

acute hypoxia has been studied. It has been shown that melatonin administration 30 minutes before modelling acute hypoxia in animals containing under the conditions of an altered photoperiod is conducive to a normalization of the parameters of peroxidation processes in the basal ganglia.

Key words: melatonin, peroxidation processes, basal ganglia, altered photoperiod, acute hypoxia.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Рецензент – доц. Н.В.Черновська

Buk. Med. Herald. – 2009. – Vol.13, №4.–P.250-254

Надійшла до редакції 6.08.2009 року

© І.Ю.Сопова, І.І.Заморський, 2009

УДК 612.67

В.Х.Хавинсон, В.Н.Анисимов

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПЕПТИДНОЙ РЕГУЛЯЦИИ СТАРЕНИЯ

Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН
НИИ онкологии им. Н.Н.Петрова Минздрава РФ, г. Санкт-Петербург

Резюме. Обобщены результаты исследований, направленных на изучение механизмов старения и эффективности пептидных биорегуляторов в профилактике возрастной патологии. Предложена молекулярная модель комплементарного взаимодействия коротких пептидов с промоторными участками генов, которая

лежит в основе инициации синтеза белка. Оцениваются перспективы применения пептидных биорегуляторов для профилактики преждевременного старения.

Ключевые слова: пептидные биорегуляторы, старение, возрастная патология, профилактика.

Известно, что видовой предел продолжительности жизни животных и человека примерно на 30-40% превышает среднюю длительность жизни. Это связано с воздействием на организм различных неблагоприятных факторов, которые приводят к изменению экспрессии и структуры генов, что сопровождается нарушением синтеза белка и снижением функций организма [10]. Установлено, что по мере старения происходит инволюция центрального органа иммунной системы – тимуса и нейроэндокринной системы – эпифиза [10, 11]. Также выявлено существенное снижение синтеза белка в клетках различных тканей организма [11]. Для восстановления функций тимуса, эпифиза и других органов разработан специальный метод для извлечения, очистки и фракционирования низкомолекулярных пептидов из экстрактов этих органов [10, 11]. Выделенные низкомолекулярные пептиды из тимуса (препарат «тималин») и из эпифиза (препарат «эпиталамин») животных были изучены в различных биологических моделях. Эти пептидные препараты в многочисленных экспериментах способствовали достоверному увеличению средней и, в ряде случаев, максимальной продолжительности жизни мышей и крыс (табл.), а также замедлению у них старения репродуктивной системы, двигательной активности и физической выносливости [1-3, 5, 6, 17-23]. Особенно следует отметить отчетливую корреляцию увеличения средней продолжительности жизни и основного показателя клеточного иммунитета – реакции бласттрансформации лимфоцитов с фитогемагглютинином (РБТЛ с ФГА), характеризующего функцию Т-лимфоцитов [19].

Значительное увеличение средней продолжительности жизни животных в определенной мере было связано с тем, что введение пептидов, выделенных из эпифиза и тимуса, способствовало снижению частоты развития спонтанных опухолей. Введение пептидов также угнетало рост перевиваемых опухолей, тормозило спонтанный и индуцированный канцерогенез у крыс и мышей различных линий, включая трансгенных [1-3, 10, 11, 16, 23].

Введение самцам и самкам крыс тетрапептида эпиталона оказывало нормализующее влияние на свободно-радикальные процессы, большинство гормонально-метаболических и поведенческих показателей у животных, содержащихся в условиях постоянного или естественного режимов освещения, и приводило к замедлению процессов старения, торможению развития у них возрастной патологии, включая новообразования, и увеличению продолжительности жизни [5, 6, 10, 11, 15, 23].

В специальных экспериментах было установлено, что короткие пептиды, выделенные из различных органов и тканей, а также их синтезированные аналоги (ди-, три-, тетрапептиды) обладают достоверной тканеспецифической (геноспецифической) активностью как в культуре клеток, так и в экспериментальных моделях у молодых и старых животных [11].

