) и аспарагиновая кислота (Asp, D).

Нерибосомальный синтез пептидов

Пептидное связывание аминокислот вне рибосом приводит к образованию *de novo* регуляторных пептидов, в том числе короткоцепочечных, таких как карнозин (Ala-His, AH) и глутатион (Glu-Cys-Gly, ECG) (см. [36, 39]).

Фриц Липманн, лауреат Нобелевской премии по физиологии или медицине за 1953 г., показал, что нерибосомальный ферментативный синтез часто встречается у микроорганизмов, продуцирующих пептидные антибиотики [40]; пептиды нерибосомального происхождения, обнаруженные у животных и человека, могут продуцироваться микроорганизмами, а не клетками макроорганизма. Этот феномен изучен, главным образом, на антимикробных пептидах, полученных из бактерий, попадающих в желудочно-кишечный тракт в составе пищевых продуктов, таких как молоко или мед [9, 10]. Некоторые количества пептидов нерибосомального происхождения могут быть обнаружены в самих пищевых продуктах, и некоторые короткоцепочечные пептиды такого рода могут проникать во внутреннюю среду человеческого организма сквозь кишечный барьер (см. ниже).

Характерной особенностью пептидов нерибосомального происхождения является то, что их протеиногенные аминокислоты могут быть гликозилированными, ацилированными,

галогенированными или гидроксильрованными; они также могут нести N-метильные или N-формильные группы. Кроме того, такие пептиды часто содержат необычные или непотеиногенные аминокислоты (см. [36]) и D-аминокислоты.

Молекулы таких пептидов часто имеют циклическую структуру. Например, почвенные грибы *Tolypocladium inflatum* синтезируют циклический ундекапептид циклоспорин нерибосомальным способом [7]. Первичная структура циклоспорина А [27] может быть представлена в упрощенном виде следующим образом:



Здесь аббревиатуры, обозначающие непотеиногенные аминокислоты, выделены полужирным шрифтом:

Abu = α -аминомасляная кислота (непотеиногенная);

Sar = саркозин (промежуточный и побочный продукт в синтезе глицина);

и **ala** = D-Ala = D-аланин.

Нерибосомальный синтез создает не только короткоцепочечные пептиды, такие как карнозин и глутатион, но в микроорганизмах он может создавать пептидные молекулы, состоящие из нескольких десятков аминокислот, как это было рассмотрено в нескольких работах (см. [22]).

Неоднократно выдвигалась гипотеза, что нерибосомальный синтез является древним способом производства пептидов, который в ходе эволюции был заменен более прогрессивным рибосомальным синтезом. Возможно, так и было. Однако остается открытым вопрос о том, когда и каким образом появились нерибосомальные пептидные синтетазы (NRPSs), то есть белки, продуцируемые в *рибосомах* и необходимые для синтеза *нерибосомальных* пептидов.

Что касается регуляторных пептидов в головном мозге, то глутатион, продукт синтеза нерибосомальных белков, обнаружен связанным с синаптическими мембранами в головном мозге млекопитающих [26, 50] и считается кандидатом на роль нейромедиатора [24]. Однако Мишель Кретьен и его коллеги из Монреальского университета еще в 1970-х годах выдвинули предположение, ставшее впоследствии общепринятым, что все нейропептиды синтезируются в виде белковых молекул-предшественников, которые затем фрагментируются ферментами [10].

1.3. Продукты регуляторных пептидов

Регуляторные пептиды, происходящие из просвета кишки

Кишечник как источник регуляторных пептидов (рис. 1) имеет второстепенное значение в отношении длинных молекул и, скорее всего, большое значение в отношении короткоцепочечных пептидов. Пептиды появляются в просвете кишки в результате: протеолиза пищевых белков (рис. 1 А) и синтетической активности кишечной микробиоты (рис. 1 С) [2].

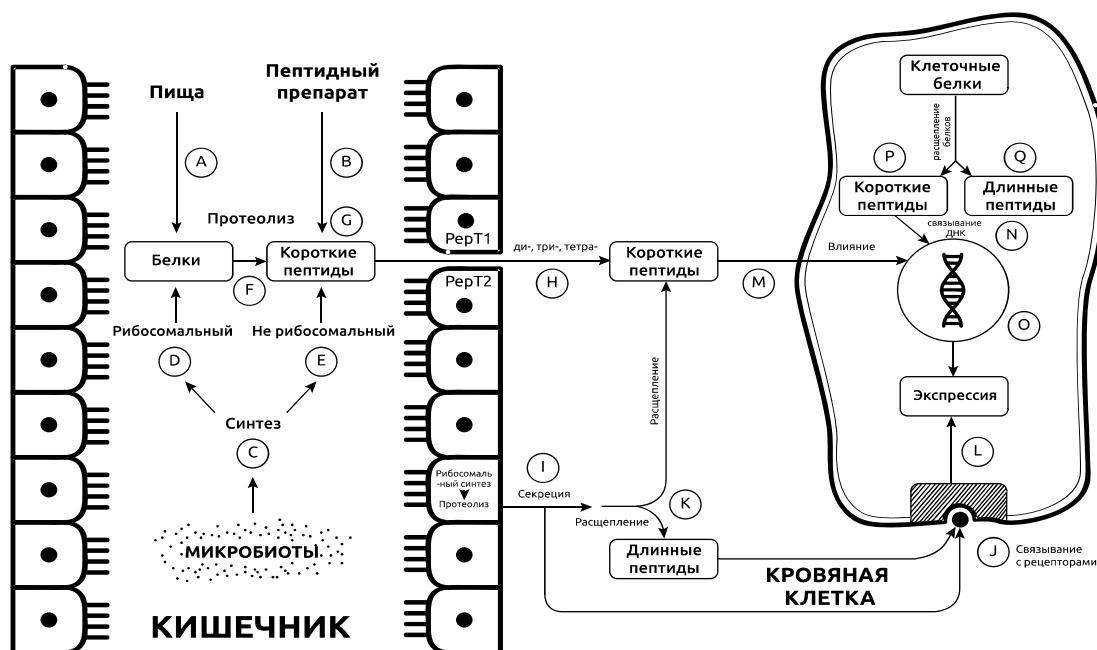


Рис. 1. Система пептидной регуляции: основные элементы.

Белки пищи расщепляются кишечными ферментами до тетра-, три- и дипептидов. Ди- и три- и, в меньшей степени, тетрапептиды всасываются в кровоток. В зависимости от их аминокислотного состава, пептиды более или менее устойчивы к дальнейшему протеолизу. Менее резистентные пептиды, которые количественно преобладают, расщепляются до аминокислот, тогда как более резистентные могут играть роль гуморальных регуляторных факторов.

Микроорганизмы, обитающие в толстой кишке и, в меньших количествах, в тонкой кишке, могут синтезировать: белки в своих рибосомах (рис. 1 D) и пептиды нерибосомальным способом (рис. 1 E). Последние привлекают внимание исследователей преимущественно в контексте влияния патогенных микроорганизмов на биоту кишечника и на состояние организма [59].

Белки, синтезируемые в микробных рибосомах, содержат те же протеиногенные аминокислоты, что и белки, содержащиеся в пищевых белках. Обе группы белков расщепляются (рис. 1 F) тем же арсеналом панкреатических пептидаз. После этого короткоцепочечные пептиды, происходящие как из пищи, так и из микробиоты, можно рассматривать как единый пул (рис. 1 G).

Среди продуктов их пищеварения выделяют короткоцепочечные пептиды, такие как глицил-глицин Gly-Gly, глицил-карнозин Gly-Sar, карнозин β -Ala-His и другие, которые из кишечника могут выходить в кровоток [1].

Регуляторные пептиды, выделяемые непосредственно в кровь

Третий, после пищи и микробиоты, источник регуляторных пептидов составляют эндокринные железы и диффузная нейроэндокринная система, которая представлена в основном эндокринными клетками в слизистой оболочке тонкой кишки [56]. Во всех вышеперечисленных клетках происходят следующие процессы: (а) рибосомальный синтез белков, включая белки — предшественники пептидов; (б) ограниченный протеолиз белков

до пептидов, часть которых являются регуляторными; и (в) высвобождение регуляторных пептидов в кровь (рис. 1 I). Некоторые из длинноцепочечных пептидов вскоре связываются со своими рецепторами на поверхности клеток-мишеней (рис. 1 J), тогда как другие расщепляются в крови и интерстициальной жидкости на более мелкие фрагменты (рис. 1 K), которые также связываются со специфическими рецепторами (рис. 1 J).

Связавшись со специфическими рецепторами, пептиды запускают сквозь системы вторичных мессенджеров (рис. 1 L) цепочки биохимических событий, которые в конечном итоге проявляются в виде эффектов на клеточном и тканевом уровнях.

Синтетические аналоги регуляторных пептидов в качестве лекарственных препаратов

Короткоцепочечные регуляторные пептиды могут поступать в организм и в виде синтетических препаратов, принимаемых *per os* в качестве лекарственных средств (см. гл. 5). Это четвертый возможный источник регуляторных пептидов (рис. 1 B).

Независимо от их происхождения короткоцепочечных регуляторных пептидов (из пищевых продуктов, микробиоты, эндокринные клеток или лекарственных препаратов), дальнейшая судьба всех этих молекул имеет общие черты, а потому участие в физиологической регуляции как эндогенных, так и экзогенных пептидов можно рассматривать с общих позиций.

Регуляторные пептиды, продуцируемые самими клетками-мишенями

Теоретически регуляторные пептиды могут образовываться путем расщепления клеточных белков, присутствующих в плазматической мембране, цитоплазме, ядерной оболочке и нуклеоплазме. Например, ниже будет показано, что мотив AEDG (пептиды эпифиза) состоит из белка, связанного с механизмами аутофагии, который присутствует во многих органах человеческого организма, включая ЦНС [41, 57].

Короткоцепочечные пептиды (рис. 1 P), образующиеся в результате протеолиза собственных белков клетки, могут связываться с ДНК (рис. 1 N), тогда как длинноцепочечные пептиды (рис. 1 Q) того же происхождения могут оставить свою клетку-продуцент и связаться с рецепторами (рис. 1 J) на поверхности той же клетки (аутокринный механизм действия). В противном случае они могут связывать соседние клетки (паракринный механизм) или удаленные клетки (эндокринный механизм).

Транспорт регуляторных пептидов сквозь барьеры

Транспорт пептидов сквозь барьеры осуществляется белками *bp* суперсемейства главных фасилитаторов (*major facilitator superfamily* — MSF), которое включает подсемейство протонзависимых (или связанных) олигопептидных транспортеров (*proton-dependent or proton-coupled oligopeptide transporters* — OPTs), способных распознавать и переносить более 8000 различных пептидов [54].

Система поглощения короткоцепочечных пептидов, в том числе тетрапептидов, обнаружена у бактерии *Sinorhizobium meliloti* [49]. Транспортёр тетрапептидов Isp4 обнаружен в делящихся дрожжах *Schizosaccharomyces pombe* и считается незаменимым для этих клеток [34]. В почкующихся дрожжах *Saccharomyces cerevisia* описана транспортная система для олигопептидов длиной в 4-5 аминокислот (*OligoPeptide Transport* — OPT) [67]. PcORT14, ортолог OPT, способен опосредовать поглощение тетрапептида KLGL клетками дрожжей *Saccharomyces cerevisia* [68]. OPT, специфичные для три-и пентапептидов, обнаружены в грибах и растениях [52]. Наличие таких транспортных систем прослеживается филогенетически от бактерий и грибов до позвоночных [14].

Транспорт пептидов сквозь кишечный барьер

Короткоцепочечные пептиды образуются в результате ограниченного протеолиза белков, как собственных, так и пищевых, которые в небольших количествах переходят из тонкой кишки в кровь [69].

При ферментативном расщеплении пищевых белков существует теоретическая возможность образования короткоживущих фрагментов, структура которых сходна с регуляторными длинноцепочечными пептидами; однако сомнительно, что столь крупные молекулы были способны проникать сквозь кишечный барьер.

Вполне возможно, что кишечный барьер проницаем для циклических пептидов. Например, аргинин-вазопрессин (CYFQNCPRG) частично всасывается и сохраняет свою физиологическую активность при всасывании [48, 61]. В связи с этим возникают два вопроса: много ли циклических длинноцепочечных пептидов в просвете кишки и имеют ли они какое-либо значение для системной гуморальной регуляции?

Как было указано выше, расщепление белков и пептидов в просвете кишки (независимо от того, является ли их происхождение пищевым или микробным) заканчивается на стадии короткоцепочечных пептидов (рис. 1 G), которые способны проникать сквозь кишечный барьер и попадать в интерстициальную жидкость и кровь.

Трипептид Ala-Gly-Gly (AGG) и некоторые дипептиды не гидролизуются в тонкой кишке. Транспортные системы для переноса дипептидов сквозь кишечный барьер не строго специфичны, так как при одновременном введении в просвет кишки двух дипептидов транспорт каждого из них оказывается менее интенсивным, чем при введении одного [1].

Транспортеры пептидов локализованы на щеточных мембранах эпителиальных клеток кишечника [64]. Они переносят ди- и трипептиды сквозь кишечный барьер [5, 64]. Pept1 (рис. 1 H) действует как электрогенный протон- и трипептидный симпортер и переносит любые ди- и трипептиды, но не свободные аминокислоты и не тетрапептиды или еще более крупные молекулы [13, 35]. Однако у птиц было показано, что Pept2 переносит и тетрапептиды [66]

Транспорт пептидов сквозь гематоэнцефалический барьер

Длинноцепочечные регуляторные пептиды, синтезированные вне мозга, оказывают свое действие на центральную нервную систему путем связывания со специфическими рецепторами, локализованными на вагусных афферентах (чувствительных волокнах блуждающего нерва) и на внешней поверхности мозга, и лишь в редких случаях благодаря их проникновению сквозь гематоэнцефалический барьер в паренхиму мозга за счет специфической транспортной системы [43]. В то же время короткоцепочечные пептиды, такие как TRPT, могут действовать, попадая в мозг [46]. Например, считается, что тетрапептид Tyr-MIF-1 (YPLG) проникает в мозг путем диффузии сквозь гематоэнцефалический барьер [53]

Транспорт пептидов сквозь клеточные и ядерные мембраны: длинноцепочечные пептиды, проникающие в клетку

У куриных эмбрионов экспрессия мРНК транспортных систем Pept1 и Pept2 обнаруживается не только в тонкой кишке, но и в головном мозге, сердце, легких и почках [72]. Pept2 обнаружен в срезах мозга крыс [25].

Некоторые тетрапептиды способны проходить сквозь клеточные мембраны без участия Pepts (рис. 1 M); например, эта способность показана для синтетического опиоидного тетрапептида [Dmt1]DALDA (Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂, где Dmt-2',6' — диметилтирозин) [70].

В конце 1980-х годов исследователи, работавшие на медицинском факультете Университета Джона Хопкинса, обнаружили, что белок транс-активатор транскрипции (Tat) вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) способен проникать в клетки и влиять на

экспрессию генов [19, 21]. Именно тогда было открыто семейство проникающих в клетки пептидов (cell-penetrating peptides — CPPs) [11, 20].

Полагают, что CPPs можно будет использовать в качестве эффективного и нетоксичного средства для доставки в клетки малых интерферирующих РНК (siRNA) [15] — мощного инструмента для модуляции генной экспрессии с помощью РНК-интерференции (RNAi) [58]. Следует подчеркнуть, что CPPs являются не только переносчиками других молекул в клетки извне, но и сами могут быть регуляторными пептидами, то есть могут производить физиологические эффекты, влияя на экспрессию генов.

Большинство CPPs являются длинноцепочечными пептидами, такими как нонапептид R₆W₃ или октадекапептид PVEC (табл. 2). CPPs широко распространены в вирусах человека. Например, белки оболочки вируса Т-клеточного лейкоза человека и вируса иммунодефицита человека ВИЧ-1 содержат примерно по 200 копий мотива GRKKRRQRRPPQ, известного как Tat-пептид.

Таблица 2. Некоторые проникающие в клетку пептидные мотивы [6] и биологические виды, чьи белки содержат такие мотивы [30]

Происхождение	Пептид	Первичная структура	Кол-во мотивов* *	Образцы видов, имеющих мотив, обнаруженный в их белках
Белкового происхождения	Пенетратин (16)*	RQIKIWFQNRRMKWKK	1204	человек, горилла, шимпанзе, макака, слон, овца, свинья, летучая мышь, утконос, саккоглосс Ковалевского, пиявки, клещи и т. д.
	Tat-пептид (13)	GRKKRRQRRPPQ	447	вирус Т-клеточного лейкоза человека, вирус иммунодефицита человека-1
	PVEC (18)	LLIILRRRIRKQAHANSK	1	домовая мышь
Синтетические	Полиаргинины (7-11)	(R) <i>n</i> 6 < <i>n</i> < 12	273 (R11)	человек, кошка, собака, дрозофила, токсоплазма, дрожжи, гидра, ячмень, рис, пшеница, кукуруза, персик, <i>Ancylostoma ceylanicum</i> , <i>Acanthamoeba castellanii</i> , <i>Acetobacter pasteurianus</i> и т. д.
	MAP (18)	KLALKLALKALKAALK LA	0	не найдено
	R ₆ W ₃ (9)	RRWWRRWRR	3	рис, <i>Gregarina niphandrodes</i>

* В скобках указано количество аминокислотных остатков в мотиве.

** Общее количество мотивов, найденных в NIH Protein Database.

Среди синтетических CPPs следует отметить декапептид полиаргинин (R)₁₁ [6]. Было обнаружено, что некоторые животные белки содержат и более длинные монотонные мотивы, состоящие исключительно из остатков аргинина (R...R) [30]. Например, переносчик многочисленных вирусных заболеваний комар *Aedes albopictus* имеет белок, в котором 100 остатков аргинина следуют подряд.

Химерные CPPs, а именно Transportan (n=27), MPG (n=27) и Pep-1 (n=21), которые упоминаются в [6], до сих пор не найдены в природных белках [30].

Способность проникать сквозь клеточные мембраны характерна для коротких фрагментов Tat-белка (активатора транскрипции ВИЧ-1). Часто они являются основными, т. е. содержат в избытке положительно заряженные аминокислотные остатки. Преимущество этих пептидов заключается в том, что они легко проходят кислый слой гликокаликса, прилегающий к плазматической мембране [37]. Показано, что синтетические основные и амфифильные пептиды, содержащие несколько остатков лизина, проникают не только в клетку, но и в ядро, где они образуют комплексы с ДНК и РНК [31-33].

Непосредственное взаимодействие пептида с клеточной мембраной определяется электростатическими силами между положительно заряженными боковыми цепями остатков аргинина (R) и лизина (K) и отрицательно заряженными карбоксильными фрагментами фосфатидилсерина, находящимися на внешней стороне плазматической мембраны. Центрами связывания отрицательно заряженных (карбоновых) боковых цепей пептидов являются положительно заряженные холиновые и этаноламиновые фрагменты фосфолипидов. Другим возможным механизмом проникновения короткоцепочечных пептидов сквозь плазматические мембраны является пиноцитоз [11].

В число CPPs также входят короткие синтетические пептиды, такие как пептид тимуса (KE) и пептиды эпифиза (AEDG) [4].

Короткоцепочечные пептиды Хавинсона как CPPs

Под влиянием пептидов мозга (AEDP) состояние хроматина в культивируемых клетках изменяется. Было показано, что пептиды мозга проходят сквозь плазматическую и ядерную мембраны и влияют на активность генов [3].

Пептиды эпифиза, коры головного мозга (EDR) и бронхов (AEDL) преимущественно связываются с CNG-содержащими последовательностями ДНК, которые являются мишенями для метилирования цитозина в эукариотической ДНК. Пептиды эпифиза, семенников (KEDG) и мозга, похоже, связываются преимущественно с CAG-, в то время как пептиды бронхов — с CTG-содержащими последовательностями. Сайт-специфические взаимодействия пептидов с ДНК могут эпигенетически контролировать клеточные функции и, по-видимому, играют важную роль в регуляции активности генов от самых ранних стадий биологической эволюции до настоящего времени [17].

Короткоцепочечные пептиды, прошедшие сквозь клеточную и ядерную мембраны, могут регулировать экспрессию генов и синтез белка, стимулировать пролиферацию и дифференцировку клеток, подавлять апоптоз, восстанавливая тем самым функции различных органов [28, 29, 32].

Было показано, что пептиды эпифиза, мозга и семенников, меченные FITC, присутствуют в ядрах и ядрышках клеток HeLa после их инкубации с пептидами в течение 12 ч [18].

Известно, что ядро эукариотической клетки имеет систему транспортных пор (нуклеопор), образованных белковыми комплексами нуклеопоринов. Внутренний диаметр нуклеопора составляет около 50 нм, следовательно, они проницаемы для свободно

диффундирующих низкомолекулярных веществ массой до 3,5 кДа, к числу которых можно отнести короткоцепочечные пептиды. Это позволяет обсуждать возможность непосредственного взаимодействия короткоцепочечных пептидов с ДНК [51].

1.4 Рецепторные и нерецепторные взаимодействия пептидов с клетками-мишенями

Рецепторно-опосредованные взаимодействия

Несмотря на огромный фармацевтический интерес к деталям взаимодействия регуляторных пептидов с их специфическими рецепторами на клеточных мембранах, эти детали до сих пор остаются малоизученными. Данные о связывании около десятка пептидов с рецепторами, встроенными в мицеллы додецилфосфохолина, позволяют предположить, что: (i) при связывании с его рецептором лиганд может взаимодействовать с липидным бислоем вокруг рецептора; (ii) взаимодействие с клеточными мембранами включает от 4 до 12 аминокислотных остатков пептида, которые входят в состав от 4 до 33 длинных аминокислотных сегментов его молекул, и только от 4 до 5 длинных аминокислотных мотивов полностью взаимодействуют с мембраной.

Нерецепторные взаимодействия

Рецепторно-неопосредованные взаимодействия более характерны для короткоцепочечных регуляторных пептидов, которые способны проникать сквозь клеточную и ядерную мембраны (рис. 1 М) и путем укладки в большую бороздку молекулы ДНК (рис. 1 N) могут влиять на транскрипцию строго определенных генов (см. гл. 3). Это — один из основных принципов эпигенетической регуляции физиологических функций с помощью пептидов (рис. 1 O). Механизм будет более подробно рассмотрен в гл. 3; однако в целом он соответствует следующей схеме [45]:

CRPs → экспрессия генов → синтез белка → физиологические изменения (например, старение)

Хотя физиологическое значение пептидных связей широко признано, роль пептидов, особенно короткоцепочечных, в физиологической регуляции недооценена. Регуляция, включающая отдельные аминокислоты, возможно, действует довольно рано в эволюции прокариот. Например, известно регуляторное действие аминокислот на пролиферацию бактерий. С появлением пептидных связей у природы появилась возможность записывать в молекулу гораздо больше информации для передачи к клетке-мишени. Это обеспечивает более тонкую регуляцию функций клеток.

Резюме

Регуляторные пептиды возникают в основном в результате ферментативного расщепления белков-предшественников, синтезируемых в рибосомах. Что касается короткоцепочечных пептидов, то нельзя исключать и нерибосомальный механизм их синтеза.

Основными продуцентами регуляторных пептидов являются нейросекреторные клетки, присутствующие во всех органах, но, главным образом, в кишечнике, эндокринных железах и головном мозге. Часть пептидов может появиться в просвете кишки вследствие расщепления пищевых белков и синтеза микробиотой как рибосомальных, так и нерибосомальных белков. Возможно также, что регуляторные пептиды образуются в самих клетках-мишенях в результате синтеза белков-предшественников и их последующего ферментативного расщепления.

Существуют специальные системы для активного транспорта регуляторных пептидов сквозь биологические барьеры, включая кишечную стенку, гематоэнцефалический барьер, клеточные и ядерные мембраны. Регуляторные пептиды могут проникать в клетки-мишени по тому же механизму, что и пептиды из группы CPPs.

Воздействие длинноцепочечных регуляторных пептидов на клетки-мишени в значительной степени опосредуется связыванием со специфическими рецепторами на поверхности клеток. Короткоцепочечные пептиды могут действовать нерцепторными путями, проникая в клетку и ее ядро, связываясь с молекулами ДНК и изменяя экспрессию генов (эти темы будут рассмотрены более подробно в главах 3 и 4).

Из-за способности короткоцепочечных пептидов взаимодействовать с ДНК рецепторно-неопосредованным способом их роль в физиологической регуляции гораздо более значительна, чем это было признано до сих пор.

Литература

1. Addison JM, Burston D, Dalrympe JA, Matthews DM, Payne JW, Sleisenger MH, Wilkinson S. A common mechanism for transport of di- and tri-peptides by hamster jejunum in vitro. *Clin Sci Mol Med*. 1975;49(4):313-22.
2. Al-Hassi HO, Mann ER, Sanchez B, English NR, Peake ST, Landy J, Man R, Urdaci M, Hart AL, Fernandez-Salazar L, Lee GH, Garrote JA, Arranz E, Margolles A, Stagg AJ, Knight SC, Bernardo D. Altered human gut dendritic cell properties in ulcerative colitis are reversed by *Lactobacillus plantarum* extracellular encrypted peptide STp. *Mol Nutr Food Res*. 2014;58(5):1132-43.
3. Anisimov SV, Bokheler KR, Khavinson VKh, Anisimov VN. Elucidation of the effect of brain cortex tetrapeptide Cortagen on gene expression in mouse heart by microarray. *Neuro Endocrinol Lett*. 2004;25(1/2):87-93.
4. Anisimov VN, Khavinson VKh. Peptide bioregulation of aging: results and prospects. *Biogerontology*. 2010;11:139-49.
5. Beale JH, Parker JL, Samsudin F, Barrett AL, Senan A, Bird LE, Scott D, Owens RJ, Sansom MS, Tucker SJ, Meredith D, Fowler PW, Newstead S. Crystal Structures of the extracellular domain from PepT1 and PepT2 provide novel insights into mammalian peptide transport. *Structure*. 2015;23(10):1889-99.
6. Bechara C, Sagan S. Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand?. *FEBS Letters*. 2013;587(12):1693–702.
7. Borel JF. History of the discovery of cyclosporin and of its early pharmacological development. *Wien Klin Wochenschr*. 2002;114(12):433-7.
8. Caminero A, Herrán AR, Nistal E, Pérez-Andrés J, Vaquero L, Vivas S, Ruiz de Morales JM, Albillos SM, Casqueiro J. Diversity of the cultivable human gut microbiome involved in gluten metabolism: Isolation of microorganisms with potential interest for coeliac disease. *FEMS Microbiol Ecol*. 2014;88(2):309-19.
9. Chaudhry V, Chauhan PS, Mishra A, Goel R, Asif MH, Mantri SS, Bag SK, Singh SK, Sawant SV, Nautiyal CS. Insights from the draft genome of *Paenibacillus lentimorbus* NRRL B-30488, a promising plant growth promoting bacterium. *J Biotechnol*. 2013;168(4):737-8.
10. Chrétien M, Benjannet S, Gossard F, Gianoulakis C, Crine P, Lis M, Seidah NG. From beta-lipotropin to beta-endorphin and „pro-opio-melanocortin“. *Can J Biochem*. 1979;57(9):1111-21.
11. Chugh A, Eudes F, Shim YS. Cell-penetrating peptides: Nanocarrier for macromolecule delivery in living cells. *IUBMB Life*. 2010;62(3):183-93.
12. Conlon JM. Biosynthesis of regulatory peptides — evolutionary aspects. In: Holmgren S, editor. *The Comparative Physiology of Regulatory Peptides*. Chapman & Hall. 1989.
13. Daniel H. Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport. *Annu Rev*

Physiol. 2004;66:361-84.

14. Daniel H, Spanier B, Kottra G, Weitz D. From bacteria to man: Archaic proton-dependent peptide transporters at work. *Physiology (Bethesda)*. 2006;21:93-102.
15. Dash-Wagh S, Langel Ü, Ulfendahl M. PepFect6 mediated SiRNA delivery into organotypic cultures. *Methods Mol Biol*. 2016;1364:27-35.
16. Dickerson IM, Mains RE. Cell-type specific posttranslational processing of peptides by different pituitary cell lines. *Endocrinology*. 1990;127(1):133-40.
17. Fedoreyeva LI, Kireev II, Khavinson VKh, Vanyushin BF. Penetration of short fluorescence-labeled peptides into the nucleus in HeLa cells and in vitro specific interaction of the peptides with deoxyribooligonucleotides and DNA. *Biochemistry (Moscow)*, 2011;76(11):1210-19.
18. Fedoreeva LI, Smirnova TA, Kolomijtseva GYa, Khavinson VKh, Vanyushin BF. Interaction of short peptides with FITC-labeled wheat histones and their complexes with deoxyribooligonucleotides. *Biochemistry (Moscow)*. 2013;78(2):166-75.
19. Frankel AD, Pabo CO. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*. 1988;55:1189-93.
20. Fuchs SM, Raines RT. Pathway for polyarginine entry into mammalian cells. *Biochemistry*. 2004;43:2438 — 44.
21. Green M, Loewenstein PM. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell*. 1988;55:1179-1188.
22. Grünwald J, Marahiel MA. Nonribosomally synthesized microbial macrocyclic peptides. In: Kastin AJ, editor. *Handbook of Biologically Active Peptides*. Amsterdam: Academic Press, 2006.
23. Guettou F, Quistgaard EM, Trésaugues L, Moberg P, Jegerschöld C, Zhu L, Jong AJ, Nordlund P, Löw C. Structural insights into substrate recognition in proton-dependent oligopeptide transporters. *EMBO Rep*. 2013;14(9):804-10.
24. Guo N, McIntosh C, Shaw C. Glutathione: new candidate neuropeptide in the central nervous system. *Neuroscience*. 1992;51(4):835-42.
25. Hu Y, Xie Y, Keep RF, Smith DE. Divergent developmental expression and function of the proton-coupled oligopeptide transporters PepT2 and PhT1 in regional brain slices of mouse and rat. *J Neurochem*. 2014;129(6):955-65.
26. Janáky R, Shaw CA, Varga V, Hermann A, Dohovics R, Saransaari P, Oja SS. Specific glutathione binding sites in pig cerebral cortical synaptic membranes. *Neuroscience*. 2000;95(2):617-24.
27. Kallen J, Mikol V, Taylor P, Walkinshaw MD. X-ray structures and analysis of 11 cyclosporin derivatives complexed with cyclophilin A. *J Mol Biol*. 1998;283:435-49.
28. Khavinson VKh. Peptidergic Regulation of Ageing. *Humanistica, St Petersburg*. 2009.
29. Khavinson VKh. Peptides, genome, aging. *Adv Gerontol*. 2014;4(4):337-45.
30. Khavinson VKh, Kormiletz DYu, Maryanovich AT. Peptides (epigenetic regulators) in the structure of proteins long- and short-lived rodents. *Bull Exper Biol Med*. 2017;163(5):671-6.
31. Khavinson VKh, Solov'ev AYu, Tarnovskaya SI, Lin'kova NS. Mechanism of biological activity of short peptides: Cell penetration and epigenetic regulation of gene expression. *Biol Bull Rev*. 2013;3(6):451-5.
32. Khavinson VKh, Solov'ev AYu, Zhilinskii DV, Shataeva LK, Vanyushin BF. Epigenetic aspects of peptide-mediated regulation of aging. *Adv Gerontol*. 2012;2(4):277-86.
33. Khavinson VKh, Tarnovskaya SI, Linkova NS, Pronyaeva VE, Shataeva LK, Yakutseni PP. Short cell-penetrating peptides: a model of interactions with gene promoter site. *Bull Exper Biol Med*. 2013;154(3):403-10.
34. Kitamura K, Nakase M, Tohda H, Takegawa K. The Ubiquitin ligase Ubr11 is essential for oligopeptide utilization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell*. 2012;11(3):302-10.
35. Klang JE, Burnworth LA, Pan YX, Webb KE Jr, Wong EA. Functional characterization of a

- cloned pig intestinal peptide transporter (pPepT1). *J Anim Sci.* 2005;83(1):172-81.
36. Klompus M, Ho W, Sharkey KA, McKay DM. Antisecretory effects of neuropeptide Y in the mouse colon are region-specific and are lost in DSS-induced colitis. *Regul Pept.* 2010;165(2-3):138-45.
37. Kubo T, Yanagihara K, Sato Y, Morita Y, Seyama T. Enhancement of gene silencing effect and membrane permeability by peptide-conjugated 27-nucleotide small interfering RNA. *Molecules.* 2012;17(9):11089-102.
38. Langelaan DN, Rainey JK. Membrane catalysis of peptide-receptor binding. *Biochem Cell Biol.* 2010;88(2):203-10.
39. Li H, Xu H, Graham DE, White RH. Glutathione synthetase homologs encode α -L-glutamate ligases for methanogenic coenzyme F₄₂₀ and tetrahydrosarcinapterin biosyntheses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(17):9785-90.
40. Lipmann F. Attempts to map a process evolution of peptide biosynthesis. *Science.* 1971;173(4000):875-84.
41. Liu TT, Hu CH, Tsai CD, Li CW, Lin YF, Wang JY. Heat stroke induces autophagy as a protection mechanism against neurodegeneration in the brain. *Shock.* 2010;34(6):643-8.
42. Maryanovich AT. Early stages of phylogenesis of peptide regulation. *J Evol Biochem Physiol.* 2014;50(5):460-71.
43. Maryanovich AT. Foundations of Peptide Regulation of the Physiological Functions: Blood-Brain Barrier and Evolution of Viscera-to-Brain Communications / Mechinkov North-Western State Medical University, 2014. (Russian, English).
44. McDermott JR, Smith AI, Edwardson JA, Griffiths EC. Mechanism of neurotensin degradation by rat brain peptidases. *Regul Pept.* 1982;3(5-6):397-404.
45. Micans P. The new Russian peptide revolution. *Aging Matters.* 2016. (Spec 25 yrs ann edit):6-9.
46. Moskal JR, Kuo AG, Weiss C, Wood PL, O'Connor Hanson A, Kelso S, Harris RB, Disterhoft JF. GLYX-13: a monoclonal antibody-derived peptide that acts as an N-methyl-D-aspartate receptor modulator. *Neuropharmacology.* 2005;49(7):1077-87.
47. Nagahama M, Ikemizu J, Misumi Y, Ikehara Y, Murakami K, Nakayama K. Evidence that differentiates between precursor cleavages at dibasic and Arg-X-Lys/Arg-Arg sites. *J Biochem.* 1991;110(5):806-11.
48. Natochin YuV, Prutskova NP. Absorption of functionally active arginine-vasotocin in the frog small intestine. *Dokl Biol Sci.* 2004;394:24-6.
49. Nogales J, Muñoz S, Olivares J, Sanjuán J. Genetic characterization of oligopeptide uptake systems in *Sinorhizobium meliloti*. *FEMS Microbiol Lett.* 2009;293(2):177-87.
50. Ogita K, Yoneda Y. Possible presence of [³H]glutathione (GSH) in synaptic membranes from rat brain. *Neurosci Res.* 1987;4(6):486-96.
51. Ohno M, Fornered M, Mattaj IW. Nucleocytoplasmic transport: the last 200 nanometers. *Cell.* 1998;92(2):327-36.
52. Osawa H, Stacey G, Gassmann W. ScOPT1 and AtOPT4 function as proton-coupled oligopeptide transporters with broad but distinct substrate specificities. *Biochem J.* 2006;393(Pt 1):267-75.
53. Pan W, Kastin AJ. From MIF-1 to endomorphin: the Tyr-MIF-1 family of peptides. *Peptides.* 2007;28(12):2411-34.
54. Parker JL, Mindell JA, Newstead S. Thermodynamic evidence for a dual transport mechanism in a POT peptide transporter. *Elife.* 2014;3. doi: 10.7554/eLife.04273.
55. Pessione E. Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012;2:86.
56. Polak JM, Bloom SR. The diffuse neuroendocrine system. Studies of this newly discovered controlling system in health and disease. *J Histochem Cytochem.* 1979;27(10):1398-1400.

