

На правах рукописи



МИРОНОВА

Екатерина Сергеевна

**ПЕПТИДЕРГИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РЕПЛИКАТИВНОГО СТАРЕНИЯ
И НЕЙРОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА**

14.01.30 – геронтология и гериатрия

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2020

Работа выполнена в лаборатории молекулярных механизмов старения отдела биogerонтологии автономной научной некоммерческой организации высшего образования научно-исследовательского центра «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии».

Научные руководители:

заслуженный деятель науки РФ,
член-корреспондент РАН,
доктор медицинских наук, профессор
Хавинсон Владимир Хацкелевич

доктор биологических наук, доцент
Линькова Наталья Сергеевна

Официальные оппоненты:

заведующая отделом общей патологии и патологической физиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины»

член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, доцент
Шамова Ольга Валерьевна

заведующая кафедрой фармакологии, организации и экономики фармации Медицинского института; заведующая лабораторией доклинических исследований, клеточной патологии и биорегуляции Института высоких биомедицинских технологий Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Петрозаводский государственный университет»

доктор медицинских наук, профессор
Виноградова Ирина Анатольевна

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия.

Защита диссертации состоится «___» _____ 2020 г. в _____ часов на заседании Диссертационного совета Д 521.103.01 в АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» по адресу: 197110, Санкт-Петербург, пр. Динамо, д. 3.

С диссертационной работой можно ознакомиться в библиотеке и на сайте АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» <http://www.gerontology.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 521.103.01,
доктор биологических наук, профессор



Козина Людмила Семеновна

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

С возрастом снижается количество мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), регулирующих физиологическое обновление тканей и поддержание гомеостаза в организме человека, что впоследствии нарушает его функционирование [Baker D. et al., 2011]. ММСК широко используются в регенеративной медицине в том числе при возраст-ассоциированных нейродегенеративных заболеваниях [Wagner W. et al., 2010]. Генерация новых нейронов из стволовых клеток, может стать перспективным вариантом лечения для пациентов с патологией нервной системы [Kang J.M. et al., 2016].

Длительное культивирование стволовых клеток в условиях *in vitro* вызывает потерю клеточных функций. ММСК переходят в состояние репликативного старения и становятся непригодными для клинического применения, в котором необходимо использовать большое число клеток с целью регенерации тканей и органов [Turinetti V. et al., 2016; De Becker A. et al., 2016]. ММСК человека, полученные из периодонтальной связки (PDLSCs) и десны (GMSCs), обладают высокой пролиферативной способностью, гомогенностью и стабильным фенотипом [Giacoppo S. et al., 2017; Diomede F. et al., 2018]. PDLSCs и GMSCs относят к ММСК в соответствии с критериями Международного общества клеточной терапии, согласно которым мезенхимальные свойства клеток могут быть идентифицированы по их способности адгезироваться к лабораторному пластику, дифференцироваться при индукции в остеогенном и адипогенном направлении *in vitro*, а также экспрессировать на своей поверхности основную панель специфических для ММСК маркеров: CD13 (миелоидный гликопротеин), CD29 (интегрин β -1), CD44 (рецептор лимфоцитов), CD73 (Т- и В-клеточный маркер), CD90 (Т-клеточный маркер), CD105 (маркер ангиогенеза), но при этом не содержать маркеры гемопоэтических стволовых клеток (ГСК): CD14 (рецептор липополисахаридов), CD34 (маркер гемопоэза, молекула клеточной адгезии), CD45 (маркер лейкоцитов) или CD11b (маркер клеток миелопоэза), CD79a (В-клеточный маркер) или CD19 (ко-рецептор В-лимфоцитов) и HLA-DR (лейкоцитарный антиген человека, молекула главного комплекса гистосовместимости II класса) [Dominici M. et al., 2006].

Короткие олигопептиды являются сигнальными молекулами, способными взаимодействовать с ДНК и гистонами, эпигенетически регулировать экспрессию генов и синтез белков [Khavinson V.Kh. et al., 2016], обеспечивая поддержание гомеостаза клеток, тканей и органов при их старении. Тетрапептид AEDG (Ala-Glu-Asp-Gly) индуцирует активность каталитической субъединицы теломеразы и модулирует длину теломер в культуре фибробластов легкого и лимфоцитах крови человека [Khavinson V.Kh. et al., 2003; Khavinson V.Kh. et al., 2004], ингибирует синтез каспазы-3 (белок апоптоза), MMP9, CD98hc (белки старения и дисфункции клеток), повышает синтез Ki67 (пролиферативный белок) в культурах фибробластов кожи при их репликативном старении [Lin'kova N.S. et al., 2016]. Пептид AEDG индуцирует деконденсацию гетерохроматина вблизи центромер в лимфоцитах крови у лиц пожилого и старческого возраста [Khavinson V.Kh. et al., 2003], способствует увеличению продолжительности жизни *in vivo* [Rosenfeld S.V. et al., 2002]. Трипептид KED (Lys-Glu-Asp) обладает вазопротекторной активностью в культурах эндотелия при старении, которая была реализована посредством эпигенетической регуляцией повышения синтеза Ki67 и понижения синтеза p53 [Khavinson V.Kh. et al., 2014]. Пептид способствует восстановлению синаптической передачи при нейродегенерации, повышая количество грибовидных шипиков в культуре нейронов гиппокампа в модели болезни Альцгеймера у мышей [Красковская Н.А. и др., 2017], а также стимулирует экспрессию серотонина в культурах клеток коры головного мозга при их старении [Хавинсон В.Х. и др., 2014].

Таким образом, пептиды AEDG и KED являются потенциальными веществами, способными поддерживать морфологию и функциональную активность ММСК, защищая клетки от репликативного старения при их длительном культивировании, которое необходимо для клеточной терапии. Предполагается, что пептиды AEDG и KED способны регулировать

дифференцировку ММСК в нейрогенном направлении, что является одной из актуальных и перспективных областей клеточной геронтологии и нейротрансплантологии.

Цель и задачи исследования

Цель исследования – изучить влияние пептидов AEDG и KED на репликативное старение и дифференцировку денальных стволовых клеток человека в нейрогенном направлении. Для достижения указанной цели были поставлены и последовательно решены следующие задачи.

1. Провести фенотипирование стволовых клеток периодонтальной связки и мезенхимальных стволовых клеток десны человека.
2. Изучить влияние пептида AEDG на экспрессию генов и синтез белков репликативного старения (p16, p21) в стволовых клетках периодонтальной связки и мезенхимальных стволовых клетках десны человека.
3. Оценить влияние пептида KED на экспрессию генов и синтез белков репликативного старения (p16, p21) в стволовых клетках периодонтальной связки и мезенхимальных стволовых клетках десны человека.
4. Изучить влияние пептида AEDG на экспрессию генов и синтез белков нейрогенеза (нестин, β -тубулин III, GAP43, даблкортин) в стволовых клетках периодонтальной связки и мезенхимальных стволовых клетках десны человека.
5. Оценить влияние пептида KED на экспрессию генов и синтез белков нейрогенеза (нестин, β -тубулин III, GAP43, даблкортин) в стволовых клетках периодонтальной связки и мезенхимальных стволовых клетках десны человека.

Научная новизна

В работе впервые изучена способность пептидов AEDG и KED влиять на процесс репликативного старения денальных стволовых клеток. Установлено, что пептиды AEDG и KED замедляют репликативное старение клеток периодонтальной связки и мезенхимальных стволовых клеток десны человека в условиях *in vitro*, снижая экспрессию генов и синтез белков p16 и p21 в исследованных культурах.

В работе впервые изучена способность пептидов AEDG и KED влиять на нейрогенез денальных стволовых клеток. Установлено, что пептиды AEDG и KED индуцируют дифференцировку клеток периодонтальной связки и мезенхимальных стволовых клеток десны человека в нейрогенном направлении *in vitro*, повышая экспрессию генов и синтез белков нестина, β -тубулина III, GAP43, даблкортина в исследованных культурах.

Практическая значимость

Исследование влияния пептидов AEDG и KED на репликативное старение денальных стволовых клеток в условиях *in vitro* позволило установить, что изученные пептиды могут быть использованы в качестве дополнительных веществ в культуральных средах с целью снижения экспрессии маркеров репликативного старения p16, p21 и стимулирования широкомасштабной экспансии мезенхимальных мультипотентных стволовых клеток *in vitro*. Практическая значимость работы состоит в том, что пептиды могут обеспечить необходимую для клинического применения низкую степень старения клеток при их длительном культивировании.

Кроме того, установлена способность пептидов AEDG и KED увеличивать экспрессию генов и синтез белков нейрогенеза (нестин, β -тубулин III, GAP43, даблкортин) в культурах денальных стволовых клеток. Таким образом, изученные пептиды могут быть рекомендованы в качестве средств, стимулирующих дифференцировку стволовых клеток в нейрогенном направлении. Практическая значимость работы состоит в том, что индуцированные мезенхимальные мультипотентные стволовые клетки могут быть использованы в регенеративной медицине для нейротрансплантации в поврежденную область

нервной системы с целью профилактики и лечения нейродегенеративных заболеваний, ассоциированных с возрастом.

Положения, выносимые на защиту

1. Используемые в исследовании клеточные культуры стволовых клеток периодонтальной связки и мезенхимальных стволовых клеток десны человека обладают иммунофенотипом мезенхимальных мультипотентных стволовых клеток (позитивны в отношении молекул CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 и негативны в отношении гемопоэтических поверхностных молекул CD14, CD34 и CD45), а также способностью к мезенгенной дифференцировке, что соответствует минимальным необходимым и достаточным критериям, принятым международным сообществом по клеточной терапии.
2. Пептид AEDG снижает экспрессию генов и синтез белков репликативного старения p16 и p21 в стволовых клетках периодонтальной связки и в мезенхимальных стволовых клетках десны человека. Пептид AEDG стимулирует экспансию мезенхимальных стволовых клеток *in vitro* и замедляет их репликативное старение.
3. Пептид KED снижает экспрессию генов и синтез белков p16 и p21 в стволовых клетках периодонтальной связки и в мезенхимальных стволовых клетках десны человека. Пептид KED стимулирует экспансию мезенхимальных стволовых клеток *in vitro* и замедляет их репликативное старение.
4. Пептид AEDG повышает экспрессию генов и синтез белков нейрогенеза: нестин, β -тубулин III, GAP43, даблкортин в стволовых клетках периодонтальной связки и в мезенхимальных стволовых клетках десны человека. Пептид AEDG способен индуцировать дифференцировку дентальных стволовых клеток в нейрогенном направлении посредством повышения экспрессии генов и синтеза белков, ответственных за нейрогенез.
5. Пептид KED повышает экспрессию генов и синтез белков: нестин, β -тубулин III, GAP43, даблкортин в стволовых клетках периодонтальной связки и в мезенхимальных стволовых клетках десны человека. Пептид KED способен индуцировать дифференцировку дентальных стволовых клеток в нейрогенном направлении посредством повышения экспрессии генов и синтеза белков, ответственных за процесс нейрогенеза.

Связь с научно-исследовательской работой института

Диссертационная работа является научной темой, выполняемой по основному плану научно-исследовательских работ АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии».

Публикации по теме диссертации

Общее количество научных трудов, в том числе и не по теме диссертации – 69. По материалам диссертации опубликовано 32 научные работы, в том числе 7 статей в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации для опубликования материалов диссертационных исследований (из них 4 статьи, индексируемые в Scopus и Web of Science), 1 глава в коллективной монографии, 1 статья в другом журнале и 23 тезиса докладов.