Воздействие пептидов приводило к тканеспецифической стимуляции синтеза белка в клетках тех органов, из которых эти пептиды были выделены. Эффект усиления синтеза белка при введении пептидов выявлен у молодых и старых животных [11]. Особенно значимым явился факт восстановления репродуктивной системы у ста-

Таблица

Влияние пептидных биорегуляторов на продолжительность жизни, эстральную функцию и развитие спонтанных опухолей у лабораторных животных

Вид, линия животных	Пол	Начало введения	Продолжительность жизни (в % к контролю)		Популяционная скорость старения (в % к контролю)	Влияние на эстральную функцию	Влияние на развитие спонтанных опухолей
			средняя	максимальная			
препарат «эпиталамин» (комплекс пептидов)							
Крысы	Самки	3.5 мес.	+ 25*	+ 6	- 52*	Замедление возрастного выключения эстральной функции	↓
Крысы	Самки	15 мес.	+ 6	+ 9	- 72*		↓
Мыши СЗН/Sp	Самки	3.5 мес.	+ 31*	+ 14	- 27*		↓
Мыши SHR	Самки	3.5 мес.	+ 13	+ 5	- 23*		↓
	Самки	3.5 мес.	+ 11*	- 2	+ 2		↓
	Самки	12 мес.	+ 6	- 3	но+		↓
препарат «тималин» (комплекс пептидов)							
Мыши СЗН/Sp	Самки	3.5 мес.	+ 28*	+ 11	но+	Не влияет	↓
Мыши SHR	Самки	3.5 мес.	+ 12*	0	- 9		↓
	Самки	3.5 мес.	- 2	- 6	но+		↓
	Самки	12 мес.	+ 13*	0	но+		↓
пептид Glu-Trp							
Крысы	Самки	4 мес.	+ 2	+ 14	- 42*	Не влияет	↓
Lys-Glu							
Мыши СВА	Самки	6 мес.	+ 3*	+ 7	- 23*	Не влияет	↓
пептид Ala-Glu-Asp-Gly							
Крысы	Самцы	4 мес.	+ 9	+ 1	+ 25*	Замедление возрастного выключения эстральной функции	↓
	Самки	4 мес.	+ 10*	+ 3	- 4		↓
Мыши SHR	Самки	3 мес.	0	+ 12	- 29*		↓
Мыши СВА	Самки	6 мес.	+ 5*	+ 42	- 46*		↓
Мыши SAMR-1	Самки	2 мес.	+ 5	- 8	+ 66		=
Мыши SAMP-1	Самки	2 мес.	+ 7*	+ 8	+ 59		=
Мыши HER-2/neu	Самки	2 мес.	+ 13*	+ 4	- 6		↓

Примечание. * - статистически достоверно ($p < 0.05$) по сравнению с контролем; +но - не определяли; ↓ - снижение частоты и/или множественности и/или увеличение латентного периода опухолей; = - отсутствие эффекта

рых самок крыс после введения пептидного препарата эпифиза [3, 23].

Таким образом, были установлены главные преимущества коротких пептидов: они обладали высокой биологической активностью, проявляли тканеспецифичность, у них отсутствовала видоспецифичность и иммуногенность. Эти характеристики сближали регуляторные пептиды с некоторыми пептидными гормонами [11, 13].

В течение многих лет проводилось подробное изучение молекулярных масс, химических свойств, аминокислотного состава и последовательности аминокислот низкомолекулярных пептидов из тимуса, эпифиза и других органов [10, 11]. Полученная информация была использована для осуществления химического синтеза некоторых коротких пептидов. Сравнение показало, что биологическая активность природных и синтетических препаратов в основном идентична. Так, на-

пример, дипептид Glu-Trp стимулировал иммунитет [11, 19]. Биологическая активность природных и синтетических пептидов была сходной при стандартном тестировании в культуре тканей и у животных [11]. Препарат эпифиза эпиталамин и синтетический пептид эпиталон при добавлении в питательную среду на стадии личинок существенно (до 52 %) увеличивали среднюю продолжительность жизни самцов и самок дрозофил разных линий [10, 11]. Эти результаты указывали на перспективность применения пептидов в качестве геропротекторных препаратов. Учитывая актуальность поиска новых лекарственных средств – геропротекторов, были проведены доклинические исследования на разных структурных уровнях.