57. Ribas VT, Schnepf B, Challagundla M, Koch JC, Bähr M, Lingor P. Early and sustained activation of autophagy in degenerating axons after spinal cord injury. *Brain Pathol.* 2015;25(2):157-70.
58. Roberts TC, Ezzat K, El Andaloussi S, Weinberg MS. Synthetic SiRNA delivery: Progress and prospects. *Methods Mol Biol.* 2016;1364:291-310.
59. Schneditz G, Rentner J, Roier S, Pletz J, Herzog KA, Bücken R, Troeger H, Schild S, Weber H, Breinbauer R, Gorkiewicz G, Högenauer C, Zechner EL. Enterotoxicity of a nonribosomal peptide causes antibiotic-associated colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(36):13181-6.
60. Schwartz TW. The processing of peptide precursors. 'Proline-directed arginyl cleavage' and other monobasic processing mechanisms. *FEBS Lett.* 1986;200(1):1-10.
61. Selivestrova EV, Shakhmatova EI, Komissarchik YaYu, Prutskova NP, Snigirevskaya ES, Natochin YuV. Immunocytochemical localization of vasopressin at its absorption by cells of rat small intestine. *Tsitologiya.* 2004;46(11):953-9.
62. Shao D, Massoud E, Clarke D, Cowley E, Renton K, Agu RU. Optimization of human nasal epithelium primary culture conditions for optimal proton oligopeptide and organic cation transporters expression in vitro. *Int J Pharm.* 2013;441(1-2):334-42.
63. Stoller TJ, Shields D. The role of paired basic amino acids in mediating proteolytic cleavage of prosomatostatin. Analysis using site-directed mutagenesis. *J Biol Chem.* 1989;264(12):6922-8.
64. Terada T, Inui K. Recent advances in structural biology of peptide transporters. *Curr Top Membr.* 2012;70:257-74.
65. Thorne BA, Thomas G. An in vivo characterization of the cleavage site specificity of the insulin cell prohormone processing enzymes. *J Biol Chem.* 1990;265(15):8436-43.
66. Van L, Pan YX, Bloomquist JR, Webb KE Jr, Wong EA. Developmental regulation of a turkey intestinal peptide transporter (PepT1). *Poult Sci.* 2005;84(1):75-82.
67. Wiles AM, Cai H, Naider F, Becker JM. Nutrient regulation of oligopeptide transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology.* 2006;152(Pt 10):3133-45.
68. Xiang Q, Wang Z, Zhang Y, Wang H. An oligopeptide transporter gene family in *Phanerochaete chrysosporium*. *Gene.* 2013;522(2):133-41.
69. Zakutskii AN, Chalisova NI, Ryzhak GA, Aniskina AI, Filippov SV, Zeziulin PN. The tissue-specific effect of synthetic peptides-biologic regulators in organotypic tissues culture in young and old rats. *Adv Gerontol.* 2006;19:93-6.
70. Zhao K, Luo G, Zhao GM, Schiller PW, Szeto HH. Transcellular transport of a highly polar 3+ net charge opioid tetrapeptide. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;304(1):425-32.
71. Zhao X, de Jong A, Zhou Z, Kuipers OP. Complete genome sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* strain BH072, isolated from honey. *Genome Announc.* 2015;3(2). pii: e00098-15.
72. Zwaryecz B, Wong EA. Expression of the peptide transporters PepT1, PepT2, and PHT1 in the embryonic and posthatch chick. *Poult Sci.* 2013;92(5):1314-21.

Глава 2. ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ПЕПТИДОВ

2.1. Пептидные препараты, полученные из организма животных

В 1985 г. В. Г. Морозов и В. Х. Хавинсон выдвинули гипотезу о том, что пептиды, полученные из коры головного мозга, шишковидной железы, простаты и сетчатки глаза, участвуют в *регуляции генов*. Эта гипотеза была подтверждена многочисленными исследованиями (рассмотренными в работах [30, 49]).

Способность некоторых пептидных препаратов увеличивать продолжительность жизни лабораторных животных и замедлять развитие рака и атеросклероза, которые являются основными причинами преждевременной смерти человека, дает основания рассматривать их в качестве геропротекторов. Основное преимущество пептидных комплексов заключается в том, что они не токсичны и в принципе не могут быть передозированы [91].

Увеличение продолжительности жизни. Введение пептидов эпифиза и тимуса крысам было связано со значительным, на 25-40%, увеличением продолжительности их жизни по сравнению с контрольной группой [18].

Влияние на канцерогенез. Пептиды, полученные из шишковидной железы и тимуса, проявляли устойчивую противоопухолевую активность. Частота возникновения у лабораторных животных злокачественных новообразований, спонтанных и индуцированных различными веществами и ионизирующими излучениями, снижалась в 1,4-7,0 раза [1, 4, 6-8, 10, 12, 18].

В большинстве экспериментов наблюдалось беспрецедентное снижение числа опухолевых заболеваний. Поскольку механизмы канцерогенеза едины для всех млекопитающих, эти результаты заслуживают того, чтобы их рассматривали как чрезвычайно важные для профилактики рака у человека [34].

ПК из коры головного мозга

Пептидный комплекс, полученный из коры головного мозга крупного рогатого скота и свиней обладает выраженной нейропротекторной активностью. Он стимулирует репаративные процессы в головном мозге и ускоряет восстановление функций мозга после перенесенных стрессов [23].

Введение пептидов, полученных из коры головного мозга (10 мг внутримышечно ежедневно в течение 10 дней) пациентам с органическим эмоционально лабильным (астеническим) расстройством (МКБ-10, F06.6) ассоциировалось со снижением уровня кортизола в крови. У пациентов, проводимая терапия которых дополнялась пептидами, нормализовались уровни тиреоидных гормонов и тиреотропина в крови [87].

Пептиды из коры головного мозга применяются для лечения нарушений мозгового кровообращения, астенических состояний и энцефалопатий различного генеза у пациентов пожилого возраста.

Мишенями являются нейрональные и глиальные клетки [37]. В поврежденном мозге пептиды влияют на ключевые стадии процессов, завершающихся гибелью нейронов: ингибирует апоптоз, вызванный чрезмерным высвобождением глутамата в синаптические щели, и таким образом ослабляет гиперстимуляцию глутаматных рецепторов [26].

Пептиды коры головного мозга может быть полезен пациентам с черепно-мозговой травмой, нарушениями мозгового кровообращения, вирусными и бактериальными нейроинфекциями, энцефалопатиями различной этиологии, а также острыми и хроническими энцефалитами и энцефаломиелитами [88]. Введение пептидов (10 мг внутримышечно ежедневно в течение 10 дней) 58 пациентам пожилого и старческого возрастов с органическими психическими расстройствами способствовало восстановлению когнитивных функций, таких как память и интеллект, а также иммунологических показателей. Повторные курсы лечения давали более выраженные и длительные эффекты.

Когда комплексная терапия черепно-мозговой травмы у 174 больных была дополнена пептидами в указанных выше дозах, это позволило нормализовать показатели электроэнцефалографии и транскраниальной ультразвуковой доплерографии.

Согласно данным, полученным в многоцентровом проспективном с двойным слепым контролем исследовании пептидов коры головного мозга, этот препарат оказался эффективным в лечении острого ишемического инсульта у 272 пациентов в возрасте от 30 до 80 лет. Эти пептиды в дозе 10 мг внутримышечно вводили два раза в день в течение 10 дней, и курс лечения повторяли через 10 дней. Были получены следующие результаты: а) восстановление неврологических функций, оцениваемых по шкалам NIH, Rankin и Rivermead, и б) улучшение когнитивных расстройств (шкала MMSE) и двигательного дефицита (индекс повседневной активности Бартеля). Эти эффекты сохранялись примерно в течение одного месяца после завершения второго курса лечения.

Было установлено, что пептиды эффективны у пациентов с хроническими цереброваскулярными заболеваниями. Препарат вводили по 10 мг два раза в день в течение 14 дней 31 пациенту с дисциркуляторной энцефалопатией I-II стадий в возрасте от 50 до 75 лет. Качество жизни улучшилось у 97% пациентов. В 90% случаев пациенты сообщали об ослаблении своих субъективных симптомов, таких как эмоциональная нестабильность, повышенная утомляемость, головная боль и головокружение. Отмечено улучшение вестибуло-мозжечковой и вегетативной симптоматики. Улучшились слуховая и речевая память. Амплитуда когнитивного вызванного потенциала увеличилась, а латентность уменьшилась. Уменьшение зон активности в височной и лобной областях мозга, по данным ядерно-магнитно-резонансного исследования, свидетельствует о снижении энергозатрат на реагирование на стандартные психологические тесты.

Нейропротекторные эффекты основаны на способности усиливать выработку серотонина и гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК). Было обнаружено, что пептиды стимулируют высвобождение дофамина из аксонов стриатальных нейронов и в то же время подавляет действие дофамина на пре- и постсинаптических рецепторах. Нейропротекторные свойства также связаны со способностью ингибировать апоптоз и стимулировать пролиферацию нейронов.

В культивируемых нейронах мозжечка, коры головного мозга и гиппокампа замедляется развитие отложенной дерегуляции кальция, вызванной глутаматом. В органотипических культурах головного мозга куриных эмбрионов пептиды мозга стимулирует рост нейритов.

Было высказано предположение, что активация обновления нейрональных клеток связана с изменениями экспрессии генов, регулирующих синтез собственных нейротрофических факторов клетки, таких как нейротрофический фактор головного мозга (brain-derived neurotrophic factor — BDNF) и фактор роста нервов (nerve growth factor — NGF) [49].

Были отмечены противоопухолевые эффекты. В крысиной модели индуцированного нитрозомочевинной трансплацентарного канцерогенеза развивались опухоли головного мозга, позвоночника, периферической нервной системы и почек. Лечение было связано со снижением частоты возникновения и множественности опухолей, вероятно, из-за способности пептидов нормализовать дифференцировку и пролиферацию глиальных клеток [1].

Применение пептидов мозга самостоятельно или в комбинации с пептидами сетчатки глаза оказывает выраженный защитный эффект при диабетической ретинопатии, макулярной дистрофии, атрофии зрительного нерва, глаукоме и других заболеваниях глаз [28, 99]. У пациентов, прошедших не менее двух ежегодных курсов лечения пептидами мозга в течение 7-10 лет, острота зрения была в 2,5 раза выше, чем у пациентов, получавших традиционную терапию.

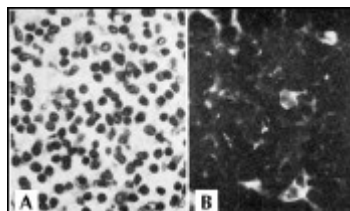
Пептиды мозга эффективны у практически здоровых людей в экстремальных условиях окружающей среды и профессиональной деятельности, а также при переутомлении или астении. Биорегулятор усиливает кратковременную и долговременную память, ускоряет обработку информации, психические реакции и пространственную координацию, способствует концентрации внимания и адекватности восприятия. Также способен улучшать настроение, поддерживать активность, снижать тревожность и психическое напряжение. Биорегулятор эпифиза также может быть использован для контроля патологических состояний, связанных с повышенными интеллектуальными и психоэмоциональными усилиями, в том числе у пациентов пожилого возраста.

У 58 пациентов в возрасте от 60 до 74 лет, страдавших ангиоретинопатией, ассоциированной с артериальной гипертензией, пептиды мозга улучшали остроту зрения, которая даже через 3 мес. после терапии оставалась на 20% выше, чем до нее. Допплерография четко показала, что у пациентов улучшилась микроциркуляция.

Пептиды тимуса были выделены из вилочковой железы теленка. Они содержат более 10 пептидных компонентов. Среди аминокислот наиболее распространены глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, глицин и лизин.

Пептиды тимуса доказали свою эффективность при лечении ряда состояний, связанных со снижением клеточного иммунитета и фагоцитоза, в том числе осложнений, возникающих у онкологических больных после лучевой и химиотерапии, острых и хронических инфекций и воспалительных состояний, осложнений массивных доз антибиотиков, вялотекущей регенерации тканей при посттравматических и послеоперационных осложнениях, облитерирующих заболеваниях артерий конечностей, при хронических заболеваниях печени и простаты, а также в комплексной терапии некоторых форм туберкулеза и проказы [5].

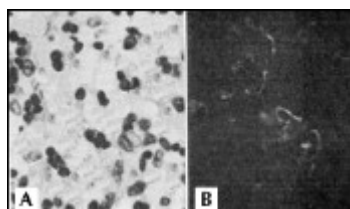
Тимус, центральный орган иммунной системы, претерпевает инволюцию в процессе старения. Этот процесс связан с уменьшением продукции тимусом пептидных регуляторов (рис. 2) [33].



Субкапсулярная область коры головного мозга (открытая биопсия, двухлетний ребенок).

А: окрашивание гематоксилином и эозином.

В: связанная с пептидами тимуса флуоресценция в телах и отростках эпителиальных клеток, образующих альвеолы Кларка, а также гранулы на мембранах тимоцитов внутри альвеол.



Субкапсулярная область коры головного мозга (биопсия, 46-летний мужчина).

А: окрашивание гематоксилином и эозином.

В: связанная с пептидами тимуса флуоресценция в телах и отростках эпителиоцитов, образующих группы по 2-5 клеток.

Рис. 2. Возрастная инволюция тимуса связана со снижением продукции пептидных биорегуляторов (метод непрямой иммунофлуоресценции с использованием антител к полипептидам тимуса, $\times 600$).

В экспериментальных условиях пептиды вилочковой железы вводили мышам, получавшим внутриутробное лечение N-нитрозо-N-этилмочевинной. Введение начиналось с 2,5 мес. после рождения и продолжалось до конца жизни животного. Лечение было связано с увеличением латентного периода развития опухоли на 1,5 — 2,5 мес. Распространенность опухолей позвоночника снизилась примерно на 30%. Таким образом, пептиды тимуса оказывал явное ингибирующее действие на трансплацентарный N-нитрозо-N-этилмочевининдуцированный канцерогенез [1].

У мышей линии SHR, получавших пептиды тимуса, начиная с четвертого месяца жизни, распространенность спонтанных опухолей уменьшалась с 55 до 44%. У самок мышей линии CH3/Sn, получавших пептиды тимуса в течение всей жизни, начиная с однемесячного возраста, распространенность спонтанных опухолей, включая аденокарциному молочной железы, снизилась в 2,8 и 2,6 раза соответственно [7, 14, 15].

Пептиды сетчатки глаза получают из сетчатки глаза крупного рогатого скота [59, 60].

Показано, что этот пептидный препарат регулирует метаболические процессы в сетчатке, оказывает выраженное защитное действие на эндотелий сосудов и коллагеновые волокна периваскулярной соединительной ткани, усиливает репарацию поврежденных структур сосудистой стенки. Индуцирует дифференцировку, о чем свидетельствует его способность активировать развитие клеток сетчатки и пигментированного эпителия при добавлении к плюрипотентным клеткам эктодермы ранней гастролы лягушки *Xenopus laevis* [53, 75]

У крыс Кэмпбелла (Campbell's rat) с наследственной пигментированной дегенерацией сетчатки пептиды ингибировали дистрофические процессы [60].

Двадцатилетний опыт их применения в лечении глазных болезней различного генеза доказал, что этот препарат обладает высокой клинической эффективностью. Пептиды сетчатки глаза усиливают функциональные взаимодействия между пигментированным эпителием и внешними сегментами фоторецепторных клеток, метаболическую регуляцию, активацию антиоксидантной защиты и чувствительность сетчатки к свету. Многолетнее применение в лечении больных пигментным ретинитом показало, что пептиды обладают высокой эффективностью и способен обеспечить благоприятные клинические результаты в 90% случаев. После лечения в виде парабульбарных инъекций в суточных дозах от 5 до 10 мг в течение 10 дней центральные скотомы уменьшались в размерах или исчезали у всех 250 пациентов с прогрессирующей возрастной макулярной дегенерацией и атрофией пигментного эпителия сетчатки [28]. Применение ассоциировалось со значительным улучшением зрения (повышение остроты зрения и расширение поля зрения) и связанных с этим электрофизиологических показателей, а также с улучшением соматического состояния и антирадикальной защиты крови у всех пациентов (табл. 3 и 4). Было установлено, что применение биорегуляторов для лечения пигментного ретинита не вызывает побочных эффектов, осложнений или лекарственной зависимости даже у пациентов с неблагоприятным аллергологическим анамнезом [29].

Таблица 3

Результаты компьютерной периметрии в контрольной группе больных пигментным ретинитом

Номер тестового объекта в поле зрения (%)

Характеристики поля зрения	До лечения			Сразу после лечения			3 мес. после лечения		
	Стадия болезни			Стадия болезни			Стадия болезни		
	III	IV	V	III	IV	V	III	IV	V
Нормальное	37,6	8,3	1,6	38,9	8,0	1,7	34,2	8,5	1,5
Относительные скотомы	28,2	7,5	3,1	23,7	7,9	2,9	30,7	2,3	1,1
Абсолютные скотомы	34,2	84,2	95,3	37,4	84,1	95,4	35,1	89,2	97,4

Таблица 4

Результаты компьютерной периметрии в опытной группе больных пигментным ретинитом

Характеристики поля зрения	Номер тестового объекта в поле зрения (%)								
	до лечения			сразу после лечения			3 мес. после лечения		
	стадия болезни			стадия болезни			стадия болезни		
	III	IV	V	III	IV	V	III	IV	V
нормальное	35,4	8,5	1,1	43,3	11,1	2,1	46,1	13,8	2,6
относительные скотомы	28,1	11,1	2,1	30,3	14,8	3,7	31,2	15,8	4,8
абсолютные скотомы	36,5	80,4	96,8	26,3	94,1	22,7	70,4	92,6	74,1

Пептиды простаты, полученные из простаты животных, доказали свою эффективность в терапии хронического простатита, доброкачественной гиперплазии простаты, осложнений хирургических вмешательств на простате и различных возрастных дисфункций этого органа [33, 46, 47].

Среди всех пептидных препаратов, полученных из тканей животных, только этот стимулирует рост эксплантов простаты и мочевого пузыря крыс [29, 50].

Заметно повышает эффективность лечения возрастных заболеваний простаты и, воздействуя на мужские половые функции, значительно продлевает мужскую сексуальную активность [30, 49, 69].

Пептиды простаты не вызывают неблагоприятных побочных эффектов [29].

Пептиды эпифиза, полученные из шишковидной железы крупного рогатого скота, использовались для лечения пациентов пожилого возраста с признаками ускоренного старения сердечно-сосудистой системы. В рандомизированном сравнительном исследовании было обнаружено снижение темпов старения и смертности на протяжении 15 лет наблюдения. Установлено, что длительное применение пептидов эпифиза (6 курсов лечения в течение 3 лет) снижает скорость старения сердечно-сосудистой системы, восстанавливает сниженную из-за старения физическую работоспособность, нормализует углеводный и липидный обмены, а также суточную ритмику секреции мелатонина. Геропротекторная активность пептидов проявляется также в снижении смертности, что подтверждается анализом графиков выживаемости Каплана-Мейера [5, 78].

Старение связано с лимфопенией и нарушением бластной трансформации Т-клеток, однако у старых самок мышей С3Н/Sn, ежедневно получавших эпиталамин, начиная с 3,5-

месячного возраста, индуцированная фитогемагглютинином бластная трансформация Т-клеток была такой же, как и у молодых мышей [14].

Было показано, что пептиды шишковидной железы снижают перекисное окисление липидов, как следует из 4,1-кратного снижения уровня диеновых конъюгатов, что позволяет предположить ингибирование ранних стадий перекисного окисления липидов (ПОЛ). Сообщалось, что активность супероксиддисмутазы повышается в крови крыс через неделю после начала приема.

Пептиды эпифиза слабо цитостатичны в отношении клеток саркомы-37 *in vitro* [14, 15]. *In vivo* введение самкам крыс, начиная с 15-месячного возраста, снижало частоту возникновения всех опухолей и злокачественных опухолей в 1,6 и 2,7 раза, соответственно [4, 14, 15].

Препарат эпифиза заметно усиливал цитостатический эффект лазерного облучения опухолей, оцениваемый по количеству опухолевых очагов, и ослаблял метастазирование лимфосаркомы Плисса и карциномы легкого у крыс [15].

У мышей оказывал противоопухолевое действие на трансплантируемые опухоли, включая рак молочной железы, плоскоклеточный рак шейки матки, гепатому 22а и лимфолейкемию L10-1, но не оказывал влияния на меланому Хардинга-Пасси и лейкемию L-1210.

Было показано, что биорегулятор эпифиза снижает частоту возникновения диметилбензантрацен-индуцированных аденокарцином молочной железы (DMBA-induced mammary adenocarcinomas) у крыс. Было высказано предположение, что противоопухолевой эффект может проявляться в условиях синдрома канкрофилии, индуцированного трансплантацией опухоли или химическими канцерогенами [19].

Значительные противоопухолевые эффекты возникают при совместном применении пептидных препаратов, полученных из шишковидной железы и тимуса. Их согласованное действие проявляется в 1,4 — 7,0-кратном снижении частоты встречаемости злокачественных опухолей, как спонтанных, так и индуцированных облучением химическими канцерогенами. Такое снижение было отмечено в подавляющем большинстве экспериментов [5].

Ежедневное введение 0,5 мг препарата эпифиза увеличивало продолжительность жизни крыс на 25% [19].

У мышей линии СЗН/Sp ежедневное введение пептидов эпифиза начиная с возраста 3,5 мес. увеличивало среднюю и максимальную продолжительность жизни на 40 и 25%, соответственно [14].

Пептиды эпифиза и тимуса увеличивали среднюю продолжительность жизни мух-дрозофил, мышей и крыс на 25-40% по сравнению с контрольными группами. В ряде экспериментов было также показано, что и максимальная продолжительность жизни в некоторой степени увеличивается [5].

Изучено влияние пептидов эпифиза на эндокринную регуляцию у кроликов. Показано, что прием в течение трех недель был связан со снижением уровня инсулина и триглицеридов в крови и повышением толерантности к глюкозе. Внутривентрикулярное введение крысам сопровождалось значительным повышением уровня кортизола в крови [30].

Влияние пептидов эпифиза на репродуктивную функцию у старых крыс с постоянным эструсом проявлялось в восстановлении регулярных эструсных циклов [1]. У старых самок крыс снижался уровень лютеинизирующего гормона и пролактина в крови, повышался уровень трийодтиронина в крови и повышалась чувствительность гипоталамо-гипофизарной системы к гомеостатическому ингибированию секреции кортикотропинов глюкокортикоидами. У молодых самцов крыс при введении в течение пяти дней наблюдалось повышение содержания трийодтиронина и снижение содержания тироксина в крови [30].

Особое значение имеет способность пептидного препарата, полученного из шишковидной железы, восстанавливать репродуктивную функцию у старых самок крыс [18].

У 57 женщин с дисгормональной вегетативной миокардиодистрофией, получавших внутримышечные инъекции по 10 мг ежедневно в течение 5-10 дней с интервалом 4-6 мес., общее состояние и электрокардиограмма (ЭКГ) улучшились после первой инъекции, и этот эффект сохранялся в течение всего периода наблюдения. Другие изменения включали значительное снижение уровня фолликулостимулирующего гормона в крови и улучшение электролитного баланса [82].

Женщины с дизовариантной вегетативной миокардиодистрофией получали 10 мг пептидов эпифиза внутримышечно ежедневно в течение 10 дней. У 68% больных нормализовался уровень гонадотропинов и эстрадиола в крови, частота сердечно-сосудистых нарушений снизилась в 3,2 раза, а фаза реполяризации ЭКГ восстановилась [90].

У десяти пациентов с аспириновой астмой в ремиссии или в ходе затухающего обострения антиастматическая терапия глюкокортикоидами дополнялась пептидами эпифиза внутримышечно в суточной дозе 10 мг в течение 10 дней. Двенадцать пациентов контрольной группы получали глюкокортикоиды и внутримышечные инъекции воды. К концу лечения у большинства пациентов наблюдалось снижение дневной частоты астматических симптомов и улучшение толерантности к физическим нагрузкам, сильным запахам и холодному воздуху. Легочные хрипы стихли или исчезли совсем. Реакция на Беротек N на уровне дистальных бронхов улучшилась на 52%. У 40% больных к концу лечения и у 90% через 10 дней после его окончания экскреция 6-оксимелатонина сульфата (основного метаболита мелатонина) с мочой увеличивалась на 68%, а показатели клеточного и гуморального иммунитета улучшались, что в целом говорит о том, что изначально сниженная продукция мелатонина увеличивалась. Применение пептидов шишковидной железы позволило снизить дозировки ингаляций антиастматических препаратов на срок до 6 мес. За все это время у пациентов не было зарегистрировано ни одного острого респираторного заболевания [21].

2.2. Короткоцепочечные пептиды Хавинсона

Многолетнее клиническое применение пептидных экстрактов, описанных в разделе 2.1, доказало их высокую эффективность при лечении пациентов разного возраста. Существенным преимуществом этих биорегуляторных пептидов является то, что их геропротекторная активность лишена неблагоприятных побочных эффектов [33, 47].

На основе анализа аминокислотных составов пептидных экстрактов из тканей животных В. Х. Хавинсон разработал подход к конструированию короткоцепочечных пептидов, обладающих главными *in vitro* и *in vivo* эффектами вышеуказанных препаратов [31, 32].

Принципы конструирования биологически активных короткоцепочечных пептидов заключаются в следующем: (а) количественный анализ аминокислотного состава биологически активных пептидных препаратов, полученных из тканей организма, используется для выбора двух аминокислот, имеющих наибольшее содержание; (б) две аминокислоты соединяются пептидной связью, образуя ядро перспективного пептида; (в) ядро расширяется путем добавления аминокислот, содержание которых является следующим во частоте. Также учитывается, что, если две аминокислоты оказывают комплементарное воздействие на ткань и одна аминокислота (например лизин, К) усиливает пролиферацию, а другая (например лейцин, L) усиливает апоптоз, то составленный из них дипептид (лейциллизин, LK), вероятно, будет усиливать регенерацию тканей.

Группа короткоцепочечных пептидов, полученных из длинноцепочечных или синтезированных из аминокислот, была зарегистрирована под торговой маркой Khavinson

peptides® (табл. 5). Большинство пептидов, перечисленных в табл. 5, запатентованы в США и ЕС.

Таблица 5. Пептиды Хавинсона: короткоцепочечные пептиды, разработанные профессором В. Х. Хавинсоном и сотрудниками Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии

Пептиды	Первичная структура	Основная биологическая мишень	Суммарный заряд	Молярная масса, Да	Индекс гидрофобности	Патент
Эпифиза (синтетика)	AEDG	нейроэндокринная система	-2	390	-5.6	[31]
Мозг (синтетика)	EDR	мозг	-1	418	-11.5	[41]
Бронхи (синтетика)	EDG	органы дыхания	-1	391	-19.0	[40]
Сетчатки глаза (синт)	KE	сетчатка глаза (регенерация)	0	275	-7.4	[56]
Тимус (синтетика)	EW	иммунная система	-1	333	-4.4	[66, 93]
Pancragen®	KEDW	поджелудочная железа	0	576	-11.8	[52]
Бронхи (экстракт)	AEDL	бронхи	-2	446	-1.4	[63, 65]
Cartalax®	AED	суставы	-2	333	-5.2	
Vesugen®	KED	кровеносные сосуды	-1	391	-19.0	[42]
Crystagen®	EDP	иммунная система	-2	358	-8.6	[43]
Ovagen®	EDL	печень	-2	375	-3.2	
Prostasmaх®	KEDP	простата	-1	488	-12.5	[51]
Печень (экастракт)	KEDA	печень	-1	462	-9.1	[32]
Мозга (экстракт)	AEDP	мозг	-2	430	-6.8	[55]
Сердца (эксстракт)	AEDR	миокард	-1	490	-9.7	[55, 64]

Семенник ов (экстракт)	KEDG	яички	-1	448	-11.3
------------------------------	------	-------	----	-----	-------

Примечание: индекс гидрофобности определи по шкале Кайта-Дулиттла (Kyte-Doolittle scale) [81].

Пептиды Хавинсона в природе: легко расщепляемые пептидные мотивы в белках

Общедоступные базы данных в настоящее время обеспечивают свободный доступ к первичным структурам около 33 млн. белков (11 млрд. аминокислотных остатков). Это позволило оценить [44], как часто мотивы, точно соответствующие короткоцепочечным пептидам Хавинсона, встречаются в белках с известными первичными структурами (табл. 6).

Таблица 6. Короткоцепочечные пептиды Хавинсона: их появление в белках в обычных и легко расщепляемых мотивах*

Пептид	Теоретическое число записей в предположении, что встречаемость любой аминокислоты равна 0,05	Теоретическое количество записей с учетом фактических встречаемости аминокислот	Встречаемость во всех известных аминокислотных последовательностях белков	Встречаемость белковых последовательностей в легко расщепляемом окружении
1	2	3	4	5
Эпифиза (AEDG)	69,482	227,643	202,661	3,567
Мозга (EDR)	1,389,633	2,061,666	1,672,349	28,527
Chonluten (EDG)	1,389,633	2,638,836	2,854,126	35,885
Vilon (KE)	27,792,657	36,570,381	44,149,477	767,912
Thymogen (EW)	27,792,657	8,973,420	8,333,999	128,821
Pancragen (KEDW)	69,482	25,652	23,25	732
Bronchogen (AEDL)	69,482	316,921	299,094	4,078
Cartalax (AED)	1,389,633	3,228,457	2,699,529	32,307
Vesugen (KED)	1,389,633	1,977,978	1,898,832	29,779
Crystagen (EDP)	1,389,633	1,789,601	1,493,125	18,510
Ovagen (EDL)	1,389,633	3,673,745	3,828,952	53,938
Prostamax (KEDP)	69,482	94,585	72,664	1,302
Livagen (KEDA)	69,482	170,633	134,596	2,053
Cortagen	69,482	154,382	127,728	1,524

(AEDP) Cardiogen	69,482	177,852	141,213	2,540
(AEDR) Testagen	69,482	139,470	135,349	2,417
(KEDG)				

Примечание: предполагается, что оценка встречаемости определенного мотива во всех легко расщепляемых средах (графа б) представляет собой сумму встречаемости мотива, окруженного остатками лизина и/или аргинина (т. е. К-пептид-К + К-пептид-R + R-пептид-К + R-пептид-R).

* Расчеты выполнены д-ром Д. Ю. Кормильцем (Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург).

Очевидно, что короткие мотивы (от 2 до 4 аминокислотных остатков) встречаются в белках очень часто, даже чаще, чем это предсказано математически на основе перемножения частот встречаемости в протеоме каждой из двух аминокислот, его составляющих.

Вполне вероятно, что легко выделяемые (высобожаемые) мотивы будут первыми извлечены из белковой молекулы и включены в процессы физиологической регуляции.

Маловероятно, что все потенциально активные мотивы будут генерироваться расщеплением белка и участвовать в регуляторных функциях. Более вероятно, что свободно циркулирующие короткоцепочечные пептиды образуются из белковых молекул там, где они окружены Lys (K) и/или Arg (K) — двумя положительно заряженными аминокислотами, которые облегчают разрушение пептидной связи.

Ниже приведены примерные легко расщепляемые мотивы, готовые к использованию в физиологической регуляции [44].

Пример 1. Полная первичная структура белка, связанного с аутофагией человека (923 аминокислоты), включает мотив пептида эпифиза (AEDG, выделенный цветным фоном), окруженный двумя аминокислотами, способствующими расщеплению: аргинином (R) и лизином (K), которые подчеркнуты.

MVSRMGWGGRRRLGRWGDLGPGSVPLLPMLPPPPPPSCRPGGGGRISIFSLSPAPHTRSS
PSSFSPPTAGPPCSVLQGTGASQSCHSALPIPATPPTQAQPAMTPASASPSWGSHTPPLAPA
TPTPSQQCPQDSPGLRVGPLIPEQDYERLEDCDPEGSQDSPIHGEEQQPLLHVPEGLRGSWH
HIQNLDSEFFTKIYSYHQNRNGFACILLEDFVQLGQFIFIVTFTTFLLRCDVYNVLFANQPSNHT
RPGPFHRSKVTLSAAILPSAQCAERIRSSPLLVLVLAAGFWLVQLLRSVCNLFYSWIDIQVF
YREALHIPPEELSSVPWAEVQSRLALQRSGGLCVQPRPLTELDIHRILRYTNYQVALANK
GLLPARCPLPWGGSAAFLSRGLALNVDLLLFRGPFSLFRGGWELPHAYKRSDQRGALAAR
WGRTVLLLAALNLALSPLVLAWQVLHVIFYSHVELLRREP GALGARGWSRLARLQLRHFN
ELPHELRLARAYRPA AFLR TA APPAPLRTLARQLVFFAGALFAALLVLT VYDEDVLA
VEHVLTAMTALGVTATVARSFIPPEEQCQGRAPQLLQTALAHMHYLPPEPGGGRDRAYR
QMAQLLQYRAVSLLEELLSPLLTPLFLLWFRPRALEIIDFFHHFTVDVAGVGDICSFALMD
VKRHGHPQWLSAGQTEASLSQRAEDGKTEL SLMRFS LAHPLWRPPGHSSKFLGHLWGRV
QQDAAAWGATSARGPSTPGVLSNCTSPLPEFLANL FVHPLLPRDLSPTAPCPAAATASLLA
SISRIAQDPSSVSPGGTGGQKLAQLPELASAEMSLHVIYHLHQLHQQQQQEPWGEAAASILS
RPCSSPSQPPSPDEEKPSWSSDGSSPASSPRQQWGTQKARNLFPGGFQVTTDTQKEPDRASC
TD

Пример 2. Нижеприведенный фрагмент (115 аминокислот) человеческого транскрипционного фактора AP-4 содержит мотив пептида бронхов (AEDL), окруженный лизином (K) и аргинином (R).