Апробация и реализация диссертации

Основные материалы диссертации доложены на научно-практической конференции «Инновационные Российские технологии в геронтологии и гериатрии» (Санкт-Петербург, 2017); международном симпозиуме «Effective current approaches in anti-aging medicine and gerontology» (Stockholm, Sweden, 2018); XIII международном форуме «Старшее поколение» (Санкт-Петербург, 2018); XIV научно-практической геронтологической конференции «Пушковские чтения» (Санкт-Петербург, 2018); международном симпозиуме «Effective current approaches in anti-aging medicine and gerontology» (Stockholm, Sweden, 2019); XIV

международном форуме «Старшее поколение» (Санкт-Петербург, 2019); международном конгрессе «International Association of Gerontology and Geriatrics European Region Congress» (Gothenburg, Sweden, 2019); Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 170-летию со дня рождения И.П. Павлова (Санкт-Петербург, 2019); Европейском конгрессе по превентивной регенеративной и антивозрастной медицине – ESCOPRAM (Геленджик, 2019); Всероссийском форуме с международным участием «Продуктивное долголетие: доказательная медицина и трансдисциплинарный синтез» (Москва, 2019); XV научно-практической геронтологической конференции «Пушковские чтения» (Санкт-Петербург, 2019); международном симпозиуме «Regenerative medicine and ageing» (Dubai, UAE, 2020).

Личный вклад автора

Личный вклад автора (не менее 85%) в диссертационное исследование состоял в разработке плана исследования, проведении опытов, статистической обработке и анализе полученных данных. В задачи автора входило изучение влияния пептидов AEDG и KED на экспрессию генов и синтез белков репликативного старения (p16, p21) и нейрогенной дифференцировки (нестин, β -тубулин III, GAP43, даблкортин) в стволовых клетках периодонтальной связки и мезенхимальных стволовых клетках десны человека. Автор принимала участие во всех экспериментах, включавших в себя изолирование и культивирование клеток, проточный цитофлуориметрический анализ, индукцию мезенхимной дифференцировки, гистологическое и иммунофлуоресцентное окрашивание, световую и лазерную сканирующую конфокальную микроскопию, морфометрию, полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени с реакцией обратной транскрипции. Автор также принимала участие в анализе данных, статистической обработке полученных результатов исследования, написании статей, главы в монографии, тезисов, выступлении с докладами на международных и отечественных конференциях.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, содержащего актуальность проведенной работы, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и указателя литературы. Текст диссертации изложен на 112 страницах, содержит 6 таблиц, иллюстрирован 23 рисунками. Список литературы содержит 173 источника, из них на русском языке – 36, на английском – 137.

Благодарность

Автор выражает благодарность за научную консультацию заведующей лабораторией фармакологии и пептидов отдела биogerонтологии АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» доктору биологических наук И.Г. Попович, руководителю отдела клеточной биологии и патологии АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии», заслуженному деятелю науки РФ, доктору медицинских наук, профессору И.М. Кветному, заместителю директора по научной работе и новым технологиям АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии», заслуженному деятелю науки РФ, доктору медицинских наук, профессору Г.А. Рыжак.

Автор также выражает благодарность за возможность проведения экспериментов и помощь в освоении методик научным сотрудникам департамента Medical, Oral and Biotechnological Sciences, University G. d'Annunzio of Chieti–Pescara, Ph.D., Francesca Diomede, Ph.D. Bruna Sinjari, руководителю департамента Medical, Oral and Biotechnological Sciences, University G. d'Annunzio of Chieti–Pescara, профессору Oriana Trubiani, M.D., ректору University G. d'Annunzio of Chieti–Pescara, профессору Sergio Caputi, M.D., D.D.S.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение культур денальных стволовых клеток

Исследование проводилось в департаменте Medical, Oral and Biotechnological Sciences, University “G. d’Annunzio”, Chieti–Pescara, Italy.

Стволовые клетки периодонтальной связки человека

PDLSCs были получены из биоптатов связок пародонта пациентов после подписания информированного согласия. В исследование были включены 5 мужчин и 5 женщин (возрастной диапазон: 20-40 лет). У всех добровольцев отсутствовали системные заболевания. Биопсии были получены из альвеолярного отростка и горизонтальных волокон периодонтальной связки путем соскабливания корней некариозных третьих моляров с помощью кюреток Грейси. Фрагменты ткани помещали в чашку Петри со специализированной средой для роста мезенхимальных стволовых клеток MSCGM-CD (Mesenchymal Stem Cell Growth Medium Chemically Defined, Lonza, Швейцария) [Trubiani O. et al., 2015] и инкубировали при температуре 37°C, 80% влажности и 5% CO₂. Среду заменяли каждые 2 дня. Через 14 дней PDLSCs самопроизвольно мигрировали из эксплантатов ткани и были выделены с использованием 0,1% раствора трипсина. Клетки 2 пассажа высевали в чашки Петри с плотностью 1×10^3 клеток/см² и использовали в последующих этапах эксперимента.

Мезенхимальные стволовые клетки десны человека

GMSCs были изолированы из ткани десны, которую получали во время хирургической резекции десны при удалении зуба или других ортодонтических манипуляциях. В это исследование были включены 5 мужчин и 5 женщин (возрастной диапазон: 20-40 лет). Все добровольцы не имели системных заболеваний и подписали информированное согласие. Образцы ткани помещали в чашку Петри со средой MSCGM-CD (Lonza, Швейцария) и инкубировали при температуре 37°C, 80% влажности и 5% CO₂. Замену среды производили каждые 2 дня. GMSCs самопроизвольно мигрировали из ткани десны через 14 дней культивирования [Libro R. et al., 2016], после чего были выделены с использованием 0,1% раствора трипсина. Клетки 2 пассажа высевали в чашки Петри с плотностью 1×10^3 клеток/см² и использовали в последующих этапах эксперимента.

Определение мезенхимального фенотипа у полученных культур денальных стволовых клеток

Для оценки мезенхимальных свойств культур PDLSCs и GMSCs было выполнено флуоресцентное цитофлуориметрическое детектирование поверхностных мезенхимальных и гемопоэтических маркеров, а также индукция мезенхимной дифференцировки клеток в адипогенном и остеогенном направлениях.

Проточный цитофлуориметрический анализ стволовых антигенов

Цитофлуориметрический анализ проводили, как описано ранее [Diomedea F. et al., 2016]. В культурах PDLSCs и GMSCs методом цитофлуориметрии исследовали наличие экспрессии поверхностных маркеров CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 – специфических для ММСК, а также отсутствие экспрессии маркеров CD14, CD34, CD45 – специфических для ГСК. Клетки в количестве 5×10^5 фиксировали 4% параформальдегидом в течении 30 минут. Пермеабиллизацию клеток для внутриклеточного окрашивания проводили растворами для лизиса Permeabilizing Solution 2 (BD Bioscience, США). После чего клетки инкубировали с буфером, содержащим антитела, конъюгированные с флуоресцеин-5-изотиоцианатом (FITC): CD13/FITC, CD14/FITC, CD44/FITC, CD45/FITC, CD90/FITC и антитела, конъюгированные с фикоэритрином (PE): CD29/PE, CD34/PE, CD73/PE, CD105/PE (BD Bioscience, США) в течение 60 минут при температуре 4°C. Анализ поверхностных маркеров проводили с

использованием системы проточной цитометрии FACStarPLUS и программного обеспечения FlowJo™ (TreeStar, США). Неокрашенные клетки являлись отрицательным контролем.

Индукционная мезенхимная дифференцировка дентальных стволовых клеток

Для оценки способности клеточных культур PDLSCs и GMSCs дифференцироваться в остеогенную и адипогенную приверженность клетки поддерживались в остеогенных и адипогенных условиях в течение 21 и 28 дней соответственно, согласно протоколу [Diomedea F. et al., 2017]. Для индукции остеогенной дифференцировки клеток использовали специализированную дифференцировочную среду Human Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation Medium BulletKit™ (Lonza Group, Швейцария). Для индукции адипогенной дифференцировки клеток использовали специализированную дифференцировочную среду Human Mesenchymal Stem Cell Adipogenic Differentiation Medium BulletKit™ (Lonza Group, Швейцария). Чтобы качественно оценить образование минерализованных осадков костного матрикса и липидных вакуолей, после периода дифференциации (21, 28 дней) окрашивание минерализованных отложений проводили при помощи Alizarin Red S (Sigma-Aldrich, Италия), а накопление липидных капель и содержание триглицеридов оценивали соответственно при помощи AdipoRed™ Assay Reagent (Lonza Group, Швейцария). Ядра клеток окрашивали гематоксилином. Для визуализации дифференцированных образцов PDLSCs и GMSCs использовали инвертированный световой микроскоп Leica DMIL (Leica Microsystem, Италия).

Чтобы количественно подтвердить способность клеток дифференцироваться в остеогенную и адипогенную приверженность, экспрессию RUNX-2, ALP (маркеры ранних предшественников остеобластов) и FABP4, PPAR γ (маркеры предшественников адипоцитов) оценивали с помощью количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с реакцией обратной транскрипции (RT-qPCR), согласно литературе [Cianci E. et al., 2016]. Для анализа экспрессии исследуемых генов использовались коммерчески доступные наборы TaqMan® (RUNX-2 Hs00231692_m1; ALP Hs01029144_m1; FABP4 Hs01086177_m1; PPAR γ Hs01115513_m1) и TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, США) согласно рекомендации производителя. Бета-2-микроглобулин (B2M Hs99999907_m1) (Applied Biosystems, США) использовали для нормализации и калибровки матрицы. RT-qPCR проводили в 3 независимых экспериментах, и для каждого образца проводили повторные определения.

Дизайн экспериментов по влиянию пептидов на репликативное старение и нейрогенную дифференцировку дентальных стволовых клеток

Изучение влияния пептидов AEDG и KED на репликативное старение GMSCs и PDLSCs проводили на клетках 25 пассажа. Изучение влияния пептидов на нейрогенную дифференцировку GMSCs и PDLSCs проводили на клетках 3 пассажа. Клетки 3 и 25 пассажа были разделены на 6 групп: 1 – контрольная группа клеток PDLSCs (без добавления пептидов), 2 – клетки PDLSCs, обработанные пептидом AEDG (0,01 мкг/мл), 3 – клетки PDLSCs, обработанные пептидом KED (0,01 мкг/мл), 4 – контрольная группа клеток GMSCs (без добавления пептидов), 5 – клетки GMSCs, обработанные пептидом AEDG (0,01 мкг/мл), 6 – клетки GMSCs, обработанные пептидом KED (0,01 мкг/мл). Пептиды разбавляли до используемой концентрации в натрий-фосфатном буфере (PBS), добавляли в клеточную среду и меняли каждые 3 дня культивирования. Клетки инкубировали в 5% CO₂-инкубаторе при температуре 37°C и влажности 80%. На 7 день обработки пептидами клеточные культуры анализировали методом иммунофлуоресценции и RT-qPCR по экспрессии маркеров репликативного старения: p16, p21 и маркеров нейрогенной дифференцировки: нестин, β -тубулин III, GAP43, даблкортин.

Для индукции нейрогенной дифференцировки клетки GMSCs и PDLSCs культивировали в специализированной дифференцировочной среде Neurobasal-A (Gibco, Life Technologies, Италия) в течение 10 дней. Замену среды производили каждые 3 дня согласно стандартному протоколу [Trubiani O. et al., 2016].

Иммунофлуоресцентный анализ

Клетки фиксировали в 4% растворе параформальдегида, разведенном в 0,1 М PBS при комнатной температуре и 7,4 pH в течение 30 минут. Пермеабиллизацию клеток проводили в течение 10 минут 0,1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, США), разведенном в PBS. После чего клетки блокировали от неспецифического связывания в течение 30 минут в 5% обезжиренном молоке, разведенном в PBS. Клетки инкубировали с мышиными моноклональными антителами p16 (Santa Cruz Biotechnology, США), p21 (1:200; Abcam, Италия), нестин (1:200; Santa Cruz Biotechnology, США), GAP43 (1:500; Sigma Aldrich, Италия), β -тубулин III (1:250; Santa Cruz Biotechnology, США) и даблкортин (1:200; Abcam, Италия) – в качестве первичных антител и Alexa Fluor 568 (Molecular Probes, США) в качестве вторичного антитела. Все образцы инкубировали с флуоресцентным конъюгатом фаллоидина Alexa Fluor 488 (1:200; Life Technologies, Италия) в качестве маркера актинового цитоскелета и с TO-PRO (Thermo Fisher Scientific, США) для визуализации ядер [Diomedea F. et al., 2017]. Экспрессию маркеров репликативного старения и нейрогенной дифференцировки качественно исследовали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Zeiss LSM800 META (Zeiss, Германия), подключенного к инвертированному микроскопу Zeiss Axiovert 200, оборудованному масляным иммерсионным объективом Plan Neofluar (40 \times /1,3NA). Конфокальные изображения получали с использованием излучения аргонового лазера с линиями возбуждения при $\lambda=488$ нм и гелий-неонового источника при $\lambda=543, 633$ нм.

Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени с реакцией обратной транскрипции

Маркеры репликативного старения и нейрогенной дифференцировки оценивали с помощью метода RT-qPCR. Общую РНК выделяли с использованием набора Total RNA Purification Kit (NorgenBiotek Corp., США) в соответствии с инструкциями производителя. Реагенты обратной транскриптазы M-MLV (Applied Biosystems, США) были использованы для создания комплиментарной ДНК. RT-qPCR проводили с использованием системы Mastercycler ep realplex real-time PCR (Eppendorf, Германия). Для исследования экспрессии генов согласно стандартному протоколу использовали наборы TaqMan[®] Gene Expression Cells-to-Ct[™] Kit (p16 Hs00923894_m1; p21 Hs01040810_m1; Nestin Hs04187831_g1; GAP43 Hs00967138_m1; β Tubulin III Hs00801390_s1; Doublecortin Hs00167057_m1) (Applied Biosystems, США), позволяющие проводить исследование непосредственно в культурах клеток без выделения и очищения РНК. Для обеспечения высокой чувствительности метода применяли TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, США). Бета-2-микроглобулин (B2M Hs99999907_m1) (Applied Biosystems, США) использовали для нормализации и калибровки матрицы [Diomedea F. et al., 2016]. RT-qPCR проводили в 3 независимых экспериментах, для каждого образца проводили повторные определения.

Исследуемые пептиды и сигнальные молекулы

В работе изучали тетрапептид AEDG (Ala-Glu-Asp-Gly, эпиталон), который был синтезирован на основе анализа аминокислотного состава полипептидного комплекса, выделенного из эпифизов мозга крупного рогатого скота [Хавинсон В.Х., 2000]. Также исследовали влияние трипептида KED (Lys-Glu-Asp, везуген), который был синтезирован на основе анализа аминокислотного состава полипептидного комплекса, выделенного из сосудов крупного рогатого скота [Хавинсон В.Х. и др., 2007].

В исследовании были изучены сигнальные молекулы p16 и p21, так как экспрессия этих генов и синтез белков играет ключевую роль в процессах клеточного цикла и старения клеток. Повышенная активность p16, стимулируемая окислительным стрессом или повреждением ДНК, способствует старению клеток и снижает способность стволовых клеток к самообновлению [Rayess H. et al., 2012]. Клетки с высокой экспрессией p21 переходят в состояние покоя (фазу G₀), индуцируя клеточное старение, тогда как клетки с низкой экспрессией p21 продолжают пролиферировать [Wani W.Y. et al., 2017].

В качестве маркеров нейрогенной дифференцировки были выбраны сигнальные молекулы нестин, β -тубулин III, GAP43, даблкортин. GAP43 является маркером нейрональной пластичности, так как высокие уровни экспрессии данного белка наблюдаются в конусе роста аксона в течение его развития и регенерации, а также после долговременной потенциации [Zhao J.C. et al., 2012]. Нестин экспрессируется нейрональными клетками-предшественниками в процессе их дифференцировки во время постнатального нейрогенеза, после детерминации стволовых клеток в нейроны экспрессия нестина подавляется [Yan S. et al., 2016]. β -тубулин III является нейрон-специфическим маркером, инактивация которого приводит к нарушению пролиферации нервных мультипотентных предшественников [Kamande J.W. et al., 2019]. Уникальный паттерн экспрессии даблкортина заключается в том, что данный белок экспрессируется исключительно нейрональными клетками-предшественниками с незамедлительным затуханием экспрессии после окончательного превращения в развитые нейроны [Burger D. et al., 2016].

Статистический анализ данных

Результаты исследований анализировали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism версии 6.0 (GraphPad Software, США) по показателю экспрессии мРНК генов, кодирующих RUNX-2, ALP, FABP4, PPAR γ , а также p16, p21, нестин, β -тубулин III, GAP43, даблкортин. Методы описательной статистики включали в себя оценку среднего арифметического значения и стандартного отклонения от среднего значения. Различия между уровнями исследуемого фактора оценивались с помощью двустороннего дисперсионного теста. Для выполнения большого числа попарных сравнений групповых средних без потери статистической мощности был применен критерий Тьюки. Значение $p < 0,01$ считалось статистически значимым во всех проведенных тестах.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Определение мезенхимального иммунофенотипа у денальных стволовых клеток

Идентификацию фенотипа мезенхимальных стволовых клеток у полученных клеточных культур 3 пассажа проводили с использованием метода флуоресцентной проточной цитометрии. Клетки PDLSCs и GMSCs оказались позитивны в отношении мезенхимальных поверхностных молекул CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 и отрицательны для гемопоэтических молекул CD14, CD34 и CD45, что соответствует необходимому минимуму идентификации иммунофенотипа ММСК (табл. 1).

Таблица 1.

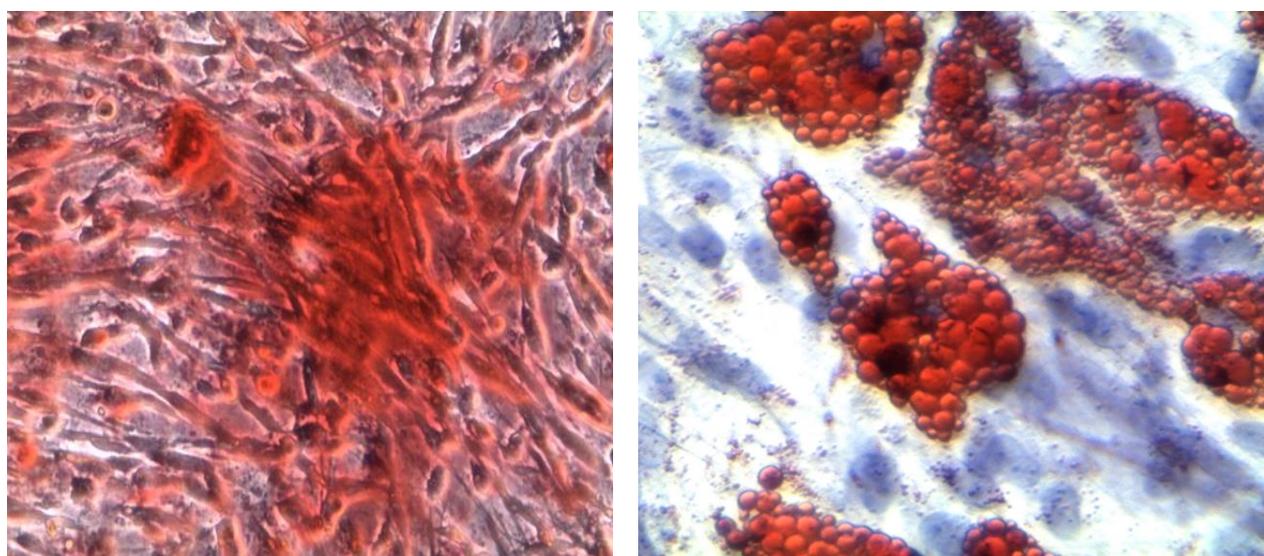
Проточный цитофлуориметрический анализ мезенхимальных и гемопоэтических стволовых антигенов в PDLSCs и GMSCs

| Специфические поверхностные молекулы | Исследуемый антиген | Клеточная культура | |
|--------------------------------------|---------------------|---|------------------|
| | | PDLSCs | GMSCs |
| | | Средняя интенсивность флуоресценции (MFI), усл. ед. | |
| Мезенхимального фенотипа | CD13 | 154,6 \pm 28,2 | 173,4 \pm 21,7 |
| | CD29 | 114,4 \pm 15,8 | 195,2 \pm 22,3 |
| | CD44 | 164,7 \pm 31,4 | 187,8 \pm 27,3 |
| | CD73 | 31,8 \pm 1,6 | 29,4 \pm 2,9 |
| | CD90 | 270,7 \pm 31,8 | 296,4 \pm 28,2 |
| | CD105 | 9,5 \pm 2,7 | 9,1 \pm 1,3 |
| Гемопоэтического фенотипа | CD14 | Не обнаружено | Не обнаружено |
| | CD34 | Не обнаружено | Не обнаружено |
| | CD45 | Не обнаружено | Не обнаружено |

Примечание. Показатель MFI представляет собой среднее арифметическое значение, полученное при проведении флуориметрии 3 независимо измеряемых образцов клеток \pm стандартное отклонение.

Индукцированная мезенхимная дифференцировка дентальных стволовых клеток

Для идентификации мезенхимальных стволовых свойств клеток качественно и количественно была оценена способность PDLSCs и GMSCs дифференцироваться в остеогенную и адипогенную линию при индукции. Индикатор Alizarin Red S показал позитивное красное окрашивание отложений кальция в дифференцированных клетках PDLSCs на 21 день после направленной остеогенной индукции (рис. 1 А). Индикатор AdipoRed показал позитивное красное окрашивание липидных капель, локализованных в цитоплазме дифференцированных клеток GMSCs на 28 день после индукции адипогенеза (рис. 1 Б). PDLSCs и GMSCs, культивируемые в остеогенных условиях, методом RT-qPCR показали повышенную статистически значимую экспрессию маркеров остеогенеза RUNX2 и ALP по сравнению с недифференцированными образцами контрольной группы. Экспрессия мРНК транскриптов RUNX2 и ALP в дифференцированных клетках PDLSCs была выше в 1,72 и 1,89 раза соответственно по сравнению с соответствующим контролем (табл. 2, рис. 2). Экспрессия мРНК транскриптов RUNX2 и ALP в дифференцированных клетках GMSCs была выше в 1,55 и 1,73 раза соответственно по сравнению с недифференцированными клетками контрольной группы (табл. 2, рис. 2).



А

Б

Рисунок 1. Качественный анализ остеогенной и адипогенной индуцированной дифференцировки PDLSCs и GMSCs: **А** – Микрофотография культуры PDLSCs после индукции остеогенной дифференцировки на 21 день. Красным цветом обозначено позитивное окрашивание Alizarin Red S отложений кальция. Увеличение: $\times 100$; **Б** – Микрофотография культуры GMSCs после индукции адипогенной дифференцировки на 28 день. Красным цветом обозначено позитивное окрашивание AdipoRed внутриклеточных липидных везикул. Увеличение: $\times 400$. Окраска ядер клеток – гематоксилин.

Таблица 2.

| Относительная экспрессия мРНК генов остеогенной дифференцировки | | |
|---|-----------------|--|
| Культура клеток | Молекула маркер | Относительная экспрессия мРНК (среднее значение \pm стандартное отклонение) |
| PDLSCs | RUNX2 | 1,720 \pm 0,028* |
| | ALP | 1,890 \pm 0,069* |
| GMSCs | RUNX2 | 1,545 \pm 0,051* |
| | ALP | 1,725 \pm 0,048* |

* $p < 0,01$ по сравнению с группой контроля (недифференцированные клетки). Экспрессия мРНК RUNX2 и ALP в контроле принята за 1.

