

Е. В. Празднова¹, М. С. Мазанко¹, П. В. Золотухин¹, Е. Ю. Харченко¹, В. А. Чистяков¹,
В. А. Арутюнов², Л. С. Козина²

РОЛЬ ОСТАТКА ЛИЗИНА В АНТИОКСИДАНТНОЙ И ДНК-ПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ ОЛИГОПЕПТИДОВ*

¹ Академия биологии и биотехнологии им. Д. И. Ивановского, Южный федеральный университет, 344090 Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1; ² Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии РАН, 197110 Санкт-Петербург, пр. Динамо, 3; e-mail: milakozina@mail.ru

Присутствующие в клетке олигопептиды проявляют антиоксидантные свойства и участвуют в регуляции антиоксидантного баланса, в частности путем взаимодействия с редокс-зависимыми клеточными сигнальными каскадами. В отличие от экспериментов на животных, доказывающих геропротекторное и адаптогенное влияние олигопептидов, в данной работе изучено действие ряда синтетических олигопептидов на клетку с использованием бактериальных моделей. Такой подход позволяет оценить именно антиоксидантные свойства соединений, не затрагивая их участие в регуляторных каскадах, характерных для клеток эукариот. Эксперименты с бактериальными *lux*-биосенсорами показали, что способность олигопептидов защищать клетки от действия физических прооксидантных факторов (УФ-облучение) связана с наличием в молекуле остатка лизина. Для химических прооксидантов (диоксидин) наблюдается схожая, хоть и менее строгая закономерность. Описанный эффект также коррелирует с ДНК-протекторной активностью исследуемых олигопептидов.

Ключевые слова: олигопептиды, лизин, антиоксиданты, редокс-зависимые каскады, бактерии, биосенсоры

В клетке присутствует широкий спектр низкомолекулярных олигопептидов. Одной из основных функций эндогенных пептидов является регуляция интенсивности процессов свободнорадикального окисления. Эта функция осуществляется за счет изменения уровня потребления кислорода, интенсивности образования свободных радикалов и продуктов окисления [8]. Регулируя антиоксидантный баланс, олигопептиды принимают участие в противодействии организма окислительному стрессу, возникающему при патологических процессах и стрессовых состояниях [10].

В дополнение к сигнальным эффектам, позволяющим пептидам нормализовать окислительный

статус клетки, они обладают выраженными антиоксидантными свойствами [20]. Эта их характеристика, в свою очередь, делает их агентами двойного действия, поскольку широкий спектр клеточных сигнальных каскадов регулируется внутриклеточными уровнями АФК и азота. Примерами таких редокс-зависимых каскадов являются: *PI3K/Akt*, регулирующий ряд важных клеточных процессов — от метаболизма глюкозы до пролиферации [34, 39]; стресс-реактивный каскад *p38 MAPK* [18, 36]; каскад протеинкиназ *C*, который регулирует экспрессию генов, контролирующих структуру мембран, рост и взаимодействие клеток [25]; каскад *NF-κB*, способный, помимо прочего, заблокировать программу некроза [23, 26, 28], и даже каскад функционального фенотипа стволовых клеток *Wnt/CTNNB1* [16, 21, 32]. Таким образом, антиоксидантная активность пептидов делает их мультимодальными: они, с одной стороны, непосредственно инактивируют АФК, а с другой — предсказуемо изменяют активационный статус редокс-зависимых сигнальных каскадов. Влияние пептидов на вышеописанные каскады делает их более перспективными с точки зрения фармакологического воздействия на клетку по сравнению с веществами, воздействующими только на одну мишень [4].

В настоящее время доказано, что многие олигопептиды обладают геропротекторными и адаптогенными свойствами. Они представляют собой низкомолекулярные соединения пара- и аутокринной природы, обеспечивающие перенос информации как внутри клеток, так и между ними. Широкий спектр функциональной активности этих соединений объясняется их влиянием на фундаментальные механизмы, составляющие основу разнообраз-

* Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 16-16-04032).

ных патологических процессов. Так, установлено, что они способны увеличивать продолжительность жизни у млекопитающих, замедлять развитие опухолей, а также оказывают иммуномодулирующее действие — способны к усилению клеточного и гуморального иммунитета, к улучшению показателей коагуляции, повышению нейрональной активности, оптимизации когнитивных функций [1, 8]. Показано, что пептиды принимают участие в поддержании равновесия между тремя основными клеточными процессами — пролиферацией, дифференцировкой и апоптозом клеток [11]. Синтезированные в последние годы олигопептиды, проникая в ядро и ядрышко, регулируют экспрессию генов благодаря связыванию с молекулой ДНК и гистоновыми белками [12]. Более того, входящие в состав пептидов аминокислоты также могут регулировать процессы пролиферации и апоптоза клеток [13].

Для ряда низкомолекулярных олигопептидов (Эпиталона, Вилона и Кортагена) экспериментально показано влияние на свободнорадикальные процессы и основные системы антиоксидантной защиты в крови, печени и мозгу у лабораторных животных. Особенно высокую эффективность данные соединения демонстрировали в качестве геропротекторов. При этом показано, что короткие пептиды (Эпиталон, Кортаген, Вилон, Пинеалон и Везуген) обладают антиоксидантными свойствами в экспериментах *in vivo* и *in vitro* [5].