MQSINAGFQSLKTLIPHTDGEKLSKAAILQQTAEYIFSLEQEKTRLLQQNTQLKRFIQELSGS
SPKRRRAEDKDEGIGSPDIWEDEKAEDLRREMIELRQQLDKERSVRMMLEEQ

Примеры 3 и 4. Фрагменты (из 382 и 252 аминокислот, соответственно) двух белков, выведенных из метагенома кишечника человека, содержат два мотива пептидов печени (KEDA), обрамленных лизинами (K).

RYTVFSLWDTYRNVSTLMTLLYPEKQLDIIRTMIDMYKESGWLPKWELYGRETLMEGDP
SIPYIVDAYMRGLRDYDIETAYEGMRKGATTPGEFNLLRPDNDYMSKGYVPLREQYDNS
VSHALEYYIADWNLSLLADALGKKEDAKLFRERAMGYKHYYCKEFGTLRPILPDGTFYSP
FDPKQGENFEPSPGFHEGNAWNYTFYVPHDIKGLAKLMGGQKKFVDKLMVFDKGYD
MANEPDIAYPYLFYFKGEAWRTQKLVRELLGKYHNA PNGLPGNDDTGT MSTWAIFSM
MGFY PACPGDLDYVLTSP TFNKVTIRLDEKFY PKGELVIESAHKTPEDIYIKEVTAGGKCLK
GYTISQDELVNAGTLRFTLENKH

DYALSTLAEALGKKEDAKLFRKRSMGYKNYYSKDFGTLRPITKEGKFYEPFDPKEGANFA
PSPGFHEGNAWNYTFFVPHDINGLVKLMGGDKKFVDKLSVFDEGNYDPANEPDIAYPYL
FSRFKGEAWRTQKLVKELAKYFTTKPDGIPGNDDTGTMSAWAIFSMMGFYPCPGVPEY
TLTPTFDKVTVQLDPKYWGKELVIKKEGQGDYIKEIRLGNKKINKYLISHDDLKAGEIT
FIVTENPNKK

Пример 5. Полная первичная структура человеческой цитозольной фосфолипазы A2 зета (851 аминокислота) включает мотив пептида мозга (AEDP), окруженный лизином (K) и аргинином (R):

MLWALWPRWLADKMLPLLGA VLLQKREKRGPLWRHWRRRETYPPYYDLQVKVLRATNIR
GTDLLSKADCYVQLWLPTASPSPAQTRIVANCS DPEWNETFHYQIHGA VKNVLELTLTYDK
DILGSDQLSLLLFDLRLSKCGQPHKHTFPLNHQDSQELQVEFVLEKSQVPASEVITNGVLVA
HPCLRIQGTLRGDGTAPREEYGSRQLQLAVPGAYEKPQLLPLQPPTPEGLPPTFTFHVNPVL
SSRLHVELMELLA AVQSGPSAELEAQT SKLGEGGILLSSPLGQEEQCSVALGEGQEVALS
MKVEMSSGDLDLRLGFDLSDGEQEFLDRRKQV VSKALQQVLGLSEALDSGQTQVPVVAV
LGSGGGTRAMSSLYGSLAGLQELGLLDTVTYLSGVSGSTWCISTLYRDPAWSQVALQGPIE
RAQVHVCSSKMGALSTERLQYYTQELGVRERSGHSVSLIDLWGLLVEYLLYQEENPAKLS
DQQEAVRQGGQNPYPIYTSVNVRTNLSGEDFAEWCEFTPYEVGF PKY GAYVPTELFGSELF
MGRLQLQPEPRICYLQGMWGS AFATSLDEIFLKTAGSGLSFLEWYRGSVNITDDCQKPQL
HNPSRLRTRLLTPQGPFSQAVLDIFTSRFTSAQSFNFTRGLCLHKDYVAGREFVAWKDTHP
DAFPNQLTPMRDCLYLVDGGFAINSFPPLALLPQRAVDLILSFDYSLEAPFEVLKMTEKYCL
DRGIPFPSIEVGPEDMEEARECYLFAKAEDPRSPIVLHFPLVNR TFRTHLAPGVERQTAE EK
AFGDFVINRPDTPYGMMNFYEPQDFYRLVALSRYNVLNNVETLKCALQLALDRHQARER
AGA

Ниже будут приведены результаты изучения биологических эффектов короткоцепочечных пептидов Хавинсона, включая продление продолжительности жизни и механизмы этих эффектов (см. гл. 3 и 4). Некоторые из пептидов считаются перспективными в качестве геропротекторов (см. гл. 5), не имеющих токсических, аллергических или других побочных эффектов [33].

Превращения пептидов Хавинсона в кишечнике и крови

Пептиды эпиталон (AEDG), вилон (KE) и ливаген (KEDA), добавляемые в гомогенаты тканей, полученные из различных сегментов желудочно-кишечного тракта и печени крыс, не гидролизуются в препаратах тонкой кишки и незначительно гидролизуются в препаратах толстой кишки и печени. Открытие того, что ливаген не гидролизуется в плазме крови, позволяет предположить, что он может транспортироваться кровью к своим органам-мишеням.

Эпиталон, вилон и ливаген не расщепляются в желудке и тонкой кишке и могут регулировать активность пищеварительных ферментов у старых животных. Пероральное введение ливагена в течение двух недель старым крысам увеличивало активность сахаразы и мальтазы в двенадцатиперстной кишке на 60%, активность мальтазы в тонком и толстом кишечнике — втрое, а активность аминопептидазы и глицил-L-лейцинпептидазы — вдвое. Введение вилона в аналогичных экспериментальных условиях повышало активность мальтазы (в 1,2 раза в двенадцатиперстной кишке, в 1,5 раза в тонкой и в 1,3 раза в подвздошной) и щелочной фосфатазы (в 2,2 раза в тонкой и подвздошной кишках и в 1,8 раза в двенадцатиперстной). Введение вилона и ливагена увеличивало активность пищеварительных ферментов у старых животных до уровней, характерных для молодых. Кроме того, пероральное введение пептидов в течение 1 мес. старым крысам усиливало всасывание глюкозы и глицина в среднем сегменте тонкой кишки в случае вилона и в проксимальном и дистальном сегментах в случае эпиталона [38].

Фармакокинетика

Фармакокинетика тимогена (EW) изучали у крыс после внутримышечного введения EW в дозе $870 \text{ мкг} \cdot \text{кг}^{-1}$. В контрольных экспериментах вводили $[^3\text{H}]\text{L-Glu}$ и $[^3\text{H}]\text{L-Trp}$. Органы и плазма крыс подвергались основному гидролизу. Радиоактивность гидролизата измеряли с помощью сцинтилляционного счетчика.

$[^3\text{H}]\text{-L-Glu-L-Trp}$ ($^3\text{H-EW}$) быстро поглощался тканями и имел большой объем распределения. Печень, надпочечники, почки, лимфатические узлы, тимус и плазма показали самые высокие уровни поглощения.

Пик концентрации тимогена в плазме крови наблюдался через 1-2 ч после введения препарата. Крысы выделяли примерно 85% дозы в течение 24 ч, что свидетельствует о быстром выведении пептида [94].

Перекисное окисление липидов

Прием эпиталона (AEDG) приводит к снижению содержания продуктов ПОЛ у *Drosophila melanogaster* [57, 58]. Эффективность антиоксидантного действия эпиталона повышается при экстремальных стрессах, таких как гипоксия и гипокинезия. Было обнаружено, что эпиталон защищает мозжечковые нейроны от окислительного стресса у потомства крыс, подвергшихся воздействию гипоксии. Этот эффект обусловлен в значительной степени способностью эпиталона предотвращать подавление активности металлопептидаз — неприлизина (neprilysin, membrane metallo-endopeptidase — ММЕ, CD10) и инсулин-деградирующего фермента, участвующих в катаболизме амилоидного β -пептида, который играет ключевую роль в патогенезе болезни Альцгеймера [79, 80].

Инъекции кортагена (AEDP) крысам сопровождалась снижением содержания продуктов ПОЛ и окислительной модификацией белков, снижением антиоксидантной активности сыворотки крови и коры головного мозга [79].

Пролиферация и регенерация тканей

Адекватным и удобным методом быстрой количественной оценки эффектов биологически активных соединений является органотипическое культивирование фрагментов тканей и анализ зон роста эксплантов. Изменения количества клеток могут быть

использованы для первоначальной интегральной оценки биологической активности соединений, отраженной их способностью стимулировать или ингибировать пролиферацию клеток.

Влияние эпиталона и лейциллизина (LK) на рост клеток изучали с использованием органотипических культур кожи, полученных от молодых и старых крыс [17].

Зона роста культивируемых фрагментов кожи включает эпителиальные клетки и фибробласты, которые образуют ее периферию, оцениваемую по индексу площади (I_s).

При добавлении двух аминокислот в культуру кожной ткани отдельно, каждая по 0,05 нг на 1 мл, лизин (K) увеличивает I_s на 26% ($p < 0,05$), тогда как лейцин (L) уменьшает I_s на 12% ($p < 0,05$).

Добавление лейциллизина в дозе 0,1 нг/мл к культуре эпителиоцитов кожи увеличивало I_s эксплантов на 45%, то есть на 17% больше ($p < 0,05$), чем это наблюдалось при добавлении смеси двух аминокислот.

Эпиталон (AEDG) оказывает аналогичное, хотя и менее выраженное, действие на I_s в кожных эксплантах, полученных от молодых крыс. Его добавление при оптимальной концентрации 0,1 нг/мл связано с увеличением I_s на 34% по сравнению с контролем (рис. 3).

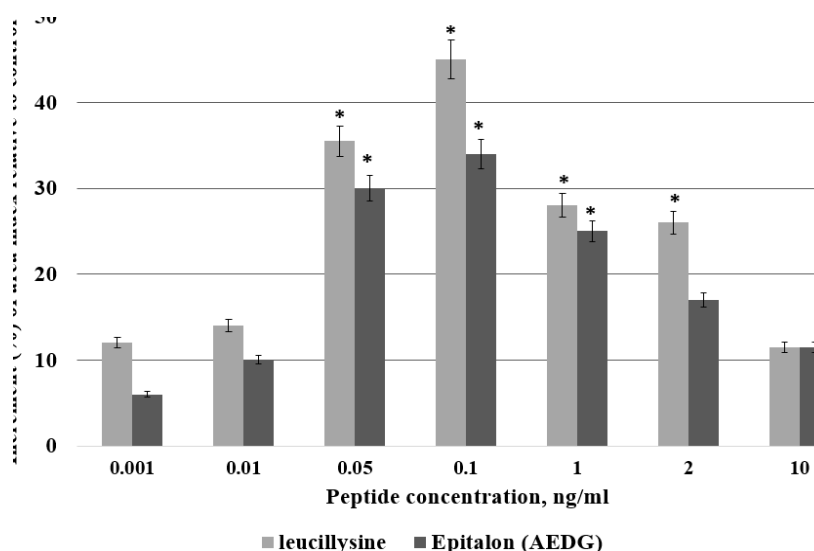


Рис. 3. Изучено влияние лейциллизина и эпиталона на индекс площади кожных эксплантов у молодых крыс.

* $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

В культурах кожи молодых крыс лейциллизин в дозах от 0,05 до 2,0 нг/мл стимулировал рост экспланта, причем пиковый эффект (+45%, $p < 0,05$) был обнаружен при 0,1 нг/мл. В культурах кожи старых крыс эпиталон и лейциллизин также стимулировали рост экспланта; однако их эффекты были менее выражены и наблюдались на меньших диапазонах исследуемых соединений. эпиталон при 1 нг/мл и 2 нг/мл повышен на 30% по сравнению с контролем ($p < 0,05$). эпиталон в дозах 1 и 2 нг/мл повышал I_s на 29 и 31%, соответственно, по сравнению с контролем ($p < 0,05$) (рис. 4).

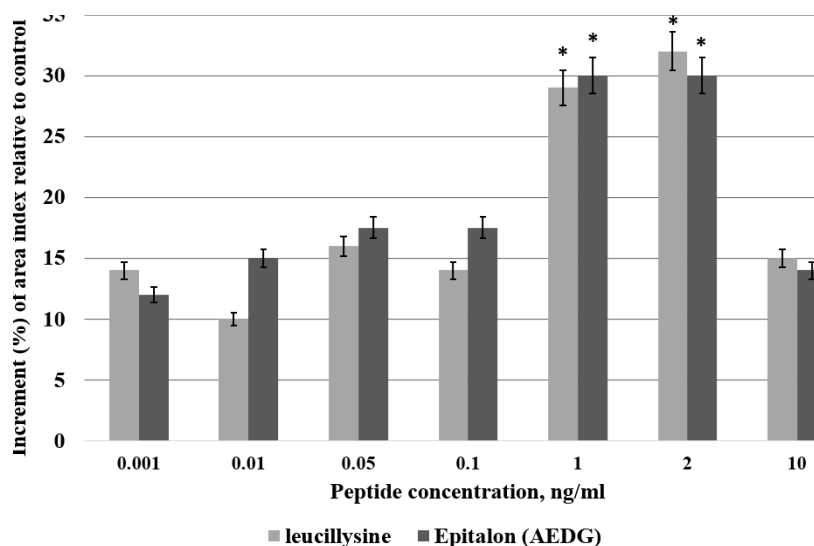


Рис. 4. Влияние лейциллизина и эпیتالона на индекс площади кожных эксплантов старых крыс.

* $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Эпیتالон и лейциллизин, применяемые в широких диапазонах концентраций, стимулировали пролиферацию клеток в коже крыс. Диапазоны концентраций были шире у молодых крыс, чем у старых, а уровни концентраций были выше (1-2 нг/мл) у старых крыс. Стимулирующее действие лейциллизина было несколько выше, чем у эпیتالона.

Эпیتالон и лейциллизин способствуют повышению функциональной активности стареющих фибробластов кожи [17].

Установлено, что вилон (КЕ) оказывает выраженное активирующее и стабилизирующее действие на морфофункциональные характеристики органотипических культур селезенки старых крыс. Специфические эффекты вилон проявлялись в усилении морфологической целостности, пролиферации и функциональной активности клеток. вилон стимулировал стромальное микроокружение и значительно повышал жизнеспособность клеток в выживших культурах селезенки. При стрессах, приводящих к частичной гибели клеток в культурах, вилон уменьшал потерю клеток, повышал пролиферативный потенциал клеток и повышал устойчивость клеток к неблагоприятным условиям микроокружения, способствуя тем самым регенерации тканей [76].

В модели ускоренного старения, вызванного фракционным гамма-облучением в сублетальных дозах, вилон модулировал иммунный гомеостаз крыс, стимулировал репаративные процессы в их тимусе и ослаблял фазные изменения, вызванные гамма-облучением в тимусе и селезенке, ускоряя тем самым компенсацию микроциркуляторных нарушений в этих органах. Наконец, после однократного гамма-облучения всего тела в дозе 6 Гр вилон стимулировал пострадиационное восстановление тимуса и селезенки, в частности, повышая пролиферативную активность тимоцитов, усиливая дифференцировку Т- и В-лимфоцитов и способствуя миграционной активности лейкоцитов [77].

Изучено влияние вилон на уровень трансформирующего фактора роста-бета (transforming growth factor-beta — TGF- β) и проницаемость микрососудов на модели крыс с хирургически индуцированной хронической почечной недостаточностью (ХПН). Вилон вводили в дозе 100 мг на 1 кг массы тела ежедневно в течение 10 дней двумя курсами, один из которых начинался через 6 дней, а другой — через 20 дней после операции. В контрольной группе (ХПН + плацебо) уровень TGF-beta повышался, тогда как в экспериментальной группе он снижался через 2 мес. и оставался сниженным после этого. Проницаемость микрососудов показала ту же картину изменений [22].

Среди всех разработанных нами короткоцепочечных пептидов было обнаружено, что только простамакс (KEDP) стимулирует зоны роста эксплантов мочевого пузыря и простаты [50, 102].

Влияние на продолжительность жизни

Пределы продолжительности жизни у человека и животных на 30-40% превышают соответствующие средние значения продолжительности жизни [5]. У человека предел продолжительности жизни составляет 110-120 лет. Было обнаружено, что пептиды способствуют откладыванию предела деления соматических клеток человека [36].

Разница между средней продолжительностью жизни и пределом продолжительности жизни может быть объяснена воздействием неблагоприятных факторов, которые вызывают изменения в структуре и экспрессии генов, сопровождающиеся нарушениями синтеза белка и функционирования организма (рис. 5).



Рис. 5. Потенциальное увеличение средней продолжительности жизни человека до определенного предела (биологического резерва).

Последние достижения в области теоретической и прикладной геронтологии побудили нас искать новые средства профилактики преждевременного старения и возрастной патологии с конечной целью увеличения средней продолжительности жизни, поддержания активного долголетия и достижения верхнего предела продолжительности жизни человека [27].

Пептидергическая регуляция гомеостаза занимает важное место в сложной цепи физиологических процессов, приводящих к старению клеток, тканей, органов и организма в целом. К морфофункциональным проявлениям старения относятся инволюция органов и тканей, прежде всего тех, которые относятся к основным регуляторным системам — нервной, эндокринной и иммунной. Имеющиеся данные свидетельствуют о существовании возрастной гипоплазии, а в некоторых случаях даже атрофии шишковидной железы, тимуса, коры головного мозга, подкорковых структур, сетчатки глаза, сосудистой стенки и репродуктивных органов [33].

В многочисленных экспериментах пептидные препараты, описанные выше, способствовали увеличению средней продолжительности жизни животных на величину до 25-30% по сравнению с контролем. В большинстве экспериментов было отмечено некоторое увеличение максимальной продолжительности жизни. Наиболее значительное увеличение максимальной продолжительности жизни, на 42,3%, было обнаружено у мышей СВА, получавших эпиталон (AEDG) [6].

эпиталон увеличивает продолжительность жизни животных, относящихся к таксонам, удаленным один от другого на филогенетическом древе [13, 31, 39, 100]. Было обнаружено, что тимоген (EW) также обладает геропротекторной активностью [9].

Влияние тимогена и эпиталона на среднюю продолжительность жизни и средний индекс бластной трансформации лимфоцитов проиллюстрировано на рис. 6.

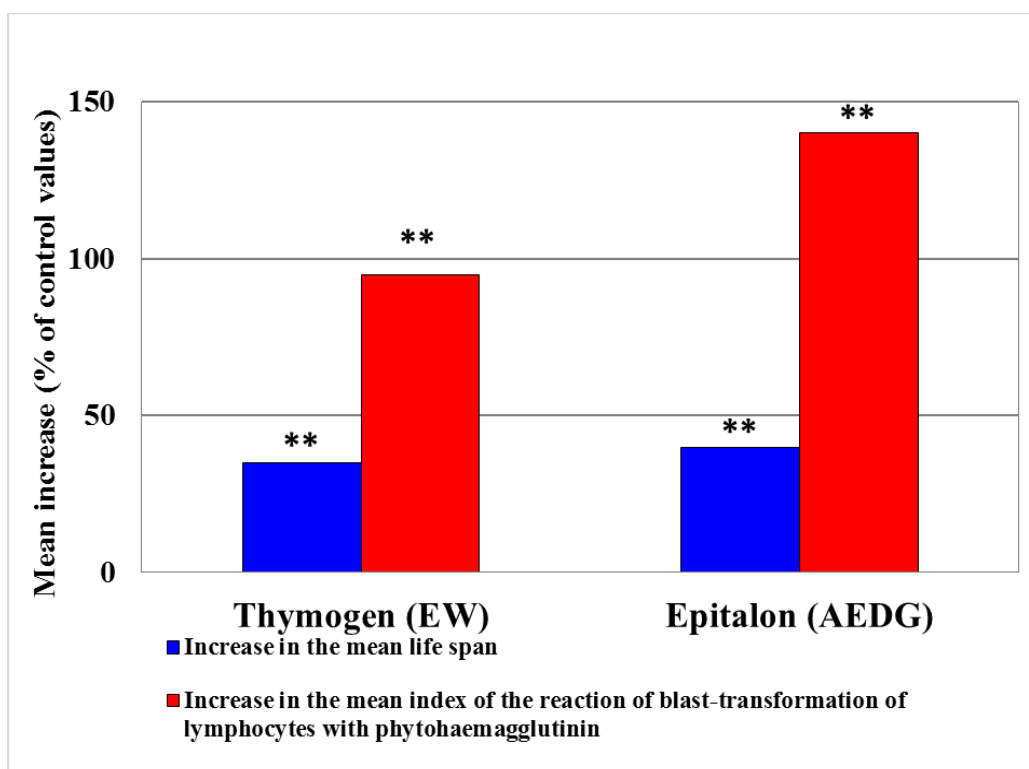


Рис. 6. Влияние тимогена и эпیتالона на среднюю продолжительность жизни мышей (синие колонки) и на реакцию мышинных лимфоцитов, стимулированных фитогемагглютинином (красные колонки).

** $p < 0,01$ по сравнению с контролем.

У мышей СВА, получавших вилон в виде ежемесячных пятидневных курсов, начиная с шестимесячного возраста, максимальная продолжительность жизни увеличивалась, а скорость спонтанного развития опухолей снижалась в 1,5 раза. У мышей, получавших вилон, распространенность аденомы легких и рака молочной железы уменьшилась. Количество мышей, доживших до возраста 23 мес., было в 2,6 раза выше в группе, получавшей вилон, чем в контрольной группе, где мышам вводили физиологический раствор. Максимальная продолжительность жизни мышей, получавших вилон, увеличилась на 2 мес. по сравнению с контролем [6, 35].

Под действием вилонa гены, которые репрессируются из-за гетерохроматизации эухроматических хромосомных областей, наблюдаемой в процессе старения, освобождаются от репрессии [49]. Пероральное введение вилонa в течение двух недель крысам Вистар в возрасте 11 мес. было связано с повышением активности сахаразы, мальтазы и щелочной фосфатазы в двенадцатиперстной и всей тонкой кишке. Уровень мальтазы, щелочной фосфатазы и дипептидазы повышался в различных отделах тонкой кишки. вилон оказывал более благоприятное воздействие на старых крыс, чем на молодых. У старых крыс, получавших вилон, активность ферментов в кишечнике была примерно такой же, как и у молодых крыс.

У старых крыс линии Вистар, получавших вилон в течение 1 мес., значительно повышались уровни ферментов щеточной пограничной мембраны — мальтазы и щелочной фосфатазы. В то же время было обнаружено, что активность преимущественно цитозольной глицил-L-лециндипептидазы также значительно повышается. Эти данные свидетельствуют о том, что вилон укрепляет кишечный барьер у старых крыс и способствует повышению надежности работы кишечной ферментативной системы [73].

Противоопухолевая активность

У мышей, получавших пептидные препараты, полученные из тимуса и шишковидной железы, были выявлены корреляции между средней продолжительностью жизни и показателями клеточного иммунитета, такими как бластная трансформация лимфоцитов, индуцированная фитогемагглютинином, который отражает функции Т-лимфоцитов [7].

Значительное увеличение средней продолжительности жизни животных, скорее всего, было вызвано сильной противоопухолевой активностью тимогена и эпیتالона, что было подтверждено в 55 экспериментах, проведенных в течение 35-летнего периода изучения этих пептидов. У мышей наблюдалось резкое снижение общей заболеваемости злокачественными опухолями в 1,4-7,0 раз, как спонтанное, так и индуцированное облучением или канцерогенами (рис. 7).

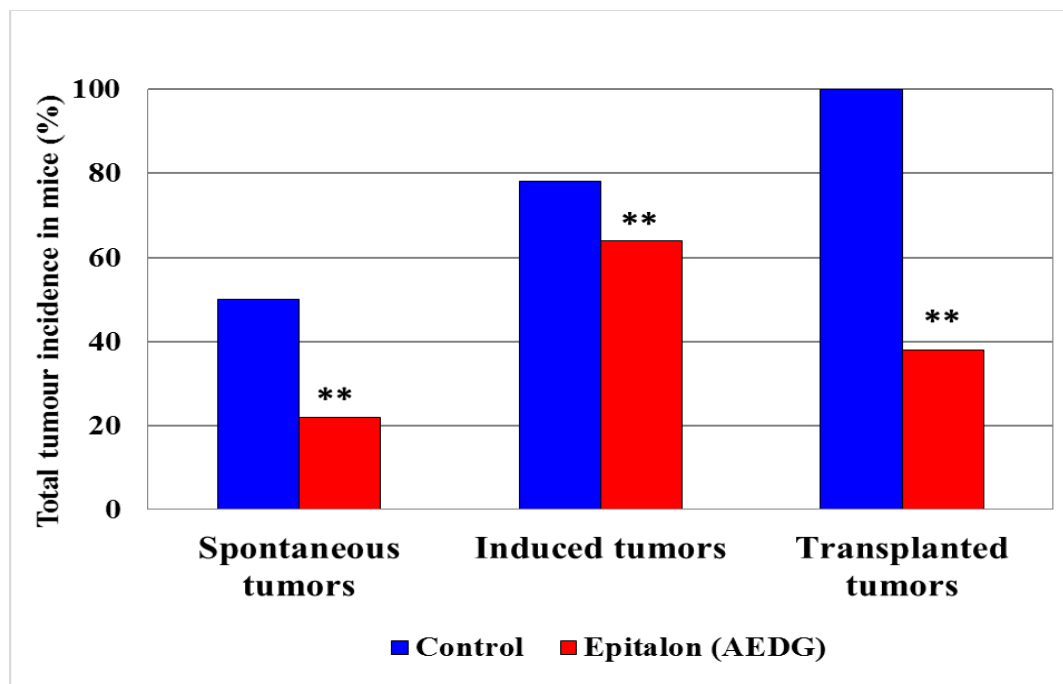


Рис. 7. эпیتالон уменьшает общее количество опухолей у мышей.

** $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

У крыс, получавших тимоген в течение одного года, радионуклидно-индуцированный канцерогенез был снижен: общая частота всех спонтанных опухолей снизилась в 3,3 раза, а аденокарциномы молочной железы — в 6 раз. тимоген стимулировал иммунитет и подавлял возникновение спонтанных опухолей у животных.

Эти результаты позволяют предположить, что короткоцепочечные пептиды Хавинсона могут быть использованы для профилактики опухолей у человека [54] (см. также гл. 5).

У крыс, находящихся в условиях круглосуточного освещения, спонтанные опухоли появляются раньше, чем при нормальном освещении. Применение эпیتالона (0,1 мкг на крысу 5 дней в неделю, начиная с четырехмесячного возраста) уменьшало неблагоприятные эффекты постоянного освещения, улучшало гомеостаз и замедляло старение. эпیتالон значительно подавлял спонтанное развитие опухолей [101].

Было обнаружено, что эпیتالон значительно снижает распространенность и скорость развития спонтанных опухолей у мышей SHR [100] и ингибирует развитие опухолей, индуцированных 1,2-диметилгидразином у крыс [12].

Воздействие на кору головного мозга

Интраназальное введение эпیتالона крысам было связано с активацией кортикальных нейронов. В некоторых экспериментах эффект эпیتالона был многофазным. За первым пиком повышенной частоты нейронного разряда на 5-7 мин последовали пики на 11-12 и 17-18-й минутах. Увеличение частоты разрядов происходило за счет увеличения ее в активных нейронах и рекрутирования ранее молчавших нейронов [97, 98].

Воздействие на гипоталамус

Было обнаружено, что эпیتالон стимулирует рост эксплантов подкорковых структур головного мозга *in vitro*. На уровне 2 нг/мг эпیتالон усиливал развитие культивируемых органотипических эксплантов медиобазальной преоптической зоны (МРО) гипоталамуса у молодых (3 мес.) и старых (24 мес.) самок крыс. Этому эффекту эпیتالона может способствовать ингибирование апоптоза [92].

Воздействие на шишковидную железу

Эпیتالон (AEDG) снижал на 35-40% частоту разрядов в пинеалоцитах с низкой частотой разрядов ($0,05-0,01 \text{ c}^{-1}$) и нерегулярной активностью и на 25% — в пинеалоцитах с высокой частотой разрядов ($2,0-0,4 \text{ c}^{-1}$) и регулярной активностью. Интраназальное введение эпیتالона привело к тому, что частота разрядов снижалась на 30% во всех типах пинеалоцитов. Добавление эпیتالона к изолированным шишковидным железам приводило к снижению частоты разрядов на 80-90% в клетках с нерегулярной активностью и не влияло на клетки, продуцирующие регулярные периодические последовательности разрядов.

У старых (20-26 лет) самок макак-резусов, получавших эпیتالон в течение 10 дней по вечерам (в 21 ч), уровень мелатонина, который был снижен вдвое по сравнению с молодыми животными (6-8 лет), повышался втрое, т. е. был выше, чем у молодых обезьян [8, 12, 101]. Аналогичные реакции наблюдались и у старых крыс [20].

После гамма-облучения крыс полученные изменения в шишковидной железе, которые регистрировались с помощью электронной микроскопии, включали набухание и вакуолизацию фенестрированного эндотелия и исчезновение цитоплазматических органелл и пиноцитотических везикул. Введение крысам эпیتالона (по 5 мкг в течение 5 дней) сопровождалось тем, что ультраструктура пинеалоцитов и глиальных клеток полностью восстановилась и не отличалась от той, что наблюдалось у интактных крыс [74].

Воздействие на легкие

Бронхоген (AEDL) может оказывать геропротекторное действие на бронхиальную ткань [71].

Воздействие на поджелудочную железу

эпیتالон, введенный старым макакам-резусам, восстанавливал нарушенную толерантность к глюкозе и чувствительность бета-клеток поджелудочной железы к глюкозе. Влияние крайне низких доз (по 10 мкг ежедневно в течение 10 дней) эпیتالона на эндокринную функцию поджелудочной железы частично сохранялось в течение 1-2 мес. после прекращения лечения.

Воздействие на мочевой пузырь

Было обнаружено, что вилон (KE) ингибирует развитие опухоли в мочевом пузыре крыс [96].

Влияние на иммунокомпетентные клетки

В опытах *in vitro* обнаружено, что эпیتالон стимулирует активность сфингомиелиназы и модулирует трансдукцию сигнала IL-1R через сфингомиелиновый путь

в мембранах мышечных нервных клеток и тимоцитов. *In vivo* эпиталон нормализовал активность Н-сфингомиелиназы во фракции P2 коры головного мозга и в мембранах тимоцитов у крыс после иммуносупрессивных и иммуностимулирующих стрессов [45]. Вилон в дозе 50 нг/мл значительно повышал активность нейтральной сфингомиелиназы в мембранах тимоцитов мышей. Таким образом, воздействие пептидов на иммунокомпетентные клетки опосредуется сфингомиелиновым путем сигнальной трансдукции [62].

Влияние на плацентарный барьер

Эпиталон (AEDG), меченый флуоресцентным красителем дансилом (dansyl), легко проникает во все ткани и органы беременных самок кроликов и сквозь плаценту — в органы плода. Включение меченого эпиталона в плацентарные ткани чаще наблюдается у плодов, развивающихся при плацентарной недостаточности, чем у нормальных плодов [86].

Влияние на биоритмы

У старых самцов крыс линии Wistar и мышей линии CBA нарушаются суточные и годовые ритмы сывороточного тимического фактора и количества клеток-предшественников фибробластов, гранулоцитарно-макрофагальных колоний, а также CD4+, Mac-1+ и CD19+ клеток в костном мозге. Эти нарушения проявляются в монотонности, сезонном сдвиге акрофаз, увеличении или уменьшении амплитуды пиков, инверсии и десинхронизации. Введение эпиталона начиная с шестимесячного возраста у крыс и с четырехмесячного возраста у мышей ослабляло вышеуказанные изменения. Наблюдалось значительное замедление возрастных изменений в супрахиазматическом ядре гипоталамуса. Ночные уровни кортикостерона и тестостерона снижались. Выработка этих гормонов увеличивалась летом и уменьшалась зимой. Биоритмы многих физиологических параметров у старых животных приближались к тому, что наблюдается у животных взрослых [83-85].

Влияние на генетическую стабильность

Новая концепция, выдвинутая в [68], утверждает, что ДНК и пептиды являются двумя классами носителей биологической информации, которыми они обмениваются при инициации транскрипции генов. Пептидные воздействия на ДНК восстанавливают структуру и экспрессию генов, обеспечивая генетическую стабильность и нормализацию возрастных метаболических изменений, предотвращают развитие возрастной патологии, увеличивают продолжительность жизни до ее видоспецифического предела. Пептиды играют роль информационных регуляторов генетической стабильности, стабилизируют физиологические функции и замедляют старение организма [67, 70].

Короткоцепочечные регуляторные пептиды, взаимодействующие с ДНК, являются не только геропротекторами, но и эпигенетическими регуляторами, непосредственно влияющими на состояние генома.

Резюме

Вышеизложенное позволяет предположить, что короткоцепочечные пептиды Хавинсона:

— присутствуют в структуре природных белков, как пищевых, так и эндогенных, и, благодаря их легко расщепляемому окружению (например, аргинин-пептид-лизин) и легко высвобождаются при протеолизе;

— относительно устойчивы к пептидазам и способны к некоторым эффектам, специфичным для их предшественников (белков) и тканей происхождения;

— производят на ткани эпигенетическое действие, стимулируя синтез белка, и тем самым компенсируют структурные дефекты, возникающие в результате патологических процессов и старения, и способствуют восстановлению функциональной активности клеток;
— снижают частоту возникновения опухолей.