На уровне целого организма у различных животных продемонстрировано значительное разнообразие биологической активности корот-

ких пептидов и особенно пептидов тимуса и эпифиза, включающее антиоксидантный эффект, влияние на эндокринную систему, пролиферативную активность и апоптоз [10, 11, 15].

На уровне клеточных структур обнаружено, что короткие пептиды активируют гетерохроматин в клеточных ядрах лимфоцитов крови у людей старческого возраста [11, 25].

Крайне важным явилось обнаружение способности пептидов индуцировать дифференцировку полипотентных клеток. Так, добавление пептидов сетчатки к полипотентным клеткам эктодермы ранней гастрюлы лягушки *Xenopus laevis* привело к возникновению клеток сетчатки и пигментного эпителия. Это наблюдение в значительной степени объясняет значительный клинический эффект препарата сетчатки у людей при дегенеративных заболеваниях сетчатки и у животных с генетически детерминированным пигментным ретинитом [11].

На уровне хромосом число хромосомных aberrаций используется как маркер повреждений ДНК в стареющем организме. Соматические мутации могут возникать из-за накопления устойчивых aberrаций и лежат в основе возрастной патологии, включая злокачественные опухоли. Достоверная антимуtagenная и репаративная активность пептидов тимуса и эпифиза была подтверждена снижением числа хромосомных aberrаций в клетках костного мозга и эпителия роговицы животных с ускоренным старением [11].

На уровне регуляции активности генов установлено, что пептиды Lys-Glu и Ala-Glu-Asp-Gly при введении в организм трансгенных мышей подавляют в 2 – 3,6 раза по сравнению с контролем экспрессию гена HER-2/neu (рак молочной железы человека). Это подавление экспрессии гена сопровождается достоверным уменьшением диаметра опухоли [16].

Обнаружено, что добавление тетрапептида Ala-Glu-Asp-Gly в культуру легочных фибробластов человека индуцирует экспрессию гена теломеразы, активность теломеразы и способствует удлинению теломера в 2,4 раза. Активация экспрессии гена сопровождается увеличением числа делений клеток на 42,5 %, что демонстрирует преодоление предела клеточного деления Хейфлика [11, 12].

С использованием ДНК-микрочиповой технологии исследовали влияние ди- и тетрапептидов Lys-Glu, Glu-Trp, Ala-Glu-Asp-Gly, Ala-Glu-Asp-Pro на экспрессию 15247 генов сердца и головного мозга мышей до и после введения пептидов [4, 11, 14]. В эксперименте использовали клоны, входящие в библиотеку кДНК Национального института старения США. В этом эксперименте получены уникальные данные по изменению экспрессии различных генов под влиянием пептидов. Важным выводом явилось то, что каждый пептид специфически регулирует конкретные гены. Результаты эксперимента указывают на существующий механизм пептидной регуляции генетической активности. В эксперименте установлено, что дипептид

Lys-Glu, обладающий иммуномодулирующей активностью, регулирует экспрессию гена интерлейкина-2 в лимфоцитах крови [11].

На молекулярном уровне существовал очевидный разрыв между многочисленными доказательствами специфических эффектов, вызванных регуляторными пептидами в активации транскрипции генов, и ограниченными схемами процесса, который лежит в основе селективного связывания фактора транскрипции со специфическими сайтами ДНК. При этом неспецифическое связывание белков с двойной спиралью ДНК было доказано физико-химическими методами [25]. Для активации транскрипции гена в клетках высших организмов, как правило, требуются десятки макромолекулярных активаторов и факторов транскрипции.

Нами предложена молекулярная модель взаимодействия регуляторных пептидов и двойной спирали ДНК на промоторном участке гена [11, 25].

Геометрическая и химическая комплементарность аминокислотной последовательности пептида и последовательности нуклеотидных пар ДНК были положены в основу молекулярной модели. Регуляторный пептид распознаёт специфический сайт в двойной спирали ДНК, если его собственная аминокислотная последовательность комплементарна на достаточном протяжении последовательности нуклеотидов ДНК; другими словами – их взаимодействие специфично из-за совпадения последовательностей.