Так как, практически независимо от структуры этих пептидов, все они обладают антиоксидантной активностью, единым универсальным принципом их действия является регуляция редокс-зависимых каскадов и утилизация АФК. Однако сравнительную характеристику мощности сигнальных пептидов именно с точки зрения таких свойств очень трудно осуществить с применением модельных клеток человека — клеточных линий, культур тканей, эксплантов и так далее, так как непосредственные сигнальные, регуляторные эффекты пептидов могут маскировать их антиоксидантные эффекты. Поэтому данные свойства лучше всего тестировать или в чистых химических системах, или с применением клеток, имеющих отличную от клеток человека организацию. Последний вариант предпочтительнее, так как тесты в чистых химических системах часто дают результат, противоположный тому, что наблюдается в биосистемах [27, 35]. В связи с этим, в настоящем исследовании на бактериальной модели проверяли антимутагенный эффект и способность утилизировать АФК

у перспективных синтетических пептидов. Была изучена протекторная активность четырех олигопептидов, адаптогенные свойства которых описаны в ряде работ В. Х. Хавинсона и соавт. [10].

Материалы и методы

В качестве источника УФ-излучения использовали Cl_2 -эксилампу низкой интенсивности (терапевтическую), излучающую УФ с длиной волны 311 нм («Эксилампы», Россия). Мощность дозы при облучении составляла $12,2 \cdot 10^{-7}$ Дж/м² в сек. В качестве химического индуктора повреждения ДНК использовали диоксидин (гидроксиметилхиноксалиндиоксид). В работе были использованы олигопептиды, синтезированные в Институте биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН (Санкт-Петербург), к которым относятся соединения следующего состава и молярной массы:

Панкраген — *Lys-Glu-Asp-Trp* — 628,68 г/моль;
 Пинеалон — *Glu-Asp-Arg* — 452,47 г/моль;
 Везуген — *Lys-Glu-Asp* — 424,46 г/моль;
 Изовилон (АВ-А) — *Lys-Glu* — 292,34 г/моль.

Оценку протекторной активности проводили с помощью системы бактериальных биосенсоров, реагирующих люминесцентным сигналом на активацию системы SOS-ответа (координированной экспрессии системы генов, отвечающих за восстановление повреждений ДНК). В качестве биосенсоров использовали штаммы *E. coli* MG1655 (*RecA-lux*) и *E. coli* MG1655 (*KatG-lux*), предоставленные сотрудниками ГосНИИ Генетики (Москва). Принцип детекции с помощью данных штаммов описан в работе [38].

Биолюминесцентный тест. Культуры клеток *E. coli* растили на полноценной среде Луриа—Бертани (LB) [9]. Культивирование бактерий в жидкой питательной среде проводили при постоянной аэрации на круговой качалке при 37 °С. Для выращивания на твердой среде использовали LB-агар (LB + 20 г/л микробиологического агара). Как в жидкую, так и твердую среду добавляли антибиотик ампициллин (100 мкг/мл).

Культивирование бактерий в жидкой питательной среде проводили при 37 °С до ранней или средней логарифмической фазы. Культуру разбавляли свежей средой до плотности 0,01 (для штамма с *KatG*-плазмидой) — 0,1 (для штамма с *RecA*-плазмидой) единиц Мак-Фарланда (концентрация $3 \cdot 10^7$ — $3 \cdot 10^6$ клеток/мл, соответственно). Измерения проводили при помощи денситометра DEN-1В («Biosan»). Затем суспензию культиви-

ровали в течение 2 ч до ранней логарифмической фазы клеточного цикла. Аликвоты этой культуры (по 90 мкл) переносили в планшет и добавляли в них по 10 мкл тестируемого препарата и по 10 мкл диоксидина (кроме контрольных ячеек). В контрольные ячейки добавляли 10 мкл деионизированной воды. Для тестов с физическими мутагенами в ячейки вносили по 45 мкл культуры и 5 мкл тестируемого вещества требуемой концентрации. В контрольные ячейки добавляли 5 мкл дистиллированной воды.

Измерение люминесценции. После обработки планшет с пробами помещали в люминометр и инкубировали при 30 °С. Интенсивность биолюминесценции измеряли каждые 10–15 мин. Для измерения люминесценции использовали микропланшетный люминометр ЛМ-01Т («Immunotechco»). Фактор индукции SOS ответа (I^s) вычисляли по формуле:

$$I^s = \frac{L_e}{L_k} - 1, \quad (1)$$

где L_k — интенсивность люминесценции контрольной пробы (усл. ед.); L_e — интенсивность люминесценции опытной пробы (усл. ед.). Признаком достоверности эффекта SOS-индукции считали статистически достоверное превышение L_e над L_k , оцениваемое по t -критерию.

Показатель антимуtagenного потенциала, или протекторной активности (A , %), вычисляли по формуле:

$$A = \left(1 - \frac{I_a}{I_p}\right) \times 100\%, \quad (2)$$

где I_a — фактор индукции SOS-ответа исследуемым воздействием в присутствии протектора; I_p — фактор индукции SOS-ответа исследуемым воздействием.