Литература

1. Alexandrov VA, Beshpalov VG, Morozov VG, Khavinson VKh, Anisimov VN. Study of the post-natal effects of chemopreventive agents on ethylnitrosourea-induced transplacental carcinogenesis in rats. II. Influence of low-molecular-weight polypeptide factors from the thymus, pineal glands, bone marrow, anterior hypothalamus, brain cortex and brain white substance. *Carcinogenesis*. 1996;7(8):1931-4.
2. Anisimov SV, Bokheler KR, Khavinson VKh, Anisimov VN. Elucidation of the effect of brain cortex tetrapeptide Cortagen on gene expression in mouse heart by microarray. *Neuro Endocrinol Lett*. 2004;25(1/2):87-93.
3. Anisimov VN, Arutjunyan AV, Khavinson VKh. Effects of pineal peptide preparation Epithalamin on free-radical processes in humans and animals. *Neuro Endocrinol Lett*. 2001;22:9-18.
4. Anisimov VN, Bondarenko LA, Khavinson VKh. The pineal peptides: Interaction with indoles and the role in aging and cancer. In: *Neuroendocrinology: New Frontiers*. D. Gupta, editor. Tübingen. Research Promotion. 1990. pp. 317–25.
5. Anisimov VN, Khavinson VKh. Peptide bioregulation of aging: results and prospects. *Biogerontology*. 2010;11:139-49.
6. Anisimov VN, Khavinson VKh, Mikhalski AI, Yashin AI. Effect of synthetic thymic and pineal peptides on biomarkers of ageing, survival and spontaneous tumour incidence in female CBA mice. *Mech Ageing Dev*. 2001;122(1):41-68.
7. Anisimov VN, Khavinson VKh, Morozov VG. Carcinogenesis and aging. IV. Effect of low-molecular-weight factors of thymus, pineal gland and anterior hypothalamus on immunity, tumor incidence and life span of C3H/Sn mice. *Mech Ageing Dev*. 1982;19:245-58.
8. Anisimov VN, Khavinson VKh, Morozov VG. Twenty years of study on effect of pineal peptide preparation): Epithalamin in experimental gerontology and oncology. *Ann NY Acad Sci*. 1994;719:483-93.
9. Anisimov VN, Khavinson VKh, Morozov VG. Effect of synthetic dipeptide Thymogen (Glu-Trp) on life span and spontaneous tumor incidence in rats. *The Gerontologist*. 1998;38:7-8.
10. Anisimov VN, Khavinson VKh, Morozov VG. Immunomodulatory peptide L-Glu-L-Trp slows down aging and inhibits spontaneous carcinogenesis in rats. *Biogerontology*. 2000;1:55-9.
11. Anisimov VN, Khavinson VKh, Morozov VG, Dil'man VM. Effect of epiphyseal extracts in lowering the threshold sensitivity of the hypothalamo-hypophyseal system of old female rats to the action of estrogens. *Dokl Akad Nauk SSSR*. 1973;213(2):483-5.
12. Anisimov VN, Khavinson VKh, Popovich IG, Zabezhinski MA. Inhibitory effect of peptide Epitalon on colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats. *Cancer Lett*. 2002;183:1-8.
13. Anisimov VN, Khavinson VKh, Popovich IG, Zabezhinski MA, Alimova IN, Rosenfeld S, Zavarzina NYu, Semenchenko A, Yashin AI. Effect of epitalon on biomarkers of aging, life span and spontaneous tumor incidence in female swiss-derived SHR mice. *Biogerontology*. 2003;4:193-202.
14. Anisimov VN, Morozov VG, Khavinson VKh. Increase of the life span and decrease in the

tumor incidence in C3H/Sn mice as affected by thymus and epiphysis polypeptide factors. Dokl Akad Nauk SSSR. 1982;263(3):742-5.

15. Anisimov VN, Morozov VG, Khavinson VKh. Effect of polypeptide factors from the thymus, bone marrow, epiphysis and blood vessels on the life span and tumor development in mice. Dokl Akad Nauk SSSR. 1987;293(4):1000-4.

16. Boiko AN, Batysheva TT, Vinetskiĭ IaIa, Vdovichenko TV, Ganzhula PA, Gaponova OV, Zhuravleva Elu, Ismailov AM, Lisneker LN, Otcheskaia OV, Khozova AA. Use of cortexin in neurological practice for treatment of out-patients with chronic cerebrovascular disturbances. Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova. 2006;106(5):25-30.

17. Chalisova NI, Linkova NS, Zhekalov AN, Orlova AO, Ryzhak GA, Khavinson VKh. Short peptides stimulate cell regeneration in skin during aging. Adv Gerontol. 2015;5(3):176-9.

18. Dilman VM, Anisimov VN, Ostroumova MN, Khavinson VKh, Morozov VG. Increase in lifespan of rats following polypeptide pineal extract treatment. Exp Pathol (Jena). 1979;17(9):539-45.

19. Dilman VM, Anisimov VN, Ostroumova MN, Morozov VG, Khavinson VKh, Azarova MA. Study of the anti-tumor effect of polypeptide pineal extract. Oncology. 1979;36(6):274-80.

20. Djeridane Y, Khavinson VKh, Anisimov VN, Tuitou Y. Effect of synthetic pineal tetrapeptide (Ala-Glu-Asp-Gly) on melatonin secretion by the pineal gland of young and old rats. J Endocrinol Invest. 2003;26(3):211-5.

21. Evsyukova HV. Aspirin-sensitive asthma due to diffuse neuroendocrine system pathology. Neuro Endocrinol Lett. 2002;23(4):281-5.

22. Gavrisheva NA, Malinin VV, Ses TP, Kozlov KL, Panchenko AV, Titkov AY. Effect of peptide Vilon on the content of transforming growth factor-beta and permeability of microvessels during experimental chronic renal failure. Bull Exp Biol Med. 2005;139(1):24-6.

23. Gomazkov OA. Cortexin. Molecular mechanisms and targets of neuroprotective activity. Zh Nevrol Psikhiatr Im SS Korsakova. 2015;115(8):99-104.

24. Goncharova ND, Khavinson VKh, Lapin BA. Regulatory effect of Epithalon on production of melatonin and cortisol in old monkeys. Bull Exp Biol. 2001;131(4):394-6.

25. Goncharova ND, Vengerin AA, Khavinson VKh, Lapin BA. Pineal peptides restore the age-related disturbances in hormonal functions of the pineal gland and the pancreas. Exper Gerontol. 2005;40:51-7.

26. Granstrem OK, Sorokina EG, Salykina MA, Storozhevykh TP, Surin AM, Shtuchnaya GV, Reutov VP, Krushinsky AL, Kuzenkov VS, Pinelis VG, Dyakonov MM. Cortexin: neuroprotection at the molecular level. Neuroimmunologia. 2010;8(1/2):34-40.

27. Hayflick L. The future of ageing. Nature. 2000;408:(6809):267-9.

28. Kharintseva SV. Retinoprotective therapy of diabetes macular edema in elderly patients. Adv Gerontol. 2011;24(3):521-3.

29. Khavinson VKh. Tissue-specific effects of peptides. Bull Exp Biol. 2001;132(2):807-8.

30. Khavinson VKh. Peptides and ageing. Neuro Endocrinol Lett. 2002;23(Suppl. special issue).

31. Khavinson VKh. Tetrapeptide revealing geroprotective effect, pharmacological substance on its basis, and the method of its application. US Patent N 6,727,227 B1. 2004.

32. Khavinson VKh. Tetrapeptide stimulating the functional activity of hepatocytes, pharmacological substance on its basis and the method of its application. US Patent N 7,101,854 B2. 2006.

33. Khavinson VKh. Peptidergic Regulation of Ageing. Humanistica, St Petersburg. 2009.

34. Khavinson VKh. Peptides, genome, aging. Adv Gerontol. 2014;4(4):337-45.

35. Khavinson VKh, Anisimov VN, Zavarzina NYu, Zabezhinskii MA, Zimina OA, Popovich IG, Shtylik AV, Malinin VV, Morozov VG. Effect of vilon on biological age and lifespan in mice. Bull Exp Biol Med. 2000;130(7):687-90.

36. Khavinson V, Bondarev I, Butyugov A, Smirnova T. Peptide promotes overcoming of the division limit in human somatic cell. *Bull Exp Biol Med.* 2004;137(5):613-6.
37. Khavinson VKh, Chalisova NI, Okulov VB. The neurite-stimulating effect of peptides from brain in dorsal root ganglion neuron organotypic culture. *Prim Sensory Neuron.* 1997;2(3):191-200.
38. Khavinson VKh, Egorova VV, Timofeeva NM, Malinin VV, Gordova LA, Gromova LV. Effect of Vilon and Epithalon on glucose and glycine absorption in various regions of small intestine in aged rats. *Bull Exp Biol Med.* 2002;133(5):494-6.
39. Khavinson V, Goncharova N, Lapin B. Synthetic tetrapeptide epitalon restores disturbed neuroendocrine regulation in senescent monkeys. *Neuro Endocrinol Lett.* 2001;22(4):251-4.
40. Khavinson VKh, Grigoriev EI, Malinin VV, Ryzhak GA. Peptide substance revealing a stress protective effect, pharmaceutical composition on its base and the method of its application. US Patent N 8,071,556. 2006.
41. Khavinson VKh, Grigoriev EI, Malinin VV, Ryzhak GA. Peptide substance stimulating regeneration of central nervous system neurons, pharmaceutical composition on its base, and the method of its application. European Patent EP 2024388. 2009.
42. Khavinson VKh, Grigoriev EI, Malinin VV, Ryzhak GA. Peptide, pharmaceutical composition, and a method of treating microcirculation disorders. US Patent N 7,851,449. 2010.
43. Khavinson VKh, Grigoriev EI, Malinin VV, Ryzhak GA. Peptide glutamyl-aspartyl-proline, pharmaceutical compositions comprising the peptide and uses of the peptide. Israel Patent IL 194499. 2015.
44. Khavinson VKh, Kormiletz DYu, Maryanovich AT. Short-chain regulatory peptides in the structure of the natural proteins. *Adv Gerontol.* 2016, in press.
45. Khavinson VKh, Korneva EA, Malinin VV, Rybakina EG, Pivanovich IYu, Shanin SN. Effect of epitalon on interleukin-1 β signal transduction and the reaction of thymocyte blast transformation under stress. *Neuro Endocrinol Lett.* 2002;23(5/6):411-6.
46. Khavinson VKh, Kuznik BI, Ryzhak GA. Peptide bioregulators: the new class of geroprotectors. Communication 1. Results of experimental studies. *Adv Gerontol.* 2012;25(4):696-708.
47. Khavinson VKh, Kuznik BI, Ryzhak GA. Peptide bioregulators: the new class of geroprotectors. Message 2. Clinical studies results. *Adv Gerontol.* 2013;26(1):20-37.
48. Khavinson VKh, Linkova NS, Tarnovskaya SI, Umnov RS, Elashkina EV, Durnova AO. Short peptides stimulate serotonin expression in cells of brain cortex. *Bull Exp Biol Med.* 2014;157(1):77-80.
49. Khavinson VKh, Malinin VV. *Gerontological Aspects of Genome Peptide Regulation.* Basel (Switzerland), Karger AG, 2005.
50. Khavinson VKh, Malinin VV, Chalisova NI, Grigor'ev EI. Tissue-specific action of peptides in tissue culture of rats of various ages. *Adv Gerontol.* 2002;9:95-100.
51. Khavinson VKh, Malinin VV, Grigoriev EI. Tetrapeptide regulating prostate functions and its compositions and methods. European Patent EP 1353939 B1. 2004.
52. Khavinson VKh, Malinin VV, Grigoriev EI, Ryzhak GA. Tetrapeptide regulating blood glucose level in diabetes mellitus. US Patent N 7,491,703. 2009.
53. Khavinson VKh, Malinin VV, Trofimova SV, Zemchikhina VN. Inductive activity of retinal peptides. *Bull Exp Biol Med.* 2002;134(5):482-4.
54. Khavinson V, Morozov V. Peptides of pineal gland and thymus prolong human life. *Neuro Endocrinol Lett.* 2003;24(3/4):233-40.
55. Khavinson VKh, Morozov VG, Malinin VV, Grigoriev EI. Tetrapeptide stimulating functional activity of neurons, pharmacological agent based thereon and method of use thereof. US Patent N 7,189,701. 2007.

56. Khavinson VKh, Morozov VG, Malinin VV, Sery SV. Use of a dipeptide for stimulating repair processes. European Patent EP 1089753. 2003.
57. Khavinson VKh, Myl'nikov SV. Effect of pineal tetrapeptide on antioxidant defense in *Drosophila melanogaster*. Bull Exp Biol Med. 2000;129(4):355-6.
58. Khavinson VKh, Myl'nikov SV. Effect of Epitalone on the age-specific changes in the time course of lipid peroxidation in *Drosophila melanogaster*. Bull Exp Biol Med. 2000;130(11):1116-9.
59. Khavinson VKh, Pronyaeva VE, Linkova, NS, Trofimova SV. Peptidergic regulation of differentiation of embryonic retinal cells. Bull Exp Biol Med: Cell Technol Biol Med. 2013;1:172-5.
60. Khavinson V, Razumovsky M, Trofimova S, Grigorian R, Razumovskaya A. Pineal-regulating tetrapeptide epitalon improves eye retina condition in retinitis pigmentosa. Neuroend Lett. 2002;23:365-8.
61. Khavinson V, Ribakova Y, Kulebiakin K, Vladychenskaya E, Kozina L, Arutjunyan A, Boldyrev A. Pinealon increases cell viability by suppression of free radical levels and activating proliferative processes. Rejuvenation Res. 2011;14(5):535-41.
62. Khavinson VKh, Rybakina EG, Malinin VV, Pivanovich IYu, Shanin SN, Korneva EA. Effects of short peptides on thymocyte blast transformation and signal transduction along the sphingomyelin pathway. Bull Exp Biol. 2002;133(5):497-9.
63. Khavinson VKh, Ryzhak GA, Grigoriev EI, Ryadnova IYu. Peptide substance restoring function of respiratory organs. European Patent EP 1758922. 2008.
64. Khavinson VKh, Ryzhak GA, Grigoriev EI, Ryadnova IYu. Peptide substance restoring myocardium function. US Patent N 7,662,789. 2008.
65. Khavinson VKh, Ryzhak GA, Grigoriev EI, Ryadnova IYu. Peptide substance restoring respiratory organs function. US Patent. 7,625,870. 2009.
66. Khavinson VKh, Sery SV, Morozov VG. Pharmaceutical dipeptide compositions and methods of use thereof. US Patent N 6,139,862. 2000.
67. Khavinson VKh, Shataeva LK, Chernova AA. Effect of regulatory peptides on gene transcription. Bull Exp Biol Med. 2003;136(3):288-90.
68. Khavinson VKh, Solov'ev AIu, Zhilinskii DV, Shataeva LK, Vaniushin BF. Epigenetic aspects of peptide regulation of aging. Adv Gerontol. 2012;25(1):11-22.
69. Khavinson VKh, Solovieva DV. New approach to the prophylaxis and treatment of age-related pathology. Romanian J Gerontol Geriatr. 1998;20(1):28-34.
70. Khavinson VKh, Tarnovskaya SI, Linkova NS, Pronyaeva VE, Shataeva LK, Yakutseni PP. Short cell-penetrating peptides: a model of interactions with gene promoter sites. Bull Exp Biol Med. 2013;154(3):403-10.
71. Khavinson VKh, Tendler SM, Vanyushin BF, Kasyanenko NA, Kvetnoy IM, Linkova NS, Ashapkin VV, Polyakova VO, Basharina VS, Bernadotte A. Peptide regulation of gene expression and protein synthesis in bronchial epithelium. Lung. 2014;192(5):781-91.
72. Khavinson VKh, Timofeeva NM, Malinin VV, Egorova VV, Nikitina AA. Effect of the dipeptide vilon on activity of digestive enzyme in rats of various ages. Bull Exp Biol Med. 2001;131(6):583-5.
73. Khavinson VKh, Timofeeva NM, Malinin VV, Gordova LA, Nikitina AA. Effect of vilon and epithalon on activity of enzymes in epithelial and subepithelial layers in small intestine of old rats. Bull Exp Biol Med. 2002;134(6):562-4.
74. Khavinson VK, Yakovleva ND, Popuchiev VV, Kvetnoy IM, Manokhina RP. Reparative effect of epithalon on pineal gland ultrastructure in gamma-irradiated rats. Bull Exp Biol Med. 2001;131(1):81-5.
75. Khavinson VKh, Zemchikhina VN, Trofimova SV, Malinin VV. Effects of peptides on proliferative activity of retinal and pigmented epithelial cells. Bull Exp Biol Med. 2003;135(6):597-

9.

76. Kniaz'kin IV, Iuzhakov VV, Chalisova NI, Grigor'ev EI. Functional morphology of organotypic culture of spleens from rats of various ages exposed to vilon. *Adv Gerontol.* 2002;9:110-5.

77. Kniaz'kin IV, Poliakova VO. The effect of vilon on the thymus and spleen in a radiation model of premature aging. *Adv Gerontol.* 2002;9:105-9.

78. Korkushko OV, Khavinson VKh, Shatilo VB, Antonyk-Sheglova IA. Peptide geroprotector from the pineal gland inhibits rapid aging of elderly people: results of 15-year follow-up. *Bull Exp Biol Med.* 2011;151(3):366-9.

79. Kozina LS. Effects of bioactive tetrapeptides on free-radical processes. *Bull Exp Biol Med.* 2007;143(6):744-6.

80. Kozina LS, Arutjunyn AV, Khavinson VKh. Antioxidant properties of geroprotective peptides of the pineal gland. *Arch Gerontol Geriatr.* 2007. Suppl.1:213-6.

81. Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol.* 1982;157(1):105-32.

82. Labunets IF. Antigen-induced changes in the endocrine function of the thymus in CBA mice during aging: role of peptide factors released by the pineal gland. *Bull Exp Biol Med.* 2005;139(6):724-6.

83. Labunets IF, Butenko GM, Khavinson VKh. Effects of bioactive factors of the pineal gland on thymus function and cell composition of the bone marrow and spleen in mice of different age. *Bull Exp Biol Med.* 2004;137(5):510-2.

84. Labunets IF, Butenko GM, Korkushko OV, Shatilo VB. Effect of epithalamin on the rhythm of immune and endocrine systems functioning in patients with chronic coronary disease. *Bull Exp Biol Med.* 2007;143(4):472-5.

85. Labunets IF, Butenko GM, Magdich LV, Korkushko OV, Khavinson VKh, Shatilo VB. Effect of epithalamin on circadian relationship between the endocrine function of the thymus and melatonin-producing function of the pineal gland in elderly people. *Bull Exp Biol Med.* 2004;137(5):507-9.

86. Lapina EA, Nazarova LA, Petrova OP, Sibarov DA, Zubzhitskaya LB, Pavlova NG, Konstantinova NN, Konovalov YS, Kvetnoy IM, Arutyunyan AV, Grigorev EI. Fluorescent microscopic study of epithalon binding in maternal and fetal rabbit tissues in health and under conditions of placental insufficiency. *Bull Exp Biol Med.* 2005;139(5):615-8.

87. Levchuk LA, Ivanova SA, Semke VY. Effects of neuroprotector cortexin on the dynamics of neuroendocrine system parameters in patients with organic emotionally labile (asthenic) disorders. *Bull Exp Biol Med.* 2013;155(1):75-7.

88. Mashin VV, Belova LA, Chaplanova OI, Khusnullina AF, Manasian AM. An open clinical trial of cortexin in treatment of brain ischemia. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova.* 2014;114(9):49-52

89. Mendzheritskiĭ AM, Karantysh GV, Ryzhak GA, Dem'ianenko SV. Regulation of content of cytokines in blood serum and of caspase-3 activity in brains of old rats in model of sharp hypoxic hypoxia with Cortexin and Pinealon. *Adv Gerontol.* 2014;27(1):94-7.

90. Merkur'eva GA, Ryzhak GA. Effect of the pineal gland peptide preparation on the diurnal profile of arterial pressure in middle-aged and elderly women with ischemic heart disease and arterial hypertension. *Adv Gerontol.* 2008;21(1):132-42.

91. Micans P. The new Russian peptide revolution. *Aging Matters.* 2016. (Spec 25 yrs ann edit):6-9.

92. Miliutina IuP, Kozina LS, Arutiunian AV, Chalisova NI, Lesniak VV, Morozova PIu. The effect of pineal peptide preparations on proliferative activity in organotypic culture of the preoptic hypothalamus area. *Adv Gerontol.* 2007;20(4):61-3.

93. Morozov VG, Khavinson VKh. Pharmaceutical preparation for the therapy of immune deficiency conditions. US Patent N 5,538,951.1996.

94. Morozov VG, Khavinson VKh. Natural and synthetic thymic peptides as therapeutics for

immune dysfunction. *Int J Immunopharmacology*. 1997;19(9/10):501-5.

95. Pinelis VG, Storozhevykh TP, Surin AM et al. Neuroprotective effects of cortagen, cortexin and semax on glutamate neurotoxicity. *J Peptide Science*. 2008;14(8)Suppl:159–60.

96. Pliss GB, Mel'nikov AS, Malinin VV, Khavinson VKh. Inhibitory effect of peptide vilon on the development of induced rat urinary bladder tumors in rats. *Bull Exp Biol Med*. 2001;131(6):558–60.

97. Sibarov DA, Kovalenko RI, Malinin VV, Khavinson VKh. Epitalon influences pineal secretion in stress-exposed rats in the daytime. *Neuroendocr Lett*. 2002;23(5/6):473-5.

98. Sibarov DA, Volinova AB, Frolov DS, Nozdrachev AD. Effects of intranasal administration of epitalon on neuron activity in the rat neocortex. *Neurosci Behav Physiol*. 2007;37(9):889-93.

99. Trofimova SV, Khavinson VKh. The retina and aging. *Adv Gerontol*. 2002;9:79-82.

100. Vinogradova IA, Bukalev AV, Zabezhinski MA, Semenchenko AV, Khavinson VKh, Anisimov SV. Effect of Ala-Glu-Asp-Gly peptide on life span and development of spontaneous tumors in female rats exposed to different illumination regimes. *Bull Exp Biol Med*. 2007;144(6):825–30.

101. Vinogradova IA, Bukalev AV, Zabezhinski MA, Semenchenko AV, Khavinson VKh, Anisimov VN. Geroprotective effect of ala-glu-asp-gly peptide in male rats exposed to different illumination regimens. *Bull Exp Biol Med*. 2008;145(4):472-7.

102. Zakutskii AN, Chalisova NI, Ryzhak GA, Aniskina AI, Filippov SV, Zeziulin PN. The tissue-specific effect of synthetic peptides-biologic regulators in organotypic tissues culture in young and old rats. *Adv Gerontol*. 2006;19:93-6.

Глава 3. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ПЕПТИДОВ И ДНК

(в соавторстве с С. И. Тарновской и Е. Гутон)

3.1. Взаимодействия белков и пептидов с ДНК

Взаимодействие белка с ДНК

Взаимодействия с белками важны для всех функций ДНК: транскрипции и регуляции генов, репликации и репарации ДНК, упаковки ДНК в хромосомы [1, 7]. Белки, взаимодействующие с ДНК, могут быть классифицированы как те, что активно скользят вдоль нитей ДНК, и те, которые связываются с определенными участками ДНК. К первой группе относятся ДНК- и РНК-полимеразы. Из-за их последовательного взаимодействия с основаниями ДНК и постоянного контакта с ДНК их называют *скользящими белками*. Белки второй группы также движутся вдоль ДНК, однако не скользят, а вступают в контакт с последовательными основаниями ДНК и перестают двигаться, образуя комплексы с определенными комбинациями оснований. К этой группе относятся факторы транскрипции и репликации, которые участвуют в рекрутинге других белков, например ДНК-полимеразы, в соответствующие позиции [16].

Белки, которые неспецифически связываются с ДНК, в основном участвуют в упаковке ДНК в хромосомах и в стабилизации одноцепочечных сегментов ДНК. Однако такие клеточные процессы, как пролиферация, дифференцировка и апоптоз, контролируются белками, которые связываются с ДНК сайт-специфическим образом [6]. Первичные структуры таких белков обычно имеют ДНК-связывающие мотивы, которые непосредственно контактируют с участками ДНК. Полученные комплексы характеризуются

константами аффинности, которые в 10^2 - 10^6 раз выше констант аффинности возможных комплексов, образуемых пептидами с любыми другими участками ДНК [47].

Структурные исследования ДНК-белковых комплексов выявили два механизма распознавания белками участков связывания.

Первый — это прямое связывание, при котором функциональные группы аминокислотных остатков вступают в непосредственный контакт, например, через водородные связи, с определенными азотистыми основаниями (аденин, тимин, гуанин или цитозин). Такие белки обычно связываются с большой бороздкой ДНК, где могут образовываться многочисленные донорно-акцепторные связи. Таким образом, белки этой категории распознают свои участки связывания путем прямого зондирования поверхности ДНК, которая может изменяться в зависимости от лежащей в ее основе нуклеотидной последовательности. Типичными для этих белков являются структуры, известные как спираль-петля-спираль (например, в репрессоре бактериофага λ , белке-репрессоре 434 или бактериальном λ Trp репрессоре), лейциновая застежка-молния (например, в белке GCN4) и цинковые пальцы (например, в транскрипционном факторе TFIIIA) [18, 38, 46].

Второй механизм распознавания участков связывания включает связывание белков внутри малой бороздки ДНК. Однако имеющиеся там доноры и акцепторы протонов сходны в любых нуклеотидных последовательностях, и это ставит под вопрос их специфическое распознавание белками. Таким образом, белки распознают дополнительные сигналы, такие как изменение ширины больших и малых бороздок, угла поворота спирали ДНК и ее жесткости, а также стейкинговые взаимодействия и другие физические свойства ДНК. К таким белкам относятся Lac-репрессоры, ТАТА-связывающие белки, рестриктазы и белки, участвующие в репарации ДНК. Механизм распознавания ДНК этими белками называется *непрямым считыванием*. Очень часто белком используются оба механизма [17].

Анализ ДНК-белковых комплексов, входящих в банк данных Rcsb Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>) показывает, что среди азотистых оснований наиболее активным в плане взаимодействия с белками является гуанин, за ним следуют аденин, цитозин и тимин. На белковой стороне полярные боковые цепи наиболее важны для взаимодействия с основаниями ДНК. Среди аминокислот аргинин, лизин, серин и треонин наиболее способны образовывать множественные водородные связи с азотистыми основаниями. Кислотные остатки, такие как аспарагиновая и глутаминовая кислоты, менее способны взаимодействовать с ДНК из-за их неблагоприятных электростатических характеристик. Отрицательно заряженные аминокислоты отталкиваются от отрицательно заряженных фосфатов остова ДНК. Однако считается, что отрицательно заряженные аминокислоты способны взаимодействовать с азотными основаниями в большой бороздке, и эти взаимодействия специфичны. Среди нейтральных аминокислот только глицин способен образовывать множественные связи с ДНК [17].

Взаимодействие между ДНК и короткоцепочечными пептидами

Предполагается, что взаимодействие короткоцепочечных пептидов с их тканями-мишенями основано на способности этих пептидов проходить сквозь плазматическую и ядерную мембраны, проникать в клеточное ядро и ядрышко и там взаимодействовать с ДНК, регулируя эпигенетически экспрессию генов, ответственных за синтез сигнальных молекул и белков, важных для клеточной дифференцировки, пролиферации и апоптоза, а также для транскрипции генов [4, 25, 28, 29].

Согласно результатам, полученным с помощью физических методов — ультрафиолетовой (УФ) спектроскопии, кругового дихроизма, вискозиметрии и атомно-силовой микроскопии, а также молекулярного моделирования, сигнальные пептиды способны связываться с ДНК в растворе *in vitro* [24, 26, 29, 31, 32, 34].

Этот процесс занимает несколько часов и происходит практически без электростатических сил. В результате образования комплекса, включающего азотистые основания в бороздке ДНК, наблюдается вызванная пептидами дестабилизация вторичной структуры ДНК. С помощью УФ-спектрофотометрии был обнаружен концентрационно-зависимый гиперхромный эффект (увеличение поглощения при 260 нм) в смеси эпیتالона (AEDG) и двухцепочечной ДНК. Гиперхромный эффект указывает на то, что водородные связи между нуклеотидными парами двойной спирали ДНК частично разрушаются, и нити двойной спирали становятся локально разделенными.

Экспериментально установлено, что разделение нитей ДНК (плавление ДНК) происходит при температуре +69,5 °С со свободной синтетической ДНК и при температуре +28,0 °С со смесью ДНК и эпیتالона. Таким образом, эпیتالон облегчал разделение нитей ДНК при температурах, характерных для биохимических реакций. Важно отметить, что разделение цепей ДНК при физиологических температурах требуется для инициации экспрессии генов, но не является денатурацией ДНК.

Эти и другие теоретические рассуждения и экспериментальные данные позволили разработать модель взаимодействия пептидов с ДНК, предполагающую формирование стабильного ДНК-пептидного комплекса [33, 35]. С помощью молекулярного моделирования были определены основные физико-химические параметры комплекса (количество водородных связей, гидрофобные и электростатические взаимодействия, минимизация энергии при образовании ДНК-пептидного комплекса). На основе этих расчетов была предложена трехмерная модель взаимодействия эпیتالона с последовательностями АТТТС в ДНК [30].

Открытие того, что пептиды способны связываться с олигонуклеотидами на конкретных участках (сайт-специфическим образом), может быть особенно важным для эпигенетического механизма регуляции экспрессии генов [23, 27]. Взаимодействие коротких пептидов с ДНК в ее одноцепочечной форме может контролировать экспрессию генов. Кроме того, связывание короткоцепочечного пептида эпیتالона с ДНК сопровождается локальным разматыванием нитей ДНК, что может привести к появлению одноцепочечной мишени для связывания других пептидов с ДНК.

Взаимодействие короткоцепочечных пептидов с одно- и двухцепочечными дезоксирибо-олигонуклеотидами изучали с использованием препаратов ДНК фага лямбда [23, 27]. Определено влияние пептидов на спектры флуоресценции олигонуклеотидов, меченных 5,6-карбоксифлуоресцеином, и влияние ДНК фага лямбда на спектры флуоресценции пептидов, меченных флуоресцеина изотиоцианатом (FITC). Было обнаружено, что пептиды гасят флуоресценцию связанных с олигонуклеотидами флуорофоров. Это открытие предполагает, что пептиды связываются с ДНК. Было также установлено, что пептиды способны влиять на синтез белка и экспрессию генов [9]. Применение пептидов позволяет компенсировать изменения экспрессии генов в животных моделях патологических состояний. Эпیتالон (AEDG), вилон (KE), тимоген (EW) и кортаген (AEDP) изменяют экспрессию 194 из 266 генов, изученных на животных моделях [3, 4]. Это согласуется с тем, что короткоцепочечные пептиды могут связываться с ДНК и регулировать активность генов эпигенетическим образом.

Наблюдались проявления сайт-специфических взаимодействий пинеалона (ERD) с ДНК. Пинеалон связывается с олигонуклеотидами, которые содержат последовательности CNG, предпочтительно последовательности CAG, делая эти сайты недоступными для ДНК-метилтрансфераз и, таким образом, оставляя промоторы генов неметилированными. Поэтому вполне возможно, что специфические (комплементарные) пептидно-ДНК взаимодействия контролируют синтез белка в нейронах [21].

Сравнение пространственного расположения функциональных групп на поверхности главной бороздки двухцепочечной ДНК и боковых групп регуляторных пептидов показало,

что эпиталон может связываться с комплементарными участками ДНК промоторов генов, вызывая тем самым локальное разделение нитей ДНК и инициируя транскрипцию генов РНК-полимеразой II [22, 29].

Было обнаружено, что короткоцепочечные пептиды активируют гетерохроматин в клеточных ядрах старых людей и тем самым облегчают высвобождение генов из ингибирования, вызванного гетерохроматизацией эухроматиновых сегментов хромосом, которая происходит при старении [20, 23, 37] (табл.7).

Таблица 7. Влияние эпиталона (AEDG) и вилона (KE) на хроматин в лимфоцитах у людей пожилого возраста [21]

Группа	Ассоциированные акроцентрические хромосомы (на 1 клетку)	Дегетерохроматизация факультативного гетерохроматина (на 1 клетку)	Общий гетерохроматин	Структурный гетерохроматин хромосомы 1
Молодые люди (20-40 лет)	1,3±0,1	7,7±0,4	Стабильный	Стабильный
Контрольная группа людей старческого возраста (75-88 лет)	0,0	5,9±0,2*	Гетерохроматизация	Гетерохроматизация
Старые пациенты, получавшие эпиталон	2,3±0,1***	8,4±0,5***	Дегетерохроматизация	Дегетерохроматизация
Старые пациенты, получавшие вилон	2,4±0,1***	9,9±0,6***	Дегетерохроматизация	Гетерохроматизация

* $p < 0,05$ по сравнению с молодыми людьми. *** $p < 0,001$ по сравнению с контрольной группой старых пациентов.

Структурная конденсация хроматина тесно коррелирует с его функциональной неоднородностью. Существует два типа хроматина в ядрах клеток: светлый эухроматин и плотный гетерохроматин, который находится вблизи ядерной оболочки. Деконденсированные (эухроматические) сегменты хромосом функционально активны. Известно, что активный хроматин необходим для транскрипционной активности генов. Транскрипция генов ограничена эухроматином. С возрастом количество гетерохроматина в ядрах клеток увеличивается. Повышенная гетерохроматизация коррелирует с инактивацией генов, которые были активны раньше. Репликация плотно гетерохроматизированных сегментов хромосом задерживается. Регуляторные пептиды повышают содержание эухроматина в ядрах клеток. Это означает, что большее количество генов становится доступным для факторов транскрипции, усиливается транскрипция и увеличивается синтез белка. Большее количество эухроматина в клеточных ядрах означает, что синтез белка в клетках более активен. Результаты описанных выше экспериментов свидетельствуют о том, что возрастная гетерохроматизация является обратимой [21].