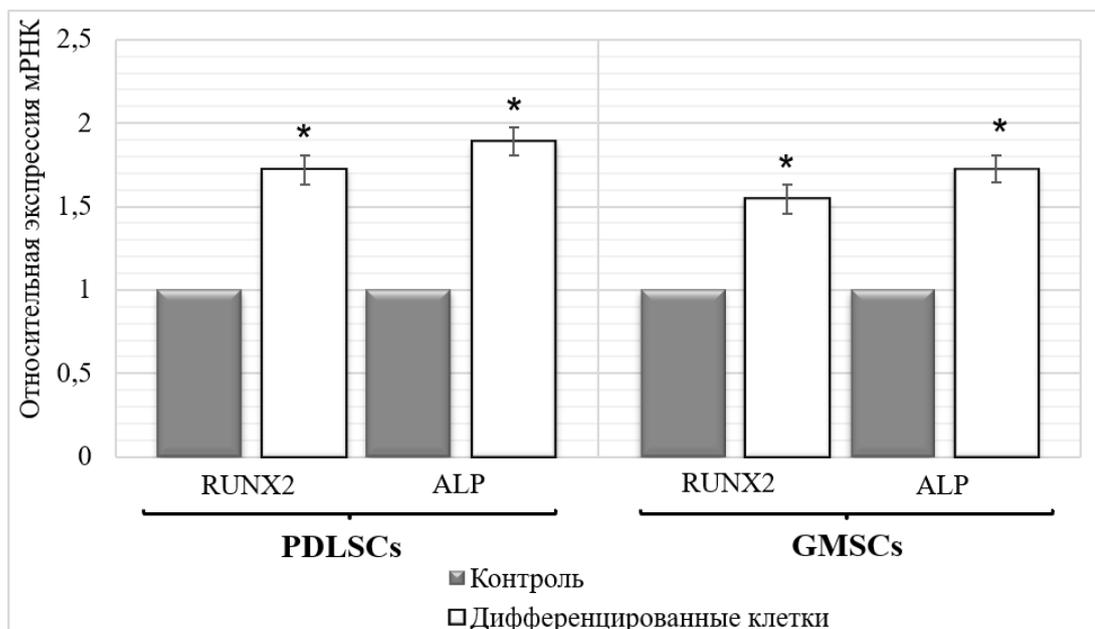


Рисунок 2. Количественный анализ остеогенной дифференцировки культур PDLSCs и GMSCs. Относительная экспрессия мРНК генов ALP и RUNX2, полученная с помощью метода RT-qPCR на 21 сутки культивирования PDLSCs и GMSCs в остеогенных условиях.

* $p < 0,01$ по сравнению с группой контроля (недифференцированные клетки).

Клетки, дифференцированные в адипогенную приверженность, методом RT-qPCR показали повышенную статистически значимую экспрессию маркеров предшественников адипоцитов FABP4 и PPAR γ по сравнению с недифференцированными образцами контрольной группы. Экспрессия мРНК транскриптов FABP4 и PPAR γ в дифференцированных клетках PDLSCs была выше в 3,41 и 2,13 раза по сравнению с соответствующим контролем (табл. 3, рис. 3). Экспрессия мРНК транскриптов FABP4 и PPAR γ в дифференцированных клетках GMSCs была выше в 3,18 и 2,39 раза соответственно по сравнению с недифференцированными клетками контрольной группы (табл. 3, рис. 3).

Таблица 3.

Относительная экспрессия мРНК генов адипогенной дифференцировки

| Культура клеток | Молекула маркер | Относительная экспрессия мРНК (среднее значение \pm стандартное отклонение) |
|-----------------|-----------------|---|
| PDLSCs | FABP4 | 3,411 \pm 0,045* |
| | PPAR γ | 2,133 \pm 0,058* |
| GMSCs | FABP4 | 3,180 \pm 0,022* |
| | PPAR γ | 2,387 \pm 0,074* |

* $p < 0,01$ по сравнению с группой контроля (недифференцированные клетки). Экспрессия мРНК FABP4 и PPAR γ в контроле принята за 1.

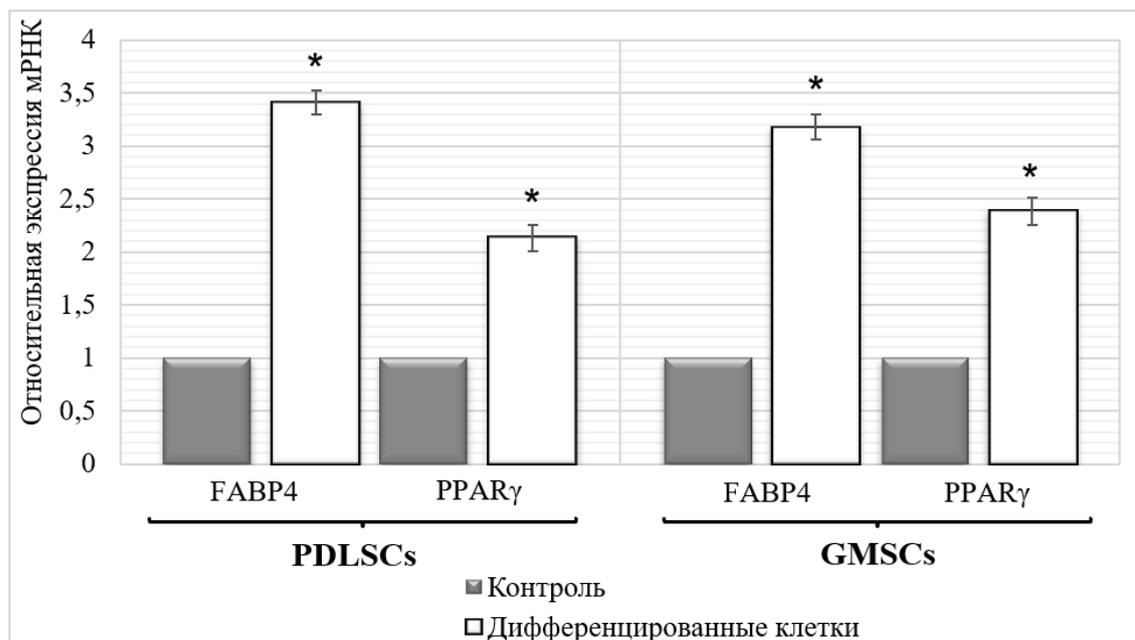


Рисунок 3. Количественный анализ адипогенной дифференцировки культур PDLSCs и GMSCs. Относительная экспрессия мРНК генов FABP4 и PPAR γ , полученная с помощью метода RT-qPCR на 28 сутки культивирования PDLSCs и GMSCs в адипогенных условиях.

* $p < 0,01$ по сравнению с группой контроля (недифференцированные клетки).

Таким образом, согласно минимальным необходимым и достаточным критериям идентификации ММСК, принятых международным сообществом по клеточной терапии [Dominici M. et al., 2006], была доказана мезенхимальная принадлежность полученных клеточных культур PDLSCs и GMSCs. Данные эксперимента подтверждены качественно и количественно, что позволяет использовать полученные культуры PDLSCs и GMSCs в дальнейшем исследовании.

Влияние пептидов AEDG и KED на репликативное старение дентальных стволовых клеток

Определение геропротекторных свойств пептидов AEDG и KED в отношении репликативного старения культур PDLSCs и GMSCs проводили на клетках 25 пассажа. Для качественного анализа использовали метод иммунофлуоресцентного окрашивания, для количественного был использован метод RT-qPCR по показателю относительной экспрессии мРНК генов p16 и p21.

Имунофлуоресцентный анализ синтеза белков репликативного старения в дентальных стволовых клетках

Имунофлуоресцентный анализ синтеза белков репликативного старения проводили с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа. Необработанные пептидами культуры клеток 25 пассажа PDLSCs и GMSCs показали позитивное окрашивание в отношении маркеров репликативного старения p16 и p21, локализующихся в ядре клеток. В то время, как 25 пассаж клеток PDLSCs и GMSCs после 7 дней обработки пептидами AEDG и KED (0,01 мкг/мл) продемонстрировали негативное иммунофлуоресцентное окрашивание в отношении маркеров репликативного старения p16 и p21 (рис. 4).

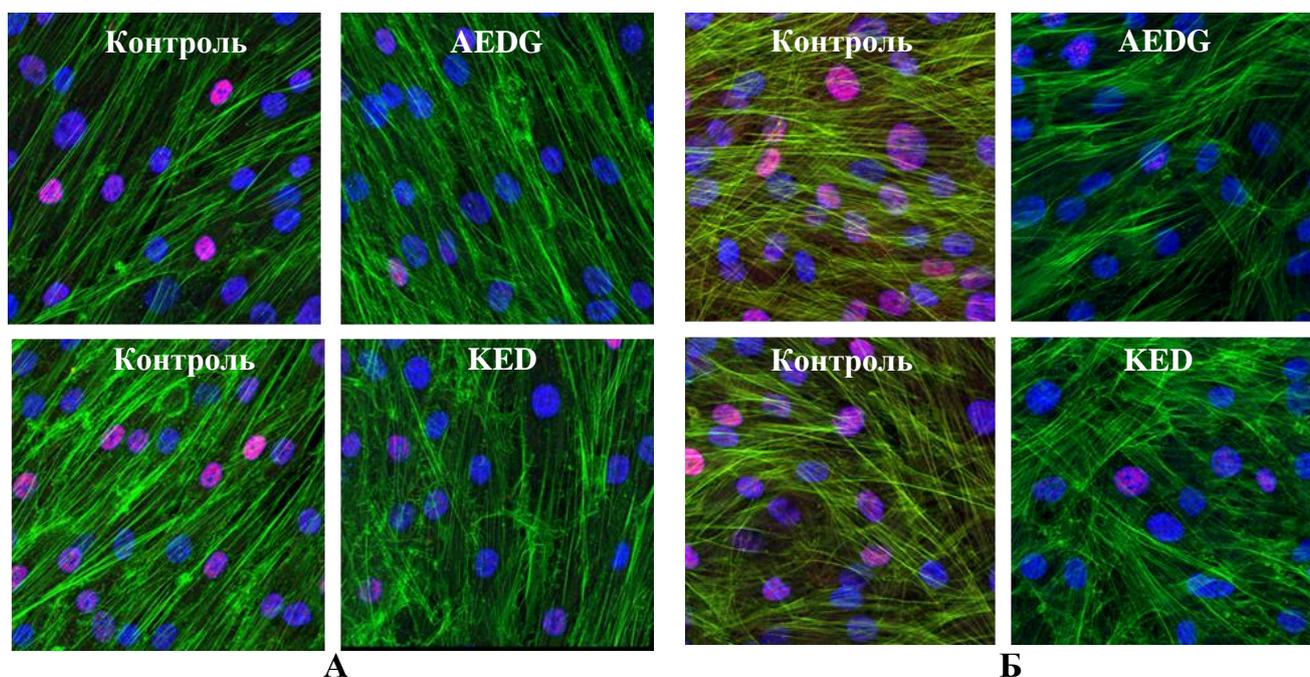


Рисунок 4. Экспрессия маркеров репликативного старения в культурах PDLSCs и GMSCs 25 пассажа при добавлении пептидов AEDG и KED (0,01 мкг/мл). Иммунофлуоресцентное окрашивание с антителами к p16 и p21 (красное свечение), ядерный краситель TO-PRO (синее свечение), цитоскелетный краситель фаллоидин (зеленое свечение). Увеличение: $\times 200$. **А** – экспрессия маркера p16 в культуре PDLSCs, **Б** – экспрессия маркера p21 в культуре GMSCs.

Анализ экспрессии генов репликативного старения в денальных стволовых клетках методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с реакцией обратной транскрипции

Уровни мРНК генов репликативного старения p16 и p21, были количественно проанализированы при помощи метода RT-qPCR в культурах PDLSCs и GMSCs. Пептид AEDG статистически значимо снижал экспрессию p16 и p21 в культуре PDLSCs в 1,56 и 2,22 раза по сравнению соответствующим контролем. Пептид KED снижал экспрессию p16 и p21 в культуре PDLSCs в 1,95 и 2,17 раза соответственно по сравнению с контролем ($p < 0,01$) (табл. 4, рис. 5).

Кроме того, пептид AEDG статистически значимо снижал экспрессию p16 и p21 в культуре GMSCs в 1,92 и 2,44 раза в 1,92 и 2,44 раза по сравнению с соответствующим контролем. Пептид KED снижал экспрессию p16 и p21 в культуре GMSCs в 3,23 и 1,82 раза соответственно по сравнению с контролем ($p < 0,01$) (табл. 5, рис. 6).

Таблица 4.