Все эксперименты проводили в трех независимых повторах. В качестве характеристики протекторной активности исследуемой концентрации вещества использовали среднюю величину A в течение всего времени измерений.

Результаты и обсуждение

ДНК-протекторная и антиоксидантная активность олигопептидов

ДНК-протекторный эффект изучали, оценивая степень экспрессии генов SOS-ответа в клетках штамма *E. coli* MG1655 (*RecA-lux*).

Значительную протекторную активность пептидов в низких концентрациях при действии УФ длинной волны 311 нм в дозе $146,4 \cdot 10^{-7}$ Дж/м² наблюдали только для Изовилон в концентрациях 10^{-7} – 10^{-6} М (31,65 и 19,2 %, соответственно). При его использовании в более высоких концентрациях (10^{-5} – 10^{-3} М) протекторного эффекта не наблюдали.

При изучении защиты ДНК от генотоксического действия диоксидина были установлены протекторные эффекты всех пептидов, причем они были выражены сильнее по сравнению с УФ-облучением. Наиболее высокую протекторную активность (72,93 %) проявлял Изовилон в концентрации 10^{-5} М (рис. 1).

Способность олигопептидов инактивировать пероксид водорода, добавленный в среду или генерирующийся под действием УФ-облучения, изучали при помощи штамма *E. coli* MG 1655 (*KatG-lux*), рис. 2. При действии УФ с длиной волны 311 нм в дозе $146,4 \cdot 10^{-7}$ Дж/м² для концентраций 10^{-4} – 10^{-5} были отмечены весьма незначительные протекторные эффекты (19,7 % — для Везугена и 14,13 % — для Панкрагена, см. таблицу). В концентрации 10^{-3} М эти пептиды, также как Изовилон, протекторного действия не оказывали. При действии пероксида водорода в концентрации 10^{-3} М на биосенсорный штамм, высокий протекторный эффект (90,18 %) наблюдали для Панкрагена в концентрации 10^{-8} М, средний (42,85 %) — для Пинеалона в концентрации 10^{-8} М, для Везугена и Изовилон в концентрации 10^{-7} М протекторные эффекты составляли 23,59 и 25 %, соответственно. При использовании пептидов в концентрациях 10^{-5} – 10^{-4} протекторных эффектов не выявлено. В концентрации 10^{-3} М была отмечена незначительная протекторная активность исследуемых пептидов (см. рис. 2).

ДНК-протекторная и антиоксидантная активность чистого препарата лизина

Для лизина также был показан ДНК-протекторный эффект при действии диоксидина (рис. 3). При этом защиты от генотоксического действия УФ в данной модельной системе не наблюдали.

Антиоксидантная активность лизина в концентрациях 10^{-2} – 10^{-6} М зафиксирована как при перексиде водорода (рис. 4), так и при действии УФ 311 нм (рис. 5). Протекторная активность чистого лизина значительно превышала таковую для олигопептидов.

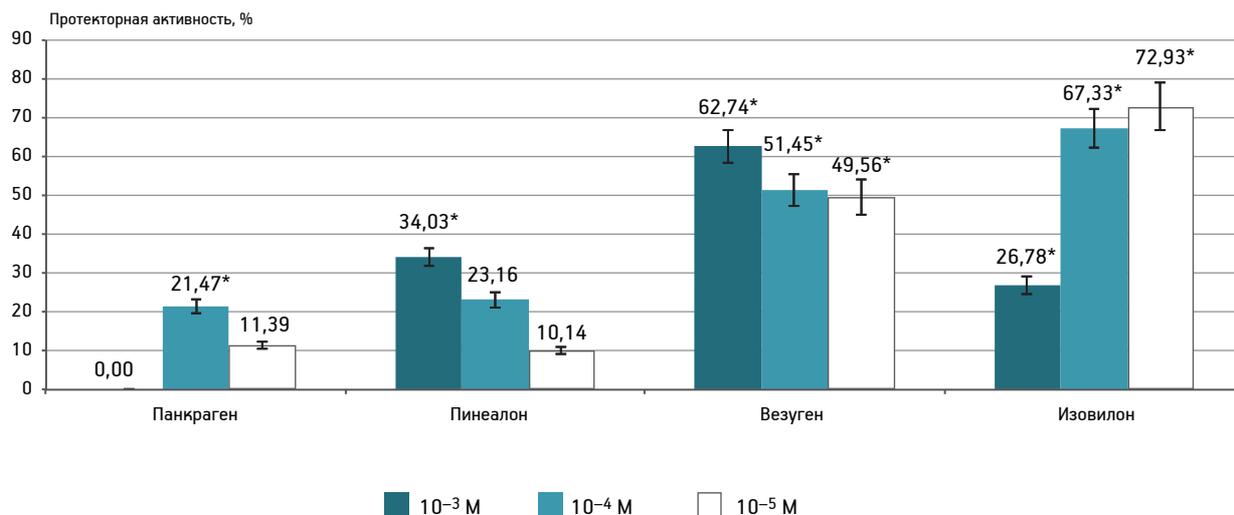


Рис. 1. ДНК-протекторная активность пептидов в низких концентрациях при действии диоксида в концентрации $2,25 \cdot 10^{-5}$ М на штамм *E. coli* MG 1655 (*RecA-lux*); * статистически значимые эффекты, $p < 0,05$ (t-критерий)