Взаимодействие веществ с малой бороздкой ДНК

По механизмам их взаимодействия с ДНК все вещества, как экзогенные, так и эндогенные, можно отнести к пяти типам:

- А. Интеркалирующие
- В. Металлосодержащие
- С. Разделяющие цепочки
- Д. Нацеленные на бороздку ДНК

Только последний из вышеперечисленных механизмов был подтвержден в наших экспериментальных исследованиях короткоцепочечных пептидов и в клинических испытаниях препаратов на их основе. В настоящее время изучаются и другие возможные механизмы.

Двухцепочечная ДНК в своей форме В имеет большую и малую бороздки, ширина которых составляет 2,1 или 1,2 Å соответственно. Связывание с ними вещества, можно показать на примере природных антибиотиков нетропсина и дистамицина. Они связываются через свои положительно заряженные боковые группы с малой бороздкой ДНК в ее АТ-богатых областях. Это взаимодействие стабилизируется водородными связями и электростатическими и ван-дер-ваальсовыми силами. Эти два вещества не могут связываться с областями, богатыми GC, потому что NH₂-группа гуанина вытеснит их из малой бороздки. Взаимодействие антибиотиков с малой бороздкой изменит компланарность нуклеотидных пар и исказит структуру ДНК [56, 8]. Кристаллическая структура комплекса нетропсина с додекамером ДНК была определена R. E. Dickerson и соавторами [36]. Молекула нетропсина связывается с ядром ДНК, получая доступ к нему из малой бороздки, образованной последовательностью ААТТ.

При взаимодействии с ДНК нетропсин или дистамицин вытесняет молекулы воды. Аминогруппы антибиотиков образуют водородные связи с N-3 атомами аденина и O-2 атомами тимина вдоль dna малой бороздки. Кроме того, ван-дер-ваальсовы силы между аденином и пиррольными кольцами антибиотиков участвуют в их взаимодействии с ДНК. Используя рентгеноструктурный анализ, аналогичные паттерны взаимодействий были обнаружены и в случае связывания дистамицина с последовательностями CGCAAATTTGCG [40]. АТ-богатые участки ДНК в малой бороздке также участвуют в связывании ДНК-специфических красителей Hoechst 33258, SN6999 и их аналогов [49].

Хромомицин А3 и митрамицин — антибиотики, способные подавлять пролиферацию раковых клеток. Они выделяются из *Streptomyces sp.* В отличие от других веществ, способных связываться с малой бороздкой ДНК, эти антибиотики взаимодействуют с GC-богатыми последовательностями в присутствии ионов металлов, например Mg²⁺.

Структура комплекса между хромомицином и D(TTGGCCAA)₂ определялась с помощью ядерного магнитного резонанса. В отличие от нетропсина и дистамицина, которые существенно не изменяют конформации ДНК, хромомицин расширяет малую бороздку и тем самым приводит к значительным конформационным изменениям в двухцепочечной ДНК. Специфичность связывания с GC основана на образовании водородной связи между C-8 или гидроксильной группой структуры антибиотика и атомом N-3 (акцептор) или NH-группой (донор) гуанина [42].

3.2. Моделирование взаимодействия короткоцепочечных пептидов с ДНК

В последние годы молекулярное моделирование все чаще используется для анализа наноструктур, в том числе короткоцепочечных пептидов. Истоки этого подхода

прослеживаются еще в начале XX века. Первые успешные представления трехмерных молекулярных структур были вызваны достижениями в ядерной физике.

Ключевое значение для молекулярного моделирования имели достижения в области кристаллографии. Дополнительный подход к визуализации трехмерных структур кристаллов основан на построении молекулярных моделей с использованием конструктивных наборов, таких как шары и стержни, которые используются в моделях Дрейдинга. Эти модели обеспечивают удовлетворительные аппроксимации стерических изменений, возникающих в результате введения заместителей или образования водородных связей. В 1970-х годах были разработаны первые виртуальные модели Дрейдинга [43]. Джеймс Уотсон и Фрэнсис Крик использовали молекулярные модели в своих первых попытках смоделировать структуру ДНК. Несколько позже были предложены механические аналогии молекулярных систем. Применяемый при моделировании подход силового поля все больше оптимизируется для достижения беспрецедентной эффективности.

В настоящее время молекулярное моделирование находит многочисленные применения в различных областях биологии, химии и медицины. Компьютерное моделирование физико-химических процессов позволяет решать многие задачи, с которыми сталкиваются экспериментаторы в своих эмпирических исследованиях. В частности, моделирование позволяет предсказать, как проявляются физико-химические свойства молекул в определенных условиях, и получить структурные детали биохимических процессов. Экспериментаторы могут лучше проектировать свои исследования, рассматривая многочисленные варианты и выбирая оптимальные из них [43].

Сила молекулярного моделирования применительно к короткоцепочечным пептидам

Молекулярное моделирование позволяет построить трехмерную химическую структуру короткоцепочечных пептидов с использованием специализированного программного обеспечения и баз данных о структурах и физико-химических свойствах атомов и молекул, в том числе макромолекул. Моделирование макромолекул включает в себя извлечение свойств атомов и молекулярных фрагментов из соответствующих баз данных и построение связей между этими элементами на основе валентностей [12].

Метод молекулярной механики позволяет рассчитать потенциальную энергию данной системы по закону Гука (Hooke's law): атомы молекулы рассматриваются как упругие шарики разного размера, соединенные пружинами разной длины. Полная энергия такой системы вычисляется относительно начала координат энергии [41]:

$$E_{tot} = E_{str} + E_{bend} + E_{tors} + E_{vdw} + E_{elec} + \dots,$$

Где E_{tot} — полная потенциальная энергия макромолекулы; E_{str} — энергия растяжения связи; E_{bend} — энергия деформации валентного угла; E_{tors} — энергия деформации угла кручения; E_{vdw} — энергия ван-дер-Ваальса; E_{elec} — электростатическая энергия.

Полная стерическая энергия системы вычисляется для силового поля, определяемого набором регулируемых параметров (силовых констант) и стандартными значениями длины связи, валентности и углов кручения. Учитываются также ван-дер-ваальсовы взаимодействия. Первый аддитивный элемент вышеприведенного уравнения фиксирует изменения энергии связи, возникающие в результате удлинения или сжатия связи относительно ее стандартной длины [2]:

$$E_{str} = \frac{1}{2} k_b (b - b_0)^2,$$

где k_b — постоянная силы изменения длины связи; b_0 — стандартная длина связи; а b — ее кажущаяся длина.

Угловые деформации фиксируются уравнением:

$$E_{bend} = \frac{1}{2} k_\theta (\theta - \theta_0)^2,$$

где k_θ — силовая постоянная деформации валентного угла; θ_0 — равновесное значение валентного угла; θ — его кажущееся значение.

Вклад вращения относительно двугранных углов вычисляется с помощью тригонометрического уравнения:

$$E_{tors} = \frac{1}{2} k_\phi (1 + \cos(n\phi - \phi_0)),$$

где: k_ϕ — торсионный барьер (вращательный барьер); ϕ — кажущийся угол кручения; n — число энергетических минимумов за один полный оборот; и ϕ_0 — стандартный угол кручения.

Ван-дер-ваальсовы взаимодействия между непосредственно соседними атомами обычно отражаются в потенциале Леннарда-Джонса (Lennard-Jones potential) [19]:

$$E_{vdw} = \sum \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right),$$

Где A_{ij} — коэффициент отталкивания; B_{ij} — фактор притяжения; и r_{ij} — расстояние между двумя атомами i и j .

Электростатические силы описываются функцией, полученной из уравнения Кулона (Coulomb equation) [15]:

$$E_{elec} = \frac{1}{\epsilon} \frac{Q_1 Q_2}{r},$$

где ϵ — диэлектрическая проницаемость; Q_1 и Q_2 — заряды взаимодействующих атомов; r — расстояние между атомами.

После построения компьютерных моделей пептидов и ДНК важным дальнейшим шагом является геометрическая оптимизация их структур, которая достигается путем минимизации суммарной энергии моделируемой системы. Эта процедура выполняется методом наиболее крутого спуска, который подразумевает постепенное смещение каждого атома молекулы в соответствующем фазовом пространстве по траектории, имеющей локальные энергетические минимумы в каждой из ее точек, до достижения абсолютного минимума. Этот подход применим к моделируемым структурам, начальные условия которых далеки от их минимальной энергии.

Расчеты в молекулярной механике делаются более точными с помощью метода сопряженных градиентов. В принципе, он подразумевает итеративное накопление информации о функции, подлежащей минимизации. Градиент энергии на каждом шаге итерации используется в качестве дополнительного фактора, включаемого в расчет следующего шага итерации. Таким образом, каждый последующий шаг устанавливает направление движения к абсолютному минимуму [45].

Эти процедуры приводят к серии трехмерных конфигураций молекулы, каждая из которых имеет свою собственную энергию. Важной задачей является нахождение конфигураций, имеющих сходные значения суммарной потенциальной энергии вокруг

определенных локальных минимумов. Для этого используется метод конформационного поиска [44].

Конформационный анализ короткоцепочечных пептидов

Пептидные молекулы не являются жесткими, и при комнатной температуре их внутренняя кинетическая энергия может быть достаточно высокой, чтобы все атомы в их структурах находились в постоянном движении. Результирующие переходы между различными конформациями связаны с изменением углов кручения одиночных химических связей [14]. Структуры, обладающие максимальной энергией, нестабильны. Считается, что биологическая активность терапевтического препарата определяется единственной, так называемой “биоактивной” конформацией его молекул, которую необходимо найти среди всех возможных низкоэнергетических конформаций [13]. Основываясь на информации об активной конформации, можно построить новые активные лиганды для конкретных мишеней. Таким образом, нахождение низкоэнергетических конформаций имеет важное значение для понимания взаимосвязей между структурой и биологической активностью молекулы.

Для определения наиболее вероятной конформации пептида в водной среде важно учитывать влияние растворителя на поведение всей системы. Для расчета таких эффектов растворитель рассматривают как сплошную среду вокруг молекул растворенного вещества. Такой подход позволяет определить эффект сольватации при минимальных расчетных затратах на примере обобщенной модели Борна и площади поверхности (generalized Born and surface area model — GBSA) [48, 51].

Рис. 8 представляет собой низкоэнергетические конформации тетра- и трипептидов. Каждый пептид образует сеть внутримолекулярных водородных связей, показанных пунктирными линиями. Каждая молекула содержит полярный отрицательно заряженный кластер, образованный глутаминовой и аспарагиновой кислотами. Таким образом, в водных средах пептиды образуют круговые структуры за счет нековалентных донорно-акцепторных электростатических взаимодействий между отрицательно заряженными карбоновыми группами аспарагиновой или глутаминовой кислоты и положительно заряженными аминогруппами лизина или N-концевой аминокислоты. Сильные электростатические связи между положительно заряженным азотом и отрицательно заряженным кислородом стабилизируют полученную пространственную конформацию.

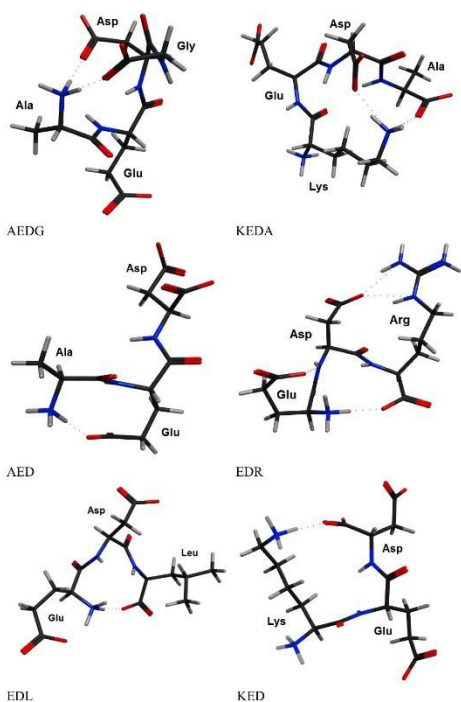


Рис. 8. Наиболее энергетически благоприятные конформации пептидов в водной среде при pH 7 и температуре 300 °K в силовом поле молекулярной механики Amber99 найдены с использованием CCG Molecular Operating Environment 2013. AEDG — эпیتالон, KEDA — ливаген, AED — карталакс, EDR — пинеалон, EDL — оваген, KED — везуген. Отмеченные черным цветом пептидные остовы, которые включают атомы углерода, кислорода и азота. Пунктирные линии обозначают водородные связи.

Докинг анализ применительно к ДНК-пептидным комплексам

Докинг (docking, стыковка) — вариант компьютерного цифрового моделирования, направленного на определение оптимальной ориентации лиганда (пептида) относительно его рецептора (участка ДНК в пределах большой бороздки). Метод подразумевает приведение лиганда в его низкоэнергетическое состояние и его связывающего участка в контакт, вычисление энергии их взаимодействия (ккал/моль) и нахождение положения лиганда, минимизирующего эту энергию. При «полуупругой» стыковке учитывается только конформационная подвижность лиганда, тогда как азотистые основания ДНК считаются жесткими. При определении оптимальной ориентации пептида относительно двухцепочечной ДНК учитываются такие параметры, как площадь контакта, число водородных связей, гидрофобные и электростатические взаимодействия. Очень важно правильно подобрать силовое поле и правильный алгоритм поиска [41]. Общий алгоритм включает в себя расчет энтальпии образования пептидно-ДНК-комплекса:

$$dH = C_{hb} f_{hb} + C_{ion} f_{ion} + C_{mlig} f_{mlig} + C_{hh} f_{hh} + C_{hp} f_{hp} + C_{aa} f_{aa},$$

где каждый f — частично вычисленное межатомное взаимодействие, а C — соответствующий коэффициент для вычисления аффинности, индексы которого имеют следующие значения:

- hb — взаимодействия в донорно-акцепторных парах
- ion — электростатические взаимодействия между заряженными частицами
- mlig — взаимодействия между атомами азота, серы и переходных металлов

hh — взаимодействия между гидрофобными и полярными атомами (обычно они неблагоприятны)

aa — другие взаимодействия между любыми атомами (они обычно благоприятны, но слабы)

Предполагаемые механизмы действия пептидов — это регуляция генов путями, сходными с теми, которые характеризуются факторами транскрипции. Все факторы транскрипции имеют свои специфические участки связывания на молекулах ДНК. Факторы транскрипции распознают свои участки в регуляторных областях генов и связываются с ними, таким образом активируя или ингибируя экспрессию генов.

Геометрические свойства пептидов, имеющих до четырех аминокислотных остатков, позволяют таким пептидам легко проникать в большую бороздку ДНК и взаимодействовать там с азотистыми основаниями. В табл. 8 представлен результат использования стандартного программного пакета МОЕ 2014.10 для выполнения стыковки 16 короткоцепочечных пептидов со всеми возможными комбинациями четырех нуклеотидов, образующих последовательность ДНК. Для каждого пептида была определена последовательность ДНК, которая образует с ним наиболее энергетически благоприятный комплекс (табл. 8). Сильные взаимодействия с ДНК были обнаружены в случаях ливагена, панкрегена, пинеалона и кардиогена, которые все имеют положительно заряженные боковые цепи (Lys, Arg). Наиболее слабые взаимодействия характерны для всех дипептидов, вероятно, потому, что площади их контактов с ДНК невелики.

Таблица 8. Видимые участки ДНК для связывания короткоцепочечных пептидов

Пептид	Структура пептида	Участок ДНК	Оценочное значение взаимодействия пептид—ДНК
эпиталон	AEDG	AATG	++
пинеалон	EDR	TTCC	+++
хонлутен	EDG	TTTT	+
вилон	KE	AGAT	+
тимоген	EW	AACG	+
панкреген	KEDW	ACCT	+++
бронхоген	AEDL	CTCC	++
карталакс	AED	ACCT	+
везуген	KED	GCCG	+
кристаген	EDP	AGAT	++
оваген	EDL	CTCC	++
простамакс	KEDP	ATTC	++
ливаген	KEDA	TCCT	+++
кортаген	AEDP	AACC	++
кардиоген	AEDR	AGTC	+++
тестаген	KEDG	CAAC	++

+ слабый ($dH = -3$ ккал/моль); ++ значительный ($dH = -4,0-4,5$ ккал/моль); +++ сильный ($dH = -5-6$ ккал/моль).

Для некоторых пептидов их участки связывания одинаковы. Например, вилон и кристаген связываются с AGAT. Оба пептида являются иммуномодуляторами. Они образуют водородные связи с N-7 и N-6 атомами аденина и с фосфатами остова ДНК. Однако

кристаллоген образует только одну водородную связь с атомом N-4 цитозина. Поэтому энергия образования комплекса кристаллаген- AGAT ниже, чем у комплекса вилон—AGAT.

Пептиды панкраген и карталакс связываются с последовательностью АССТ (рис. 9). Площадь контакта с панкрагеном больше, чем с карталаксом, потому что первый имеет громоздкие боковые цепи лизина и триптофана. Таким образом, панкраген может полностью заполнить большую бороздку ДНК, предотвращая связывание других молекул с тем же участком. Связь панкрагена с последовательностью АССТ в три раза сильнее, чем связь карталакса (табл. 8). Оба пептида взаимодействуют с атомами N-4 и N-6 цитозина. Однако панкраген также взаимодействует и с N-7 аденина и образует сеть водородных и ионно-ионных связей с фосфатами остова ДНК. Хотя оба пептида связываются с одними и теми же участками, их эффекты могут быть различными. В случае с карталаксом его количество должно быть в три раза больше, чем у панкрагена, чтобы сделать эффекты обоих пептидов одинаковыми.

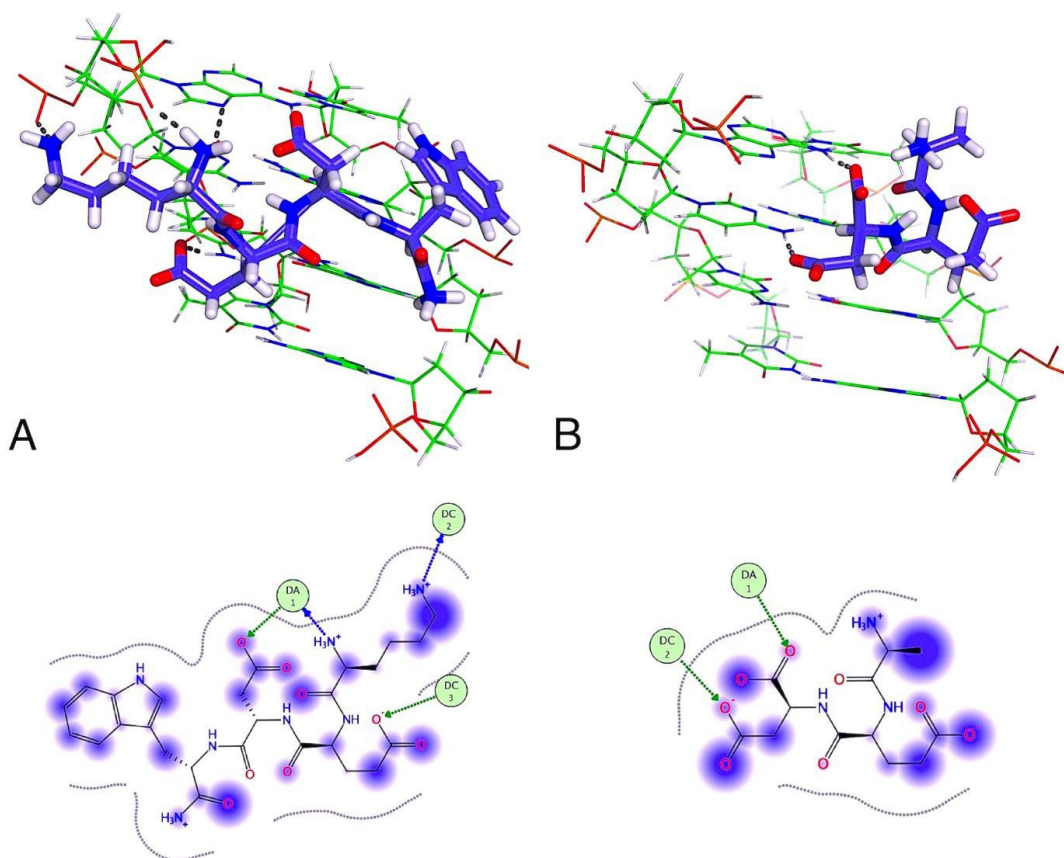


Рис. 9. Взаимодействие пептида с последовательностью АССТ в большой бороздке ДНК. А — панкраген; В — карталакс. Верхние цифры — 3D-модели линий и палочек. На нижних рисунках показаны соответствующие лиганд-рецепторные взаимодействия и направления переноса протонов. Нуклеотиды изображены в виде кругов: DA — аденозинмонофосфат; DC — цитозин монофосфат.

Пептиды бронхоген и оваген связываются с последовательностью СТСС ДНК. Энергии образования комплексов одинаковы для обоих пептидов (табл. 8). Поскольку они несут тяжелые отрицательные заряды, они не взаимодействуют с фосфатами остова ДНК. Их механизмы связывания схожи.

В целом молекулярный докинг оказался мощным методом поиска мишеней пептидов, имеющих различные аминокислотные последовательности. С помощью этого метода были определены селективные участки связывания для каждого из исследуемых пептидов,

рассчитаны энергии комплексообразования, определены донорно-акцепторные, ионно-ионные и катионно-пи межмолекулярные взаимодействия и ориентации пептидов на участках их связывания.

Резюме

Предполагаемой мишенью для пептидов, описанных выше, является ДНК. Механизмы взаимодействий пептидов и ДНК зависят от аминокислотных последовательностей пептидов. Некоторые из них связываются в качестве акцепторов протонов только с азотистыми основаниями ДНК. Другие, которые действуют как доноры протонов, связываются как с азотистыми основаниями, так и с фосфатами остова ДНК. Такие пептиды содержат положительно заряженные боковые цепи и взаимодействуют с ДНК сильнее, чем другие пептиды. В эту группу входят панкragen (KEDW), пинеалон (EDR), ливаген (KEDA), и кардиоген (AEDR). Энергия образования комплекса с ДНК ниже в случае других пептидов. Можно предположить, что они действуют в силу некоторых других механизмов, таких как связывание с регуляторными белками или гистонами.

Дальнейшее развитие использованных нами методов позволит найти среди короткоцепочечных пептидов, в частности, новые активаторы экспрессии генов, обладающие заранее определенными эффектами.

Литература

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science. 2002.
2. Allinger NL, Yuh YH, Lii JH. Molecular mechanics. The MM3 force field for hydrocarbons. *J Am Chem Soc*. 1989;111(23):8551–66.
3. Anisimov SV, Bokheler KR, Khavinson VKh, Anisimov VN. Elucidation of the effect of brain cortex tetrapeptide Cortagen on gene expression in mouse heart by microarray. *Neuro Endocrinol Lett*. 2004;25(1/2):87-93.
4. Anisimov VN, Khavinson VKh. Peptide bioregulation of aging: results and prospects. *Biogerontology*. 2010;11:139–49.
5. Bailly C, Chaires JB. Sequence-specific DNA minor groove binders. Design and synthesis of netropsin and distamycin analogues. *Bioconjug Chem*. 1998;9(5):513–38.
6. Barbi M, Place C, Popkov V, Salerno M. A model of sequence-dependent protein diffusion along DNA. *J Biol Phys*. 2004;30(3):203–26.
7. Cai Y-H, Huang H. Advances in the study of protein-DNA interaction. *Amino Acids*. 2012;43(3):1141–6.
8. Coll M, Frederick CA, Wang AH, Rich A. A bifurcated hydrogen-bonded conformation in the d(A.T) base pairs of the DNA dodecamer d(CGCAAATTTGCG) and its complex with distamycin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987;84(23):8385–9.
9. Dmitrieva VG, Dergunova LV, Povarova OV, Skvortsova VI, Limborskaya SA, Myasoedov NF. The effect of semax and the C-terminal peptide PGP on expression of growth factor genes and receptors in rats under conditions of experimental cerebral ischemia. *Dokl Biochem Biophys*. 2008;422:261–4.
10. Fedoreyeva LI, Kireev II, Khavinson VKh, Vanyushin BF. Penetration of short fluorescence labeled peptides into the nucleus in HeLa cells and in vitro specific interaction of the peptides with deoxyribooligonucleotides and DNA. *Biochem Moscow*. 2011;76(11):1210–9.

11. Fedoreyeva LI, Smirnova TA, Vanyushin BF, Sciences A. Interaction of short peptides with FITC-labeled wheat histones and their complexes with deoxyribooligonucleotides. 2013;78(2):166-75.
12. Gasteiger J, Rudolph C, Sadowski J. Automatic generation of 3D-atomic coordinates for organic molecules. *Tetrahedron Comput Methodol.* 1990;3(6):537-47.
13. Ghose AK, Crippen GM, Revankar GR, McKernan PA, Smee DF, Robins RK. Analysis of the in vitro antiviral activity of certain ribonucleosides against parainfluenza virus using a novel computer aided receptor modeling procedure. *J Med Chem.* 1989;32(4):746-56.
14. Ghose AK, Jaeger EP, Kowalczyk PJ, Peterson ML, Treasurywala AM. Conformational searching methods for small molecules. I. Study of the sybyl search method. *J Comput Chem.* 1993;14(9):1050-65.
15. Gilson MK, Sharp KA, Honig BH. Calculating the electrostatic potential of molecules in solution: Method and error assessment. *J Comput Chem.* 1988;9(4):327-35.
16. Halford SE, Marko JF. How do site-specific DNA-binding proteins find their targets? *Nucleic Acids Res.* 2004;32(10):3040-52.
17. Hobza P, Nachtigallová D, Havlas Z, Maloň P, Šponar J. Interaction of Lysine-Alanine-Alanine tripeptide with a fragment of DNA: An empirical potential study. *J Comput Chem.* 1991;12(1):9-16.
18. Johnson NP, Lindstrom J, Baase WA, von Hippel PH. Double-stranded DNA templates can induce alpha-helical conformation in peptides containing lysine and alanine: functional implications for leucine zipper and helix-loop-helix transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(11):4840-4.
19. Jones JE. On the determination of molecular fields. I. From the variation of the viscosity of a gas with temperature. *Proc R Soc A Math Phys Eng Sci.* 1994;106(738):441-62.
20. Khavinson VKh. Peptides and ageing. *Neuro Endocrinol Lett.* 2002;23(Suppl. special issue).
21. Khavinson VKh. Peptides, genome, aging. *Adv Gerontol.* 2014;4(4):337-45.
22. Khavinson V, Bondarev I, Butyugov A. Epitalon peptide induces telomerase activity and telomere elongation in human somatic cells. *Bull Exp Biol Med.* 2003;135(6):590-2.
23. Khavinson VKh, Fedoreeva LI, Vanyushin BF. Short peptides modulate the effect of endonucleases of wheat seedling. *Dokl Biochem Biophys.* 2011;437(1):64-7.
24. Khavinson VKh, Lezhava TA, Monaselidze JR, Jokhadze TA, Dvalis NA, Bablshvili NK, Trofimova SV. Peptide Epitalon activates chromatin at the old age. *Neuro Endocrinol Lett.* 2003;24(5):329-33.
25. Khavinson VKh, Linkova NS, Polyakova VO, Kheifets OV, Tarnovskaya SI, Kvetnoy IM. Peptide tissue-specifically stimulate cell differentiation during their aging. *Cell Technol Biol Med.* 2012;1(5):148-51.
26. Khavinson VKh, Malinin VV. Gerontological aspects of genome peptide regulation. Basel (Switzerland), Karger AG, 2005.
27. Khavinson VKh, Malinin VV, Vanyushin BF. Role of peptides in epigenetic regulation of gene activities in ontogeny. *Bull Exp Biol Med.* 2012;152(4):470-4.
28. Khavinson VKh, Sevostyanova NN, Durnova AO, Linkova NS, Tarnovskaya SI, Dudkov AV, Kvetnaia TV. Tetrapeptide stimulates functional activity of pancreatic cells in aging. *Adv Gerontol.* 55

2013;3(3):220–4.

29. Khavinson VKh, Shataeva LK, Chernova AA. Effect of regulatory peptides on gene transcription. *Bull Exp Biol Med.* 2003;136(3):288–90.
30. Khavinson V, Shataeva L, Chernova A. DNA double-helix binds regulatory peptides similarly to transcription factors. *Neuro Endocrinol Lett.* 2005;26(3):237-41.
31. Khavinson VKh, Solovyov AYu, Shataeva LK. Molecular mechanism of interaction between oligopeptides and double-stranded DNA. *Bull Exp Biol Med.* 2006;141(4):457-61.
32. Khavinson VKh, Solovyov AYu, Shataeva LK. Melting of DNA double strand after binding to geroprotective tetrapeptide. *Bull Exp Biol Med.* 2008;146(5):624-6.
33. Khavinson VKh, Solov'ev AY, Tarnovskaya SI, Lin'kova NS. Mechanism of biological activity of short peptides: Cell penetration and epigenetic regulation of gene expression. *Biol Bull Rev.* 2013;3(6):451-5.
34. Khavinson VKh, Solov'ev AYu, Zhilinskii DV, Shataeva LK, Vanyushin BF. Epigenetic aspects of peptide-mediated regulation of aging. *Adv Gerontol.* 2012;2(4):277–86.
35. Khavinson VKh, Tarnovskaya SI, Linkova NS, Pronyaeva VE, Shataeva LK, Yakutseni PP. Short cell-penetrating peptides: a model of interactions with gene promoter sites. *Bull Exp Biol Med.* 2013;154(3):403-10.
36. Kopka ML, Yoon C, Goodsell D, Pjura P, Dickerson RE. The molecular origin of DNA-drug specificity in netropsin and distamycin. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1985;82:1376–80.
37. Lezhava T, Khavinson V, Monaselidze J, Jokhadze T, Dvalishvili N, Bablishvili N, Barbakadze S. Bioregulator Vilon-induced reactivation of chromatin in cultured lymphocytes from old people. *Biogerontology.* 2004;5:73–9.
38. Lu Z, Cheng Z, Zhao Y, Volchenboum SL. Bioinformatic analysis and post-translational modification crosstalk prediction of lysine acetylation. *PLoS One.* 2011;6(12).
39. Micans P. The new Russian peptide revolution. *Aging Matters.* 2016. (Spec 25 yrs ann edit):6-9.
40. Neidle S, Achari A, Taylor GL, Berman HM, Carrell HL, Glusker JP, Stallings WC. Structure of a dinucleoside phosphate–drug complex as model for nucleic acid–drug interaction. *Nature.* 1977;269(5626):304–7.
41. Samish I, MacDermaid CM, Perez-Aguilar JM, Saven JG. Theoretical and computational protein design. *Annu Rev Phys Chem.* 2011;62:129–49.
42. Sastry M, Patel DJ. Solution structure of the mithramycin dimer-DNA complex. *Biochemistry.* 1993;32(26):6588–604.
43. Saxena A, Wong D, Diraviyam K, Sept D. The basic concepts of molecular modeling. *Methods Enzymol.* 2009;467:307–34.
44. Scheraga HA. Theoretical and experimental studies of conformations of polypeptides. *Chem Rev.* 1971;71(2):195–217.
45. Schlick T, Olson WK. Supercoiled DNA energetics and dynamics by computer simulation. *J Mol Biol.* 1992;223(4):1089-119.
46. Seeman NC, Rosenberg JM, Rich A. Sequence-specific recognition of double helical nucleic acids by proteins. *Science.* 1976;73(3):804–8.
47. Slutsky M, Mirny LA. Kinetics of protein-DNA interaction: facilitated target location in

sequence-dependent potential. *Biophys J.* 2004;87(6):4021–35.

48. Still WC, Tempczyk A, Hawley RC, Hendrickson T. Semianalytical treatment of solvation for molecular mechanics and dynamics. *J Am Chem Soc. Amer Chem Soc.* 1990;112(16):6127–9.

49. Vega MC, Saez IG. Three-dimensional crystal structure of the A-tract DNA dodecamer d(CGCAAATTTGCG) complexed with the minor-groove-binding drug Hoechst 33258. *Biologia (Bratisl).* 1994;726:721–6.

50. Watson JD, Crick FHC. Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature.* 1953;171:738–40.

51. Wojciechowski M, Lesyng B. Generalized born model: analysis, refinement, and applications to proteins. *J Phys Chem B. Amer Chem Soc.* 2004;108(47):18368–76.

Глава 4. ПЕПТИДЫ КАК ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

4.1. Эпигенетический подход к проблеме старения

В последние годы исследователи все чаще признают важность факторов, способных влиять на экспрессию генов, но не связанных непосредственно с последовательностями ДНК. Это признание согласуется с биологической дисциплиной, известной как эпигенетика, которая занимается наследуемыми и потенциально обратимыми изменениями в экспрессии генов, вызванными модификациями гистонов и/или метилированием ДНК. У промоторов генов образуются различные комбинации транскрипционных факторов, обеспечивающих специфичность экспрессии генов. Транскрипты генов могут быть нацелены на сотни микро-РНК, объединенных с другими белками и РНК, которые участвуют в посттранскрипционной регуляции экспрессии генов [15]. Только около половины составляющих человеческого хромосом — это ДНК. Остальная часть состоит из белков, несущих эпигенетические метки, которые определяют изменения в активности и экспрессии генов [13, 14].

Можно влиять на старение, изменяя экспрессию генов с модуляторами транскрипции, чтобы компенсировать возрастные генетические изменения [11, 21]. Например, короткоцепочечные пептиды Хавинсона могут проникать в ядра клеток и изменять экспрессию генов и синтез белка [17, 38]. Общая последовательность событий, вызванных короткоцепочечными пептидами, выглядит следующим образом [55]:

- а) комплементарное взаимодействие между короткоцепочечным пептидом и ДНК;
- б) деконденсация хроматина;
- в) изменения в конформации и экспрессии генов;
- г) синтез тканеспецифических белков;
- д) пролиферация и дифференцировка клеток;
- е) регуляция биохимических и физиологических процессов.

Молекулярные механизмы взаимодействия короткоцепочечных пептидов с ДНК подробно описаны в гл. 3.

Короткоцепочечные пептиды дифференцированно модулируют расщепление ДНК эндонуклеазами, и этот эффект опосредуется гистонами. Пептиды находят места в хроматине, где они могут взаимодействовать с ДНК, причем их доступность определяется в основном гистонами. Влияние пептидов на активность эндонуклеаз может быть определено дифференциальной специфичностью связывания пептидов с ДНК, а также специфичностью самих ферментов [18, 37].