Влияние пептидов AEDG и KED на экспрессию мРНК генов репликативного старения

| Культура клеток | Молекула маркер | Относительная экспрессия мРНК (среднее значение \pm стандартное отклонение) | |
|-----------------|-----------------|--|------------------------|
| | | Добавление пептида AEDG | Добавление пептида KED |
| PDLSCs | p16 | 0,642 \pm 0,105* | 0,514 \pm 0,185* |
| | p21 | 0,450 \pm 0,128* | 0,460 \pm 0,098* |
| GMSCs | p16 | 0,520 \pm 0,115* | 0,310 \pm 0,125* |
| | p21 | 0,410 \pm 0,108* | 0,550 \pm 0,158* |

* $p < 0,01$ по сравнению со значением в контрольной группе (без добавления пептида). Экспрессия мРНК p16 и p21 в контроле принята за 1.

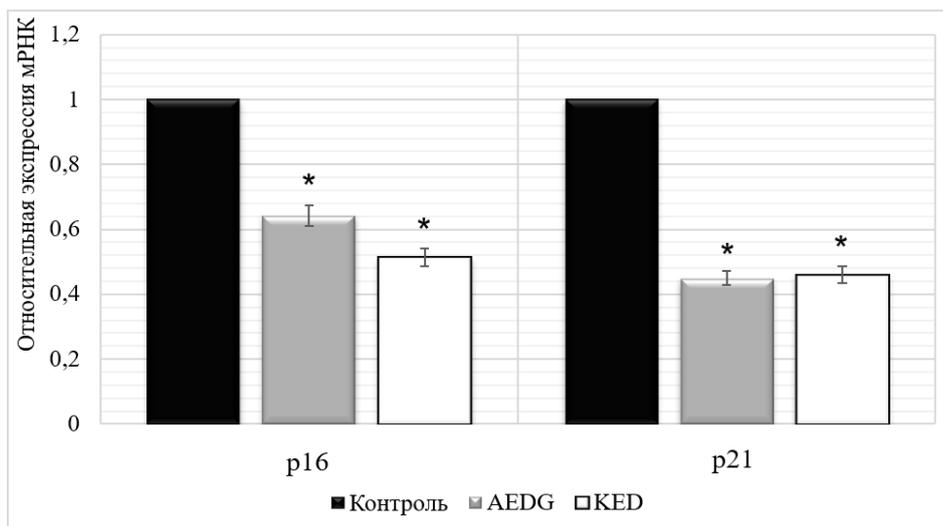


Рисунок 5. Влияние пептидов AEDG и KED на экспрессию генов репликативного старения p16 и p21 в культуре PDLSCs 25 пассажа.

* $p < 0,01$ по сравнению со значением в контрольной группе (без добавления пептида).

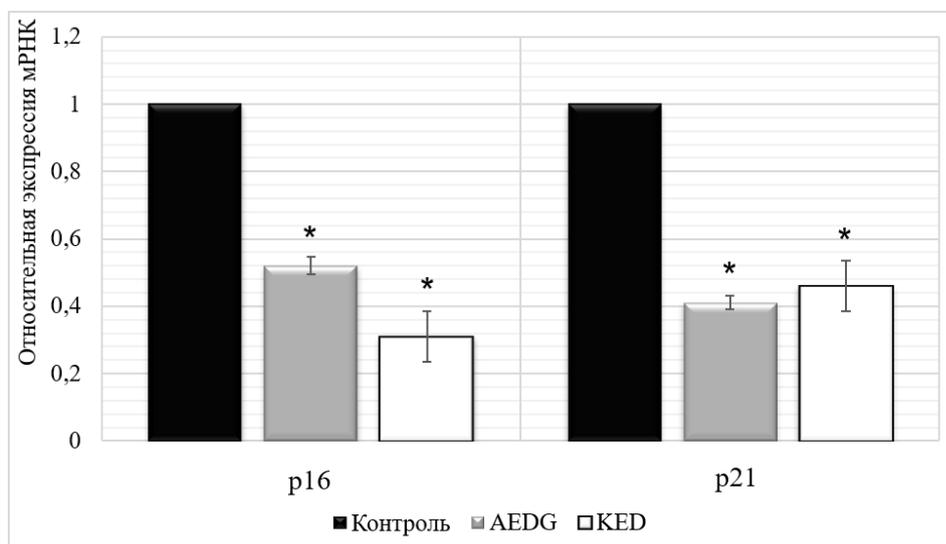


Рисунок 6. Влияние пептидов AEDG и KED на экспрессию генов репликативного старения p16 и p21 в культуре GMSCs 25 пассажа.

* $p < 0,01$ по сравнению со значением в контрольной группе (без добавления пептида).

Можно предположить, что пептиды AEDG и KED реализуют геропротекторное действие для стволовых клеток посредством уменьшения экспрессии генов и синтеза белков p16 и p21. Таким образом, пептиды могут продлить экспансию стволовых клеток в условиях *in vitro* и замедлить их репликативное старение. Количественные данные RT-qPCR подтвердили результаты, полученные при помощи иммунофлуоресцентного метода исследования.

Влияние пептидов AEDG и KED на нейрогенную дифференцировку дентальных стволовых клеток

Для определения способности пептидов AEDG и KED индуцировать дифференцировку дентальных стволовых клеток в нейрогенном направлении использовали 3 пассаж клеток PDLSCs и GMSCs, соответственно. Для качественного анализа использовали метод иммунофлуоресценции, для количественного был использован метод RT-qPCR по показателю относительной экспрессии мРНК маркеров нейрогенеза: нестин, β -тубулин III, GAP43, даблкортин.

**Иммунофлуоресцентный анализ синтеза белков нейрогенеза
в денальных стволовых клетках**

Иммунофлуоресцентный анализ синтеза белков нейрогенеза проводили с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа. Клетки PDLSCs и GMSCs 3 пассажа, обработанные пептидами AEDG и KED (0,01 мкг/мл), показали позитивное окрашивание в отношении маркеров нейрогенеза (нестин, β -тубулин III, GAP43, даблкортин), локализующихся в цитоплазме клеток (рис. 7).

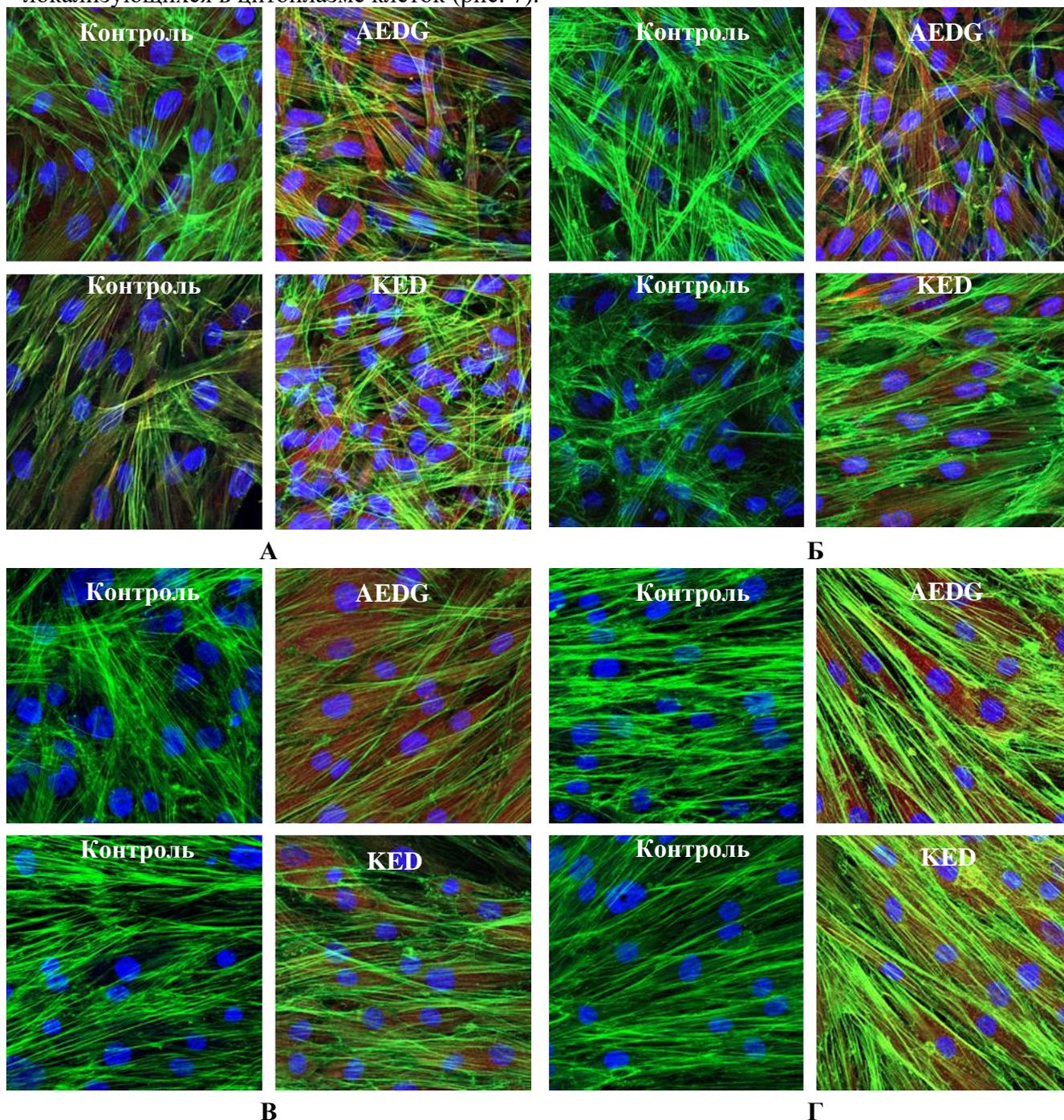


Рисунок 7. Экспрессия маркеров нейрогенеза в культуре PDLSCs и GMSCs 3 пассажа при добавлении пептидов AEDG и KED (0,01 мкг/мл). Иммунофлуоресцентное окрашивание с антителами к нестину, β -тубулину III, GAP43, даблкортину (красное свечение), ядерный краситель TO-PRO (синее свечение), цитоскелетный краситель фаллоидин (зеленое свечение). Увеличение: $\times 200$. **А** – экспрессия маркера нестин в культуре GMSCs, **Б** – экспрессия маркера β -тубулин III в культуре PDLSCs, **В** – экспрессия маркера GAP43 в культуре GMSCs, **Г** – экспрессия маркера даблкортин в культуре PDLSCs.

В то время, как в контрольной группе (без добавления пептидов) было продемонстрировано негативное иммуофлуоресцентное окрашивание в отношении изучаемых маркеров нейрогенеза (рис. 7).

Анализ экспрессии генов нейрогенеза в дентальных стволовых клетках методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с реакцией обратной транскрипции

Уровни мРНК нестина, β -тубулина III, GAP43, даблкортина были количественно проанализированы при помощи метода RT-qPCR в культурах PDLSCs и GMSCs. Пептид AEDG статистически значимо повышал экспрессию мРНК нестина, β -тубулина III, GAP43, даблкортина в культуре PDLSCs в 1,66, 1,87, 1,78 и 1,86 раза по сравнению соответствующим контролем без добавления пептида. Пептид KED повышал экспрессию мРНК нестина, β -тубулина III, GAP43, даблкортина в культуре PDLSCs в 1,85, 1,57, 1,66 и 1,90 раза соответственно по сравнению с контрольной группой ($p < 0,01$) (табл. 5, рис. 8).

Кроме того, пептид AEDG статистически значимо повышал экспрессию мРНК нестина, β -тубулина III, GAP43, даблкортина в культуре GMSCs в 1,66, 1,58, 1,76 и 1,75 раза по сравнению с соответствующим контролем без добавления пептида. Пептид KED повышал экспрессию мРНК нестина, β -тубулина III, GAP43, даблкортина в культуре GMSCs в 1,75, 1,65, 1,60 и 1,67 раза соответственно по сравнению с контрольной группой ($p < 0,01$) (табл. 5, рис. 9).

Таблица 5.