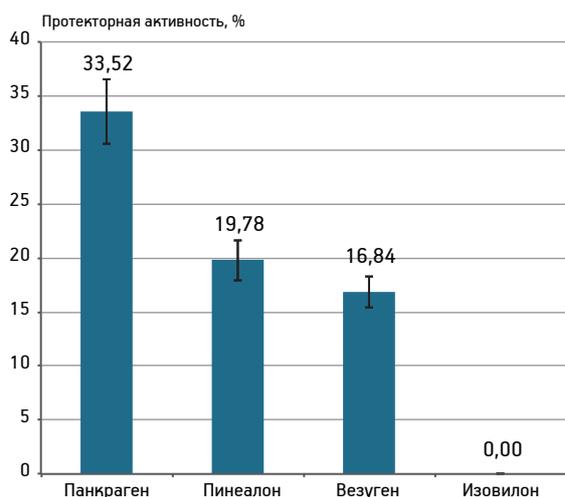


Рис. 2. Протекторная активность олигопептидов в концентрации 10^{-3} М при действии пероксида водорода в концентрации 10^{-3} М на штамм *E. coli* MG 1655 (*KatG-lux*).

Здесь и на рис. 3–5: все эффекты > 0 статистически значимы, $p < 0,05$ (t-критерий)

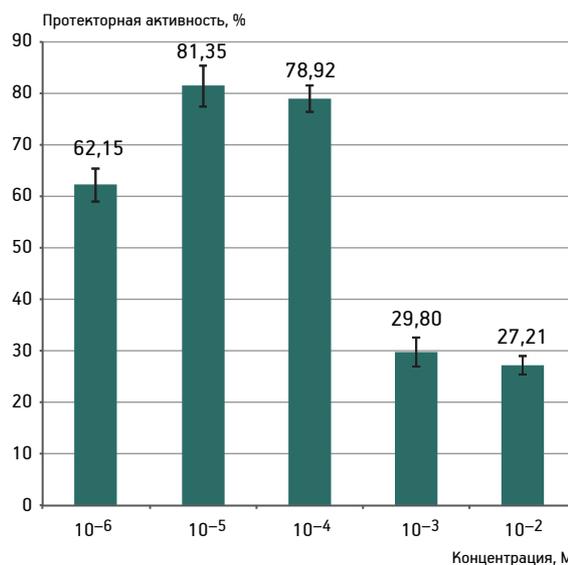


Рис. 3. ДНК-протекторная активность лизина в ряде концентраций при действии диоксида в концентрации $2,25 \cdot 10^{-5}$ М на штамм *E. coli* MG 1655 (*RecA-lux*)

Среди изученных олигопептидов наиболее эффективными ДНК-протекторами при действии химических индукторов являются Везуген (активность 62,74 % для концентрации 10^{-3} М) и Изовилон (72,93 % для концентрации 10^{-5} М). Диапазон эффективных концентраций — 10^{-4} – 10^{-8} М. Агентами взаимодействия являются пероксид водорода и, по-видимому, пероксильный радикал. Сравнительные данные по активности олигопептидов представлены в таблице.

Как можно видеть из представленных данных, протекторная активность в отношении повреждений ДНК, вызванных УФ, возрастает в ряду пептидов: Пинеалон (0 %)–Панкраген (6,1%)–Везуген (8,07%)–Изовилон (31,65 %). Очевидна прямая корреляция с содержанием остатков лизина в молекулах пептидов: Пинеалон (0 %)–Панкраген (25%)–Везуген (33,3%)–Изовилон (50 %). Можно заключить, что для защиты ДНК от повреждающего действия УФ с длиной волны 311 нм

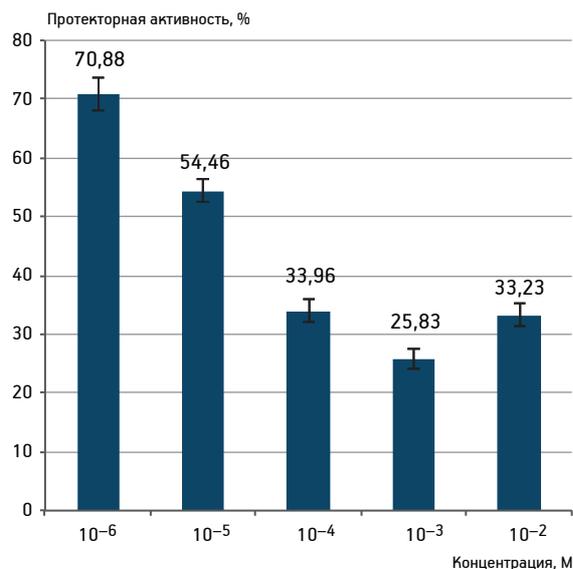


Рис. 4. Антиоксидантная активность лизина в ряде концентраций при действии пероксида водорода в концентрации 10⁻³ М на штамм *E. coli* MG 1655 (*KatG-lux*)