Каждая последовательность нуклеотидных пар в двойной спирали ДНК образует уникальный узор функциональных групп на поверхности большой канавки двойной спирали ДНК. Пептид в развёрнутой β -конформации может комплементарно расположиться в большой канавке ДНК вдоль оси двойной спирали. Литературные данные о молекулярной геометрии двойной спирали ДНК и пептидной β -нити были использованы для того, чтобы найти последовательность нуклеотидных пар для специфического связывания ДНК и пептида Ala-Glu-Asp-Gly. Скрининг показал, что этот тетрапептид может быть размещён в большой канавке ДНК с последовательностью нуклеотидов на ведущей цепи АТТТГ (или АТТТС) в соответствии с комплементарностью расположения их функциональных групп [9, 11].

Для экспериментальной проверки молекулярной модели использованы синтетические препараты: ДНК [поли(dA-dT):поли(dA-dT)] (двойная спираль) и тетрапептид Ala-Glu-Asp-Gly. С помощью гельхроматографии доказано, что пептид Ala-Glu-Asp-Gly образует устойчивый межмолекулярный комплекс с двойной спиралью ДНК [13, 25].

Комплементарное связывание пептида с последовательностью нуклеотидов на ведущей цепи ТАТАТА двойной спирали может быть осуществлено посредством шести водородных и одной гидрофобной связей между функциональными группами обоих участников.

В нормальных физиологических условиях ДНК существует в форме двойной спирали, две

полимерных цепи которой удерживаются вместе водородными связями между парами оснований на каждой цепи. Большинство биологических процессов, включающих ДНК (транскрипция, репликация), требует, чтобы двойная спираль разделилась на отдельные цепи. В частности, известно, что локальное разделение цепей двойной спирали предшествует транскрипции генов РНК полимеразой. Для того, чтобы началась транскрипция (синтез матричной РНК), двойная спираль ДНК должна быть освобождена от гистонов, а в том месте, где начинается синтез матричной РНК, цепи двойной спирали должны быть разделены.

С использованием спектрофотометрии в ультрафиолетовой области растворов синтетической двойной спирали ДНК и тетрапептида Ala-Glu-Asp-Gly обнаружен концентриционно зависимый гиперхромный эффект (увеличение оптической плотности раствора при длине волны 260 нм) в смеси пептида и двуспиральной ДНК. Гиперхромный эффект свидетельствует о частичном разрушении водородных связей между нуклеотидными парами двойной спирали и о локальном разделении цепей двойной спирали (аллостерическое конформационное изменение).

В специальном эксперименте установлено, что разделение цепей (плавление) свободной ДНК происходит при температуре +69,5°C. В системе ДНК с тетрапептидом плавление спирали произошло при +28°C и характеризовалось снижением показателей энтропии и энтальпии примерно в 2 раза [13]. Этот факт указывает на термодинамически облегченный путь разделения цепей ДНК при температурном режиме, характерном для биохимических процессов большинства живых организмов. Эксперименты *in vitro* показывают, что короткий пептид определённой структуры и аминокислотной последовательности может участвовать в активации транскрипции генов на этапе разделения цепей двойной спирали ДНК. Биохимический аспект этого факта состоит в сходстве структуры и аминокислотной последовательности регуляторного пептида и специфического участка пептидной цепи макромолекулярного фактора транскрипции.

Таким образом, изучение биологической активности пептидов на различных структурных уровнях и физико-химических процессов их взаимодействия показало несомненную высокую физиологическую активность пептидных регуляторов. Основным выводом явилось то, что пептиды обладают способностью регулировать экспрессию генов. В доклинических исследованиях установлена высокая биологическая активность и безопасность синтезированных пептидов [10, 11]. Так, введение пептидов Lys-Glu, Ala-Glu-Asp-Gly животным способствовало уменьшению частоты развития опухолей и увеличению средней продолжительности жизни (табл.). Пептид Ala-Glu-Asp-Pro стимулировал регенерацию нерва, пептид Lys-Glu-Asp-Trp снижал уровень глюкозы в

крови у животных с экспериментальным сахарным диабетом [11].