Влияние пептидов AEDG и KED на экспрессию мРНК генов нейрогенеза в дентальных стволовых клетках

| Культура клеток | Молекула маркер | Относительная экспрессия мРНК (среднее значение \pm стандартное отклонение) | |
|-----------------|----------------------|--|------------------------|
| | | Добавление пептида AEDG | Добавление пептида KED |
| PDLSCs | нестин | 1,659 \pm 0,255* | 1,845 \pm 0,147* |
| | β -тубулин III | 1,865 \pm 0,148* | 1,569 \pm 0,169* |
| | GAP43 | 1,775 \pm 0,203* | 1,657 \pm 0,150* |
| | даблкортин | 1,862 \pm 0,147* | 1,899 \pm 0,180* |
| GMSCs | нестин | 1,659 \pm 0,192* | 1,746 \pm 0,158* |
| | β -тубулин III | 1,578 \pm 0,220* | 1,652 \pm 0,215* |
| | GAP43 | 1,759 \pm 0,171* | 1,599 \pm 0,225* |
| | даблкортин | 1,746 \pm 0,149* | 1,665 \pm 0,198* |

* $p < 0,01$ по сравнению со значением в контрольной группе (без добавления пептида). Экспрессия мРНК нестина, β -тубулина III, GAP43, даблкортина в контроле принята за 1.

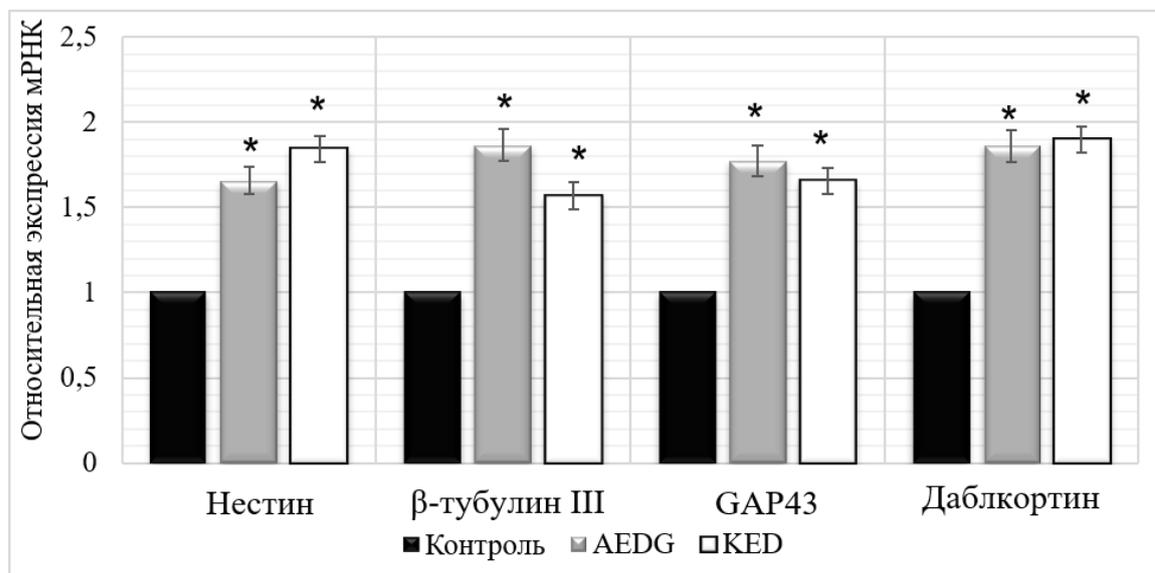


Рисунок 8. Влияние пептидов AEDG и KED на экспрессию мРНК генов нейрогенеза (нестин, β-тубулин III, GAP43, даблкортин) в культуре PDLSCs 3 пассажа.

* $p < 0,01$ по сравнению со значением в контрольной группе (без добавления пептида).

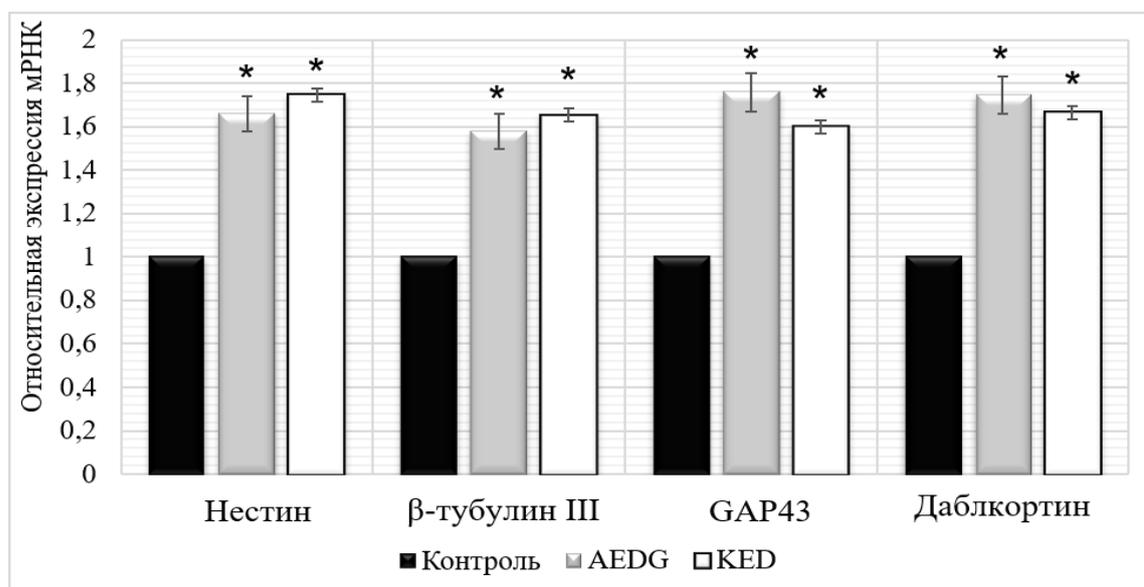


Рисунок 9. Влияние пептидов AEDG и KED на экспрессию мРНК генов нейрогенеза (нестин, β-тубулин III, GAP43, даблкортин) в культуре GMSCs 3 пассажа.

* $p < 0,01$ по сравнению со значением в контрольной группе (без добавления пептида).

Можно предположить, что пептиды AEDG и KED способны индуцировать дифференцировку дентальных стволовых клеток в нейрогенном направлении посредством повышения экспрессии генов и синтеза белков, ответственных за процесс нейрогенеза. Количественные данные RT-qPCR подтвердили результаты, полученные при помощи иммунофлуоресцентного метода исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При старении организма происходит снижение пула постнатальных стволовых клеток, что приводит к уменьшению регенеративного потенциала тканей и органов, а также нарушению их функционирования. ММСК широко используются в регенеративной медицине в том числе при возраст-ассоциированных нейродегенеративных заболеваниях. Длительное культивирование стволовых клеток *in vitro* вызывает потерю клеточных функций. ММСК

становятся непригодными для клинического применения, в котором необходимо использовать большое число клеток с целью регенерации тканей и органов [Turinetti V. et al., 2016]. Стволовые клетки, культивируемые до длительного пассажа, теряют типичную морфологию, способность к самообновлению, миграции, потенциал к многолинейной дифференциации и переходят в состояние репликативного старения [Wagner W. et al., 2010].

Ткань десны представляет собой доступный источник постнатальных стволовых клеток [Gugliandolo A. et al., 2018]. PDLSCs и GMSCs легко собирать и изолировать. Этот тип клеток обладает высокой пролиферативной способностью, гомогенностью и стабильным фенотипом [Rajan T.S. et al., 2017]. PDLSCs и GMSCs способны прикрепляться к пластиковому субстрату, дифференцироваться при индукции в адипогенном и остеогенном направлении, экспрессировать поверхностные маркеры, свойственные ММСК, не экспрессируя гемопоэтических специфических поверхностных молекул.

В 1 части исследования использовались культуры дентальных стволовых клеток PDLSCs и GMSCs 25 пассажа для оценки геропротекторных эффектов пептидов AEDG и KED в условиях длительного культивирования *in vitro* (модель репликативного старения). Синтез белков репликативного старения p16 и p21 был изучен иммунофлуоресцентным методом при помощи лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Полученные результаты были подтверждены количественными данными экспрессии транскриптов мРНК p16 и p21 методом RT-qPCR. Клетки 25 пассажа, обработанные пептидом AEDG и KED, показали снижение экспрессии генов и синтез белков p16 и p21 по сравнению с контрольной группой. В предыдущих исследованиях пептид AEDG способствовал увеличению длины теломер, повышал активность теломеразы [Khavinson V.Kh. et al., 2003; Khavinson V.Kh. et al., 2004], ингибировал синтез каспазы-3 (белок апоптоза), CD98hc (белки старения и дисфункции клеток), повышал синтез Ki67 (пролиферативный белок) в культурах фибробластов во время старения [Linkova N.S. et al., 2016]. AEDG индуцировал деконденсацию гетерохроматина вблизи центромер в культивируемых лимфоцитах, полученных от лиц пожилого возраста [Khavinson V.Kh. et al., 2003]. В экспериментах *in vivo* тетрапептид снижал хромосомные aberrации и увеличивал продолжительность жизни мышей [Rosenfeld S.V. et al., 2002]. Трипептид KED стимулировал синтез пролиферативного белка Ki67 и снижал синтез апоптотического белка p53 в культурах клеток фибробластов и эндотелия сосудов при репликативном старении [Khavinson V.Kh. et al., 2014].

Таким образом, пептиды AEDG и KED способны снижать репликативное старение ММСК при длительном культивировании. Пептиды AEDG и KED можно использовать в качестве дополнительных веществ в культуральных средах с целью стимулирования широкомасштабной экспансии клеток *in vitro*, необходимой для клинического применения терапии стволовыми клетками.

С возрастом патологии нервной системы приводят к нарушению когнитивных и двигательных функций [Jennings L.A. et al., 2015]. *In vitro* и *in vivo* исследования потенциальных возможностей ММСК обнаружили способность данных клеток дифференцироваться не только в адипоциты, хондроциты и остеобласты, но также в нейроны и миоциты, обладающие повышенным интересом для регенеративной медицины [Park B.W. et al., 2012; Mortada I. et al., 2018]. Генерация новых нейронов из стволовых клеток может стать перспективным вариантом лечения для пациентов с нарушениями функций нервной системы [Kang J.M. et al., 2016].

Во 2 части исследования при оценке способности пептидов AEDG и KED стимулировать дифференцировку ММСК в нейрогенном направлении использовались культуры PDLSCs и GMSCs 3 пассажа. Синтез белков нейрогенеза: нестина, β -тубулина III, GAP43, даблкортина был изучен иммунофлуоресцентным методом при помощи лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Полученные результаты были подтверждены количественными данными экспрессии транскриптов мРНК нестина, β -тубулина III, GAP43, даблкортина методом RT-qPCR. Клетки 3 пассажа, обработанные пептидом AEDG и KED, показали повышение экспрессии генов и синтез белков нейрогенеза по сравнению с

контрольной группой. Ранее была обнаружена пролиферативная способность пептида AEDG в отношении культур клеток сетчатки и пигментного эпителия у крыс [Хавинсон В.Х. и др., 2014]. Пептид AEDG стимулировал дифференцировку полипотентных клеток эктодермы ранней гаструлы лягушки *Xenopus laevis* в нервную ткань и эпидермис [Khavinson V. et al., 2002]. Добавление AEDG в органотипическую культуру клеток способствовало повышению уровня экспрессии маркеров нейронов сетчатки (Brn3, Prox1, Vsx1) и маркера клеток пигментного эпителия сетчатки (TTR) [Хавинсон В.Х. и др., 2013]. Трипептид KED способствовал стимуляции восстановления синаптической передачи при нейродегенерации, повышая количество грибовидных шипиков в культуре нейронов гиппокампа в модели болезни Альцгеймера у мышей [Красковская Н.А. и др., 2017]. Пептид KED также стимулировал экспрессию серотонина в культурах клеток коры головного мозга при их старении [Хавинсон В.Х. и др., 2014]. Основываясь на результатах проведенных ранее и настоящего исследований, можно предположить, что пептиды AEDG и KED реализуют индукцию нейрогенной дифференцировки ММСК, повышая экспрессию генов и синтез белков нестина, β -тубулина III, GAP43, даблкортина.

Таким образом, стимуляция короткими пептидами дифференцировки стволовых клеток в нейрогенном направлении может быть использована в регенеративной медицине и впоследствии приводить к снижению частоты возникновения нейродегенеративных заболеваний, ассоциированных с возрастом.