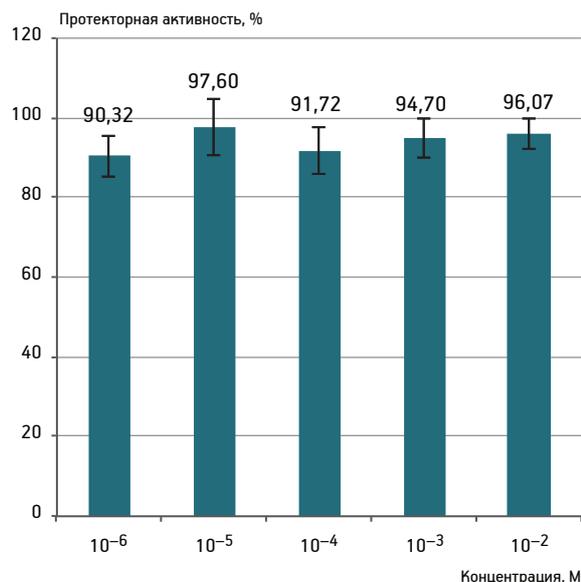


Рис. 5. Антиоксидантная активность лизина при действии УФ 311 нм в дозе 146,4·10⁻⁷ Дж/м² на штамм *E. coli* MG 1655 (*KatG-lux*)

ключевую роль играет наличие в молекуле остатка лизина (2,6-диаминогексановой кислоты).

Однако для производных лизина, таких как нацистелин (*nacystelyn*), показана способность инактивировать пероксид водорода [22]. Кроме того, в работе В. А. Чистякова и соавт. [14] было показано, что отдельные аминокислоты в водных растворах, в частности лизин, могут быть эффективны-

ми перехватчиками супероксид-аниона, а в работе И. В. Корниенко и соавт. [6] этот тезис подтвержден при помощи квантово-химических расчетов *ab initio*. В качестве причины высокой супероксид-устраняющей активности лизина названа его способность к образованию устойчивого межмолекулярного комплекса, сопровождающего переносом протона с аминокислоты на радикал. Подобный

Протекторная активность олигопептидов

| Протектор | Индуктор | Штамм | Эффективная концентрация, М | Максимальный эффект, % |
|-----------|-------------------|--|-----------------------------|------------------------|
| Панкраген | УФ311 нм | <i>E. coli</i> MG 1655 (<i>RecA-lux</i>) | 10 ⁻⁷ | 6,10 |
| | | <i>E. coli</i> MG 1655 (<i>KatG-lux</i>) | 10 ⁻⁴ | 14,13 |
| | Пероксид водорода | <i>E. coli</i> MG 1655 (<i>KatG-lux</i>) | 10 ⁻⁸ | 90,18 |
| Пинеалон | УФ311 нм | <i>E. coli</i> MG 1655 (<i>RecA-lux</i>) | – | – |
| | | <i>E. coli</i> MG 1655 (<i>KatG-lux</i>) | 10 ⁻⁴ | 3,77 |
| | Диоксидин | <i>E. coli</i> MG 1655 (<i>RecA-lux</i>) | 10 ⁻³ | 34,03 |
| Везуген | УФ311 нм | <i>E. coli</i> MG 1655 (<i>RecA-lux</i>) | 10 ⁻⁷ | 8,07 |
| | | <i>E. coli</i> MG 1655 (<i>KatG-lux</i>) | 10 ⁻⁴ | 19,7 |
| | Диоксидин | <i>E. coli</i> MG 1655 (<i>RecA-lux</i>) | 10 ⁻³ | 62,74 |
| | Пероксид водорода | <i>E. coli</i> MG 1655 (<i>KatG-lux</i>) | 10 ⁻⁷ | 23,59 |
| Изовилон | УФ311 нм | <i>E. coli</i> MG 1655 (<i>RecA-lux</i>) | 10 ⁻⁷ | 31,65 |
| | | <i>E. coli</i> MG 1655 (<i>KatG-lux</i>) | – | – |
| | Диоксидин | <i>E. coli</i> MG 1655 (<i>RecA-lux</i>) | 10 ⁻⁵ | 72,93 |
| | Пероксид водорода | <i>E. coli</i> MG 1655 (<i>KatG-lux</i>) | 10 ⁻⁷ | 25,00 |

механизм позволяет уменьшить энергию, необходимую для восстановления O_2 — до H_2O_2 .

Имеются данные и о прооксидантном действии лизина. В частности, описана его способность понижать активность ферментов антиоксидантной защиты [33]. Известно, что антиоксиданты могут проявлять и прооксидантный эффект в зависимости от концентрации, биохимического контекста и локализации в компартментах клетки [15]. По-видимому, дозы, использованные нами в данной работе, достаточно низки, чтобы прооксидантный эффект не проявился.

Для олигопептидов, содержащих лизин, отличных по структуре от изученных нами, продемонстрированы сходные свойства. Так, в работе [24] показана антиоксидантная активность олигопептида *SP-B*, выделенного из тканей ската *Raja porosa* и содержащего лизин. В работе [30] утверждается, что насыщенные лизином положительно заряженные пептиды ингибируют окисление липопротеидов и демонстрируют противовоспалительный эффект *in vitro* и *in vivo*.