Старение изменяет экспрессию генов, кодирующих регуляторные пептиды. Возникающие в результате этого регуляторные дисбалансы могут быть устранены с

помощью пептидных биорегуляторов. Они улучшают энергоснабжение тканей, снижают генерацию активных форм кислорода и улучшают возрастные изменения иммунных, эндокринных и других функций [39].

Старение связано с повышением экспрессии генов, продукты которых участвуют в воспалении. В то же время снижается экспрессия генов, участвующих в регуляции клеточной энергетики, дифференцировке и пролиферации. Воспаление вносит значительный вклад в патогенез возрастных нарушений. Восприимчивость к воспалению является результатом иммунного дисбаланса, в частности нарушения функций Т-клеток. В целом это приводит к снижению способности живых организмов противостоять многим инфекциям и злокачественным опухолям, заболеваемость которыми значительно возрастает с возрастом. Еще одним фактором повышенной онкологической заболеваемости является нарушенный контроль пролиферации и дифференцировки клеток, что не только способствует развитию рака, но и нарушает гомеостаз, регенерацию тканей и их функциональную активность. Последние подвергаются риску также из-за нарушения механизмов выработки энергии митохондриями. Кроме того, эти нарушения связаны с увеличением выработки активных форм кислорода, которые повреждают ткани и способствуют развитию рака, атеросклероза и возрастных неврологических расстройств. Наиболее важными среди изменений клеточной дифференцировки являются те, которые происходят в нейроэндокринных органах, влияющих на многочисленные физиологические функции. Вышеизложенное делает обоснованным изучение молекулярно-генетических механизмов действия геропротекторных пептидов [8, 17, 21].

Взаимодействие короткоцепочечных пептидов Хавинсона с ДНК носит эпигенетический характер [39, 44]. Пептидные биорегуляторы участвуют в тканеспецифической регуляции экспрессии генов и синтеза белка. Их действие на клеточном уровне проявляется в снижении темпов накопления патологических изменений, таких как повреждения ДНК, мутации, злокачественная трансформация и др., а также усиливается активность репаративных процессов, которые восстанавливают клеточный гомеостаз [29].

Вилон (KE) и эпиталон (AEDG) стимулируют экспрессию генов, кодирующих компоненты дыхательной цепи митохондрий. Эти пептиды, а также кортаген (AEDP) вызывают более чем двукратное повышение уровней митохондриальных генов, кодирующих 16S-субъединицу рибосом, NADH-дегидрогеназу-1, цитохром С-оксидазу 1, NADH-дегидрогеназу-4, NADH-дегидрогеназу-5 и цитохром В [37, 39].

Среди генов, активность которых изменяется при введении пептидов организмам, есть те, которые отвечают за структуру и подвижность клеток, системы защиты клеток, восприятие и трансдукцию сигналов. Не менее важным является влияние пептидов на цитокины, такие как IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-17A, TNF α и INF- γ [22, 42, 53], которые определяют активность как клеточной, так и гуморальной ветвей приобретенного иммунитета.

В отличие от генетических мутаций, эпигенетические изменения потенциально обратимы. Это дает основания полагать, что пептидные биорегуляторы, обладающие эпигенетической активностью, могут способствовать нормализации функций генов, нарушенных вследствие нарушения метилирования.

Пептидные препараты, полученные из тканей и органов (см. гл. 2) способны при введении экспериментальным животным стимулировать синтез белка в органах их происхождения тканеспецифическим способом [22].

Тканеспецифические эффекты проявляются не только пептидными препаратами, полученными из тканей молодых животных, но и некоторыми короткоцепочечными (ди-, три- или тетра-) пептидами, выделенными из препаратов или синтезированными искусственно, в том числе короткоцепочечными пептидами Хавинсона. Такие короткоцепочечные пептиды обладают сродством к органам и тканям, где они накапливаются и проявляют самую высокую биологическую активность.

Короткоцепочечные пептиды Хавинсона индуцируют синтез белка в клетках органов, которые были источниками пептидных препаратов и аминокислотные композиции которых использовались при конструировании соответствующих пептидов. Например, панкреаген (KEWD) индуцирует экспрессию факторов дифференцировки CXCL12, Ноха3 и WEGC в клетках поджелудочной железы, бронхоген (AEDL) делает это в бронхиальном эпителии, а везуген (KED) — в фибробластах и т. д. Такие эффекты наиболее выражены в "старых" клеточных культурах, что позволяет предположить, что они могут быть вовлечены в геропротекторную активность пептидов [19, 39]. Эпиталон и вилон производят четкие тканеспецифические эффекты на пинеальную железу и вилочковую железу соответственно.

Было показано, что панкреаген увеличивает экспрессию металлопротеиназ (MMP2, MMP9), серотонина, гликопротеина CD79a, антиапоптотического белка Mcl-1 и маркеров пролиферации PCNA и Ki67. Панкреаген ингибирует экспрессию проапоптотического белка p53 в "старых" культурах клеток поджелудочной железы [36].

Бронхоген регулирует синтез белков Ki67, Mcl-1, p53, CD79 и NOS-3 в культурах клеток бронхиального эпителия человека в разных пассажах. Это может способствовать усилению клеточного обновления и увеличению функциональной активности бронхиального эпителия за счет бронхогена [19].

Везуген в культуре кортикальных тимоцитов человека стимулировал дифференцировку клеток в сторону регуляторных Т-клеток, повышал их пролиферативную активность и снижал апоптоз. Везуген стимулировал пролиферацию (оцениваемую по экспрессии Ki67) и антиапоптотическую (Mcl-1) активность зрелых регуляторных Т-клеток. Он усиливал экспрессию маркера миелоидных клеток CD14 и антигена В-лимфоцитов CD19 в костном мозге [32, 54].

Добавление эпиталона к культуре пинеалоцитов стимулировало экспрессию арилалкиламин-N-ацетилтрансферазы (AANAT) и транскрипционного фактора pCREB, участвующего в синтезе мелатонина из серотонина. Содержание мелатонина в питательной среде повышалось [4 - 6, 9, 10, 25]. Было показано, что эпиталон и вилон ингибируют запрограммированную гибель лимфоцитов селезенки у крыс [23].

Короткоцепочечные пептиды Хавинсона (ди-, три- и тетрапептиды) проявляли выраженную тканеспецифическую активность в клеточных культурах как молодых, так и старых экспериментальных животных (рис.10).

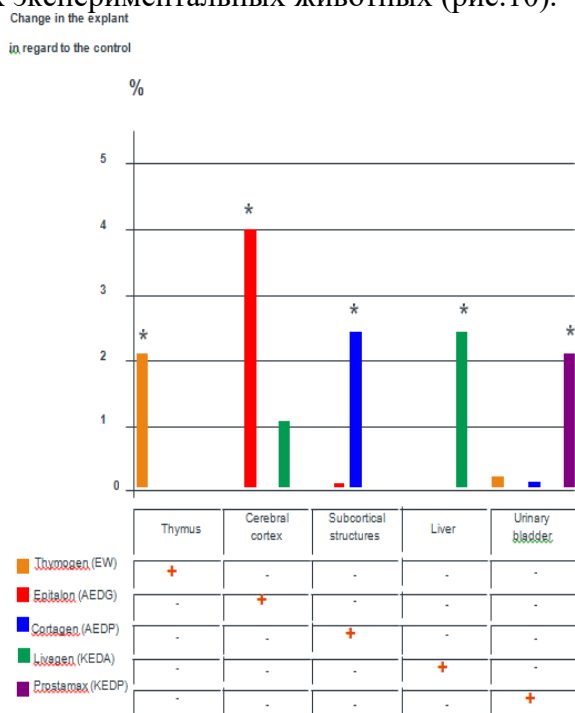


Рис. 10. Тканеспецифические эффекты пептидов Хавинсона.

* $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

+Статистически значимый эффект.

Такие тканеспецифические эффекты были обнаружены у животных всех возрастов, начиная с внутриутробных периодов жизни. Например, добавление вилона или эпیتالона к культурам эмбриональных клеток сетчатки активировало экспрессию белков *Vrn3*, *Rax6*, *Prox1* и *Vsx1*. Эти пептиды стимулируют дифференцировку нейронов и клеток пигментного эпителия сетчатки и поэтому могут рассматриваться как потенциальные ретинопротекторные препараты для лечения возрастных дегенеративных изменений сетчатки [33]. Добавление короткоцепочечного пептида к плюрипотентным клеткам эктодермы ранней гастрюлы лягушки *Xenopus laevis* привело к появлению различных тканей [28].

Показано, что введение эпیتالона и вилона трансгенным мышам подавляет в 2,0 — 3,6 раза, соответственно, экспрессию гена *HER-2/neu*, который, как известно, связан с повышением риска развития рака молочной железы у человека, и значительно уменьшает размер опухоли [7].

Промоторные области генов, кодирующих *IL-2*, *IL-5*, *IL-6*, *IL-17A*, *TNF α* и *IFN γ* , содержат участки связывания вилона, представленные последовательностями *GCAG* и *CGTC* [45].

Кардиоген (AEDR) усиливал экспрессию белков цито- и кариоскелета в культивируемых эмбриональных фибробластах. Этот пептид увеличивал экспрессию цитоскелетных белков (актина, тубулина и виментина) в 2-5 раз, а ядерных белков (ламина А, ламина С) — в 2-3 раза. Молекулярный механизм действия этого тетрапептида основан на его способности активировать синтез белков цито- и кариоскелета, что усиливает пролиферацию клеток и снижает апоптоз [27].

4.2. Эпигенитическое действие короткоцепочечных пептидов на органы и ткани

Многочисленные исследования показали, что гены являются мишенями для ди-, три- и терапевтидов [17, 24, 29, 37, 39]. Это позволяет дать таким пептидам название цитогены. Некоторые эффекты цитогенов, конструкция которых основана на исследованиях пептидных препаратов, полученных из тканей организма, ограничены соответствующими тканями [39].

Сердце

Среди 15247 генов, экспрессия которых в сердце мышей была изучена с помощью библиотеки кДНК, предоставленной Национальным институтом старения (National Institute of Aging) США, 180 были либо повышены, либо понижены вилонем, 242 — эпیتالонем и 144 — обоими пептидами (рис. 11) [1, 3].

Было обнаружено, что эпیتالон, вилон и тимоген влияют на экспрессию ядерных и митохондриальных генов в здоровых сердцах взрослых мышей. От 1,25 до 1,74% всех изученных генов изменяли свою экспрессию под действием какого-либо из этих пептидов. Прирост составил до 6,61 раза по сравнению с контролем, а снижение — в пределах 3,06 раза. Среди генов, затронутых пептидами, были и те, которые участвуют в метаболической регуляции, транскрипции генов и пролиферации клеток [29].

.....рисунок!.....

Рис. 11. Влияние вилона (KE) и эпиталона (AEDG) на экспрессию генов в сердце мышей. Исследование было проведено в сотрудничестве с Национальным институтом старения, Балтимор, США.

Мозг

Транскриптомные исследования проводились с образцами мозга мышей, получавших эпиталон. Среди 16 897 генов, входящих в состав библиотеки кДНК, использованной в исследовании, 53 показали значительные изменения в их экспрессии под действием эпиталона, включая 22 случая индуцированной экспрессии. Известно, что гены, на которые влияет эпиталон, участвуют в клеточном цикле, апоптозе, синтезе нуклеиновых кислот, их переработке и транспорте, а также активации хроматина [1, 3, 31].

После однократного интраназального введения вилона крысам было обнаружено увеличение мРНК IL-2 в гипоталамусе с использованием метода гибридизации заблокированных аминокислот *in situ*. Это открытие является доказательством эпигенетического механизма действия вилона [16].

Через 2 ч после интраназального введения вилона количество положительных клеток IL-2 уменьшилось в гипоталамических структурах крыс, которые не были адаптированы к умеренному стрессу, связанному с передачей и помещением в клетки во время эксперимента. У крыс, которые были приспособлены к обращению, такой реакции на вилон не наблюдалось.

Однократное интраназальное введение кортагена (AEDP, 10 мкл раствора 10 нг/мл в каждую ноздрю) было связано с заметным повышением уровня мРНК IL-2 в гипоталамических ядрах LHA, DMH, и VMH [16].

Было обнаружено, что кортаген ускоряет регенерацию поврежденных нейронов и усиливает проводимость нервных импульсов в регенерирующих афферентных нервных волокнах [58].

Инъекции эпиталона и кортагена крысам снижали содержание продуктов ПОЛ и снижали окислительную модификацию белков, что сопровождалось подавлением антиоксидантной активности в коре головного мозга крыс [43].

Сетчатка глаза

Было обнаружено, что эпиталон стимулирует рост эксплантов сетчатки животных и запускает пролиферацию клеток в культурах пигментированного эпителия [35, 41].

У крыс Кэмпбелла, имеющих наследственную дистрофию пигментного эпителия, парабульбарное введение эпиталона (по 0,1 мкг в каждый глаз) проводили ежедневно с рождения и до 72 дней жизни. В период с 17 по 35-е сутки общая изоэлектрическая активность, определяемая методом электроретинографии, повышалась до уровней, которые были в 7 раз выше, чем у контрольных крыс. У контрольных крыс на 43-й день не было зарегистрировано активности ЭРГ, тогда как у крыс, получавших эпиталон, она могла быть зарегистрирована до 62-го дня после рождения. Эпиталон способствовал сохранению морфологической структуры сетчатки глаза [34, 35]. Вероятно, этот эффект был возможен благодаря способности эпиталона связываться с PIRE или другими участками ДНК или с факторами транскрипции (см. гл. 3).

Добавление эпиталона к плюрипотентным клеткам эктодермы ранней гаструлы лягушки *Xenopus laevis* привело к появлению клеток ретинального и пигментного эпителия [28, 30].

Эндокринная система

У гипофизэктомированных цыплят в возрасте 1, 21 или 40 дней повышалась свертываемость крови, ингибировался фибринолиз, снижалось количество лейкоцитов (в том числе лимфоцитов) в крови, снижалось количество антителообразующих клеток и цитотоксическая активность лейкоцитов в селезенке, снижались уровни тиреотропина, три- и тетраiodтиронинов в крови. Одновременно с перечисленными изменениями развились дегенеративные изменения в тимусе, бурсе и щитовидной железе. Эти реакции на гипотизэктомия были менее выражены у цыплят в возрасте 1 года и у старых (5 лет). Введение эпиталона (0,1 мг/кг массы тела) гипофизэктомированным цыплятам в течение 40 дней, начиная с 5-го дня после операции, улучшало эти показатели независимо от возраста. Поведение получавших эпиталон гипофизэктомированных цыплят мало чем отличалось от поведения ложно оперированных цыплят того же возраста [46-48].

Шишковидная железа

Лимфоидный компонент шишковидной железы в органотипических культурах представлен преимущественно недифференцированными CD5+ лимфоцитами. Вилон стимулировал дифференцировку этих предшественников в Т-хелперы, цитотоксические Т-лимфоциты и В-клетки. Эпиталон стимулировал дифференцировку клеток-предшественников в органотипической культуре лимфоидного компонента шишковидной железы в сторону В-клеток [51].

Легкие: бронхиальный эпителий

Установлено, что бронхоген регулирует экспрессию белков Ki67, Mcl-1, p53, CD79, NOS-3 в культурах клеток бронхиального эпителия человека в различных пассажах и усиливает обновление клеток и функциональную активность в бронхиальном эпителии. В клеточных культурах при их третьем пассаже ("молодая"), седьмом пассаже ("зрелая") и четырнадцатом пассаже ("старая") бронхоген увеличивался в 1,55, 2,44 и 3,42 раза, соответственно, в тех областях, где обнаруживалась экспрессия Ki67 (табл. 9). Площади экспрессии Mcl-1 увеличивались бронхогеном в 1,41 и 1,89 раза в "зрелой" и "старой" культурах соответственно. Апоптоз, оцениваемый по экспрессии белка p53, снижался бронхогеном на 38, 22 и 32% в "молодых", "зрелых" и "старых" культурах бронхиальных клеток соответственно [19]. Поскольку экспрессия p53 в контрольных культурах повышается при старении клеток, происходящем в процессе перехода от третьего к четырнадцатому пассажу, способность бронхогена ингибировать апоптоз можно рассматривать как один из механизмов геропротекторной активности пептида.

Способность бронхогена повышать экспрессию трансмембранного гликопротеина CD79 позволяет предположить, что этот пептид способен регулировать местные иммунные реакции. В присутствии бронхогена площадь экспрессии CD79 увеличивалась в "молодой", "зрелой" и "старой" культурах на 18, 85 и 41%, соответственно. Бронхоген снижал экспрессию NOS-3, фермента, который модулирует клеточные реакции в "старых" культурах клеток бронхиального эпителия.

Таблица 9. Влияние бронхогена (AEDL) на площади (% от общей площади), где можно было бы обнаружить экспрессию белковых маркеров функциональной активности культур клеток бронхиального эпителия человека

Маркер	Экспериментальная группа	Пассаж		
		3 ("молодой")	7 ("зрелый")	14 ("старый")
Ki67	контроль	4.21±0.05	4.15±0.07	4.07±0.12
	бронхоген	6.52±0.07*	10.12±0.34*	13.92±0.41*

Mcl-1	контроль	2.63±0.07	2.41±0.06	2.38±0.09
	бронхоген	3,72±0.06*	4.55±0.13*	4.51±0.11*
p53	контроль	4.82±0.09	5,31±0.13	5.96±0.23
	бронхоген	3.01±0.07*	4.14±0.11*	4.07±0.17*
CD79	контроль	0.61±0.05	0.33±0.06	0.54±0.07
	бронхоген	0.72±0.09*	0.61±0.07*	0.76±0.06*
NOS-3	контроль	8.72±0.06	9.04±0.07	9.13±0.08
	бронхоген	8.65±0.09	9.11±0.10	8.31±0.09*

*p<0,05 по сравнению с соответствующим контролем.

Далее было изучено влияние бронхогена на экспрессию генов, участвующих в ранней и поздней дифференцировке клеток бронхиального эпителия, и их функциональную активность. Было обнаружено, что бронхоген активизирует экспрессию этих генов в “молодых” и “зрелых” культурах и не оказывает никакого эффекта в “старых” культурах. В “молодых” культурах экспрессия генов *Nkx2.1* и *SCGB1A1* повышалась соответственно в 1,59 и 2,58 раза под действием бронхогена. В “зрелых” культурах клеток бронхиального эпителия экспрессия всех изученных генов (*Nkx2.1*, *SCGB1A1* и *SCGB3A2*) увеличилась в 1,65, 1,42 и 2,00 раза, соответственно. Таким образом, бронхоген эпигенетически стимулирует ранние стадии дифференцировки клеток бронхиального эпителия. Бронхоген вызывал 10,3-кратное увеличение экспрессии *FoxA2* в “молодых” клеточных культурах, а также 1,50- и 2,17-кратное увеличение экспрессии *FoxA1* и *FoxA2*, соответственно, в зрелых культурах. Примечательно, что продукт гена *FoxA1* регулирует активность секретогранина *SCGB1A1* [40].

Таблица 10. Влияние бронхогена (AEDL) на экспрессию генов, участвующих в дифференцировке клеток и функциональной активности бронхиального эпителия человека

Ген	Экспериментальная группа	Пассаж	
		3 (“молодой”)	7 (“зрелый”)
<i>Nkx2.1</i>	контроль	1,10±0,10	0,82±0,10
	бронхоген	1,75±0,20*	1,35±0,20*
<i>SCGB1A1</i>	контроль	0,60±0,05	0,60±0,10
	бронхоген	1,55±0,10*	0,85±0,10*
<i>SCGB3A2</i>	контроль	1,75±0,20	0,60±0,10
	бронхоген	1,60±0,20	1,20±0,10*
<i>FoxA1</i>	контроль	1,95±0,15	0,90±0,10
	бронхоген	1,90±0,20	1,35±0,10*
<i>FoxA2</i>	контроль	0,15±0,02	0,60±0,10
	бронхоген	1,55±0,10*	1,30±0,10*
<i>MUC4</i>	контроль	2,00±0,20	0,75±0,15
	бронхоген	1,70±0,20	1,65±0,10*
<i>MUC5AC</i>	контроль	1,20±0,10	1,00±0,10
	бронхоген	1,80±0,20*	1,05±0,10
<i>SftpA1</i>	контроль	1,00±0,10	0,90±0,05
	бронхоген	1,65±0,10*	1,50±0,10*

Примечание: *p<0,05 по сравнению с соответствующим контролем. Результаты, которые выражаются в условных единицах, были получены методом количественной

полимеразной цепной реакции. Интеркалатный флуоресцентный краситель SYBR зеленый-1 (QuantiFast SYBR Green PCR Kit, QIAGEN, Германия) и амплификатор CFX96 (Real-Time PCR Detection System, BioRad Laboratories, Inc., США).

Бронхоген активирует экспрессию генов, характеризующихся тем, что снижение их активности коррелирует с развитием различных патологических состояний в легких. В "молодых" культурах клеток экспрессия генов *MUC5AC* и *SftpA1* повышалась соответственно в 1,50 и 1,65 раза под действием бронхогена.

Возможно, бронхоген влияет только на *FoxA1*, и что кажущееся увеличение *SCGB1A1* является вторичным. С другой стороны, нельзя исключать, что бронхоген непосредственно активирует оба гена. Кроме того, поскольку *FoxA2* участвует в дифференцировке клеток и развитии тканей, эпигенетическая регуляция *FoxA2* бронхогеном может нарушать основы онтогенеза. Данные, представленные выше, предполагают, что этот тетрапептид может связываться с линкерными и коровыми гистонами, некоторые из которых взаимодействуют с *FoxA2*.

Изменения в синтезе белка SP-A1 (продукт гена *SftpA1*) коррелируют с дыхательными функциями у больных хроническим бронхитом. Активируя экспрессию генов *MUC4*, *MUC5AC* и *SftpA1*, бронхоген может предотвратить развитие патологических состояний в легких. Было показано, что бронхоген стимулирует экспрессию *MUC4* и *SftpA1* в 2,20 и 1,67 раза, соответственно, в "зрелых" клеточных культурах (см. табл. 10). Эти данные особенно важны, поскольку в раковых тканях было обнаружено снижение экспрессии *MUC4*. Снижение экспрессии *MUC5AC* приводит к недостаточному синтезу муцина и, таким образом, ставит под угрозу защиту легких от инфекций. В культурах бронхиальных клеток человека бронхоген активирует экспрессию генов *Nkx2.1*, *SCGB1A1*, *SCGB3A2*, *FoxA1*, *FoxA2*, которые участвуют в дифференцировке клеток бронхиального эпителия. Пептид также увеличивает экспрессию генов *MUC4*, *MUC5AC* и *SftpA1*, снижение экспрессии которых коррелирует с развитием хронического бронхита [40].

В совокупности вышеизложенное позволяет предположить, что механизмы генной регуляции бронхогена включают сигнальные каскады, и они реализуются через несколько стадий на генетическом, субклеточном и клеточном уровнях.

Легкие: легочные фибробласты

Добавление эпителиона (AEDG) к культурам фибробластов легких человека индуцирует ген теломеразы и активность теломеразы, что связано с увеличением длины теломера в 2,40 раза и увеличением числа удвоений клеток в 1,42 раза. Обработанные эпителионом фибробласты с удлинёнными теломерами были способны к 10 дополнительным делениям. Эпителион способствует увеличению продолжительности жизни диплоидных клеток человека за счет превышения предела Хейфлика [20].

В обработанных эпителионом культурах клеток шишковидной железы молодых и старых экспериментальных животных наблюдалось увеличение синтеза экспрессии белков MMP2 и Ki67 и снижение экспрессии проапоптотического белка p53 [6].

Почки

Пептиды карталакс (AED) и оваген (EDL) не влияли на экспрессию Ki67a в "старых" культурах почечных клеток (рис. 12).

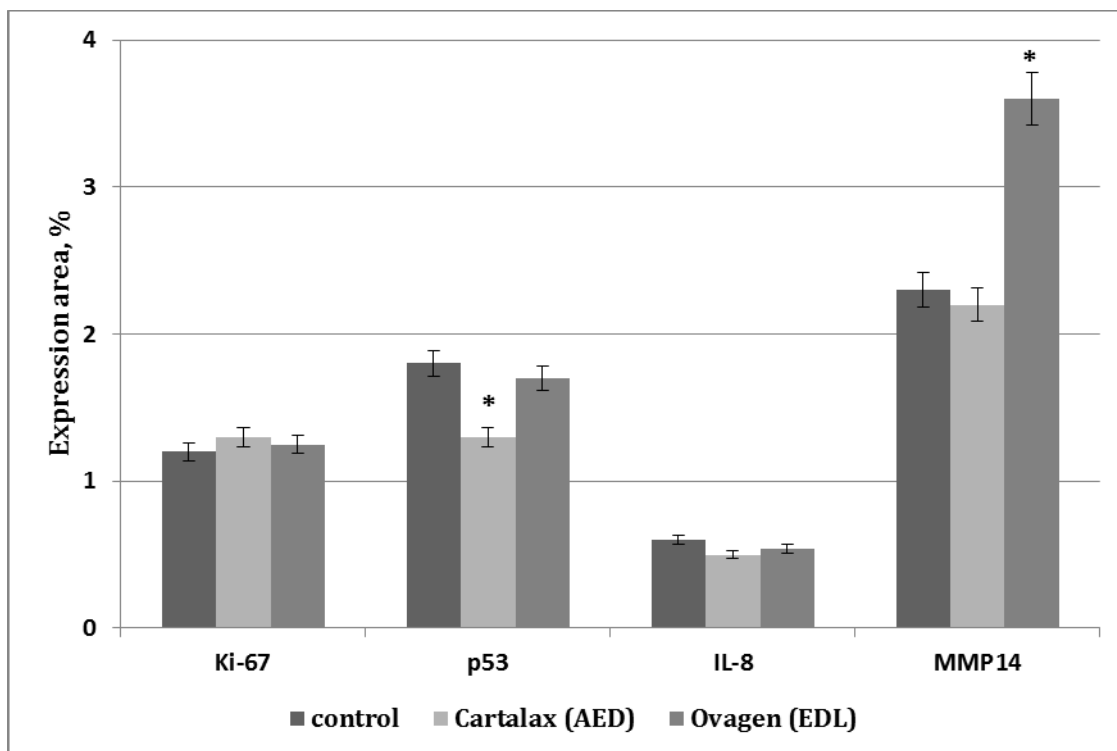


Рис. 12. Влияние карталакса и овагена на экспрессию сигнальных молекул в диссоциированных культурах почечных клеток на 14-м пассаже ("старые" культуры клеток). * $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

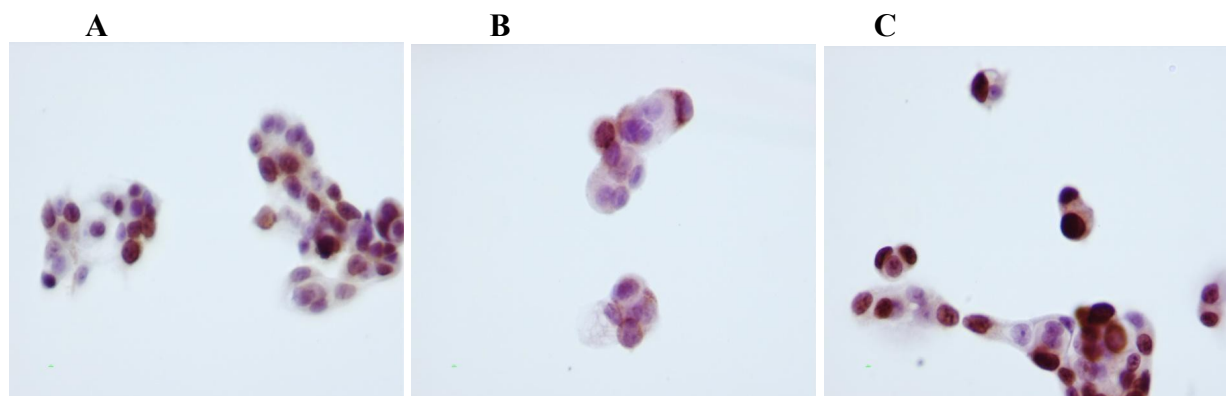


Рис. 13. Влияние короткоцепочечных пептидов на экспрессию p53 в культурах почечных клеток при 14-м пассаже ("старые" культуры клеток). А: Контроль; В: карталакс; СВ: оваген. Иммуноцитохимия, $\times 200$.

Карталакс (AED) снижал экспрессию p53 в "старых" культурах в 1,33 раза (см. рис. 12 и 13). Экспрессия IL-8 не изменялась при добавлении пептидов к культурам. Известно, что изменения экспрессии этого хемокина обычно связаны с выраженными воспалительными реакциями в почках. Поэтому вполне вероятно, что изменения экспрессии IL-8 не могут быть обнаружены в нормальных культурах клеток почечного эпителия. Оваген (EDL) увеличивал в 1,52 раза экспрессию желатиназы ММП14 в "старых" культурах почечных клеток. В то же время карталакс и пептидные экстракты, полученные из почек, не производили такого эффекта.

Карталакс и оваген стимулируют рост органотипических культур почечной ткани у молодых и старых экспериментальных животных. Изучено влияние карталакса и овагена на экспрессию маркеров почечной патологии в стареющих культурах почечных клеток. Оба

пептида влияют на экспрессию сигнальных молекул, синтез которых изменяется в почках при патологических состояниях. Однако молекулярные мишени пептидов различны. Например, эффекты карталакса были однонаправленными и выражались в почти двукратном увеличении пролиферативной активности клеток и 1,5-кратном снижении апоптоза в стареющих культурах клеток почечного эпителия. Для овагена мишенью является желатиназа ММР14. Его экспрессия в почечном эпителии повышается этим пептидом в 1,5 раза. В то же время оваген не влияет на пролиферацию и апоптоз клеток в культурах почечных клеток.

Кожа

Короткоцепочечные пептиды Хавинсона повышают экспрессию каспазы-3 — маркера апоптоза, в “старых” (14 пассажей) культурах фибробластов кожи крыс больше, чем в “молодых” (3 пассажа) культурах. Карталакс снижает скорость апоптоза как в “молодых”, так и в “старых” культурах, а эпиталон делает это в “старых” культурах в меньшей степени, чем в “молодых” [52].

Проведено сравнение влияния эпиталона, вилон, карталакса и везугена на экспрессию маркеров клеточного обновления и ремоделирования внеклеточного матрикса в культурах фибробластов кожи в процессе их старения. Указанные пептиды увеличивали экспрессию Ki67 в “молодых” культурах в 1,14, 1,89, 1,40 и 2,08 раза соответственно (рис. 14) [52].

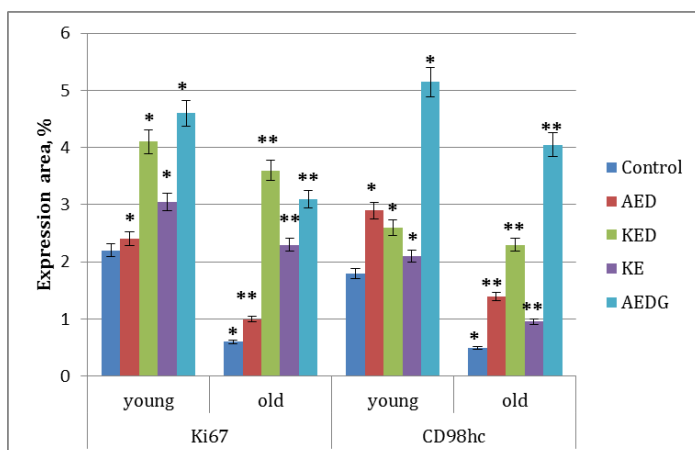


Рис. 14. Влияние короткоцепочечных пептидов на пролиферацию и апоптоз клеток в “молодых”(3 пассажа) и “старых” (14 пассажей) культурах фибробластов кожи крыс. AED — карталакс; KED — везуген; KE — вилон; AEDG — эпиталон.

* $p < 0,05$ по сравнению с контрольными “молодыми” культурами; ** $p < 0,05$ по сравнению с контрольными “старыми” культурами.

Для качественной оценки способности фибробластов кожи ремоделировать внеклеточный матрикс в качестве маркера использовали ММР9. В контрольных “молодых” культурах экспрессия ММР9 была в 4,24 раза ниже, чем в контрольных “старых” культурах. Ни один из исследуемых пептидов (эпиталон, вилон, карталакс и везуген) не влиял на экспрессию ММР9 в “молодых” культурах фибробластов. В “старых” культурах эти пептиды снижали экспрессию ММР9 в 3,43, 2,88, 4,50 и 1,29 раза, соответственно (рис. 15) [52].

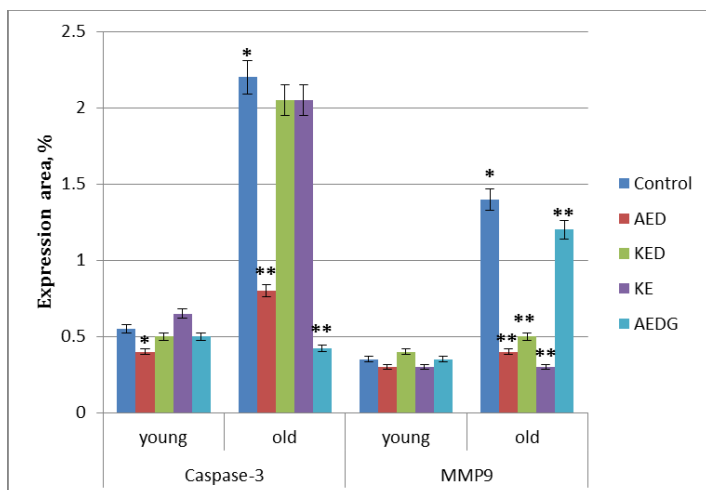
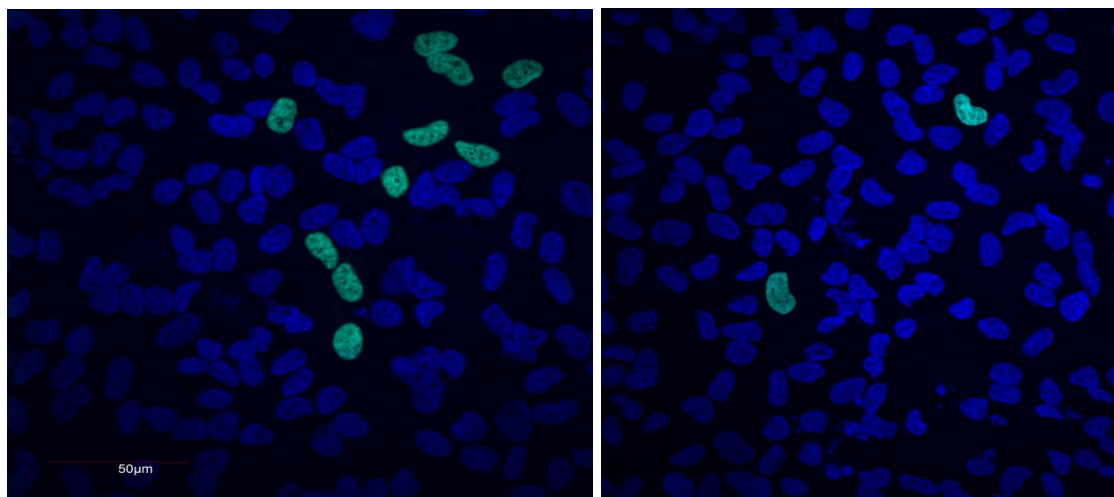


Рис. 15. Влияние пептидов на обновление клеток и ремоделирование внеклеточного матрикса фибробластов кожи крыс в процессе их старения. * $p < 0,05$ по сравнению с контрольными "молодыми" культурами клеток; ** $p < 0,05$ по сравнению с контрольными "старыми" культурами клеток.