Значительным достижением оказался результат восстановления уровня секреции мелатонина до нормы у старых обезьян после введения пептида эпифиза [11, 24]. У этих же животных после введения пептида восстановился до нормы суточный ритм секреции основного гормона надпочечников – кортизола.

Учитывая достоверные данные, свидетельствующие о высокой геропротекторной активности тканеспецифических, как природных, так и синтетических пептидных препаратов, особое внимание в последние годы было уделено изучению геропротекторной активности пептидов у людей пожилого и старческого возраста [7, 8]. Так, ежегодное курсовое применение препаратов тимуса и эпифиза привело к достоверному снижению смертности, что было связано с улучшением функции иммунной, эндокринной, сердечно-сосудистой систем, мозгам, повышением плотности костной ткани [7]. Следует отметить, что применение препарата тимуса привело к снижению в 2 раза частоты острых респираторных заболеваний. Особенно значимым явился факт восстановления уровня секреции мелатонина у пациентов после введения препарата эпифиза [8]. Эти результаты открывают определенные перспективы для решения некоторых демографических проблем.

Выводы

1. Исследование механизмов старения показало, что в основе этого процесса лежит инволюция основных органов и тканей организма, которая сопровождается снижением синтеза белка в клетках. Выделенные из органов молодых животных пептиды при введении в организм способны индуцировать синтез белка, что сопровождается восстановлением основных функций.

2. Установлено, что длительное применение у животных (как правило со второй половины жизни) пептидов – как выделенных из органов, так и синтезированных из аминокислот аналогов, приводит к достоверному увеличению средней продолжительности жизни до 25-31 % и достижение видового предела.

3. Обнаружено, что короткие пептиды (ди-, три- и тетрапептиды) способны комплементарно взаимодействовать на промоторном участке генов со специфическими сайтами связывания ДНК, вызывая разделение цепей двойной спирали и активацию РНК полимеразы. Выявление феномена пептидной активации транскрипции генов указывает на природный механизм поддержания физиологических функций организма, в основе которого лежит комплементарное взаимодействие ДНК и регуляторных пептидов. Этот процесс является фундаментом развития и функционирования живой материи, а старение представляет собой эволюционно детерминированный биологический процесс возрастного изменения экспрессии и структуры генов.

Профилактическое применение пептидных препаратов у людей привело к значительному восстановлению основных физиологических функций и достоверному снижению смертности в различных возрастных группах в течение периода 6-2 лет.