Интересно отметить, что полимер лизина ϵ -поли-*L*-лизин (*ϵ -poly-L-lysine*) обладает антиоксидантными свойствами [37]. Можно предположить, что реализация антиоксидантного эффекта лизина происходит за счет перераспределения электронной плотности в молекуле, связанного с вовлеченностью лизина в пептидную связь.

При изучении защиты от действия диоксида азота эффект возрастает в ряду Панкраген—Пинеалон—Везуген—Изовилон, что, в принципе, также согласуется с выдвинутым предположением о решающей роли лизина. Протекторная активность Пинеалона в данном случае может обеспечиваться наличием в его молекуле ароматической аминокислоты триптофана, которая, как известно, обладает антиоксидантной активностью, обусловленной способностью перехватывать пероксильный радикал [19, 31].

При изучении защиты от пероксида водорода, генерирующегося при действии УФ, активность возрастает в ряду Пинеалон—Панкраген—Везуген, что также коррелирует с наличием лизина. Однако Изовилон не проявляет даже слабой активности в этом тесте, поэтому, по-видимому, в данном случае следует обратить внимание на содержание в молекуле других аминокислот с антиоксидантными свойствами, таких как аспарагиновая кислота [17]. При изучении защиты от пероксида водорода, внесенного в среду, корреляцию эффектов с содержанием отдельных аминокислот не наблюдали.

Пептидная регуляция существует на всех уровнях функционирования организма [3]. Показано, что пептиды, обладающие антиоксидантной активностью, способны корректировать нарушения взаимодействия генов в условиях окислительного стресса, возникающего при старении вследствие развития ряда патологических процессов (сердечно-сосудистые патологии, нарушение мозгового кровообращения, онкологические заболевания, нейродегенеративные болезни и т. д.) [5]. В частности, существует гипотеза о вызываемой пептидными регуляторами модификации характера экспрессии генов, кодирующих белки, являющиеся структурными компонентами митохондриальных мембран. Благодаря такой регуляции, пептиды, ингибируя свободнорадикальные процессы в мембране за счет химических реакций, способствуют сохранению ее целостности и обеспечивают нормальное функционирование регуляторных систем клетки [29].

Для таких пептидов, как Тималин, Вилон, Эпиталамин, Эпиталон, Кортексин и другие, показана возможность устранения вторичных иммунодефицитов, восстановление баланса про- и противовоспалительных цитокинов, нормализация состояния системы гемостаза. Одним из возможных механизмов действия можно было бы предположить эпигенетическое влияние пептидов на систему иммунитета и гомеостаз. Для Вилона (*Lys-Glu*) было показано, что он способен взаимодействовать с генами про- (*IL-6*, *IL-17A* и *TNF- α*) и противовоспалительных цитокинов (*IL-4* и *IL-10*), а также иммунного цитокина *IL-5* [7].

Механизмы действия регуляторных пептидов объясняют, с одной стороны, с точки зрения существования так называемого пептидного каскада. Суть данной гипотезы в том, что каждый пептид, помимо своей непосредственной биологической активности, обладает также способностью запускать сложный каскадный процесс, продолжающийся в течение промежутков времени, значительно превышающих время существования в организме отдельных молекул пептидов [2].

В качестве иного механизма действия регуляторных пептидов называют их процессинг. В короткие сроки путем активации определенных протеолитических ферментов в нужном компартменте образуется необходимое количество требуемых пептидов. При этом образующиеся короткие фрагменты длиной в 3–4 аминокислотных остатка могут оказаться значительно более эффективными, чем исходные соединения [3]. Как было по-

казано в работе В. Х. Хавинсона и соавт. (2015), тетрапептиды проявляют четкое тканеспецифическое влияние на пролиферативные процессы в соответствующих им тканях. Трипептиды менее тканеспецифичны, однако было показано, что несколько трипептидов (*T-38 (Lys-Glu-Asp)*, *T-34 (Glu-Asp-Gly)* и другие), в частности, усиливают пролиферацию и дифференцировку нейронов коры головного мозга, обладают нейропротекторным свойством, способствуют активации антиоксидантной системы и повышению работоспособности. Дипептиды, такие как *D4 (Asp-Gly)*, восстанавливают иммуногенез в тимусе и селезенке, индуцируя пролиферацию и дифференцировку *T*- и *B*-лимфоцитов, стимулируют процессы регенерации, способствуют увеличению средней продолжительности жизни [12].

Заключение

Таким образом, антиоксидантные свойства олигопептидов могут быть обусловлены не только непосредственным их взаимодействием с АФК, но и опосредованным влиянием на внутриклеточные механизмы поддержания антиоксидантного баланса. Применение олигопептидов, содержащих остаток лизина, представляется перспективным с точки зрения разработки новых препаратов-антиоксидантов и геропротекторов. При действии таких соединений на многоклеточные организмы аминокислотное окружение будет осуществлять адресную доставку остатков лизина, осуществляющих собственно антиоксидантный эффект в нужные органы, ткани и компартменты клетки, а также защищать лизин от взаимодействия с ферментами. Предложенная нами бактериальная модель позволяет проводить быстрый скрининг протекторных свойств и предварительный анализ эффективности данных соединений, выбирая наиболее эффективные композиции для дальнейших экспериментов на животных.