ВЫВОДЫ

1. Исследуемые клеточные культуры периодонтальной связки и мезенхимальных стволовых клеток десны человека обладают иммунофенотипом мезенхимальных мультипотентных стволовых клеток (позитивны в отношении мезенхимальных молекул CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 и негативны в отношении гемопоэтических поверхностных молекул CD14, CD34 и CD45) и способностью к мезенгенной дифференцировке в адипогенном и остеогенном направлении. Эти данные соответствуют минимальным необходимым и достаточным критериям, принятым международным сообществом по клеточной терапии.
2. Пептид AEDG снижал экспрессию генов и синтез белков p16 и p21 в стволовых клетках периодонтальной связки в 1,56 и 2,22 раза, а в мезенхимальных стволовых клетках десны человека в 1,92 и 2,44 раза по сравнению с соответствующим контролем.
3. Пептид KED снижал экспрессию генов и синтез белков p16 и p21 в стволовых клетках периодонтальной связки в 1,95 и 2,17 раза, а в мезенхимальных стволовых клетках десны человека в 3,23 и 1,82 раза по сравнению с соответствующим контролем.
4. Пептид AEDG повышал экспрессию генов и синтез белков нестина, β -тубулина III, GAP43, даблкортина в стволовых клетках периодонтальной связки в 1,66, 1,87, 1,78 и 1,86 раза, а в мезенхимальных стволовых клетках десны человека в 1,66, 1,58, 1,76 и 1,75 раза по сравнению с соответствующим контролем.
5. Пептид KED повышал экспрессию генов и синтез белков нестина, β -тубулина III, GAP43, даблкортина в стволовых клетках периодонтальной связки в 1,85, 1,57, 1,66 и 1,90 раза, а в мезенхимальных стволовых клетках десны человека в 1,75, 1,65, 1,60 и 1,67 раза по сравнению с соответствующим контролем.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Пептиды AEDG и KED могут быть использованы в качестве дополнительных веществ в культуральных средах с целью замедления репликативного старения мезенхимальных мультипотентных стволовых клеток *in vitro*, длительное культивирование которых необходимо для клинического применения с целью регенерации тканей и органов.
2. Пептиды AEDG и KED могут быть рекомендованы для дальнейшего экспериментального изучения с целью создания средств, стимулирующих дифференцировку стволовых клеток в нейрогенном направлении, так как установлена их способность увеличивать экспрессию генов и синтез белков нейрогенеза (нестин, β -тубулин III, GAP43, даблкортин) в культурах

стволовых клеток периодонтальной связки и мезенхимальных стволовых клеток десны человека. Индуцированные мезенхимальные мультипотентные стволовые клетки могут быть использованы в регенеративной медицине для трансплантации в поврежденную область нервной системы с целью профилактики и лечения нейродегенеративных заболеваний, ассоциированных с возрастом.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации

1. Эпигенетические механизмы пептидной регуляции и нейропротекторный белок FKBP1b / Б.И. Кузник, С.О. Давыдов, **Е.С. Поправка (Миронова)**, Н.С. Линькова, Л.С. Козина, В.Х. Хавинсон // Молекулярная биология. – 2019. – Т. 53, № 2. – С. 339-348.
DOI: 10.1134/S0026893319020095.
(Англ. версия. *Epigenetic Mechanisms of Peptide-Driven Regulation and Neuroprotective Protein FKBP1b / B.I. Kuznik, S.O. Davydova, E.S. Popravka (Mironova), N.S. Lin'kova, L.S. Kozina, V.Kh. Khavinson // Molecular Biology. – 2019. – Vol. 53, № 2. – P. 299-307. DOI: 10.1134/S0026893319020092*).
2. Сравнительное влияние пептидов KE и EW на рост нормальных и опухолевых клеток / Н.С. Линькова, **Е.С. Миронова**, О.М. Ивко, О.А. Орлова, А.В. Дудков // Медицинский академический журнал. – 2019. Спецвыпуск. – С. 174-176.
3. Short Peptides Protect Oral Stem Cells from Ageing / B. Sinjari, F. Diomedea, V. Khavinson, **E. Mironova**, N. Linkova, S. Trofimova, O. Trubiani, S. Caputi // Stem Cell Reviews and Reports. – 2020. – Vol. 16, №. 1. – P. 159-166. DOI: 10.1007/s12015-019-09921-3.
4. AEDG Peptide (Epitalon) Stimulates Gene Expression and Protein Synthesis during Neurogenesis: Possible Epigenetic Mechanism / V. Khavinson, F. Diomedea, **E. Mironova**, N. Linkova, S. Trofimova, O. Trubiani, S. Caputi, B. Sinjari // Molecules. – 2020. – Vol. 25 (3), 609. – P. 1-17.
DOI: 10.3390/molecules25030609.
5. Идентификация коротких пептидов в составе полипептидных комплексов, выделенных из органов животных / И.К. Журкович, Н.Г. Ковров, Г.А. Рыжак, **Е.С. Миронова**, В.Х. Хавинсон // Успехи современной биологии. – 2020. – Т. 140, № 2. – С. 140-148.
DOI: 10.31857/S004213242002012X.
6. Нейропротекторные эффекты пептидов / **Е.С. Миронова**, Н.С. Линькова, И.Г. Попович, Л.С. Козина, В.Х. Хавинсон // Успехи геронтологии. – 2020. – Т. 33, № 2. – С. 299-306.
DOI: 10.34922/AE.2020.33.2.011.
7. Трансплантация мезенхимальных стволовых клеток при нейродегенеративных заболеваниях / **Е.С. Миронова**, Н.С. Линькова, И.Г. Попович // Молекулярная медицина. – 2020. – Т. 18, № 2. – С. 23-26.
DOI: 10.29296/24999490-2020-02-04.

Статья в другом журнале

8. Применение пептидов эпифиза для повышения качества и продолжительности жизни / **Е.С. Миронова**, Н.С. Линькова // Научные труды Северо-Западного института управления РАНХиГС. 2019. – Т. 10. – Вып. 2(39). – С. 309-311.

Глава в монографии

9. Глава 1. Пептид EDR – регулятор экспрессии сигнальных молекул в культурах нейронов головного мозга. Соавторы: И.М. Кветной, В.О. Полякова, **Е.С. Миронова**, А.Р. Ильина, А.Н. Богатырев– С. 14-28. В книге В.Х. Хавинсон, Р.С. Умнов, Н.С. Линькова, А.В. Арутюнян «Молекулярно-клеточные механизмы пептидергической регуляции функций мозга». – М.: Наука, 2018. – 222 с.

Тезисы докладов

10. Пептиды эпифиза замедляют процессы старения фибробластов кожи / В.Х. Хавинсон, Н.С. Линькова, О.А. Орлова, **Е.С. Поправка (Миронова)**, А.В. Дудков, Н.В. Фридман // IV International Dermaesthetic Medical Day «Ageless Generation – симбиоз геронтологии и эстетической медицины». – Москва. – 2017. – С. 16.
11. Короткие пептиды замедляют рост клеток лимфомы Беркитта / **Е.С. Поправка (Миронова)**, А.С. Дятлова, К.О. Ивко, А.В. Дудков // Материалы научно-практической конференции «Инновационные Российские технологии в геронтологии и гериатрии» Успехи геронтологии. – СПб. – 2017. – Т.30, № 6. –С. 64-65.
12. Cytoprotective action of the «Immunity» peptide complex / Oleg Ivko, **Ekaterina Popravka (Mironova)**, Anastasia Dyatlova, Chalisova Natalia // Book of abstracts International symposium of experts “Effective current approaches in anti-aging medicine and gerontology”. – Stockholm, Sweden. – 2018. – P. 40-42.
13. Short peptides slow the growth of Burkitt's lymphoma cells / **Ekaterina Popravka (Mironova)**, Alexander Dudkov // Book of abstracts International symposium of experts “Effective current approaches in anti-aging medicine and gerontology”. – Stockholm, Sweden. – 2018. – P. 86-87.
14. Цитопротекторные и геропротекторные эффекты пептидного комплекса «Иммунитет» / О.М. Ивко, **Е.С. Поправка (Миронова)**, А.С. Дятлова, Н.И. Чалисова // XIII Международный форум «Старшее Поколение». – СПб. – 2018. – С. 58-59.
15. Короткие геропротекторные пептиды подавляют рост клеток лимфомы человека **Е.С. Поправка (Миронова)**, А.В. Дудков // XIII Международный форум «Старшее Поколение». – СПб. – 2018. – С. 91-92.
16. Дипептиды снижают апоптоз лимфоцитов крови при их старении *in vitro* / **Е.С. Миронова**, А.В. Дудков, К.О. Ивко, В.В. Бенберин, В.Х. Хавинсон // XIV Научно-практическая геронтологическая конференция «Пушковские чтения». Специалист Здравоохранения. – СПб. 2018. – № 4 (18). – С. 6-7.
17. Пептидная регуляция клеточного старения / В.Х. Хавинсон, Н.С. Линькова, А.Н. Богатырев, **Е.С. Миронова**, С.В. Трофимова // XIV Научно-практическая геронтологическая конференция «Пушковские чтения». Специалист Здравоохранения. – СПб. 2018. – № 4 (18). – С. 7-8.
18. Short peptides and their effects on ageing in oral derived stem cells / Francesca Diomede, Oriana Trubiani, Svetlana Trofimova, Bruna Sinjari, **Ekaterina Popravka (Mironova)**, Elena Sakhenberg, Vladimir Khavinson, Sergio Caputi // Book of abstracts International symposium of experts “Effective current approaches in anti-aging medicine and gerontology”. – Stockholm, Sweden. – 2019. – P. 32-33.
19. Short peptides increased Nestin expression in human periodontal ligament stem cells / Sergio Caputi, Vladimir Khavinson, Oriana Trubiani, Bruna Sinjari, **Ekaterina Mironova**, Natalia Linkova // Book of abstracts International symposium of experts “Effective current approaches in anti-aging medicine and gerontology”. – Stockholm, Sweden. – 2019. – P. 21-23.
20. Peptides stimulate lymphoid cells markers expression in human thymocytes / **Ekaterina Mironova**, Anastasia Pina, Sonia Rahbani, Ksenia Ivko // Book of abstracts International symposium of experts “Effective current approaches in anti-aging medicine and gerontology”. – Stockholm, Sweden. – 2019. – P. 65-66.
21. Пептид AEDG снижает экспрессию генов и белков «старения» в стволовых клетках человека / **Е.С. Миронова**, С.В. Трофимова, Н.С. Линькова, В.Х. Хавинсон, S. Caputi, O. Trubiani, B. Sinjari, F. Diomede, О.М. Ивко // XIV Международный форум «Старшее Поколение». – СПб. – 2019. – С. 69-70.
22. Трипептид KED активизирует дифференцировку стволовых клеток человека / **Е.С. Миронова**, Н.С. Линькова, С.В. Трофимова, В.Х. Хавинсон, S. Caputi, O. Trubiani, B. Sinjari, F. Diomede // XIV Международный форум «Старшее Поколение». – СПб. – 2019. – С. 70.