Экспрессия CD98hc, маркера функциональной активности клеток кожи, была в 2,92 раза выше в "молодых" культурах, чем в "старых". В присутствии эпиталона, виллона, карталакса и везугена экспрессия CD98hc увеличивалась соответственно в 1,66, 1,49, 1,22 и 2,94 раза в "молодых" культурах и в 2,38, 3,90, 1,62 и 6,75 раза в "старых" культурах [52].

Влияние пептидов на апоптоз в фибробластах кожи изучали с использованием "старых" и "молодых" клеточных культур. Экспрессия каспазы-3 была в 3,8 раза выше в "молодых" культурах, чем в "старых". Карталакс снижал экспрессию каспазы-3 в 1,43 раза в "молодых" культурах, тогда как эпиталон, вилон и везуген не влияли на нее. В "старых" культурах эпиталон и карталакс снижали экспрессию каспазы-3 в 2,52 и 5,05 раза соответственно (рис. 16), тогда как вилон и везуген не оказали на него существенного влияния (см. рис. 13) [52].



А

В

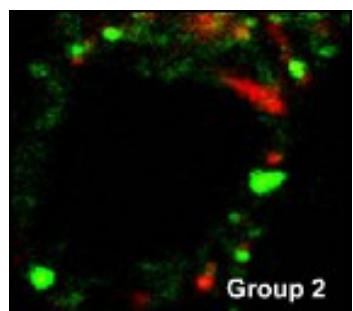
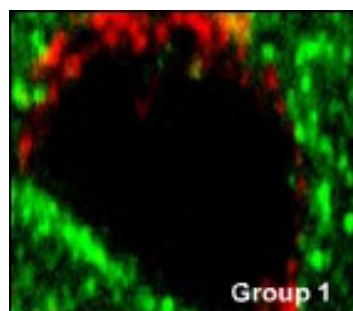
Рис. 16. Иммунофлуоресценция культур фибробластов кожи 14-го пассажа. Конфокальная микроскопия ($\times 200$). Ядра клеток окрашены NucleoFast 33258 (темно-синяя флуоресценция). Светло-голубая флуоресценция — окрашиванием на каспазу-3. А: Контрольные культуры, В: Культуры, обработанные эпиталонои (AEDG).

Наблюдение, что в "старых" культурах фибробластов кожи экспрессия MMP9 выше, чем в "молодых" культурах, согласуется с активацией ремоделирования внеклеточного матрикса и воспалительных процессов с увеличением возраста. Эпиталон, вилон, карталакс и везуген снижали экспрессию MMP9 в "старых", но не в "молодых" культурах.

Иммунная система

Тимус

Тимус, центральный орган иммунной системы, претерпевает инволюцию в процессе старения, как это показано на рис. 17.



Возрастная группа	Оптическая плотность (условные единицы)	Область экспрессии (процент)
1: 6 мес. — 4 года	2,05±0,06	3,36±1,54
2: 65 — 79 лет	0,54±0,02*	1,24±0,06*
3: 80 — 95 лет	0,39±0,01*	0,99±0,03*
*p<0,05 по сравнению с группой 1		

Иммунофлуоресценция в образцах, визуализируемых методом лазерной конфокальной микроскопии, ×400 (красная флуоресценция: родамин G; зеленая флуоресценция: FITC).

Рис. 17. Экспрессия транскрипционных белков PAX 1 в эпителиальных клетках тимуса человека. Исследование проведено в сотрудничестве с Центром исследований Принца Фелипе (Centro de Investigación Príncipe Felipe — CIPF), Валенсия, Испания.

Эпиталон *in vitro* значительно увеличивал сывороточный тимусный фактор в супернатанте стромы тимуса у мышей разного возраста и долю CD⁺ клеток в суспензии костного мозга у старых мышей [49, 50].

Добавление эпиталона в культуральную среду тимоцитов и эпителиальных клеток на вторые сутки после посева подавляло экспрессию аргирофильных белков и образование рибосом и тем самым снижало синтез белка. Эти данные свидетельствуют о том, что транскрипционная активность рибосомных генов и пролиферативная активность клеток были снижены эпиталоном [56].

Добавление вилонна к культивируемым тимоцитам человека и крысы увеличивало экспрессию CD5, маркера дифференцировки лимфоцитов. Вилон индуцировал дифференцировку предшественников Т-клеток в сторону CD4⁺ Т-хелперов [57].

В тимоцитах вилон (KE) стимулирует экспрессию аргирофильных белков в областях ядрышкового организатора. Эти белки отвечают за синтез, сборку и транспорт рибосом в цитоплазму, и поэтому их экспрессия должна усиливать синтез белка. Вилон, вероятно, вмешивается в регуляцию функций ядрышкового организатора и расположенных в нем рибосомных генов [56].

Вилон в дозе от 10 до 100 мкг/мл показал повышенное внутриклеточное содержание Ca^{2+} в тимоцитах и макрофагах, что согласуется с активацией клеток.

Селезенка

Экспрессия маркеров недифференцированных CD5⁺ клеток, В-клеток, Т-киллеров/супрессоров и Т-хелперов была верифицирована иммуногистохимическими методами в тимусах лиц пожилого (55-60 лет) и старческого возрастов (75-90 лет), а также долгоживущих (старше 90 лет). Количество CD5⁺ клеток в тимусе постепенно уменьшается с возрастом. Были обнаружены положительные корреляции между количествами CD5⁺ и дифференцированных Т-клеток. Способность CD5⁺ тимоцитов дифференцироваться в Т-киллеры/супрессорные клетки снижалась с возрастом [26].

После 5 ч инкубации лимфоидных клеток из селезенки мышей в присутствии вилона уровень мРНК IL-2 в клетках повышался. Было высказано предположение, что вилон не только проникает в клетки, но и участвует в регуляции экспрессии генов. Возможно, что вилон проникает в ядра клеток или взаимодействует с трансфакторами, участвующими в активации гена IL-2 в лимфоцитах [29].

Добавление вилона к культивируемым тимоцитам человека и крысы сопровождалось повышением экспрессии маркера дифференцировки лимфоцитов CD5. Вилон индуцировал дифференцировку предшественников Т-клеток в сторону CD4⁺ Т-хелперов [57].

Везуген (КЕД), добавляемый в культуры кортикальных тимоцитов человека, увеличивал их дифференцировку в регуляторные Т-клетки и их пролиферативную активность, а также снижал скорость апоптоза. Кроме того, везуген стимулировал пролиферативную активность, оцениваемую по Ki67, и антиапоптотическую активность, оцениваемую по Mcl-1 в зрелых регуляторных Т-клетках. Также были изучены везугенные эффекты CD34⁺ стволовых клеток костного мозга. Была продемонстрирована способность везугена стимулировать экспрессию маркера В-клеток CD19 в костном мозге.

Резюме

К числу наиболее важных факторов, способствующих старению, относится снижение синтеза белка, что приводит к инволюции основных органов и тканей. Пептидные препараты, полученные из органов молодых животных, способны при длительном их введении в старый организм стимулировать синтез белка и тем самым восстанавливать основные функции органов тканеспецифическим образом.

Эта способность пептидных препаратов, полученных из определенных органов молодых животных, разделяется некоторыми искусственно синтезированными пептидами Хавинсона, короткоцепочечными (ди-, три- и тетра- пептидами), разработанными на основе исследований соответствующих комплексных пептидных препаратов. Добавление таких короткоцепочечных пептидов к плюрипотентным клеткам эктодермы приводит к появлению различных тканей. Эти пептиды способны индуцировать дифференцировку клеток, которая зависит от их структуры. Можно направленно индуцировать дифференцировку плюрипотентных клеток и таким образом использовать этот биологический резерв органов и тканей для продления продолжительности жизни животных и человека до их видоспецифических пределов.

Эндогенные короткоцепочечные пептиды можно рассматривать как эпигенетические факторы, выполняющие естественную регуляцию экспрессии генов. Короткоцепочечные пептиды избирательно связываются с определенными участками ДНК. Они эпигенетически регулируют экспрессию генов, включая онкогены, гены теломеразы, интерлейкинов и фактора транскрипции. Было показано, что короткоцепочечные пептиды увеличивают длину теломера в соматических клетках, усиливают пролиферацию и дифференцировку клеток,

которые все более нарушаются в процессе старения, и ингибируют апоптоз. В целом эти эффекты способствуют долголетию. Экспериментальные животные, получающие такие пептиды во второй половине своей жизни, живут на 20-40% дольше.

В различных органах и тканях в принципе можно добиться целенаправленной индукции клеточной дифференцировки и тем самым активизировать клеточные резервы. Короткоцепочечные пептиды Хавинсона являются материальным средством для увеличения жизненных ресурсов организма и для увеличения средней продолжительности жизни человека до видоспецифического предела продолжительности жизни.

Литература

1. Anisimov SV, Bokheler KR, Khavinson VKh, Anisimov VN. Studies of the effects of Vilon and Epithalon on gene expression in mouse heart using DNA-microarray technology. *Bull Exp Biol Med.* 2002;133(3):293–9.
2. Anisimov SV, Bokheler KR, Khavinson VKh, Anisimov VN. Elucidation of the effect of brain cortex tetrapeptide Cortagen on gene expression in mouse heart by microarray. *Neuro Endocrinol Lett.* 2004;25(1/2):87-93.
3. Anisimov SV, Khavinson VKh, Anisimov VN. Effect of melatonin and tetrapeptide on gene expression in mouse brain. *Bull Exp Biol Med.* 2004;138(5):504-9.
4. Anisimov VN, Arutjunyan, AV, Khavinson, VKh. Effects of pineal peptide preparation Epithalamin on free-radical processes in humans and animals. *Neuro Endocrinol Lett.* 2001; 22(1): 9–18.
5. Anisimov VN, Bondarenko LA, Khavinson VKh. Effect of pineal peptide preparation (Epithalamin) on life span and pineal and serum melatonin level in old rats. *Ann NY Acad Sci.* 1992;673:53-7.
6. Anisimov VN, Khavinson VKh. Pineal peptides as modulators of aging. In: *Aging Interventions and Therapies.* Suresh, IS Rattan, ed.: World Sci, Singapore. 2005:127–46.
7. Anisimov VN, Khavinson VKh, Provinciali M, Alimova IN, Baturin DA, Popovich IG, Zabezhinski MA, Imyanitov EN, Mancini R, Franceschi C. Inhibitory effect of the peptide epithalon on the development of spontaneous mammary tumors in *Her-2/NEU* transgenic mice. *Int J Cancer.* 2002;101:7-10.
8. Anisimov VN, Morozov VG, Khavinson VKh. Increase of the life span and decrease in the tumor incidence in C3H/Sn mice as affected by thymus and epiphysis polypeptide factors. *Dokl Akad Nauk SSSR.* 1982;263(3):742-5.
9. Anisimov VN, Mylnikov SV, Khavinson VKh. Pineal peptide preparation epithalamin increases the lifespan of fruit flies, mice and rats. *Mech Ageing Dev.* 1998;103:123-32.
10. Anisimov VN, Mylnikov SV, Oparina TI, Khavinson VKh. Effect of melatonin and pineal peptide preparation epithalamin on life span and free radical oxidation in *Drosophila melanogaster*. *Mech Ageing Dev.* 1997;97:81-91.
11. Ashapkin VV, Linkova NS, Khavinson VKh, Vanyushin BF. Epigenetic mechanisms of peptidergic regulation of gene expression during aging of human cells. *Biochemistry (Moscow).* 2015;80(3):310-22.
12. Barabanova SV, Artyukhina ZE, Kazakova TB, Khavinson VKh, Malinin VV, Korneva EA. Interleukin-2 concentration in hypothalamic structures of rats receiving peptides during mild stress.

Bull Exp Biol Med. 2006;141(4):390-3

13. Collins AR, Duthie SJ. Epigenetics. Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D, Caparros M-L, eds. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Lab Press, 2007.

14. Collins AR, Duthie SJ, Fillion L, Gedik CM, Vaughan N, Wood SG. Oxidative DNA damage in human cells: the influence of antioxidants and DNA repair. *Biochem Soc Trans.* 1997;25(1):326-31.

15. Hafner M, Landthaler M, Burger L, Khorshid M, Hausser J, Berninger P, Rothballer A, Ascano M Jr, Jungkamp AC, Munschauer M, Ulrich A, Wardle GS, Dewell S, Zavolan M, Tuschl T. Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell.* 2010;141(1):129-41.

16. Kazakova TB, Barabanova SV, Novikova NS, Glushikhina MS, Khavinson VKh, Malinin VV, Korneva EA. Synthesis of IL-2 mRNA in cells of rat hypothalamic structures after injection of short peptides. *Bull Exp Biol Med.* 2005;139(6):718-20.

17. Khavinson VKh. Peptides and ageing. *Neuro Endocrinol Lett.* 2002;23(Suppl. special issue).

18. Khavinson VKh. Peptidergic Regulation of Ageing. *Humanistica*, St Petersburg. 2009.

19. Khavinson VKh. Peptides, genome, aging. *Adv Gerontol.* 2014;4(4):337-45.

20. Khavinson VKh, Bondarev IE, Butyugov AA, Smirnova TD. Peptide promotes overcoming of the division limit in human somatic cell. *Bull Exp Biol Med.* 2004;137(5):503-6.

21. Khavinson VKh, Fedoreeva LI, Vanyushin BF. Short peptides modulate the effect of endonucleases of wheat seedling. *Dokl Biochem Biophys.* 2011;437(1):64-7.

22. Khavinson VKh, Kuznik BI, Ryzhak GA. Peptide bioregulators: the new class of geroprotectors. Communication 1. Results of experimental studies. *Adv Gerontol.* 2012;25(4):696-708.

23. Khavinson VKh, Kvetnoy IM. Peptide bioregulators inhibit apoptosis. *Bull Exp Biol Med.* 2000;130(12):1175-6.

24. Khavinson VKh, Lezhava TA, Monaselidze JG, Dzhokhadze TA, Dvalishvili NA, Bablishvili NK, Ryadnova IY. Effects of Livagen peptide on chromatin activation in lymphocytes from old people. *Bull Exp Biol Med.* 2002;134(4):389-92.

25. Khavinson VKh, Linkova NS, Kvetnoy IM, Kvetnaia TV, Polyakova VO, Korf HW. Molecular cellular mechanisms of peptide regulation of melatonin synthesis in pinealocyte culture. *Bull Exp Biol Med.* 2012; 153(2):255-8.

26. Khavinson VKh, Linkova NS, Polyakova VO, Dudnov AV, Kvetnoy IM. Age-specific dynamics of human thymus immune cell differentiation. *Bull Exp Biol Med.* 2011;151(5):631-3.

27. Khavinson VKh, Lin'kova NS, Polyakova VO, Kvetnoy IM, Benberin VV, D'yakonov MM, Titkov YS. Tetrapeptide H-Ala-Glu-Asp-Arg-OH stimulates expression of cytoskeletal and nuclear matrix proteins. *Bull Exp Biol Med: Cell Technol Biol Med.* 2012;153(4):559-62.

28. Khavinson VKh, Lin'kova NS, Trofimov AV, Polyakova VO, Sevost'yanova NN, Kvetnoy IM. Morphofunctional fundamentals for peptide regulation of aging. *Biol Bull Rev.* 2011;1(4):390-4.

29. Khavinson VKh, Malinin VV. *Gerontological Aspects of Genome Peptide Regulation.* Basel (Switzerland), Karger AG, 2005.

30. Khavinson VKh, Malinin VV, Trofimova SV, Zemchikhina VN. Inductive activity of retinal peptides. *Bull Exp Biol Med.* 2002;134(5):482-4.

31. Khavinson VKh, Morozov VG. Peptides of pineal gland and thymus prolong human life. *Neuro*

Endocrinol Lett. 2003;24(3/4):233-40.

32. Khavinson VKh, Polyakova VO, Linkova NS, Dudkov AV, Kvetnoy IM. Peptides regulate cortical thymocytes differentiation, proliferation, and apoptosis. *J Amino Acids*. 2011;2011:1-5.

33. Khavinson VKh, Pronyaeva VE, Linkova, NS, Trofimova SV. Peptidergic regulation of differentiation of embryonic retinal cells. *Bull Exp Biol Med: Cell Technol Biol Med*. 2013;1:172-5.

34. Khavinson VKh, Razumovskii MI, Trofimova SV, Grigor'yan RA, Chaban TV, Oleinik TL, Razumovskaya AM. Effect of epithalon on age-specific changes in the retina in rats with hereditary pigmentary dystrophy. *Bull Exp Biol Med*. 2002;133(1):87-9.

35. Khavinson V, Razumovsky M, Trofimova S, Grigorian R, Razumovskaya A. Pineal-regulating tetrapeptide epitalon improves eye retina condition in retinitis pigmentosa. *Neuro Endocrinol Lett*. 2002;23(4):365-8.

36. Khavinson VKh, Sevostyanova NN, Durnova AO, Lin'kova NS, Tarnovskaya SI, Dudkov AV, Kvetnaia TV. Tetrapeptide stimulates functional activity of pancreatic cells in aging. *Adv Gerontol*. 2013;3(3):220-4.

37. Khavinson VKh, Shataeva LK, Chernova AA. Effect of regulatory peptides on gene transcription. *Bull Exp Biol Med*. 2003;136(3):288-90.

38. Khavinson VKh, Solov'ev AYu, Tarnovskaya SI, Lin'kova NS. Mechanism of biological activity of short peptides: Cell penetration and epigenetic regulation of gene expression. *Biol Bull Rev*. 2013;3(6):451-5.

39. Khavinson VKh, Solov'ev AIu, Zhilinskii DV, Shataeva LK, Vaniushin BF. Epigenetic aspects of peptide regulation of aging. *Adv Gerontol*. 2012;25(1):11-22.

40. Khavinson VKh, Tendler SM, Vanyushin BF, Kasyanenko NA, Kvetnoy IM, Linkova NS, Ashapkin VV, Polyakova VO, Basharina VS, Bernadotte A. Peptide regulation of gene expression and protein synthesis in bronchial epithelium. *Lung*. 2014;192:781-91.

41. Khavinson VKh, Zemchikhina VN, Trofimova SV, Malinin VV. Effects of peptides on proliferative activity of retinal and pigmented epithelial cells. *Bull Exp Biol Med*. 2003;135(6):597-9.

42. Korneva EA, Rybakina EG, Kokryakov VN, Orlov DS, Shamova OV, Shanin SN. Interleukin 1 and defensins in thermoregulation, stress and immunity. *Ann NY Acad Sci*. 1997;81:465-74.

43. Kozina LS. Effects of bioactive tetrapeptides on free-radical processes. *Bull Exp Biol Med*. 2007;143(6):744-6.

44. Kuznik BI, Lin'kova NS, Khavinson VKh. Heat shock proteins: changes related to aging, development of thrombotic complications, and peptide regulation of the genome. *Adv Gerontol*. 2012;2(3):175-86.

45. Kuznik BI, Lin'kova NS, Tarnovskaia SI, Khavinson VKh. Cytokinis and regulatory peptides: age-related changes, atherosclerosis and trombotic diseases. *Adv Gerontol*. 2013;26(1):38-51.

46. Kuznik BI, Pateyuk AV, Rusaeva NS. Effect of tetrapeptides Lys-Glu-Asp-Gly and Ala-Glu-Asp-Gly on the structure and function of the thyroid gland in neonatally hypophysectomized chickens. *Bull Exp Biol Med*. 2008;145(1):104-7.

47. Kuznik BI, Pateyuk AV, Rusayeva NS, Baranchugova LM, Obydenko VI. Effect of Lys-Glu-Asp-Gly and Ala-Glu-Asp-Gly Peptides of hormonal activity and thyrioid morphology in

- hypophysectomized mature and old birds. *Adv Gerontol.* 2011;24(1):93-8.
48. Kuznik BI, Pateyuk AV, Rusaeva NS, Baranchugova LM, Obydenko VI. Effects of peptides Lys-Glu-Asp-Gly and Ala-Glu-Asp-Gly on hormonal activity and structure of the thyroid gland in hypophysectomized young chickens and old hens. *Bull Exp Biol Med.* 2011;150(4): 495-9.
49. Labunets IF. Antigen-induced changes in the endocrine function of the thymus in CBA mice during aging: role of peptide factors released by the pineal gland. *Bull Exp Biol Med.* 2005;139(6):724-6.
50. Labunets IF, Butenko GM, Khavinson VKh. Effects of bioactive factors of the pineal gland on thymus function and cell composition of the bone marrow and spleen in mice of different age. *Bull Exp Biol Med.* 2004;137(5):510-2.
51. Linkova NS, Khavinson VKh, Chalisova NI, Katanugina AS, Koncevaya EA. Peptidergic stimulation of differentiation of pineal immune cells. *Bull Exp Biol Med.* 2011;152(1):124-7.
52. Lin'kova NS, Drobintseva AO, Orlova OA, Kuznetsova EP, Polyakova VO, Kvetnoy IM, Khavinson VKh. Peptide regulation of skin fibroblast functions during their aging in vitro. *Bull Exp Biol Med.* 2016;161(1):175-8.
53. Lin'kova NS, Kuznik BI, Khavinson VKh. Peptide Ala-Glu-Asp-Gly and interferon gamma: their role in immune response during aging. *Adv Gerontol.* 2012;25(3):478-82.
54. Lin'kova NS, Polyakova VO, Trofimov AV, Kvetnoy IM, Khavinson VKh. Peptidergic regulation of thymocyte differentiation, proliferation, and apoptosis during aging of the thymus. *Bull Exp Biol Med.* 2011;151(2):239-42.
55. Micans P. The new Russian peptide revolution. *Aging Matters.* 2016. (Spec 25 yrs ann edit):6-9.
56. Raikhlina NT, Bukaeva IA, Smirnova EA, Yarilin AA, Sharova NI, Mitneva MM, Khavinson VKh, Polyakova VO, Trofimov AV, Kvetnoy IM. Expression of argyrophilic proteins in the nucleolar organizer regions of human thymocytes and thymic epitheliocytes under conditions of coculturing with vilon and epithalon peptides. *Bull Exp Biol Med.* 2004;137(6):588-91.
57. Sevostianova NN, Linkova NS, Polyakova VO, Chervyakova NA, Kostylev AV, Durnova AO, Kvetnoy IM, Abdulragimov RI, Khavinson VKh. Immunomodulating effects of Vilon and its analogue in the culture of human and animal thymus cells. *Bull Exp Biol Med.* 2013;154(4):562-5.
58. Turchaninova LN, Kolosova LI, Malinin VV, Moiseeva AB, Nozdrachev AD, Khavinson VKh. Effect of tetrapeptide Cortagen on regeneration of sciatic nerve. *Bull Exp Biol Med.* 2000. 130(12):1172-4.

Глава 5. КОРОТКОЦЕПОЧЕЧНЫЕ ПЕПТИДЫ КАК ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА: ВЫВОДЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ (в соавторстве с С. В. Трофимовой и Д. Вински)

Опыт перевода фундаментальных научных открытий в медицинскую практику подтверждает, что клинический прогресс во многом зависит от достижений молекулярной

медицины, то есть от изучения генов и биологически активных молекул. Достижения в области генетики, молекулярной и клеточной биологии помогают молекулярной медицине в разработке новых фармацевтических препаратов и терапевтических технологий [24]. В течение последнего десятилетия целью нашей работы в области геронтологии было изучение роли короткоцепочечных пептидов в физиологической регуляции функций организма во время старения. Важно знать общий механизм действия пептидов и оценивать их безопасность и эффективность в качестве новых лекарственных средств.

Действие пептидов Хавинсона

Короткоцепочечные пептиды Хавинсона проявляют высокую биологическую активность и тканевую специфичность и не являются ни видоспецифичными, ни иммуногенными [1, 3]. Теоретические и экспериментальные исследования короткоцепочечных пептидов Хавинсона позволили уточнить молекулярный механизм их биологической активности и функции. Влияние пептидов на экспрессию генов, пролиферацию клеток, апоптоз и дифференцировку, функции органов тела, канцерогенез и продолжительность жизни животных описано в гл. 1 -4. В клинических исследованиях оценивалось влияние пептидов на жизнедеятельность человека и на выживаемость людей пожилого и старческого возрастов [2, 4, 6, 9, 10, 14, 19, 22, 23, 27, 28].

Пероральное введение короткоцепочечных пептидов Хавинсона

Экспериментально обнаруженная и клинически подтвержденная возможность перорального применения препаратов на основе короткоцепочечных пептидов, устойчивость пептидов к протеазам в пищеварительном тракте и плазме крови, а также их способность усиливать кишечное всасывание различных биологически активных веществ, проникать в цитоплазму и ядра клеток-мишеней в различных тканях, взаимодействовать с ДНК и тем самым регулировать эпигенетически экспрессию генов и, следовательно, клеточный метаболизм — все эти данные объясняют высокую геропротекторную эффективность пептидов. Установлено, что пероральное введение короткоцепочечных пептидов Хавинсона эффективно в терапии различных патологических состояний, включая сахарный диабет, атеросклероз, нарушения центральной нервной системы и ускоренное старение, вызванное чрезмерными физическими нагрузками.

5.1. Центральная нервная система

В клиническом исследовании с участием 72 пациентов с церебральной астенией после черепно-мозговой травмы (возраст: от 30 до 74 лет) к традиционной терапии был добавлен пинеалон (EDR) перорально в дозе 0,2 мг два раза в день в течение 20-30 дней. Контрольная группа состояла из 37 пациентов, страдавших аналогичными расстройствами и получавших лечение обычным способом. Пациенты, получавшие пинеалон, отмечали улучшение памяти и эмоциональной стабильности, а также уменьшение продолжительности и интенсивности головных болей. Регрессирующие очаговые симптомы и улучшение речи наблюдались у тех пациентов, у которых была моторная или сенсорная афазия. У пациентов, получавших пинеалон, тестируемых на скорость обработки информации (proof-correction test), количество ошибок уменьшалось, а интегральный индекс работоспособности увеличивался [13].

Пинеалон в капсулах (по одной капсуле два раза в день в течение двух недель) давали 75 пожилым людям для коррекции психоэмоционального и функционального состояния центральной нервной системы. У больных наблюдалось улучшение кратковременной и долговременной памяти, а также снижение индекса тяжести патологических состояний [13].

Влияние пинеалона (EDR) на функциональное состояние ЦНС изучали в экспериментальной модели пренатальной гипергомоцистеинемии у крыс. Известно, что

повышенный уровень гомоцистеина в крови связан с окислительным стрессом, снижением когнитивных функций и нарушениями в глутаматергической системе головного мозга [17].

Короткоцепочечные пептиды были успешно использованы для лечения различных заболеваний ЦНС у пациентов пожилого возраста. Эти заболевания включали ишемический инсульт, дисциркуляторную энцефалопатию, болезнь Альцгеймера, осложнения черепно-мозговой травмы, психические расстройства и болезнь Хантингтона. Было обнаружено, что пептидные препараты повышают физическую и когнитивную работоспособность человека при повышенных физических нагрузках и ускоренном старении [13].

Комбинированное пероральное введение пинеалона и везугена (KED) (по одной капсуле два раза в день в течение 30 дней) испытуемым в возрасте от 20 до 75 лет, подвергшимся воздействию неблагоприятных профессиональных условий (150 водителей уличных транспортных средств), способствовало улучшению их памяти, внимания, когнитивных способностей, восприятия и двигательных реакций, а также уменьшению симптомов старения центральной нервной системы.

5.2. Сетчатка глаза

Наиболее важным среди наследственных заболеваний сетчатки глаза является пигментный ретинит. Его заболеваемость достигает 1 случая на 3000 человек населения. В настоящее время во всем мире насчитывается около 1,5 млн. пациентов с пигментным ретинитом. Эффективные методы лечения этих заболеваний отсутствуют. Диагностика заболевания осложняется его бессимптомным началом. Патогенез включает переваривание отслаивающихся дегенерированных фрагментов наружных сегментов палочек пигментированным эпителием и его чрезмерную пигментацию и повреждение с последующим нарушением функций палочек, концентрическим сужением поля зрения и, наконец, слепотой.

Эффективность антиоксидантных витаминов А и Е, используемых для замедления развития пигментного ретинита, невелика.

Эпиталон, который обладает мощными геропротекторными и антиоксидантными свойствами, также может регулировать клеточный метаболизм в сетчатке. Улучшение клинического течения пигментного ретинита эпиталоном подтверждено в экспериментальных исследованиях.

Влияние эпиталона на пигментный ретинит было изучено на крысах Кэмпбелла, гомозиготных по мутации, нарушающей фагоцитарную функцию пигментированного эпителия сетчатки. В исследовании использовались электрофизиологические и гистологические методы. У контрольных крыс Кэмпбелла биоэлектрическая активность резко снижалась в возрасте от 23 до 35 дней, и к 53-му дню ни у одного из животных не было зафиксировано ни одной электроретинограммы (ЭРГ). У крыс Кэмпбелла, получавших эпиталон, ЭРГ оставалась высокой после 23-го дня жизни и начала медленно снижаться только после 41-го дня. В этом возрасте ЭРГ в группе лечения была в 2,8 раза выше, чем в контрольной [15].

Сравнительное гистологическое исследование препаратов сетчатки из пролеченной и контрольной групп крыс в возрасте 35 дней показало, что в пролеченной группе все морфологические структуры сохранились лучше и все слои тканей были хорошо очерчены, тогда как в контрольной группе все слои были сужены. К 41-му дню жизни все слои утратили свою структуру в контрольной группе и сохранили ее в группе лечения. К 71-му дню в группе лечения наблюдалась потеря структуры слоев сетчатки, однако фоторецепторный слой сохранялся и хорошо окрашивался. К 81-му дню некоторые функциональные элементы сетчатки оставались неповрежденными у пролеченных крыс, несмотря на ее полное разрушение. Таким образом, эпиталон обеспечивал двукратное

удлинение относительной интактности морфологической структуры сетчатки глаза у крыс Кэмпбелла.

5.3. Сосудистая система

В рандомизированном исследовании с участием 53 больных ишемической болезнью сердца и артериальным атеросклерозом в возрасте от 50 до 82 лет добавление везугена (0,2 мг перорально во время приема пищи два раза в день в течение 20-30 дней) к традиционной терапии повысило ее эффективность по сравнению с контрольной группой из 34 пациентов. Сообщалось, что везуген помогает нормализовать сон, уменьшить сердечные аритмии и сделать приступы стенокардии менее частыми у пациентов с ишемической болезнью сердца. У пациентов с артериальной гипертензией добавление везугена к стандартной антигипертензивной терапии способствовало достижению длительных ремиссий между гипертоническими кризами и снижению уровня общего холестерина и липопротеидов очень низкой плотности в крови.

5.4. Дыхательная система

Хронический бронхит является наиболее распространенным (90%) среди хронических неспецифических заболеваний легких. В России ежегодный прирост заболеваемости хроническим бронхитом составляет 6-7%, а смертность от него и его осложнений ежегодно увеличивается на 1,6%. Стандартные методы лечения хронического бронхита, включающие антибактериальные препараты и иммуномодуляторы, связаны с неблагоприятными побочными эффектами, в том числе аллергией. Традиционные методы лечения часто не могут применяться из-за сопутствующих заболеваний. Важной задачей молекулярной медицины является поиск веществ, способных к физиологической нормализации функциональной активности клеток бронхиального эпителия — средств, обладающих высокой специфичностью по отношению к легочным тканям и не имеющих побочных эффектов. Это важно для разработки препаратов, которые будут использоваться в терапии легочных заболеваний.

Новым средством для восстановления функций легких при различных патологических состояниях является тетрапептид бронхоген (AEDL). Эффективность этого короткоцепочечного пептида подтверждена на моделях острого воспаления легких, вызванного бактериальными инфекциями, хроническим воспалительным фиброзом и сублетальным гипертоническим повреждением легких. Указанные условия связаны со значительными изменениями морфологических характеристик легких и клеточного состава бронхоальвеолярной жидкости. Последние изменения включают увеличение количества нейтрофилов и лимфоцитов, а также уменьшение количества альвеолярных макрофагов. На крысиной модели острого легочного воспаления было показано, что введение бронхогена на шестой день после начала заболевания связано с нормализацией состава бронхоальвеолярной жидкости, увеличением массы тела, уменьшением обструкции бронхов, ингибированием ПОЛ и возобновлением продукции сурфактанта. Эти эффекты свидетельствуют о том, что бронхоген обладает противовоспалительной активностью. Установлено, что бронхоген способствует нормализации клеточного состава тканей бронхов при различных патологических процессах и индуцирует экспрессию определенных сигнальных молекул в клетках эпителия бронхов.

После стандартной терапии, дополненной бронхогеном, жизненная емкость, общая емкость и форсированная экспираторная емкость легких статистически значимо увеличились на 13,2, 10,4 и 38,7%, соответственно, по сравнению с показателями, полученными до начала лечения. У пациентов, получавших стандартную терапию, значительно увеличивалась только форсированная жизненная емкость легких. После применения бронхогена в мокроте было обнаружено меньше твердых частиц, включая лейкоциты, эндотелиальные клетки и

спирали Куршмана (Curschmann's spirals). Это наблюдение свидетельствует о снижении воспалительных и бронхостатических проявлений легочных заболеваний. При применении бронхогена не было выявлено никаких побочных эффектов, осложнений, противопоказаний и лекарственной зависимости.