Литература

1. Анисимов В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения (2-е изд.). СПб.: Наука, 2008.
2. Ашмарин И.П., Обухова М.Ф. Регуляторные пептиды, функционально-непрерывная совокупность // Биохимия. 1986. Т. 51. № 4. С. 531–545.
3. Гомазков О.А. Физиологически активные пептиды: Справ. рук. М.: ИПГМ, 1995.
4. Золотухин П.В., Беланова А.А., Празднова Е.В. и др. Митохондрии как сигнальный узел и мишень для отключения фенотипа // Биохимия. 2016. Т. 81. № 4. С. 465–475.
5. Козина Л.С., Стволинский С.Л., Федорова Т.Н. и др. Изучение антиоксидантных и мембранопротекторных свойств коротких пептидов в модельных экспериментах // Вопр. биол., мед. и фармацевтич. химии. 2008. № 6. С. 31–36.
6. Корниенко И.В., Клецкий М.Е., Олехнович Л.П. и др. Механизм антиоксидантного действия полипептидов: экспериментальное и теоретическое изучение // Биотехнология. 2001. № 2. С. 83.
7. Кузник Б.И., Хавинсон В.Х., Тарновская С.И., Линькова Н.С. Эпигенетическое действие регуляторных пептидов на цитокиновый профиль и систему гемостаза // Вестн. гематол. 2013. Т. IX. № 4. С. 56–58.
8. Лысенко А.В., Арутюнян А.В., Козина Л.С. Пептидная регуляция адаптации организма к стрессорным воздействиям. СПб.: Изд-во ВМА, 2005.
9. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
10. Козина Л.С. Влияние биологически активных тетрапептидов на свободнорадикальные процессы // Бюл. exper. биол. 2007. Т. 143. № 6. С. 690–692.
11. Хавинсон В.Х., Линькова Н.С., Умнов Р.С., Червякова Н.А. Пептидергическая регуляция функций нервной и иммунной системы при старении // Здоровье — основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения. 2013. Т. 8. № 2. С. 697–698.
12. Хавинсон В.Х., Чалисова Н.И., Линькова Н.С. и др. Зависимость тканеспецифического действия пептидов от количества аминокислот, входящих в их состав // Фундаментальные исследования. 2015. № 2. С. 497–503.
13. Чалисова Н.И., Лесняк В.В., Ноздрачев А.Д. Протекторное влияние аминокислот и олигопептидов при сочетании действия с цитостатиком в культуре лимфоидной ткани // Докл. АН. 2009. Т. 434. № 5. С. 57–61.
14. Чистяков В.А., Корниенко И.В., Клецкий М.Е. и др. Супероксидустраняющая активность некоторых аминокислот в водных растворах // Биофизика. 2005. Т. 50. № 4. С. 601–605.
15. Чистяков В.А. Неспецифические механизмы защиты от деструктивного действия активных форм кислорода // Успехи соврем. биол. 2008. Т. 128. № 3. С. 301–308.
16. Чмыхало В.К., Беланова А.А., Смирнов Д.С. и др. Тиоредоксин-доменные белки человека. Ч. 1: Нуклеоредоксин // Валеология. 2015. № 4. С. 92–99.
17. Abad L. V., Rellve L. S., Aranilla C. T. et al. Natural antioxidants for radiation vulcanization of natural rubber latex // Polymer degradat. stabil. 2002. Vol. 76. № 2. P. 275–279.
18. Bao X. M., Wu C. F., Lu G. P. Atorvastatin inhibits homocysteine-induced oxidative stress and apoptosis in endothelial progenitor cells involving Nox4 and p38MAPK // Atherosclerosis. 2010. Vol. 210. № 1. P. 114–21.
19. Christen S., Peterhans E., Stocker R. Antioxidant activities of some tryptophan metabolites: possible implication for inflammatory diseases // Proc. nat. Acad. Sci. 1990. Vol. 87. № 7. P. 2506–2510.
20. Elias R. J., Kellerby S. S., Decker E. A. Antioxidant activity of proteins and peptides // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2008. Vol. 48. № 5. P. 430–441.
21. Funato Y., Miki H. Redox regulation of WNT signaling via nucleoredoxin // Free Radic. Res. 2010. Vol. 44. № 4. P. 379–88.
22. Gillissen A., Jaworska M., Orth M. et al. Nacystelyn, a novel lysine salt of N-acetylcysteine, to augment cellular antioxidant defence in vitro // Respir. med. 1997. Vol. 91. № 3. P. 159–168.
23. Hirota K., Murata M., Sachi Y. et al. Distinct roles of thio-redoxin in the cytoplasm and in the nucleus. A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF-kappaB // J. biol. Chem. 1999. Vol. 274. № 39. P. 27891–27898.
24. Hu F. Y., Chi C. F., Wang B., Deng S. G. Two novel antioxidant nonapeptides from protein hydrolysate of skate (*Raja porosa*) muscle // Marine drugs. 2015. Vol. 13. № 4. P. 1993–2009.