Литература

1. Анисимов В.Н. Влияние эпиталона и мелатонина на продолжительность жизни и спонтанный канцерогенез у мышей с ускоренным старением (SAM) / В.Н.Анисимов, И.Г.Попович, М.А.Забезинский [и др.] // *Вопр. онкол.* – 2005. – Т. 51, № 1. – С. 93-98.
2. Анисимов В.Н. Влияние полипептидного препарата эпифиза на продолжительность жизни и частоту спонтанных опухолей у старых самок крыс / В.И.Анисимов, В.Х.Хавинсон // *Докл. АН СССР.* – 1991. – Т. 319. – С. 250-253.
3. Снижение порога чувствительности гипоталамо-гипофизарной системы к действию эстрогенов под влиянием экстракта эпифиза у старых самок крыс / В.Н.Анисимов, В.Х.Хавинсон, В.Г.Морозов [и др.] // *Докл. АН СССР.* – 1973. – Т. 213. – С. 483-485.
4. Изучение действия пептидов виллона и эпиталона на экспрессию генов в сердце мыши с помощью технологии на основе микрочипов / С.В.Анисимов, К.Р.Богилер, В.Х.Хавинсон [и др.] // *Бюл. эксперим. биол. и мед.* – 2002. – Т. 133, № 3. – С. 340-347.
5. Влияние пептида Ala-Glu-Asp-Glu на продолжительность жизни и развитие спонтанных опухолей у самок крыс, содержащихся при разных световых режимах / И.А.Виноградова, А.В.Букалев, М.А.Забезинский [и др.] // *Бюл. эксперим. биол. и мед.* – 2007. – Т. 144, № 12. – С. 676-681.
6. Геропротекторный эффект пептида ALA-GLU-ASP-GLY у самцов крыс, содержащихся при разных режимах освещения / И.А.Виноградова, А.В.Букалев, М.А.Забезинский [и др.] // *Бюл. эксперим. биол. и мед.* – 2008. – Т. 145, № 4. – С. 455-460.
7. Геропротекторный эффект пептидного препарата эпифиза эпиталона у пожилых людей с ускоренным старением / О.В.Коркушко, В.Х.Хавинсон, В.Б.Шатило [и др.] // *Бюл. эксперим. биол. и мед.* – 2006. – Т. 142, № 9. – С. 328-332.
8. Влияние пептидного препарата эпиталона на суточный ритм мелатонинобразующей функции эпифиза у людей пожилого возраста / О.В.Коркушко, В.Х.Хавинсон, В.Б.Шатило [и др.] // *Бюл. эксперим. биол. и мед.* – 2004. – Т. 137, № 4. – С. 441-443.
9. Ряднова И.Ю. Взаимодействие дезоксирибонуклеиновой кислоты с белками в модельных системах / И.Ю.Ряднова, Л.К.Шатаева, В.Х.Хавинсон // *Высокомолекулярные соединения.* – 2000. – Т. 42. – С. 833-839.
10. Хавинсон В.Х. Пептидные биорегуляторы и старение / В.Х.Хавинсон, В.Н.Анисимов. – СПб.: Наука, 2003. – 223 с.
11. Пептидная регуляция генома и старение / [Хавинсон В.Х., Анисимов С.В., Малинин В.В., Анисимов В.Н.]. – М.: Изд-во РАМН, 2005. – 208 с.
12. Хавинсон В.Х. Пептид способствует преодолению лимита деления соматических клеток человека / В.Х.Хавинсон, И.Э.Бондарев, А.А.Бутыгов [и др.] // *Бюл. эксперим. биол. и мед.* – 2004. – Т. 137, № 5. – С. 573-577.
13. Хавинсон В.Х. Плавление двойной спирали ДНК при связывании с геропротекторным тетрапептидом / В.Х.Хавинсон, А.Ю.Соловьев, Л.К.Шатаева // *Бюл. эксперим. биол. и мед.* – 2008. – Т. 146, № 11. – С. 560-562.

ФІЗІОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ПЕПТИДНОЇ РЕГУЛЯЦІЇ СТАРІННЯ

В.Х.Хавинсон, В.М.Анісімов

Резюме. Узагальнені результати досліджень, направлені на вивчення механізмів старіння і ефективності пептидних біорегуляторів у профілактиці вікової патології. Запропонована молекулярна модель взаємодії комплементу коротких пептидів із промоторними ділянками генів, яка лежить в основі ініціації синтезу білка. Оцінюються перспективи застосування пептидних біорегуляторів для профілактики передчасного старіння.

Ключові слова: пептидні біорегулятори, старіння, вікова патологія, профілактика.

PHYSIOLOGICAL ASPECTS OF PEPTIDE REGULATION OF AGING

V.Kh.Khavinson, V.N.Anisimov

Abstract. The authors have generalized the results of investigations directed at studying the mechanisms of aging and efficacy of peptide bioregulators in the prophylaxis of age-related pathology. A molecular model of a complementary interaction of short peptides with promoter sites of genes, underlying the initiation of protein synthesis have been proposed. Prospects of applying peptide bioregulators to prevent premature aging are evaluated.

Key words: peptide bioregulators, aging, age-associated pathology, prevention.

Institute of Bioregulation and Gerontology (St. Petersburg, Russia)
N.N.Petrov Research Institute of Oncology (St. Petersburg, Russia)

Рецензент – доц. В.В.Степанчук

Buk. Med. Herald. – 2009. – Vol.13, №4.–P.254-258

Надійшла до редакції 9.07.2009 року