Молекулярный механизм биологической активности пептида зависит от его способности регулировать синтез широкого спектра белков в бронхиальном эпителии человека, о чем свидетельствуют данные, приведенные выше. Бронхоген специфическим образом регулирует обновление клеток в бронхиальном эпителии, влияя на экспрессию белков Ki67, Mcl-1 и p53, а также регулирует функции клеток, воздействуя на CD70 и NOS-3. Некоторые эффекты терапевтида более выражены в "молодых" клеточных культурах, а другие эффекты — в "старых" культурах. Вполне возможно, что эти различия объясняют отсутствие синхронности в снижении продукции этих белков в процессе старения клеток. Бронхоген регулирует эпигенетически экспрессию генов, участвующих в дифференцировке клеток в бронхиальном эпителии: *Nkx2.1*, *SCGB1A1*, *SCGB3A2*, *FoxA1* и *FoxA2*. Поскольку известно, что продукты некоторых из этих генов влияют на другие гены этой группы и взаимодействуют с гистонами, которые также нацелены на бронхоген, можно предположить, что пептид имеет либо одну ключевую мишень, либо несколько независимых мишеней в соответствующих сигнальных каскадах. Активируя экспрессию генов *MUC4*, *MUC5AC*, *SftpA1*, продукты которых служат маркерами функциональной активности клеток бронхиального эпителия, бронхоген может предотвращать развитие патологических состояний легких. Это требует дальнейших исследований данного пептида как средства для нормализации дыхательных функций.

Бронхоген эффективен и безопасен в качестве компонента комбинированной терапии хронического бронхита и поэтому может быть рекомендован для перорального применения пациентам с легочными и бронхиальными нарушениями, обусловленными хроническими респираторными заболеваниями различного генеза, а также пожилым пациентам для поддержания их дыхательных функций.

Исследования молекулярных механизмов активности бронхогена и его клинической эффективности свидетельствуют о том, что пептид эпигенетически регулирует экспрессию генов и синтез белков, участвующих в дифференцировке клеток и функциональной активности в бронхиальном эпителии.

Эффективность перорального применения бронхогена оценивали в группе 78 больных (44 женщины и 34 мужчины) в возрасте от 34 до 65 лет, страдавших хроническим бронхитом с астматическими симптомами в стадии ремиссии. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Они предъявляли характерные жалобы на кашель с мокротой, преимущественно по утрам, повышенную утомляемость, потливость, одышку при физических нагрузках, периодические приступы апноэ, нарушения сна и головные боли. Пациенты были разделены методом стратифицированной рандомизации на две группы: экспериментальную (58 человек) и контрольную (20 человек). В контрольной группе применяли стандартную терапию. В экспериментальной группе стандартную терапию дополняли бронхогеном (0,2 мг в капсулах, два раза в день при приеме пищи, 30 дней). Жалобы пациентов регистрировали, образцы мокроты исследовали микроскопически, а дыхательные функции оценивали путем определения параметров внешнего дыхания.

У 86% больных бронхоген помог улучшить их общее состояние, уменьшить частоту приступов кашля и апноэ, уменьшить количество выделяемой мокроты, повысить работоспособность. Аускультация легких показала уменьшение или исчезновение сухих хрипов. Бронхоген помог улучшить параметры внешнего дыхания.

5.5. Пищеварительная система

Применение вилона (КЕ) в суммарных дозах от 10 до 40 мг в течение одного-четырех курсов лечения больных колоректальным раком сопровождалось улучшением иммунитета, общего состояния и способности переносить химиотерапию. Диссеминация рака в течение двух лет после лечения имела место у 62% пациентов контрольной группы против 33% пациентов, получавших вилон во время химиотерапии. Примечательно, что все 12 больных колоректальным раком, получавших в ходе химиотерапии вилон, который давали тремя курсами с интервалом в 1 мес., выжили в течение 1 года без рецидивов, и только один рецидив произошел в течение двух лет. Двухлетняя выживаемость в этой группе составила 86% против 37% в контрольной группе.

5.6. Выделительная система

Среди препаратов, применяемых для лечения больных с заболеваниями почек, около 64% составляют антибиотики и химиотерапевтические препараты, большинство из которых нефротоксичны и не могут быть рекомендованы пациентам пожилого возраста. Новый перспективный класс препаратов основан на тканеспецифичных пептидных биорегуляторах природного и синтетического происхождения [12].

Карталакс (АЕД), который активирует обновление клеток, может быть потенциальным геропротектором, используемым для коррекции возрастных нарушений функции почек. Оваген (ЕДЛ), мишенями которого являются матриксные металлопротеиназы, и, вероятно, тканевой ингибитор металлопротеиназ (tissue inhibitor of metalloproteinases — TIMP) должны быть испытаны в качестве терапевтического средства для лечения тубулярно-интерстициального фиброза.

5.7. Иммунная система

На уровне клеточных структур эпиталон и вилон активируют гетерохроматин в ядрах клеток и способствуют "высвобождению" генов, подавленных вследствие гетерохроматизации эухроматина в хромосомах лимфоцитов у пациентов старческого возраст (табл. 11) [7].

Таблица 11. Влияние вилона (КЕ) и эпиталона (АЕДГ) на хроматин в лимфоцитах старых людей

Испытуемые	Ассоцирование акроцентрических хромосом (на 1 клетку)	Дегетерохроматинизация факультативных гетерохроматинов (на 1 клетку)	Общий гетерохроматин	С х
контроль 1 (20-40 лет)	1,33±0,1	7,7±0,4	нормальное состояние	н
контроль 2 (75-88 лет)	1,2±0,1*	5,9±0,2*	гетерохроматинизация	г
лечение вилоном	2,4±0,1***	9,9±0,6***	дегетерохроматинизация	г
лечение эпиталолом	2,3±0,1***	8,4±0,5***	дегетерохроматинизация	д

* $p < 0,05$ по сравнению с контролем 1; *** $p < 0,001$ по сравнению с контролем 2.

Тимоген (EW) и вилон (KE) активировали дифференцировку Т-клеток и распознавание ими комплексов пептид-МНС (major histocompatibility complex — главный комплекс иммуносовместимости), а также индуцировали изменения внутриклеточного содержания циклических нуклеотидов, интерлейкина IL-2 и интерферонов. Оба дипептида активировали хемотаксис нейтрофилов и фагоцитоз. Тимоген применялся для лечения пациентов с хроническими патологическими состояниями, связанными с иммунной дисфункцией. Полученные результаты свидетельствуют о том, что тимические пептиды участвуют как антагонисты цитокинов в регуляторных механизмах воспалительных процессов [26].

Тимоген и вилон эффективны при лечении многочисленных заболеваний и состояний, связанных со снижением клеточного иммунитета и функций макрофагов: лучевая терапия и химиотерапия у онкологических больных, острые и хронические инфекции и воспаления, применение массивных доз антибиотиков, нарушенная регенерация, связанная с осложнениями после травм и хирургических вмешательств, облитерирующие заболевания конечностей, хронические заболевания печени или простаты, а также некоторые формы туберкулеза и проказы [11, 19, 21, 26].

У пациентов с вторичным иммунодефицитом тимоген нормализовал количество CD4+ клеток и восстановил соотношение CD4+/CD8+ клеток. Аналогичные эффекты были получены с помощью тималина в дозах от 100 до 1000 раз выше, чем у тимогена [25].

5.8. Углеводный обмен

Наиболее важным нарушением обмена веществ у человека является сахарный диабет. Пероральное введение панкрагена (KEDW) пациентам пожилого возраста с сахарным диабетом 2 типа способствовало снижению уровня глюкозы в плазме крови и индекса инсулинорезистентности [20].

5.9. Опорно-двигательный аппарат

Пероральное введение короткоцепочечного синтетического пептида карталакса (AED) и пептидного экстракта сугумира, полученного из хрящевых тканей, способствовало улучшению состояния опорно-двигательного аппарата у пациентов с ожирением. В клиническом исследовании карталаксом в сочетании с традиционными методами лечения приняли участие 63 пациента с остеоартрозом коленного сустава (18 человек), остеохондрозом позвоночника (28 человек) и остеопорозом (17 человек) в возрасте 45-78 лет. Карталакс давали в виде двух капсул во время приема пищи три раза в день в течение 30 дней. Каждая капсула содержала 0,1 мг активного вещества. Контрольную группу составили 37 пациентов с аналогичными диагнозами, которые лечились общепринятыми способами. У больных остеоартрозом карталакс помогал уменьшить боль и повысить подвижность суставов в 72,6% случаев. По данным рентгенологических исследований, наиболее значимые клинические эффекты наблюдались на начальных стадиях заболевания. У пациентов с остеохондрозом поясничного отдела позвоночника карталакс в сочетании с традиционными методами лечения уменьшал болевой синдром в 65,3% случаев. Длительное применение карталакса (не менее трех курсов с интервалом 4 мес. ежегодно, каждый курс продолжительностью 30 дней) при лечении остеохондроза способствовало стабилизации метаболических процессов в костных тканях, как следует из данных, полученных методом денситометрии.

5.10. Старение кожи

Гипотрофия фибробластов, связанная с пониженным содержанием гиалуроновой кислоты, выявляется уже в возрасте 35 - 40 лет. В этом возрасте микроциркуляция в дерме и

эпидермисе может быть нарушена. В стареющей коже роговичный слой утолщается, а функциональная активность фибробластов снижается, что проявляется нарушением синтеза коллагена и ремоделирования внеклеточного матрикса.

Актуальной задачей косметологии и молекулярной медицины является поиск веществ, способных восстанавливать функциональную активность фибробластов кожи. Среди перспективных геропротекторов для кожи — короткоцепочечные пептиды Хавинсона.

На органотипических культурах кожи, полученных от крыс разного возраста, показано, что эпиталон, вилон и везуген стимулируют пролиферацию клеток и ингибируют апоптоз.

Ниже описаны эффекты короткоцепочечных пептидов Хавинсона, вводимых в состав кремов для лица.

Наиболее заметные стимулирующие эффекты дает эпиталон. Пептид помогает замедлить старение кожи, регулируя метаболические процессы, а также благодаря своей антиоксидантной активности и способности регулировать синтез меланина в клетках кожи. Эпиталон может применяться в качестве активного общеукрепляющего компонента косметических средств для людей с выраженными проявлениями старения кожи.

Эпиталон и пинеалон помогают увеличить содержание влаги в поверхностных слоях кожи и тем самым уменьшить видимость морщин на лице и шее у женщин пожилого возраста.

Эпиталон и лейциллизин, которые способны проникать сквозь клеточные мембраны, могут быть использованы в кремах для поддержания функциональной активности клеток кожи женщин среднего возраста и в косметических устройствах, использующих электрофорез для введения пептидов в глубокие слои кожи, как это может быть необходимо женщинам пожилого возраста.

Карталакс менее эффективен, чем эпиталон, в предотвращении потери фибробластов в коже. Тем не менее, он может быть использован для защиты кожи от старения, поскольку может восстанавливать выработку коллагена и эластина фибробластами благодаря своей способности регулировать метаболические процессы в соединительной ткани. Использование карталакса в составе кремов способствует повышению упругости и эластичности кожи, а также повышению защитных свойств кожи головы. Такие кремы также могут оказывать подтягивающее действие на контуры лица.

Везуген способствует активизации естественных барьерных функций кожи и повышению ее тургора, активизируя микроциркуляцию и регулируя обмен веществ в сосулистом эндотелии.

Вилон активизирует регенерацию клеток кожи и уменьшает воспаление. Применение вилонна в составе кремов ускоряет заживление кожных повреждений, предотвращает раздражение, повышает тургор кожи и содержание влаги.

5. 11. Адаптация к интенсивным физическим нагрузкам

Пероральное введение пинеалона (EDR) и кристагена (EDP) в дозе 0,1 мг два раза в день в течение двух недель нормализовало антиоксидантные функции в организме спортсменов и способствовало их адаптации к физическим нагрузкам, повышению тренированности и стимуляции энергетического обмена. Повышенное энергоснабжение мышц под действием пептидных биорегуляторов коррелирует с повышением экспрессии генов *PPARA* и *PPARG*, которые усиливают окислительную способность скелетных мышц. Пептидно-опосредованное повышение адаптационной способности организма человека было связано с повышением уровня экспрессии гена, кодирующего белок теплового шока HSPA1A. Примечательно, что введение спортсменам пинеалона и кортагена сопровождалось снижением частоты респираторных заболеваний, что согласуется с результатами оценки

иммунного статуса спортсменов. Полученные результаты включают повышение экспрессии маркеров активации иммунных клеток (CD71, CD25 и HLA-DR) и нормализацию уровней иммуноглобулинов классов M, G и E [8, 17].

Резюме

Приведенные выше результаты клинических и экспериментальных исследований свидетельствуют о том, что короткоцепочечные пептиды, разработанные по результатам исследований аминокислотного состава пептидных препаратов, полученных из тканей организма, обладают высокой тканеспецифической биологической активностью, влияющей на различные органы и системы организма при их старении. Установлено, что молекулярные механизмы действия короткоцепочечных пептидов Хавинсона зависят от эпигенетической регуляции экспрессии генов и синтеза белков, которые играют роль регуляторов функциональной активности клеток. Этот вывод подтверждается результатами, полученными с помощью методов молекулярно-биологических (культивирование клеток, иммуноцитохимия, микроскопия и др.) и физико-химических (спектрофотометрия, молекулярное моделирование и др.) в экспериментах на животных и клинических испытаниях.

Литература

1. Alexandrov VA, Bepalov VG, Morozov VG, Khavinson VKh, Anisimov VN. Study of the post-natal effects of chemopreventive agents on ethylnitrosourea-induced transplacental carcinogenesis in rats. II. Influence of low-molecular-weight polypeptide factors from the thymus, pineal glands, bone marrow, anterior hypothalamus, brain cortex and brain white substance. *Carcinogenesis*. 1996;7(8):1931-4.
2. Anisimov VN, Khavinson VKh, Morozov VG. Carcinogenesis and aging. IV. Effect of low-molecular-weight factors of thymus, pineal gland and anterior hypothalamus on immunity, tumor incidence and life span of C3H/Sn mice. *Mech Ageing Dev*. 1982;19:245-58.
3. Anisimov VN, Mylnikov SV, Oparina TI, Khavinson VKh. Effect of melatonin and pineal peptide preparation epithalamin on life span and free radical oxidation in *Drosophila melanogaster*. *Mech Ageing Dev*. 1997;97:81-91.
4. Goncharova ND, Vengerin AA, Khavinson VKh, Lapin BA. Pineal peptides restore the age-related disturbances in hormonal functions of the pineal gland and the pancreas. *Exp Gerontol* 2005;40:51-7.
5. Ias'kevich LS, Krutilina NI, Kostetskaia TV, Ryzhak GA, Khavinson VKh. Application of peptide bioregulator in complex treatment of elderly cancer patients. *Adv Gerontol*. 2005;16:97-100.
6. Khavinson VKh. Tissue-specific effects of peptides. *Bull Exp Biol Med*. 2001;132(2):807-8.
7. Khavinson VKh. Peptidergic Regulation of Ageing. *Humanistica*, St Petersburg. 2009.
8. Khavinson VKh. Peptides, genome, aging. *Adv Gerontol*. 2014;4(4):337-45.
9. Khavinson VKh, Goncharova N, Lapin B. Synthetic tetrapeptide epitalon restores disturbed neuroendocrine regulation in senescent monkeys. *Neuro Endocrinol Lett*. 2001;22:251-4.
10. Khavinson VKh, Izmailov DM, Obukhova LK, Malinin VV. Effect of epitalon on the lifespan

increase in *Drosophila melanogaster*. *Mech Ageing Dev.* 2000;120:141–9.

11. Khavinson VKh, Kuznik BI, Ryzhak GA. Peptide bioregulators: the new class of geroprotectors. Communication 1. Results of experimental studies. *Adv Gerontol.* 2012;25(4):696-708.
12. Khavinson VKh, Lin'kova NS, Polyakova VO, Durnova AO, Nichik TE, Kvetnoy IM. Peptides regulate expression of signaling molecules in kidney cell cultures during in vitro aging. *Bull Exp Biol Med.* 2014;157(2):261-4.
13. Khavinson VKh, Linkova NS, Tarnovskaya SI, Umnov RS, Elashkina EV, Durnova AO. Short peptides stimulate serotonin expression in cells of brain cortex. *Bull Exp Biol Med.* 2014;157(1):77-80.
14. Khavinson VKh, Morozov VG, Anisimov VN. Experimental studies of the pineal gland preparation Epithalamin. In: *The Pineal Gland and Cancer*. Bartsch C. et al. (Eds.) Springer-Verlag: Berlin Heidelberg. 2001:294-306.
15. Khavinson VKh, Pronyaeva VE, Linkova NS, Trofimova SV, Umnov RS. Molecular-physiological aspects of peptide regulation of the function of the retina in retinitis pigmentosa. *Hum Physiol.* 2014;40:153–8.
16. Khavinson V, Razumovsky M, Trofimova S, Grigorian R, Razumovskaya A. Pineal-regulating tetrapeptide epitalon improves eye retina condition in retinitis pigmentosa. *Neuro Endocrinol Lett.* 2002;23:365-8.
17. Khavinson V, Ribakova Y, Kulebiakin K, Vladychenskaya E, Kozina L, Arutjunyan A, Boldyrev A. Pinealon increases cell viability by suppression of free radical levels and activating proliferative processes. *Rejuvenation Res.* 2011;14(5):535-41.
18. Khavinson VKh, Zemchikhina VN, Trofimova SV, Malinin VV. Effects of peptides on proliferative activity of retinal and pigmented epithelial cells. *Bull Exp Biol Med.* 2003;135(6):597-9.
19. Korkushko OV, Khavinson VKh, Shatilo VB, Antonyk-Sheglova IA. Peptide geroprotector from the pineal gland inhibits rapid aging of elderly people: results of 15-year follow-up. *Bull Exp Biol Med.* 2011;151(3):366–9.
20. Korkushko OV, Khavinson VKh, Shatilo VB, Antonyk-Sheglova IA, Bondarenko EV. Prospects of using Pancragen for correction of metabolic disorders in elderly people. *Bull Exp Biol Med.* 2011;151(4):454–6.
21. Korkushko OV, Khavinson VKh, Shatilo VB, Magdich LV. Effect of peptide preparation epithalamin on circadian rhythm of epiphyseal melatonin-producing function in elderly people. *Bull Exp Biol Med.* 2004;37(4):389-91.
22. Kossoy G, Zandbank J, Tendler E, Anisimov VN, Khavinson VKh, Popovich IG, Zabezhinski MA, Zusman I, Ben-Hur H. Epitalon and colon carcinogenesis in rats: Proliferative activity and apoptosis in colon tumors and mucosa. *Int J Mol Med.* 2003;12(4):473-7.
23. Kozina LS, Arutjunyan AV, Khavinson VKh. Antioxidant properties of geroprotective peptides of the pineal gland. *Arch Gerontol Geriatr.* 2007;Suppl.1:213-6.
24. Micans P. The new Russian peptide revolution. *Ageing Matters.* 2016. (Spec 25 yrs ann edit):6-9.

25. Morozov VG, Khavinson VKh. US Patent N 5,538,951 «Pharmaceutical preparation for the therapy of immune deficiency conditions»; 23.07.1996.
26. Morozov VG, Khavinson VKh. Natural and synthetic thymic peptides as therapeutics for immune dysfunction. Int J Immunopharmacology. 1997;19(9/10):501-5.
27. Rosenfeld SV, Togo EF, Mikheev VS, Popovich IG, Khavinson VKh, Anisimov VN. Effect of Epitalon on the incidence of chromosome aberrations in senescence-accelerated mice. Bull Exp Biol Med. 2002;133(3):274–6.
28. Sibarov DA, Kovalenko RI, Malinin VV, Khavinson VKh. Epitalon influences pineal secretion in stress-exposed rats in the daytime. Neuro Endocrinol Lett. 2002;23(5/6):452-4.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пептидные препараты, полученные из тканей организма (цитомедины) и синтетические короткоцепочечные пептиды (пептиды Хавинсона, цитогены), являются биорегуляторами, обладающими геропротекторной и противоопухолевой активностью, и поэтому могут быть использованы для лечения различных патологических состояний.

Регуляторные пептиды синтезируются как компоненты белков, которые могут расщепляться специфическими протеазами для высвобождения таких пептидов. При частичном протеолизе пищевых белков в пищеварительном тракте образуются и всасываются в кровоток ди-, три- и тетрапептиды. Нельзя исключать, что они тоже участвуют в физиологической регуляции. Это дает основания вводить пептиды перорально.

Пептидные биорегуляторы оказывают антистрессовое действие и нормализуют состояние центральной нервной системы и эндокринных желез. Их влияние распространяется на все защитные системы организма: пролиферацию клеток и регенерацию тканей, врожденный и приобретенный иммунитет, метаболический гомеостаз, белки теплового шока, защиту от перекисного окисления липидов, повреждения свободными радикалами и многие другие.

Пептидные биорегуляторы в настоящее время используются в качестве лекарственных препаратов, пищевых добавок и косметических средств, и эта тенденция, несомненно, будет продолжаться.

Список зарубежных патентов

№ п/п	№	Название	Авторы	Страна, дата выдачи
1.	CH 659586	Arzneimittel aus dem Thymus und Verfahren zu dessen Herstellung	Morozov VG, Khavinson VKh	Switzerland 13/02/1987
2.	DE 3421789	Arzneimittel auf der Basis einer Thymusfraktion und Verfahren zu dessen Herstellung	Morozov VG, Khavinson VKh	FRG 06/10/1988
3.	Fr 2583982	Produit medicamenteux obtenu a partir du thymus et son procede d'obtention	Morozov VG, Khavinson VKh	France 24/02/1989
4.	JP 1625201	Process for production of thymus gland preparation	Morozov VG, Khavinson VKh	Japan 18/11/1991
5.	US 5,070,076	Thymus-gland preparation and method for producing same	Morozov VG, Khavinson VKh	USA 03/12/1991
6.	AU 616236	Pharmaceutical preparation for treating immunodeficiency conditions	Yakovlev GM, Morozov VG,	Australia 03/03/1992

			Khavinson VKh, Deigin VI, Korotkov AM	
7.	EP 0346501	Arzneimittelzubereitung zur behandlung des immunmangels	Yakovlev GM, Morozov VG, Khavinson VKh, Deigin VI, Korotkov AM	European Patent 29/07/1992
8.	CA 1,330,300	Pharmaceutical preparation for therapy of immunodeficit states	Yakovlev GM, Morozov VG, Khavinson VKh, Deigin VI, Korotkov AM	Canada 21/06/1994
9.	JP 2511159	Pharmaceutical preparation for treating immunodeficiency conditions	Yakovlev GM, Morozov VG, Khavinson VKh, Deigin VI, Korotkov AM	Japan 26/06/1996
10.	US 5,538,951	Pharmaceutical preparation for the therapy of immune deficiency conditions	Morozov VG, Khavinson VKh	USA 23/07/1996
11.	US 5,728,680	Methods for normalizing numbers of lymphocytes	Morozov VG, Khavinson VKh	USA 17/03/1998
12.	US 5,767,087	Pharmaceutical preparation for the therapy of immune deficiency conditions	Morozov VG, Khavinson VKh	USA 16/06/1998
13.	US 5,770,576	Pharmaceutical dipeptide compositions and methods of use thereof: systemic toxicity	Morozov VG, Khavinson VKh	USA 23/06/1998
14.	US 5,789,384	Pharmaceutical dipeptide compositions and methods of use thereof	Khavinson VKh, Sery SV, Morozov VG	USA 04/08/1998
15.	US 5,807,830	Method for treatment of purulent inflammatory diseases	Morozov VG, Khavinson VKh	USA 15/09/1998
16.	US 5,811,399	Pharmaceutical dipeptide compositions and methods of use thereof: immunodepressants	Khavinson VKh, Morozov VG	USA 22/09/1998
17.	US 5,814,611	Pharmaceutical for the therapy of immune deficiency conditions	Morozov VG, Khavinson VKh	USA 29/09/1998
18.	US 6,066,622	Immunomodulating peptides and methods of use	Green LR, Sinackevich NV, Ivanov VT, Mikhalyova II, Vaskovsky BV., Mikhaltsov AN, Khavinson VKh, Morozov VG	USA 23/05/2000
19.	US 6,100,380	Immunomodulating peptides and methods of use	Green LR, Sinackevich NV, Ivanov VT, Mikhalyova II, Vaskovsky BV, Mikhaltsov AN, Morozov VG, Khavinson VKh	USA 08/08/2000
20.	US 6,136,788	Pharmaceutical preparation for the therapy of immune deficiency conditions	Morozov VG, Khavinson VKh,	USA 24/10/2000
21.	US 6,139,862	Pharmaceutical dipeptide compositions and methods of use thereof	Khavinson VKh, Sery SV, Morozov VG	USA 31/10/2000

22.	US 6,346,514	Pharmaceutical lysine-containing polypeptide compositions and method of use thereof	Green LR, Sinackevich NV, Ivanov VT, Mikhalyova II, Vaskovsky BV, Mikhaltsov AN, Khavinson VKh, Morozov VG	USA 12/02/2002
23.	US 6,368,788	Method of treating complications in immunodepressed states resulting from HIV infection	Kozhemyakin AL, Sinackevich NV, Sery SV, Rakhilov AM, Morozov VG, Khavinson VKh	USA 09/04/2002
24.	CH 692 477	Zusammensetzung zur Stimulation von Wiederherstellungsvorgängen, enthaltend L-Lysil-L-Glutaminsäure	Khavinson VKh, Morozov VG, Malinin VV, Sery SV	Switzerland 15/07/2002
25.	EP 1 224 212	Tetrapeptide stimulating functional activity of neurones, pharmacological agent based thereon and method of use thereof	Khavinson VKh, Morozov VG, Malinin VV, Grigorev EI	European Patent 09/07/2003
26.	EP 1 089 753	Use of a dipeptide for stimulating repair processes	Khavinson VKh, Morozov VG, Malinin VV, Sery SV	European Patent 23/07/2003
27.	US 6,642,201	Use of a dipeptide for stimulating repair processes	Khavinson VKh, Morozov VG, Malinin VV, Sery SV	USA 04/11/2003
28.	US 6,727,227	Tetrapeptide revealing geroprotective effect, pharmacological substance on its basis, and the method of its application	Khavinson VKh	USA 27/04/2004
29.	AU 769847	Tetrapeptide revealing geroprotective effect, pharmacological substance on its basis, and the method of its application	Khavinson VKh	Australia 20/05/2004
30.	US 6,777,195	Pharmaceutical dipeptide compositions and methods of use thereof: immunostimulants	Kozhemyakin AL, Sinackevich NV, Sery SV, Rakhilov AM, Morozov VG, Khavinson VKh	USA 17/08/2004
31.	EP 1 325 026	Tetrapeptide stimulating functional activity of hepatocytes and its therapeutical use	Khavinson VKh	European Patent 18/08/2004
32.	EP 1 353 939	Tetrapeptide regulating prostate functions and its compositions and uses	Khavinson VKh, Malinin VV, Grigorev EI	European Patent 25/08/2004
33.	DK 175381	Farmaceutisk præparat til behandling af immundefekttilstande	Yakovlev GM, Morozov VG, Khavinson VKh, Deigin VI, Korotkov AM	Denmark 20/09/2004
34.	AU 776693	Use of a dipeptide for stimulating repair processes	Khavinson VKh, Morozov VG, Malinin VV, Sery SV	Australia 06/01/2005
35.	EP 1 179 008	Tetrapeptide revealing geroprotective effect, pharmacological substance on its basis, and the method of its application	Khavinson VKh	European Patent 22/03/2006
36.	AU 784578	Tetrapeptide stimulating functional	Khavinson VKh,	Australia

		activity of neurones, pharmacological agent based thereon and method of use thereof	Morozov VG, Malinin VV, Grigorev EI	17/08/2006
37.	US 7,101,854	Tetrapeptide stimulating the functional activity of hepatocytes, pharmacological substance on its basis and the method of its application	Khavinson VKh	USA 05/09/2006
38.	JP 3902406	Tetrapeptide revealing geroprotective effect, pharmacological substance on its basis, and the method of its application	Khavinson VKh	Japan 12/01/2007
39.	US 7,189,701	Tetrapeptide stimulating functional activity of neurons, pharmacological agent based thereon and method of use thereof	Khavinson VKh, Morozov VG, Malinin VV, Grigorev EI	USA 13/03/2007
40.	CA 2,373,128	Tetrapeptide revealing geroprotective effect, pharmacological substance on its basis, and the method of its application	Khavinson VKh	Canada 13/03/2007
41.	IL 146432	Tetrapeptide revealing geroprotective effect, pharmacological substance on its basis, and the method of its application	Khavinson VKh	Israel 04/09/2007
42.	EP 1 758 922	Peptide substance restoring function of respiratory organs	Khavinson VKh, Ryzhak GA, Grigorev EI, Ryadnova IYu	European Patent 13/02/2008
43.	EP 1 758 923	Peptide substance restoring myocardium function	Khavinson VKh, Ryzhak GA, Grigorev EI, Ryadnova IYu	European Patent 13/02/2008
44.	US 7,491,703	Tetrapeptide regulating blood glucose level in diabetes mellitus	Khavinson VKh, Malinin VV, Grigorev EI, Ryzhak GA	USA 17/02/2009
45.	EP 2 024 388	Peptide substance stimulating regeneration of central nervous system neurons, pharmaceutical composition on its base, and the method of its application	Khavinson VKh, Grigorev EI, Malinin VV, Ryzhak GA	European Patent 14/10/2009
46.	EP 2 024 387	Peptide substance enhancing capillaries resistance, pharmaceutical composition on its base and the method of its application	Khavinson VKh, Grigorev EI, Malinin VV, Ryzhak GA	European Patent 21/10/2009
47.	US 7,625,870	Peptide substance restoring respiratory organs function	Khavinson VKh, Ryzhak GA, Grigorev EI, Ryadnova IYu	USA 01/12/2009
48.	EP 1 697 401	Tetrapeptide regulating blood glucose level in diabetes mellitus	Khavinson VKh, Malinin VV, Grigorev EI, Ryzhak GA	European Patent 06/01/2010
49.	US 7,662,789	Peptide substance restoring myocardium function	Khavinson VKh, Ryzhak GA, Grigorev EI, Ryadnova IYu	USA 16/02/2010
50.	JP 4489946	Use of a dipeptide for stimulating repair processes	Khavinson VKh, Morozov VG, Malinin VV, Sery SV	Japan 09/04/2010
51.	AU 2004296269	Tetrapeptide regulating blood glucose level in diabetes mellitus	Grigorev EI, Khavinson VKh,	Australia 16/09/2010

			Ryzhak GA, Malinin VV	
52.	US 7,851,449	Peptide, pharmaceutical composition, and a method of treating microcirculation disorders	Khavinson VKh, Grigorev EI, Malinin VV, Ryzhak GA	USA 14/12/2010
53.	CA 2,425,445	Tetrapeptide stimulating functional activity of hepatocytes, pharmacological substance on its basis and the method of its application	Khavinson VKh	Canada 18/01/2011
54.	JP 4668497	Tetrapeptide stimulating functional activity of neurons, pharmacological agent based thereon and method of use thereof	Khavinson VKh, Morozov VG, Malinin VV, Grigorev EI	Japan 13/04/2011
55.	IN 247551	Tetrapeptide lisl-glutamyl-aspartyl-tryptophane amide	Khavinson VKh, Malinin VV, Grigorev EI, Ryzhak GA	India 19/04/2011
56.	EP 2 032 595	Peptide substance revealing an immunogeroprotective effect, pharmaceutical composition on its base and the method of its application	Khavinson VKh, Grigorev EI, Malinin VV, Ryzhak GA	European Patent 22/06/2011
57.	US 8,057,810	Peptide substance revealing an immunogeroprotective effect, pharmaceutical composition on its base and the method of its application	Khavinson VKh, Grigorev EI, Malinin VV, Ryzhak GA	USA 15/11/2011
58.	CA 2,547,873	Tetrapeptide regulating blood glucose level in diabetes mellitus	Khavinson VKh, Malinin VV, Grigorev EI, Ryzhak GA	Canada 22/11/2011
59.	US 8,071,556	Peptide substance revealing a stress protective effect, pharmaceutical composition on its base and the method of its application	Khavinson VKh, Grigorev EI, Malinin VV, Ryzhak GA	USA 06/12/2011
60.	KR 10-1106609	Tetrapeptide regulating blood glucose level in diabetes mellitus	Khavinson VKh, Malinin VV, Grigorev EI, Ryzhak GA	Republic of Korea 10/01/2012
61.	CA 2,335,362	Use of a dipeptide for stimulating repair processes	Khavinson VKh, Morozov VG, Malinin VV, Sery SV	Canada 20/11/2012
62.	IL 194346	Tripeptide having a stimulating effect on the regeneration of neurons and pharmaceutical compositions comprising it	Khavinson VKh, Grigorev EI, Malinin VV, Ryzhak GA	Israel 01/04/2013
63.	KR 10-1289220	Peptide substance stimulating regeneration of central nervous system neurons, pharmaceutical composition on its base, and the method of its application	Khavinson VKh, Grigorev EI, Malinin VV, Ryzhak GA	Republic of Korea 17/07/2013
64.	US 8,524,674	Method of improving the conditioned reflex habit, the muscle tonus, or the motion coordination of a patient after suffering trauma to the brain cortex	Khavinson VKh, Grigorev EI, Malinin VV, Ryzhak GA	USA 03/09/2013
65.	KR 10-1382947	Peptide substance revealing an immunogeroprotective effect, pharmaceutical composition on its base	Khavinson VKh, Grigorev EI, Malinin VV, Ryzhak GA	Republic of Korea 01/04/2014

		and the method of its application		
66.	IL 194500	Peptide substance capable of enhancing capillary resistance and pharmaceutical composition comprising such	Khavinson VKh, Grigorev EI, Malinin VV, Ryzhak GA	Israel 01/05/2014
67.	IL 194499	Peptide glutamyl-aspartyl-proline, pharmaceutical compositions comprising the peptide and uses of the peptide	Khavinson VKh, Grigorev EI, Malinin VV, Ryzhak GA	Israel 31/01/2015