25. Jaiswal A. K. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression // *Free Radic. Biol. Med.* 2004. Vol. 36. № 10. P. 1199–207.
26. Jin D. Y., Chae H. Z., Rhee S. G., Jeang K. T. Regulatory role for a novel human thioredoxin peroxidase in NF-kappaB activation // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. № 49. P. 30952–30961.
27. Jung K. A., Choi B. H., Nam C. W. et al. Identification of aldo-keto reductases as NRF2-target marker genes in human cells // *Toxicol. Lett.* 2013. Vol. 218 № 1 P. 39–49.
28. Kim H. J., Jung K. J., Yu B. P. et al. Modulation of redox-sensitive transcription factors by calorie restriction during aging // *Mech. Ageing Dev.* 2002. Vol. 123. № 12. P. 1589–1595.
29. Khavinson V. K. Peptides and Ageing // *Neuroendocr. Lett.* 2002. Vol. 23. (Suppl. 3. Special iss.). P. 143.
30. Narasimhulu C. A., Selvarajan K., Brown M., Parthasarathy S. Cationic peptides neutralize Ox-LDL, prevent its uptake by macrophages, and attenuate inflammatory response // *Atherosclerosis*. 2014. Vol. 236. № 1. P. 133–141.
31. Reiter R. J., Tan D.-X., Cabrera J., D'Arpa D. Melatonin and tryptophan derivatives as free radical scavengers and antioxidants: Tryptophan, Serotonin, and Melatonin // *Adv. Exp. Med. Biol.* 1999. Vol. 467. P. 379–387.
32. Rharass T., Lemcke H., Lantow M. et al. Ca²⁺-mediated mitochondrial reactive oxygen species metabolism augments WNT/β-catenin pathway activation to facilitate cell differentiation // *J. Biol. Chem.* 2014. Vol. 289. № 40. P. 7937–7951.
33. Seminotti B., Ribeiro R. T., Amaral A. U. et al. Acute lysine overload provokes protein oxidative damage and reduction of antioxidant defenses in the brain of infant glutaryl-CoA dehydrogenase deficient mice: A role for oxidative stress in GA I neuropathology // *J. Neurol. Sci.* 2014. Vol. 344. № 1. P. 105–113.
34. Suliman H. B., Carraway M. S., Tatro L. G., Piantadosi C. A. A new activating role for CO in cardiac mitochondrial biogenesis // *J. Cell Sci.* 2007. Vol. 120. № 2 P. 299–308.
35. Taguchi K., Fujikawa N., Komatsu M. et al. Keap1 degradation by autophagy for the maintenance of redox homeostasis // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.* 2012. Vol. 09. № 34. P. 13561–13566.
36. Ushio-Fukai M., Alexander R. W., Akers M., Griending K. K. p38 Mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II: Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273. № 24. P. 15022–15029.
37. Ye R., Xua H., Wanb C. et al. Antibacterial activity and mechanism of action of ε-poly-L-lysine // *Biochem. biophys. res. commun.* 2013. Vol. 439. № 1. P. 148–153.
38. Zaviigelsky G. B., Kotova V. Y., Manukhov I. V. Action of 1, 1-dimethylhydrazine on bacterial cells is determined by hydrogen peroxide // *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagenesis.* 2007. Vol. 634. № 1. P. 172–176.
39. Zhang Q., Pi J., Woods C. G., Andersen M. E. A systems biology perspective on Nrf2-mediated antioxidant response // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2010. Vol. 244. № 1. P. 84–97.

Adv. geront. 2016. Vol. 29. № 5. P. 776–783

*E. V. Prazdnova¹, M. S. Mazanko¹, P. V. Zolotukhin¹, E. Y. Kharchenko¹, V. A. Chistyakov¹,
V. A. Arutiunov², L. S. Kozina²*

THE ROLE OF A LYSINE RESIDUE IN THE ANTIOXIDANT AND DNA-PROTECTIVE ACTIVITY OF OLIGOPEPTIDES

¹ D. I. Ivanovsky Academy of Biology and Biotechnologies, Southern Federal University, 194/1, pr. Stachki, Rostov-na-Donu 344090; ² St. Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, 3, pr. Dinamo, Saint-Petersburg 197110; e-mail: milakozina@mail.ru

Oligopeptides present in the living cell were found to have antioxidative activity and to be involved in the regulation of antioxidant balance by interaction with the redox-dependent cellular signaling cascades. Experiments on animal models have shown that the introduction of oligopeptides causes geroprotective and adaptogenic effects. In the present work, we investigate the biological action of a number of synthetic oligopeptides using bacterial biosensors. This approach allows us to precisely estimate the antioxidant properties of the compounds without affecting their participation in regulatory cascades typical to eukaryotic cells. It has been shown that the ability of oligopeptides to protect cells from action of physical prooxidant factors (UV-irradiation) is related to the presence of a lysine residue in the molecule. For chemical pro-oxidants (dioxidine), we have observed a similar, though less strict pattern. This effect also correlates with DNA-protective activity of the investigated oligopeptides.

Key words: oligopeptides, lysine, antioxidants, redox-dependent cascades, bacteria, biosensors