23. Peptides regulate signal molecules expression in renal senescence cells / Tatiana Nichik, **Ekaterina Mironova**, Anastasia Il'ina, Xenia Ivko, Andrey Bogatyrev, Vladimir Khavinson // International Association of Gerontology and Geriatrics European Region Congress. – Gothenburg, Sweden. – 2019. – P.O.T:25.
24. Дипептиды снижают апоптоз в лимфоцитах крови человека при их старении / **Е.С. Миронова**, А.В. Дудков, Н.С. Линькова, В.Х. Хавинсон // Интегративная физиология: Всероссийская конференция с международным участием, посвященная 170-летию со дня рождения И.П. Павлова. – СПб. – 2019. – С. 157-158.
25. Пептиды KE и AEDG активируют внутриклеточный транспорт везикул в фибробластах кожи человека / В.Х. Хавинсон, Н.С. Линькова, О.А. Орлова, **Е.С. Миронова**, О.М. Ивко // Интегративная физиология: Всероссийская конференция с международным участием. – СПб. – 2019. – С. 253-254.
26. Трипептид регулирует экспрессию «генов старения» p16 и p21 в стволовых клетках человека / **Е.С. Миронова**, Н.С. Линькова, О.М. Ивко, А.В. Дудков, В.Х. Хавинсон // Европейский конгресс по превентивной регенеративной и антивозрастной медицине – ESCOPRAM. – Геленджик. – 2019. С. 35-36.
27. Трипептид везуген (KED) снижает синтез белков каспаза-зависимого апоптоза при репликативном старении клеток сосудов / А.Р. Ильина, А.В. Дудков, Е.О. Гутоп, **Е.С. Миронова**, Н.С. Линькова, В.Х. Хавинсон // Труды Всероссийского форума с международным участием «Продуктивное долголетие: доказательная медицина и трансдисциплинарный синтез». – Москва. – 2019. – С. 36-38.
28. Тетрапептид эпиталон (AEDG) снижает экспрессию генов апоптоза и репликативного старения в стволовых клетках человека / **Е.С. Миронова**, Н.С. Линькова, О.М. Ивко, В.Х. Хавинсон // Труды Всероссийского форума с международным участием «Продуктивное долголетие: доказательная медицина и трансдисциплинарный синтез». – Москва. – 2019. – С. 61-62.
29. Геропротекторный пептид AEDG (эпиталон): эпигенетические механизмы регуляции нейрогенеза / **Е.С. Миронова**, Н.С. Линькова, О.М. Ивко, С.Н. Мякишева, В.Х. Хавинсон // XV Научно-практическая геронтологическая конференция «Пушковские чтения». – СПб. – 2019. – С. 23-24
30. The effect of KED tripeptide on neuronal differentiation of human gingival mesenchymal stem cells / Sergio Caputi, Bruna Sinjari, Francesca Diomede, Oriana Trubiani, **Ekaterina Mironova**, Vladimir Khavinson // Book of abstracts International symposium of experts “Regenerative medicine and ageing”. – Dubai, UAE. – 2020. – P. 11.
31. Biopeptides as master regulators of signal transduction pathways involved in the proliferation and polarization of a macrophage cellular model derived from THP-1 cell line / Giulia Giambuzzi, Andreana Marino, **Ekaterina Mironova**, Alfonso Pennelli, Svetlana Trofimova, Paola Lanuti, Marina Marchisio, Francesco Avolio, Elena Toniato, Stefano Martinotti, Vladimir Khavinson // Book of abstracts International symposium of experts “Regenerative medicine and ageing”. – Dubai, UAE. – 2020. – P. 20-21.
32. Short peptides protect oral stem cells from ageing / Bruna Sinjari, Francesca Diomede, Vladimir Khavinson, **Ekaterina Mironova**, Natalia Linkova, Svetlana Trofimova, Oriana Trubiani, Sergio Caputi // Book of abstracts International symposium of experts “Regenerative medicine and ageing”. – Dubai, UAE. – 2020. – P. 50-51.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, ИСПОЛЬЗОВАННЫХ В АВТОРЕФЕРАТЕ

| | |
|----------------------|---|
| ГСК | гемопоэтические стволовые клетки |
| ДНК | дезоксирибонуклеиновая кислота |
| ММСК | мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки |
| мРНК | матричная рибонуклеиновая кислота |
| AEDG | пептид Ala-Glu-Asp-Gly, AE-0, эпиталон |
| CD | кластер дифференцировки (cluster of differentiation) |
| FABP4 | белок, связывающий жирные кислоты 4 (fatty acid binding protein 4) |
| FITC | флуоресцеин-5-изотиоцианат (fluorescein isothiocyanate) |
| GAP43 | белок, ассоциированный с ростом 43 (growth associated protein 43) |
| GMSCs | мезенхимальные стволовые клетки десны (gingival mesenchymal stem cells) |
| KED | пептид Lys-Glu-Asp, T-38, везуген |
| MFI | средняя интенсивность флуоресценции (mean fluorescence intensity) |
| MSCGM- CD | химически определенная среда для роста мезенхимальных стволовых клеток (mesenchymal stem cell growth medium chemically defined) |
| PBS | натрий-фосфатный буфер (phosphate buffered saline) |
| PDLSCs | стволовые клетки периодонтальной связки человека (periodontal ligament stem cells) |
| RT-qPCR | количественная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени с реакцией обратной транскрипции (real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction) |
| RUNX2 | фактор транскрипции, связанный с дифференцировкой остеобластов (runt-related transcription factor 2) |

МИРОНОВА Екатерина Сергеевна ПЕПТИДЕРГИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РЕПЛИКАТИВНОГО СТАРЕНИЯ И НЕЙРОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА // Автореф. дис. канд. биол. наук: 14.01.30 – геронтология и гериатрия, 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология, СПб. – 2020. – 24 с.

Подписано в печать «___» _____ 2020 г. Формат 60*84 1/16.

Бумага офсетная. Печать офсетная. Печ. л. 1,0.

Тираж 100 экз. Заказ _____.

Отпечатано с готового оригинал-макета
в типографии Издательства СПбГЭТУ «ЛЭТИ»
Издательство СПбГЭТУ «ЛЭТИ»
197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 5.

УКАЗАТЕЛЬ ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Красковская Н.А. и др.* Трипептиды восстанавливают количество шипиков нейронов в модели болезни Альцгеймера *in vitro* // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2017. Т. 2. С. 101-104; *Хавинсон В.Х.* Тетрапептид, обладающий геропротекторной активностью, фармакологическое средство на его основе и способ его применения // Патент РФ № 2157233. 2000. Бюл. № 28; *Хавинсон В.Х. и др.* Пептид, повышающий резистентность капилляров, фармацевтическая композиция на его основе и способ ее применения // Патент РФ № 2295970. 2007. Бюл. № 9; *Хавинсон В.Х. и др.* Короткие пептиды стимулируют экспрессию серотонина в клетках коры головного мозга // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2014. Т. 157, № 1. С. 89-93; *Хавинсон В.Х. и др.* Пептидергическая регуляция дифференцировки эмбриональных клеток сетчатки // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2013. № 1. С. 57-60; *Baker D. et al.* Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders // Nature 2011. Vol. 479. P. 232-236; *Burger D. et al.* Crystal Structures of the Human Doublecortin C- and N-terminal Domains in Complex with Specific Antibodies // J Biol Chem. 2016. 291(31). P. 16292-16306; *Cianci E. et al.* Human Periodontal Stem Cells Release Specialized Proresolving Mediators and Carry Immunomodulatory and Prohealing Properties Regulated by Lipoxins // Stem Cells Translational Medicine. 2016. № 5. 20-32; *De Becker A. et al.* Homing and migration of mesenchymal stromal cells: How to improve the efficacy of cell therapy? // World J Stem Cells. 2016. 8(3). 73-87; *Diomedea F. et al.* Three-dimensional printed PLA scaffold and human gingival stem cell-derived extracellular vesicles: a new tool for bone defect repair // Stem cell research & therapy. 2018. 9(1). 104; *Diomedea F. et al.* Stemness Maintenance Properties in Human Oral Stem Cells after Long-Term Passage // Stem cells international. 2017. doi: 10.1155/2017/5651287; *Diomedea F. et al.* Human periodontal ligament stem cells cultured onto cortico-cancellous scaffold drive bone regenerative process // European cells & materials. 2016. № 32. P. 181-201; *Dominici M. et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // Cytotherapy. 2006. Vol. 8. № 4. P. 315-317; *Giacoppo S. et al.* Anti-inflammatory effects of hypoxia-preconditioned human periodontal ligament cell secretome in an experimental model of multiple sclerosis: a key role of IL-37 // FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 2017. 31(12). P. 5592-5608; *Gugliandolo A. et al.* Transcriptomic analysis of gingival mesenchymal stem cells cultured on 3D bioprinted scaffold: A promising strategy for neuroregeneration // Journal of biomedical materials research Part A. 2018. 106(1). P. 126-137; *Honczarenko M. et al.* Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors // Stem cells. 2006. 24(4). P. 1030-1041; *Jennings L.A. et al.* Unmet needs of caregivers of individuals referred to a dementia care program // Journal of the American Geriatrics Society. 2015. Vol. 2. № 63. P. 282-289; *Kamande J.W. et al.* Multi-compartment Microfluidic Device Geometry and Covalently Bound Poly-D-Lysine Influence Neuronal Maturation // Front Bioeng Biotechnol. 2019. 7. 84; *Kang J.M. et al.* Stem Cell Therapy for Alzheimer's Disease: A Review of Recent Clinical Trials // J Alzheimers Dis. 2016. Vol. 54. № 3. P. 879-889; *Kassem M.* Stem Cells Potential Therapy for Age-Related Diseases // Ann Ny Acad Sci. 2006. № 1067. P. 436-442; *Khavinson V.Kh.* Peptides and ageing // Neuroendocrinol Lett. 2002. 23(3). P. 11-144; *Khavinson V.Kh. et al.* Epithalon Peptide Induces Telomerase Activity and Telomere Elongation in Human Somatic Cells // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2003. 135(6). P. 590-592; *Khavinson V.Kh. et al.* Peptide Promotes Overcoming of the Division Limit in Human Somatic Cell // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2004. 137(5). P. 613-616; *Khavinson V.Kh. et al.* Peptide Epithalon activates chromatin at the old age // Neuroendocrinology Lett. 2003. 24(5). P. 329-333; *Khavinson V.Kh. et al.* Short Peptides Regulate Gene Expression // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2016. 162(2). P. 288-292; *Khavinson V.Kh. et al.* Epigenetic aspects of peptidergic regulation of vascular endothelial cell proliferation during aging // Advances in gerontology. 2014. 27(1). P. 108-114; *Libro R. et al.* Cannabidiol Modulates the Immunophenotype and Inhibits the Activation of the Inflammasome in Human Gingival Mesenchymal Stem Cells // Frontiers in Physiology. 2016. Vol. 7. № 559; *Linkova N.S. et al.* Peptide Regulation of Skin Fibroblast Functions during Their Aging *in vitro* // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2016. 161(1). P. 175-178; *Mortada I. et al.* Epigenetic changes in mesenchymal stem cells differentiation // Eur J Med Genet. 2018. Vol. 61. № 2. P. 114-118; *Park B.W. et al.* Peripheral nerve regeneration using autologous porcine skin-derived mesenchymal stem cells // J. Tissue Eng. Regen. Med. 2012. Vol. 6. № 2. P. 113-124; *Rajan T.S. et al.* Gingival Stromal Cells as an *in vitro* Model: Cannabidiol Modulates Genes Linked with Amyotrophic Lateral Sclerosis // Journal of cellular biochemistry. 2017. Vol. 118(4). P. 819-828; *Rayess H. et al.* Cellular senescence and tumor suppressor gene p16 // Int J Cancer., 2012. Vol. 130(8). P. 1715-1725; *Rosenfeld S.V. et al.* Effect of epithalon on the incidence of chromosome aberrations in senescence-accelerated mice // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2002. Vol. 133(3). P. 274-276; *Trubiani O. et al.* Assessment of an Efficient Xeno-Free Culture System of Human Periodontal Ligament Stem Cells // Tissue Eng Part C Methods. 2015. № 1. P. 52-64; *Turinetti V. et al.* Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells: Functional Changes and Implications in Stem Cell Based Therapy // International journal of molecular sciences. 2016; *Yan S. et al.* Nestin regulates neural stem cell migration via controlling the cell contractility // Int J Biochem Cell Biol. 2016. № 78. P. 349-360; *Wagner W. et al.* Different facets of aging in human mesenchymal stem cells // Tissue engineering Part B, Reviews. 2010. Vol. 16(4). P. 445-453; *Wani W.Y. et al.* Cell cycle activation in p21 dependent pathway: An alternative mechanism of organophosphate induced dopaminergic neurodegeneration // Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2017. Vol. 1863. № 7. P. 1858-1866; *Zhao J.C. et al.* The differential regulation of Gap43 gene in the neuronal differentiation of P19 cells // J Cell Physiol. 2012. Vol. 227(6). P. 2645-2653.